



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología
Médica**

**La proteína A como blanco potencial para modular
el daño óseo durante la osteomielitis por
*Staphylococcus aureus***

AUTOR: Lic. ANDREA MENDOZA BERTELLI

DIRECTOR: Dra. MARISA I. GÓMEZ

DIRECTOR-ADJUNTO: Dra. MARÍA VICTORIA DELPINO

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dra. MARTA MOLLERACH

2016

AGRADECIMIENTOS.

- ❖ A mis papas por el estímulo constante, confianza y amor. Gracias por estar siempre!. Son mi mejor ejemplo y los admiro profundamente!
- ❖ A mi hermano por ser uno de los pilares de mi vida, mi amigo, por confiar en mí y darme esperanza siempre que lo necesite. Gracias por ser el mejor hermano mayor!
- ❖ A Lucas, mi amor, mi amigo, mi compañero de vida. Gracias por hacerme reír hasta en los momentos más difíciles, por creer en mí y por tu apoyo incondicional! TE AMO!
- ❖ A Marisa, por la dedicación constante y contribuir a mi formación profesional. Gracias por tu confianza, por la comunicación que siempre existió, por tu tiempo compartido y por ayudarme siempre que lo necesite!
- ❖ A Vicky por confiar en mí y tu apoyo incondicional! Gracias por siempre tener una palabra de aliento y tu buen humor!
- ❖ A Cristina y Daniel por brindarme el espacio para realizar este trabajo.
- ❖ A la Dra. Marta Mollerach por aceptar ser mi consejera de estudios.
- ❖ A las chicas, Coty, Ailin, Cami, Cin y Celes por todos los momentos compartidos laborales y extra laborales, por las risas, por ayudarme siempre! Las voy a extrañar! Me llevo lo mejor de Uds! Gracias por hacer de mi doctorado una etapa muy especial! Las quiero!
- ❖ A Moni por ayudarme en los últimos años del doctorado. Gracias por estar!
- ❖ A Angie y Santi por su gran ayuda con los experimentos con animales, por su buena predisposición y las risas compartidas en cada “inoculación”, gracias por todo! Fuimos el mejor equipo!
- ❖ A Lore por brindarme desinteresadamente su ayuda, por escucharme y aconsejarme siempre.
- ❖ A Ágata por las tardes de cuarto de cultivo, por apoyarme hasta un sábado a las 3 am y brindarme su amistad.
- ❖ A todos los chicos del becalario por los momentos compartidos, los mates entre experimentos y sus consejos! Me llevo de cada uno de Uds un pedacito!
- ❖ A las chicas de secretaría del IMPaM, Barby, Juli y Marian por la buena onda siempre!
- ❖ Al personal de Bioterio y personal no docente del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA.
- ❖ A mis amigos, los biotecnólogos y los no biotecnólogos, gracias por formar parte de mi vida!
- ❖ Al jurado por la buena predisposición para evaluar este trabajo.

INDICE.

AGRADECIMIENTOS	I
INDICE	II
PUBLICACIONES	V
ABREVIATURAS	VI
RESÚMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OSTEOMIELITIS	2
1.1.1. Patogenia y origen de la infección	2
1.1.2. Etiología	3
1.1.3. Osteomielitis secundaria al reemplazo de articulaciones.	3
1.2. FISIOLÓGIA OSEA	4
1.2.1. Protagonistas del remodelado óseo.	5
1.2.1.1. Osteoclastos	5
1.2.1.2. Osteoblastos.	8
1.2.1.3. Comunicación osteoclasto-osteoblasto	9
1.2.1.4. Osteocitos.	10
1.2.2. El hueso en condiciones inflamatorias.	10
1.3. PATOGENIA DE LAS INFECCIONES OSEAS POR <i>S. aureus</i>	11
1.3.1. Adhesión	12
1.3.2. Invasión tisular y daño.	13
1.3.3. Inducción de respuesta inflamatoria	14
1.3.3.1. Interacción de <i>S. aureus</i> con las células del hueso.	14
1.3.4. Evasión de los mecanismos de defensa del huésped por <i>S. aureus</i>	15
1.3.4.1. Biopelículas y su rol en persistencia.	15
1.3.4.2. Persistencia intracelular	16
1.3.4.3. Formación de variantes puntiformes.	16
1.3.5. La proteína A y su rol potencial en osteomielitis	17
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	19
2.1. HIPÓTESIS	20
2.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. SOLUCIONES Y REACTIVOS	22
3.2. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO	22
3.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	24

3.3.1. Expresión de proteínas recombinantes.	24
3.3.2. Purificación de proteínas de fusión a GST.	25
3.3.3. Decontaminación de las proteínas.	25
3.3.4. Determinación del grado de pureza e integridad de las proteínas purificadas.	26
3.3.5 Cuantificación de las proteínas aisladas.	27
3.4. CÉLULAS Y MEDIOS DE CULTIVO CELULAR.	27
3.4.1 Obtención de precursores de osteoclastos de origen murino.	28
3.4.2. Obtención de precursores de osteoclastos de origen humano.	28
3.5. ENSAYOS DE OSTEOCLASTOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>.	29
3.6. ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD.	30
3.7. MODELO DE OSTEOMIELITIS EXPERIMENTAL.	30
3.7.1. Determinación de la carga bacteriana del hueso.	31
3.7.2. Análisis por Micro-tomografía computada (micro-CT).	31
3.7.3. Determinación del índice osteomielítico.	31
3.7.4. Análisis histopatológicos.	32
3.7.5. Ensayos de osteoclastogénesis <i>ex vivo</i>	32
3.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GELATINOLITICA POR ZIMOGRAFÍA.	33
3.9. TINCION DE LA FOSFATASA ACIDA TARTRATO RESISTENTE (TRAP).	33
3.10. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE ARNm.	33
3.10.1. Extracción y cuantificación de ARN total.	34
3.10.2. Extracción y cuantificación de ADN genómico total.	35
3.10.3. Preparación de ADNc a partir del ARN total.	35
3.10.4. PCR de tiempo real.	37
3.11. ELISA.	39
3.12. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.	40
4. RESULTADOS.	42
4.1. LA PROTEÍNA A DE <i>S. aureus</i> INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE OSTEOCLASTOS Y MODULA SU FUNCIÓN RESORTIVA.	43
4.1.1. La proteína A de <i>S. aureus</i> induce osteoclastogénesis.	43
4.1.1.1. La proteína A de <i>S. aureus</i> induce la expresión de RANK.	47
4.1.2. La proteína A contribuye a la producción de citoquinas pro-inflamatorias por precursores de osteoclastos estimulados con <i>S. aureus</i>	47
4.1.3. La proteína A de <i>S. aureus</i> modula la actividad resortiva de los osteoclastos.	51
4.1.4. Conclusiones parciales.	53
4.2. ROL DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LOS RECEPTORES TNFR1 Y EGFR EN LA DIFERENCIACIÓN Y ACTIVACIÓN DE OSTEOCLASTOS INDUCIDA POR LA PROTEÍNA A DE <i>S. aureus</i>.	54

4.2.1. La proteína A de <i>S. aureus</i> induce osteoclastogénesis a través de la señalización mediada por TNFR1 y EGFR.	54
4.2.2. La señalización por TNFR1 y EGFR posee un rol en la osteoclastogénesis inducida por <i>S. aureus</i>	55
4.2.3. El TNF- α inducido por la proteína A de <i>S. aureus</i> contribuye a la diferenciación de osteoclastos.	56
4.2.4. La señalización vía TNFR1 es crítica para la funcionalidad de los osteoclastos diferenciados en respuesta a <i>S. aureus</i>	58
4.2.5. Conclusiones parciales.	59
4.3. CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA A EN LA DEGRADACIÓN ÓSEA CARACTERÍSTICA DE LA OSTEOMIELITIS POR <i>S. aureus</i>.	59
4.3.1. Contribución de la señalización inducida por la proteína A de <i>S. aureus</i> en el desarrollo de osteomielitis en un modelo experimental murino.	59
4.3.1.1. La proteína A induce la diferenciación de osteoclastos durante la infección <i>in vivo</i> con <i>S. aureus</i>	59
4.3.1.2. TNFR1 posee un rol crítico en la diferenciación de osteoclastos durante la infección <i>in vivo</i> por <i>S. aureus</i>	61
4.3.1.3. La proteína A contribuye a la inducción de mediadores inflamatorios durante la infección <i>in vivo</i> por <i>S. aureus</i>	62
4.3.1.4. La expresión de proteína A contribuye al daño óseo durante la infección <i>in vivo</i> por <i>S. aureus</i>	65
4.3.2. Contribución de la señalización inducida por la proteína A de <i>S. aureus</i> en el desarrollo de osteomielitis en un modelo experimental en rata.	66
4.3.3. Conclusiones parciales.	70
4.4. IMPACTO DE LA NEUTRALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA A EN LA OSTEOCLASTOGÉNESIS DURANTE LOS ESTADIOS INICIALES DE LA INFECCIÓN ÓSEA POR <i>S. aureus</i>.	71
4.4.1. La neutralización de la proteína A previene la diferenciación de osteoclastos y la producción de mediadores inflamatorios inducidos por <i>S. aureus in vitro</i>	71
4.4.2. La neutralización de la proteína A previene la diferenciación de osteoclastos inducida por <i>S. aureus in vivo</i>	74
4.4.3. La neutralización de la proteína A modula la producción de mediadores inflamatorios durante la infección <i>in vivo</i> por <i>S. aureus</i>	75
4.4.4. Conclusiones parciales.	79
5. DISCUSIÓN.	80
5.1. DISCUSIÓN.	81
6. CONCLUSIONES.	90
6.1. CONCLUSIONES.	91
6.2. CONCLUSION GENERAL.	92
7. BIBLIOGRAFÍA.	93

PUBLICACIONES.

Los resultados del presente trabajo han sido parcialmente publicados en:

Andrea Mendoza Bertelli, María Victoria Delpino, Santiago Lattar, Constanza Gai, Mariángeles Noto Llana, Norberto Sanjuan, James E. Cassat, Daniel Sordelli, Marisa I. Gómez, 2016. “*Staphylococcus aureus* Protein A Enhances Osteoclastogenesis via TNFR1 and EGFR Signaling”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1862 (10): 1975–83. doi:10.1016/j.bbadis.2016.07.016.

ABREVIATURAS.

A: Amperio.
Abs: absorbancia.
ADN: ácido desoxirribonucleico.
ADNc: ácido deoxirribonucleico complementario.
ARN: ácido ribonucleico.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
Bbp: del inglés “*bone sialoprotein binding protein*”.
BSA: del inglés “*bovine serum albumin*”.
BMP: del inglés “*bone morphogenic proteins*”.
Cna: del inglés “*collagen binding protein*”.
CTR: del inglés “*calcitonin receptor*”.
CoA: *coagulasa*.
Da: Dalton.
DO: densidad óptica.
EDTA: del inglés “*Ethylenediaminetetraacetic acid*”.
EGF: del inglés “*Epidermal growth factor*”.
EGFR: del inglés “*Epidermal growth factor receptor*”.
FnBP: del inglés “*Fibronecting binding protein*”.
GAPDH: del inglés “*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*”.
gr: gramo.
Ig: inmunoglobulina.
IGF: del inglés “*Insulin growth factor*”.
Ihh: proteínas indian hedgehog.
IL: interleuquina.
IL-1 β : interleuquina 1 beta.
I.O: Índice osteomielítico.
IPTG: del inglés “*isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*”.
kDa: kilo Dalton.
LPS: lipopolisacárido.
M: molar.
mA: miliamper.
MAPKs: del inglés “*Mitogen-activated protein kinases*”.
MMPs: metaloproteasas de matriz.
M-CP1: del inglés “*Monocyte chemotactic protein 1*”.
M-CSF: del inglés “*Macrophage colony stimulating factor*”.
min: minutos.
ml: mililitro.
mM: milimolar.
MSCRAMMs: del inglés “*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*”.
NFAT: del inglés “*nuclear factor of activated T cells*”.
NF- κ B: del inglés “*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*”.
ng: nanogramo.
NLRP-3: del inglés “*NLR family pyrin domain containing 3*”.
nM: nanomolar.
nm: nanómetro.
NOD: del inglés “*nucleotide-binding oligomerization domain proteins*”.
NS: no significativo.
ON: del inglés: “*overnight*”.

OPG: Osteoprotegerina.
PAMPs: del inglés: “*pathogen-associated molecular patterns*”.
Pb: Pares de bases.
PCR: del inglés “*polymerase chain reaction*”.
pg: picogramo.
rpm: revoluciones por minuto.
PRRs: del inglés: “*pathogen recognition receptors*”.
PSMs: del inglés “*phenol soluble modulins*”.
PVL: del inglés “*Panton-Valentine Leukocidin*”.
RANK: del inglés “*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B*”.
RANKL: del inglés “*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*”.
RT: retrotranscripción o retrotranscriptasa.
SA: *S. aureus*.
Sbi: del inglés “*Staphylococcal immunoglobulin-binding protein*”.
SCV: del inglés “*Small Colony Variant*”.
SDS: del inglés “*Sodium Dodecyl Sulfate*” (dodecil sulfato de sodio).
SFB: suero fetal bovino.
SNR: suero normal de ratón.
SpA: del inglés “*Staphylococcal protein A*”.
SP-1: del inglés: “*Sphingosine-1-phosphate*”.
SSR: del inglés “*short sequence repeats*”.
TIMPs: del inglés “*tissue inhibitors of metalloproteinases*”.
Td: temperatura de disociación.
TLRs: del inglés “*Toll- like receptors*”.
TMB: TMB: 3,3', 5,5'- tretametilbencidina.
TNF- α : del inglés “*tumor necrosis factor alfa*”.
TNFR1: del inglés “*tumor necrosis factor receptor 1*”.
TRAP: Fosfatasa Acida Tartrato Resistente.
TSA: Agar tripteína soja.
Tu: temperatura de unión.
u.a.: unidades arbitrarias.
UFC: Unidades Formadoras de Colonias.
 μ g: microgramo.
 μ l: microlitro.
 μ M: micromolar.
VEGF: del inglés “*vascular endothelial growth factor*”.
V: voltios.

RESUMEN.

Las infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* constituyen un gran problema para la salud pública dado el incremento en la incidencia de aislamientos resistentes a la meticilina aún en individuos de la comunidad. El desarrollo de reemplazos de articulaciones ha sido sin duda uno de los grandes éxitos de la medicina del siglo XX. Sin embargo, a pesar del desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, el implante de prótesis se asocia indefectiblemente a un alto riesgo de infecciones bacterianas. Entre las diferentes especies que pueden ocasionar infecciones asociadas a prótesis, *S. aureus* es uno de los patógenos de mayor importancia siendo el responsable de entre el 50 y el 70% de las osteomielitis en individuos adultos. Las infecciones osteoarticulares por *S. aureus* son muy difíciles de erradicar ya que la bacteria se vuelve refractaria al tratamiento con antibióticos independientemente de su patrón de susceptibilidad *in vitro*. Este hecho, sumado a la aparición de cepas resistentes a vancomicina hacen al tratamiento de las infecciones estafilocócicas un verdadero desafío. En este contexto, el esclarecimiento de los mecanismos involucrados durante la interacción de *S. aureus* con células críticas en el metabolismo óseo que conducen al desarrollo de osteomielitis es sumamente necesario a fin de establecer tratamientos alternativos y/o complementarios a los actuales.

