



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

Estudio de la fisiopatología de las alteraciones óseas asociadas a la enfermedad de Gaucher

Tesista: Lic. Andrea Natalia Crivaro

Directora: Dra. Paula Adriana Rozenfeld

Codirectora: Dra. María Victoria Delpino

Año: 2020

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos de La Plata (IIFP) perteneciente a la UNLP y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata (UNLP)

AGRADECIMIENTOS

Sin dudas, la parte más difícil de plasmar en pocas palabras.

En principio, quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por la formación académica, y a la ANPCyT y CONICET por otorgarme las becas para el desarrollo de mi tesis doctoral.

Estos cinco años pasaron rápido pero dejaron huellas. Huellas que trascienden el plano profesional para instalarse en el plano personal, donde muchos de los compañeros de trabajo pasan a ser amigos y consejeros... Cada uno puso su granito de arena para que las cosas salieran adelante, así que a todos ellos les dedico parte de esta tesis. En el plano personal también me gustaría agregar a mis amigos y familia, porque a veces el trabajo se lleva a casa y son ellos los que deben entender forzosamente las ausencias. A ellos, la otra parte.

Esperando no olvidarme de nadie, mis agradecimientos particulares:

A Paula, mi directora, por animarse a incorporarme en su grupo de investigación y por su generosidad de darme libertad de trabajo e igualdad de oportunidades.

A Vic, mi codirectora, por su buena predisposición y por compartir su punto de vista para salir de callejones “sin salida”.

A Juan, por aceptar una hermana menor en el grupo de trabajo y compartir su sabiduría día a día. A Maxi, por alegrar esos días con música; y a Costy por ayudarme con la organización en el laboratorio y bajarme de las nubes cuando mis experimentos eran muy ambiciosos. A los tres, gracias por su paciencia y apoyo emocional.

A las chicas DIEL que siempre me dieron una mano cuando la necesité.

A Coqui, mi madrina de laboratorio, que siempre se hacía presente de la nada para salvarme las papas.

A cada miembro del IIFP, gracias por su calidez.

A los habitantes del “purgatorio” con quienes compartí experimentos, mates, anécdotas y risas... Muchas risas! Después de la mudanza del instituto nos dividimos en el Box 4 y el Box V. Yo quedé en el Box V por lo que quisiera agradecer en particular a Dave, Pao, Agus, Costy, Iva, Juan, Maxi, Pablo, Lean y Mati por hacer el día a día más ameno, por compartir sus experiencias y porque somos una combinación Intensamente perfecta.

A George, mi amigo personal, que nunca dejó de alentarme a pesar de la distancia.

A mis amigos de antaño, que siempre están presentes y hacen el camino más fácil con su compañía.

A mi familia, por enseñarme a soñar y a seguir mis convicciones. Por su eterna comprensión y apoyo.

A Gonza, por ser mi compañero incondicional.

A todos, ¡Gracias totales!

RESUMEN

La enfermedad de Gaucher (EG) es una patología genética de almacenamiento lisosomal de herencia autosómica recesiva causada por la deficiencia de la enzima lisosomal glucocerebrosidasa (GCasa). Esta deficiencia conduce a la acumulación de glucosilceramida, principalmente en macrófagos. Las manifestaciones clínicas principales son: anemia, trombopenia, hepatoesplenomegalia, fracturas óseas, dolores óseos, osteopenia y osteonecrosis. Los pacientes que se encuentran en tratamiento aún sufren de problemas óseos y los mecanismos del daño tisular han comenzado a estudiarse recientemente. En el presente trabajo de tesis se propuso estudiar nuevos mecanismos celulares y moleculares con el objetivo de encontrar blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos tratamientos.

Para el estudio de estos mecanismos se emplearon dos modelos *in vitro* murinos, en los cuales la actividad de la GCasa es inhibida mediante el uso de un epóxido (CBE) que inhibe irreversiblemente la enzima; y un modelo *in vitro* humano basado en células madre mesenquimales (MSCs) derivadas de individuos sanos y pacientes con enfermedad de Gaucher.

Pudimos demostrar en los tres modelos estudiados una estimulación en la formación de osteoclastos como también la disminución en la funcionalidad de osteoblastos y osteocitos cuando la actividad de la GCasa era inhibida, lo que en conjunto llevarían a un daño óseo. Por otro lado, demostramos que los adipocitos Gaucher derivados de las MSCs tenían mayor potencial de diferenciación que los adipocitos de individuos sanos. Al realizar el tratamiento con Velaglucerasa alfa (GCasa recombinante) en el modelo *in vitro* humano, no se logró recuperar la función de los osteoblastos Gaucher. Sin embargo, con el tratamiento con Semaforina 3A recombinante (proteína de secreción que tiene función osteogénica) se observó que la función de mineralización tuvo una mejora.

Como conclusión general, se observó que el contexto Gaucher provoca alteraciones en las células del tejido óseo lo que explica, al menos en parte, la problemática ósea de los pacientes. La Semaforina 3A podría considerarse para ser utilizada como complemento de las terapias actuales.

Mecanismos propuestos en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher que se derivan de los resultados de esta tesis

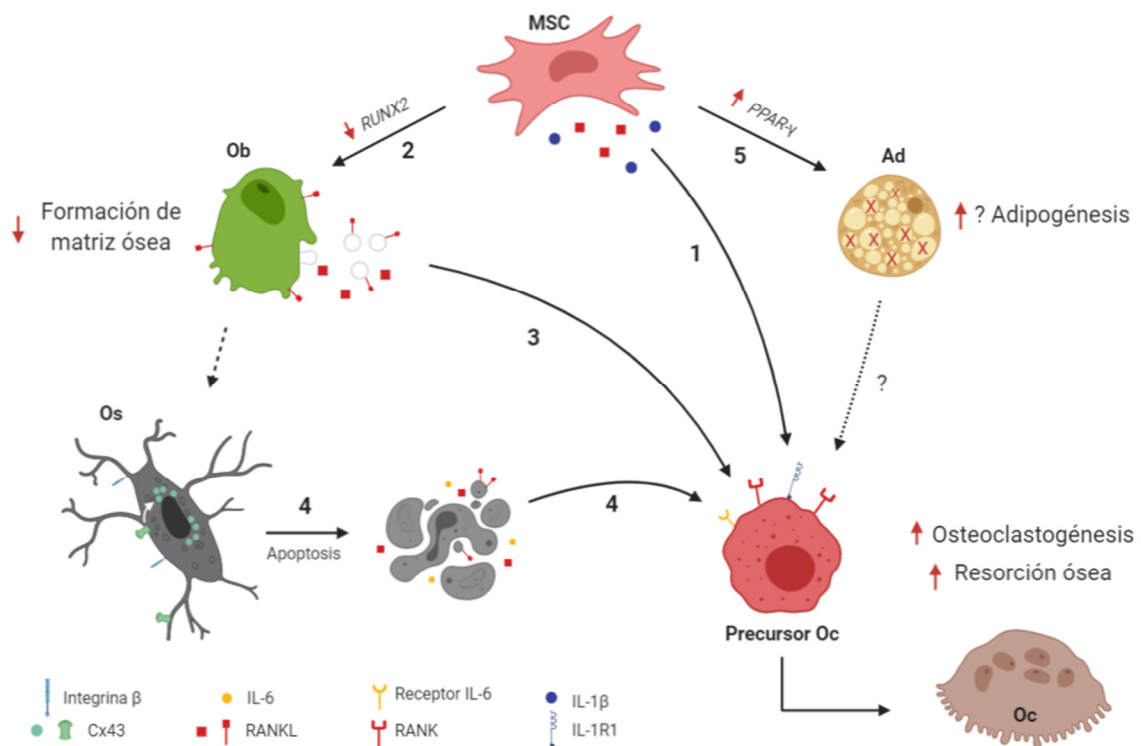


Fig. 23 Mecanismos propuestos involucrados en la problemática ósea de la enfermedad de Gaucher. Mediadores que se encuentran modulados en células Gaucher con respecto a las control.

1. MSC secreta RANKL e IL-1β estimulando la osteoclastogénesis con el consecuente incremento en la resorción ósea. **2.** MSC subexpresa *RUNX2* inhibiendo la diferenciación a Ob y disminuyendo la formación ósea. **3.** Ob secreta RANKL y microvesículas que contienen RANKL, estimulando la resorción ósea. **4.** Os subexpresa proteínas de uniones intercelulares que podría derivar en la apoptosis de estas células liberando cuerpos apoptóticos y RANKL, los cuales provocan la estimulación de la resorción ósea. **5.** MSC sobreexpresa *PPAR-γ* estimulando la diferenciación a Ad que no muestran una acumulación de gotas lipídicas. MSC: célula madre mesenquimal; Ob: osteoblasto; Ad: adipocito; Os: osteocito; Oc: osteoclasto.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de este trabajo han sido publicados en una revista internacional y en comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

Artículo

“Osteocyte Alterations Induce Osteoclastogenesis in an *In Vitro* Model of Gaucher Disease”. Bondar C., Ormazabal M., Crivaro A., Ferreyra-Compagnucci M., Delpino MV., Rozenfeld P., Mucci JM. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 13;18(1) doi: 10.3390/ijms18010112.

Presentación a congresos modalidad póster

“Osteoblast and adipose differentiation of Gaucher mesenchymal stem cells”. Andrea N. Crivaro, Constanza M. Bondar, Juan M. Mucci, Maximiliano Ormazabal, Ricardo A. Feldman, Victoria Delpino, Paula Rozenfeld. *Molecular Genetics and Metabolism. Annual WORLDSymposium.* Orlando, Florida, EEUU (2019) Feb 01;2(S43) <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.12.013>.

“Gaucher hMSCs present an altered osteoblast and adipose differentiation”. Crivaro A., Bondar C, Mucci JM, Ormazabal M, Delpino V, Rozenfeld P. Reunión anual SAI, SAIC, SAFIS. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (2018)

“Osteocytes contribute to bone pathology in Gaucher Disease”. Bondar Constanza, Mucci Juan Marcos, Ferreyra Malena, Crivaro Andrea, Ceci Romina, Ormazabal Maximiliano, Delpino Victoria, Rozenfeld Paula. *Annual WORLDSymposium.* San Diego, California, EEUU (2017).

“Osteocytes and IL-6 contribute to bone pathology in Gaucher Disease”. Andrea N. Crivaro, Juan M Mucci, Malena Ferreyra, Constanza Bondar Maximiliano Ormazabal, Victoria Delpino, Paula Rozenfeld. LXI SAIC, LXIV SAI, XLVIII SAFE, VII NANOMEDar, AACyTAL. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (2016)

INDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	3
PUBLICACIONES	5
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	11
La Enfermedad de Gaucher	17
Clasificación	18
Mutaciones	20
Clínica	20
Biomarcadores	20
Enfermedad de Gaucher neuropática	22
Enfermedad de Gaucher no neuropática	23
Fisiología y fisiopatología ósea	25
Fisiología	25
Fisiopatología ósea de la Enfermedad de Gaucher	31
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Ratones	37
Líneas celulares	37
Cultivos de las líneas celulares	37
Mantenimiento con medios completos	37
Diferenciación	38
Preparación de sobrenadantes condicionados	39
Aislamiento de vesículas/cuerpos apoptóticos a partir de sobrenadantes condicionados	39
Ensayo de diferenciación a osteoclastos con sobrenadantes condicionados	40
Evaluación de la actividad de resorción de osteoclastos	41
Evaluación del efecto de la enzima GCasa recombinante (Velaglucerasa) sobre la actividad de osteoblastos	42
Efecto dosis respuesta de Semaforina 3A en osteoblastos	42
Medición de actividades enzimáticas	43
Glucocerebrosidasa (GCasa)	43
Proteína Kinasa C (PKC)	43
Determinación de glucosilceramida	44
Determinación de apoptosis y ciclo celular	45
Anexina V / Ioduro de Propidio	45
TUNEL	45
Ciclo celular	45
Microscopía de fluorescencia	46
Tinciones	46
Alizarin Red (ARS)	46
Sirius Red (SR)	47
Fosfatasa alcalina	47
Oil Red	48

Medida de citoquinas -----	48
Ensayos moleculares -----	48
Extracción y retro-transcripción (RT) de ARN-----	48
Diseño de cebadores (<i>primers</i>)-----	49
PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)-----	50
Análisis estadístico -----	50
RESULTADOS -----	51
Capítulo 1: Rol de los osteocitos en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher ----	52
Validación del modelo-----	53
Proteínas de uniones intercelulares: Integrina- β y Conexina-43 (Cx43)-----	54
Apoptosis-----	56
Evaluación de toxicidad CBE-----	56
Evaluación de componentes liberados por osteocitos apoptóticos y su relación con la osteoclastogénesis-----	57
Discusión-----	62
Capítulo 2: Rol de los osteoblastos en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher -----	65
Validación del modelo-----	66
Evaluación de la diferenciación a osteoblastos de MC3T3-E1-----	66
Evaluación del proceso de apoptosis en MC3T3-E1 diferenciadas a osteoblastos-----	69
Evaluación de los componentes liberados por MC3T3-E1 diferenciadas a osteoblastos y su relación con la osteoclastogénesis-----	70
Discusión-----	74
Capítulo 3: Rol de las Células Madre Mesenquimales (MSCs) en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher -----	77
Caracterización de las MSCs-----	78
Diferenciación de MSCs a osteoblastos-----	79
Estudio del efecto de tratamientos para osteoblastos Gaucher-----	81
Efecto de las MSCs y osteoblastos sobre la Osteoclastogénesis-----	85
Diferenciación de MSCs a adipocitos-----	88
Discusión-----	91
CONCLUSIONES -----	94
PERSPECTIVAS FUTURAS -----	98
BIBLIOGRAFÍA -----	99

ABREVIATURAS

ACTB - β -actina

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ALP - Fosfatasa alcalina

ARN - Ácido ribonucleico

ARS - *Alizarin Red*

BCA - Ensayo de ácido bicinónico

C/EBP - Proteína de unión potenciadora de CCAAT

CBE - Conduritol- β -epóxido

CCL18 - Quemoquina con motivo C-C ligando 18

CHIT - Quitotriosidasa

CLN2 - Lipofuscinosis ceroidea neuronal infantil tardía

ColA1 - Colágeno tipo I

Ctrl - Control

Cx43 - Conexina 43

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM - Medio esencial mínimo modificado por Dulbecco

EG - Enfermedad de Gaucher

ELISA - Ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FI - *Fold Increase*

GBA - Glucocerebrosidasa (Gen)

GCasa - Glucocerebrosidasa o beta-glucosidasa ácida (Proteína)

GDI - Gen de interés

GPNMB - Glicoproteína no-metastásica B

hs - Horas

IL- Interleuquina

LAL - Déficit de lipasa acida lisosomal

M-CSF - Factor de estimulación de colonias de macrófagos

MEM - Medio esencial mínimo

min - Minutos

MPS - Mucopolisacaridosis

MSCs - Células Madre Mesenquimales

OPG - Osteoprotegerina

PBMC - Células mononucleares de sangre periférica

PBS - Buffer fosfato salino

PKC - Proteína Kinasa C

PPAR- γ - Receptor γ activado por el proliferador de peroxisoma

qPCR - Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RANK - Receptor activador del factor nuclear kappa-B

RANKL - Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B

Runx2 - Factor de transcripción asociado a runt2

seg - Segundos

Sem3A - Semaforina 3A

SFB - Suero fetal bovino

SR - *Sirius Red*

TBS - Buffer Tris salino

TGF - Factor de crecimiento tumoral

TLC - Cromatografía en capa fina

TNF - Factor de necrosis tumoral

TRAP - Fosfatasa ácida resistente a tartrato

TRE - Terapia de reemplazo enzimático

Wnt - Sitio de integración relacionado con ingles

INTRODUCCIÓN

Enfermedades lisosomales

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal son errores hereditarios del metabolismo que afectan la función de los lisosomas y se encuentran dentro del grupo de las enfermedades poco frecuentes por su baja incidencia en la población. Se estima que este número se encuentra entre 1/5.000 de nacidos vivos (Boustany, 2013). Las enfermedades lisosomales más comunes son la enfermedad de Fabry (hasta 2,5 casos por 100.000 hombres), enfermedad de Gaucher (hasta 2 casos por 100.000 individuos), leucodistrofia metacromática (hasta 2,5 casos por 100.000 individuos) y enfermedad de Pompe (hasta 2,5 casos por 100.000 individuos) (“US National Library of Medicine, Genetics Home Reference - NIH,” 2018).

La mayoría de las enfermedades lisosomales son desórdenes autosómicos recesivos, aunque existen tres enfermedades cuyo patrón es ligado al cromosoma X (Fabry, Hunter y Danon). Estos trastornos son originados por mutaciones en genes que codifican proteínas lisosomales, tales como enzimas, proteínas integrales de membrana, transportadores, modificadores enzimáticos o activadores, afectando su función (Platt et al., 2011). La ausencia o reducción de una enzima lisosomal trae como consecuencia la acumulación de sustratos no metabolizados dentro de estas estructuras (lisosomas), lo que finalmente conduce a la disfunción y muerte celular desencadenando los diferentes síntomas característicos de cada enfermedad (Rigante et al., 2017).

Inicialmente, la clasificación de las enfermedades lisosomales se basó en el tipo de sustrato que se acumula. Así, la enfermedad que acumula lípidos se clasificaba como lipidosis; la que acumula mucopolisacáridos entraba en la categoría de mucopolisacaridosis; etc. Aunque parte de esta clasificación aún se mantiene, se actualiza continuamente sobre la base de los conocimientos recientemente adquiridos sobre la patología molecular subyacente (Filocamo et al., 2011; Platt et al., 2012). Los detalles se pueden ver en la Tabla I.

Tabla I Clasificación de las Enfermedades Lisosomales según el mecanismo de acumulación. Se incluyen varios ejemplos con su causa, órganos y sistemas afectados. Adaptado de (Platt et al., 2012)

Mecanismo de acumulación lisosomal	Ejemplos de enfermedad	Proteína lisosomal deficiente (símbolo del gen)	Sustrato(s) almacenados	Principales órganos periféricos afectados	Patología del SNC
Deficiencia de actividad enzimática lisosomal (mutación de enzima lisosomal, enzima activadora o cofactor enzimático)	Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa (glicosilasparaginasa, AGA)	aspartilglucosamina (N-acetilglucosaminil-asparagina)	Esqueleto, tejido conectivo	+
	Enf. de Fabry	α -Galactosidasa A (GLA)	Globotriaosilceramida, globotriaosilsefingosina	Riñón, corazón, sistema vascular	-
	Enf. de Gaucher tipo 1, 2, y 3	β -Glucocerebrosidasa (GBA)	Glucoilceramida, glucoilsefingosina	Bazo/hígado, médula ósea, hueso	+
	Gangliosidosis GM1	β -Galactosidasa (GLB1)	Gangliósido GM1, oligosacáridos	Esqueleto, corazón	+
	Enf. de Krabbe (Leucodistrofia de células globoides)	Galactocerebrosidasa (GALC)	Galactosilceramida	Corazón	+
	Leucodistrofia metacromática	Arisulfatasa A (ARSA)	Sulfogalactosilceramida		+
	Mucopolisacaridosis	Enzimas involucradas en el catabolismo de mucopolisacáridos	Mucopolisacáridos	Cartilago, hueso, corazón, pulmones	+
	Deficiencia múltiple de sulfatasas	SUMF1 (enzima generadora de formilglicina, necesaria para activar sulfatasas)	Múltiples, incluyendo glicosaminoglicanos sulfatados	Bazo/hígado, hueso, piel	+
	Enf. de Pompe Enf. de Sandhoff	α -Glucosidasa (GAA) β -hexosaminidasa A y B (HEXB)	Glucógeno Gangliósido GM2	Músculo esquelético	- +
Defecto en el tráfico de enzimas lisosomales	Mucopolipidosis tipo II (enf. de células I) y Mucopolipidosis tipo IIIA (polidistrofia pseudo-Hurler)	N-acetilglucosamina fosforil transferasa α/β (GNPTAB)	Carbohidratos, lípidos, proteínas	Esqueleto, corazón	+ (II) +/- (IIIA)
Defectos en proteínas lisosomales solubles no enzimáticas	Enf. de Niemann-Pick tipo C2	NPC2 (proteína soluble lisosomal que se une a colesterol)	Colesterol y esfingolípidos	Hígado	+
Defectos en proteínas lisosomales de membrana	Cistinosis	Cistinosin (transportador de cisteína, CTNS)	Cistina	Riñón, ojo	-
	Enf. de Danon	Proteína de membrana asociada a lisosomas 2, variante de <i>splicing</i> A (LAMP2)	Glucógeno y otros componentes autofágicos	Músculo cardíaco y esquelético	+
	Desorden de almacenamiento de ácido siálico libre	Sialina (transportador de ácido siálico, SLC 1 7A5)	Ácido siálico libre	Hígado/bazo, esqueleto	+
	Mucopolipidosis IV	Mucopolipina-1 (MCOLN1)	Mucopolisacáridos y lípidos	Ojo	+
	Enf. de Niemann-Pick tipo C1	NPC1 (proteína de membrana involucrada en el transporte de lípidos)	Colesterol y esfingolípidos	Hígado	+
Desórdenes lisosomales de etiología no elucidada	Lipofuscinosis ceroides neuronal (NCLs, incluyendo la enf. de Batten)	Grupo diverso de enfermedades con defectos genéticos en genes aparentemente no relacionados, muchos de los cuales no están asociados al sistema lisosomal. Se desconoce si estos genes cooperan en vías celulares comunes.	La lipofuscina autofluorescente es una característica común, con signos clínicos convergentes (por ej. defectos visuales/ceguera)		+

Las manifestaciones clínicas, en general, aparecen en forma insidiosa y se produce afectación de muchos órganos. Algunas manifestaciones clínicas características son el dismorfismo facial, manifestaciones viscerales y hematológicas, afectaciones esqueléticas, manifestaciones oculares y, en muchos casos, afecciones neurológicas las cuales son extremadamente variables. Asimismo, cualquier otro órgano o sistema puede verse afectado en las enfermedades lisosomales, incluido el corazón, piel, riñones, tracto

respiratorio superior, pulmones e intestino (Parenti et al., 2015). El primer paso para el diagnóstico es la sospecha clínica por parte del médico. Este paso, en general, puede durar años debido a un retraso en la asociación de la aparición de los síntomas con el diagnóstico confirmatorio, por lo que la falta de conocimiento de este tipo de patologías por la comunidad médica es un componente clave en dicho retraso.

El diagnóstico de laboratorio de las enfermedades lisosomales debidas a deficiencias enzimáticas incluye una evaluación bioquímica, donde la medición de la actividad de enzimas lisosomales en leucocitos extraídos de sangre total es el *gold standard* para proporcionar el diagnóstico definitivo. Este estudio se complementa generalmente con el estudio genético molecular para la identificación de las mutaciones patogénicas. La actividad de las enzimas puede analizarse utilizando sustratos sintéticos de 4-metilumbeliferona (4-MU) disponibles comercialmente (Ceci et al., 2011; Wenger et al., 2002, 2003). Además de confirmarse el diagnóstico mediante estos estudios, también se puede llevar a cabo el consejo genético familiar (Filocamo et al., 2011).

Cabe mencionar que las enfermedades lisosomales presentan rasgos comunes entre sí, lo que llevaría a pensar que se pudiesen trasladar las conclusiones de los hallazgos de unas a otras. Sin embargo, la experiencia indica que aún dentro de la misma enfermedad, existe amplia heterogeneidad en las manifestaciones clínicas, por lo que es difícil establecer una generalización de los mecanismos fisiopatológicos asociados a cada una de ellas. A nivel celular, se han estudiado diversas vías que pueden ser causales de las manifestaciones clínicas y entre ellas se puede encontrar la acumulación de sustratos primarios que pueden inhibir enzimas catabólicas y transportadores, lo cual resultará en una acumulación secundaria de sustratos (Grassi et al., 2019). Esta acumulación de sustratos primarios y secundarios puede tener efectos sobre otras organelas aparte del lisosoma (mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas, etc.), impactando en funciones celulares como la autofagia e inflamación (Lieberman et al., 2012).

En la actualidad, el tratamiento más utilizado en la clínica para algunas enfermedades lisosomales (enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, MPS I, MPS VI, MPS II, MPS IVA, MPS VII, LAL, CLN2 y enfermedad de Pompe) es la Terapia de Reemplazo Enzimático que consiste en la administración intravenosa de la enzima recombinante específica de cada enfermedad con intervalos de una o dos semanas (Drelichman et al.,

2015; Li, 2018). También existen tratamientos aprobados y en fase clínica que apuntan a la inhibición de síntesis de sustrato o a la administración de chaperonas químicas que mejoran el plegamiento y estabilizan la enzima mutada (Guce et al., 2011; Narita et al., 2016; Solomon et al., 2017). Los avances en el ámbito de la ingeniería genética permitieron idear y desarrollar terapias génicas para algunas de estas enfermedades, principalmente las que tienen componente neurológico ya que la enzima recombinante administrada por infusión intravenosa no logra atravesar la barrera hematoencefálica. Los vectores virales adenoasociados (AAV) para tratar enfermedades del sistema nervioso se han evaluado en modelos de grandes y pequeños animales para alfa-manosidosis, leucodistrofia de células globoides, gangliosidosis GM1 y GM2, mucopolisacaridosis, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Sanfilippo (MPS IIIB), Pompe y enfermedad de Gaucher (Gurda et al., 2019; Marcó et al., 2019; Massaro et al., 2018; Ronzitti et al., 2019). Estos vectores también están siendo testeados en pruebas clínicas en donde las propias células madre hematopoyéticas del paciente son modificadas *ex vivo* y luego transfundidas al paciente. Sólo algunas células estarían genéticamente corregidas, pero serían las suficientes para sobreexpresar el producto génico y lograr la corrección cruzada (Platt et al., 2018). Otra estrategia en fase de prueba es la corrección de las mutaciones por una copia funcional del gen mediante la técnica de CRISPR/Cas9. Los primeros ensayos de terapia génica que usan esta técnica fueron para la MPS II e involucran la corrección mediada por AAV (Sharma et al., 2015).

Los detalles de las terapias aprobadas para las distintas enfermedades lisosomales se pueden ver en la tabla II; mientras que las terapias en fase de pruebas clínicas se pueden ver en la tabla III.

Tabla II (Pág. 16) →

Tabla III (Pág. 17) →

Tabla II. Terapias aprobadas. CNS, sistema nervioso central; EMA, Agencia Europea de Medicamentos; ERT, terapia de reemplazo enzimático; LSD, enfermedad de almacenamiento lisosomal; MPS, mucopolisacaridosis. Los nombres de las enzimas recombinantes representan el nombre genérico. El uso de α y β en nombre de la enzima natural es para distinguir entre diferentes preparaciones de las enzimas recombinantes (Platt et al., 2018).

Disease	Type of therapy	Drug name	Comments
Gaucher disease	Recombinant enzyme ^a	<ul style="list-style-type: none"> • Imiglucerase • Velaglucerase alfa • Taliglucerase alfa 	ERT is effective only for type I Gaucher disease (the non-neuronopathic phenotype) and is not effective for types II and III (neuronopathic phenotypes)
	Substrate reduction therapy	<ul style="list-style-type: none"> • Miglustat • Eliglustat 	Effective only for non-neuronopathic Gaucher disease
Fabry disease	Recombinant enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • Agalsidase beta • Agalsidase alfa 	<ul style="list-style-type: none"> • Agalsidase alfa and beta have the same amino acid composition but different glycosylation • Agalsidase beta was approved by the US FDA, although both drugs are approved by the EMA
	Chaperone therapy	Migalastat	Active site inhibitor and/or chaperone
Pompe disease	Recombinant enzyme	Alglucosidase alfa	Reverses cardiac but not skeletal muscle abnormalities in Pompe disease and is approved by the EMA
MPS I (Hurler–Scheie and Scheie syndromes)	Recombinant enzyme	Laronidase	Effective for attenuated forms of MPS I (Hurler–Scheie and Scheie syndromes) but is not effective for severe form of MPS I (Hurler syndrome)
MPS II (Hunter syndrome)	Recombinant enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • Idursulfase • Idursulfase beta 	<ul style="list-style-type: none"> • Not effective for CNS or skeletal disease • Idursulfase beta approval by Korean Ministry of Food and Drug Safety
MPS VI (Maroteaux–Lamy syndrome)	Recombinant enzyme	Galsulfase	Efficacy variable and depends on the severity of the disease and the age at which ERT was started
MPS IV (Morquio syndrome A)	Recombinant enzyme	Elosulfase	Not effective on bone disease, which might need surgical intervention
MPS VII (Sly syndrome)	Recombinant enzyme	Vestronidase alfa	Approved for use in paediatric and adult patients
Lysosomal acid lipase deficiency	Recombinant enzyme	Sebelipase alfa	Multiple disease-related lipid abnormalities reduced
Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2 disease)	Recombinant enzyme	Cerliponase alfa	First treatment available for any form of Batten disease; requires intracerebroventricular administration
Niemann–Pick disease type C	Substrate reduction therapy	Miglustat	First small-molecule modifier of CNS disease in an LSD

Tabla III. Terapias en fase de prueba clínica. Los ensayos se enumeran en bases de datos disponibles públicamente y están disponibles en ClinicalTrials.gov. AAV, virus adenoasociado; ARSA, arilsulfatasa A; HSC, células madre hematopoyéticas; LSD, enfermedad de almacenamiento lisosomal; LV, lentivirus; MPS, mucopolisacaridosis (Platt et al., 2018).

Disease	Type of therapy	Drug name or procedure	Clinical trial number examples
α -Mannosidosis	Recombinant enzyme	rhLAMAN Velmanase alfa	EudraCT Number: 2016-001988-36
Niemann–Pick disease type B	Recombinant enzyme	rhASM Olipudase alfa	NCT02004691
Niemann–Pick disease type C	Proteostasis modifier	Arimoclomol	NCT02612129
	Disease-specific	Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (VTS 720)	NCT02534844
Metachromatic leukodystrophy	Recombinant enzyme	rhASA	NCT01887938
	Gene therapy	LV/ARSA-transduced HSC transplantation	NCT01560182
	Gene therapy	LV/ARSA/ABCD1 transduced autologous HSC transplantation	NCT02559830
	Gene therapy	Intracerebral AAVrh.10cuARSA	NCT01801709
MPS I	Gene therapy	Intravenous AAV/ SB-318-IDUA	NCT02702115
	Anti-inflammatory	Adalimumab	NCT03153319
MPS II	Anti-inflammatory	Adalimumab	NCT03153319
	Gene therapy	AAV/SB-913-IDS	NCT03041324
MPS IIIA (Sanfilippo syndrome A)	Recombinant enzyme	rhHNS	NCT01299727
	Gene therapy	Intravenous scAAV9.U1a.hSGSH	NCT02716246
MPS IIIB (Sanfilippo syndrome B)	Recombinant enzyme	BMN250	NCT02754076
	Substrate reduction therapy	Genistein	EudraCT: 2013-001479-18
	Gene therapy	Intracerebral rAAV2/5-hNAGLU	NCT03300453
MPS VI	Gene therapy	Intravenous rAAV9.CMV.hNAGLU	NCT03315182
	Gene therapy	AAV2/8.TBG.hARSB	NCT03173521
Fabry disease	Substrate reduction therapy	Lucerastat	NCT02930655
	Substrate reduction therapy	lbiglustat	NCT0228460
	Gene therapy	LV galactosidase- α -transduced stem cells	NCT02228460
Gaucher disease	Substrate reduction therapy	lbiglustat	NCT02843035
	Chaperone therapy	Ambroxol	NCT01463215
Pompe disease	Gene therapy	Intramuscular AAV9-DES-hGAA	NCT02240407
Tay–Sachs and Sandhoff disease	Chaperone therapy	Pyrimethamine	NCT01102686

La Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher (EG) es una patología genética autosómica recesiva de almacenamiento lisosomal causada por mutaciones patogénicas en el gen *GBA* que codifica para la enzima lisosomal glucocerebrosidasa o beta-glucosidasa ácida (GCasa). El gen que codifica esta enzima se encuentra localizado en el cromosoma 1 (q21 – q31) (Devine et al., 1982). La deficiencia de actividad de esta enzima produce la acumulación de su sustrato (glucosilceramida) principalmente en macrófagos, causando un agrandamiento de estas células que en el contexto de la enfermedad se denominan Células de Gaucher. Otra variable de la Enfermedad de Gaucher, es la mutación en el gen *PSAP* que codifica para el cofactor saposina C necesario para la función normal de

la GCasa. La deficiencia de saposina C desemboca en fenotipos Gaucher tipo 1 y 3 (Kang et al., 2018; Tamargo et al., 2012).