En el presente proyecto de investigación se propuso estudiar el rol de la proteína A, una proteína altamente conservada y potente inductora de mediadores inflamatorios, en la patogénesis de la osteomielitis por *S. aureus*. Se determinó que la proteína A contribuye significativamente al proceso de osteoclastogénesis a través de la señalización mediada por el receptor de TNF- α tipo 1 (TNFR1) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Mientras que ambos receptores participan del proceso de diferenciación de osteoclastos, la señalización por TNFR1 resultó determinante para la función resortiva de los mismos. Mediante la utilización de modelos experimentales de osteomielitis se demostró que la proteína A posee un rol crítico en la activación temprana de osteoclastos y en la inducción de mediadores inflamatorios durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Se estableció asimismo, la importancia de la señalización por TNFR1 en el primado de osteoclastos durante la osteomielitis experimental. Más aún se demostró la participación de la proteína A en el desarrollo de daño óseo, evidenciado por alteraciones histopatológicas del tejido y por la inducción de cambios en la densidad mineral ósea volumétrica durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Finalmente, se estableció la potencialidad del uso de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína A para bloquear la diferenciación de osteoclastos inducida durante los estadios iniciales de la infección y modular la producción de mediadores inflamatorios durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un avance en el entendimiento de las bases moleculares de los mecanismos que desencadenan el daño óseo y la persistencia bacteriana durante la osteomielitis por *S. aureus*. Considerando el impacto que dicha enfermedad posee en la salud pública es sumamente necesario contar con estrategias terapéuticas alternativas a las actuales. En este sentido, el presente trabajo demuestra que la proteína A podría ser considerada como un potencial nuevo blanco terapéutico en el diseño de terapias complementarias a las convencionales para la prevención y tratamiento de la osteomielitis por *S. aureus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OSTEOMIELITIS.

1.1.1. Patogenia y origen de la infección.

La osteomielitis es una infección del hueso y de la medula ósea que puede originarse por diseminación hematológica del microorganismo, por contigüidad desde un foco cercano de infección o en forma secundaria a una insuficiencia vascular [1]. Si el microorganismo proviene de un foco distante de infección y llega al hueso a través del torrente sanguíneo se considera osteomielitis hematológica. La osteomielitis hematológica ocurre principalmente en niños, en quienes la infección se localiza generalmente en la zona metafisaria de los huesos largos. En adultos, la osteomielitis hematológica es infrecuente excepto en huéspedes inmunocomprometidos [2,3]. Una segunda vía de adquisición es por contigüidad, cuando el microorganismo llega al hueso a través de una herida que se infecta. Las fracturas expuestas y el uso de reemplazo de articulaciones son el tipo de lesiones que más se asocian a este tipo de osteomielitis. La infección ósea puede tener lugar además en casos en que la irrigación sanguínea del hueso se interrumpe. Esto puede ocurrir en las personas mayores que sufren de insuficiencia vascular o diabetes. La mayor parte de las infecciones de este tipo ocurren en los pies. Se ha descrito que el 19% de las osteomielitis son de origen hematológico, el 47% secundarias a una infección por contigüidad y el 34% asociado a la insuficiencia vascular [2].

Inicialmente la infección se presenta como un proceso agudo caracterizado por una respuesta inflamatoria exacerbada. Los leucocitos que acceden a la zona infectada como parte del proceso de la respuesta inmune de la que participan, liberan enzimas que contribuyen a la necrosis del tejido y la destrucción del hueso trabecular y matriz ósea. Los abscesos formados por la infección, conducen a un aumento en la presión intramedular debido a la obstrucción del flujo en los vasos sanguíneos. Es por ello que los principales hallazgos histopatológicos que se observan en una osteomielitis aguda son la presencia de microorganismos, infiltrados de neutrófilos y congestión o trombosis de los vasos sanguíneos [1].

Si el microorganismo no es eliminado rápidamente, se establece la infección crónica que se caracteriza por la formación de sequestrados óseos. El sequestrado es tejido necrótico no vascularizado, reconocido por la ausencia de osteocitos vivos que se encuentra separado del resto del hueso por tejido de granulación. La necrosis ósea está acoplada a la formación reactiva de hueso nuevo, conocido como involucro. Este último se refiere a la capa de hueso sano que se forma para envolver el hueso necrótico.

1.1.2. Etiología.

Toda clase de microorganismos, tales como virus, hongos, parásitos y bacterias pueden causar osteomielitis, pero las formas causadas por ciertas bacterias piógenas y micobacterias son las más frecuentes. El microorganismo responsable varía según el grupo etario. En neonatos las bacterias más frecuentemente asociadas a osteomielitis son: *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del Grupo B), *Staphylococcus aureus* y bacilos entéricos gram negativos [1]. En niños en edad escolar (mayores de 4 años), *S. aureus* es el microorganismo más identificado, seguido por *Streptococcus pyogenes* (Grupo A). *Haemophilus influenzae* tipo B ocasionalmente origina osteomielitis y más comúnmente produce artritis. Las heridas penetrantes en los pies pueden estar asociadas a osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa*. En adultos el 50% de las infecciones óseas son ocasionadas por *S. aureus*. *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella* spp afectan especialmente la columna. Dentro de las osteomielitis causadas por hongos se destacan las infecciones óseas por *Cándida* y *Aspergillus* en individuos inmunocomprometidos [4].

1.1.3. Osteomielitis secundaria al reemplazo de articulaciones.

Las enfermedades degenerativas óseas y articulares afectan a millones de personas en todo el mundo. Se prevé que para el año 2020 la población mayor de 50 años afectada por estas enfermedades se duplicará [5]. En este contexto, el desarrollo de reemplazos de articulaciones ha sido sin duda uno de los grandes éxitos de la medicina del siglo XX considerando el impacto sobre la calidad de vida de las personas que sufren estas complicaciones óseas y articulares. Sin embargo, el implante de prótesis se asocia indefectiblemente a un alto riesgo de infecciones bacterianas [6]. Más de la mitad de los casos de infecciones asociadas a prótesis están causadas por estafilococos, siendo *S. aureus* y *S. epidermidis* los principales agentes responsables [7]. Entre ellos, *S. aureus* es considerado como uno de los patógenos de mayor importancia causante de entre el 50 y el 70% de las osteomielitis en individuos adultos [8,9].

La osteomielitis puede comenzar con la inoculación directa del microorganismo al hueso en el momento del trauma o por adquisición nosocomial durante el procedimiento pre-operatorio o intra-operatorio [10]. El trauma contribuye a la infección no sólo por el ingreso directo de la bacteria al individuo, sino que el daño generado favorece la necrosis del tejido el cual la bacteria puede colonizar formando biopelículas. La presencia de implantes prostéticos es un factor predisponente para el establecimiento de la infección debido a que después de su colocación son recubiertos por proteínas del hospedador, las cuales proveen una excelente matriz a la cual la bacteria puede adherirse y formar una biopelícula [11,12].

Las infecciones invasivas por *S. aureus* constituyen un gran problema para la salud pública dado el incremento en la incidencia de cepas resistentes a la meticilina aún en individuos sanos de la comunidad [9,13,14]. En los casos en que se aísla *S. aureus* resistente a meticilina, los desenlaces suelen no ser favorables y conducen en su mayoría a intervenciones quirúrgicas [13,15] o a cirugías tipo "toilet" las cuales no sólo son muy costosas sino que el porcentaje de éxito puede ser tan bajo como el 60% poniendo a los pacientes en riesgo de discapacidad o amputación [16–20]. Debido al gran aumento de las infecciones por *S. aureus* resistente a meticilina el uso de vancomicina se ha incrementado desde su introducción [21,22], lo cual ha llevado a la aparición de cepas con resistencia intermedia a vancomicina, un fenómeno del que nuestro país no está exento [23–25]. Además de la problemática asociada a la resistencia a antibióticos, los cambios fenotípicos y genotípicos que *S. aureus* puede presentar durante el curso de la infección, contribuyen a la persistencia del microorganismo (ver más adelante variantes puntiformes) y hacen que el tratamiento antibiótico pueda no resultar efectivo para eliminar al microorganismo independientemente de su patrón de susceptibilidad *in vitro* [26,27]. Por todo lo expuesto, el tratamiento de las infecciones óseas por *S. aureus* constituye un verdadero desafío.

1.2. FISIOLÓGÍA ÓSEA.

El hueso constituye un tejido conectivo especializado que provee un sistema de soporte interno a todos los vertebrados superiores. Además de su función de sostén y protección, es la principal fuente de iones inorgánicos participando activamente en la homeostasis de calcio en el organismo. La matriz del hueso está compuesta en un 50 a 70% por matriz mineral, 20 a 40% por matriz orgánica, 5 a 10% por agua y en menos de un 3% por lípidos [28]. El contenido mineral del hueso es fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, con pequeñas cantidades de carbonato, magnesio y fosfato ácido [28]. Estos componentes producen un tejido con alta rigidez capaz de proveer sostén y protección. La matriz orgánica, compuesta en un 90% por proteínas colágenas, en su mayoría por colágeno tipo I con trazas de colágeno tipo III y V, produce un tejido de gran elasticidad. El restante 10% está compuesto por proteoglicanos, glicoproteínas, proteínas con grupos γ -carboxiglutámicos y las proteínas morfogenéticas óseas [28].

A fin de mantener su integridad estructural, el hueso se encuentra en constante remodelación y rejuvenecimiento mediante un proceso complejo que comprende la acción coordinada de dos tipos celulares: los osteoclastos y los osteoblastos. Los osteoclastos son las células encargadas de degradar la matriz extracelular mediante acidificación y liberación de enzimas lisosomales, mientras que los osteoblastos son responsables de la deposición de matriz y facilitan la mineralización y calcificación ósea. Las actividades de estos dos tipos celulares se encuentran acopladas y altamente

reguladas por factores locales y sistémicos para mantener el equilibrio óseo. Los osteoblastos reconocen y responden a las señales del medio externo y modulan la diferenciación y funcionalidad de los osteoclastos [9]. Cada ciclo de remodelado consta de tres fases: reabsorción, reposo o inversión y terminación. La fase de reabsorción incluye el reclutamiento de los precursores de osteoclastos, su diferenciación a osteoclastos maduros, así como también la activación y el mantenimiento de la degradación del hueso. Una vez finalizada la reabsorción sigue la fase de reposo o inversión en la cual la degradación del hueso es inhibida y los osteoclastos mueren por apoptosis, mientras que los precursores de los osteoblastos son reclutados y comienzan a diferenciarse. El último paso se denomina fase de terminación e implica la formación de matriz por parte de los osteoblastos y la posterior mineralización [29].

1.2.1. Protagonistas del remodelado óseo.

1.2.1.1. Osteoclastos.

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas que se forman a partir de la fusión de los precursores del linaje monocítico/macrofágico en un proceso altamente regulado que depende de múltiples pasos de diferenciación, denominado osteoclastogénesis [30]. La proliferación y diferenciación de los precursores involucra la presencia de dos factores clave: el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL) [30] (Figura 1). El M-CSF producido por los osteoblastos se une a su receptor c-fms en precursores de osteoclastos promoviendo su supervivencia y proliferación [31]. El RANKL es expresado en la superficie de los osteoblastos o es liberado en forma soluble. Se ha documentado su expresión por otros tipos celulares como fibroblastos, linfocitos B y T activados [32,33]. Su actividad biológica está regulada por el inhibidor natural osteoprotegerina (OPG) que actúa como un receptor soluble de RANKL que inhibe en forma competitiva la unión de este último a su receptor RANK (del inglés "*Receptor Activator for Nuclear Factor κB* ") en la superficie de los precursores de osteoclastos [34]. La interacción entre el receptor RANK y su ligando RANKL induce la activación de una cascada de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los osteoclastos [35]. Entre los factores de transcripción activados se encuentran c-fos, NF- κB (del inglés "*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*"), AP-1, y NFATc1 (del inglés "*nuclear factor of activated T cells*"). Recientemente se ha demostrado que el IFN- β modula la osteoclastogénesis inhibiendo la expresión de c-fos actuando como un regulador negativo para prevenir la resorción ósea en exceso [36] (Figura 1).

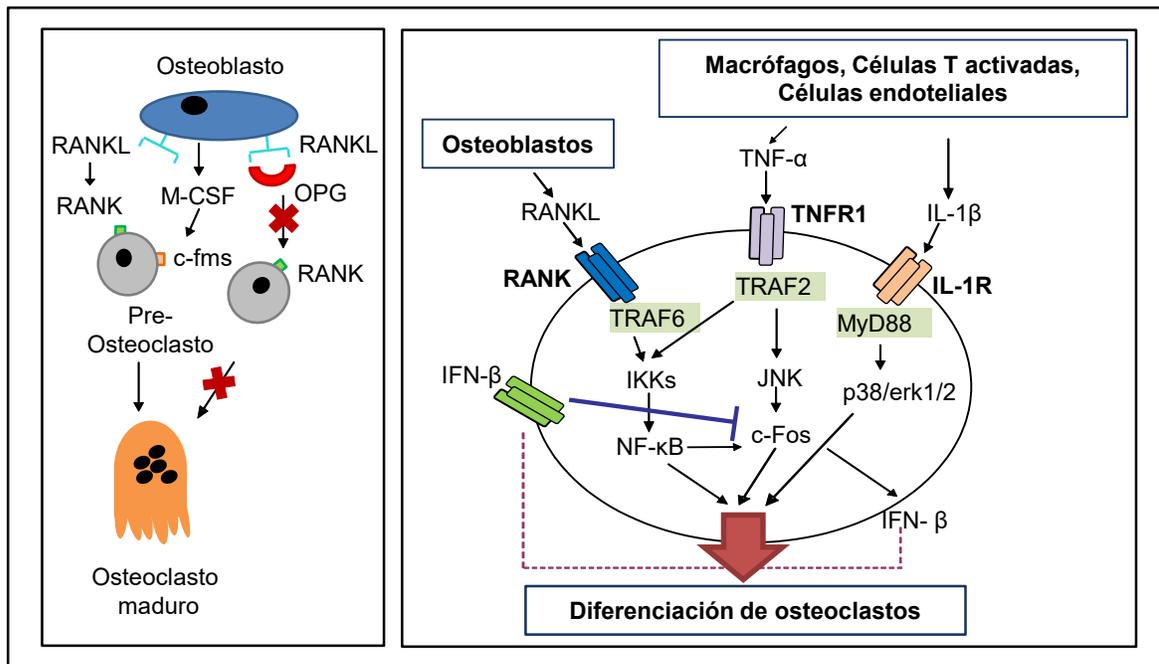


Figura 1. Cascadas de señalización que participan en la osteoclastogénesis.

La fusión de los precursores mononucleares comienza con el reconocimiento entre las células y adhesión entre las mismas para que pueda tener lugar la formación de células multinucleadas. Entre las proteínas involucradas en esta etapa de fusión, se ha descrito a la E-cadherina como una proteína transmembrana crítica para el contacto intercelular durante la diferenciación de osteoclastos [37]. Luego de cada fusión el tamaño celular y el número de núcleos aumenta dando como resultado células gigantes, multinucleadas cuya actividad resorptiva depende del tamaño logrado en cada fusión [38,39]. Para ejercer su función de resorción los osteoclastos deben migrar desde la medula ósea hasta los sitios de degradación ósea por lo que existen en dos estados funcionales diferentes: uno móvil y uno degradativo [40]. Los osteoclastos móviles son células no polarizadas y aplanadas que migran mediante la formación de lamelipodios. Se adhieren a los sitios de resorción ósea mediante la interacción de la integrina $\alpha\beta 3$ expresada en la superficie de los osteoclastos con las proteínas de la matriz extracelular del hueso vitronectina, osteopontina y sialoproteína [41], dando inicio a la fase degradativa. Durante este proceso, los osteoclastos maduros se polarizan por reorganización del citoesqueleto lo cual resulta en la formación de un borde rugoso con profundos pliegues por donde se secretan iones H^+ y se produce la exocitosis, mediada por vesículas, de las metaloproteasas de matriz y catepsina K (Figura 2). Los iones H^+ acidifican el medio lo cual disuelve la matriz mineral mientras que las enzimas secretadas degradan la matriz proteica. El contacto con la matriz ósea

estimula en los osteoclastos la formación de un anillo rico en filamentos de actina que rodea a la zona rugosa y sella el compartimento acidificado donde ocurre la degradación, aislándolo del resto de la superficie ósea [42].

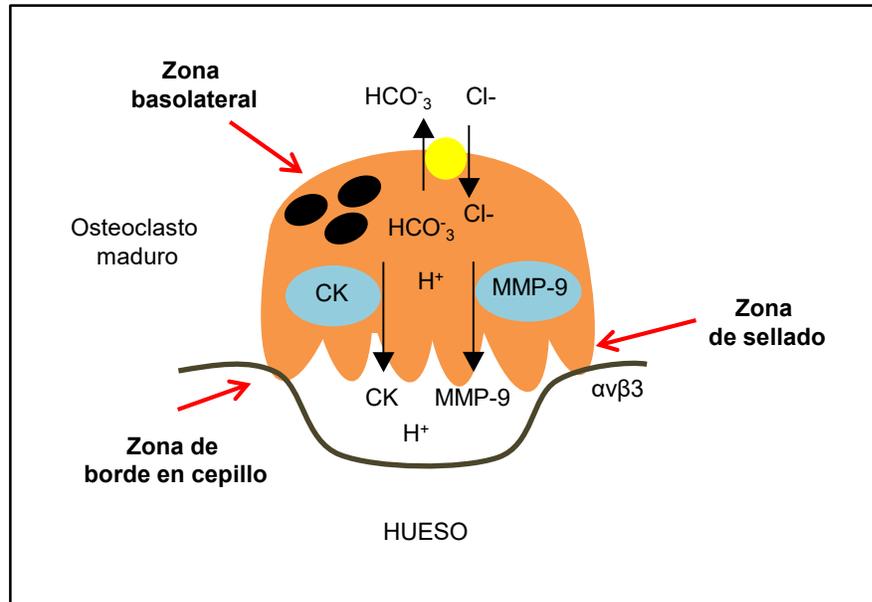


Figura 2. Regiones del osteoclasto activo. Cuando resorben hueso en forma activa los osteoclastos muestran tres regiones especializadas: 1) Borde en cepillo: porción de la célula en contacto directo con el hueso. Contiene muchos repliegues profundos de la membrana plasmática que forman estructuras del tipo de las microvellosidades. 2) Zona de sellado: es un perímetro de citoplasma anular contiguo al borde en cepillo que delimita la superficie ósea en resorción. 3) Región basolateral: interviene en la exocitosis del material.

En la zona del hueso situada por debajo del osteoclasto se forma una excavación llamada laguna de resorción (laguna de Howship) que posee gran cantidad de enzimas. Entre ellas, se destacan las metaloproteasas de matriz (MMPs), las cuales son una familia de endopeptidasas dependientes de Zn^{+2} y Ca^{+2} . Hasta el momento se conocen al menos 23 MMPs en humanos, las cuales se encuentran clasificadas según su especificidad de sustrato en *colagenasas* (MMP-1, -8, -13 y -18), *gelatinasas* (MMP-2 y MMP-9), *estromelisin* (MMP-3, -10, -11 y -17), *matrilisin* (MMP-7 y -26), *MMPs de unión a membrana* (MT-MMPs, MMP-14, -15, -16, -17, -24 y -25) que pueden degradar gelatina, fibronectina y laminina. Existen otras MMPs que no pueden ser incluidas en ninguna de las clases mencionadas [43–47]. Las MMPs son secretadas como proenzimas que para ser activadas requieren ser clivadas por proteinasas o por agentes químicos *in vitro* [48]. Debido a su capacidad destructiva se encuentran estrictamente reguladas en diferentes niveles. La actividad es regulada por los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) que son una familia de 4 proteínas secretadas (TIMP-1 a TIMP-4) que se unen no covalentemente al dominio catalítico de las

MMPs inhibiendo su actividad. También son reguladas a nivel transcripcional por citoquinas, factores de crecimiento y hormonas [49].

La degradación de la matriz orgánica involucra además de las MMPs a la cisteína proteasa lisosomal, catepsina K [50]. La forma inactiva de esta proteasa predomina en los osteoclastos quiescentes que están alejados de los sitios de resorción activa. Su activación *in vivo* se cree tiene lugar intracelularmente en compartimientos lisosomales y luego es secretada a la laguna de resorción. Los osteoclastos cercanos a la superficie ósea expresan catepsina K madura [51]. Su expresión está regulada por RANKL, un inductor clave de la osteoclastogénesis, así como también por otros agentes involucrados en la diferenciación de osteoclastos como la vitamina D, la hormona paratiroidea e interleucinas [52]. Entre los marcadores de actividad y diferenciación osteoclástica se encuentran la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), la enzima vacuolar H⁺-ATPasa (similar a una bomba de protones), las integrinas $\alpha\beta_3$, que participan en la regulación del citoesqueleto durante la migración de los osteoclastos y la expresión del receptor de calcitonina (CTR) [40,53].

1.2.1.2. Osteoblastos.

Los osteoblastos son células mononucleadas originadas a partir de células madre mesenquimales responsables de la síntesis y la mineralización ósea [54]. Morfológicamente, son células cuboidales con un citoplasma fuertemente basófilo presentes a lo largo de la vida de un organismo, pero cuya actividad es máxima durante la formación del esqueleto embrionario y el crecimiento. Durante la vida adulta se activan ante la necesidad de regeneración de defectos o por agotamiento de la matriz ósea [55]. El reclutamiento, diferenciación y crecimiento de los osteoblastos está controlado por distintos factores locales y sistémicos. Entre ellos se encuentran los factores de transcripción Runx2 y OSTERIX que regulan la expresión de las proteínas de la matriz ósea (osteopontina, sialoproteína, osteocalcina) [56] y participan de la diferenciación temprana de osteoblastos respectivamente [57]. El proceso de remodelado también está regulado por factores sistémicos entre los que se encuentran la hormona paratiroidea, la 1,25-dihidroxi vitamina D, los glucocorticoides y el estrógeno [58–61], los cuales estimulan la degradación o la formación de hueso.

Una de las vías de señalización más importantes que regulan la formación del hueso es la vía Wnt/ β -catenina [62]. La misma está involucrada en la estimulación de la proliferación y diferenciación, y promueve la supervivencia de los osteoblastos y osteocitos. Otra vía de señalización involucrada en la diferenciación de los osteoblastos incluye la vía de la superfamilia TGF- β , siendo dos miembros clave TGF- β y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) [63]. Por su parte las proteínas indian hedgehog (Ihh) participan de la osteogénesis del esqueleto endocondral durante la embriogénesis [62]. La diferenciación de osteoblastos también está sujeta a la regulación por estímulos físicos para asegurar una adecuada formación ósea que sirva como soporte estructural y dinámico del cuerpo [56].

La diferenciación de los osteoblastos consiste de tres etapas, cada una caracterizada por la expresión de determinados marcadores moleculares [64]. En la fase de proliferación activa los precursores expresan proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno tipo 1. Los precursores que proliferan y diferencian en pre-osteoblastos son células elípticas que no son capaces de depositar matriz ósea. En la segunda etapa las células abandonan el ciclo celular y comienzan a expresar genes característicos de los osteoblastos diferenciados (fosfatasa alcalina y osteocalcina) y comienza la síntesis de la matriz extracelular. En la tercer y última etapa el osteoblasto adquiere su estructura cuboidal característica y comienza la formación ósea. Los osteoblastos sintetizan colágeno tipo 1 y distintas proteínas no-colágenas (sialoproteína, osteopontina y osteocalcina) que están asociadas a la mineralización y recambio óseo [65].

Al finalizar la síntesis y mineralización de la matriz extracelular los osteoblastos pueden seguir tres destinos diferentes: pueden ser eliminados por apoptosis, quedar embebidos dentro de la matriz mineralizada y transformarse en osteocitos o pueden transformarse en células de revestimiento que tapizan la superficie del hueso [66]. Estas últimas regulan el flujo de iones minerales en la superficie ósea y mantienen la capacidad de re diferenciarse a osteoblastos ante la exposición a un estímulo determinado (hormonas, fuerzas mecánicas) [28].

1.2.1.3. Comunicación osteoclasto-osteoblasto.

Los osteoclastos y osteoblastos cumplen funciones opuestas pero se encuentran permanentemente comunicados y regulan mutuamente su función. Uno de los mecanismos por el cual los osteoclastos pueden participar en la regulación de la formación del hueso es mediante la liberación de factores inmersos en la matriz los cuales regulan positivamente la función de los osteoblastos. Ejemplos de estos factores son las proteínas morfogenéticas óseas, los factores de crecimiento insulínico (IGFs) I y II y TGF- β [67,68]. Otro mecanismo por el cual los osteoclastos pueden regular la función de los osteoblastos es mediante el contacto directo célula-célula a través de la interacción de las proteínas transmembrana ephrinB2 expresada por los osteoblastos y EphB4 expresada por los osteoclastos, la cual promueve la diferenciación de los osteoblastos e inhibe la diferenciación de los osteoclastos [69]. La regulación también puede ocurrir a través de factores liberados por los osteoclastos. Un ejemplo es el factor osteoclástico esfingosina 1-fosfato (SP-1) el cual ha sido involucrado en el reclutamiento de precursores de osteoblastos y en el incremento de la producción de RANKL por estas últimas células [70].

Los osteoblastos son capaces de regular la diferenciación de los osteoclastos a través de la expresión de M-CSF, RANKL y OPG como se mencionó anteriormente. Asimismo, los osteoblastos pueden inducir la migración de precursores de osteoclastos a la superficie ósea a través de la secreción de factores quimioattractantes. Dos de estos factores, los cuales derivan de la matriz ósea,

son osteocalcina y colágeno tipo I [71]. Estos son producidos por los osteoblastos y son depositados en la matriz durante la formación del hueso. Cuando los osteoclastos degradan la matriz liberan estos factores atrayendo así más precursores de osteoclastos. La proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) producida por los osteoblastos también ha sido involucrada en la atracción de los precursores de osteoclastos [72].

1.2.1.4. Osteocitos.

Los osteocitos son osteoblastos totalmente diferenciados que son incorporados dentro de la matriz ósea mineralizada y constituyen las células mayoritarias del hueso. Poseen una gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas que les permiten comunicarse entre sí y con los osteoblastos o las células de revestimiento que tapizan las superficies del hueso. Existen evidencias que sugieren que la principal función de los osteocitos es la de sensar las fuerzas mecánicas e iniciar el proceso de remodelado del hueso en zonas específicas [73].

1.2.2. El hueso en condiciones inflamatorias.

La resorción ósea es un proceso constante en el cuerpo humano manteniéndose en equilibrio con la formación de hueso nuevo [35]. La presencia de *S. aureus* en un hueso sano conduce al desarrollo de osteomielitis por alteración del balance riguroso entre la actividad de osteoblastos y osteoclastos a través de la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria [9]. El daño óseo es el resultado de una actividad de los osteoclastos exacerbada acompañada de una menor deposición de matriz por los osteoblastos [74]. Se ha demostrado la capacidad de IL-1 β , IL-6 y TNF- α de contribuir en la destrucción ósea durante las enfermedades inflamatorias crónicas del hueso [74,75], debido a que favorecen la diferenciación de osteoclastos y regulan positivamente las funciones resortivas de los mismos [76–79]. La pérdida ósea observada en distintas enfermedades inflamatorias se debe también a una menor deposición de matriz orgánica por parte de los osteoblastos [80]. Las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β son capaces de inducir la apoptosis o inhibir la diferenciación y función de los osteoblastos afectando el desarrollo normal del hueso [81–85].

En condiciones patológicas las MMPs, involucradas normalmente en distintos procesos que requieren de la remodelación de la matriz extracelular, han sido asociadas a enfermedades que involucran la destrucción del tejido conectivo tales como artritis, invasión tumoral, enfermedades infecciosas y aterosclerosis [86,87]. En las enfermedades óseas las más relevantes son la MMP-2 y MMP-9 debido a que son capaces de degradar varios tipos de colágeno incluyendo colágeno tipo IV (presente en la membrana basal), colágeno tipo V (presente en el hueso), colágeno tipo II (presente en el cartílago) y colágeno fibrilar desnaturalizado (gelatina) [88]. Particularmente se ha propuesto a la MMP-9 como un elemento clave de la pérdida ósea observada durante la osteomielitis ya que es

expresada en altos niveles por los osteoclastos [89] y mediante su acción promueve la liberación de factores de crecimiento y factores de diferenciación de osteoclastos, tales como M-CSF, TGF- β y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) desde la matriz ósea, lo cual promueve la movilización de los osteoclastos hacia futuros sitios de resorción [90]. La secreción de MMP-9 se encuentra regulada positivamente por IL-1 β y TNF- α , lo cual podría contribuir al aumento de la resorción ósea observada durante distintas condiciones inflamatorias [91–93]. Al respecto, se ha propuesto que el daño osteoarticular observado durante la brucelosis podría deberse a la elevada producción de MMP-9 por monocitos en respuesta a la infección de osteoblastos por *Brucella abortus* [94].

La degradación de la matriz orgánica involucra además de las MMPs a la cisteína proteasa lisosomal, catepsina K [50]. Debido a su capacidad de degradar colágeno tipo I, el mayor componente de la matriz orgánica del hueso, cumple un rol en el inicio de la resorción. Se ha descrito que TNF- α favorece la expresión de esta proteasa contribuyendo a la degradación de tejido observada durante las lesiones ateroscleróticas [95]. Asimismo se ha demostrado que un aumento en la expresión de los genes marcadores de osteoclastos que codifican para TRAP y catepsina K contribuye a la resorción ósea inducida por *S. aureus* en cultivos de hueso parietal [96]. En distintas enfermedades inflamatorias deficiencias en la expresión de catepsina K se han asociado a una reducción de la inflamación y degradación ósea [97]. En pacientes con la enfermedad de Gaucher la expresión de catepsina K se ha asociado a la fragilidad ósea característica de esta enfermedad [98].

1.3. PATOGENIA DE LAS INFECCIONES ÓSEAS POR *S. aureus*.

Staphylococcus aureus es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, que forma agrupaciones en racimos dado que al dividirse las células permanecen parcialmente adheridas. Se caracteriza, entre los estafilococos, por producir coagulasa, fermentar el manitol y la pigmentación dorada de sus colonias [99].