La EG afecta hasta 2 casos por 100.000 individuos en todo el mundo. La forma más común (Tipo 1) se estima que afecta al 90% de los pacientes diagnosticados en Europa, América del Norte y Australia y su prevalencia varía entre 0,70 a 1,75 individuos cada 100.000. Hay una mayor prevalencia de Gaucher tipo 1 entre las personas de etnia judía Ashkenazi con una incidencia de nacimientos de aproximadamente 1 individuo cada 850-1.000 (“US National Library of Medicine, Genetics Home Reference - NIH,” 2018; Zimran et al., 2018). En el año 2008 se creó el Grupo Latinoamericano para la Enfermedad de Gaucher y entre sus objetivos principales se encuentran el fomento de consensos regionales y difundir el ingreso de pacientes al registro internacional. Hasta abril del 2010 ingresaron 5828 pacientes de todo el mundo entre los cuales 911 son de Latinoamérica donde Brasil es el país con el mayor número de pacientes (511). Según el informe médico, dentro de Latinoamérica el 95% de los pacientes padece Gaucher Tipo 1, el 1% Gaucher Tipo 2 y el 4% Gaucher Tipo 3 (Drelichman et al., 2012).

Clasificación

Históricamente la EG se clasificó en tres fenotipos clínicos dependiendo de la ausencia (Tipo 1) o presencia de manifestaciones neurológicas y si dichas manifestaciones se presentaban de manera aguda (Tipo 2) o crónica (Tipo 3). A partir del reconocimiento de un subconjunto de pacientes con EG tipo 1 que desarrollan Parkinson y neuropatías periféricas, se ha expandido el concepto de clasificación a un continuo de fenotipos que varían desde asintomáticos hasta complicaciones neurológicas severas que llevan a la muerte antes del año de vida (Fig. I). Esto lleva a pensar que la clasificación de EG debe modificarse periódicamente a medida que se introducen nuevas variantes. En consecuencia, se ha desarrollado una nueva clasificación ampliada en base a la literatura existente (Alaei et al., 2019) (Fig. II). En la actualidad, la clasificación en tres fenotipos clásicos aún sigue siendo de utilidad para el delineamiento de las formas clínicas básicas.

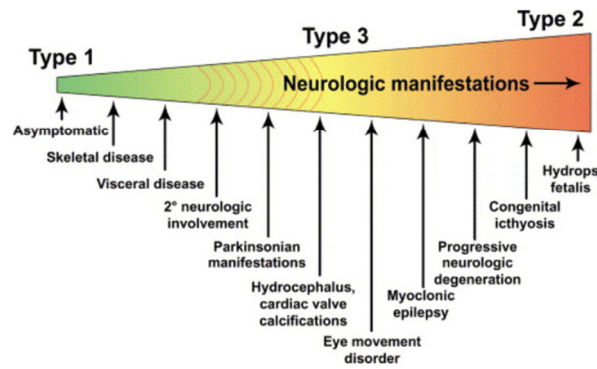


Fig. I Espectro de fenotipos. En la zona indicada por líneas curvas no está claro si la neuropatología es el resultado de la deficiencia enzimática o de una causa secundaria (Sidransky, 2004).

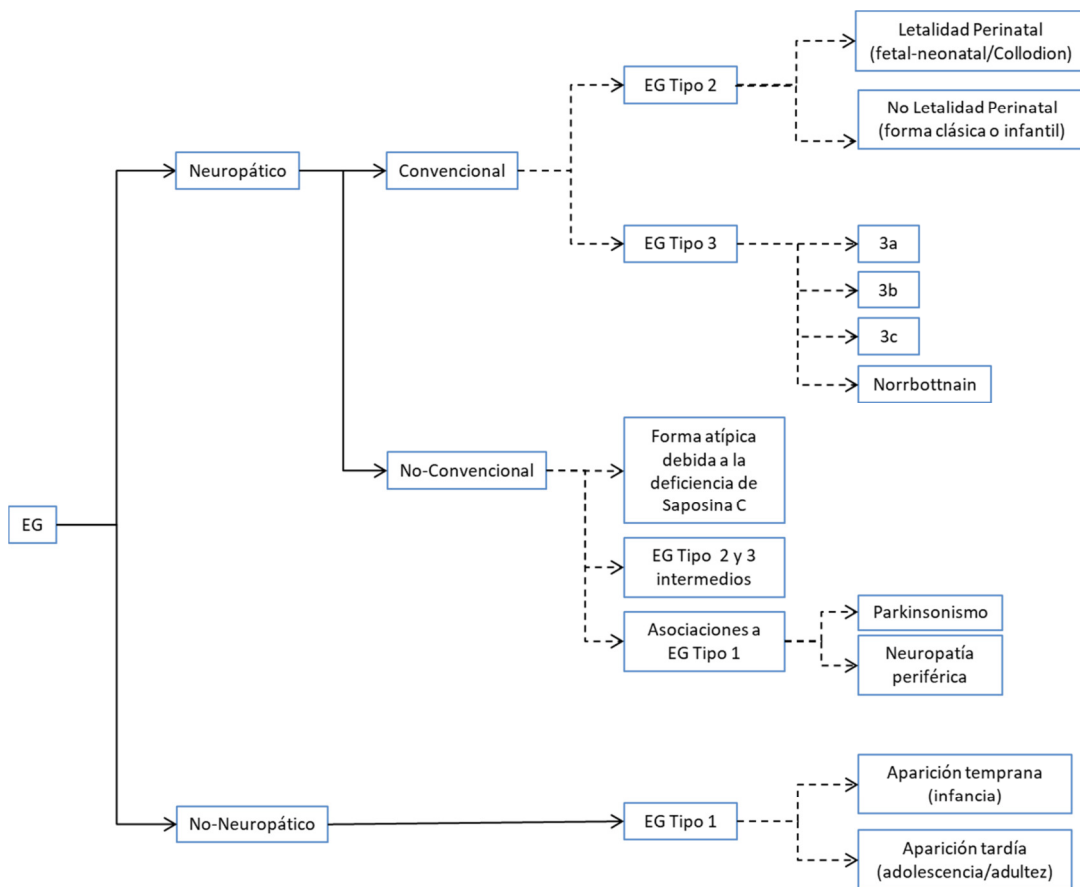


Fig. II Nueva clasificación expandida de la Enfermedad de Gaucher (EG) (Alaei et al., 2019).

Mutaciones

El estudio de mutaciones en pacientes Gaucher ha revelado la existencia de cuatro mutaciones de mayor frecuencia en el gen *GBA* que dan cuenta del 95% de las mutaciones en la población judía Ashkenazi y del 75% en la población general. Esas mutaciones son: c.1226A>G(N370S), c.1448T>C (L444P), c.84_85dupG (84GG) y c.115+1G>A (IVS2+1), que se encuentran en los exones 9, 10, 2 y 2, respectivamente (Balwani et al., 2011; Horowitz et al., 1993). Para encarar el estudio genético se procede en primera instancia a la búsqueda de esas cuatro mutaciones frecuentes, sobre todo si los pacientes pertenecen a dicha etnia. Ante la ausencia de esas mutaciones, se debe proseguir con la secuenciación completa del gen, que contiene 11 exones, para encontrar los dos alelos mutados.

Clínica

La sospecha de EG puede basarse en la presencia de visceromegalias no atribuibles a otras causas, presencia de anemia y/o trombocitopenia, dolores óseos, osteopenia, osteoporosis, fracturas, presencia de células de Gaucher en biopsias de hígado, ganglio y médula ósea y/o alteraciones neurológicas, cardíacas, apraxia óculomotora. Sin embargo, la presencia de células de Gaucher en biopsias no es suficiente para el diagnóstico, ya que células con morfología similar pueden evidenciarse debido a otras condiciones hematológicas por lo que se las denomina “seudo Gaucher”. Por otro lado, la ausencia de células de Gaucher en biopsias no descarta la posibilidad de que el paciente tenga la enfermedad, por lo que el diagnóstico confirmatorio se realiza mediante determinación de la actividad de la enzima GCasa en leucocitos o fibroblastos de pacientes (Raghavan et al., 1980).

Biomarcadores

Para el seguimiento clínico de la enfermedad se utilizan biomarcadores plasmáticos, los cuales se encuentran aumentados en pacientes con EG y presentan cierta correlación con la severidad de los signos clínicos.

Quitotriosidasa

La quitotriosidasa es una enzima secretada por macrófagos activados y la determinación de su actividad está catalogada como biomarcador clásico, ya que su actividad en plasma está marcadamente incrementada en los pacientes con EG. Sus valores pueden ser correlacionados con la evolución de la enfermedad y con la respuesta al tratamiento. El incremento de quitotriosidasa puede ser hasta 600 veces mayor con respecto a la media control. Sin embargo, existe una limitación para su aplicación como biomarcador ya que el 6-10% de la población general padece de una duplicación de 24 pares de bases (c.1049_1072dup24) en el exón 10 del gen *CHIT1* (MIM 600031) que está asociado a una deficiencia en esta enzima. De esta manera, no se puede utilizar a la quitotriosidasa como biomarcador en personas homocigotas para esta mutación (Drelichman et al., 2013).

Quemoquina CCL18/PARC

La Quemoquina CCL18/PARC es producida y secretada en grandes cantidades por las células de Gaucher. Se encuentra aumentada entre 10 y 40 veces en el suero de pacientes y sus niveles poseen una buena correlación con la severidad de la enfermedad (Aerts et al., 2005). La medida de los niveles de esta quemoquina mediante la técnica de ELISA es útil para monitorear la enfermedad, sobre todo en pacientes que no poseen actividad quitotriosidasa debido a mutaciones en la misma.

Glucosilesfingosina

La glucosilesfingosina se encuentra aumentada 200 veces por encima de los valores normales en pacientes Gaucher tipo 1 y sería específico para esta enfermedad ya que no se han observado cambios en plasma en ninguna otra condición. También se ha observado que los niveles en plasma de glucosilesfingosina correlacionan directamente con la hepatomegalia que presentan los pacientes y con la deficiencia en GCasa. Sin embargo, los mismos difieren si el paciente es homocigota o heterocigota para una mutación específica de la enzima defectuosa, siendo mayor para la combinación heterocigota N370S/L444P. Con respecto a las alteraciones óseas, no se encontró clara

evidencia de que las cantidades de este lípido en plasma se correlacionen (Dekker et al., 2015).

En la mayoría de los pacientes Gaucher, la glucosilesfingosina en plasma tiende a disminuir con los años de tratamiento (Murugesan et al., 2016).

Glicoproteína no-metastásica B (GPNMB)

Los marcadores antes mencionados son de utilidad para el seguimiento de la EG de tipo 1, pero hasta el presente no hay marcadores específicos para la EG de tipo 2 y 3 (Aerts et al., 2005; Gary et al., 2018). Hay quienes proponen como biomarcador a la glicoproteína no-metastásica B (GPNMB) para los tipos 2 y 3, ya que observaron una correlación directa con la gravedad de los síntomas (Zigdon et al., 2015). Dichos estudios se hicieron en necropsias de cerebros de pacientes que habían sido diagnosticados con enfermedad de Gaucher y con muestras de fluido espinal. Los estudios de cromatografía líquida y espectroscopía de masa en tandem, mostraron que los niveles de quitotriosidasa-1 (CHIT1) y de GPNMB estaban significativamente elevados (Zigdon et al., 2015). Los resultados obtenidos son alentadores, sin embargo la toma de muestras es bastante invasiva, por lo que se está estudiando partir de muestras de sangre. Una posibilidad podría ser la medición de la expresión de GPNMB (mRNA) en las PBMCs del paciente teniendo en cuenta que la GPNMB es expresada en melanocitos, osteoclastos, macrófagos, neuronas y astrocitos (Ripoll et al., 2007; Tanaka et al., 2012).

Enfermedad de Gaucher neuropática

Las enfermedades de Gaucher del tipo Neuropáticas (tipos 2 y 3) son menos frecuentes, aparecen a edad más temprana y se caracterizan por presentar manifestaciones neurológicas. La EG tipo 2 constituye la minoría de los casos con una frecuencia estimada de 1/500.000 nacimientos vivos; mientras que la EG tipo 3 afecta a menos de 1/100.000 personas (Aviner et al., 2009; Martins et al., 2009).

La forma aguda de la enfermedad neurológica, EG tipo 2 (OMIM 230900), es un trastorno muy raro que puede causar la muerte antes de los tres años de vida. Los signos clínicos incluyen una grave afectación neurológica del tronco encefálico, hidropesía fetal, ictiosis, alteraciones oculares como estrabismo y apraxia oculomotora, retraso en el desarrollo, disfagia y problemas respiratorios (Kang et al., 2018).

Menos del 10% de los pacientes con la EG desarrolla la llamada forma neuropática crónica, o EG tipo 3 (OMIM 231000), sus características clínicas son apraxia oculomotora, epilepsia mioclónica y sordera nerviosa. Además presentan una participación sistémica variable y, a veces, en los pulmones se observa una prominente infiltración alveolar (Drelichman et al., 2013). También se ha detectado que estos pacientes sufren manifestaciones esqueléticas que incluyen dolor óseo severo, osteopenia, crisis óseas agudas y fracturas (Schwartz et al., 2018).

Enfermedad de Gaucher no neuropática

La forma crónica no neuropática o EG tipo 1 (OMIM # 230800) es la más frecuente de los tres tipos, representando aproximadamente un 90% de los casos (Sawkar et al., 2006). Su incidencia es de aproximadamente 1 individuo cada 850-1.000 dentro de la población de judíos Ashkenazi, y de hasta 2 individuos cada 100.000 en el resto de la población (“US National Library of Medicine, Genetics Home Reference - NIH,” 2018; Zimran et al., 2018). El inicio de los síntomas puede ocurrir a cualquier edad y aunque se desconocen las causas exactas, la epigenética y las regulaciones a nivel de microRNA podrían ser de relevancia (Hassan et al., 2017). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son principalmente hematológicas, viscerales y óseas. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que algunos pacientes desarrollan una enfermedad extrapiramidal parecida al parkinsonismo, cuyas bases no se comprenden completamente (Chérin et al., 2010; E. Sidransky et al., 2009). Se conoce que mutaciones en el gen *GBA*, aún en personas heterocigotas, son los determinantes genéticos de mayor prevalencia para la enfermedad de Parkinson (Sidransky et al., 2009).

Los pacientes con EG tipo 1 presentan alteraciones hematológicas debidas al compromiso de la medula ósea, caracterizadas por anemia y trombopenia. Por otro lado, también sufren de hepatoesplenomegalia (donde el hígado y bazo están infiltrados con macrófagos activados en los sinusoides esplénicos y reemplazando a las células de Kupffer en el hígado). La alteración esplénica provoca un mayor secuestro de células sanguíneas contribuyendo a la anemia y trombopenia (Grabowski, 2006). En casos poco frecuentes también se puede encontrar infiltración pulmonar severa y una calcificación de válvula cardíaca (Sirrs et al., 2002).

La patología esquelética es variable, progresiva y no se resuelve espontáneamente. El dolor óseo agudo o crónico es común en los pacientes. La deformidad radiológica en forma de “frasco de Erlenmeyer” es característica pero no determinante y se debe a una alteración en el remodelamiento de la metafisis del fémur distal. El esqueleto sufre tumefacción, osteólisis, osteopenia, desmineralización generalizada, infartos medulares, expansión medular, adelgazamiento óseo cortical y osteoporosis con riesgo aumentado de fracturas. Los pacientes pueden tener osteosclerosis, como resultado del remodelamiento aberrante de un infarto óseo con deposición de calcio. La osteonecrosis o necrosis avascular (muerte ósea), se cree que es secundaria a la isquemia por infarto crónico, y se observa generalmente en la cabeza femoral, humero proximal, rodilla y cuerpos vertebrales, alterando la función de las grandes articulaciones de la cadera, hombros y rodillas. El conjunto de manifestaciones óseas es la complicación más grave y se asocia a discapacidad y a una reducida calidad de vida. Si bien el daño óseo es una característica común de la EG, involucra mecanismos complejos por lo que las bases fisiopatológicas de las complicaciones óseas aún no se conocen completamente (Cox et al., 2012). En las descripciones clásicas de la fisiopatogenia de la enfermedad, las células de Gaucher eran la clave de la explicación. Sin embargo, actualmente se asume que la simple presencia de material de depósito dentro de las células no constituye la base para explicar las alteraciones observadas.

La Terapia de Reemplazo Enzimático y la Terapia de Reducción de Sustrato logran disminuir el número de macrófagos que infiltran la medula ósea y el hígado, revierten las citopenias (anemia y trombopenia), reducen la aparición de episodios de osteonecrosis y mejoran la mineralización ósea (Pastores et al., 2007; Sims et al., 2008; Weinreb et al., 2002). A pesar de las mejoras, las manifestaciones relacionadas a la injuria ósea no son totalmente eliminadas, manteniéndose las crisis de dolor óseo en

aproximadamente un 40% de los pacientes (Oliveri et al., 2019; K. B. Sims et al., 2008) En la actualidad, luego de 2 décadas de experiencia con Terapia de Reemplazo Enzimático, los especialistas ya no ven a la EG como un desorden caracterizado por citopenias y visceromegalias sino como una patología principalmente esquelética con defectos en la estructura y metabolismo óseo (Deegan et al., 2011).

Fisiología y fisiopatología ósea

Fisiología

El hueso es un tipo de tejido conectivo especializado que provee un sistema de soporte estructural a todos los vertebrados superiores, permitiendo la locomoción y protección de órganos vitales, y también tiene una función central tanto en el mantenimiento de la homeostasis de calcio como en el reservorio de factores de crecimiento y citoquinas.

Los huesos largos, que son los más afectados en la enfermedad de Gaucher, están formados por hueso cortical y hueso trabecular. El hueso cortical forma una envoltura densa alrededor de la cavidad de la médula y consta de sistemas de Havers. Éstos son estructuras de láminas concéntricas de tejido óseo que rodean un canal central que contiene vasos sanguíneos. En cambio, el hueso trabecular o esponjoso tiene una densidad más baja y consiste en una malla interconectada de trabéculas óseas separadas por espacios que contienen médula ósea (Fig. III) (Ralston, 2013)

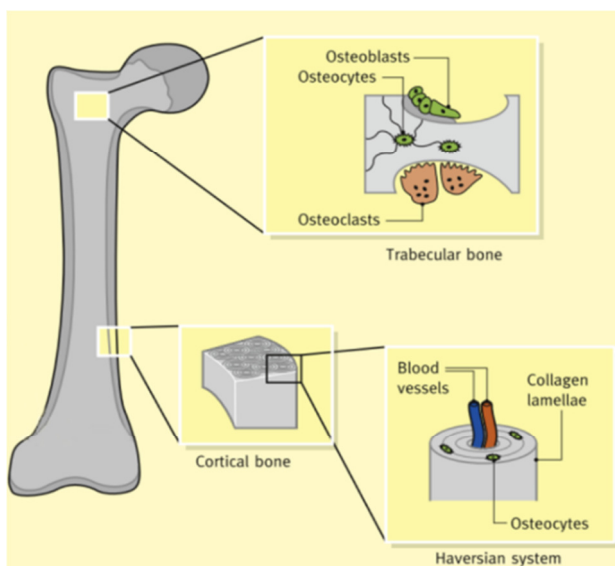


Fig. III Estructura ósea. Esquema del hueso trabecular y hueso cortical con su sistema Harvesiano (Ralston, 2013)

El hueso se encuentra formado por un 50-70% de matriz mineral, compuesta en su mayoría por hidroxiapatita en forma de cristales $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y pequeñas cantidades de carbonato, magnesio y fosfato ácido. El 20-40% se compone de matriz orgánica llamada osteoide que contiene un 90% de proteínas colágenas, en su mayoría colágeno tipo I, con trazas de colágeno tipo III y V. Un 10% está compuesto por proteoglicanos, glicoproteínas, proteínas con grupos γ -carboxiglutámicos, citoquinas y proteínas morfogenéticas óseas. El resto de los componentes del hueso se divide entre un 5-10% de agua y aproximadamente un 3% de lípidos (Clarke, 2008).

En condiciones normales, el hueso se encuentra en un estado de continuo remodelamiento, proceso que permite mantener la salud ósea al reparar lesiones derivadas de la fatiga crónica y requerimientos físicos. Para que se pueda llevar a cabo, es necesaria la participación de dos tipos celulares: los osteoclastos y los osteoblastos; también hay que tener en cuenta la interacción de los otros tipos celulares presentes en el sistema óseo y que pueden influir en este proceso: los osteocitos y las células adiposas de la médula ósea.

Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas (de tres o más núcleos) que se forman a partir de la fusión de precursores del linaje monocito/macrófago en un proceso denominado osteoclastogénesis y son los responsables de la resorción de la matriz ósea (Teitelbaum, 2000). Para que este proceso ocurra, es necesaria la presencia de dos factores clave: el factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF), generado por los osteoblastos; y el ligando del receptor activado del factor nuclear κB (RANKL), generado por osteoblastos y osteocitos (Hodge et al., 2007), cuyo receptor se encuentra en los precursores de los osteoclastos. El M-CSF se une a su receptor c-fms promoviendo la supervivencia y proliferación de estas células (Feng et al., 2013; Rosenfeld et al., 2015), mientras que el RANKL se une a su receptor RANK de membrana activando la fusión y diferenciación de los precursores hacia un osteoclasto maduro por la activación de la vía que involucra al factor nuclear de transcripción kappa-B (NF- κB) (Capulli et al., 2014). Por otro lado, la actividad biológica del eje RANK-RANKL se encuentra regulada por un inhibidor natural osteoprotegerina (OPG) que es secretado

principalmente por los osteoblastos y que actúa como un receptor soluble señuelo de RANKL inhibiendo su unión a su receptor RANK (Liu et al., 2015).

Tras la fijación de los osteoclastos al hueso, se observan pequeños puntos de F-actina llamados podosomas. Al comienzo del proceso, los mismos se encuentran separados y desorganizados, pero luego se reorganizan en anillos pequeños para formar una zona de sellado formado por podosomas. En el paso siguiente, el osteoclasto diferenciado forma una membrana ondulada por la cual va a acidificar el microambiente extracelular por medio de una bomba de protones que alcanzará un pH aproximado de 4,5. En este contexto, el medio ácido moviliza la fase mineral del hueso y proporciona un entorno óptimo para la resorción de la matriz orgánica por la catepsina K (Bellido et al., 2014).

Osteoblastos

Los osteoblastos son las células responsables de la formación del hueso y se originan a partir de células mesenquimales residentes en la médula ósea, diferenciándose primero a pre-osteoblastos y luego a osteoblastos maduros dependiendo de la activación específica de factores de transcripción inducidos por las proteínas morfogenéticas y del desarrollo (Bellido et al., 2014). *RUNX2* se considera como el factor de transcripción de osteoblastos maestro esencial para el desarrollo óseo ya que regula muchos genes que determinan el fenotipo de los osteoblastos (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Stein et al., 2004). El crecimiento y diferenciación de osteoblastos se puede dividir en tres etapas: una vez que se induce la expresión de *Runx2* y *Col1A1* en los progenitores de osteoblastos comienza la etapa de proliferación durante la cual los progenitores adquieren actividad fosfatasa alcalina, convirtiéndose en pre-osteoblastos. Éstos experimentan cambios morfológicos, transformándose en células cuboidales grandes. Luego, sigue la etapa de maduración de osteoblastos que se caracteriza por una mayor expresión de las proteínas de la matriz ósea como la Osteocalcina, BSP I y II y colágeno tipo I para obtener osteoblastos maduros. Estas células quedarán atrapadas en el osteoide recién depuesto donde se producirá la mineralización de esta matriz que se evidencia por la deposición de calcio en forma de cristales de hidroxapatita que provienen de vesículas secretadas desde la superficie de los osteoblastos (Anderson, 2003; Capulli et al., 2014; Setzer et al., 2009). Luego de cumplir su función, los osteoblastos pueden tener distintos destinos: morir por apoptosis, quedar embebidos en

la matriz ósea para diferenciarse a osteocitos o transformarse en células de revestimiento o *lining-cells* en la superficie del hueso (Bellido et al., 2014; Capulli et al., 2014).

Recientemente se ha demostrado que los osteoblastos expresan una proteína de secreción llamada semaforina 3A (Sem3A) (Li et al., 2017) perteneciente a la familia de semaforinas (Behar et al., 1996), las cuales se identificaron originalmente como moléculas que controlan la ruta del axón durante el desarrollo del sistema nervioso (Kolodkin et al., 1993). La Sem3A puede actuar autócrina o parácrinamente uniéndose a su receptor *neuropilin 1* (Nrp1) expresado tanto en osteoblastos como en los precursores de osteoclastos, por lo que es capaz de estimular la formación ósea mientras inhibe la resorción (Li et al., 2017). En la actualidad, las semaforinas están siendo estudiadas como drogas terapéuticas para ciertas enfermedades (Worzfeld et al., 2014); más específicamente, el uso de Sem3A recombinante se está empleando para la terapia del cáncer (Maione et al., 2009), dolor neuropático (Hayashi et al., 2011) y osteoporosis (Hayashi et al., 2012).

Se ha demostrado que los osteoblastos, además de ser capaces de generar hueso, también pueden afectar la formación, diferenciación y apoptosis de osteoclastos a través de varias vías como OPG/RANKL/RANK, RANKL/LGR4/RANK, Ephrin2/epHB4, y Fas/FasL (Chen et al., 2018). Además, se ha descrito que los osteoblastos liberan microvesículas al medio extracelular y que, junto con exosomas y cuerpos apoptóticos, desempeñan un papel importante en la comunicación celular durante el crecimiento y la homeostasis ósea porque transportan moléculas bioactivas a las células vecinas (Yuan et al., 2018). Dichas microvesículas son capaces de estimular la actividad de los osteoclastos a través del eje RANKL-RANK (Deng et al., 2015), por lo que la desregulación de este proceso podría contribuir a una mayor resorción ósea. Por otro lado, los osteoblastos también secretan Sem3A, la cual inhibe la diferenciación de osteoclastos inducida por la vía RANKL (Yamashita et al., 2013).

Osteocitos

Los osteocitos representan el mayor número de células en el hueso cubriendo un 90-95% de la masa total y son uno de los tipos celulares más longevos del cuerpo,

perdurando incluso durante décadas. Tienen una forma característica estrellada caracterizada por prolongaciones que surgen del citoplasma y que se extienden a lo largo de pequeños canales situados en la matriz mineralizada del hueso, formando un laberinto de conductos llamado sistema lácuno-canalicular. Entre las funciones de los osteocitos se incluyen: la regulación de la remodelación ósea mediante la interacción con osteoblastos y osteoclastos; la regulación en la homeostasis del fósforo y calcio; el censado de estímulos mecánicos que coordinan la respuesta del esqueleto a la carga o descarga; y la función como células endócrinas (Bonewald, 2017).

Los osteocitos se forman a partir de los osteoblastos cuando éstos se diferencian y embeben dentro de la matriz ósea. Esto presenta desafíos importantes con respecto a la comunicación con otras células y el acceso a suficientes nutrientes y oxígeno. Para ello, los osteocitos y su sistema lácuno-canalicular están adaptados para desarrollar sus funciones dentro de esta matriz mineralizada. El cuerpo del osteocito está dispuesto dentro de una laguna de 15-20 μm de diámetro, y los procesos celulares pasan a través de la matriz ósea a través de canales estrechos llamados canalículos de aproximadamente 250-300 nm de diámetro. Numerosos procesos dendríticos conectan a los osteocitos entre sí, con los osteoblastos, los osteoclastos y las células que recubren los huesos (Lanyon, 1993; Tanaka-Kamioka et al., 2009). Esta morfología característica permite el paso de nutrientes y señales bioquímicas de un osteocito a otro formando una red funcional (Dallas et al., 2013). El intercambio de pequeñas moléculas es posible a través de uniones estrechas presentes en las dendritas de los osteocitos. La proteína más abundante en las uniones estrechas óseas es la Conexina-43 (Cx43), que forma los canales transmembrana que conectan el citoplasma de las células adyacentes y permiten el paso de moléculas menores a 1 KDa (Lampe et al., 2000; Plotkin, 2014b).

Considerando la complejidad de la regulación de la remodelación ósea, es notable que se necesiten varios métodos de comunicación entre las células óseas para su coordinación. Muchos tipos de células, incluyendo a los osteocitos, pueden secretar vesículas extracelulares que son estructuras de membrana complejas que contienen entre otras cosas: proteínas, ARN mensajeros, microARN y ARN circular. Estas vesículas se pueden dividir en dos clases principales: exosomas y microvesículas. Los exosomas varían entre 30 y 100 nm de diámetro) y las microvesículas (de 100 a 1000 nm de diámetro). Además de estas dos clases principales, existen vesículas denominadas cuerpos apoptóticos que poseen un diámetro entre 800 y 5000 nm que se desprenden

durante el proceso apoptótico y que rara vez participan en comunicaciones intercelulares, pero son eliminados por fagocitosis inmediatamente después de su liberación (Tao et al., 2018). Sin embargo, hay evidencias que demuestran que los cuerpos apoptóticos provenientes de los osteocitos son capaces de inducir la resorción ósea *in vivo* y de generar un aumento en el número de osteoclastos *in vitro*. Estos hechos apuntan a un mecanismo por el cual los osteocitos apoptóticos podrían promover la resorción ósea (Kogianni et al., 2008).

Adipocitos

El tejido adiposo de la médula ósea es un componente metabólicamente distinto de otros subtipos de tejido adiposo. El mismo es un componente conservado del microambiente de la médula ósea que estabiliza esta estructura y proporciona una fuente de energía. Además, se ha descrito que tanto la cantidad como la calidad de este tejido son relevantes para preservar las relaciones funcionales entre la producción de tejido adiposo medular, hueso y células sanguíneas (Pino et al., 2017).

Los adipocitos de la médula ósea derivan de células mesenquimales y son más pequeños que sus contrapartes subcutáneas y viscerales. Como todos los adipocitos, su función principal es almacenar energía, pero también son responsables de secretar una serie de moléculas de señalización conocidas como adipoquinas. Estas adipoquinas funcionan como hormonas circulantes para comunicarse con otros órganos como el cerebro, el hígado, los músculos, el sistema inmunitario y el propio tejido adiposo (Morris et al., 2018). Además de adipoquinas, los adipocitos de la médula ósea también secretan varias citoquinas como IL-6, IL-1 β y TNF- α (Miggitsch et al., 2019; Schäffler et al., 2010).

La diferenciación de las células mesenquimales de médula ósea en adipocitos es un proceso complejo que involucra varios pasos de activación seriada de distintos genes. La expresión de factores de transcripción como el receptor γ activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR- γ) y de la familia de proteínas de unión potenciadora de CCAAT (C/EBP) son claves para este proceso. En principio, la expresión de PPAR- γ es inducida por la coexpresión de C/EBP- β y C/EBP- δ . Luego, la activación de PPAR- γ en conjunto con C/EBP- α conducirá a la diferenciación de los pre-adipocitos a adipocitos

maduros (Gregoire et al., 1998; Ntambi et al., 2000). Algunos de los genes activados por PPAR- γ son: la ácido graso sintasa, la lipoproteína lipasa, CD36 y la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) (Rosen et al., 2009); mientras que C/EBP- α fomenta la activación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4), leptina y el receptor de insulina entre otros (Gregoire et al., 1998).

Fisiopatología ósea de la Enfermedad de Gaucher

Las distintas enfermedades óseas pueden ser originadas por factores genéticos, metabólicos u hormonales. La alteración en las funciones de las células óseas puede llevar a un estado de formación o de resorción anormales del hueso que ocasionen trastornos caracterizados por una microestructura ósea debilitada, aumentando la fragilidad del hueso (Su et al., 2019). En particular, en la enfermedad de Gaucher las manifestaciones esqueléticas son frecuentes en todas las edades y entre ellas podemos nombrar: 1) anomalías en el modelamiento y remodelamiento, resultando en cambios en el desarrollo y pérdida de la matriz ósea (osteopenia / osteoporosis), adelgazamiento cortical, lesiones líticas y fracturas y 2) osteonecrosis y fenómenos relacionados como infartos medulares, osteosclerosis, infartos corticales, daño en las articulaciones y deformidades (Hughes et al., 2019). Hay reportes y estudios previos de nuestro grupo que muestran que los niveles de osteoclastos obtenidos en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes Gaucher están incrementados (Bondar et al., 2017; Reed et al., 2013) y que correlacionan con la baja densidad ósea registrada en la clínica (Bondar et al., 2017). Por otro lado, un modelo murino de la EG mostró deficiencias en la actividad de formación ósea por parte de los osteoblastos causada por la acumulación de glucosilceramida (GL1) y glucosilesfingosina (Lyso-GL1) (Mistry et al., 2010).