Aproximadamente el 20% de la población se encuentra colonizada en forma permanente, un 60% son portadores intermitentes, mientras que el 20% restante no está colonizado [100]. La parte anterior de las fosas nasales es el sitio más frecuente de colonización, aunque *S. aureus* puede colonizar además la piel, la orofaringe y el tracto gastrointestinal [101]. La colonización proporciona un reservorio a partir del cual la bacteria puede ingresar al hospedador cuando la primera línea de defensa se ve interrumpida como por ejemplo cuando existe una ruptura de la barrera de la piel durante la inserción de catéteres, heridas o cirugías [11]. La transmisión de *S. aureus* tiene lugar entre pacientes hospitalizados así como entre los individuos sanos de la comunidad [102,103]. En el caso de la osteomielitis secundaria al reemplazo de articulaciones, los principales reservorios de la

bacteria constituyen el ambiente hospitalario, el instrumental quirúrgico, la indumentaria o piel del personal de salud, así como también la piel del propio paciente.

A pesar de la importancia a nivel de la salud pública que la osteomielitis presenta, existe un escaso conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la degradación ósea que se observa como consecuencia de la infección por *S. aureus*. La patogénesis de las infecciones por *S. aureus* está determinada por la acción coordinada de un conjunto de factores de virulencia que median la adherencia, inflamación y daño a los tejidos y permiten evadir la respuesta inmune del hospedador [101,104]. A continuación se mencionan aquéllos factores de virulencia que se consideran relevantes para las infecciones óseas.

1.3.1. Adhesión.

El primer evento en las infecciones por *S. aureus*, como en la mayoría de las infecciones de origen bacteriano, involucra la adherencia a componentes de la matriz extracelular del hospedador la cual es crítica para la colonización. Es importante considerar que en los casos en que el hospedador cuenta con un implante prostético, éste es rápidamente cubierto por componentes de la matriz extracelular con lo cual se favorece la adherencia del microorganismo a dicho dispositivo. La adherencia del microorganismo a los componentes de la matriz extracelular o a la prótesis esta mediada por proteínas de superficie denominadas adhesinas, pertenecientes a la familia de MSCRAMMs (del inglés “*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*”), las cuales en la mayoría de los casos están covalentemente ancladas al peptidoglicano de la pared celular [105,106]. Entre las adhesinas involucradas en la adherencia de *S. aureus* a la superficie ósea se destacan las proteínas de unión a la fibronectina A y B (FnBP: del inglés “*fibronecting binding protein*”) las cuales facilitan principalmente la invasión de los osteoblastos presentes en la matriz ósea. La fibronectina actúa como un puente entre la FnBP de la bacteria y la integrina $\alpha 5b1$ expresada en la superficie de los osteoblastos. Estudios realizados con mutantes de *S. aureus* que carecen de la expresión de FnBPA y FnBPB demuestran que las mismas presentan una menor capacidad de invadir osteoblastos lo cual denota la importancia de dichas proteínas en la colonización ósea [107,108]. Otra molécula de adhesión importante para la interacción de *S. aureus* con el hueso es la proteína de unión al colágeno (Cna: del inglés “*collagen adhesin*”). Existen evidencias experimentales utilizando un modelo de osteomielitis hematogena, de que esta proteína jugaría un rol preponderante en el establecimiento de la infección ósea debido a que participa en el desarrollo de cambios histológicos indicativos de osteomielitis aguda como inflamación de los huesos largos, formación de abscesos y destrucción de la fisis o cartílago de crecimiento y tejido óseo [109]. Asimismo, la expresión de Cna es crítica en la osteomielitis asociada a implantes prostéticos debido a

que los mismos son rápidamente cubiertos por colágeno en el huésped facilitándose así la adherencia de la bacteria a través de dicha adhesina [110]. La proteína de unión a la sialoproteína del hueso (bbp del inglés “*bone sialoprotein binding protein*”) ha sido una de las primeras adhesinas estudiadas dada su expresión en aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes con infecciones óseas o articulares y se ha propuesto que tendría un rol en el desarrollo de osteomielitis [111].

La adherencia de *S. aureus* a la matriz ósea o al implante prostético, como se mencionó anteriormente, es el primer paso para la colonización bacteriana. Luego, el establecimiento de la infección se verá favorecido por la capacidad de este patógeno de crecer formando parte de una biopelícula lo cual genera una adherencia fuerte al tejido o la matriz [112].

1.3.2. Invasión tisular y daño.

Una de las características más sobresalientes de *S. aureus* es su capacidad para producir una gran diversidad de toxinas que dañan células del hospedador así como enzimas extracelulares que facilitan la invasión tales como proteasas, hialorunidasa, lipasa y nucleasa [101,104]. Una vez que *S. aureus* estableció la infección ósea secreta algunas de estas toxinas para debilitar los componentes de la matriz, lo cual resulta en la destrucción ósea. [113]. Entre ellas se destacan la leucocidina de *Panton–Valentine* (PVL: del inglés “*Panton–Valentine leucocidin*”), una exotoxina formadora de poro y la coagulasa (CoA) una proteína que se une a la protrombina del suero, activándola y desencadenando la coagulación [114]. Ambas moléculas se propone que están involucradas en la pérdida y destrucción ósea durante la osteomielitis por *S. aureus* debido a que provocan la inhibición de la proliferación de los osteoblastos e inducen su apoptosis. Asimismo bloquean la formación y mineralización ósea y regulan la expresión de RANKL favoreciendo la diferenciación de osteoclastos *in vitro* [115]. Se ha demostrado que PVL jugaría un rol en la degradación ósea observada durante la osteomielitis debido a su capacidad de inducir deformación ósea y abscesos musculares en un modelo de osteomielitis en conejo [116]. No obstante es necesario considerar que no todos los aislamientos de *S. aureus* expresan dicha toxina.

S. aureus secreta además modulinas solubles en fenol (PSMs: del inglés “*phenol soluble modulins*”), pequeños péptidos anfipáticos que actúan como surfactantes provocando la lisis celular [117]. Se ha demostrado que dichas modulinas promueven la lisis de osteoblastos [118]. Estudios *in vivo* han demostrado que participan en el desarrollo de osteomielitis favoreciendo la diseminación bacteriana y la deformación ósea. Sin embargo, en este modelo la ausencia de PSMs sólo previno la diseminación bacteriana al inicio de la infección y no presentó un impacto en la reducción del daño a tiempos más prolongados en el modelo de osteomielitis en conejo [119].

1.3.3. Inducción de respuesta inflamatoria.

Las infecciones causadas por *S. aureus* se caracterizan por la inducción de una importante respuesta inflamatoria. Luego de su ingreso, *S. aureus* es rápidamente reconocido por receptores celulares del sistema inmune innato del hospedador iniciando cascadas de señalización que llevan a la producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas [76]. Las células del hospedador reconocen, mediante receptores específicos denominados PRRs (del inglés “*pathogen recognition receptors*”) diversos motivos conservados de los microorganismos denominados PAMPs (del inglés “*pathogen-associated molecular patterns*”). Entre los PAMPs bacterianos de *S. aureus* se encuentran el peptidoglicano de la pared celular, las lipoproteínas y los ácidos lipoteicoicos. Entre los receptores celulares que reconocen estos PAMPs se destacan, los receptores TLR2 (del inglés “*Toll-like receptor-2*”) y NOD (del inglés “*nucleotide-binding oligomerization domain proteins*”).

1.3.3.1. Interacción de *S. aureus* con las células del hueso.

El ingreso de la bacteria al hueso genera una importante respuesta inflamatoria. Entre las células respondedoras a la presencia de la bacteria en el microambiente óseo las más estudiadas han sido los osteoblastos [120]. Entre los PRRs expresados por los osteoblastos se han descrito los receptores NOD1 y NOD2, receptores de reconocimiento de patrones intracelulares, los cuales activan la señalización vía NF- κ B, las MAPKs (del inglés “*Mitogen-activated protein kinases*”) y los receptores TLR2 cuya señalización favorece la expresión de RANKL. Asimismo, *S. aureus* es reconocido por TNFR1 (del inglés “*tumor necrosis factor receptor 1*”) en la superficie de los osteoblastos [96,121–123].

En cuanto a la producción de mediadores inflamatorios, se ha demostrado que los osteoblastos de origen murino y humano infectados con *S. aureus* expresan altos niveles de IL-6 [123]. Asimismo, los osteoblastos secretan las quimioquinas MCP-1 y CXCL10 (IP-10), las cuales tienen la capacidad de reclutar monocitos y linfocitos T respectivamente favoreciendo el desarrollo de daño óseo [124,125]. Asimismo, durante la infección por *S. aureus* se produce en los osteoblastos la activación de NLRP-3 (del inglés “*NLR family pyrin domain containing 3*”) un inflamasoma que es esencial para la secreción de IL-1 β por otros tipos celulares en respuesta a *S. aureus* [126].

Además de los osteoblastos, las células progenitoras de medula ósea actúan como una fuente de efectores inmunes y ante la presencia de un patógeno favorecen la diferenciación hacia un perfil mieloide que permita combatir la infección. Se ha identificado la presencia de PRRs en las células progenitoras, entre ellos TLR2 y NOD2, los cuales inducen la diferenciación hacia células dendríticas y monocitos/macrófagos [127–129]. La interacción de *S. aureus* con los osteoclastos ha sido muy poco estudiada hasta el presente. Recientemente, en forma paralela a la realización de este trabajo

se demostró que las citoquinas pro-inflamatorias producidas por macrófagos en respuesta a *S. aureus* activan a los osteoclastos promoviendo su migración y funciones resorptivas [130].

1.3.4. Evasión de los mecanismos de defensa del huésped por *S. aureus*.

Las infecciones crónicas por *S. aureus*, como es el caso de la osteomielitis, surgen como consecuencia de la exitosa evasión de la respuesta inmune del hospedador lo cual conduce a la persistencia de la bacteria en el microambiente óseo. Entre las estrategias empleadas por *S. aureus* que se propone contribuyen a la persistencia en hueso se destacan la forma de vida en biopelículas, la persistencia intracelular y la formación de variantes puntiformes (SCV: del inglés “*Small Colony Variants*”).

1.3.4.1. Biopelículas y su rol en persistencia.

El establecimiento y la persistencia de las infecciones por *S. aureus* se debe en gran parte a su capacidad de formar biopelículas. La presencia de un implante prostético así como el tejido desvitalizado resultante de la infección constituyen una superficie ideal para la formación de la biopelícula [131]. Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo y se caracterizan por un crecimiento, una expresión génica y una producción proteica alterada [132]. Las bacterias al formar biopelícula están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos [133]. Entre los mecanismos responsables de la resistencia a antibióticos se incluyen: (i) la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos (ii) el crecimiento enlentecido de las bacterias debido a la limitación de nutrientes y (iii) la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico que la hace menos susceptible a la acción antimicrobiana [133,134]. Asimismo, hay que tener en cuenta que el fracaso terapéutico puede deberse en parte a que los antibióticos utilizados rutinariamente han sido seleccionados por su actividad frente a bacterias planctónicas, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de una biopelícula [135]. De esta manera la falta de un tratamiento antimicrobiano efectivo favorece la persistencia de la bacteria. Este hecho sumado a que la formación de una biopelícula representa un punto de diseminación debido a que algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan de la misma, contribuye a la colonización de los tejidos adyacentes, el establecimiento de la infección y la cronicidad de la enfermedad [132]. Se ha demostrado que las biopelículas están compuestas de una mezcla heterogénea de proteínas que participan de diversos aspectos de la fisiología bacteriana, entre ellos factores de transcripción y traducción, aquellos involucrados en el metabolismo energético

y la patogénesis. Asimismo se han identificado factores de virulencia que representan tan solo el 12% del proteosoma extracelular total. La liberación de estos factores puede contribuir al daño óseo durante la osteomielitis por *S. aureus* debido a que se ha demostrado que inducen la apoptosis de osteoblastos, inhiben la diferenciación osteogénica y favorecen la diferenciación de osteoclastos por inducir un aumento de RANKL [136].

1.3.4.2. Persistencia intracelular.

Se ha propuesto que la internalización de *S. aureus* por los osteoblastos sería un elemento determinante para la cronicidad en las enfermedades óseas ya que permitiría a la bacteria ocultarse del sistema inmune y evitar la acción de los antibióticos [137]. La adhesión de *S. aureus* a los osteoblastos es el primer paso para la internalización e involucra la interacción de las proteínas FnBPA y FnBPB de *S. aureus* con la integrina $\alpha 5b1$ expresada en la superficie de los osteoblastos. La capacidad de distintas cepas de *S. aureus* de ser internalizadas por estas células está regulada por los niveles del factor de transcripción sigma B, ya que el mismo modula la expresión de las FnBP [138]. Luego de la adhesión los microfilamentos comienzan a formar extensiones de la superficie celular que recubren a la bacteria y favorecen su fagocitosis. Los microtúbulos por su parte trasladan la vesícula endocítica fuera de la membrana celular para permitir la formación de nuevas vesículas [139]. Luego de ser internalizada, la mayoría de la bacteria reside en estas vesículas y permanece viva, sin embargo, algunas bacterias pueden ser liberadas al citoplasma e inducir apoptosis [140]. La invasión de los osteoblastos resulta en un aumento de la fosforilación de las kinasas erk1/2 las cuales se encuentran involucradas en la señalización intracelular que conduce a la producción de TNF- α e IL-6 [141]. El estudio de los mecanismos de persistencia de *S. aureus* en los osteoblastos es un elemento clave para el entendimiento de la evolución de la enfermedad desde la fase aguda al estadio crónico.

1.3.4.3. Formación de variantes puntiformes.

Se ha demostrado que el microambiente que *S. aureus* encuentra en el medio intracelular induce la formación de variantes puntiformes (SCV) [142] las cuales se caracterizan por formar colonias pequeñas en agar, presentar un metabolismo lento y un fenotipo menos virulento. El estrés como el que puede representar la presencia de un antibiótico favorece su aparición [143]. Una de las características más importantes de las SCV es su capacidad de persistir intracelularmente en diversos tipos celulares, entre ellos los osteoblastos [144]. Recientemente se describió que utilizan como mecanismo de adaptación la transición entre un fenotipo virulento a otro no virulento lo cual les permite ocultarse en el interior de las células del hospedador utilizándolo como reservorio y contribuyendo al desarrollo de las infecciones crónicas [145]. La presencia de SCV en el interior

celular regula negativamente la respuesta inmune del huésped disminuyendo la secreción de quimioquinas como CXCL10, RANTES o CXCL-11 [146].

La ubicación intracelular de las variantes puntiformes constituye un problema para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* debido a que se ha descrito que a pesar que muchos antibióticos se acumulan intracelularmente, su actividad puede ser menor dentro de las células del huésped [147]. Más aún muchos compuestos antimicrobianos requieren que el patógeno se encuentre metabólicamente activo para tener efectividad por lo que el cambio de estas variantes al fenotipo de menor actividad metabólica puede ser responsable de la menor susceptibilidad al tratamiento [148]. Se ha descrito asimismo que bajas concentraciones de antibióticos como gentamicina, moxifloxacina y clindamicina pueden promover la formación de estas variantes *in vitro* [27], por lo que la selección de estos compuestos para el tratamiento de las infecciones crónicas debe ser investigado correctamente para excluir la posibilidad de que promuevan la formación de variantes puntiformes y por lo tanto la persistencia en el tejido del huésped.