Cómo se ha mencionado, la deficiencia en la actividad de la GCasa en la EG lleva a la acumulación de glucocerebrósidos en el lisosoma, principalmente glucosilceramida y glucosilesfingosina (Mirzaian et al., 2015; Nilsson et al., 1985). Los glucocerebrósidos se encuentran dentro de la familia de esfingolípidos, y se ha demostrado que los esfingolípidos bioactivos inducen una cascada de cambios que afectan la vascularidad del hueso, la presión intramedular, el entorno inmune, la hematopoyesis y la función de

las células que residen en el hueso perturbando el crecimiento esquelético (Mikosch et al., 2010) y el modelamiento y remodelamiento óseo (Reed et al., 2018). También se ha demostrado la acumulación de otros esfingolípidos en otras estructuras celulares además del lisosoma, como ser las balsas lipídicas (Hein et al., 2008).

El estado proinflamatorio de la EG es otra característica de esta enfermedad. El estudio del estado proinflamatorio en pacientes se ha centrado principalmente en el análisis de los niveles de citoquinas en suero, y aunque existe una gran variación entre los pacientes, los niveles más altos se encontraron para la IL-1, receptor soluble de IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF, TGF, M-CSF y la quemoquina CCL18, que son liberados principalmente por macrófagos, monocitos y células dendríticas (Allen et al., 1997; Hollak et al., 1997; Rigante et al., 2017). Las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 han sido implicadas en la progresión de enfermedades inflamatorias crónicas del hueso con un aumento en la resorción ósea (Takayanagi, 2007). Mucci et al. han desarrollado un modelo *in vitro* de la EG donde las PBMCs de individuos sanos se tratan con CBE, un inhibidor de la GCasa. Los resultados obtenidos por este modelo muestran que dichas PBMCs secretan TNF- α e inducen un aumento en la diferenciación de precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros y activos (Mucci et al., 2012). Utilizando el mismo modelo, también se ha demostrado un aumento de la producción de citoquinas inflamatorias por monocitos y células T; además de un aumento en los niveles de precursores de osteoclastos y una mayor expresión de RANKL en la superficie de las células T (Mucci et al., 2015). El análisis de la población de linfocitos T en PBMCs de pacientes Gaucher ha demostrado que el número de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ disminuye en pacientes que presentan problemas óseos y dicha disminución, al menos para CD8⁺, fue correlacionada con los niveles más altos de actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), es decir a un mayor número de osteoclastos (Lacerda et al., 1999).

Otra citoquina involucrada en la inflamación aguda es la citoquina IL-1 y es producida por múltiples células incluyendo macrófagos, linfocitos, y células mesenquimales. Se ha demostrado que dicha citoquina ejerce potentes efectos sobre el tejido óseo mediante el aumento de la resorción ósea *in vitro* e *in vivo* y prolongando la vida de los osteoclastos (Nakamura et al., 2006). El estudio de los macrófagos derivados de pacientes con EG ha demostrado que éstos aumentan la secreción de IL-1 β después de la activación del inflammasoma (Aflaki et al., 2016). Sumado al efecto de las

citoquinas proinflamatorias sobre la osteoclastogénesis, se ha demostrado que las citoquinas TNF- α e IL-1 β también tienen un impacto en la formación del hueso, ya que son capaces de inhibir la diferenciación de osteoblastos con la consecuente reducción de hueso mediante la inhibición de la deposición de matriz orgánica y mineral (Ginaldi et al., 2016; Kotake et al., 2014).

Aunque la terapia de reemplazo enzimático logra disminuir los problemas óseos observados en los pacientes, un alto porcentaje de los mismos mantiene parte de las manifestaciones, principalmente las crisis de dolor óseo (Sims et al., 2008). En un modelo Gaucher de osteoblastos se ha demostrado que la enzima recombinante GCasa es capaz de ingresar a las células (Lamghari et al., 2005), por lo que la falta de respuesta a la terapia en los pacientes Gaucher podría ser consecuencia de la inaccesibilidad de la enzima recombinante al hueso. Comparado con otros órganos como el corazón, el hígado o el riñón, el hueso está menos vascularizado por lo que los medicamentos utilizados para tratar patologías óseas son menos efectivos debido a una baja disponibilidad en el sitio diana (Lin, 1996). Además de esta característica ósea, hay que tener en cuenta que la enzima recombinante tiene una vida media corta en circulación (Abbas et al., 2015; Van Patten et al., 2007). Por lo tanto, no sólo podrían ser útiles las terapias que incrementen la accesibilidad de la enzima al hueso, sino que también se deben estudiar terapias alternativas que puedan ser administradas como coadyuvantes para mejorar la función ósea en estos pacientes.

OBJETIVOS

E

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los reportes clínicos que documentan una persistencia en las manifestaciones a nivel óseo de pacientes Gaucher aún bajo la Terapia de Reemplazo Enzimático, proponemos como hipótesis central de este trabajo que el daño óseo en la Enfermedad de Gaucher es causado, en parte, por un estado proinflamatorio originado por la acumulación de lípidos en los lisosomas que no puede ser revertida por la falta de llegada de la enzima recombinante al hueso. Este estado metabólico provocaría un desbalance en el sistema óseo alterando su funcionalidad y composición a nivel celular a través de diversos mecanismos como: el aumento de la resorción ósea, disminución de la formación ósea y/o cambios en la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs) residentes en la médula ósea.

El objetivo general de este trabajo es investigar los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desbalance del sistema óseo presente en pacientes con enfermedad de Gaucher y la búsqueda de potenciales blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos tratamientos.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la función de osteocitos y osteoblastos *in vitro* empleando modelos celulares murinos con un inhibidor químico de la enzima GCasa.
- Evaluar el proceso de diferenciación celular de MSCs hacia osteoblastos y adipocitos en un modelo *in vitro* y determinar su destino celular.
- Evaluar la modulación del proceso de osteoclastogénesis mediado por las células de dichos modelos.
- Estudiar el efecto del tratamiento con Velaglucerasa alfa y Semaforina 3A en el proceso de diferenciación de las MSCs a osteoblastos.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

Ratones

Se utilizaron ratones de la cepa salvaje C57Bl/6 (WT) de 8 semanas de edad con el fin de obtener precursores de médula ósea para los ensayos de osteoclastogénesis indirecta descrita más adelante. Los ratones se mantuvieron en un bioterio acondicionado en base a sus necesidades, con agua y alimento *ad libitum*. El sacrificio de los mismos se realizó mediante dislocación cervical.

Líneas celulares

- MC3T3-E1: Pre-osteoblastos de origen murino.
- MLO-Y4: Osteocitos de origen murino.
- Células Madre Mesenquimales de origen humano (MSCs). Estas células fueron provistas por el Dr. Feldman (Universidad de Maryland, USA) quien ha demostrado que pueden recapitular las características patológicas de la enfermedad de Gaucher (Panicker et al., 2012). El procedimiento para su generación fue la obtención por única vez de fibroblastos provenientes de pacientes sanos y con enfermedad de Gaucher. Dichos fibroblastos se desdiferenciaron a Células Madre Pluripotenciales inducidas (iPSCs), y en este estadio se reprogramaron para diferenciarse a MSCs y establecer la línea celular. En este trabajo se utilizaron las líneas: MSC Control y MSC Tipo III (L444P/L444P).

Cultivos de las líneas celulares

Mantenimiento con medios completos

MLO-Y4: Medio α -MEM (Invitrogen) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios SA), 5% de suero bovino de ternero (Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin a 37° C en atmósfera de CO₂ 5%. Para el cultivo también es necesario que las placas/botellas estén cubiertas con colágeno

tipo I (0,15 mg/ml ácido acético 1%) (Gibco). El recubrimiento se realiza por incubación de la solución de colágeno en la superficie a tratar por 24hs a 37° C.

MC3T3-E1: Medio α -MEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios SA), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂ 5%.

MSCs: Medio DMEM-GlutaMAX™ (GIBCO) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina a 37° C en atmósfera de CO₂ 5%.

Diferenciación

Osteoblastos

La diferenciación a osteoblastos a partir de las MC3T3-E1 se realiza sobre las células adheridas mediante el reemplazo del medio de cultivo por el medio de diferenciación a osteoblastos. Este medio está compuesto por: el medio completo suplementado con dexametasona 0,01 μ M, glicerofosfato de sodio 0,23 mg/ml y L-ascorbato 0,6 mg/ml (Sigma-Aldrich) (Yan et al., 2014).

La diferenciación a osteoblastos a partir de las MSCs se realiza reemplazando el medio completo por un medio osteogénico 0,5x (Día 1 de diferenciación) y al día siguiente, se cambia el medio osteogénico 0,5x por uno 1x. El medio osteogénico está compuesto por el medio completo suplementado con glicerofosfato de sodio 10mM, dexametasona 0,1 μ M y L-ascorbato 50 μ M (Sigma-Aldrich) (Panicker et al., 2018).

Adipocitos

Para la diferenciación a adipocitos a partir de las MSCs se esperó a que las mismas llegaran a confluencia y luego se cultivaron con medio completo suplementado con

3-isobutiril-1-metilxantina (IBMX) 500 μ M, dexametasona 0,01 μ M, indometacina 50 μ M (Sigma-Aldrich) e insulina 10 μ g/ml (Densulin[®] R) (Scott et al., 2011).

Preparación de sobrenadantes condicionados

Las células de la línea MLO-Y4 se distribuyeron a razón de 40.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, al igual que las células de la línea MC3T3-E1. Esta última se diferenció a osteoblastos en medio osteogénico como se describió previamente. Ambas líneas se cultivaron en presencia o ausencia de 500 μ M CBE (Sigma) durante 7, 14 y 21 días. El CBE es un inhibidor específico de la enzima GCasa el cual se une irreversiblemente al sitio catalítico de la misma inhibiendo su actividad. El sobrenadante de cultivo condicionado se recolectó a las 72 hs a partir del último cambio de medio eliminando restos celulares por centrifugación.

Las células MSCs control y Gaucher también se diferenciaron a osteoblastos. En este caso se plaquearon 40.000 células/pocillo en placa de 24 pocillos (o el proporcional de células/botella según el volumen de sobrenadante necesitado) y se mantuvieron en cultivo por 7 y 14 días. El sobrenadante de cultivo condicionado se recolectó a las 72 hs a partir del último cambio de medio eliminando restos celulares por centrifugación.

Los sobrenadantes condicionados de las MSCs se obtuvieron por cultivo de las mismas (320.000 células) en botellas de 25 cm². El sobrenadante de cultivo condicionado se recolectó a las 72 hs a partir del último cambio de medio eliminando restos celulares por centrifugación.

Aislamiento de vesículas/cuerpos apoptóticos a partir de sobrenadantes condicionados

Las células se distribuyeron en botellas de 75 cm² (con /sin CBE) y se dejaron llegar a confluencia. Una vez alcanzado este estado se cambió el medio y el mismo se recolectó a las 72 hs.

Los cuerpos apoptóticos y los sobrenadantes fueron obtenidos en dos pasos de centrifugación modificados de Kogianni et al. (Kogianni et al., 2008). En el primer paso se realizó una centrifugación a 500 g por 30 min. En el segundo paso, se tomó el sobrenadante del paso anterior y se centrifugó a 30.000 g por 30 min. Luego, se realizó la separación del sobrenadante y del precipitado (*pellet*) para su posterior uso. El *pellet* se resuspendió en 150 μ l de α -MEM sin suero para analizar los cuerpos apoptóticos.

Las microvesículas y los sobrenadantes fueron obtenidos en dos pasos de centrifugación. En el primer paso se realizó una centrifugación a 20.000 g por 30 min. En el segundo paso, se tomó el sobrenadante del paso anterior y se centrifugó a 100.000 g por 30 min.

Ensayo de diferenciación a osteoclastos con sobrenadantes condicionados

Sobrenadantes condicionados de líneas murinas MC3T3-E1 y MLO-Y4

Se extrajeron precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 WT y se sembraron 5×10^5 células/pocillo en medio completo adicionado con 30 ng/ml de M-CSF sobre placas de cultivo de 24 pocillos, manteniéndose durante 72 hs a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5%. Las células adherentes se utilizaron para los ensayos de diferenciación a osteoclastos durante 10 días en cultivo con los sobrenadantes condicionados en una proporción 1:1 con el medio completo reemplazando el mismo cada 48 hs. Como control positivo de formación de osteoclastos los precursores se estimularon con 50 ng/ml de RANKL.

Este protocolo también se utilizó para evidenciar el papel de RANKL en la osteoclastogénesis inducida por la fracción de sobrenadante que contiene los cuerpos apoptóticos (se utilizaron 30 μ l/pocillo de placa de 24). En este ensayo se utilizó también OPG recombinante 50 ng/ml (R&D Biosciences).

Sobrenadantes condicionados de MSCs

Se plaquearon 250.000 células/pocillo de la línea monocítica humana THP-1 en placas de cultivo de 48 pocillos adicionando 30 ng/ml de M-CSF (R&D Biosciences) durante 72 hs a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Las células adherentes se utilizaron para los ensayos de diferenciación a osteoclastos durante 10 días en cultivo con los sobrenadantes condicionados en una proporción 1:1 con el medio completo reemplazando el mismo cada 48 hs. Como control positivo de formación de osteoclastos se utilizaron 50 ng/ml de RANKL (Biolegend).

Para evidenciar el papel de IL-1 β se adicionó Anakinra, inhibidor natural del receptor de IL-1 y antagonista natural de IL-1Ra en una concentración final de 500 ng/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA) sobre las células THP-1 y se dejó incubando a una concentración 2x por 1 h a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Luego se agregó el medio condicionado en una proporción 1:1 con el medio completo y se dejó en estufa por 10 días, cambiándose el medio cada 48 hs. Para evidenciar el papel de RANKL, se agregaron 50 ng/ml de OPG recombinante por pocillo (R&D Biosciences) agregando al mismo tiempo el medio condicionado en una proporción 1:1 con el medio completo. Se dejó incubando en estufa por 10 días, cambiándose el medio cada 48 hs.

Para la identificación de los osteoclastos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) y se tiñeron para revelar la actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP, Sigma Aldrich). Brevemente, se agregaron 250 μ l de la mezcla proporcionada por el kit y se dejó incubando a 37°C por 1 h. Luego se lavó con *buffer* salino fosfato (PBS) y se tiñeron los núcleos con DAPI 1 μ g/ml (Thermo Fisher Scientific). Las células que son multinucleadas (más de 3 núcleos) y positivas para TRAP (Sigma) se definieron como osteoclastos. El recuento se realizó mediante microscopía graficando el número de células multinucleadas TRAP positivas por pocillo.

Evaluación de la actividad de resorción de osteoclastos

La actividad de resorción mediada por los osteoclastos diferenciados se determinó mediante el uso de placas de cultivo recubiertas con una matriz de dentina (BD

Pharmingén) sobre las cuales se llevaron a cabo los experimentos de osteoclastogénesis. Luego del cultivo, las células se lisaron por tratamiento hipotónico con NH_4OH 1M. La placa se incubó en agitación por 5 minutos en agitación con azul de toluidina 1% / borato de sodio 1% (Sigma Aldrich) para evidenciar los espacios que han sido resorbidos. Luego se realizó el recuento del número de áreas de resorción mediante microscopía de fase.

Evaluación del efecto de la enzima GCasa recombinante (Velaglucerasa) sobre la actividad de osteoblastos

Se plaquearon las MSCs Control y Gaucher a razón de 20.000 células/pocillo en placa de 48 pocillos y se diferenciaron a osteoblastos en presencia/ausencia de la enzima recombinante Velaglucerasa alfa 1,4 U/ml - 0,035 mg/ml (Takeda, Japón) por 14 días para evaluar la capacidad de mineralización con/sin tratamiento. Como control de especificidad se adicionó una enzima recombinante no relacionada: 3,5 $\mu\text{g/ml}$ de Idursulfasa.

Efecto dosis respuesta de Semaforina 3A en osteoblastos

Se distribuyeron las MSCs Control y Gaucher a razón de 20.000 células/pocillo en placa de 48 pocillos y se diferenciaron a osteoblastos en ausencia/presencia de Semaforina 3A (R&D Systems) 50 ng/ml y 100 ng/ml durante 14 días. Se evaluó la capacidad de mineralización, deposición de colágeno y actividad fosfatasa alcalina. El medio se cambió cada 48 hs.

Medición de actividades enzimáticas

Glucocerebrosidasa (GCasa)

Se cultivaron las células en placa de 6 o en botellas de 25 cm² hasta llegar a confluencia y luego se colectaron las células en buffer lisis (HEPES 0,93M pH: 7,9 + EDTA 0,5M pH: 8 + KCl 1M + Novidet p40 10%). Para determinar la actividad GCasa se mezclaron 20 µl de lisado celular; 10 µl de buffer fosfato-citrato (ácido cítrico 0,1M + fosfato monoácido de sodio 0,1M; pH: 5), 10 µl Taurodeoxicolato de sodio 2% p/v (Sigma) y 50 µl de sustrato 4-metilumbeliferona1-β-D-glucopiranosido 0,02M (Glycosynth) y se incubó por 2h a 37°C. Luego se frenó la reacción con 200µl de solución de frenado (Buffer glicina 1M + NaOH 0,5M; pH: 10,3). Como blanco se usó la misma formulación pero el sustrato se agrega junto con la solución de frenado.

La curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de 4-metilumbeliferona (nM): 326,92; 108,96; 36,31; 12,12; 4,04; 1,35; 0,46; 0,15. La fluorescencia se midió en el espectrofotómetro (Twinkle LB 970, Berthold Technologies) a una excitación de 360nm y a una emisión de 450nm.

Para los cálculos, se corrigió la fluorescencia de interés con el blanco y se comparó con la curva de calibración de 4-metilumbeliferona. Los resultados se expresan como nanomoles de sustrato hidrolizado por mg de proteína en 2 horas.

$$\text{Actividad enzimática (nmoles/mg prot.h)} = \Delta \text{nmoles 4-MU} / 2\text{h} / \text{mg prot}$$

La concentración de proteínas (mg/ml) se determinó utilizando el método de BCA según las instrucciones del fabricante (Pierce™ BCA Protein Assay; cat: 23227).

Proteína Kinasa C (PKC)

Se cultivaron las células MLO-Y4 en placa de 6 pocillos hasta llegar a confluencia. Luego de 7 y 14 días de tratamiento con/sin CBE 500µM se colectaron las células en

buffer lisis (HEPES 0,93 M pH: 7,9 + EDTA 0,5 M pH: 8 + KCl 1 M + Novidet p40 10%). La cantidad de extracto crudo (lisado celular) utilizado para el ensayo fue de 2µg. La concentración de proteína se determinó mediante el método de BCA según las instrucciones del fabricante (Pierce™, BCA Protein Assay Kit; cat: 23227). Para la determinación de la actividad de la enzima PKC se siguieron las instrucciones del fabricante utilizando un kit específico de esta enzima (Enzo®, *PKC Kinase Activity Kit*; cat: ADI-EKS-420A).

Determinación de glucosilceramida

Se cultivaron las células MLO-Y4 con y sin CBE en botellas de 75cm². Luego de 7 días de cultivo se recolectaron para la extracción de los glicolípidos siguiendo el método de Vance y Sweeley con modificaciones (Vance et al., 1967). Brevemente, se centrifugaron las células y se descartó el sobrenadante. Luego se agregaron 3 ml de cloroformo:metanol en relación 2:1 v/v y 0,8 ml de agua. Las muestras se homogeneizaron utilizando un vortex durante 30 seg y se incubaron en hielo durante 15 min. Se agregó 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua mezclando por vortex nuevamente durante 30 seg. Para mejorar la separación de fases los tubos fueron centrifugados, la fase acuosa superior fue retirada y la fase inferior se evaporó por aplicación de calor bajo campana. Se añadieron 1ml de metanol y 0,1 ml de NaOH 1M sobre el residuo seco, y se incubó a 37°C toda la noche. Se adicionaron 2 ml de cloroformo y 0,5 ml de agua y las fases se separaron mediante centrifugación. Se eliminó la fase superior y se dejó evaporar la fase inferior, quedando los glicolípidos. Éstos fueron disueltos en cloroformo:metanol 2:1 v/v y separados mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando una placa de sílica 60. La TLC se realizó utilizando cloroformo:metanol:agua 70:30:4, v/v/v como fase móvil y los glicolípidos se detectaron pulverizando la placa con el reactivo orcinol. Se utilizaron como estándar 3 µg de glucosilceramida pura (Matreya, Pleasant Gap, PA).

Determinación de apoptosis y ciclo celular

Anexina V / Ioduro de Propidio

Se recolectaron las células por tratamiento con TRypLe (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA). Luego de un lavado con medio fresco, se centrifugaron y resuspendieron en 50µl de *buffer binding* (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM, pH = 7.40). Después se agregaron 1 µl de Anexina V-APC (BD Pharminigen, San Diego, CA, USA) y 1 µl de ioduro de propidio (1 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pasados los 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en un FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

TUNEL

Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% por 10 min y procesadas con el kit de TUNEL siguiendo las especificaciones del fabricante (Dead End Fluorometric TUNEL system; Promega, Madison, WI, USA). Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) y montados con medio de montaje para fluorescencia (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Las muestras fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti (Nikon, Sendai, Japan). El recuento de células TUNEL positivas se realizó con el programa ImageJ.

Ciclo celular

Las células se recolectaron y se fijaron con etanol 70% frío. El agregado de etanol se realizó gota a gota en agitación para asegurar la fijación y evitar el aglomeramiento de las células. Se incubó por 30 min a 4°C. Luego se centrifugó a 850g y el *pellet* se trató con 50 µl de ribonucleasa 100 µg/ml y se agregaron 2 µl de ioduro de propidio 1 mg/ml. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en un FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Microscopía de fluorescencia

Para la detección de Cx43 se utilizó un anticuerpo de ratón anti-Cx43 (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, USA, cat 13-8300) a una dilución 1:100. Este anticuerpo reconoce a la Cx43 sólo cuando la serina en el residuo 368 no está fosforilada (NP-Ser368). Sin embargo, puede reconocer a la Cx43 si se encuentra fosforilada en otros sitios. Brevemente, Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% por 10 min y luego se permeabilizaron con tritón X-100 al 0,3% en PBS por otros 10 min. Se bloqueó con suero de cabra al 5% por 30 min y luego se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor488 anti-IgG de ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, cat A11020) a una dilución 1:3000 por 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos se marcaron con yoduro de propidio 1 µg/ml por 15 min. Luego se montó con medio de montaje para fluorescencia y se observaron en el microscopio confocal TCS SP5 Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las imágenes fueron tomadas usando el programa Leica LAS AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Entre cada incubación se realizaron lavados con PBS Tween-20 0.1%. El recuento de núcleos se realizó automáticamente con el programa ImageJ, mientras que las células positivas se contaron manualmente.

Tinciones

Alizarin Red (ARS)

Las MC3T3-E1 y las MSCs se cultivaron y diferenciaron a osteoblastos como se indicó anteriormente. Luego de finalizar el cultivo, la placa se lavó con PBS y se fijaron las células con 4% (p/v) de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 15 min. Se adicionaron 150 µl/pocillo del colorante ARS 40 mM (pH 4,1) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min con agitación suave. El colorante no incorporado se aspiró y los pocillos se lavaron con agua destilada para eliminar excedentes. Para la extracción del colorante, se añadieron 150 µl/pocillo de ácido acético 10% (v/v) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en agitación. La monocapa de células de cada pocillo se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml

junto con el sobrenadante. Luego de agitar el tubo con vortex durante 30 seg se cubrió con 80 µl de vaselina líquida, se calentó a 85°C durante 10 min y se mantuvo en hielo durante 5 min. A continuación, se centrifugó a 15.000 g durante 15 min y 100 µl del sobrenadante se transfirieron a un nuevo tubo conteniendo 80 µl de 10% (v/v) de hidróxido de amonio para neutralizar el ácido. La medida de absorbancia se realizó sobre alícuotas de 150 µl a 450 nm (osteogenesis assay kit Nro. De catálogo ECM815, Millipore).

Sirius Red (SR)

Las MC3T3-E1 y las MSCs se cultivaron y diferenciaron a osteoblastos como se indicó anteriormente. Luego de finalizar el cultivo, se lavó con PBS y las células se fijaron durante 1 h con 150 µl de líquido de Bouin preparado al momento de uso (dilución ¼ de formaldehído 35% v/v en ácido pícrico saturado). Las células fijadas se lavaron 3 veces con exceso de PBS y se secaron por unos minutos. Se agregaron 150 µl/pocillo del colorante SR 0,1% (Sigma-Aldrich) en ácido pícrico y se incubó a temperatura ambiente durante 18 hs en agitación suave. Luego de la incubación se realizaron 5 lavados con HCl 0,01 N para eliminar el exceso de colorante. Para la cuantificación se agregaron 200 µl/pocillo de NaOH 0,1 N, se incubó durante 30 min en agitación para extraer el colorante y se midió la absorbancia de la solución a 540 nm (Scian et al., 2012).

Fosfatasa alcalina

Las MC3T3-E1 y las MSCs se cultivaron y diferenciaron a osteoblastos como se indicó anteriormente. La monocapa formada se lavó con *buffer* tris salino (TBS) y se cubrió con 100 µl/pocillo de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato)/NBT (azul de nitro-tetrazolio). Se incubó por 10-15 min a temperatura ambiente. Durante la incubación se siguió la generación de color por microscopía de fase para evitar la saturación del color. La reacción se detuvo mediante el agregado de agua destilada (Scian et al., 2012).

Oil Red

Las MSCs se plaquearon a razón de 40.000 células/pocillo en placa de 48 pocillos y se comenzó a diferenciar con medio adipogénico luego de que las células llegaran a confluencia, manteniéndose el cultivo por 7 y 14 días. El protocolo de tinción utilizado para evidenciar las gotas lipídicas fue el de Ciuffreda et al. con modificaciones (Ciuffreda et al., 2016). Brevemente, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) durante 1 h. Se agregaron 150 µl finales por pocillo de una solución de trabajo con proporción 6:4 de stock *Oil Red* 0,5% propilenglicol (Sigma) en agua destilada, respectivamente, y se dejó incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se hicieron 4 lavados con agua destilada y se observó al microscopio. Para realizar la extracción del colorante, se agregaron 150 µl de isopropanol 100% por pocillo y se dejó agitando suavemente por 10 min. Luego se centrifugó 5 min a 1500 rpm para eliminar restos celulares. La absorbancia del colorante se midió a 492 nm usando como blanco isopropanol.

Medida de citoquinas

Las concentraciones de IL-1 β , IL-6, TNF- α , (BD Pharmingen), se cuantificaron por ELISA de captura en los sobrenadantes de cultivo según las indicaciones del fabricante.

Ensayos moleculares

Extracción y retro-transcripción (RT) de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando kits de columnas MiniSpinR (GEHealthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y se retro-transcribió utilizando como cebadores una mezcla de hexámeros generados al azar y un kit de reactivos de RT (M-MLV RT, dNTPs, DTT, RNase-Out y First-Strand buffer) según las especificaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), utilizando el siguiente programa: 10

min a 25°C, 50 min a 37°C, 15 min a 70°C. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Diseño de cebadores (*primers*)

Los cebadores (*primers*) utilizados para la determinación de expresión génica fueron diseñados mediante el programa PerlPrimer (Tabla V). Las secuencias fueron elegidas de modo tal que tuvieran una temperatura de hibridación de alrededor de 60°C y una longitud de 20-22 pares de bases (pb). La especificidad de las secuencias se verificó mediante la herramienta Primer-BLAST del *National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, EE.UU., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)*, y se comprobó la ausencia de estructuras secundarias en las zonas de hibridación de la secuencia blanco de cDNA mediante la herramienta bioinformática mFold (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::mfold>). Para todos los cebadores se realizó una curva de eficiencia en qPCR con controles positivos apropiados y se verificó el tamaño del amplicón por electroforesis en gel de agarosa.

Tabla V Secuencia de cebadores utilizados

Secuencia de cebadores murinos		Secuencia de cebadores humanos	
Nombre	Secuencia (5' to 3')	Nombre	Secuencia (5' to 3')
<i>mActb_Fw</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	<i>hACTB_Fw</i>	CCTGGCACCCAGCACAAT
<i>mActb_Rv</i>	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	<i>hACTB_Rv</i>	GCCGATCCACACGGAGTACT
<i>mRunx2_Fw</i>	AGGCGTATTTTCAGATGATGAC	<i>hALP_Fw</i>	CCATCCTGTATGGCAATGG
<i>mRunx2_Rv</i>	GATGAAATGCTTGGGAACTG	<i>hALP_Rv</i>	CGCCTGGTAGTTGTTGTGAG
<i>mCx43_Fw</i>	TACCACGCCACCACGGCCCA	<i>hCOL1A1_Fw</i>	GAAGGGACACAGAGGTTTCAG
<i>mCx43_Rv</i>	GGCATTTTGGCTGTCGTCAGGGAA	<i>hCOL1A1_Rv</i>	TAGCACCATCATTTCACGA
<i>mRankl_Fw</i>	CTATGATGGAAGGCTCATGG	<i>hRUNX2_Fw</i>	GGAGTGGACGAGGCAAGAGTTT
<i>mRankl_Rv</i>	GAGGACAGAGTGACTTTATGG	<i>hRUNX2_Rv</i>	AGCTTCTGTCTGTGCCTTCTGG
<i>mOpg_Fw</i>	AGGTGTGGAATAGATGTCACC	<i>hPPAR-γ_Fw</i>	GGCCGCAGATTTGAAAGAAG
<i>mOpg_Rv</i>	GTATAATCTTGGTAGGAACAGC	<i>hPPAR-γ_Rv</i>	GTTTGAGAAAATGGCCTTGTGT

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La determinación de la expresión génica sobre muestras de ADN complementario (cDNA) se realizó en un termociclador iQ5 (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) por qPCR con SYBR Green, utilizando una mezcla de reacción compuesta por 10 µl de cDNA, 1 µl de cada primer (forward y reverse), y 12 µl de iQ™ SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). El programa de reacción utilizado fue: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 50 ciclos de 15 seg a 95°C y 60 seg a 60°C, con una curva final de desnaturalización de 55°C a 95°C (en pasos de 0,5°C/10 seg). Las medidas se realizaron por duplicado por cada gen y muestra. Para el cálculo del nivel expresión de un gen de interés (GDI) se utilizó un normalizador interno en cada muestra: el gen de β-actina (ACTB). Utilizando los valores promedio de ciclo al punto de intersección (Ct, *cycle threshold*) obtenidos para cada uno de ellos se calculó la expresión del gen de interés en unidades arbitrarias según la fórmula:

$$\text{Exp}_{\text{GDI}} = 2^{-\text{dCt}} = 2^{-(\text{Ct.gdi}-\text{Ct.ACTB})}$$

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism 7.0 aplicando el *test-t* no pareado o ANOVA de una vía seguido del post-test de Bonferroni. Los datos se presentan como la media ± variación estándar de la media.

RESULTADOS

Capítulo 1

Rol de los osteocitos en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher

Los osteocitos, definidos como células ubicadas dentro de la matriz ósea, descienden de las células madre mesenquimales a través de la diferenciación de osteoblastos, siendo el estadio final de diferenciación de éstos (Bonewald, 2011). Los osteocitos representan el mayor número de células en el hueso cubriendo un 90-95% de la masa total y son uno de los tipos celulares más longevos del cuerpo, perdurando incluso durante décadas. Entre las funciones de los osteocitos se incluyen: la regulación de la remodelación ósea mediante la interacción con osteoblastos y osteoclastos; la regulación en la homeostasis del fósforo y calcio; el censado de estímulos mecánicos que coordinan la respuesta del esqueleto a la carga o descarga; y la función como células endócrinas (Bonewald, 2017).

El cuerpo del osteocito está encerrado dentro de un espacio llamado laguna, y los procesos celulares atraviesan la matriz ósea a través de canales estrechos llamados canalículos. Numerosos procesos dendríticos conectan a los osteocitos entre sí y permiten que los osteocitos cercanos a la superficie ósea se conecten a los osteoblastos y las células que recubren los huesos. Esta morfología característica permite el paso de nutrientes y señales bioquímicas de un osteocito a otro formando una red funcional (Dallas et al., 2013). Varios autores han destacado a la Cx43 como la proteína más abundante en las uniones estrechas (Batra et al., 2012; Donahue, 2000) con relevancia en la supervivencia de los osteocitos (Plotkin et al., 2002). En experimentos con ratones *knockout* para esta proteína se ha visto un aumento en la apoptosis de osteocitos (Xu et al., 2015), mientras que en ratones donde se sobreexpresó la Cx43, se observó una prevención de este proceso (Davis et al., 2018). El silenciamiento de la expresión de Cx43, además de provocar un incremento en la apoptosis, incrementa el proceso de osteoclastogénesis (Davis et al., 2017). Se ha demostrado que el proceso de apoptosis en osteocitos libera vesículas o cuerpos apoptóticos que, indirectamente, contribuirían a la resorción ósea (Clarke, 2008; Kogianni et al., 2008; Plotkin, 2014a; Bellido, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes Gaucher presentan problemas óseos, entre ellos: osteopenia y alta frecuencia de fracturas, por lo que este capítulo plantea dilucidar si los osteocitos que tienen una deficiencia en la actividad GCasa tienen una mayor tasa de muerte celular que induciría el proceso de resorción ósea. Para ello, se desarrolló un modelo *in vitro* de la enfermedad de Gaucher que se basa en el uso de la línea celular murina MLO-Y4 tratada con un inhibidor químico irreversible para la enzima GCasa llamado conduritol- β -epóxido (CBE).

Validación del modelo

Los pacientes Gaucher poseen distintas mutaciones patogénicas en el gen *GBA* que producen deficiencia en la enzima GCasa. Por lo tanto, para generar un modelo de osteocitos de la EG se utilizó un inhibidor químico de la enzima GCasa, el CBE. Para corroborar que la deficiencia de GCasa esté presente, se evaluó la actividad residual de la enzima en el modelo murino de osteocitos. La concentración de CBE utilizada fue de 500 μ M, ya que estudios previos en células mesenquimales de pacientes sugirieron que el máximo de inhibición para la enzima GCasa ocurría utilizando dicha concentración (Lecourt et al., 2012; Mucci et al., 2012). Teniendo en cuenta el esquema experimental de cambio de medio que se realiza cada 2 días, se midió la actividad GCasa al día 1 y 2 de iniciada la inhibición con CBE. Este ensayo indicó que el tratamiento de los osteocitos con CBE deja una actividad residual de la enzima cercana al 4% con respecto a los osteocitos no tratados (Fig. 1a). Para determinar si la concentración 500 μ M de CBE es capaz de generar la acumulación de glucosilceramida, se cultivaron los osteocitos con/sin CBE por 7 días. La acumulación de dicho sustrato se determinó de forma semicuantitativa por la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando glucosilceramida comercial como patrón. Los resultados mostraron un aumento notable en la acumulación de glucosilceramida en los osteocitos tratados con 500 μ M de CBE en comparación con los osteocitos no tratados (Fig. 1b). A raíz de este resultado, el resto de los ensayos se realizaron con 500 μ M de CBE y con un mínimo de 7 días de tratamiento.

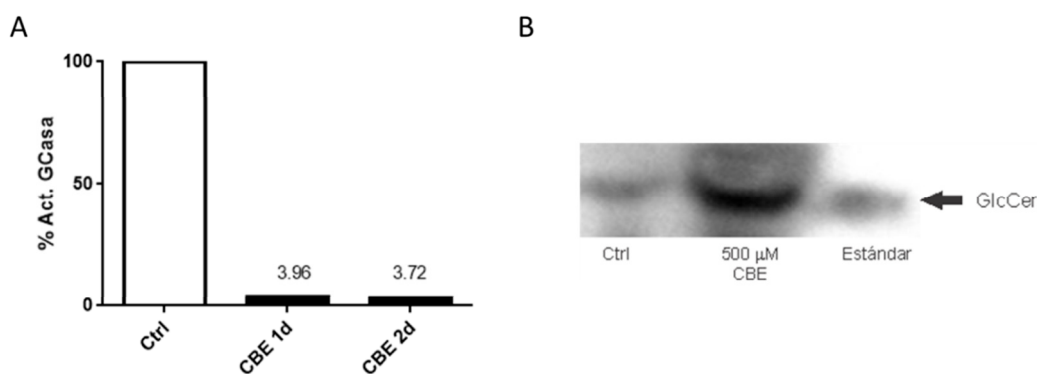


Fig. 1 Validación del modelo *in vitro* murino. Determinación de la actividad GCasa en osteocytos tratados con CBE 500 μ M (CBE) por 1 y 2 días, expresada como porcentaje con respecto a osteocytos sin tratar (Ctrl) (A). Determinación de la acumulación de glucosilceramida mediante TLC en el extracto lipídico obtenido a partir de osteocytos Ctrl y tratados con CBE 500 μ M por 7 días (B). Estándar utilizado: Glucosilceramida (GlcCer).

Proteínas de uniones intercelulares: Integrina- β y Conexina-43 (Cx43)

En el hueso, los osteocytos forman un sincitio que les da la capacidad para comunicarse entre ellos, con otras células del sistema óseo y con el medio extracelular (Clarke, 2008), poniendo en evidencia la importancia de la función de las proteínas de adhesión celular. Varios autores han destacado a la Cx43 como la proteína más abundante en las uniones estrechas (Batra et al., 2012; Donahue, 2000) con relevancia en la sobrevivencia de los osteocytos (Plotkin et al., 2002). Estas proteínas se agrupan en hexámeros para formar poros por los cuales se establece el intercambio de iones y cuyo cierre/apertura está regulado por procesos de fosforilación, donde la fosforilación en el sitio Ser368 tiene un papel clave (Lampe et al., 2000). Por otro lado, se ha demostrado que la integrina- β es necesaria para la función de mecanotransducción de osteocytos. Varias enfermedades como la osteoporosis, osteoartritis y metástasis óseas dan como resultado una expresión y función de integrina- β alteradas (Geoghegan et al., 2019), por lo que es de interés evaluar esta integrina en nuestro modelo.

Se cultivaron los osteocytos por 7, 14 y 21 días con/sin CBE para evaluar si se produce una alteración en la integrina- β y en la Cx43. Los resultados de este ensayo ponen de manifiesto que la expresión de la integrina- β a nivel de ARNm en los osteocytos tratados con CBE es significativamente menor que en los osteocytos sin tratar a todos los tiempos ensayados (Fig. 2a). Con respecto a la expresión a nivel de ARNm

de la Cx43, la misma disminuye significativamente en los osteocitos tratados con CBE a los 14 y 21 días cuando se los compara con sus respectivos controles (Fig. 2a). También pudimos observar una diferencia en la distribución intracelular de la proteína Cx43 no fosforilada en el sitio Ser368 en las células tratadas con CBE. En las células control se observa que la Cx43 se encuentra distribuida en el citoplasma, mientras que en los osteocitos tratados con CBE el patrón de distribución es perinuclear (Fig. 2b). Cuando realizamos la cuantificación de células que poseían este patrón en función de las células Cx43 positivas, se encontró que es significativamente mayor en las células tratadas con CBE en comparación con las control a los 14 y 21 días (Fig. 2c). Se ha demostrado que la fosforilación de la Cx43 en el sitio Ser368 por la proteína quinasa C (PKC) produce una reducción en la comunicación célula-célula (Lampe et al., 2000; Morel et al., 2012), por lo que medimos la actividad de la enzima en los cultivos de osteocitos con/sin CBE a 7 y 14 días de tratamiento. La actividad de PKC se encontró aumentada en los osteocitos tratados con CBE a los 7 y 14 días, siendo la diferencia significativa a los 7 días (Fig. 2d).

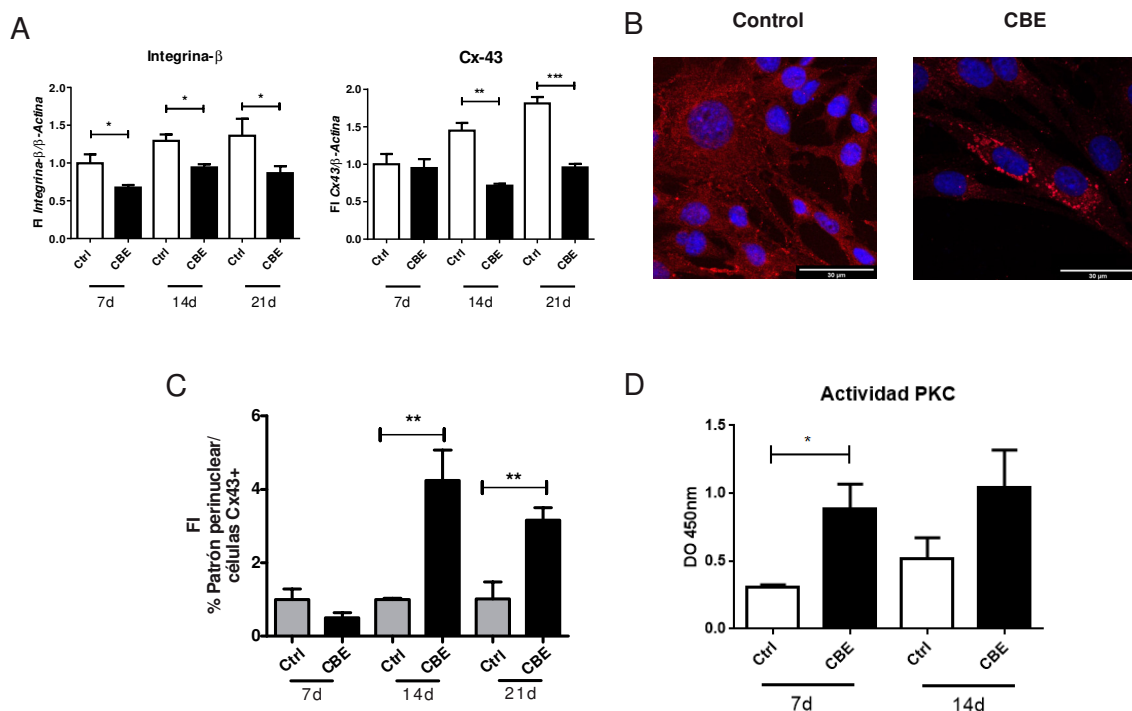


Fig. 2 Proteínas de uniones intercelulares en osteocitos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE. Determinación de la expresión de los genes *Integrina-β* (izquierda) y *Cx43* (derecha) (A). Distribución intracelular de Cx43 no fosforilada en Ser368 en osteocitos Ctrl (izquierda) y osteocitos tratados con CBE (derecha) (B). Identificación de células que presentan el patrón perinuclear de Cx43 en función de las células Cx43 positivas (C). Determinación de la actividad de la enzima PKC (D). Los resultados se expresan como el incremento de la expresión del gen de interés o del porcentaje de células positivas para Cx-43 con respecto a los osteocitos Ctrl de 7 días FI: *Fold Increase* (incremento). Barra de escala: 30µm. Color verde: Cx43; Color azul: Núcleos. *Test-t* no pareado * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Apoptosis

Se ha demostrado que la deficiencia de Cx43 en los osteocitos conduce a un aumento de la apoptosis en estas células (Bivi et al., 2012). Debido a que los osteocitos tratados con CBE presentan una menor expresión génica y una distribución celular alterada de la Cx43 decidimos evaluar si estas células sufren muerte por apoptosis. Se cultivaron los osteocitos con/sin CBE por 7 y 14 días y evaluamos los niveles de apoptosis mediante Anexina V/IP y TUNEL. Como se puede observar en la figura 3, los osteocitos tratados con CBE presentan mayores niveles de apoptosis que los osteocitos control, tanto para Anexina V/IP (Fig. 3a) como para TUNEL (Fig. 3b) a los dos tiempos evaluados.

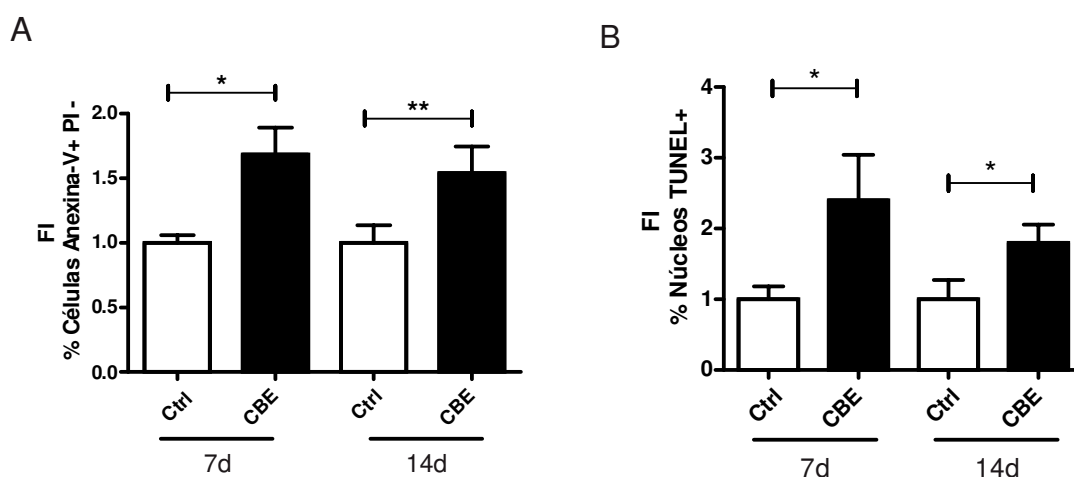


Fig. 3 Muerte celular en osteocitos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE. Determinación de células apoptóticas mediante las técnicas de Anexina V/IP (A) y TUNEL (B). Los resultados se expresan como el incremento del porcentaje de células positivas con respecto a los osteocitos Ctrl de 7 días. FI: *Fold Increase (incremento)*. *Test-t* no pareado * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Evaluación de toxicidad CBE

Para poder discriminar si el aumento de apoptosis detectada en el tratamiento de los osteocitos con CBE son una consecuencia de la acumulación de glucosilceramida o a un efecto tóxico directo del CBE sobre las células, tratamos a los osteocitos con cantidades crecientes de CBE (250, 500, 750 y 1500 μM) por 3 y 7 días y evaluamos la apoptosis. A los 7 días de tratamiento, evidenciamos aumentos significativos en los niveles de apoptosis a partir de una concentración de CBE de 500 μM que se mantuvo sin cambios entre los 500 μM y 1500 μM (Fig. 4a). Cabe destacar que tanto a los 3 como a los 7 días

de tratamiento, no se detectaron cambios en la cantidad de células necróticas y con apoptosis tardía para las diferentes concentraciones de CBE empleadas (Fig. 4b). Según estos resultados, podríamos inferir que la apoptosis temprana es un efecto inherente a la deficiencia de la enzima GCasa y no a un efecto tóxico producido por el CBE.

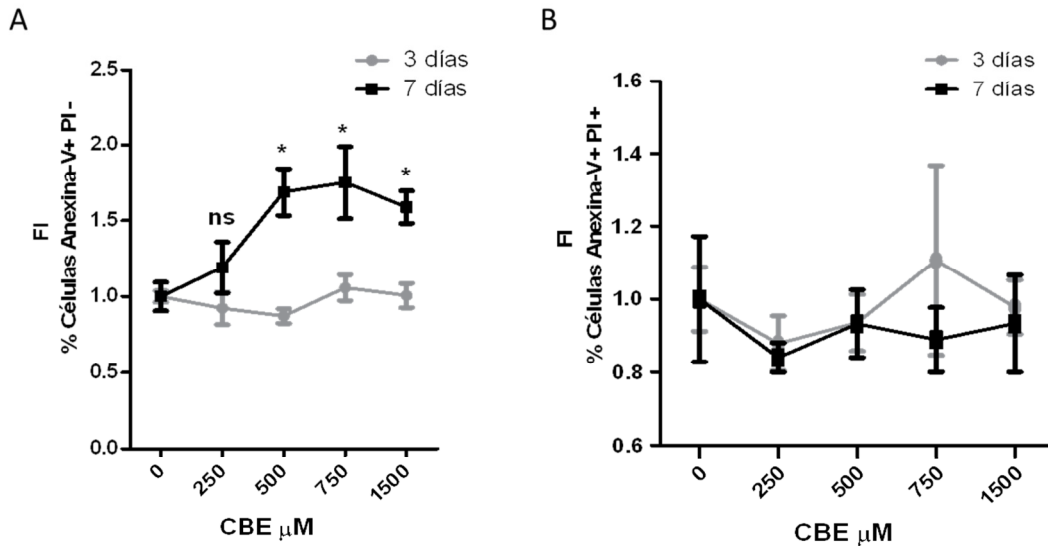


Fig. 4 Toxicidad del CBE en osteocitos tratados con CBE por 3 (Gris) y 7 días (Negro). Determinación de células apoptóticas (A), necróticas y con apoptosis tardía (B) evaluados por la técnica de Anexina V/IP en citómetro de flujo. Los resultados se expresan como el incremento del porcentaje de células positivas con respecto a los osteocitos sin CBE. FI: *Fold Increase (incremento)*. Test-t no pareado * $p < 0.05$

Evaluación de componentes liberados por osteocitos apoptóticos y su relación con la osteoclastogénesis

Los osteoclastos son las células responsables de la resorción ósea. Estas células se originan a partir de la fusión de precursores que pertenecen al linaje monocítico/macrofágico de la médula ósea, en un proceso conocido como osteoclastogénesis (Feng et al., 2013; Teitelbaum, 2007). Fisiológicamente, este proceso está mediado por M-CSF y RANKL, pero bajo condiciones inflamatorias también podría estar mediado por citoquinas (Azuma et al., 2000; Kenkre et al., 2018). Incluso, existe evidencia de que la apoptosis de osteocitos estimula la osteoclastogénesis mediante un aumento en el reclutamiento de precursores de osteoclastos, la secreción de cuerpos apoptóticos, RANKL, M-CSF y VEGF (Al-Dujaili et al., 2011; Kogianni et al., 2008). En este marco, decidimos evaluar si los osteocitos tratados con CBE tienen un

mayor potencial osteoclastogénico que los osteocitos control debido a su estado pro-apoptótico. Para ello, se trataron los osteocitos con/sin CBE por 7, 14 y 21 días para obtener los sobrenadantes condicionados y se realizaron los ensayos de osteoclastogénesis como se describió en materiales y métodos. Como se puede ver en la figura 5a, los sobrenadantes condicionados provenientes de los osteocitos tratados con CBE generan un mayor número de células multinucleadas TRAP⁺ (osteoclastos) que los sobrenadantes control. También realizamos el ensayo de osteoclastogénesis sobre una matriz de dentina para distinguir a los osteoclastos con capacidad para resorber matriz ósea, los cuales se evidencian por dejar áreas de resorción (Fig. 5b izquierda). La cuantificación de áreas de resorción indica que los sobrenadantes provenientes de los osteocitos tratados con CBE generan un mayor número de osteoclastos con capacidad de resorber matriz ósea en comparación con los osteocitos control (Fig. 5b derecha). Para asegurar que el efecto de los sobrenadantes se deba a la presencia de mediadores inducidos por el tratamiento con CBE y no a la acción directa de CBE sobre los precursores de osteoclastos, tratamos los precursores con CBE en presencia de M-CSF. No observamos diferencias entre las células tratadas con CBE en presencia de M-CSF y las que fueron cultivadas sólo con medio de cultivo (Fig. 5a y b).

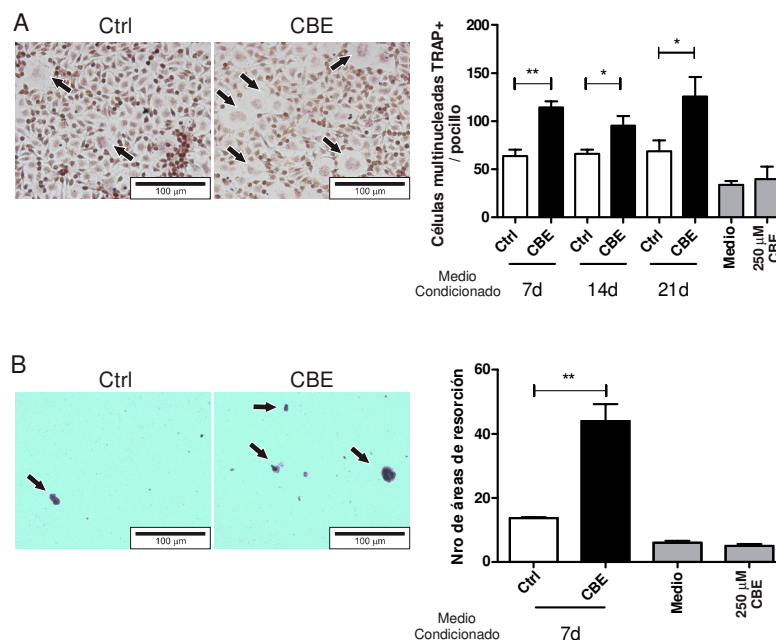


Fig. 5 Osteoclastogénesis indirecta con sobrenadantes de osteocitos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE. Imagen microscópica (izquierda) y cuantificación del número de células multinucleadas TRAP⁺ (derecha) (A). Imagen microscópica (izquierda) y cuantificación del número de áreas de resorción (B). Barra de escala: 100 μm. *Test-t* no pareado * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Una vez determinada la capacidad osteoclastogénica de los sobrenadantes de osteocitos tratados con CBE, evaluamos los posibles componentes responsables de este aumento significativo en el proceso de osteoclastogénesis. Se ha demostrado que los osteocitos presentan RANKL en su superficie, el cual interacciona con el receptor RANK de los precursores de osteoclastos para inducir la osteoclastogénesis. Por ello, la cantidad de RANKL presentada en la superficie celular de los osteocitos es un factor crítico para este proceso. Inclusive, se demostró que una gran proporción de la expresión de RANKL se localiza en los lisosomas y que el OPG (receptor señuelo para RANKL) regula el tráfico de RANKL, restringiendo la presentación del mismo en la superficie celular. El OPG también puede ser secretado uniéndose al dominio extracelular de RANKL evitando la unión al receptor RANK ubicado en los osteoclastos (Honma et al., 2014). Teniendo en cuenta la relevancia de RANKL y OPG en el proceso de osteoclastogénesis, decidimos evaluar la relación existente entre la expresión a nivel de ARNm de estos dos genes (*Rankl/Opg*) en osteocitos con/sin CBE tratados por 7 días. Los resultados indicaron que los osteocitos tratados con CBE tienen una mayor relación *Rankl/Opg* que los osteocitos no tratados (Fig. 6a), lo que explicaría en parte el aumento de la osteoclastogénesis previamente observada.

También analizamos la contribución de los cuerpos apoptóticos producidos por dichos osteocitos al tiempo en el que evidenciamos una mayor osteoclastogénesis, ya que ha sido observado que los osteocitos estimulan este proceso cuando se encuentran en apoptosis (Al-Dujaili et al., 2011; Kogianni et al., 2008). Los cuerpos apoptóticos se aislaron por ultracentrifugación como se ha detallado en materiales y métodos, y se realizó el ensayo de osteoclastogénesis estimulando los precursores de osteoclastos con los cuerpos apoptóticos obtenidos. Los resultados mostraron que los cuerpos apoptóticos provenientes de los osteocitos tratados con CBE generaron una mayor cantidad de células multinucleadas TRAP⁺ que los provenientes de los osteocitos control (Fig. 6b). Para determinar si la presencia de RANKL en los cuerpos apoptóticos influye en la diferenciación de osteoclastos, se realizaron a la par los experimentos de osteoclastogénesis en presencia de OPG. Al agregar el inhibidor OPG a los ensayos, el número de células multinucleadas TRAP⁺ disminuye significativamente alcanzando los niveles basales correspondientes al control (Fig. 6b), indicando que existe una contribución del RANKL de la superficie de los cuerpos apoptóticos en este proceso. Para determinar si la cantidad de RANKL en la superficie de los cuerpos apoptóticos de

los osteocitos tratados con CBE era mayor que la de los osteocitos control, los cuerpos apoptóticos se marcaron con un anticuerpo específico para RANKL para analizarlos mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos indicaron que no hay diferencias en la cantidad de RANKL de superficie entre los cuerpos apoptóticos provenientes de osteocitos tratados con CBE respecto de los provenientes de los controles (Fig. 6c). Debido a estas observaciones, podemos sugerir que el aumento de la osteoclastogénesis podría deberse a un aumento en el número de cuerpos apoptóticos y no a una mayor expresión de RANKL en su superficie.

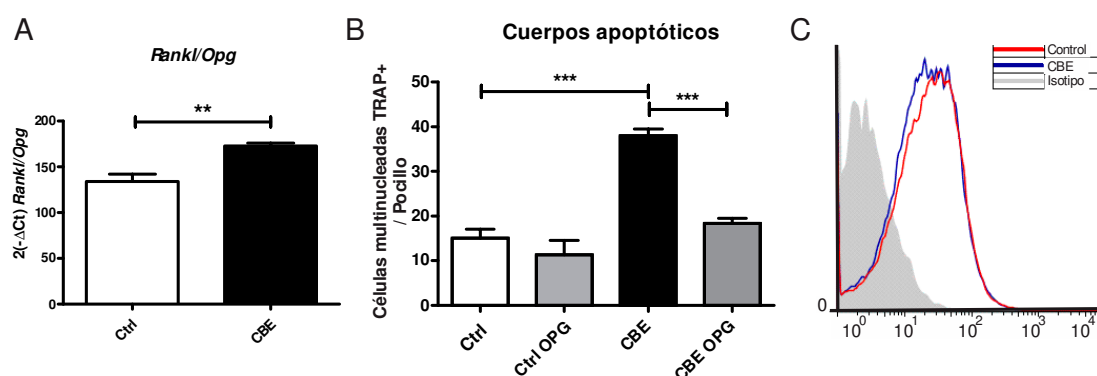


Fig. 6 Cuantificación de la expresión a nivel de ARNm de la relación *Rankl/Opg* en osteocitos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE durante 7 días (A). Cuantificación de células multinucleadas TRAP⁺ en un ensayo de osteoclastogénesis indirecta con cuerpos apoptóticos en presencia/ausencia de OPG (50 ng/ml) (B). Cuantificación de RANKL de superficie en los cuerpos apoptóticos por citometría de flujo (C). A y C: *Test-t* no pareado; B: *Test ANOVA* de una vía ***p* < 0,01; ****p* < 0,001

Como se ha mencionado anteriormente, RANKL puede encontrarse anclado a membrana, pero también se puede encontrar en forma soluble (Nakashima et al., 2000; Walsh et al., 2014). Para determinar el rol del RANKL soluble presente en los sobrenadantes de la ultracentrifugación, se realizó el ensayo de osteoclastogénesis en presencia/ausencia de OPG. Los resultados indican que los sobrenadantes provenientes de los osteocitos tratados con CBE en presencia de OPG presentaron un potencial osteoclastogénico significativamente menor que los sobrenadantes sin OPG (Fig. 7a). A pesar de observar una reducción en la formación de células multinucleadas TRAP⁺ con el agregado de OPG, estos valores no remiten totalmente al número de células multinucleadas TRAP⁺ obtenidas para los sobrenadantes control. Este resultado sugiere que además de la contribución de RANKL soluble puede haber otro componente soluble que esté promoviendo el proceso de osteoclastogénesis. Así como el RANKL y

OPG intervienen en este proceso, existen otros factores en situaciones patológicas que también influyen de manera estimuladora, como por ejemplo: IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Huynh et al., 2017; Teitelbaum, 2007). Por consiguiente, se decidió evaluar los niveles de citoquinas pro-osteoclastogénicas IL-6, TNF- α e IL-1 β presentes en los sobrenadantes de cultivo de los osteocitos mediante la técnica de ELISA. Los resultados indican un aumento significativo para la citoquina IL-6 en sobrenadante de osteocitos tratados con CBE, mientras que no se observaron niveles diferencias significativas en los niveles de TNF- α e IL-1 β (Fig. 7b).

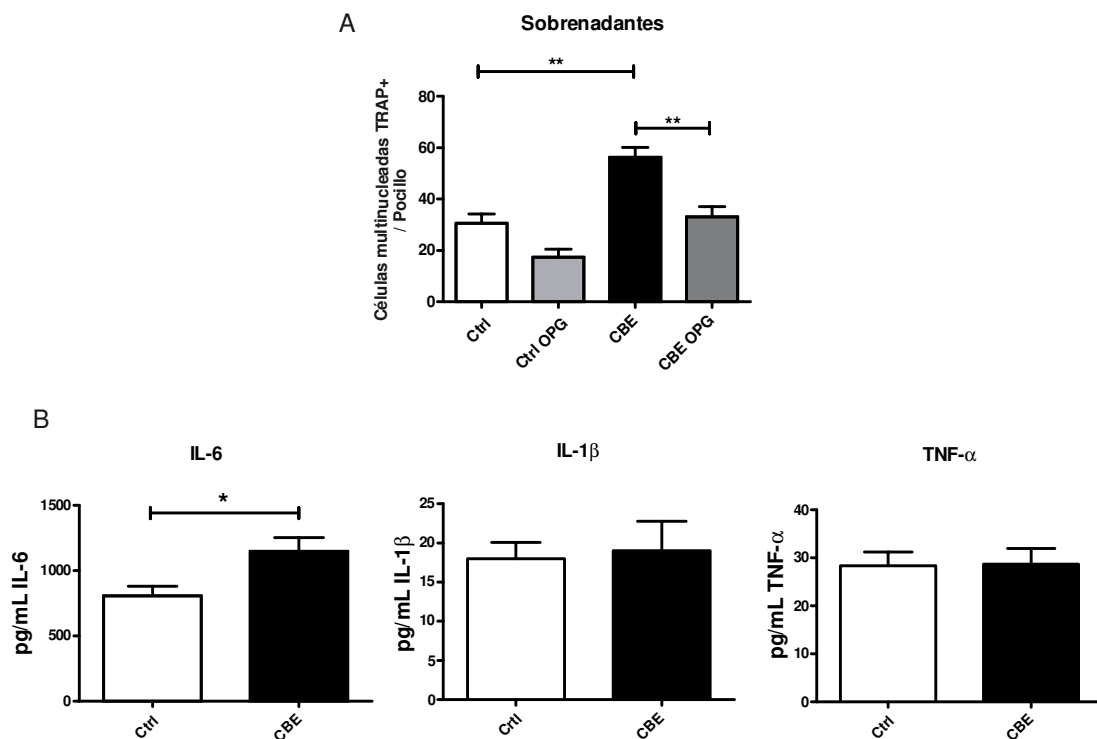


Fig. 7 Cuantificación de células multinucleadas TRAP⁺ en un ensayo de osteoclastogénesis indirecta con los sobrenadantes de los cuerpos apoptóticos en presencia/ausencia de OPG (50 ng/ml) (A). Concentración de citoquinas IL-6 (izquierda), IL-1 β (centro) y TNF- α (derecha) (B). A: *Test* ANOVA de una vía; B: *Test-t* no pareado; * p <0.05; ** p <0.01

Discusión

El osteocito es el tipo de célula más abundante del hueso aunque su papel en la dinámica ósea fue descrito recientemente (Bonewald, 2011; Nakashima et al., 2011). Dentro de sus funciones, se ha demostrado que están implicados en la regulación del remodelamiento óseo, el censado de estímulos mecánicos que coordinan la respuesta del esqueleto a la carga o descarga y función como células endócrinas, por lo que la alteración en dichas células podría llevar a un estado de formación o resorción anormales del hueso que ocasionaran trastornos caracterizados por una microestructura ósea debilitada (Bonewald, 2017; Su et al., 2019). Dadas estas observaciones, el objetivo de este capítulo fue estudiar la participación de los osteocitos en la homeostasis ósea de la enfermedad de Gaucher. Para este fin, utilizamos la línea celular de osteocito murino MLO-Y4 como modelo *in vitro*.

Para estudiar la fisiología de los osteocitos en un contexto Gaucher se utilizó el inhibidor de la enzima GCasa (CBE), lo cual permite generar una deficiencia de la enzima GCasa, y servir así como modelo *in vitro* de la EG. El tratamiento de esta línea celular con CBE redujo la actividad de la GCasa a niveles cercanos al 4%, al igual que se observó en un modelo de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) donde también se utiliza este mismo inhibidor (Mucci et al., 2012). La determinación de la acumulación de glucosilceramida se realizó por un método semicuantitativo (TLC), y los resultados que obtuvimos fueron comparables con los hallados para el modelo *in vitro* de PBMCs, siendo la acumulación significativamente mayor en las células tratadas con el inhibidor (Mucci et al., 2012).