1.3.5. La proteína A y su rol potencial en osteomielitis.

La proteína A (SpA) es una es una proteína de 42 kDa altamente conservada que está presente en la superficie de la gran mayoría de los aislamientos clínicos de *S. aureus*, se encuentra covalentemente unida a la pared celular por medio de su extremo carboxi-terminal (Figura 3). Además de su expresión en superficie, los aislamientos clínicos de *S. aureus* secretan cantidades significativas de SpA al medio extracelular [149] y se la encuentra formando parte de los componentes de las biopelículas [150]. En su forma secretada contiene el péptido de direccionamiento sin procesar por lo cual su tamaño es mayor (~65kDa). En su extremo amino-terminal presenta cinco dominios conservados (E, D, A, B, C) de 58 residuos, que se unen a la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG), seguidos de una región polimórfica, llamada Xr, que contiene un número variable, entre 1 y 22, de secuencias cortas repetitivas (SSR, del inglés: “*short sequence repeats*”) de 24 pb y la región Xc de anclaje a la pared celular [151–153].

Nuestro grupo de investigación ha identificado a la proteína A como un factor de virulencia crítico en la patogénesis de las infecciones pulmonares y sistémicas debido a su capacidad de activar la cascada de señalización de TNF- α en células epiteliales e inmunes [154–156]. A través de cada uno de sus dominios de unión a IgG la proteína A es capaz de interactuar con TNFR1 y activar los mecanismos de transducción de señales normalmente inducidos por TNF- α , el ligando natural de TNFR1 (Figura 3). La activación de TNFR1 por la proteína A induce la producción de citoquinas inflamatorias, quimioquinas y el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección mediante la activación de MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B [123,154,155,157,158]. Además de ser

reconocida por TNFR1 la proteína A es reconocida por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés “*epidermal growth factor receptor*”) en células epiteliales y macrófagos lo cual conduce a la activación de las MAPKs , erk1/2 y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Figura 3) [159].

El impacto de la expresión de la proteína A en la inducción de cascadas de señalización inflamatorias en diversos tipos celulares [154,156,158,159] la convierte en un factor que amerita ser estudiado en el contexto de las infecciones óseas por *S. aureus*.

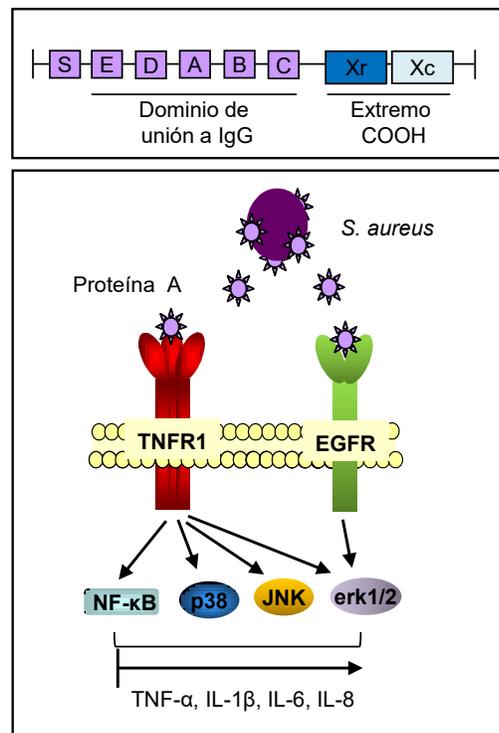


Figura 3. Estructura de la proteína A. (S): secuencia señal, (E-C): Región de unión a IgG, (X): COOH terminal, (Xr): SSRs, (Xc): Secuencia de anclaje a la pared celular. La proteína A activa la señalización a través de los receptores TNFR1 y EGFR induciendo citoquinas y quimioquinas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

2.1. HIPÓTESIS.

La proteína A de *S. aureus* contribuye significativamente a la inducción de cascadas de señalización pro-inflamatorias mediante su interacción con el receptor de TNF- α tipo 1, TNFR1 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR en múltiples tipos celulares. Ha sido propuesto que las cascadas de señalización inflamatorias jugarían un rol crítico en el desbalance del metabolismo óseo durante el desarrollo de osteomielitis. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que la acción temprana de la proteína A sobre las células presentes en el microambiente del hueso podría contribuir en forma significativa a la pérdida de masa ósea y el desarrollo de osteomielitis por *S. aureus*.

2.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

A fin de demostrar la hipótesis expuesta, el objetivo general del presente trabajo de investigación ha sido establecer el rol de la proteína A en la patogénesis de la osteomielitis por *S. aureus*. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos que fueron desarrollados mediante ensayos *in vitro* y estudios *in vivo*.

Objetivo 1. Determinar el rol de la proteína A de *S. aureus* en la diferenciación de osteoclastos y su función resorptiva.

Objetivo 2. Establecer la participación de las cascadas de señalización mediadas por los receptores TNFR1 y EGFR en la diferenciación y activación de osteoclastos inducida por *S. aureus* y la proteína A.

Objetivo 3. Determinar la contribución de la proteína A en el desarrollo de osteomielitis por *S. aureus* utilizando modelos experimentales *in vivo*.

Objetivo 4. Evaluar la potencialidad de la neutralización de la proteína A durante los estadios iniciales de la infección para prevenir la diferenciación de osteoclastos y la inducción de mediadores inflamatorios.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- PBS: 10 mM Na₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4.
- Buffer TBE 5X: Tris-Borato 0.45 M, EDTA 0.01 M, pH 8.
- Medio de cultivo Luria Bertani: Cloruro de sodio 5.0 g/l, Extracto de levadura 5.0 g/l, Triptona 10 g/l, pH 7.
- Medio de cultivo 2YT: Triptona 16 g/l, Extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.
- Buffer de siembra proteínas 6X: 375 mM Tris-HCl, 6% SDS, 48% glicerol, 9% 2-Mercaptoetanol, y 0.03% de azul de bromofenol, pH 6.8.
- Solución de tinción: azul brillante de Coomassie 1% en solución de Metanol 60%: Ácido acético 20%.
- Solución decolorante: Isopropanol 25%, Ácido acético 10%.
- Buffer de corrida 5X: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 0.1% SDS, pH 8.8.
- Buffer de siembra zimografía 5X: 0,25 M Tris-HCl, 5% SDS, 50% de glicerol, 50% sacarosa y 0.05% azul de bromofenol, pH 6.8.
- Solución de lavado I para zimografía: Tris-HCl 50 mM, Tritón 2.5%, Azida sódica 0.02%.
- Solución de lavado II para zimografía: Tris-HCl 50 mM, Tritón 2.5%, Azida sódica 0.02%, ZnCl₂ 1 µM, CaCl₂ 5 mM.
- Solución de incubación III para zimografía: Tris-HCl 50 mM, Azida sódica 0.02%, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM.
- Buffer de lisis de eritrocitos: NH₄Cl 0.5 M.
- Buffer citrato/acetato para ELISA: 0.1 M de acetato de sodio, 0.1M de ácido cítrico, pH 6.
- Buffer de lavado para ELISA: PBS, 0.05% Tween 20.
- Buffer de bloqueo para ELISA: 5 % albumina bovina (BSA) en PBS o 10% suero fetal bovino (SFB) en PBS.
- Sustrato de revelado para ELISA: 3,3', 5,5'-tretametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno.
- Solución de corte de reacción para ELISA: 2 N H₂SO₄.
- Solución Fisiológica: 0.9% NaCl.
- Ficoll-Triyosom.
- Dextrán 6%.
- Buffer MACs para purificación de monocitos humanos: EDTA 2mM, 0,5% de suero fetal bovino, PBS 1X.
- Medio α-MEM completo: α-MEM conteniendo 10% suero fetal bovino, Penicilina (100 U/ml), Estreptomina (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mM).
- Solución de tinción de TRAP para osteoclastos: Agua Rivero: 45 ml, Fast gained: fast GBC 0.5 ml + nitrito 0.5ml, Naftol: 0.5 ml, Acetato: 2ml, Tartrato: 1ml.

3.2. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Para los experimentos *in vitro*, *S. aureus* cepa FPR3757 y su correspondiente mutante isogénica SpA- (*S. aureus* que presenta deletado el gen de la proteína A) fueron gentilmente provistas por la Dra. Alice Prince (Columbia University, USA). Las cepas de *S. aureus* fueron crecidas en placas de agar tripteína de soja (TSA) a 37°C durante 16 horas y resuspendidas en medio α-MEM hasta una densidad óptica medida a 600 nm (DO₆₀₀) de 1. Los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm y el pellet fue resuspendido en medio α-MEM a una concentración

de 1×10^9 UFC/ml. Las diferentes cepas de *Lactococcus lactis* MG1363 portando el vector pKS80 conteniendo la proteína A (SpA) completa (*L. lactis* SpA) o un vector vacío (*L. lactis* VC) fueron proporcionadas por el Dr. Tim Foster (Trinity College, Dublín, Irlanda). *L. lactis* fue crecido en medio M17 con 0.5% glucosa y eritromicina (5 $\mu\text{g/ml}$) a 30°C sin agitación. Los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm y el pellet fue resuspendido en medio α -MEM a una concentración de 1×10^9 UFC/ml. Los inóculos bacterianos se inactivaron por calentamiento a 80°C durante 60 min. Este procedimiento no altera la interacción de la proteína A expuesta sobre la superficie con TNFR1 [158].

S. aureus cepa Newman y la mutante isogénica SpA⁻ (por la interrupción del gen *spa* carece de la expresión de la proteína A) fueron gentilmente provistas por el Dr. Tim Foster (Trinity College, Dublin, Irlanda). Las cepas mencionadas poseen el vector vacío pCU1 que posee resistencia a cloranfenicol. Para los experimentos *in vitro* con *S. aureus* cepa Newman y su correspondiente mutante isogénica SpA sin complementar, las cepas fueron crecidas en placas de TSA a 37°C durante 16 horas y resuspendidas en medio α -MEM hasta una densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) de 1. Los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm y el pellet fue resuspendido en medio α -MEM a una concentración de 1×10^9 UFC/ml.

Para los experimentos de complementación se incorporaron las secuencias codificantes de SpA y SpAL17A en el vector pCU1 y las cepas complementadas se denominaron SpA⁻(SpA) y SpA⁻(SpAL17A). Para estos experimentos, las cepas fueron crecidas en TSA con el agregado de cloranfenicol a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y el agregado de kanamicina a 50 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa SpA⁻, a 37°C durante 16 horas. Estos cultivos fueron utilizados para preparar cultivos frescos con una densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) de 0.05 en caldo tripteína de soja (TSB) (con el agregado de cloranfenicol a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$) los cuales fueron crecidos hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0.8$ a fin de favorecer la expresión de la proteína a partir del vector de expresión. Los cultivos fueron luego centrifugados durante 10 minutos a 10.000 rpm, se lavaron una vez con PBS y luego el pellet fue resuspendido en el mismo volumen de α -MEM para obtener un inóculo de 2×10^8 UFC/ml. Los inóculos bacterianos se inactivaron por calentamiento a 80°C durante 60 min. Se utilizó en este caso un inóculo menor dado que el crecimiento en medio líquido indujo un mayor potencial citotóxico para los cultivos.

Para los experimentos *in vivo*, *S. aureus* cepa FPR3757 tipo salvaje y la mutante isogénica SpA⁻ fueron crecidas en TSA a 37°C durante 16 horas. Estos cultivos fueron utilizados para preparar cultivos frescos con una densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 0.05 en medio TSB, los cuales fueron crecidos a 37°C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0.8$ dado que la expresión de SpA es máxima durante la fase exponencial media - tardía. Los cultivos

fueron luego centrifugados durante 10 minutos a 10.000 rpm, se lavaron una vez con PBS y luego el pellet fue resuspendido en PBS a razón de 1×10^9 UFC/ml.

Para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a GST, se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* transformada con el vector de expresión pGEX-KG conteniendo la proteína de interés la cual fue crecida en medio de cultivo 2YT conteniendo ampicilina (100 µg/ml).

3.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Se indujo la expresión de las proteínas recombinantes y luego se procedió a su purificación, determinación de la integridad proteica y grado de pureza y a la cuantificación de las mismas para su posterior utilización en ensayos *in vitro*. Se utilizaron las siguientes proteínas recombinantes:

GST: Glutación-S-transferasa.

GST-SpA: proteína A completa fusionada a GST.

GST-D: dominio D de la región de unión a IgG de la proteína A fusionada a GST.

GST-DL17A: dominio D de la proteína A con la leucina 17 mutada fusionada a GST.

La utilización del dominio D de la proteína A como inductor de señalización inflamatoria es equivalente al uso de la proteína A completa [158].

3.3.1. Expresión de proteínas recombinantes.

Con el objeto de expresar las distintas proteínas, se utilizó *E.coli* BL21 transformada con el vector de expresión pGEX-KG que contiene clonado como proteína de fusión a GST (dominio glutación-S-transferasa), el dominio D, dominio DL17A y el gen completo de la proteína A de *S. aureus* proveniente de la cepa Newman. Este vector posee un promotor inducible por IPTG (del inglés “*isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*”) y todo lo necesario para su mantenimiento y amplificación (gen de resistencia a ampicilina y origen de replicación) en esta cepa.

- Utilizar una colonia de *E.coli* BL21 conteniendo el plásmido deseado (pGEX-KG, pGEX-KG: SpA, pGEX-KG: D, pGEX-KG: DL17A) para crecer un cultivo madre en medio 2YT con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml a 37° C, con agitación a 200 rpm toda la noche (ON).
- A partir del cultivo ON, crecer un cultivo en medio 2YT con ampicilina (100 µg/ml) hasta una densidad óptica de 0.5 (medida a 600 nm), a 37° C con agitación a 200 rpm.
- Agregar IPTG a una concentración final de 1 mM, para inducir en el cultivo la expresión de la proteína de fusión y continuar con el cultivo a temperatura ambiente con agitación a 200 rpm ON.

- Centrifugar el cultivo durante 10 minutos a 10.000 rpm y resuspender el pellet bacteriano en PBS 1X frío.
- Agregar lisozima a una concentración final 100 µg/ml y ADNasa a una concentración final 10 µg/ml e incubar a 37° C por 5 minutos, para permitir la ruptura de la pared bacteriana y la posterior degradación del ADN cromosomal y plasmídico bacteriano.
- Lisar las bacterias mediante sonicación, utilizando pulsos de 10 segundos y 10 segundos de descanso por 2 minutos con una potencia de 30 amperios.
- Posteriormente centrifugar el lisado a 4°C durante 10 minutos a velocidad máxima (13000 rpm) para permitir separar el debris celular (*pellet*) del lisado proteico (sobrenadante). Conservar el sobrenadante a -80°C hasta su utilización.

3.3.2. Purificación de proteínas de fusión a GST.

Se siguió el protocolo de columnas de afinidad Glutación Sefarosa (Amersham) que permite purificar las proteínas recombinantes de las restantes proteínas bacterianas debido a la afinidad del tag GST con la Glutación Sefarosa presente en la resina de la columna.