Los osteocitos están adaptados para sobrevivir en un entorno mineralizado gracias a que están comunicados entre sí (y con otras células) mediante proyecciones dendríticas en un sistema lácuno-canalicular. Esta morfología característica permite el paso de nutrientes y señales bioquímicas de un osteocito a otro formando una red funcional (Dallas et al., 2013). La Cx43 es la proteína más abundante expresada en células óseas y media la comunicación célula a célula así como las interacciones célula-matriz (Loiselle et al., 2013) y se ha demostrado que la deficiencia de Cx43 en los osteocitos conduce a un aumento de la apoptosis en estas células (Bivi et al., 2012). Con este fin, estudiamos la Cx43 como proteína involucrada en la supervivencia de los osteocitos. Así,

demostramos que los niveles de expresión a nivel de ARNm de la Cx43 fueron menores en los osteocitos tratados con CBE y que además se encontraba distribuida formando un patrón perinuclear.

La familia de las conexinas se agrupan en hexámeros para formar poros por los cuales se establece el intercambio de iones y cuyo cierre/apertura está regulado por procesos de fosforilación (Cushing et al., 2005; Martin et al., 2001). La Cx43 tiene varios sitios de fosforilación donde el sitio Ser368 es considerado como un objetivo importante de los efectos mediados por PKC, enzima cuya actividad mostramos que está aumentada en osteocitos tratados con CBE. De esta manera, la fosforilación en el sitio Ser368 conduciría a un estado cerrado del hemicanal, por lo que la comunicación célula-célula, célula-matriz extracelular quedaría reducida (Morel et al., 2012). Por otro lado, la fosforilación mediada por MAPK y PKC de Cx43 en las serinas 252, 262, 279/282 y 368 se ha vinculado recientemente al proceso de endocitosis de uniones estrechas en células madre embrionarias de ratón y en células endoteliales de arteria primaria pulmonar (Falk et al., 2016). Cabe destacar que el anticuerpo utilizado para los ensayos de microscopía reconoce la forma no fosforilada en el sitio Ser368 de la Cx43, independientemente de que otros sitios estén fosforilados. Sin embargo, si la Cx43 se encuentra fosforilada en el sitio Ser368 ya no es detectada con nuestro anticuerpo. Según nuestros resultados y basándonos en evidencia de otros trabajos, la Cx43 estaría mayormente fosforilada en el sitio Ser368 en los osteocitos tratados con CBE, lo que podría indicar un aumento en el estado cerrado de los hemicanales y/o promoviendo la endocitosis de los canales de superficie que establecen la unión entre células. Como consecuencia de la ausencia/cierre de canales/hemicanales de Cx43 en la membrana plasmática, las interacciones intercelulares disminuirán induciendo el proceso de apoptosis en dichos osteocitos pudiendo provocar una estimulación en el proceso de osteoclastogénesis (Loiselle et al., 2013; Xu et al., 2015).

La evaluación de la apoptosis en los osteocitos tratados con CBE dio como resultado un aumento en el número de células apoptóticas con respecto a los osteocitos control, lo que se podría atribuir a lo expuesto anteriormente, descartando un efecto tóxico del CBE sobre estas células. Existe evidencia de que la apoptosis de osteocitos estimula la formación de osteoclastos en parte por un aumento en el reclutamiento de los precursores de osteoclastos y la secreción de mediadores como cuerpos apoptóticos, RANKL, M-CSF y VEGF (Al-Dujaili et al., 2011; Kogianni et al., 2008). Para

determinar si los cuerpos apoptóticos derivados de la mayor apoptosis observada en los osteocitos de nuestro modelo podían tener un rol en la osteoclastogénesis se realizó un protocolo de centrifugación de dos pasos para su aislamiento. En este procedimiento, no podemos descartar la presencia de microvesículas y células necróticas, ya que en la práctica se ha visto que todas las preparaciones de vesículas son heterogéneas (Théry et al., 2009). Sin embargo, se ha descrito que los osteocitos en proceso de necrosis no inducen la diferenciación de osteoclastos (Kogianni et al., 2008), con lo que podríamos descartar su participación en el proceso. Nuestros resultados han demostrado que la diferenciación de osteoclastos se induce significativamente por los cuerpos apoptóticos provenientes de osteocitos tratados con CBE a diferencia de los originados por los osteocitos no tratados. Además, hemos observado que RANKL se encuentra en la superficie de estas estructuras, pero su cantidad es equivalente para ambas condiciones, por lo que es probable que las diferencias en la inducción de la osteoclastogénesis sean causadas por un mayor número de cuerpos apoptóticos derivados de los osteocitos tratados con CBE.

Varias moléculas solubles también son capaces de inducir osteoclastogénesis, entre ellas se encuentran las citoquinas IL-6, TNF- α e IL-1 β , las cuales se ha demostrado que están aumentadas en modelos de enfermedad de Gaucher (Hong et al., 2006). Cuando evaluamos estas citoquinas en el modelo, no se observaron diferencias en los niveles de TNF- α e IL-1 β , aunque los niveles de IL-6 fueron más altos en los sobrenadantes provenientes de las células tratadas con CBE. Se ha descrito que los osteocitos pueden producir IL-6 *in vivo* e *in vitro* (Bakker et al., 2014) e incluso en estado de apoptosis (Cheung et al., 2012). Se vio que esta citoquina es capaz de estimular la formación de osteoclastos a partir de PBMCs (Kudo et al., 2003) y que también lo puede hacer a través de la estimulación de osteoblastos para que aumenten su expresión de RANKL (McGregor et al., 2019).

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la deficiencia de la GCasa y la consecuente acumulación de glucosilceramida en osteocitos genera un estado pro-osteoclastogénico mediado por RANKL, IL-6 y cuerpos apoptóticos que son liberados por estas células en estado de apoptosis.

Capítulo 2

Rol de los osteoblastos en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher

Los osteoblastos se originan a partir de células mesenquimales residentes en la médula ósea, diferenciándose primero a pre-osteoblastos y luego a osteoblastos maduros en un proceso llamado osteoblastogénesis (Bellido et al., 2014), siendo los responsables de la formación del hueso. La osteoblastogénesis implica la deposición de matriz orgánica para luego dar lugar a la mineralización. Para ello, se requiere de la secreción de colágeno tipo I (Capulli et al., 2014) y de la formación de cristales de hidroxapatita con ayuda de la enzima fosfatasa alcalina, que se liberarán al medio extracelular para rellenar el espacio libre entre las fibrillas de colágeno de la matriz extracelular (Anderson, 2003).

Como se ha mencionado, el sistema óseo se encuentra en un proceso de continuo remodelamiento para mantener su estructura y función. Luego de que los osteoclastos remueven las zonas dañadas o muertas, los osteoblastos rellenan los espacios vacíos para generar hueso nuevo. Cuando este proceso es deficiente, la estructura ósea se ve comprometida y debilitada (Kenkre et al., 2018).

A pesar del tratamiento que reciben los pacientes Gaucher, el mismo no resulta del todo efectivo para subsanar las problemáticas óseas. En el capítulo anterior se demostró que los osteocitos tratados con CBE presentaban un aumento en la apoptosis y que esta alteración desencadenaba una estimulación en el proceso de osteoclastogénesis, situación que podría contribuir a una menor densidad ósea. Sin embargo, queda por evaluar si los osteoblastos presentan alteraciones que también puedan contribuir a una menor densidad ósea debido a una disminución de su actividad de formación de matriz ósea. De esta manera, se utilizó la línea precursora de osteoblastos murina MC3T3-E1 tratada con inhibidor de la enzima GCasa (CBE) como modelo *in vitro* de estudio.

Validación del modelo

Para evaluar el efecto inhibitorio del CBE sobre la actividad de la GCasa en la línea MC3T3-E1, se cultivaron estas células con CBE 500 μ M por 3 y 4 días, realizando un cambio de medio a este último día. Se observó que los valores de actividad para la GCasa se mantuvieron alrededor del 3% durante los primeros 3 días de tratamiento pero aumentaron a un 12% al cuarto día. Cuando se realiza el cambio de medio al tercer día, la inhibición de la actividad GCasa se reestablece a los valores iniciales (Fig. 8). A partir de estos resultados, los cambios de medio se establecieron en un período máximo de 3 días en cultivo.

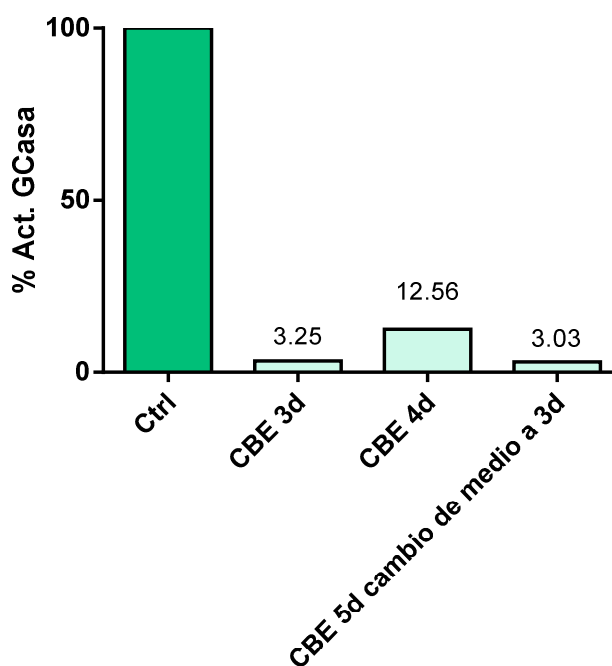


Fig. 8 Validación del modelo *in vitro* murino. Actividad GCasa en pre-osteoblastos MC3T3-E1 tratados con CBE 500 μ M (CBE) por 3 y 4 días con cambio de medio al tercer día, expresada como porcentaje con respecto a pre-osteoblastos sin tratar (Ctrl).

Evaluación de la diferenciación a osteoblastos de MC3T3-E1

El crecimiento y diferenciación de osteoblastos se puede dividir en tres etapas: una vez que se induce la expresión de *Runx2* y *ColA1* en los progenitores de osteoblastos

comienza la etapa de proliferación durante la cual los progenitores adquieren actividad fosfatasa alcalina, convirtiéndose en pre-osteoblastos. Éstos experimentan cambios morfológicos transformándose en células cuboidales grandes. Luego, sigue la etapa de maduración de osteoblastos que se caracteriza por una mayor expresión de las proteínas de la matriz ósea como la Osteocalcina, BSP I y II y colágeno tipo I para obtener osteoblastos maduros. Estas células quedarán atrapadas en la matriz ósea recién depuesta donde se producirá la mineralización de la matriz extracelular que se evidencia por la deposición de calcio en forma de cristales de hidroxapatita (Anderson, 2003; Capulli et al., 2014; Setzer et al., 2009).

Para estudiar la actividad de formación ósea por parte de los osteoblastos tratados con CBE, decidimos evaluar la producción de colágeno tipo I y la deposición de calcio (mineralización) a 7, 14 y 21 días de diferenciación con/sin tratamiento con CBE. Para la detección de colágeno tipo I se utilizó el colorante *Sirius Red* y para la detección de los depósitos de calcio el colorante *Alizarin Red*. En la evaluación de la producción de colágeno, los resultados mostraron que tanto para los osteoblastos control como para los tratados con CBE hay un aumento en los valores de colágeno tipo I durante el avance de la diferenciación. En tanto que a partir de los 14 días observamos que los osteoblastos tratados con CBE tienen una menor capacidad de producción de colágeno en comparación con los osteoblastos control (Fig. 9a). En la evaluación del proceso de mineralización, también se observó que los niveles de calcio aumentaban tanto para los osteoblastos control como para los tratados con CBE a lo largo de la diferenciación, pero a los 21 días los osteoblastos tratados con CBE mostraron una disminución significativa en los depósitos de calcio con respecto a los osteoblastos control (Fig. 9b). Estos resultados ponen de manifiesto que los osteoblastos que presentan una deficiencia en la actividad GCasa desarrollan alteraciones que disminuyen su proceso de maduración y mineralización.

La expresión del factor de transcripción relacionado a runt 2 (*Runx2*) es fundamental para la expresión de genes necesarios para el proceso de osteoblastogénesis (Stein et al., 2004; Zou et al., 2015). Con el fin de estudiar si existían diferencias en los niveles de expresión de este gen en los osteoblastos tratados con CBE, se evaluó la expresión a nivel de ARNm de *Runx2* en osteoblastos de 7, 14 y 21 días de diferenciación. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de expresión de *Runx2* en osteoblastos

control aumentan a medida que avanzan en el proceso de diferenciación. Sin embargo, en los osteoblastos tratados con CBE estos valores se mantienen constantes durante todo el proceso. A los 21 días se observa que los osteocitos tratados con CBE presentan una disminución significativa en la expresión de *Runx2* (Fig. 10).

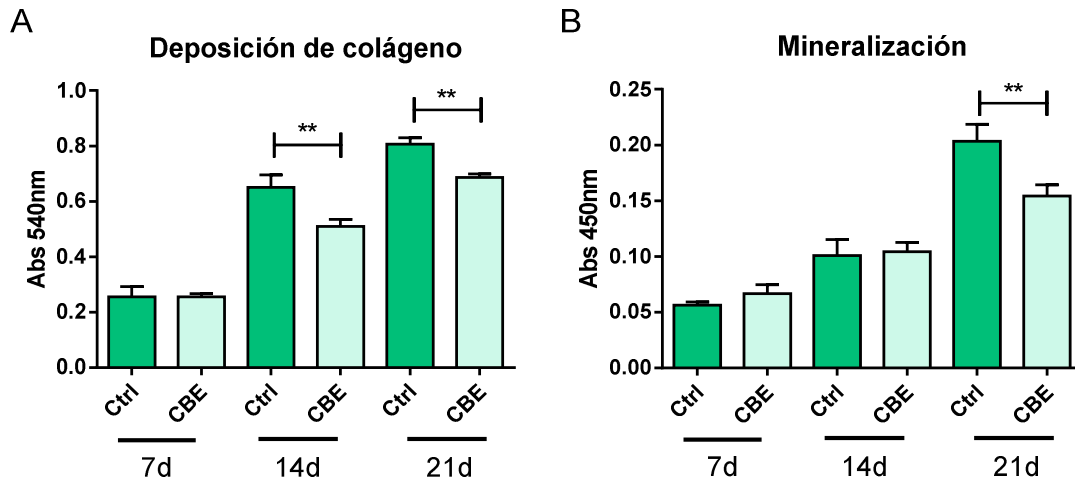


Fig. 9 Diferenciación de MC3T3-E1 a osteoblastos. Determinación de la absorbancia a 540 nm de la extracción del colorante *Sirius Red* asociado a la producción de colágeno (A) y determinación de la absorbancia a 450 nm de la extracción del colorante *Alizarin Red* asociado al proceso de mineralización (B) en osteoblastos con/sin CBE 500 μ M. *Test-t* no pareado ** $p < 0.01$

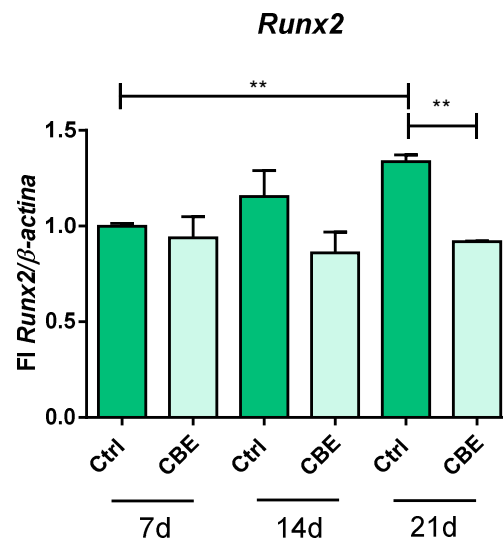


Fig. 10 Expresión a nivel de ARNm del gen *Runx2* en osteoblastos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE 500 μ M por 7, 14 y 21 días. Los resultados se expresan como el incremento de la expresión génica con respecto a los osteoblastos Ctrl de 7 días. FI: *Fold Increase (incremento)*. *Test-t* no pareado ** $p < 0.01$

Evaluación del proceso de apoptosis en MC3T3-E1 diferenciadas a osteoblastos

La menor actividad de formación ósea observada podría deberse a una menor actividad intrínseca de los osteoblastos o una mayor muerte celular. A fin de determinar entre estas dos posibilidades decidimos evaluar los niveles de apoptosis. Para ello, se diferenciaron las MC3T3-E1 a osteoblastos por 14 y 21 días, tiempos a los cuales se observaron las disminuciones en la actividad de osteoblastos, y se determinó el grado de muerte celular por las técnicas de TUNEL y AnexinaV/IP. Los resultados de apoptosis por TUNEL no arrojaron diferencias significativas en los niveles de apoptosis entre las células control y las tratadas con CBE, tanto a 14 como a 21 días de diferenciación (Fig. 11a). Tampoco observamos diferencias en los niveles de apoptosis evaluados mediante anexina V/IP (Fig. 11b). Otro mecanismo por el cual las células pueden morir es mediante necrosis, por lo que también se evaluó la población de células necróticas y en apoptosis tardía (AnexinaV⁺ IP⁺) en el mismo ensayo. Los osteoblastos tratados con CBE tampoco mostraban diferencias significativas en esta población con respecto al control (Fig. 11c).

Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos descartar que la disminución en la formación ósea observada en los osteoblastos tratados con CBE sea debido a un aumento en la muerte celular.

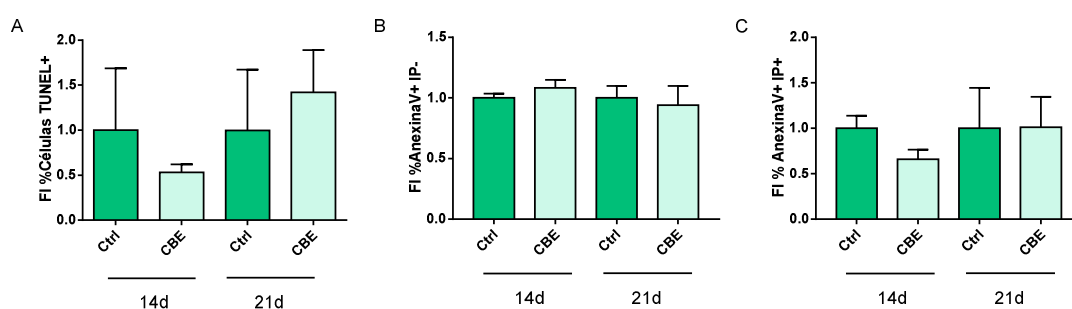


Fig. 11 Apoptosis en MC3T3-E1 diferenciadas a osteoblastos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE 500 μ M por 14 y 21 días. Recuento de células TUNEL positivas (TUNEL⁺) por microscopía expresado como el incremento porcentual sobre el total de células (A). Recuento de células Anexina V⁺/IP⁻ (apoptosis temprana) (B). Recuento de células AnexinaV⁺/IP⁺ (necrosis y apoptosis tardía) (C). Los resultados se expresan como el incremento del porcentaje de células positivas con respecto a los osteoblastos Ctrl de 14 días. FI: *Fold Increase* (incremento). *Test-t* no pareado: no significativo

Evaluación de los componentes liberados por MC3T3-E1 diferenciadas a osteoblastos y su relación con la osteoclastogénesis

Ya hemos demostrado que los osteoblastos en nuestro modelo tienen menor actividad de formación de hueso, lo que podría contribuir a una baja densidad ósea en la enfermedad de Gaucher. Los osteoblastos además de ser capaces de generar hueso, regulan el proceso de osteoclastogénesis (Chen et al., 2018). Este proceso involucra la generación de osteoclastos, lo que podría ocasionar una mayor resorción ósea. El principal mecanismo fisiológico a través del cual este proceso es estimulado es el eje RANK-RANKL-OPG, por lo que nos propusimos evaluar la contribución de estos factores en el modelo a través de ensayos de osteoclastogénesis *in vitro*. Para ello se recolectaron los sobrenadantes condicionados de osteoblastos tratados (CBE) y no tratados con CBE (Ctrl) a los 7 y 14 días de diferenciación y se realizó el ensayo como se indica en materiales y métodos. Los resultados mostraron que el agregado de los sobrenadantes condicionados de células tratadas con CBE de 14 días de diferenciación, generaban un aumento en la formación de células multinucleadas TRAP⁺ en comparación con los sobrenadantes control (Fig. 12a).

Como se ha mencionado, una de las vías a través de la cual se promueve la diferenciación de osteoclastos es el eje RANKL-RANK-OPG, por esa razón se ha decidido evaluar la expresión de los genes *Rankl* y *Opg* a nivel de ARNm en los osteoblastos del modelo. Como la osteoprotegerina (OPG) se une a RANKL inhibiendo su unión al receptor, el resultado de la relación entre ambos es la que va a determinar si el efecto neto es estimulador o inhibitorio. La determinación de esta relación evidenció que los osteoblastos tratados con CBE presentaban un aumento en la relación *Rankl/Opg* con respecto a los osteoblastos control, siendo significativa a los 14 días (Fig. 12b). A su vez, se cuantificó por microscopía la cantidad de células que expresaban RANKL. Los resultados mostraron que tanto a 7 como a 14 días de diferenciación, los osteoblastos tratados con CBE poseían un mayor número de células que expresan RANKL en comparación con los osteoblastos control, pero fue significativamente mayor a los 14 días (Fig. 12c). Estos resultados indicarían que la mayor osteoclastogénesis inducida por los sobrenadantes de los osteoblastos tratados con CBE sería, al menos en parte, a través del eje RANK-RANKL-OPG.

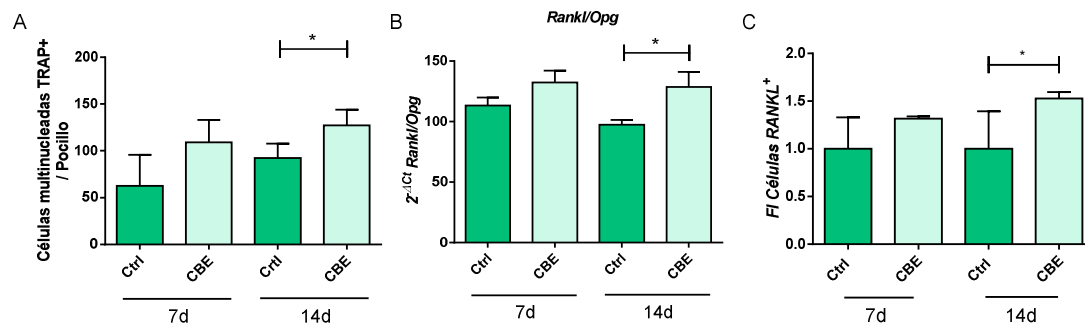


Fig. 12 Osteoclastogénesis mediada vía RANKL-OPG en osteoblastos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE 500 μ M por 7 y 14 días. Recuento de células multinucleadas TRAP⁺ inducidas por los sobrenadantes condicionados de osteoblastos (A). Cuantificación de la expresión de los genes *Rankl* y *Opg* expresado como el cociente entre ambos (B). Cuantificación de osteoblastos RANKL⁺ evaluados por microscopía (C). FI: *Fold Increase* (incremento). Test-t no pareado * $p < 0.05$

En condiciones patológicas, como la inflamación asociada a diversas enfermedades crónicas, existen otros factores parácrinos que estimulan la osteoclastogénesis como lo son las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Huynh et al., 2017; Teitelbaum, 2007). A raíz de ello, evaluamos el contenido de estas citoquinas en los sobrenadantes condicionados tratados y sin tratar con CBE a 7 y 14 días de diferenciación. Para ambos tiempos, observamos que los niveles de IL-6 son menores a medida que avanza la diferenciación y, además, son significativamente menores en los osteoblastos tratados con CBE con respecto al control (Fig. 13a). La determinación de los niveles de TNF- α (Fig. 13b) e IL-1 β (Fig. 13c), no dieron diferencias significativas entre los osteoblastos tratados con CBE y los osteoblastos control. Dado estos resultados donde las citoquinas pro-osteoclastogénicas están disminuidas o no presentaron diferencias entre los osteoblastos control y los tratados con CBE, quedaría descartado el rol de las citoquinas proinflamatorias en la osteoclastogénesis inducida por los osteoblastos de este modelo *in vitro*.

Figura 13 →

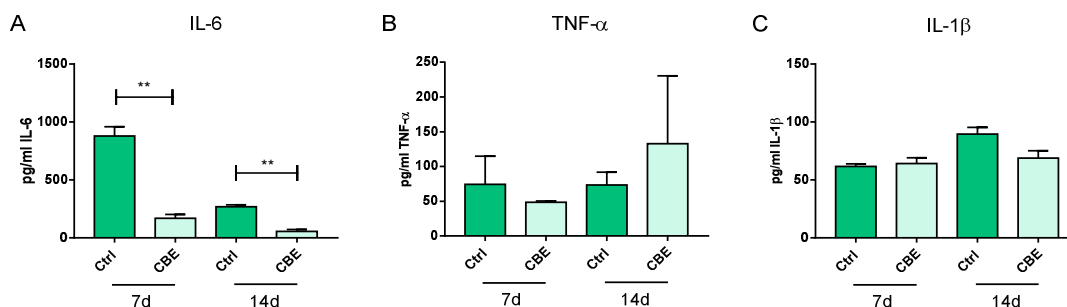


Fig. 13 Citoquinas presentes en los sobrenadantes condicionados de osteoblastos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE 500 μ M por 7 y 14 días. Concentración (pg/ml) de IL-6 (A), TNF- α (B) e IL-1 β (C). Test-t no pareado ** $p < 0.01$

Las vesículas extracelulares, incluidos los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos, desempeñan un papel importante en la comunicación celular durante el crecimiento y la homeostasis ósea al transportar moléculas bioactivas a células vecinas (Yuan et al., 2018). En los últimos años se ha descrito que los osteoblastos, al igual que los osteocitos, liberan microvesículas al medio extracelular que tienen la capacidad de estimular la actividad de los osteoclastos a través del eje RANKL-RANK (Deng et al., 2015). Por esta razón decidimos evaluar la presencia y el rol de estas vesículas en los sobrenadantes de los osteoblastos diferenciados por 14 días en el proceso de osteoclastogénesis. Para ello, se ultracentrifugaron en dos pasos los sobrenadantes de osteoblastos tratados y sin tratar con CBE, como se indica en materiales y métodos, obteniéndose dos fracciones: una fracción que contiene a las microvesículas (*pellet*) y la otra contiene la fracción soluble (sobrenadante). Ambas fracciones se utilizaron para realizar el ensayo de osteoclastogénesis descrito previamente. La fracción que contiene las microvesículas de los osteoblastos tratados con CBE indujo un aumento significativo en la formación de células multinucleadas TRAP⁺ (Fig. 14a). Durante el mismo ensayo se adicionó OPG para evaluar si el eje RANKL-RANK está involucrado en el proceso de osteoclastogénesis. La presencia de OPG en la fracción proveniente de las células tratadas con CBE disminuyó la formación de células multinucleadas TRAP⁺ a los mismos niveles que el control (Fig. 14a), lo indica que el RANKL de las vesículas está involucrado en la formación de osteoclastos. Por otro lado, evaluamos la fracción soluble donde se encontró que la fracción proveniente de los osteoblastos tratados con CBE inducían un aumento significativo en el número de células multinucleadas TRAP⁺ (Fig. 14b). En este caso también se agregó

OPG, el cual provocó una disminución significativa en la generación de osteoclastos a niveles comparables con los generados por el sobrenadante control (Fig. 14b).

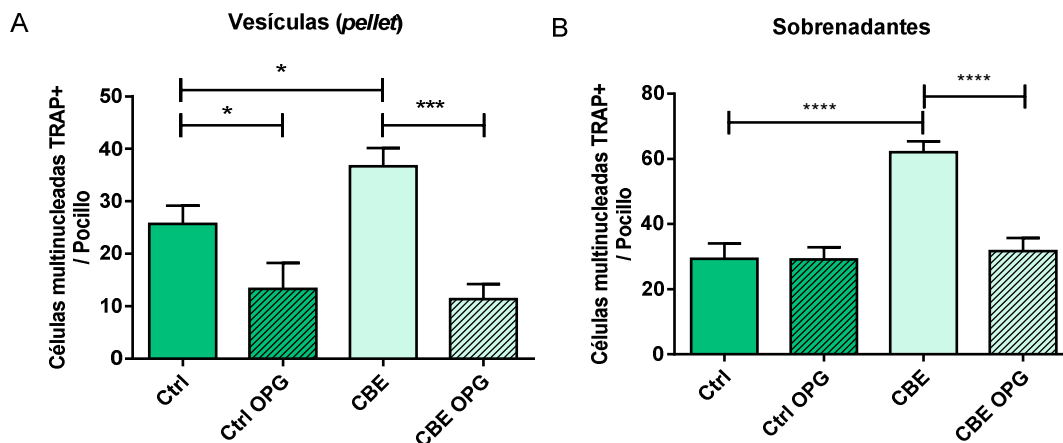


Fig. 14 Osteoclastogénesis mediada por vesículas extracelulares provenientes de osteoblastos tratados (CBE) y sin tratar (Ctrl) con CBE 500 μ M durante 14 días. Cuantificación del número de células multinucleadas TRAP⁺ inducidas por la fracción de ultracentrifugación conteniendo las vesículas (*pellet*) en presencia/ausencia de OPG (50 ng/ml) (A). Cuantificación del número de células TRAP⁺ inducidas por los sobrenadantes de la ultracentrifugación en presencia/ausencia de OPG (50 ng/ml) (B). Test ANOVA de una vía * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Discusión

Los osteoblastos representan del 4 al 6% del total de células residentes en el hueso y son comúnmente conocidos por su función de generación ósea, por lo que ejercen un papel crucial en la formación y el mantenimiento de esta estructura, siendo fundamental la comunicación con otras células óseas como lo son los osteoclastos y osteocitos (Capulli et al., 2014). En este capítulo se decidió estudiar el estado de los osteoblastos en el modelo *in vitro* de la enfermedad de Gaucher y su relación con el remodelamiento óseo.

Existen varios modelos de estudio para desentrañar los causales de las manifestaciones óseas que presentan los pacientes Gaucher. Las dos principales teorías del debilitamiento óseo radican en la disminución de la formación ósea causada por una disminución en la actividad de los osteoblastos; y en un aumento de la resorción ósea por parte de los osteoclastos. A la actualidad, se han desarrollado modelos *in vivo* en ratones y en peces zebra que modelan la enfermedad de Gaucher. El modelo murino pone en evidencia una disminución en el proceso de generación ósea sin encontrar alteraciones referentes a la resorción ósea (Mistry et al., 2010). Las causas de la disminución en la función de los osteoblastos en el modelo *in vivo* se explican por una disminución en la proliferación y baja viabilidad de los osteoblastos causada por los efectos tóxicos de los lípidos bioactivos circulantes que se acumulan en la enfermedad (Mistry et al., 2014, 2010). Sumado a estos estudios, el modelo en peces zebra demostró una alteración en la diferenciación de osteoblastos y una reducción en la mineralización ósea asociados a la vía de señalización Wnt canónica (Zancan et al., 2015).

Los resultados obtenidos en este capítulo, han demostrado que los osteoblastos que tienen la actividad GCasa inhibida por acción del CBE presentan una disminución en su actividad para generar matriz ósea en concordancia con lo observado en los modelos *in vivo*. Los tiempos a los que se observan las alteraciones en los osteoblastos tratados con CBE concuerdan con la cronología del desarrollo óseo donde primero se debe formar una matriz de colágeno para que los nuevos cristales de hidroxiapatita se propaguen en acúmulos rellenoando el espacio entre las fibrillas de colágeno (Negri, 2011). Al inicio del proceso de diferenciación, el factor de transcripción *Runx2* es fundamental para la expresión de genes necesarios para el desarrollo de las etapas de maduración y mineralización (Stein et al., 2004; Zou et al., 2015). Se ha visto que la expresión de

Runx2 aumenta en los primeros estadios de la osteoblastogénesis y luego se mantiene constante (Wu et al., 2014), por lo que se decidió evaluar su expresión en nuestro modelo. Los resultados que obtuvimos mostraron que los osteoblastos control aumentaban la expresión de *Runx2* a lo largo de la diferenciación, a diferencia de los osteoblastos tratados con CBE que no mostraron cambios. Por otro lado, la disminución observada en el proceso de formación ósea para los osteoblastos tratados con CBE podría estar relacionada con la muerte celular, sin embargo no encontramos que estas células tuvieran una mayor tasa de muerte celular en comparación con los osteoblastos control, tanto para las observaciones realizadas por TUNEL como para las realizadas con Anexina V/IP.

Como se mencionó anteriormente, los osteoblastos también tienen la capacidad de establecer una comunicación con los osteoclastos y contribuir con el proceso de osteoclastogénesis. Este proceso puede estar aumentado en ciertas enfermedades como la osteoporosis o enfermedad de Paget donde la resorción del hueso se encuentra aumentada generando una disminución en la densidad ósea (Kravets, 2018; Wang et al., 2019). En el contexto de la fisiopatología ósea de la enfermedad de Gaucher, el aumento en la osteoclastogénesis ha sido demostrado en cultivos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes (Mucci et al., 2012; Mucci et al., 2013; Reed et al., 2013). Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que los sobrenadantes de osteoblastos tratados con CBE y diferenciados por 14 días, estimulan significativamente el potencial osteoclastogénico a través de un aumento en la expresión de RANKL, e independientemente de IL-6, ya que estos sobrenadantes poseen una menor concentración de esta citoquina que los osteoblastos control. Como hemos mencionado, hay evidencias de que IL-6 es capaz de estimular la formación de osteoclastos a través de la estimulación de la producción de RANKL por parte de los osteoblastos (McGregor et al., 2019), pero este hecho quedaría descartado en nuestro modelo. También se ha demostrado que IL-6 puede tener el efecto contrario en la osteoclastogénesis inhibiendo la diferenciación de los precursores de osteoclastos para formar osteoclastos activos y prevenir la resorción ósea excesiva durante la remodelación ósea en estado estacionario (Yoshitake et al., 2008). Entonces, los resultados observados en nuestro modelo para los osteoblastos tratados con CBE, también podrían explicarse por una falta de inhibición de la osteoclastogénesis debido a la disminución de IL-6 en dichos sobrenadantes.

Está demostrado que los osteoblastos liberan microvesículas que contienen RANKL y son internalizadas por los precursores de osteoclastos, lo que estimula la vía RANK-RANKL facilitando la formación de osteoclastos maduros (Deng et al., 2015). Teniendo en cuenta esta información, analizamos si los sobrenadantes de los osteoblastos tratados con CBE contenían microvesículas que pudieran contribuir con el aumento de la osteoclastogénesis. Efectivamente, confirmamos esta observación y además comprobamos que tenían RANKL en su superficie, lo cual se evidenció por la disminución en el número de células multinucleadas TRAP⁺ luego de agregar OPG en el ensayo de osteoclastogénesis.

En resumen, nuestros resultados muestran que la deficiencia de la GCasa en osteoblastos genera una reducción en el proceso de generación de matriz ósea y, a su vez, un estado pro-osteoclastogénico mediado por RANKL y microvesículas extracelulares.

Capítulo 3

Rol de las Células Madre Mesenquimales (MSCs) en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher

La patología ósea de la enfermedad de Gaucher se caracteriza por la presencia de crisis de dolor óseo, osteopenia y fracturas, entre otras afecciones. Aunque la terapia de reemplazo enzimático logra mejoras en los pacientes, un alto porcentaje de los mismos aún mantiene parte de las manifestaciones óseas, principalmente las crisis de dolor óseo (Sims et al., 2008). Aún no se conocen con exactitud las bases fisiopatológicas de las complicaciones óseas, por lo que es necesario seguir profundizando en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares. Para abordar esta problemática se eligió utilizar un modelo de la enfermedad que utiliza una línea celular obtenida a partir de células de pacientes Gaucher en lugar de utilizar el modelo químico. De esta manera, se utilizó una línea celular humana de MSCs provenientes de fibroblastos de individuos sanos y con enfermedad de Gaucher tipo 3, los cuales tienen las mutaciones inherentes al paciente.

Las MSCs son células de origen no hematopoyético que componen el hueso y, según el estímulo del microambiente, pueden diferenciarse en adipocitos u osteoblastos (Li et al., 2016). Los procesos de osteogénesis y adipogénesis se regulan mutuamente, por lo que el microambiente óseo de ciertas enfermedades puede condicionar la diferenciación de las células MSCs hacia uno u otro tipo celular pudiendo afectar la calidad de la microestructura ósea (Bredella et al., 2014; Rodríguez et al., 2000). Para la diferenciación a osteoblastos, las MSCs pasan por el estadio de pre-osteoblastos para luego formar osteoblastos maduros, proceso que depende de la activación específica de factores de transcripción anteriormente nombrados (Bellido et al., 2014). Para la diferenciación de MSCs hacia adipocitos es necesaria la expresión de otros factores de transcripción, entre los cuales se encuentran PPAR- γ y C/EBP (Gregoire et al., 1998).

El objetivo general de esta sección fue caracterizar el modelo celular de MSCs según el microentorno y analizar posibles tratamientos enfocados a mejorar la funcionalidad de las células Gaucher.

Caracterización de las MSCs

El ciclo celular puede ser subdividido en tres interfaces (G0/G1, S y G2) y en una fase mitótica (fase M). En la fase G1, la célula aumenta de tamaño y se prepara para la síntesis de ADN; en la fase S se replica el ADN y en la fase G2 la célula chequea si hay errores en el ADN y empieza a reorganizar los microtúbulos para entrar en la fase M, donde el ADN se distribuye entre las dos células hijas. La fase G0, consiste en un estadio donde las células se encuentran en un estado quiescente pero que tienen el potencial de entrar en el ciclo celular para su división (Schafer, 1998). Debido a que se ha reportado que la deficiencia en actividad GCasa puede ocasionar problemas en la proliferación a través de la modulación del ciclo celular (Lecourt et al., 2013, 2012), evaluamos la capacidad de proliferación y grado de muerte celular en las MSCs.

La evaluación de muerte celular se llevó a cabo mediante la determinación de Anexina V- Ioduro de propidio por citometría de flujo (Fig. 15a) y mediante TUNEL por microscopía (Fig. 15b). No se observaron diferencias en los niveles de apoptosis. Al evaluar el estado del ciclo celular de las células MSCs Gaucher se detectó que un 60% de las células del cultivo se encontraba en fase G0/G1, un 15% en fase S y un 25% en fase G2, en contraste con las MSCs control donde se registró un 85% en fase G0/G1, un 5% en fase S y un 10% en fase G2 del ciclo celular (Fig. 15c). El mayor porcentaje de MSCs Gaucher en fase G2 indicaría que estas células tienen una inhibición en la proliferación.

Figura 15 →

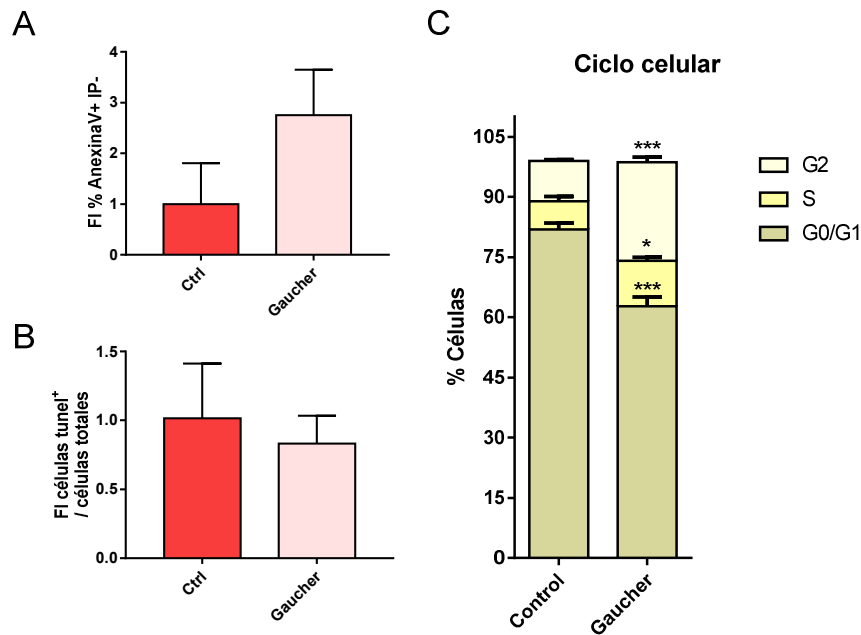


Fig. 15 Determinación de apoptosis en las MSCs utilizando las técnicas de Anexina V/IP (A) y TUNEL (B). Evaluación del ciclo celular mediante ensayo de proliferación con Ioduro de Propidio (C). Los resultados se expresan como el incremento del porcentaje de células anexina positivas con respecto a las MSCs Ctrl. FI: *Fold Increase* (incremento). *Test-t* no pareado * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Diferenciación de MSCs a osteoblastos

Como se mencionó anteriormente, durante las primeras etapas del proceso de diferenciación es necesaria la expresión de *RUNX2* que luego activará la expresión del gen de la fosfatasa alcalina (*ALP*) y colágeno de tipo I (*COL1A1*), necesarios para el proceso de formación de la matriz ósea. En algunas enfermedades los patrones de expresión pueden verse afectados contribuyendo al deterioro óseo (Zhao et al., 2016), por lo que decidimos evaluar la expresión de estos genes a nivel de ARNm en el proceso de diferenciación *in vitro* de MSCs Gaucher hacia osteoblastos a 7 y 14 días de diferenciación, comparando con el estado basal (MSCs). Los resultados obtenidos muestran que la expresión del gen *RUNX2* en osteoblastos Gaucher aumenta significativamente a los 7 días de diferenciación, pero luego disminuye a los 14 días con respecto a los osteoblastos control (Fig. 16a). Los niveles de expresión de *ALP* (Fig. 16b) y *COL1A1* (Fig. 16c) muestran una disminución significativa a los tres tiempos evaluados.

Para comprobar si estas reducciones en la expresión génica se ven reflejadas en la funcionalidad de los osteoblastos Gaucher, medimos los niveles de actividad fosfatasa alcalina (ALP), deposición de colágeno en la matriz extracelular (*Sirius Red*), y mineralización por determinación de depósitos de calcio (*Alizarin Red*) como se detalla en materiales y métodos. Estos ensayos, mostraron que los osteoblastos Gaucher presentan una disminución en la mineralización a partir de los 14 días de diferenciación (Fig. 16d), y una disminución de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) (Fig. 16e) y en los niveles de depósito de colágeno a los 7 y 14 días (Fig. 16f). Los tiempos a los que se evidencian las alteraciones en las funciones de deposición de colágeno, ALP y mineralización concuerdan con los resultados obtenidos para la expresión génica de estos marcadores (Fig. 16 a,b y c).

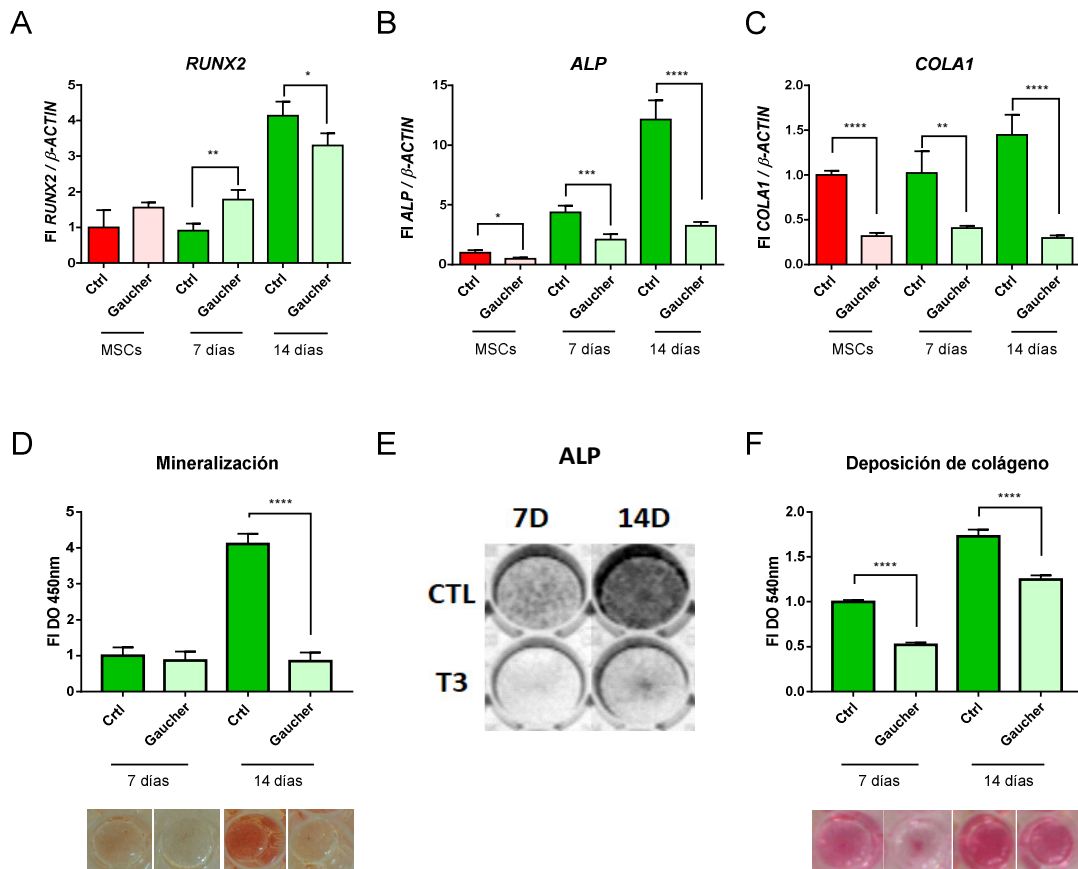


Fig. 16 Diferenciación de MSCs a Osteoblastos. Determinación de la expresión de los genes *RUNX2* (A), *ALP* (B) y *COLA1* (C) a 0 (MSCs), 7 y 14 días de diferenciación, donde los resultados se expresan como el incremento con respecto al Ctrl a 0 días (MSCs). Determinación de la absorbancia a 450 nm de la extracción del colorante *Alizarin Red* (D), determinación cualitativa de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) (E) y determinación de la absorbancia a 540 nm de la extracción del colorante *Sirius Red* (F) en osteoblastos de 7 y 14 días de diferenciación. Los resultados se expresan como el incremento con respecto al Ctrl a 7 días. FI: *Fold Increase* (incremento). *Test-t* no pareado * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Estudio del efecto de tratamientos para osteoblastos Gaucher

En la actualidad, el tratamiento más utilizado para la enfermedad de Gaucher es la Terapia de Reemplazo Enzimático que consiste en la administración intravenosa de la enzima recombinante GCasa, cada dos semanas. Sin embargo, existen otras opciones de tratamiento que apuntan a la inhibición de síntesis de sustrato (Abe et al., 2000; McEachern et al., 2007) o a la administración de chaperonas químicas para mejorar el plegamiento y estabilizar la estructura de la enzima mutada (Guce et al., 2011; Narita et al., 2016). Aunque la terapia de reemplazo enzimático logra disminuir los problemas óseos observados en los pacientes Gaucher, un alto porcentaje de los mismos mantiene parte de los síntomas, principalmente las crisis de dolor óseo (40% aproximadamente) (Sims et al., 2008). Debido a ello, se están estudiando drogas complementarias que apunten a resolver esta falencia mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Velaglucerasa alfa

Con el objetivo de estudiar la acción de la Velaglucerasa alfa recombinante (GCasa) sobre los osteoblastos Gaucher establecimos las Unidades de GCasa a utilizar. Para realizar los cálculos teóricos tomamos como referencia una persona de 70 Kg la cual recibiría una dosis de 60 U/Kg, lo que hace un total de 4200 U. De esta manera, se administrarán 1,4 U de enzima recombinante Velaglucerasa por cada mililitro de plasma, considerando que el volumen plasmático normal de un persona de 70 kg son 3 litros. Es decir que para los ensayos se utilizará una concentración de Velaglucerasa de 1,4 U por cada mililitro de medio de cultivo.

Una vez determinada la dosis a utilizar, realizamos un ensayo para estudiar la mineralización de los osteoblastos Gaucher tratados con la enzima recombinante. Como control de especificidad, se utilizó una enzima no relacionada a la enfermedad de Gaucher, la enzima Idursulfasa. Para el tratamiento con esta enzima administramos la misma cantidad de proteína que la Velaglucerasa. Las MSCs se diferenciaron durante 14 días y dividimos el tratamiento en dos partes: uno se basó en el tratamiento desde el día 0, y el otro se basó en el tratamiento a partir de los últimos 7 días de diferenciación. Es decir que en el primer caso la enzima es administrada en las MSCs y en el segundo caso en osteoblastos diferenciados. Los resultados muestran que los osteoblastos

Gaucher tratados con la Velaglucerasa poseen una menor capacidad de mineralización, tanto si la enzima es administrada desde el estadio mesenquimal o desde el estadio de osteoblasto (Fig. 17). Este efecto sólo se observó para el tratamiento con Velaglucerasa y no para la enzima no relacionada.

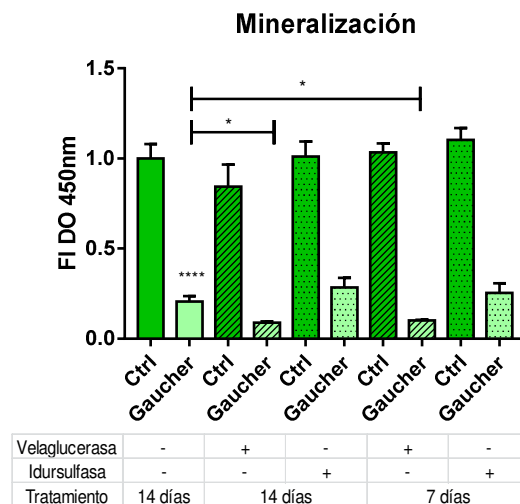


Fig. 17 Tratamiento de osteoblastos con enzimas recombinantes. Determinación de la absorbancia a 450nm de la extracción del colorante *Alizarin Red* en osteoblastos de 14 días de diferenciación administrando Velaglucerasa (1,4 U/ml - 0,035 mg) o Idursulfasa (0,035 mg) por 14 días completos o en los últimos 7 días de cultivo. Los resultados se expresan como el incremento de DO con respecto a los osteoblastos Ctrl sin tratamiento con Velaglucerasa. FI: *Fold Increase* (incremento). Test-ANOVA de una vía seguido de test Bonferroni * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$

Estos resultados nos hicieron evaluar si la Velaglucerasa estaba ingresando a las células. Comercialmente, las enzimas son modificadas para que posean una mayor capacidad de ingreso a las células. Los osteoblastos poseen receptores de manosa 6 fosfato (M6PR), por lo que la enzima recombinante es decorada con manosa 6 fosfato (M6P) como ligando a dicho receptor para facilitar el ingreso a las células (Panicker et al., 2018). Incluso, estudios por espectrometría de masas de alta resolución revelan que la Velaglucerasa posee 0,8 moles de M6P por enzima, mientras que otras alternativas de tratamiento poseen menos cantidad de M6P por enzima (0,6 moles) (Lieberman, 2011). Entonces, para evaluar si la enzima era capaz de ingresar a las MSCs se realizó una cinética de incorporación de GCasa recombinante (Velaglucerasa 1,4 U/ml) cultivando las MSCs por 6, 24 y 48 hs con esta enzima. Luego, se lavaron exhaustivamente para eliminar restos de Velaglucerasa en la superficie y se lisaron para medir la actividad GCasa remanente en el interior celular. Como se puede observar en la figura 18, se

evidenció que las MSCs Gaucher incorporaron la Velaglucerasa aumentando su actividad residual entre un 25% y un 50%.

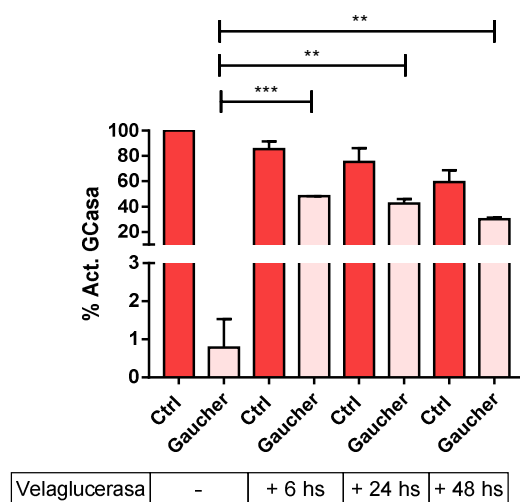


Fig. 18 Incorporación de Velaglucerasa en MSCs. Actividad GCasa a 6 hs, 24 hs y 48 hs luego de administrar 1,5 U/ml enzima recombinante Velaglucerasa. La actividad GCasa se expresa como porcentaje con respecto a la actividad GCasa de MSCs Ctrl sin tratamiento con Velaglucerasa. *Test-t* no pareado ** p<0.01; *** p<0.001

Debido a que la Velaglucerasa ingresa a la célula pero no restablece la función de mineralización de los osteoblastos Gaucher, decidimos buscar una droga que tenga efectos osteogénicos y que pueda complementar esta deficiencia. Se realizarán más estudios para identificar la causa de la falta de efecto de esta enzima en la función de los osteoblastos.

Semaforina 3A (Sem3A)

La semaforina 3A (Sem3A) es una proteína de secreción asociada a membrana perteneciente a la familia de semaforinas (Behar et al., 1996), las cuales se identificaron originalmente como moléculas que controlan la ruta del axón durante el desarrollo del sistema nervioso (Kolodkin et al., 1993). Recientemente se ha demostrado que la Sem3A es expresada principalmente por los osteoblastos, pudiendo actuar autócrina o parácrinamente uniéndose a su receptor *neuropilin 1* (Nrp1) expresado tanto en osteoblastos como en los precursores de osteoclastos. De esta manera, es capaz de estimular la formación ósea mientras inhibe la resorción (Li et al., 2017). Por otro lado, modelos *in vitro* ha demostrado que la Sem3A promueve la elongación de las dendritas

de los osteocitos (Niimura et al., 2016), y que además es capaz de generar un cambio en la diferenciación de células madre adiposas hacia osteoblastos (Liu et al., 2016).

Debido a que se ha demostrado que la Sem3A tiene propiedades osteogénicas y que es capaz de propiciar un cambio en el destino celular hacia osteoblastos, hemos decidido utilizar a la Sem3A para estudiar su aplicabilidad como droga complementaria al tratamiento de reemplazo enzimático para mejorar la patología ósea en la enfermedad de Gaucher.

En primer lugar, se determinó la concentración de uso de la Sem3A realizando una curva dosis-respuesta a distintas concentraciones de Sem3A obtenidas de literatura (50 y 100 ng/ml). Para ello diferenciamos las MSCs a osteoblastos por 14 días y evaluamos la capacidad de mineralización, deposición de colágeno y actividad fosfatasa alcalina. Los resultados mostraron que el tratamiento con Sem3A indujo un aumento significativo en el proceso de mineralización de los osteoblastos Gaucher cuando se utilizó una concentración de 100 ng/ml de Sem3A (Fig. 19a) si bien no se logró alcanzar los niveles producidos por las MSCs control. Por otro lado, la deposición de colágeno (Fig. 19b) y la actividad fosfatasa alcalina (Fig. 19c) en osteoblastos Gaucher no se ve afectada cuando los tratamos con 100 ng/ml Sem3A.

Figura 19 →

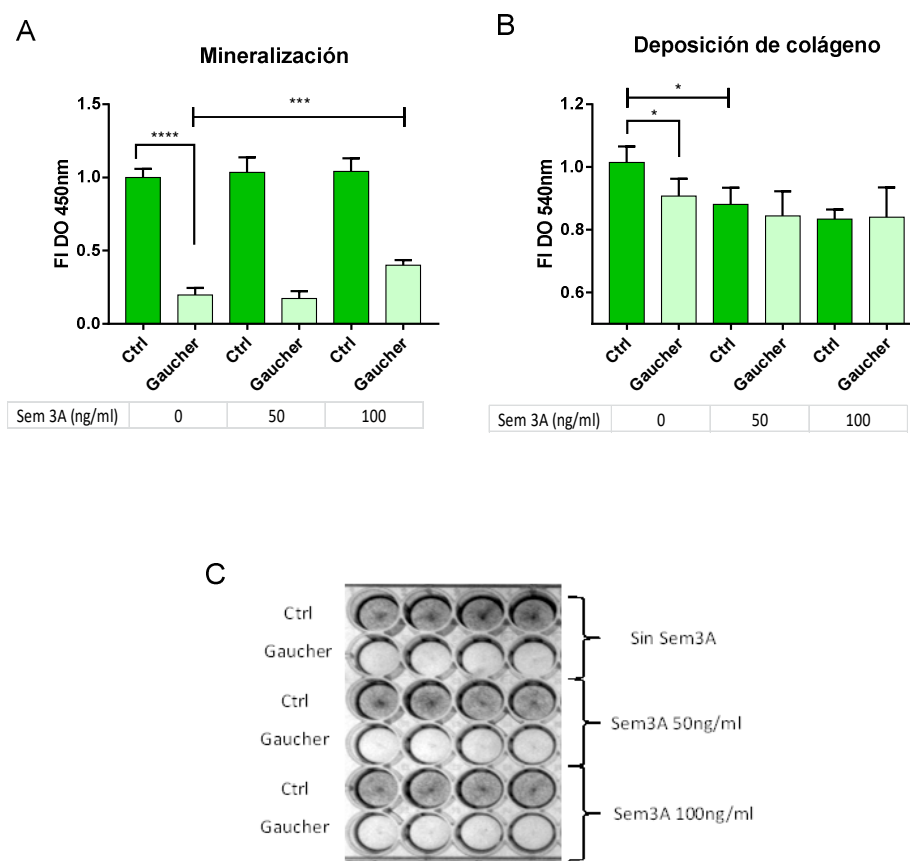


Fig. 19 Dosis respuesta de Sem3A en osteoblastos. Determinación de la absorbancia a 450 nm de la extracción del colorante Alizarin Red (A); determinación de la absorbancia a 540nm de la extracción del colorante Sirius Red (B) y determinación cualitativa de actividad fosfatasa alcalina (ALP) (C) en osteoblastos de 14 días de diferenciación administrando Sem3A (50 y 100 ng/ml). Los resultados se expresan como el incremento de DO con respecto a los osteoblastos Ctrl sin tratamiento con Sem3A. FI: *Fold Increase* (incremento). *Test-t* no pareado * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Efecto de las MSCs y osteoblastos sobre la Osteoclastogénesis

Entre las funciones de los osteoblastos se encuentra la modulación del remodelamiento óseo a través de la inhibición o activación de la osteoclastogénesis mediante la secreción de diferentes factores o por medio de proteínas ancladas a membrana (Nakashima et al., 2000; Sims et al., 2014). La vía más relevante a nivel fisiológico para la estimulación de este proceso es la vía RANK-RANKL-OPG. Por otro lado, hay evidencias que en presencia de un estado inflamatorio, la osteoclastogénesis puede ser inducida independientemente a esta vía, involucrando distintas citoquinas como IL-6, TNF- α e IL-1 β (Huynh et al., 2017; Kudo et al., 2003; Trebec-Reynolds et al., 2010).

Para determinar si las MSCs y osteoblastos Gaucher poseen distinta capacidad de inducción de osteoclastogénesis que las células control, realizamos el ensayo de osteoclastogénesis utilizando los sobrenadantes condicionados de los cultivos de las MSCs y de los cultivos de osteoblastos diferenciados por 7 y 14 días para estimular a precursores de osteoclastos en presencia de M-CSF. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20a, donde observamos que los sobrenadantes provenientes de las MSCs Gaucher mostraban un aumento significativo en la formación de células multinucleadas TRAP⁺ en comparación con los inducidos por los sobrenadantes de las células control. A partir de estos resultados, realizamos un ensayo de osteoclastogénesis con los sobrenadantes de las MSCs sobre una matriz de dentina. De esta manera identificamos los osteoclastos activos mediante el recuento de áreas de resorción (Fig. 20b). Los resultados indican que los sobrenadantes de MSCs Gaucher generan una mayor cantidad de áreas de resorción que los sobrenadantes de MSCs control. En la Figura 20b se muestra una imagen de estas áreas de resorción como ejemplo representativo. Dadas estas observaciones, evaluamos si los sobrenadantes condicionados de las MSCs Gaucher presentaban niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α (Fig. 20c), IL-1 β (Fig. 20d) e IL-6 (Fig. 20e) que estuvieran involucradas en el proceso de osteoclastogénesis en un entorno inflamatorio, y encontramos que los niveles de IL-1 β estaban aumentados en los sobrenadantes condicionados de MSCs Gaucher.

Para evidenciar el rol funcional de IL-1 β y RANKL en el proceso de osteoclastogénesis, realizamos un ensayo de osteoclastogénesis donde se utilizaron los sobrenadantes condicionados de las MSCs en presencia/ausencia de un antagonista de IL-1 β (Anakinra) o del inhibidor natural de RANKL (OPG). Los resultados mostraron una reducción en las cantidades de células multinucleadas TRAP⁺ (Fig. 20f), remarcando la participación de IL-1 β y RANKL en la osteoclastogénesis inducida por las MSCs. Para poner en evidencia los osteoclastos activos realizamos el mismo ensayo sobre una superficie de dentina para identificar áreas de resorción. Los resultados que obtuvimos van en concordancia con el ensayo anterior ya que se observa un menor número de áreas de resorción cuando los ensayos se realizaron en presencia de Anakinra y OPG (Fig. 20g).

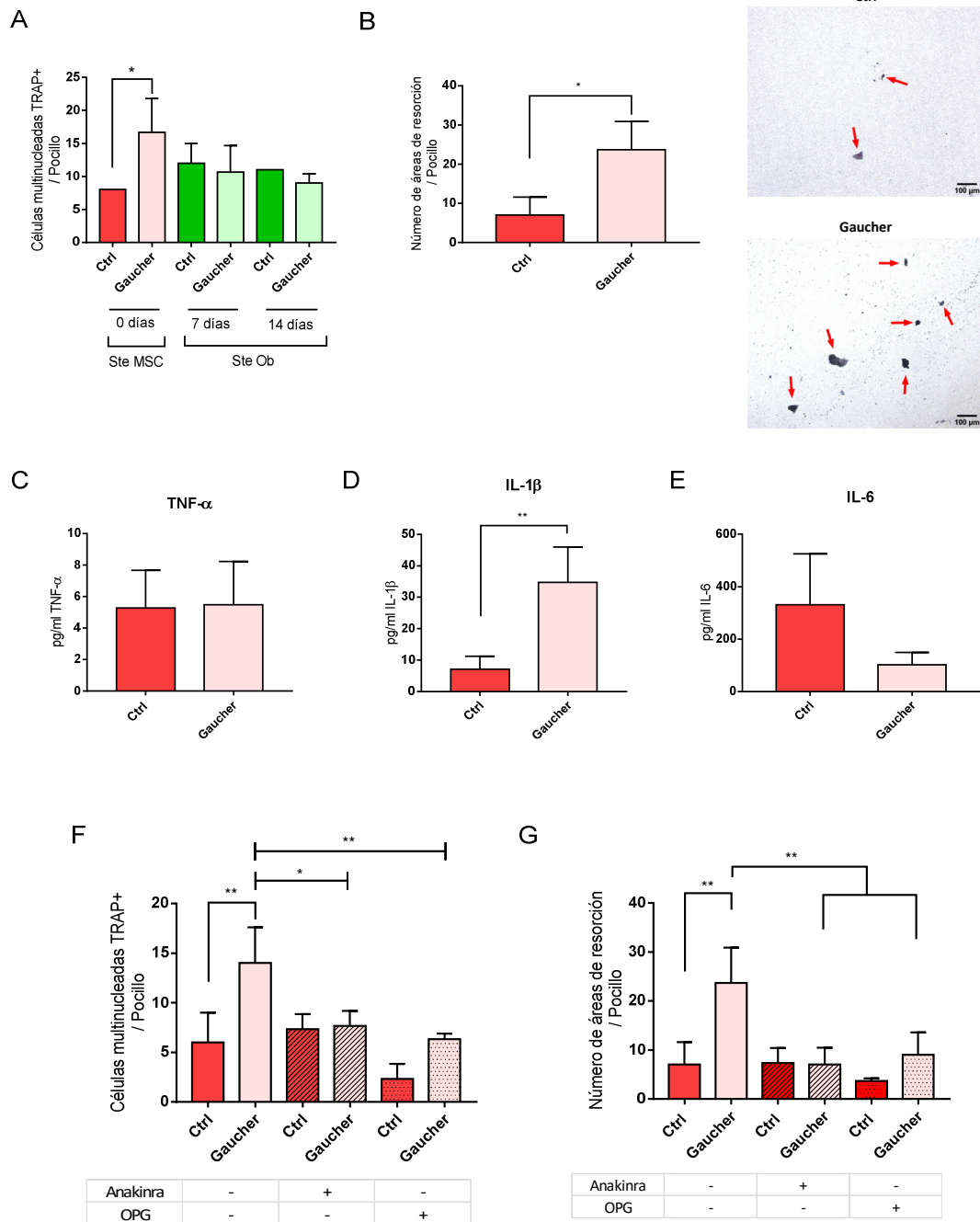


Fig. 20 Efecto de las MSCs sobre la Osteoclastogénesis. Cuantificación de células multinucleadas TRAP⁺ generadas por los sobrenadantes de osteoblastos control y Gaucher de 0 (MSCs), 7 y 14 días de diferenciación (A). Determinación de las áreas de resorción generadas por los sobrenadantes de las MSCs (izquierda) y su visualización microscópica (derecha) (B). Determinación de la concentración de citoquinas (pg/ml) TNF- α (C), IL-1 β (D) e IL-6 (E) en los sobrenadantes condicionados de MSCs mediante ELISA. Cuantificación de células multinucleadas TRAP⁺ generadas por los sobrenadantes MSCs (F) y cuantificación de áreas de resorción en placa de dentina (G), ambos en presencia/ausencia del antagonista de IL-1 β (Anakinra 500ng/ml) y OPG (50ng/ml). Barra de escala: 100 μ m. A), B), C) y D) se analizaron con *Test-t* no pareado; y E) y F) se analizaron con *Test ANOVA* de una vía seguido de *test Bonferroni* * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Diferenciación de MSCs a adipocitos

El tejido adiposo de la médula ósea es un componente conservado del microambiente de la médula que proporciona almacenamiento, liberación de energía y estabilización de la médula ósea (Pino et al., 2017). La mayoría de las enfermedades que presentan pérdida ósea, como la inflamación crónica, evolucionan hacia una alteración en la composición del tejido adiposo de la médula ósea (Pino et al., 2017), donde las MSCs desvían su diferenciación hacia adipocitos en lugar de a osteoblastos (Li et al., 2016; Wang et al., 2017). Este aumento de adipocitos en la médula ósea en un estado patológico podría contribuir a la fragilidad ósea, ya que también se observó que estos adipocitos eran capaces de estimular la osteoclastogénesis (Mori et al., 2014; Pino et al., 2017; Shanmugam et al., 2018). En la enfermedad de Gaucher el estado inflamatorio crónico está presente, por lo que se esperaría encontrar un aumento en la cantidad de adipocitos en la médula ósea. A raíz de estas observaciones decidimos utilizar el modelo *in vitro* de MSCs para estudiar el proceso de diferenciación en las células Gaucher.