- Lavar la resina con PBS 1X y centrifugar 1 minuto a 735 x g a 4° C.
- Incubar el lisado proteico con la resina por 15 minutos a temperatura ambiente con rotación constante para permitir la interacción y unión específica de las proteínas.
- Centrifugar 1 minuto a 735 x g a 4° C, para permitir separar las proteínas no unidas a la resina.
- Lavar 2 veces con PBS 1X.
- Agregar buffer de elución conteniendo glutatión reducido e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente con rotación constante, para permitir la separación de las proteínas recombinantes de la resina.
- Centrifugar 1 minuto a 735 x g a 4° C para permitir la elución de las proteínas recombinantes.
- Dializar contra 300 volúmenes de PBS 1X con agitación a 4° C toda la noche.
- Conservar el extracto proteico a -80° C.

3.3.3. Decontaminación de las proteínas.

A fin de eliminar trazas de lipopolisacárido bacteriano (LPS) presentes en el extracto proteico obtenido anteriormente se siguió el protocolo de columnas de polimixina B (Detoxi-Gel Endotoxina, Pierce). La polimixina B posee la capacidad de unirse a la porción del lípido A del polisacárido bacteriano. A continuación se detalla el protocolo seguido.

- Lavar la columna con 5 volúmenes (5 ml) de 1% deoxicolato de sodio (detergente) para regenerar la resina.
- Lavar con 5 volúmenes de agua, para remover el detergente.
- Equilibrar la resina Detoxi-Gel con 5 volúmenes de PBS 1X y permitir su elución.
- Aplicar en la columna 1 ml del extracto proteico e incubar la muestra por 1 hora a temperatura ambiente, para permitir la unión del LPS a la polimixina B
- Colectar el eluido (1 ml) por agregado de 1 ml PBS 1X.
- Las proteínas obtenidas se conservaron a -80°C hasta su utilización en los ensayos *in vitro*.

3.3.4. Determinación del grado de pureza e integridad de las proteínas purificadas.

Una alícuota de las proteínas obtenidas se analizó en un gel de poliacrilamida desnaturizante (concentrador de 5% y separador 8%) (Tabla 1 y 2) con el fin de corroborar la integridad y pureza de las mismas (Tabla 3).

Tabla 1: Reactivos y volúmenes en ml para la preparación del gel SDS-PAGE 5%.

Gel Concentrador 5%	Vol (ml)
Agua	2.1
Acrilamida/bisAcrilamida 30%	0.5
Tris 1M (pH:6,8)	0.380
SDS 10%	0.03
Persulfato de amonio 10%	0.03
TEMED	0.003
Volumen final	3

Tabla 2: Reactivos y volúmenes en ml para la preparación del gel SDS-PAGE 8%.

Gel Concentrador 8%	Vol (ml)
Agua	4.6
Acrilamida/bisAcrilamida 30%	2.7
Tris 1M (pH:6,8)	2.5
SDS 10%	0.1
Persulfato de amonio 10%	0.1
TEMED	0.006
Volumen final	10

Tabla 3: Peso molecular esperado para cada proteína recombinante y para el tag GST.

Proteína Recombinante	Peso Molecular Esperado (Da)
GST	28429
GST-SpA	81002
GST-D	30732
GST-L17A	30732

La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo un método descrito previamente para geles discontinuos conteniendo SDS [160] a 30 mA por gel, a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos en buffer de corrida frío.

Se procedió a la coloración del gel con solución de tinción durante 1 hora con agitación constante y luego se incubó en solución decolorante con agitación ON. En cada corrida electroforética se utilizó un marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific), que permitió estimar el peso molecular de las proteínas de interés mediante una curva de calibración (peso molecular en función del logaritmo de la distancia recorrida en el gel).

3.3.5. Cuantificación de las proteínas aisladas.

- Utilizar el método de Bradford para realizar la cuantificación.
- Realizar una curva patrón con diluciones seriadas al medio de albúmina bovina (BSA) con una concentración máxima de 25 µg/µl y hasta una concentración mínima de 0.39 µg/µl.
- Utilizar una dilución 1:500 de las muestras proteicas.
- Colocar en una placa de 96 pocillos 40 µl del reactivo de Bradford y luego agregar 160 µl de las muestras en dilución 1:500 ó de BSA y mezclar por resuspensión con pipeta.
- Realizar la lectura a 595 nm.
- Por extrapolación en la curva de calibración determinar la concentración de las muestras estudiadas. En el caso que la absorbancia de las muestras se encuentre fuera de los límites de la curva, realizar nuevas diluciones para obtener un resultado certero.

3.4. CÉLULAS Y MEDIOS DE CULTIVO CELULAR.

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron cultivos primarios de médula ósea de ratón y monocitos humanos purificados de sangre periférica de donadores sanos. Las células se cultivaron en medio α -MEM completo y se sembraron en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/pocillo (células de médula ósea) ó 2.5×10^5 células/pocillo (monocitos).

3.4.1. Obtención de precursores de osteoclastos de origen murino.

Los precursores de osteoclastos se diferenciaron a partir de células de medula ósea de ratones BALB/c, C57BL/6 o ratones deficientes en la expresión del receptor de TNF- α tipo 1, TNFR1 (*tnfr1*^{-/-}) según el siguiente protocolo:

- Extraer el fémur y retirar con bisturi la piel del mismo.
- Colocarlo en EtOH 70% durante 2 min.
- Cortar las epífisis y eluir la médula con 10 ml de medio α -MEM.
- Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de buffer de lisis de eritrocitos para lisar los glóbulos rojos y completar el volumen con medio α -MEM.
- Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en 5ml de medio α -MEM completo.
- Homogenizar y tomar alícuota para recuento celular y determinar viabilidad celular con azul tripán (verificar que la viabilidad sea mayor al 95 % en todos los casos).
- Estimular las células con M-CSF (30 ng/ml) durante 3 días para inducir la diferenciación a pre-osteoclastos.

3.4.2. Obtención de precursores de osteoclastos de origen humano.

Los precursores de osteoclastos se diferenciaron a partir de monocitos obtenidos de sangre periférica de donadores sanos mediante la técnica de separación por gradiente de densidad en Ficoll-Triyosom y posterior purificación con perlas magnéticas según el siguiente protocolo:

- Diluir la sangre al medio con solución fisiológica y sembrar sobre Ficoll-Triyosom en una relación de sangre diluída: Ficoll 2:1 (15ml de sangre llevarlos a 30ml con solución fisiológica y sembrar sobre 15ml de Ficoll). Centrifugar durante 25 minutos a 480 x *g* con aceleración suave y sin freno a 22°C.
- Descartar el suero y el Ficoll con pipeta pasteur, dejando sólo una película de líquido sobre el pellet de células polimorfonucleares y eritrocitos.
- Trasvasar el halo de células mononucleares a un tubo limpio y agregar 50 ml de solución fisiológica, centrifugar durante 10 minutos a 483 x *g*, descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de α -MEM 10% suero fetal bovino.
- Tomar una alícuota para recuento celular (trabajar con una cantidad celular igual o menor a 100 x 10⁶ células) y para determinar el porcentaje de neutrófilos contaminantes (el porcentaje tiene que ser igual o menor al 3%).

- Centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm. Descartar sobrenadante, romper el pellet suavemente y resuspender en 900 μ l de Buffer MACs. Trabajar en frío.
- Agregar 20 μ l de las perlas magnéticas, marcadas con anticuerpo anti-CD14 por cada 10^7 células totales. Mezclar e incubar 15 minutos en hielo y al resguardo de la luz.
- Agregar 6 ml de Buffer MACs y centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1ml de Buffer MACs. Dejar en hielo.
- Colocar la columna en el imán y agregarle 1 ml de Buffer MACs para su activación. Colocar un tubo estéril debajo de la columna para recoger las células no marcadas como los linfocitos.
- Agregar de a 500 μ l de la solución de células mononucleares marcadas con anticuerpo anti-CD14. (Nunca dejar que se seque la columna, ir agregando de 500 μ l de la solución hasta pasar todo el volumen de células).
- A continuación lavar la columna con las células 4 veces con 500 μ l de Buffer MACs.
- Retirar la columna del imán apoyándola en un tubo estéril nuevo, agregar 1 ml de Buffer MACs a la columna, colocar el émbolo y presionar hasta eluir el contenido de la columna. Pasar el volumen de células a un tubo estéril, agregarles 10 ml de Buffer MACs para lavar.
- Homogenizar y tomar alícuota para recuento celular y para control de purificación por citometría de flujo (marcar una alícuota de los monocitos purificados con anti-CD14 PE).
- Centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm y resuspender en 5ml de medio α -MEM completo.
- Homogenizar y tomar alícuota para recuento celular y determinar viabilidad celular con azul tripán (verificar que sea mayor al 95 % en todos los casos).
- Estimular las células con M-CSF (30 ng/ml) durante 3 días para inducir la diferenciación a pre-osteoclastos.

3.5. ENSAYOS DE OSTEOCLASTOGÉNESIS *IN VITRO*.

Los pre-osteoclastos fueron cultivados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con los siguientes estímulos:

- **Cepas bacterianas:** *S. aureus* cepa USA 300 FPR3757 y su correspondiente mutante isogénica SpA-, *S. aureus* cepa Newman y su correspondiente mutante isogénica SpA- sin complementar, *L. lactis* SpA y *L. lactis* VC a una concentración de 1×10^8 UFC/ml. Para los ensayos de complementación *S. aureus* cepa Newman, su correspondiente mutante isogénica SpA- y; las correspondientes cepas complementadas SpA-(SpA) y SpA-(SpAL17A) a una concentración de 1×10^7 UFC/ml.

- **Proteínas recombinantes:** GST-SpA, GST-D, GST-L17A se utilizaron a una concentración final de 0.5 nM. GST (0.5 nM) se utilizó como control negativo. RANKL (50 ng/ml) y TNF- α (10 μ g/ml) se utilizaron como controles positivos.
- **Anticuerpos neutralizantes:** Se utilizó un anticuerpo neutralizante anti-TNF- α (TN3-19.12 BD Biosciences, 10 μ g/ml) y un anticuerpo neutralizante anti-proteína A (Sigma P3775, 500 μ g/ml).

El medio y los aditivos fueron reemplazados cada 2-3 días. A los 9 días luego de la estimulación se determinó la diferenciación en células multinucleadas (más de 3 núcleos) positivas para la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) por microscopía.

3.6. ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD.

Células provenientes de medula ósea de ratones C57BL/6 o ratones *tnfr1^{-/-}* fueron sembradas en placas de dentina de 96 pocillos (BD BioCoat Osteologic, BD Biosciences, 2 x10⁵ células/pocillo en 0.2 ml de medio) y diferenciadas a precursores de osteoclastos como se describe previamente. Luego fueron estimuladas con *S. aureus* o *L. lactis* en presencia de M-CSF (30 ng/ml) por 9 días. El medio y los aditivos fueron reemplazados diariamente. Los discos de dentina se lavaron con NH₄OH 1 M para remover las células adherentes y las lagunas de reabsorción se visualizaron por microscopía óptica.

3.7. MODELO DE OSTEOMIELITIS EXPERIMENTAL.

Se utilizaron modelos de osteomielitis experimental previamente descritos [161,162]. El cuidado de los animales fue de acuerdo con el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de la Universidad de Buenos Aires y directrices internacionalmente aceptadas (CICUAL 2361-11). Se utilizaron ratones BALB/c o C57BL/6 (10 semanas de edad) así como ratas Wistar (7 semanas de edad) los cuales fueron inoculados intramedularmente en la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1x10⁶ UFC de *S. aureus* FPR3757, la correspondiente mutante SpA- o PBS como control. Para ello, se realizó un orificio en la parte central de la tibia con una mecha de 0.5 mm de diámetro mediante un torno eléctrico y se inoculó la suspensión bacteriana resuspendida en Tissucol (Baxter Argentina, Buenos Aires) (5 μ l en la rata; 2.5 μ l en el ratón). Finalmente se suturó la piel y se dejó que la infección evolucione a distintos tiempos. A las 48 horas o 14 días (modelo de infección murino) o a las 96 horas, 10 y 15 semanas (modelo de infección en rata) luego del desafío los animales fueron sacrificados con CO₂ y las tibias fueron extraídas. Se realizaron las determinaciones que se detallan más adelante a los tiempos especificados.

En determinados experimentos los ratones fueron inmunizados pasivamente por ruta intraperitoneal con un anticuerpo policlonal neutralizante contra la proteína A (Sigma P3775, 75 mg/kg) o con suero normal de conejo (SNC, control) veinticuatro horas previas al desafío intramedular y en determinados grupos a los 6 días luego del desafío.

3.7.1. Determinación de la carga bacteriana del hueso.

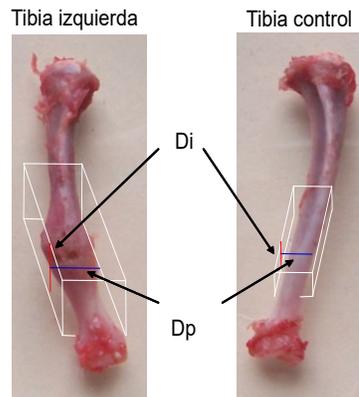
Se evaluó el desarrollo de la infección ósea mediante recuentos bacteriológicos. Ambas epífisis fueron removidas de las tibias infectadas y se homogeneizaron en un mortero estéril con 1 ml (modelo murino) ó 2 ml (modelo en rata) de PBS estéril. Se determinó el número de Unidades formadoras de Colonia (UFC) en los homogenatos realizando diluciones seriadas del macerado y sembrando en placas de TSA. Para la determinación de variantes puntiformes la siembra se realizó en placas de agar sangre de manera de poder identificar su formación mediante su capacidad hemolítica después de 48 horas de incubación a 37°C.

3.7.2. Análisis por Micro-tomografía computada (micro-CT).

El análisis de la destrucción del hueso cortical y la nueva formación ósea fue realizado mediante imágenes de micro-CT en las tibias de los ratones desafiados. Las mismas fueron adquiridas con un mCT50 (Scanco Medical) y analizadas con su respectivo software como se describió previamente [161]. Para el análisis de la destrucción ósea cortical se seleccionó un volumen de interés (VDI) que incluyó solamente el hueso cortical original y cualquier destrucción, dibujando contornos que incluyeron la superficie del periostio y excluyeron la superficie del endostio. El volumen de la destrucción ósea cortical fue determinado por segmentación de la imagen con un umbral inferior de 0 y superior de 595 mg HA/ccm, sigma 1.3 y soporte 1, para excluir al hueso en el análisis. Para las mediciones del volumen de nueva formación ósea se dibujó un contorno que incluyó el perímetro externo del hueso y excluyó la superficie del periostio preexistente. El hueso fue segmentado desde tejidos no mineralizados en el VDI con un umbral inferior de 400 mg HA/ccm, sigma 1.3, y soporte 2.

3.7.3. Determinación del índice osteomielítico.

Se cuantificaron los cambios morfológicos de las tibias infectadas mediante la determinación morfométrica del diámetro del hueso en el punto de inoculación al cual se lo denominó índice osteomielítico (I.O.). Para ello se realizaron las siguientes mediciones: a) la distancia entre el punto de inoculación y el extremo distal de la tibia izquierda (D); b) el diámetro de la tibia izquierda, es decir la elevación del periostio (di) y el diámetro en el plano perpendicular (dp) en el sitio de inoculación (experimental); c) di y dp se miden en la tibia derecha (no infectada, control) de la misma rata a la distancia D. El I.O. fue calculado según la siguiente fórmula $IO = [dp + di]_{infectada} - [dp + di]_{control}$.