La diferenciación de las MSCs a adipocitos involucra el aumento en la expresión del gen *PPAR- γ* y la disminución de la expresión del gen *RUNX2* (Rosen et al., 2009), por lo que analizamos la expresión de dichos genes a nivel de ARNm durante la diferenciación durante 7 y 14 días. Los resultados obtenidos indican que tanto a 7 como a 14 días, los adipocitos Gaucher expresan mayores niveles del gen *PPAR- γ* (Fig. 21a) y menores niveles de expresión del gen *RUNX2* (Fig. 21b) en comparación con los adipocitos control. Otro parámetro de diferenciación de adipocitos es el aumento de gotas lipídicas en su interior (Barneda et al., 2017), por lo que cultivamos las MSCs en las mismas condiciones y tiempos que en el ensayo anterior para estudiar dicho parámetro. La cuantificación de lípidos acumulados se realizó mediante la extracción y medición de absorbancia del colorante *Oil Red* (Fig. 21c derecha) y por observación microscópica (Fig. 21c izquierda). De esta manera, identificamos que los adipocitos Gaucher presentaban una disminución en la acumulación de gotas lipídicas con respecto a los adipocitos control.

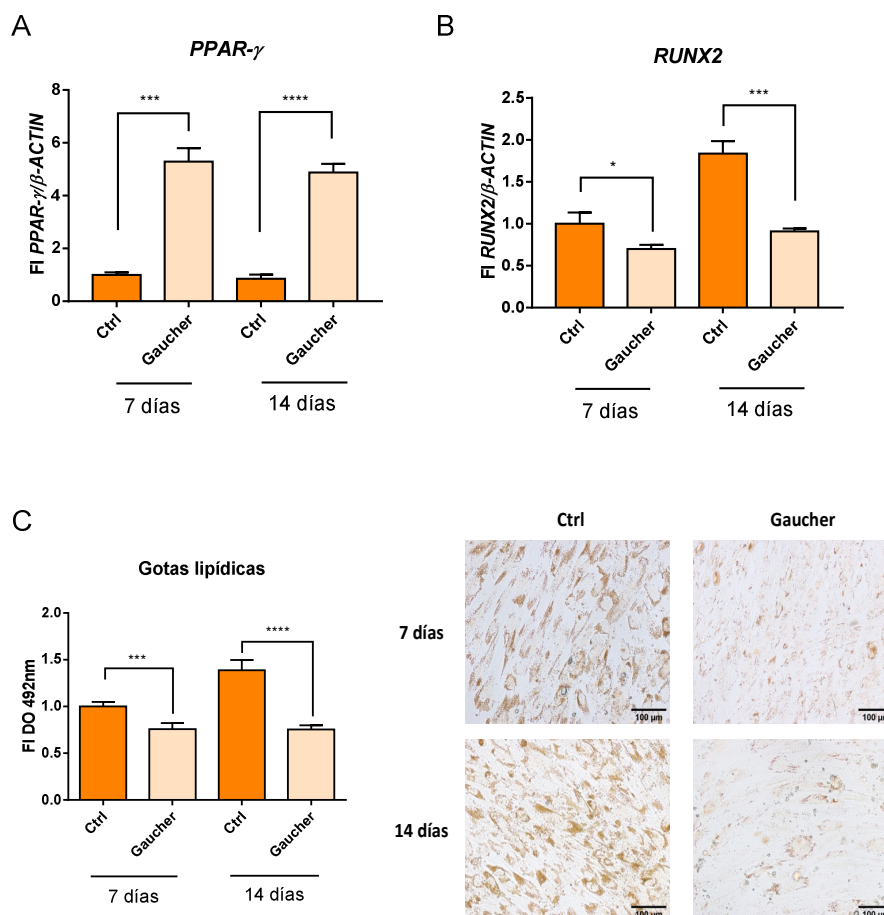


Fig. 21 Diferenciación de MSCs a adipocitos. Cuantificación de la expresión de los genes *PPAR- γ* (A) y *RUNX2* (B). Determinación de la absorbancia a 492 nm del extracto del colorante *Oil Red* (*derecha*) y observación microscópica de gotas lipídicas coloreadas con *Oil Red* (*izquierda*) (B). Los ensayos fueron realizados en adipocitos Ctrl y Gaucher de 7 y 14 días de diferenciación. Los resultados se expresan como el incremento con respecto al Ctrl de 7 días de diferenciación. Barra de escala: 100 μ m. FI: *Fold Increase* (incremento). *Test-t* no pareado * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

La observación realizada en adipocitos Gaucher sugiere que el metabolismo de las gotas lipídicas se encuentra alterado, por lo que decidimos profundizar los estudios al respecto.

La familia de proteínas de perilipinas se encuentran asociadas a la superficie de las gotas lipídicas y están involucradas en la formación de las mismas, es decir que participan del proceso de lipogénesis (Barneda et al., 2017; Itabe et al., 2017). Particularmente, la perilipina 2 (PLIN2) se expresa en adipocitos prematuros colaborando en el proceso de diferenciación (Itabe et al., 2017), y es regulada directamente por *PPAR- γ* (Maurizi et al., 2018). A partir de estas evidencias, decidimos evaluar la expresión a nivel de ARNm del gen *PLIN2* a 7 y 14 días de diferenciación

para evaluar si el proceso de lipogénesis estaba disminuido. Los resultados indicaron que los adipocitos Gaucher presentaban un aumento significativo de los niveles de expresión de *PLIN2* con respecto a los adipocitos control a los 7 días, por lo que el proceso de lipogénesis estaría estimulado (Fig. 22).

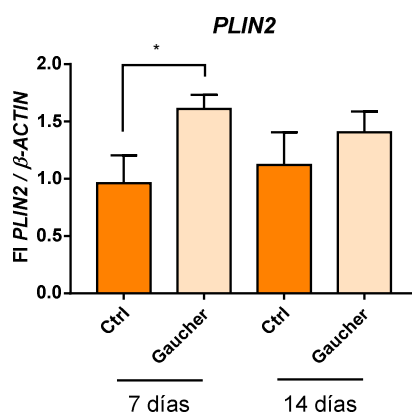


Fig. 22 Cuantificación de la expresión del gen *PLIN2* a nivel de ARNm en adipocitos de 7 y 14 días de diferenciación. Los resultados se expresan como el incremento con respecto al Ctrl de 7 días de diferenciación. Test-t no pareado * $p < 0.05$

El conjunto de resultados indican una mayor tendencia de las MSC Gaucher a diferenciarse a adipocitos. Sin embargo, la acumulación de lípidos es deficiente en los adipocitos Gaucher demostrando una deficiencia en su función. La causa de esta alteración podría provenir de un aumento de la secreción de lípidos o de la degradación de las gotas lipídicas, por lo que se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo involucrado.

Discusión

Las MSCs son células de origen no hematopoyético que componen el sistema óseo y de ellas derivan los osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Zołocińska, 2018). Las manifestaciones óseas en la enfermedad de Gaucher están mayormente asociadas a una disminución en la actividad de los osteoblastos y/o a un aumento en la resorción ósea (Mucci et al., 2014). Debido a los múltiples factores que pueden estar contribuyendo a la patología ósea de los pacientes Gaucher, decidimos evaluar la homeostasis de sistema óseo en un modelo *in vitro* constituido por una línea celular establecida de MSCs de individuos sanos y con enfermedad de Gaucher, donde estas células se diferenciaron utilizando medios de diferenciación específicos. Previo a comenzar la diferenciación, evaluamos el estado basal de las MSCs mediante el análisis de muerte y evolución en el ciclo celular, ya que se ha reportado que células con deficiencia en actividad GCasa tienen problemas en la proliferación (Lecourt et al., 2013, 2012). Con estos ensayos pudimos demostrar que las MSCs Gaucher presentan una inhibición en la proliferación.

Por otro lado, evidenciamos que los osteoblastos Gaucher presentan una disminución en su capacidad de formación de matriz ósea, demostrada por la menor capacidad de mineralización, deposición de colágeno y actividad fosfatasa alcalina con respecto a los osteoblastos control, resultados coincidentes con lo evidenciado por otros grupos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Mistry et al., 2010; Panicker et al., 2018). En la actualidad, el tratamiento de elección para la enfermedad de Gaucher es la terapia de reemplazo enzimático, por lo que evaluamos el efecto del tratamiento con la enzima recombinante Velaglucerasa en osteoblastos derivados de MSCs. La capacidad de mineralización de los osteoblastos Gaucher tratados con la enzima fueron menores que en los osteoblastos Gaucher sin tratar, hecho que no puede ser asociado a la falta de enzima dentro de la célula ya que demostramos que la enzima ingresa a las MSCs. Es decir que la Velaglucerasa no sería eficiente para restituir la función de mineralización, lo que nos llevó a evaluar la Semaforina 3A como posible droga suplementaria debido a sus propiedades osteogénicas, anti-osteoclastogénicas y anti-inflamatorias (Lepelletier et al., 2006; Z. Li et al., 2017). Los resultados que obtuvimos mostraron que la Sem3A puede mejorar la mineralización de osteoblastos Gaucher significativamente a 100 ng/ml.

Los osteoblastos también tienen un papel central en la regulación de la resorción ósea, donde se ha demostrado que la osteoclastogénesis está mediada vía RANKL/OPG y por el aumento de citoquinas proinflamatorias como IL-1 (Kenkre et al., 2018; Nakamura et al., 2006). Asimismo, se ha demostrado que la deficiencia de GCasa en las MSCs de pacientes Gaucher conduce a una disminución en las capacidades de diferenciación osteogénica y provoca una activación en la actividad de resorción de osteoclastos a través de la secreción de factores solubles como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y la proteína-1 relacionada con Dickkopf (DKK-1) (Lecourt et al., 2013). En concordancia con lo observado por Lecourt et al., los sobrenadantes condicionados de las MSCs Gaucher demostraron tener un mayor potencial osteoclastogénico con respecto a los sobrenadantes condicionados provenientes de MSCs Control y de osteoblastos Gaucher. Los ensayos de bloqueo de las señales pro-osteoclastogénicas en los sobrenadantes provenientes de MSCs Gaucher utilizando un antagonista de IL-1 β (Anakinra) y el inhibidor natural de RANKL (OPG), mostraron una disminución en el recuento de células multinucleadas TRAP⁺ en ambas condiciones, lo que confirma que las dos vías son de relevancia en el proceso de osteoclastogénesis. El rol de IL-1 en la osteoclastogénesis también ha sido demostrado por otros autores, quienes sugieren que IL-1 está involucrada en la fusión de los precursores de osteoclastos y multinucleación, como así también en la supervivencia de los osteoclastos (Nakamura et al., 2006). Por otro lado, se ha visto que IL-1 es un estímulo insuficiente para generar osteoclastos por sí solo, sin embargo esto es posible cuando se estimula la sobreexpresión de su receptor IL-1RI a través de RANKL, lo que explicaría el efecto sinérgico de IL-1 sobre la osteoclastogénesis inducida por RANKL (Kim et al., 2009).

Como mencionamos, las MSCs son las células precursoras de osteoblastos y adipocitos cuya diferenciación está guiada por factores en el microambiente óseo. Se ha demostrado que en ciertos estados patológicos como un entorno inflamatorio o estrés oxidativo, las MSCs desvían su diferenciación hacia adipocitos en lugar de a osteoblastos (Li et al., 2016; Wang et al., 2017). Este aumento de adipocitos en la médula ósea en un estado patológico podría contribuir a la fragilidad ósea, ya que también se observó que estos adipocitos eran capaces de estimular la osteoclastogénesis (Mori et al., 2014; Pino et al., 2017). En la enfermedad de Gaucher el estado inflamatorio crónico está presente, por lo que se esperaría encontrar un aumento en la

cantidad de adipocitos en la médula ósea. Por esta razón, decidimos evaluar si los adipocitos derivados de las MSCs Gaucher presentan alteraciones que pudieran influir en la problemática ósea. Nuestros resultados mostraron un perfil adipogénico aumentado en las células Gaucher con respecto a los controles, el cual fue evidenciado por una alta expresión en el gen *PPAR-γ* y una baja expresión del gen *RUNX2*. Recientemente se ha demostrado que *PPAR-γ* es estimulada directamente por glucosilceramida, cuya síntesis está dirigida por la enzima glucosilceramida sintasa y la cual es potenciada en un entorno adipogénico (Jang et al., 2019). Si se piensa en un contexto Gaucher, la deficiencia en la actividad de la GCasa provoca un aumento en los niveles de glucosilceramida por la deficiencia en su degradación, lo que podría contribuir en mayor medida a la estimulación de *PPAR-γ*.

A pesar que los adipocitos Gaucher presentan un incremento en los niveles de expresión de *PPAR-γ* con respecto a los adipocitos control, estas células no poseen la capacidad de acumular gotas lipídicas, como también lo ha evidenciado otro grupo de investigación (Campeau et al., 2009). Con estas evidencias, podemos sugerir que la ausencia de gotas lipídicas puede deberse a varios factores como por ejemplo: un aumento en el proceso de lipólisis o de secreción de las vesículas lipídicas al medio extracelular; aunque es necesario realizar más estudios para su confirmación.

Para concluir, el conjunto de resultados obtenidos en este capítulo podrían explicar parte de la patología ósea de la enfermedad de Gaucher, ya que se muestra que las células Gaucher presentan deficiencias en su funcionalidad, tanto en la estirpe de osteoblastos como en la de adipocitos; que el tratamiento con Velaglucerasa no pudo restablecer la función de los osteoblastos; y que las MSCs Gaucher estimulan el proceso de osteoclastogénesis a través de RANKL e IL-1 β .

CONCLUSIONES

Los objetivos propuestos para el presente trabajo se enfocaron en investigar la relación entre la deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal GCasa con su consecuente acumulación de sustrato (glucosilceramida) con los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desbalance del sistema óseo observado en pacientes con enfermedad de Gaucher para estudiar nuevos tratamientos complementarios al existente.

Nuestra primera estrategia fue generar un modelo *in vitro* de osteocitos y precursores de osteoblastos murinos con un inhibidor químico (CBE) para evaluar las posibles alteraciones. Estos modelos nos permitieron demostrar que la ausencia de actividad enzimática y acumulación de sustrato genera alteraciones celulares que llevan a la secreción de factores solubles capaces de inducir la diferenciación de osteoclastos maduros y activos con el potencial de degradar la matriz ósea. Además, el modelo de osteocitos nos proporcionó información para demostrar que las proteínas de adhesión (integrina) y de uniones estrechas (Cx43) estaban disminuidas, promoviendo la muerte celular por apoptosis y contribuyendo al proceso de osteoclastogénesis. Por otro lado, el modelo químico de precursores de osteoblastos nos permitió estudiar el proceso de diferenciación de osteoblastos bajo la inhibición de la enzima GCasa, pudiendo determinar que el proceso de formación ósea en estas condiciones estaba disminuido, lo que podría contribuir a la patología ósea observada en los pacientes.

Los modelos químicos que utilizamos son de utilidad para estudiar los mecanismos afectados del metabolismo óseo en el contexto de la enfermedad de Gaucher ya que la actividad residual de la enzima GCasa es comparable con la encontrada en pacientes Gaucher. Sin embargo, el uso de estos modelos químicos es limitado para estudiar distintas drogas de tratamiento. Para abordar esta problemática reemplazamos este modelo de estudio por uno más representativo de la enfermedad. El nuevo modelo se basa en una línea celular humana de MSCs inmortalizadas provenientes de fibroblastos de individuos sanos y pacientes con Enfermedad de Gaucher Tipo 3, que tienen las mutaciones inherentes al paciente. Este modelo nos permitió validar las observaciones realizadas en el modelo químico de osteoblastos, pudiendo confirmar que las MSCs de pacientes Gaucher presentan una alteración en el proceso de osteogénesis, dando como resultado una disminución en su capacidad de formación de matriz ósea. A su vez, las MSCs Gaucher tienen el potencial para promover la osteoclastogénesis a través de RANKL e IL-1 β . Otra alteración observada, fue que las MSCs Gaucher tienen

estimulada la adipogénesis pero son incapaces de acumular cantidades considerables de gotas lipídicas, es decir que también tienen una alteración en su función de almacenamiento energético. Por último, el tratamiento realizado con Velaglucerasa no fue efectivo para restablecer la función de mineralización de los osteoblastos Gaucher, sin embargo, el tratamiento con Sem3A pudo mejorar este aspecto, aunque los niveles de mineralización no alcanzaron a igualar a los de osteoblastos control.

Los mecanismos propuestos en la patología ósea de la enfermedad de Gaucher que se derivan de los resultados de esta tesis se resumen en la figura 23.

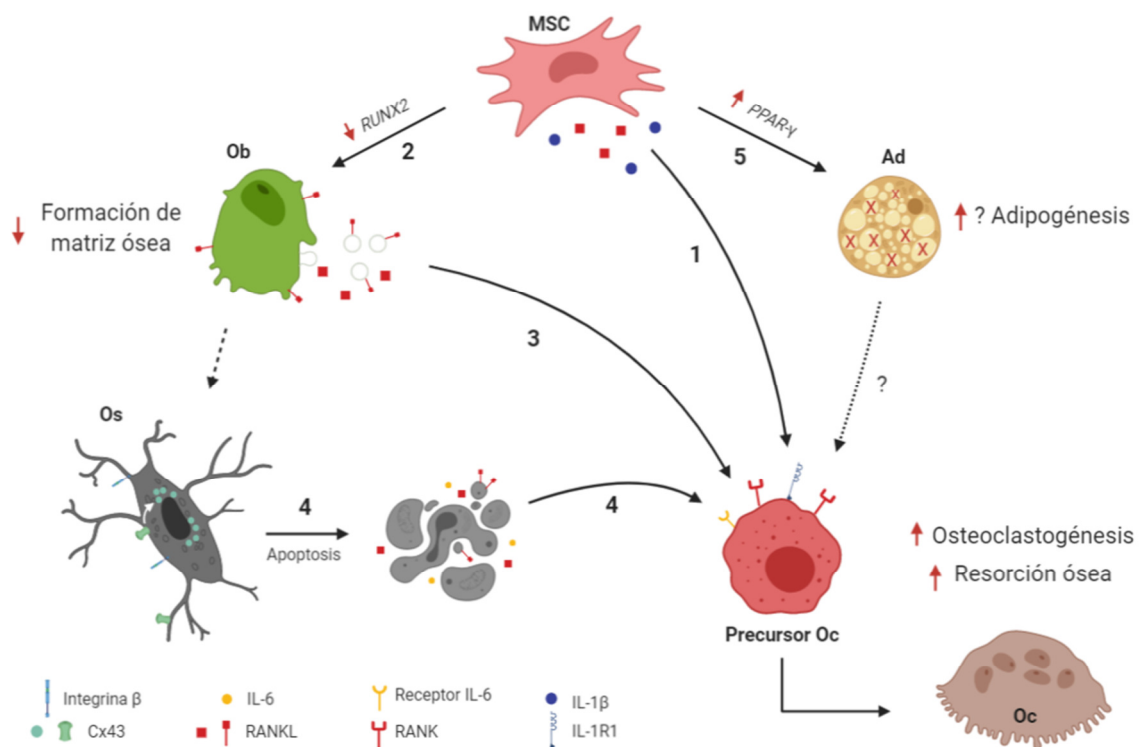


Fig. 23 Mecanismos propuestos involucrados en la problemática ósea de la enfermedad de Gaucher. Mediadores que se encuentran modulados en células Gaucher con respecto a las control.
1. MSC secreta RANKL e IL-1β estimulando la osteoclastogénesis con el consecuente incremento en la resorción ósea. **2.** MSC subexpresa *RUNX2* inhibiendo la diferenciación a Ob y disminuyendo la formación ósea. **3.** Ob secreta RANKL y microvesículas que contienen RANKL, estimulando la resorción ósea. **4.** Os subexpresa proteínas de uniones intercelulares que podría derivar en la apoptosis de estas células liberando cuerpos apoptóticos y RANKL, los cuales provocan la estimulación de la resorción ósea. **5.** MSC sobreexpresa *PPAR-γ* estimulando la diferenciación a Ad que no muestran una acumulación de gotas lipídicas. MSC: célula madre mesenquimal; Ob: osteoblasto; Ad: adipocito; Os: osteocito; Oc: osteoclasto.

Por lo tanto se concluye que:

- ✓ La menor densidad ósea observada en los pacientes con EG se explicarían por una deficiente formación ósea acompañada de un aumento en la resorción ósea.
- ✓ La disminución en la formación ósea está dada, al menos en parte, por una menor actividad de los osteoblastos Gaucher para formar la matriz ósea. A su vez, las MSCs que dan origen a dichos osteoblastos tienen parcialmente inhibido el proceso de proliferación y menor expresión de genes asociados a osteogénesis.
- ✓ La mayor resorción ósea se debe, al menos en parte, a que tanto las MSCs, osteoblastos como osteocitos en estos modelo Gaucher producen elevados niveles de factores que estimulan la osteoclastogénesis.
- ✓ Los osteocitos Gaucher presentan una mayor tasa de apoptosis y liberación de cuerpos apoptóticos.
- ✓ Las MSCs Gaucher poseen un alto potencial de diferenciación adipogénica.
- ✓ La Sem3A podría considerarse para ser utilizada como complemento de las terapias actuales en la EG.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo nos ha permitido identificar varios aspectos clave sobre los mecanismos involucrados en la problemática ósea de la enfermedad de Gaucher. Aunque por otro lado también nos abre nuevos interrogantes para continuar con nuestros estudios.

Como perspectivas a futuro, nos proponemos profundizar los estudios en la diferenciación de adipocitos y delinear si hay alteraciones en los mecanismos de lipogénesis y lipólisis como posibles causales de la falta de acumulación de lípidos observada. También se evaluará su relación con la osteoclastogénesis debido a que se ha demostrado que los adipocitos derivados de las MSCs pueden estimular este proceso (Mori et al., 2014).

Por otro lado, se estudiará el mecanismo del inflamosoma en MSCs. Se ha descrito que la ruptura de lisosomas y la consecuente liberación de distintas moléculas activa a NLRP3 (Hornung et al., 2008; Rajamäki et al., 2010), por lo que la acumulación de glucosilceramida podría generar una inestabilidad en la estructura del lisosoma, llevando a una fuga de componentes del mismo hacia el citoplasma y la activación del inflamosoma. La activación lleva al clivaje proteolítico de pro-IL-1 β y/o pro-IL-18, que puede ser dependiente o independiente de caspasa-1, dando IL-1 β e IL-18 activas. La liberación de ambas citoquinas promueve un proceso inflamatorio que puede autopropagarse llevando a un estado inflamatorio crónico. Incluso, se ha demostrado que la activación del inflamosoma en MSCs potencia la diferenciación de estas células hacia adipocitos (Wang et al., 2017).

Y por último, planteamos desarrollar soportes nanoestructurados para utilizar como soporte de la enzima Velaglucerasa y la proteína Sem 3A (Begam et al., 2017). Esta forma de administración permite dirigir específicamente la enzima o la droga hacia el hueso dependiendo de las decoraciones que se utilicen adosadas a la nanopartícula (Yang et al., 2018). A su vez, esta estrategia permitiría mantener la estructura por más tiempo en circulación aumentando las probabilidades de que la enzima/droga llegue al hueso.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, R., Park, G., Damle, B., Chertkoff, R., & Alon, S. (2015). Pharmacokinetics of Novel Plant Cell-Expressed Taliglucerase Alfa in Adult and Pediatric Patients with Gaucher Disease. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128986>
- Abe, A., Gregory, S., Lee, L., Killen, P. D., Brady, R. O., Kulkarni, A., & Shayman, J. A. (2000). Reduction of globotriaosylceramide in Fabry disease mice by substrate deprivation. *The Journal of Clinical Investigation*, *105*(11), 1563–1571. <https://doi.org/10.1172/JCI9711>
- Aerts, J. M. F. G., Hollak, C. E. M., Breemen, M., Maas, M., Groener, J. E. M., & Boot, R. (2005). Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatrica*, *94*(447), 43–46. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb02110.x>
- Aflaki, E., Moaven, N., Borger, D. K., Lopez, G., Westbroek, W., Chae, J. J., ... Sidransky, E. (2016). Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. *Aging Cell*, *15*(1), 77–88. <https://doi.org/10.1111/acel.12409>
- Al-Dujaili, S. A., Lau, E., Al-Dujaili, H., Tsang, K., Guenther, A., & You, L. (2011). Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(9), 2412–2423. <https://doi.org/10.1002/jcb.23164>
- Alaei, M. R., Tabrizi, A., Jafari, N., & Mozafari, H. (2019). Gaucher Disease: New Expanded Classification Emphasizing Neurological Features. *Iranian Journal of Child Neurology*, *13*(1), 7–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30598670>
- Allen, M. J., Myer, B. J., Khokher, A. M., Rushton, N., & Cox, T. M. (1997). Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: Increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, *90*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1093/qjmed/90.1.19>
- Anderson, H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports*, *5*(3), 222–226. <https://doi.org/10.1007/s11926-003-0071-z>
- Aviner, S., Garty, B. Z., Rachmel, A., Baris, H. N., Sidransky, E., Shuffer, A., ... Cohen, I. J. (2009). Type 2 Gaucher disease occurs in Ashkenazi Jews but is surprisingly rare. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *43*(3), 294–297. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.08.004>
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S., & Kudo, A. (2000). Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(7), 4858–4864. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.7.4858>
- Bakker, a D., Kulkarni, R. N., Klein-Nulend, J., & Lems, W. F. (2014). IL-6 alters osteocyte signaling toward osteoblasts but not osteoclasts. *Journal of Dental Research*, *93*(4), 394–399. <https://doi.org/10.1177/0022034514522485>
- Balwani, M., Grace, M. E., & Desnick, R. J. (2011). Gaucher disease: when molecular testing and clinical presentation disagree -the novel c.1226A>G(p.N370S)--RecNcil allele. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *34*(3), 789–793. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9307-7>
- Barneda, D., & Christian, M. (2017). Lipid droplet growth: regulation of a dynamic organelle. *Current Opinion in Cell Biology*, *47*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.002>
- Batra, N., Kar, R., & Jiang, J. X. (2012). Gap Junctions and Hemichannels in Signal Transmission, Function and Development of Bone. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1818*(8), 1909. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2011.09.018>

- Begam, H., Nandi, S. K., Kundu, B., & Chanda, A. (2017). Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Materials Science and Engineering: C*, *70*, 856–869. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.09.074>
- Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J., & Fishman, M. C. (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature*, *383*(6600), 525–528. <https://doi.org/10.1038/383525a0>
- Bellido, T., Plotkin, L. I., & Bruzzaniti, A. (2014). Bone cells. *Basic and Applied Bone Biology*, (JANUARY), 27–45. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00002-2>
- Bivi, N., Condon, K. W., Allen, M. R., Farlow, N., Passeri, G., Brun, L. R., ... Plotkin, L. I. (2012). Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: Consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, *27*(2), 374–389. <https://doi.org/10.1002/jbmr.548>
- Bondar, C., Mucci, J., Crivaro, A., Ormazabal, M., Ceci, R., Oliveri, B., ... Rozenfeld, P. (2017). In vitro osteoclastogenesis from Gaucher patients' cells correlates with bone mineral density but not with Chitotriosidase. *Bone*, *103*, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.07.020>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *26*(2), 229–238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Bonewald, L. F. (2017). The Role of the Osteocyte in Bone and Nonbone Disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *46*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.09.003>
- Boustany, R.-M. N. (2013). Lysosomal storage diseases—the horizon expands. *Nature Reviews Neurology*, *9*(10), 583–598. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.163>
- Bredella, M. A., Fazeli, P. K., Daley, S. M., Miller, K. K., Rosen, C. J., Klibanski, A., & Torriani, M. (2014). Marrow fat composition in anorexia nervosa. *Bone*, *66*, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.014>
- C-N Huynh, N., Everts, V., Pavasant, P., & Ampornaramveth, R. S. (2017). Interleukin-1 β induces human cementoblasts to support osteoclastogenesis. *International Journal of Oral Science Online Publication*, *13*(5). <https://doi.org/10.1038/ijos.2017.45>
- Campeau, P. M., Rafei, M., Boivin, M. N., Sun, Y., Grabowski, G. A., & Galipeau, J. (2009). Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood*, *114*(15), 3181–3190. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205708>
- Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *561*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>
- Ceci, R., Francesco, P. N. de, Mucci, J. M., Cancelarich, L. N., Fossati, C. A., Rozenfeld, P. A., ... Rozenfeld, P. A. (2011). Reliability of enzyme assays in dried blood spots for diagnosis of 4 lysosomal storage disorders. *Advances in Biological Chemistry*, *01*(03), 58–64. <https://doi.org/10.4236/abc.2011.13008>
- Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E. M., & Xie, C. (2018). Osteoblast–osteoclast interactions. *Connective Tissue Research*, *59*(2), 99–107. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>
- Chérin, P., Rose, C., de Roux-Serratrice, C., Tardy, D., Dobbelaere, D., Grosbois, B., ... Hartmann, A. (2010). The neurological manifestations of Gaucher disease type 1: the French Observatoire on Gaucher disease (FROG). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *33*(4), 331–338. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9095-5>

- Cheung, W.-Y., Simmons, C. A., & You, L. (2012). Osteocyte apoptosis regulates osteoclast precursor adhesion via osteocytic IL-6 secretion and endothelial ICAM-1 expression. *Bone*, *50*(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2011.09.052>
- Ciuffreda, M. C., Malpasso, G., Musarò, P., Turco, V., & Gneccchi, M. (2016). Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. In *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_8
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, *3 Suppl 3*, S131-9. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Cox, T. M., Amato, D., Hollak, C. E., Luzy, C., Silkey, M., Giorgino, R., ... Miglustat Maintenance Study Group. (2012). Evaluation of miglustat as maintenance therapy after enzyme therapy in adults with stable type 1 Gaucher disease: a prospective, open-label non-inferiority study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *7*, 102. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-102>
- Cushing, P., Bhalla, R., Johnson, A. M., Rushlow, W. J., Meakin, S. O., & Belliveau, D. J. (2005). Nerve growth factor increases connexin43 phosphorylation and gap junctional intercellular communication. *Journal of Neuroscience Research*, *82*(6), 788–801. <https://doi.org/10.1002/jnr.20689>
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocrine Reviews*, *34*(5), 658–690. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>
- Davis, H. M., Aref, M. W., Aguilar-Perez, A., Pacheco-Costa, R., Allen, K., Valdez, S., ... Plotkin, L. I. (2018). Cx43 Overexpression in Osteocytes Prevents Osteocyte Apoptosis and Preserves Cortical Bone Quality in Aging Mice. *JBMR Plus*, *2*(4), 206–216. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10035>
- Davis, H. M., Pacheco-Costa, R., Atkinson, E. G., Brun, L. R., Gortazar, A. R., Harris, J., ... Plotkin, L. I. (2017). Disruption of the Cx43/miR21 pathway leads to osteocyte apoptosis and increased osteoclastogenesis with aging. *Aging Cell*, *16*(3), 551–563. <https://doi.org/10.1111/acer.12586>
- Deegan, P. B., Pavlova, E., Tindall, J., Stein, P. E., Bearcroft, P., Mehta, A., ... Cox, T. M. (2011). Osseous manifestations of adult gaucher disease in the era of enzyme replacement therapy. *Medicine*, *90*(1), 52–60. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3182057be4>
- Dekker, N., Dussen, L. Van, Hollak, C. E. M., Overkleeft, H., Scheij, S., Ghauharali, K., ... Aerts, J. M. (2015). Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease : relation to phenotype , storage cell markers , and therapeutic response, *118*(16), 118–128. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-352971>.This
- Deng, L., Wang, Y., Peng, Y., Wu, Y., Ding, Y., Jiang, Y., ... Fu, Q. (2015). Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts. *Bone*, *79*, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.022>
- Devine, E. A., Smith, M., Arredondo-Vega, F. X., Shafit-Zagardo, B., & Desnick, R. J. (1982). Regional assignment of the structural gene for human acid beta-glucosidase to q42 leads to qter on chromosome 1. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *33*(4), 340–344. <https://doi.org/10.1159/000131781>
- Donahue, H. J. (2000, December). Gap junctions and biophysical regulation of bone cells. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. <https://doi.org/10.1007/s12018-011-9084-8>
- Drelichman, Guillermo; Basack, Nora; Fernández Escobar Nicolás; Watman, Nora; Bolesina, Moira; Elena, Graciela; Veber, Samuel Ernesto; Kohan, Regina; Dragosky, Marta; Annetta, Isabel; Feliu, Aurora; Sciuccati, Gabriela; Cuello, María Fernanda; Delgado, Ma, A. B. . A. G. V. M. (2013). Consenso para la Enfermedad de Gaucher. *Hematología*, *17*, 25–60.
- Drelichman, G, Fernández Escobar, N., Basack, N., Aversa, L., Aguilar, G., Larroudé, M., ... Diez, B. (2015). *Actualización del consenso argentino de enfermedad de gaucher: grupo argentino para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de gaucher*.

- Drelichman, Guillermo, Linares, A., Villalobos, J., Cabello, J. F., Kerstenetzky, M., Kohan, R. M., & María Martins, A. (2012). ENFERMEDAD DE GAUCHER EN LATINOAMÉRICA UN INFORME DEL REGISTRO INTERNACIONAL Y DEL GRUPO LATINOAMERICANO PARA LA ENFERMEDAD DE GAUCHER, 273–282.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5), 747–754. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80257-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80257-3)
- Falk, M. M., Bell, C. L., Kells Andrews, R. M., & Murray, S. A. (2016). Molecular mechanisms regulating formation, trafficking and processing of annular gap junctions. *BMC Cell Biology*, 17 Suppl 1(Suppl 1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0087-7>
- Feng, X., & Teitelbaum, S. L. (2013). Osteoclasts: New Insights. *Bone Research*, 1(1), 11–26. <https://doi.org/10.4248/BR201301003>
- Filocamo, M., & Morrone, A. (2011). Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Human Genomics*, 5(3), 156–169. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-3-156>
- Gary, S. E., Ryan, E., Steward, A. M., & Sidransky, E. (2018). Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease HHS Public Access. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 13(2), 107–118. <https://doi.org/10.1080/17446651.2018.1445524>
- Geoghegan, I. P., Hoey, D. A., & McNamara, L. M. (2019, August 15). Integrins in Osteocyte Biology and Mechanotransduction. *Current Osteoporosis Reports*. Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00520-2>
- Ginaldi, L., & Martinis, M. De. (2016). Osteoimmunology and Beyond. *Current Medicinal Chemistry*, 23(33), 3754. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160907162546>
- Grabowski, G. A. (2006). Delivery of lysosomal enzymes for therapeutic use: glucocerebrosidase as an example. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 3(6), 771–782. <https://doi.org/10.1517/17425247.3.6.771>
- Grassi, S., Chiricozzi, E., Mauri, L., Sonnino, S., & Prinetti, A. (2019). Sphingolipids and neuronal degeneration in lysosomal storage disorders. *Journal of Neurochemistry*, 148(5), 600–611. <https://doi.org/10.1111/jnc.14540>
- GREGOIRE, F. M., SMAS, C. M., & SUL, H. S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*, 78(3), 783–809. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>
- Guce, A. I., Clark, N. E., Rogich, J. J., & Garman, S. C. (2011). The molecular basis of pharmacological chaperoning in human α -galactosidase. *Chemistry & Biology*, 18(12), 1521–1526. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.10.012>
- Gurda, B. L., & Vite, C. H. (2019). Large animal models contribute to the development of therapies for central and peripheral nervous system dysfunction in patients with lysosomal storage diseases. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz127>
- Hassan, S., Sidransky, E., & Tayebi, N. (2017). The role of epigenetics in lysosomal storage disorders: Uncharted territory. *Molecular Genetics and Metabolism*, 122(3), 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2017.07.012>
- Hayashi, M., Kamiya, Y., Itoh, H., Higashi, T., Miyazaki, T., Funakoshi, K., ... Goto, T. (2011). Intrathecally administered Sema3A protein attenuates neuropathic pain behavior in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience Research*, 69(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.09.006>
- Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., & Takayanagi, H. (2012). Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature*, 485. <https://doi.org/10.1038/nature11000>

- Hein, L. K., Duplock, S., Hopwood, J. J., & Fuller, M. (2008). Lipid composition of microdomains is altered in a cell model of Gaucher disease. *Journal of Lipid Research*, 49(8), 1725–1734. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800092-JLR200>
- Hodge, J. M., Kirkland, M. A., & Nicholson, G. C. (2007). Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(3), 759–768. <https://doi.org/10.1002/jcb.21331>
- Hollak, C. E., Evers, L., Aerts, J. M., & van Oers, M. H. (1997). Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 23(2), 201–212. <https://doi.org/10.1006/bcmd.1997.0137>
- Hong, Y. Bin, Kim, E. Y., & Jung, S.-C. (2006). Upregulation of proinflammatory cytokines in the fetal brain of the Gaucher mouse. *Journal of Korean Medical Science*, 21(4), 733–738. <https://doi.org/10.3346/jkms.2006.21.4.733>
- Honma, M., Ikebuchi, Y., Kariya, Y., & Suzuki, H. (2014). Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Current Osteoporosis Reports*, 12(1), 115–120. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0189-0>
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., ... Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 9(8), 847–856. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>
- Horowitz, M., Tzuri, G., Eyal, N., Berebi, A., Kolodny, E. H., Brady, R. O., ... Zimran, A. (1993). Prevalence of nine mutations among Jewish and non-Jewish Gaucher disease patients. *American Journal of Human Genetics*, 53(4), 921–930. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8213821>
- Hughes, D., Mikosch, P., Belmatoug, N., Carubbi, F., Cox, T., Goker-Alpan, O., ... Deegan, P. (2019). Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(6), 996–1013. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3734>
- Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S., & Sasabe, N. (2017, April 28). Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids in Health and Disease*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0473-y>
- Jang, H., Lim, S., Kim, J., Yoon, S., Lee, C. Y., Hwang, H.-J., ... Choi, J. H. (2019). Glucosylceramide synthase regulates adipo-osteogenic differentiation through synergistic activation of PPAR γ with GlcCer, (October), 1–18. <https://doi.org/10.1096/fj.201901437R>
- Kang, L., Wang, Y., Gao, X., Qiu, W., Ye, J., Han, L., ... Zhang, H. (2018). Genotypes and phenotypes in 20 Chinese patients with type 2 Gaucher disease. *Brain and Development*, 40(10), 876–883. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.06.006>
- Kang, L., Zhan, X., Ye, J., Han, L., Qiu, W., Gu, X., & Zhang, H. (2018). A rare form of Gaucher disease resulting from saposin C deficiency. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 68, 60–65. <https://doi.org/10.1016/J.BCMD.2017.04.001>
- Kenkre, J. S., & Bassett, J. H. D. (2018). *The bone remodelling cycle*. *Annals of Clinical Biochemistry* (Vol. 55). <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>
- Kim, J. H., Jin, H. M., Kim, K., Song, I., Youn, U., Matsuo, K., & Kim, N. (2009). The Mechanism of Osteoclast Differentiation Induced by IL-1, 183, 1862–1870. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803007>
- Kogianni, G., Mann, V., & Noble, B. S. (2008). Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(6), 915–927. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080207>

- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., & Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*, 75(7), 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90625-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90625-Z)
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., ... Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755–764. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80258-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80258-5)
- Kotake, S., & Nanke, Y. (2014). Effect of TNF α on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(3), 1209–1213. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.12.013>
- Kravets, I. (2018). Paget's Disease of Bone: Diagnosis and Treatment. *The American Journal of Medicine*, 131(11), 1298–1303. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.04.028>
- Kudo, O., Sabokbar, A., Pocock, A., Itonaga, I., Fujikawa, Y., & Athanasou, N. . (2003). Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, 32(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00915-8](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00915-8)
- Lacerda, L., Arosa, F. A., Lacerda, R., Cabeda, J., Porto, G., Amaral, O., ... De Sousa, M. (1999). T cell numbers relate to bone involvement in Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 25(2), 130–138. <https://doi.org/10.1006/bcmd.1999.0237>
- Lamghari, M., Barrias, C. C., Sá Miranda, C., & Barbosa, M. A. (2005). Recombinant glucocerebrosidase uptake by Gaucher disease human osteoblast culture model. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(3), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.07.009>
- Lampe, P. D., & Lau, a F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(2), 205–215. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2131>
- Lanyon, L. E. (1993). Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcified Tissue International*, 53(1 Supplement). <https://doi.org/10.1007/BF01673415>
- Lecourt, S., Mouly, E., Freida, D., Cras, A., Ceccaldi, R., Heraoui, D., ... Larghero, J. (2013). A Prospective Study of Bone Marrow Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells in Type 1 Gaucher Disease Patients. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069293>
- Lecourt, S., Vanneaux, V., Cras, A., Freida, D., Heraoui, D., Herbi, L., ... Larghero, J. (2012). Bone Marrow Microenvironment in an In Vitro Model of Gaucher Disease: Consequences of Glucocerebrosidase Deficiency. *Stem Cells and Development*. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0365>
- Lepelletier, Y., Moura, I. C., Hadj-Slimane, R., Renand, A., Fiorentino, S., Baude, C., ... Hermine, O. (2006). Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *European Journal of Immunology*, 36(7), 1782–1793. <https://doi.org/10.1002/eji.200535601>
- Li, J., Liu, X., zuo, B., & Zhang, L. (2016). The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Aging and Disease*. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.1206>
- Li, M. (2018). Enzyme replacement therapy: A review and its role in treating lysosomal storage diseases. *Pediatric Annals*, 47(5), e191–e197. <https://doi.org/10.3928/19382359-20180424-01>
- Li, Z., Hao, J., Duan, X., Wu, N., Zhou, Z., Yang, F., ... Huang, S. (2017). The Role of Semaphorin 3A in Bone Remodeling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 40. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00040>

- Lieberman, A. P., Puertollano, R., Raben, N., Slaugenhaupt, S., Walkley, S. U., & Ballabio, A. (2012). Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/auto.19469>
- Lieberman, R. L. (2011). A Guided Tour of the Structural Biology of Gaucher Disease: Acid- β -Glucosidase and Saposin C. *Enzyme Research*, 2011, 973231. <https://doi.org/10.4061/2011/973231>
- Lin, J. H. (1996). Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, 18(2), 75–85. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00445-9](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00445-9)
- LIU, W., & ZHANG, X. (2015). Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Molecular Medicine Reports*, 11(5), 3212–3218. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3152>
- Liu, X., Tan, N., Zhou, Y., Zhou, X., Chen, H., Wei, H., ... Song, Y. (2016). Semaphorin 3A Shifts Adipose Mesenchymal Stem Cells towards Osteogenic Phenotype and Promotes Bone Regeneration In Vivo. *Stem Cells International*, (Article ID 2545214), 13. <https://doi.org/10.1155/2016/2545214>
- Loiselle, A. E., Jiang, J. X., & Donahue, H. J. (2013, June). Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone*. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.08.132>
- Maione, F., Molla, F., Meda, C., Latini, R., Zentilin, L., Giacca, M., ... Giraudo, E. (2009). Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(11), 3356–3372. <https://doi.org/10.1172/JCI36308>
- Marcó, S., Haurigot, V., & Bosch, F. (2019). In vivo gene therapy for Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome): A new treatment horizon. *Human Gene Therapy*, hum.2019.217. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.217>
- Martin, P. E. M., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R. J., & Evans, W. H. (2001). Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26 , 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels.
- Martins, A. M., Valadares, E. R., Porta, G., Coelho, J., Filho, J. S., Dudeque Pianovski, M. A., ... Brazilian Study Group on Gaucher Disease and other Lysosomal Storage Diseases. (2009). Recommendations on Diagnosis, Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease. *The Journal of Pediatrics*, 155(4), S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.07.004>
- Massaro, G., Mattar, C. N. Z., Wong, A. M. S., Sirka, E., Buckley, S. M. K., Herbert, B. R., ... Rahim, A. A. (2018, September 1). Fetal gene therapy for neurodegenerative disease of infants. *Nature Medicine*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0106-7>
- Maurizi, G., Petäistö, T., Maurizi, A., & Della Guardia, L. (2018). Key-genes regulating the liposecretion process of mature adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 3784–3793. <https://doi.org/10.1002/jcp.26188>
- McEachern, K. A., Fung, J., Komarnitsky, S., Siegel, C. S., Chuang, W.-L., Hutto, E., ... Marshall, J. (2007). A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2007.04.001>
- McGregor, N. E., Murat, M., Elango, J., Poulton, I. J., Walker, E. C., Crimeen-Irwin, B., ... Sims, N. A. (2019). IL-6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(19), 7850–7863. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008074>
- Miggitsch, C., Meryk, A., Naismith, E., Pangrazzi, L., Ejaz, A., Jenewein, B., ... Grubeck-Loebenstien, B. (2019). Human bone marrow adipocytes display distinct immune regulatory properties. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.023>

- Mikosch, P., & Hughes, D. (2010). An overview on bone manifestations in Gaucher disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)*, 160(23–24), 609–624. <https://doi.org/10.1007/s10354-010-0841-y>
- Mirzaian, M., Wisse, P., Ferraz, M. J., Gold, H., Donker-Koopman, W. E., Verhoek, M., ... Aerts, J. M. F. G. (2015). Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1 Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54(4), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.01.006>
- Mistry, P. K., Liu, J., Sun, L., Chuang, W.-L., Yuen, T., Yang, R., ... Zaidi, M. (2014). Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), 4934–4939. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400768111>
- Mistry, P. K., Liu, J., Yang, M., Nottoli, T., McGrath, J., Jain, D., ... Zaidi, M. (2010). Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19473–19478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003308107>
- Morel, S., Frias, M. A., Rosker, C., James, R. W., Rohr, S., & Kwak, B. R. (2012). The natural cardioprotective particle HDL modulates connexin43 gap junction channels. *Cardiovascular Research*, (93), 42–49. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr257>
- Mori, K., Suzuki, K., Hozumi, A., Goto, H., Tomita, M., Koseki, H., ... Osaki, M. (2014). Potentiation of osteoclastogenesis by adipogenic conversion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomedical Research (Tokyo)*, 35(2), 153–159. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/35/2/35_153/_pdf/-char/en
- Morris, E. V., & Edwards, C. M. (2018). Bone marrow adiposity and multiple myeloma. *Bone*. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2018.03.011>
- Mucci, J M, Cuello, M. F., Kisinovsky, I., Larroude, M., Delpino, M. V., & Rozenfeld, P. A. (2015). Proinflammatory and proosteoclastogenic potential of peripheral blood mononuclear cells from Gaucher patients: Implication for bone pathology. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 55, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.05.009>
- Mucci, Juan M., Scian, R., De Francesco, P. N., García, F. S., Ceci, R., Fossati, C. A., ... Rozenfeld, P. A. (2012). Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF-?? *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.071>
- Mucci, Juan M, Suqueli García, F., de Francesco, P. N., Ceci, R., Di Genaro, S., Fossati, C. a, ... Rozenfeld, P. a. (2013). Uncoupling of osteoblast-osteoclast regulation in a chemical murine model of Gaucher disease. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.072>
- Mucci, Juan Marcos, & Adriana, P. (2014). Examining the impact of bone pathology on type I Gaucher disease, 115(1900), 61–70.
- Murugesan, V., Chuang, W. L., Liu, J., Lischuk, A., Kacena, K., Lin, H., ... Mistry, P. K. (2016). Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, 91(11), 1082–1089. <https://doi.org/10.1002/ajh.24491>
- Nakamura, I., & Jimi, E. (2006). Regulation of Osteoclast Differentiation and Function by Interleukin-1. *Vitamins and Hormones*. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74015-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74015-8)
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, J. Q., ... Takayanagi, H. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17(10), 1231–1234. <https://doi.org/10.1038/nm.2452>

- Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H., & Sakai, H. (2000). Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(3), 768–775. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.3379>
- Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., ... Suzuki, Y. (2016). Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 3(3), 200–215. <https://doi.org/10.1002/acn3.292>
- Negri AL. (2011). Regulación de la mineralización ósea por factores inorgánicos y peptídicos Regulation of Bone Mineralization by inorganic and peptide factors. *RAEM N°*, 48(4).
- Niimura, M., Sato, T., Enoki, Y., Okubo, M., Kokabu, S., Takeda, S., & Yoda, T. (2016). Semaphorin 3A Promotes Dendrite Elongation of Osteocytes in Association with Down-regulation of CDK6. *In Vivo (Athens, Greece)*, 30(3), 231–236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27107080>
- Nilsson, O., Grabowski, G. A., Ludman, M. D., Desnick, R. J., & Svennerholm, L. (1985). Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type 1 Gaucher disease variants. *Clinical Genetics*, 27(5), 443–450. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1985.tb00229.x>
- Ntambi, J. M., & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 3122S–3126S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.12.3122s>
- Oliveri, B., González, D., Quiroga, F., Silva, C., & Rozenfeld, P. (2019). A Comprehensive Study of Bone Manifestations in Adult Gaucher Disease Type 1 Patients in Argentina. *Calcified Tissue International*, 104(6), 650–657. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00536-x>
- Panicker, L. M., Miller, D., Park, T. S., Patel, B., Azevedo, J. L., Awad, O., ... Feldman, R. A. (2012). Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1207889109>
- Panicker, L. M., Srikanth, M. P., Castro-Gomes, T., Miller, D., Andrews, N. W., & Feldman, R. A. (2018). Gaucher disease iPSC-derived osteoblasts have developmental and lysosomal defects that impair bone matrix deposition.
- Parenti, G., Andria, G., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 471–486. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-122313-085916>
- Pastores, G. M., Elstein, D., Hrebíček, M., & Zimran, A. (2007). Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. *Clinical Therapeutics*, 29(8), 1645–1654. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2007.08.006>
- Pino, A. M., & Rodríguez, J. P. (2017). Is fatty acid composition of human bone marrow significant to bone health? *Bone*. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2017.12.014>
- Platt, F. M. (2012). Lysosomal storage disorders: A brief overview. *The Rockefeller University Press J. Cell Biol*, 199(5), 723–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208152>
- Platt, F. M., d'Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F., & Tiffit, C. J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
- Plotkin, L. I. (2014a). Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Current Osteoporosis Reports*, 12(1), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0194-3>
- Plotkin, L. I. (2014b). Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Frontiers in Physiology*, 5(April), 131. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00131>

- Plotkin, L. I., Manolagas, S. C., & Bellido, T. (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8648–8657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108625200>
- Raghavan, S. S., Topol, J., & Kolodny, E. H. (1980). Leukocyte beta-glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *American Journal of Human Genetics*, 32(2), 158–173. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6770675>
- Rajamäki, K., Lappalainen, J., Öörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S., Kovanen, P. T., & Kari, E. K. (2010). Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: A novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS ONE*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011765>
- Ralston, S. H. (2013). Bone structure and metabolism. *Medicine (United Kingdom)*, 41(10), 581–585. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.07.007>
- Reed, M., Baker, R. J., Mehta, A. B., & Hughes, D. A. (2013). Enhanced differentiation of osteoclasts from mononuclear precursors in patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 51(3), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2013.04.006>
- Reed, M. C., Schiffer, C., Heales, S., Mehta, A. B., & Hughes, D. A. (2018). Impact of sphingolipids on osteoblast and osteoclast activity in Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 124(4), 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.06.007>
- Rigante, D., Cipolla, C., Basile, U., Gulli, F., & Savastano, M. C. (2017). Overview of immune abnormalities in lysosomal storage disorders. *Immunology Letters*, 188, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.004>
- Ripoll, V. M., Irvine, K. M., Ravasi, T., Sweet, M. J., & Hume, D. A. (2007). Gpnmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10), 6557–6566. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6557>
- Rodriguez, J. P., Montecinos, L., Ros, S., Reyes, P., & Martinez, J. (2000). Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20001215\)79:4<557::AID-JCB40>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20001215)79:4<557::AID-JCB40>3.0.CO;2-H)
- Ronzitti, G., Collaud, F., Laforet, P., & Mingozi, F. (2019). Progress and challenges of gene therapy for Pompe disease. *Annals of Translational Medicine*, 7(13). <https://doi.org/10.21037/25787>
- Rosen, C. J., Ackert-Bicknell, C., Rodriguez, J. P., & Pino, A. M. (2009). Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 19(2), 109–124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19392647>
- Rosenfeld, L., Shirian, J., Zur, Y., Levaot, N., Shifman, J. M., & Papo, N. (2015). Combinatorial and Computational Approaches to Identify Interactions of Macrophage Colony-stimulating Factor (M-CSF) and Its Receptor c-FMS. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 26180–26193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671271>
- Sawkar, A. R., D’Haeze, W., & Kelly, J. W. (2006). Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders – a focus on Gaucher disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(10), 1179–1192. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5437-0>
- Schafer, K. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol*, (35), 461:478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- Schäffler, A., & Schölmerich, J. (2010). Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends in Immunology*, 31(6), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.03.001>

- Schultz, M. L., Tecedor, L., Chang, M., & Davidson, B. L. (2011). Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in Neurosciences*, *34*(8), 401–410. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.05.006>
- Schwartz, I. V. D., Göker-Alpan, Ö., Kishnani, P. S., Zimran, A., Renault, L., Panahloo, Z., ... group, on behalf of the G. S. (2018). Characteristics of 26 patients with type 3 Gaucher disease: A descriptive analysis from the Gaucher Outcome Survey. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, *14*, 73. <https://doi.org/10.1016/J.YMGMR.2017.10.011>
- Scian, R., Barrionuevo, P., Fossati, C. A., Giambartolomei, G. H., & Delpino, M. V. (2012). Brucella abortus invasion of osteoblasts inhibits bone formation. *Infection and Immunity*, *80*(7), 2333–2345. <https://doi.org/10.1128/IAI.00208-12>
- Scott, M. A., Nguyen, V. T., Levi, B., & James, A. W. (2011). Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *20*(10), 1793–1804. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0040>
- Setzer, B., Bächle, M., Metzger, M. C., & Kohal, R. J. (2009). The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.054>
- Shanmugam, M., Govindarajan, R., & Sinal, C. J. (2018). Bone Marrow Adipose Tissue and Skeletal Health. *Curr Osteoporos Rep*, *16*(4), 434–442. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0451-y>
- Sharma, R., Anguela, X. M., Doyon, Y., Wechsler, T., DeKolver, R. C., Sproul, S., ... High, K. A. (2015). In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood*, *126*(15), 1777–1784. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-615492>
- Sidransky, E., Nalls, M. A., Aasly, J. O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E. R., ... Ziegler, S. G. (2009). Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, *361*(17), 1651–1661. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901281>
- Sidransky, Ellen. (2004). Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, *83*(1–2), 6–15. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2004.08.015>
- Sims, K. B., Pastores, G. M., Weinreb, N. J., Barranger, J., Rosenbloom, B. E., Packman, S., ... Rosenthal, D. (2008). Improvement of bone disease by imiglucerase (Cerezyme) therapy in patients with skeletal manifestations of type 1 Gaucher disease: results of a 48-month longitudinal cohort study. *Clinical Genetics*, *73*(5), 430–440. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.00978.x>
- Sims, N. a, & Vrahnas, C. (2014). Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *561*, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.015>
- Sirrs, S., Irving, J., McCauley, G., Gin, K., Munt, B., Pastores, G., & Mistry, P. (2002). Failure of resting echocardiography and cardiac catheterization to identify pulmonary hypertension in two patients with type I Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *25*(2), 131–132. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118528>
- Solomon, M., & Muro, S. (2017). *Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives*. *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 118). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.004>
- Stein, G. S., Lian, J. B., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., ... Pockwinse, S. M. (2004, May 24). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207676>
- Su, N., Yang, J., Xie, Y., Du, X., Chen, H., Zhou, H., & Chen, L. (2019). Bone function, dysfunction and its role in diseases including critical illness. *Int. J. Biol. Sci*, *15*(4), 776–787. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27063>

- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology*, 7(4), 292–304. <https://doi.org/10.1038/nri2062>
- Tamargo, R. J., Velayati, A., Goldin, E., & Sidransky, E. (2012, July). The role of saposin C in Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.04.024>
- Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., & Lim, S.-S. (2009). Osteocyte Shape Is Dependent on Actin Filaments and Osteocyte Processes Are Unique Actin-Rich Projections. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(10), 1555–1568. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.10.1555>
- Tanaka, H., Shimazawa, M., Kimura, M., Takata, M., Tsuruma, K., Yamada, M., ... Hara, H. (2012). The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2(1), 573. <https://doi.org/10.1038/srep00573>
- Tao, S.-C., Guo, S.-C., & Zhang, C.-Q. (2018). Modularized Extracellular Vesicles: The Dawn of Prospective Personalized and Precision Medicine. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 5(2), 1700449. <https://doi.org/10.1002/advs.201700449>
- Teitelbaum, S L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5484), 1504–1508. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.289.5484.1504>
- Teitelbaum, Steven L. (2007). Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? *The American Journal of Pathology*, 170(2), 427–435. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2007.060834>
- Teresita Bellido. (2009). Why to Keep Osteocytes Alive and How? <https://doi.org/10.3803/jkes.2009.24.4.223>
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Trebec-Reynolds, D. P., Voronov, I., Heersche, J. N. M., & Manolson, M. F. (2010). IL-1 α and IL-1 β have different effects on formation and activity of large osteoclasts. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.22476>
- US National Library of Medicine, Genetics Home Reference - NIH. (2018). Retrieved September 17, 2019, from <https://ghr.nlm.nih.gov/>
- Van Patten, S. M., Hughes, H., Huff, M. R., Piepenhagen, P. A., Waire, J., Qiu, H., ... Edmunds, T. (2007). Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. *Glycobiology*, 17(5), 467–478. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm008>
- Vance, D. E., & Sweeley, C. C. (1967). Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood. *Journal of Lipid Research*, 8(6), 621–630. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6057492>
- Walsh, M. C., & Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Frontiers in Immunology*, 5(October), 511. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00511>
- Wang, F., Zhang, C., Ge, W., & Zhang, G. (2019). Up-regulated CST5 inhibits bone resorption and activation of osteoclasts in rat models of osteoporosis via suppression of the NF- κ B pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, jcm.14552. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14552>
- Wang, L., Chen, K., Wan, X., Wang, F., Guo, Z., & Mo, Z. (2017). NLRP3 inflammasome activation in mesenchymal stem cells inhibits osteogenic differentiation and enhances adipogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.007>

- Weinreb, N. J., Charrow, J., Andersson, H. C., Kaplan, P., Kolodny, E. H., Mistry, P., ... Zimran, A. (2002). Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *The American Journal of Medicine*, 113(2), 112–119. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01150-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01150-6)
- Wenger, D. A., Coppola, S., & Liu, S.-L. (2002). Lysosomal storage disorders: diagnostic dilemmas and prospects for therapy. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 4(6), 412–419. <https://doi.org/10.109700125817-200211000-00003>
- Wenger, D. A., Coppola, S., & Liu, S.-L. (2003). Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Archives of Neurology*, 60(3), 322–328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633142>
- Worzfeld, T., & Offermanns, S. (2014). Semaphorins and plexins as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd4337>
- Wu, H., Whitfield, T. W., Gordon, J. A. R., Dobson, J. R., Tai, P. W. L., van Wijnen, A. J., ... Lian, J. B. (2014). Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis. *Genome Biology*, 15(3), R52. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r52>
- Xu, H., Gu, S., Riquelme, M. A., Burra, S., Callaway, D., Cheng, H., ... Jiang, J. X. (2015). Connexin 43 Channels Are Essential for Normal Bone Structure and Osteocyte Viability. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(3), 436–448. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2374>
- Yamashita, T., Takahashi, N., & Udagawa, N. (2013). New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World Journal of Orthopedics*, 3(11), 175. <https://doi.org/10.5312/wjo.v3.i11.175>
- Yan, X.-Z., Yang, W., Yang, F., Kersten-Niessen, M., Jansen, J. A., & Both, S. K. (2014). Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 20(3), 198–204. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0412>
- Yang, K., Miron, R. J., Bian, Z., & Zhang, Y. F. (2018). A bone-targeting drug-delivery system based on Semaphorin 3A gene therapy ameliorates bone loss in osteoporotic ovariectomized mice. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.06.003>
- Yoshitake, F., Itoh, S., Narita, H., Ishihara, K., & Ebisu, S. (2008). Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11535–11540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607999200>
- Yuan, F. L., Wu, Q. yuan, Miao, Z. N., Xu, M. H., Xu, R. S., Jiang, D. L., ... Li, X. (2018). Osteoclast-derived Extracellular vesicles: Novel regulators of osteoclastogenesis and osteoclast-osteoblasts communication in bone remodeling. *Frontiers in Physiology*, 9(MAY), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00628>
- Zancan, I., Bellesso, S., Costa, R., Salvalaio, M., Stroppiano, M., Hammond, C., ... Moro, E. (2015). Glucocerebrosidase deficiency in zebrafish affects primary bone ossification through increased oxidative stress and reduced Wnt/ β -catenin signaling. *Human Molecular Genetics*, 24(5), 1280–1294. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu538>
- Zhao, W., Zhang, S., Wang, B., Huang, J., Lu, W. W., & Chen, D. (2016). Runx2 and microRNA regulation in bone and cartilage diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1383(1), 80–87. <https://doi.org/10.1111/nyas.13206>
- Zigdon, H., Savidor, A., Levin, Y., Meshcheriakova, A., Schiffmann, R., & Futerman, A. H. (2015). Identification of a biomarker in cerebrospinal fluid for neuronopathic forms of Gaucher disease. *PLoS One*, 10(3), e0120194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120194>

- Zimran, A., Belmatoug, N., Bembi, B., Deegan, P., Elstein, D., Fernandez-Sasso, D., ... Schwartz, I. V. D. (2018). Demographics and patient characteristics of 1209 patients with Gaucher disease: Descriptive analysis from the Gaucher Outcome Survey (GOS). *American Journal of Hematology*, 93(2), 205–212. <https://doi.org/10.1002/ajh.24957>
- Zołącińska, A. (2018). Address for correspondence Funding sources The expression of marker genes during the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(5), 717–723. <https://doi.org/10.17219/acem/68386>
- Zou, L., Kidwai, F. K., Kopher, R. A., Motl, J., Kellum, C. A., Westendorf, J. J., & Kaufman, D. S. (2015). Use of RUNX2 Expression to Identify Osteogenic Progenitor Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.008>