3.7.4. Análisis histopatológicos.

Se analizaron los cambios histopatológicos mediante la tinción de cortes de tibias con Hematoxilina-Eosina y se determinó la presencia de osteoclastos en cortes de tejido mediante la reacción enzimática de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).

3.7.5. Ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo*.

Las tibias de los ratones infectados fueron removidas a las 48 horas luego del desafío y se obtuvieron las células de medula ósea como se describió anteriormente. Las células fueron eluidas con 10 ml de α -MEM. Una alícuota del eluido se destinó para el recuento bacteriológico de la tibia infectada, el resto se utilizó para obtener los precursores de osteoclastos. El hueso remanente fue homogeneizado en un mortero estéril con 500 μ l de PBS estéril. Se determinó el número de UFC en los eluidos y en los homogenatos realizando siembra directa en placas de TSA. En experimentos preliminares se determinó que las diferencias en las UFC obtenidas entre los diferentes grupos experimentales fueron comparables al evaluar los eluidos y los homogenatos. Por ello, en los ensayos *ex vivo* se evaluó la carga bacteriana en hueso mediante el recuento de las UFC en el eluido de médula.

Los células de medula ósea de los diferentes grupos de ratones (inoculados con *S. aureus*, la mutante SpA o PBS) fueron cultivadas *in vitro* con M-CSF (30 ng/ml) y utilizadas como precursores de osteoclastos. Las células fueron luego estimuladas con RANKL (50 ng/ml) en presencia de M-CSF (30 ng/ml) durante 5 días. Se determinó la diferenciación en células multinucleadas (más de 3 núcleos) positivas para la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) por microscopía.

3.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GELATINOLITICA POR ZIMOGRFÍA.

La actividad gelatinolítica de los sobrenadantes de las células estimuladas *in vitro* y de los homogenatos de las tibias infectadas fue evaluada mediante el método de Hibbs y col.[163]. Brevemente, 20 µl de medio condicionado mezclado con 5 µl de buffer de siembra fueron sembrados en cada calle de un gel de SDS-PAGE al 10% conteniendo 1 mg de gelatina (Sigma-Aldrich)/ml. Luego de la electroforesis, los geles fueron lavados con las soluciones I y II durante 45 min y se dejaron incubando en la solución III durante 48 horas a 37°C. Este paso de desnaturalización/renaturalización promueve la actividad de MMP sin el clivaje proteolítico de la pro-MMPs. La actividad gelatinolítica fue visualizada mediante la tinción de los geles con Azul de Coomassie. Las bandas sin teñir indicaron la presencia de actividad gelatinolítica, y su posición determinó el peso molecular de las enzimas involucradas.

3.9. TINCION DE LA FOSFATASA ACIDA TARTRATO RESISTENTE (TRAP).

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS y teñidas utilizando un kit comercial (TRAP staining kit, Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se siguió el siguiente protocolo:

- Lavar con 400 µl de PBS 1X o solución fisiológica.
- Adicionar 250 µl de solución de tinción.
- Incubar 1 hora en baño de agua a 37°C.
- Lavar con 400 µl de PBS 1X.
- Teñir con 200 µl de hematoxilina durante 5 minutos.
- Lavar con agua corriente con cuidado.
- Montar los portaobjetos con 5 µl de solución de montaje (1:9 glicerol-PBS).
- Cuantificar por microscopia el número de osteoclastos, definidos como células multinucleadas (más de 3 núcleos) positivas para la fosfatasa acida tartrato resistente (TRAP).

3.10. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE ARNm.

Para cuantificar los niveles de ARNm se realizaron las extracciones de ARN total de las muestras de interés, se llevaron a cabo las reacciones de retro-transcripción (RT) y finalmente la PCR en tiempo real.

3.10.1. Extracción y cuantificación de ARN total.

Se siguió el protocolo de extracción de ARN del reactivo TRIzol (Invitrogen). Este reactivo contiene una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que permiten la ruptura celular, la disgregación de los componentes celulares y la protección del ARN para evitar su degradación.

- Lisar las células con el reactivo TRIzol pasando las suspensiones celulares varias veces a través de la pipeta.
- Incubar las muestras 5 minutos a temperatura ambiente para completar la disgregación.
- Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml TRIzol utilizado inicialmente.
- Agitar vigorosamente los tubos por 15 segundos e incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 15 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C , para permitir la separación de la fase orgánica-interfase, de la fase acuosa conteniendo el ARN.
- Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf estéril (se recupera aproximadamente 60% del volumen de TRIzol utilizado inicialmente).
- Precipitar el ARN con 0.5 ml alcohol isopropílico por cada ml TRIzol utilizado inicialmente, mezclar por inversión hasta obtener una única fase.
- Incubar las muestras durante toda la noche a -20°C .
- Centrifugar las muestras durante 10 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C .
- Lavar el pellet con 1 ml de etanol 75% por cada ml de TRIzol utilizado inicialmente.
- Centrifugar durante 5 minutos a $7500 \times g$ a 4°C .
- Dejar secar los pellets de ARN a temperatura ambiente por el tiempo necesario.
- Resuspender el ARN en 26 μl de agua libre de ARNasa e incubar 10 minutos a 60°C para favorecer la solubilidad en agua. Mezclar las muestras pasando a través de la pipeta varias veces.
- Agregar 3 μl de buffer 10X para ADNasa y 1 μl de ADNasa (Promega), e incubar 30 minutos a 37°C .
- Finalmente agregar 3 μl de solución Stop (Promega) e incubar 10 minutos a 65°C .
- Cuantificar el ARN total obtenido midiendo la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos). A fin de determinar el grado de pureza, medir la absorbancia a 280 nm (proteínas). Considerar que la purificación es óptima si la relación $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ resulta entre 1.8 y 2.
- Determinar la concentración de ARN en las muestras mediante la siguiente relación: $\text{Abs}_{260\text{nm}}=1$ equivale a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN.

3.10.2. Extracción y cuantificación de ADN genómico total.

A partir de la fase orgánica-interfase del protocolo anterior se obtuvo ADN genómico el cual fue utilizado como control positivo en las reacciones de PCR.

Precipitación del ADN:

- Precipitar el ADN con 0.3 ml de etanol 100% por cada ml de reactivo TRIzol utilizado inicialmente y mezclar por inversión.
- Incubar las muestras 3 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugar durante 5 minutos a 2000 x g a 4°C para sedimentar el ADN.
- Lavar dos veces el pellet con 1ml de una solución 0.1 M de citrato de sodio en 10% de etanol por cada ml de reactivo TRIzol utilizado inicialmente e incubar 30 minutos a temperatura ambiente (mezclando periódicamente).
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 x g a 4°C.
- Resuspender el pellet de ADN en 2 ml de etanol 75% por cada ml de reactivo TRIzol utilizado inicialmente.
- Incubar 20 minutos a temperatura ambiente mezclando periódicamente.
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 x g a 4°C.
- Dejar secar el *pellet* de ADN.
- Resuspender el ADN en 600 µl de una solución 8 mM de NaOH.
- Llevar a pH 8.4 con 86 µl de una solución HEPES 0.1 M por cada ml de NaOH utilizado en el paso anterior.
- Centrifugar durante 10 minutos a 12.000 x g, para remover el material insoluble.
- Cuantificar el ADN total obtenido midiendo la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos). A fin de determinar el grado de pureza, medir la absorbancia a 280 nm (proteínas). Considerar que la purificación fue óptima si la relación Abs260nm/Abs280nm resulta entre 1.8 y 2.
- Determinar la concentración de las muestras mediante la siguiente relación: Abs260nm=1 equivale a 50 µg/ml de ADN.

3.10.3. Preparación de ADNc a partir del ARN total.

Las reacciones de retrotranscripción (RT) se realizaron a partir de 1µg de ARN utilizando la enzima RT (ImProm-II, *Reverse Transcriptase*, Promega) y hexámeros de primers. La reacción consiste de dos etapas:

Etapas 1 (RT1): unión de los cebadores al templado. Se utiliza 1 µl de la solución de *random primers* (hexámeros de secuencias aleatorias) a 1mg/ml; 1 µg de ARN de concentración conocida y la

cantidad de agua libre de ARNasas para completar 5 µl. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5 min y se conservó en hielo por 5 min.

Etapa 2 (RT2): se preparó una pre-mezcla de los reactivos componentes de la reacción (ver tabla 4) y a 15 µl de la misma se le agregaron los 5 µl de la reacción RT1: Y se procedió con el siguiente programa: 25° C por 5 min, seguidos de 60 min a 42° C y finalmente una incubación a 70° C por 15 min.

Tabla 4: Reactivos y volúmenes necesarios para la RT etapa 2.

Pre-mezcla para la RT	
Reactivo-Concentración Inicial	Reactivo-Concentración Final
Agua	Cantidad necesaria
5X Buffer	1X
25mM MgCl ₂	3 mM
10mM dNTPs	0.5 mM
40 U/µl ARNsin	1U
RT	1U
Volumen final 15µl	

Las muestras de ADNc obtenidas fueron conservadas a -20°C hasta ser procesadas. Estos ADNc fueron testeados mediante PCR del gen GAPDH de ratón. Se utilizó 2 µl de ADNc por reacción y agua como control negativo.

Tabla 5: Reactivos y volúmenes necesarios para la PCR de GAPDH de ratón.

Mezcla para la PCR de GAPDH	
Reactivo-Concentración Inicial	Reactivo-Concentración Final
Agua	Cantidad necesaria
5X PCR Buffer	1X
10mM dNTPs	0.5 mM
25mM MgCl ₂	1.5 mM
25 µM Cebador GAPDH Fw	0.5 µM
25 µM Cebador GAPDH Rv	0.5 µM
Go Taq 5U/ µl	1U
Volumen final 18µl	

Tabla 6: Programa utilizado para la realización de la PCR GAPDH en el termociclador. Las etapas 2 a 5 se repiten por 35 ciclos.

Programa GAPDH		
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5min. Desnaturalización inicial del ADN
2	95	30seg. Desnaturalización del ADN
3	60	45 seg. unión de los cebadores
4	72	45 seg. Síntesis de ADN
5	72	10 min. Elongación de cadenas de ADN
6	4	Mantenimiento

Alícuotas de cada reacción de PCR (10 µl) fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% en TBE conteniendo 0.3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). La corrida se realizó en buffer TBE a 80-90 V. Se corrió en paralelo el marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos) que permitió determinar el tamaño de cada fragmento amplificado. Tamaño del producto esperado para GAPDH: 111 pb (utilizando los cebadores indicados en la Tabla 10).

3.10.4. PCR de tiempo real.

La PCR de tiempo real permite visualizar el progreso de la reacción y al mismo tiempo cuantificar el producto de amplificación debido a que en la mezcla de reacción se encuentra incluido el reactivo EvaGreen® (Solis Biodyne) que es capaz de fluorecer cuando se une a ADN doble cadena. La fluorescencia se incrementa en cada ciclo debido a que se acumula el producto de amplificación de PCR. Durante la reacción se determina el número de ciclo al cual se incrementa la fluorescencia en forma exponencial. El punto en la curva al cual la fluorescencia cruza el umbral se lo denomina CT y este valor se comporta inversamente proporcional a la concentración de ARNm en la muestra. Para corroborar que la amplificación fue específica, se realiza una curva de disociación, donde cada par de cebadores y cada producto de amplificación, posee un valor particular de temperatura de disociación (Td). Esta curva permite visualizar dímeros de cebadores, los cuales presentaran un Td menor al producto de amplificación esperado ya que son fragmentos de menor cantidad de pb, así como también se pueden visualizar fragmentos de ADN contaminantes.

Para los genes a analizar se realizó una curva de calibración utilizando como templado ADN genómico. Se realizaron diluciones seriadas del ADN al décimo, partiendo de una concentración máxima de 150 ng/µl hasta una dilución 1/10000 equivalente a 15 pg/µl. Se realizó la reacción de PCR de tiempo real, utilizando 2 µl de ADN genómico o las diluciones en 18 µl de mezcla. Se graficó en escala logarítmica el valor de CT promedio obtenido para cada dilución en función de la dilución,

obteniéndose una recta que permite extrapolar a partir del valor de CT la masa relativa de este gen en cada muestra.

A continuación se muestran los reactivos y volúmenes necesarios (Tabla 7) y el programa de ciclado para la realización de la PCR de tiempo real de GAPDH, Catepsina K y RANK (Tablas 8 y 9).

Tabla 7: Reactivos y volúmenes necesarios para la PCR de tiempo real de GAPDH, Catepsina K y RANK.

Mezcla para la PCR de tiempo real	
Reactivo - Concentración Inicial	Reactivo - Concentración Final
Agua	Cantidad necesaria
5X Mezcla de PCR de tiempo real	1X
25 μ M Cebador Fw	0.25 μ M
25 μ M Cebador Rev	0.25 μ M
Volumen final 18μl	

Tabla 8: Programa utilizado para la realización de la PCR de tiempo real para todos los genes medidos.

Programa de PCR de tiempo real	
Temperatura (°C)	Tiempo
95	15 min. Desnaturalización inicial del ADN
95	15 seg. Desnaturalización del ADN
Tu correspondiente	30 seg. Unión de los cebadores
72	60 seg. Síntesis de ADN, al final de este tiempo se mide la fluorescencia

Tabla 9: Temperaturas de unión (Tu) utilizadas para la PCR de tiempo real para los distintos genes medidos.

Cebadores	Tu(°C)
GAPDH	60
Catepsina K	50
RANK	58

Para cada muestra se calculó el CT promedio obtenido en la PCR de tiempo real para GAPDH y se extrapoló este valor en su correspondiente curva de calibración, obteniéndose la masa relativa promedio de este gen. Para determinar los niveles de ARNm de CK y RANK se calculó la masa relativa en función del CT obtenido en cada muestra y luego se relativizó cada una a su correspondiente valor de masa relativa promedio de GAPDH (CK/GAPDH y RANK/GAPDH).

Tabla 10: Secuencia de cebadores utilizados para PCR y PCR de tiempo real.

Gen	Secuencia del cebador
RANK	Fw:5'-TGTGGTCTGCAGCTCTTCCA-3'
	Rv:5'-CGAAGATGATGGCAGCCACTA-3'
Catepsina K	Fw:5'-GAGGGCCAACTCAAGAAGAA-3'
	Rv:5'-GCCGTGGCGTTATACATACA-3'
GAPDH	Fw:5'-GAAGGTGGTGAAGCAGGCAT-3'
	Rv:5'-TCGAAGGTGGAAGAGTGGGA-3'

3.11. ELISA.

Los sobrenadantes provenientes de células sembradas en placas de 24 pocillos y estimuladas con proteína recombinante y estímulo bacteriano, se utilizaron para determinar la presencia de IL-6, TNF- α , IL-1 β y MMP-9 mediante la técnica de ELISA (BD Biosciences y R&D System). Los sobrenadantes de lesiones de ratones desafiados por inoculación intramedular, se utilizaron para determinar la presencia de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 e INF- γ mediante la técnica de ELISA (BD Biosciences y R&D System). En todos los casos se utilizó el siguiente protocolo:

- Cubrir cada uno de los pocillos con 50 μ l del anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal anti-IL-6, anti-IL-1 β , anti-TNF- α , anti-MMP-9, anti-IL10 y anti-INF- γ de ratón). Sellar la placa e incubar a 4°C ON.
- Descartar el líquido de cada pocillo y lavar tres veces con 100 μ l de buffer de lavado. Después de cada lavado invertir la placa y secar sobre papel absorbente para remover el buffer de lavado residual.
- Bloquear la placa con 100 μ l de buffer de bloqueo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Descartar el líquido y lavar tres veces como en el paso 2.
- Preparar diluciones del estándar y las muestras en buffer de bloqueo.
- Agregar 50 μ l de cada estándar y de las muestras e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
- Descartar el líquido y lavar cinco veces como en el paso 2.
- Agregar 50 μ l del anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal anti-IL-6, anti-IL-1 β , anti-TNF- α , anti-MMP-9, anti-IL-10 y anti-INF- γ de ratón biotinilados) en cada pocillo.
- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Descartar el líquido y lavar cinco veces como en el paso 2.
- Agregar 50 μ l de streptavidina-HRP (streptavidina conjugada a peroxidasa) en cada pocillo. Cubrir la placa e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

- Descartar el líquido y lavar siete veces como en el paso 2. Solo que esta vez en cada lavado incubar 30-60 segundos.
- Agregar 50 μ l de la solución sustrato (tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno en cada pocillo. Incubar la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Agregar 25 μ l de la solución corte (H_2SO_4 2N) en cada pocillo.
- Leer la absorbancia a 450 nm dentro de los 30 minutos de agregada la solución de corte.

3.12. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.

Los datos provenientes de muestras con distribución normal fueron analizados mediante el Test *t* de Student. Las comparaciones estadísticas de las UFC recuperadas en hueso e I.O. en los diferentes grupos experimentales (sin distribución normal) se realizaron con el test de Mann-Whitney. Para el análisis de los niveles de citoquinas en los homogenatos de hueso, donde los niveles basales de cada ratón fueron comparados con los valores alcanzados luego del desafío; se utilizaron pruebas no paramétricas Wilcoxon. Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron con el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Los análisis se realizaron con el programa Prism 4.0 (GraphPad).

4. RESULTADOS.

4.1. LA PROTEÍNA A DE *S. aureus* INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE OSTEOCLASTOS Y MODULA SU FUNCIÓN RESORTIVA.

4.1.1. La proteína A de *S. aureus* induce osteoclastogénesis.

En una primera etapa de la investigación, se determinó la capacidad de la proteína A de *S. aureus* de inducir la diferenciación de osteoclastos. Para ello, células provenientes de médula ósea de ratón fueron diferenciadas a pre-osteoclastos mediante el cultivo *in vitro* con factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (30 ng/ml) durante 3 días y luego fueron estimuladas en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con proteína A purificada como proteína de fusión a GST (GST-SpA) por 9 días. La presencia de osteoclastos fue determinada mediante la detección de células multinucleadas que expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Se observó un aumento significativo en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta al estímulo con proteína A en comparación con los observados a partir de células estimuladas con GST o sin estimular como control (Figura 4).

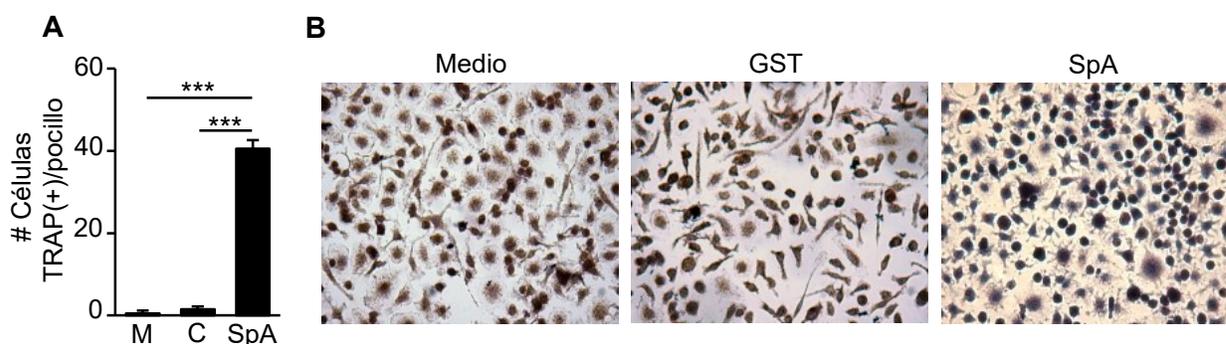


Figura 4. Osteoclastogénesis inducida por la proteína A de *S. aureus*. (A) Precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con proteína A purificada (SpA, 0.5 nM) o GST como control negativo (C, 0.5 nM). A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos, definidos como células multinucleadas (más de 3 núcleos) positivas para la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP +). Las barras corresponden al promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). *** $P < 0.001$. (B) Aumento: 20X.

A fin de corroborar el rol de la proteína A en la inducción de osteoclastogénesis en el contexto de la superficie bacteriana, se utilizó el sistema de expresión heteróloga en la bacteria comensal *L. lactis*, inactivada por calor. Se observó un aumento significativo en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta al estímulo con *L. lactis* que expresa SpA (*L. lactis* SpA) comparado con *L. lactis* conteniendo un vector control (*L. lactis* VC) o sin estimular como control (Figura 5A, 5B y 5C). Considerando que la interacción entre la bacteria y el huésped puede variar de acuerdo al hospedador, estos experimentos fueron realizados utilizando precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (Figura 5A y 5C) y C57BL/6 (Figura 5B).

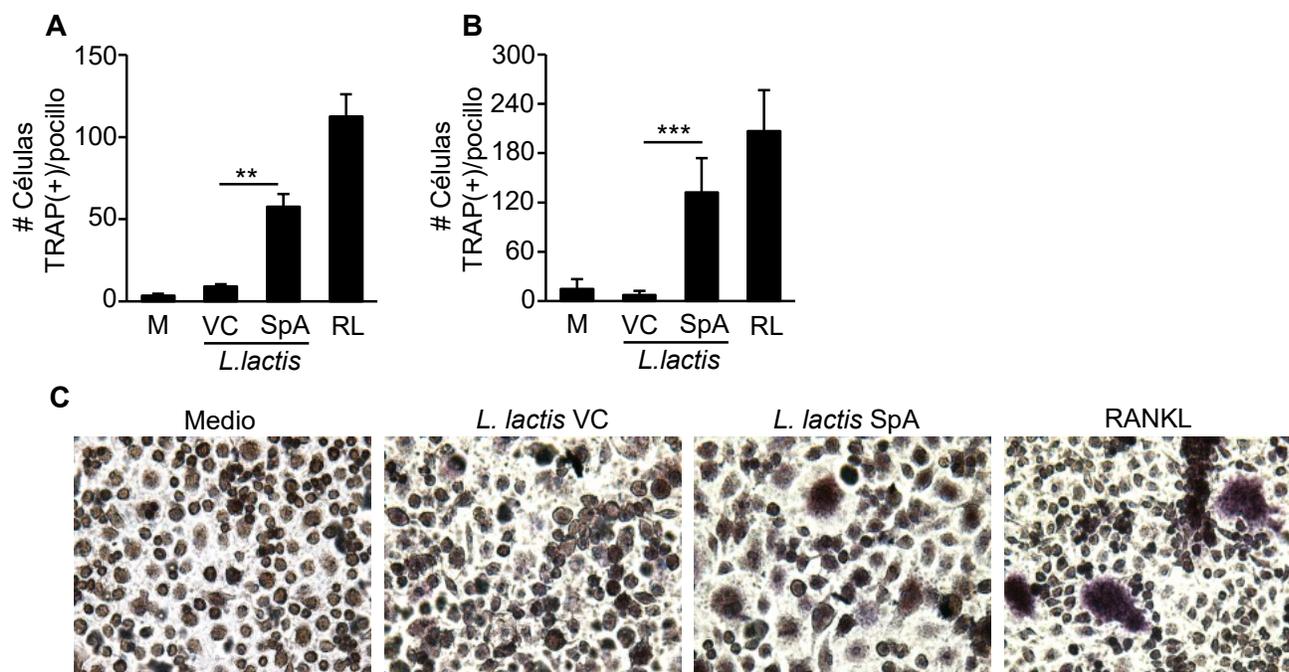


Figura 5. Osteoclastogénesis inducida por *L. lactis* expresando proteína A. Precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (**A, C**) o C57BL/6 (**B**) fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con suspensiones bacterianas (10^8 UFC/ml) inactivadas previamente por calentamiento de *L. lactis* portando un vector control (*L. lactis* VC) o expresando proteína A (*L. lactis* SpA). RANKL (RL 50 ng/ml) fue utilizado como control positivo. A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras corresponden al promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (**C**) Aumento: 20X.

Posteriormente, se determinó la relevancia relativa de la osteoclastogénesis inducida por la proteína A en la diferenciación de osteoclastos en respuesta al estímulo con *S. aureus* inactivada por calor. La estimulación con *S. aureus* cepa FPR3757 indujo un aumento significativo en el número de osteoclastos diferenciados a partir de precursores tanto de ratones BALB/c (Figura 6A y 6C) como de ratones C57BL/6 (Figura 6B). El rol de la proteína A en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* se determinó mediante el uso de una mutante isogénica que no expresa proteína A (SpA-). Se observó una disminución significativa en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a la mutante SpA- (Figura 6A, 6B y 6C). El rol de la proteína A en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* fue corroborado utilizando la cepa Newman observándose una disminución significativa en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a la mutante SpA- tanto a partir de precursores de ratones BALB/c (Figura 6D) como de C57BL/6 (Figura 6E y 6F). Más aún, se observó que la mutante SpA- complementada con SpA nativa (SpA-(SpA)) indujo niveles de osteoclastogénesis similares a la cepa salvaje de *S. aureus* (Figura 6E y 6F), confirmando la importancia de la proteína A en la diferenciación de osteoclastos inducida por *S. aureus*.

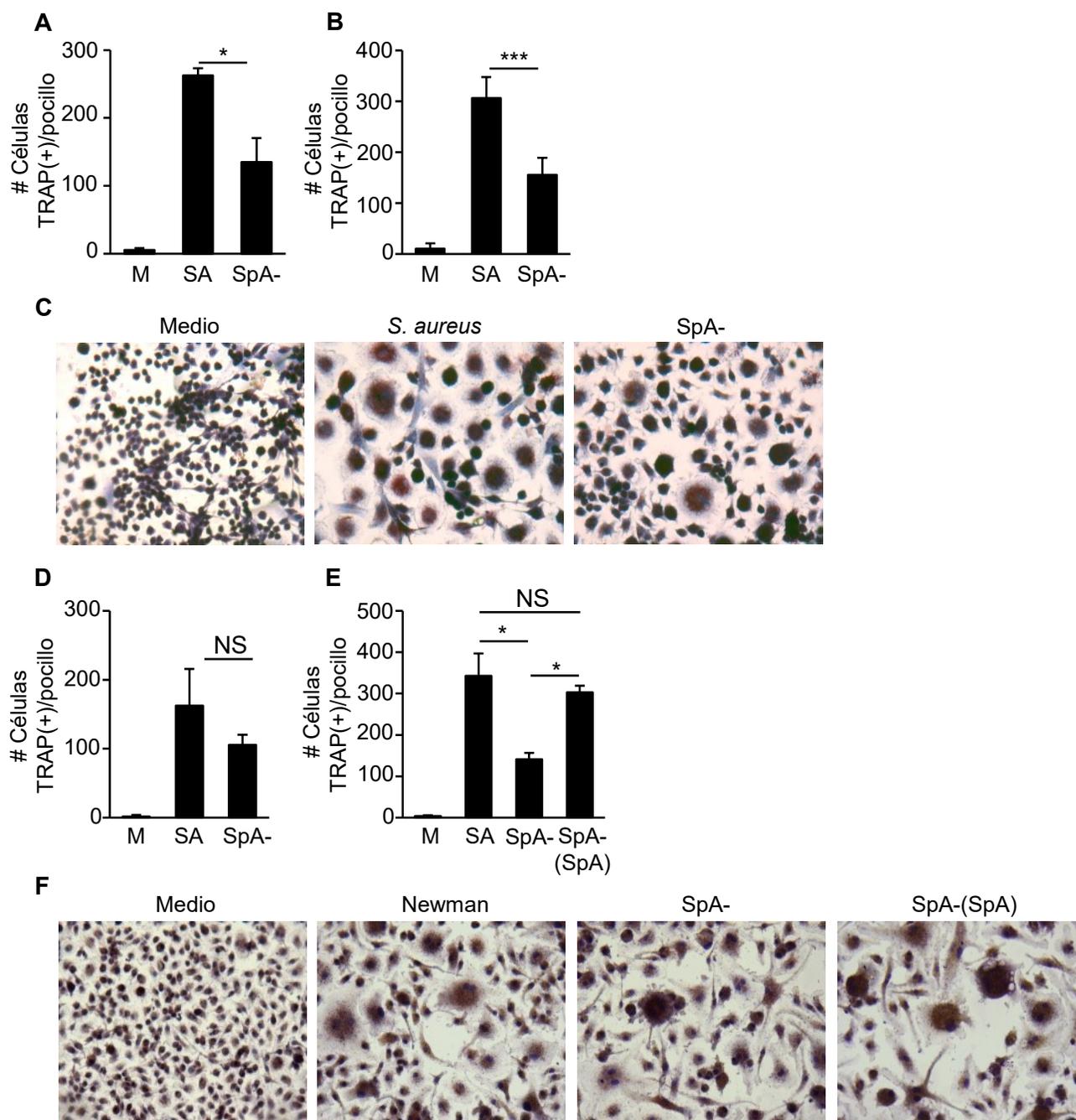


Figura 6. Osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*. Precusores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (A,C,D) o C57BL/6 (B,E,F) fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con suspensiones bacterianas inactivadas previamente por calentamiento de *S. aureus* FPR3757 (SA, 10^8 UFC/ml) o la mutante isogénica que no expresa proteína A (SpA-, 10^8 UFC/ml) (A,B,C) y *S. aureus* Newman (SA, 10^7 UFC/ml), la mutante isogénica que no expresa proteína A (SpA-, 10^7 UFC/ml) o la mutante SpA- complementada con SpA nativa (SpA⁻(SpA), 10^7 UFC/ml) (D,E,F). A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras corresponden al promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, NS: no significativo. (C) Aumento: 20X.

Considerando que el objetivo general de este trabajo abarca el entendimiento de los mecanismos involucrados en la patogenia de la osteomielitis por *S. aureus*, y que la especificidad de especie puede resultar determinante para la interpretación de los resultados se corroboró el rol de la proteína A en la inducción de osteoclastogénesis utilizando como precursores células humanas. Para ello, se utilizaron monocitos purificados de sangre periférica de dadores sanos los cuales se trataron con M-CSF (30 ng/ml) durante 3 días y luego se estimularon con *S. aureus* FPR3757 inactivada por calor durante 9 días. Se observó un aumento significativo en el número de osteoclastos en respuesta al estímulo con *S. aureus* (Figura 7A y 7C) respecto al control sin tratar. A su vez esta respuesta fue significativamente menor que la inducida por la mutante isogénica que no expresa proteína A (Figura 7A y 7C). El rol de la proteína A en la osteoclastogénesis a partir de precursores humanos se confirmó además utilizando *L. lactis* SpA como estímulo (Figura 7B y 7C).

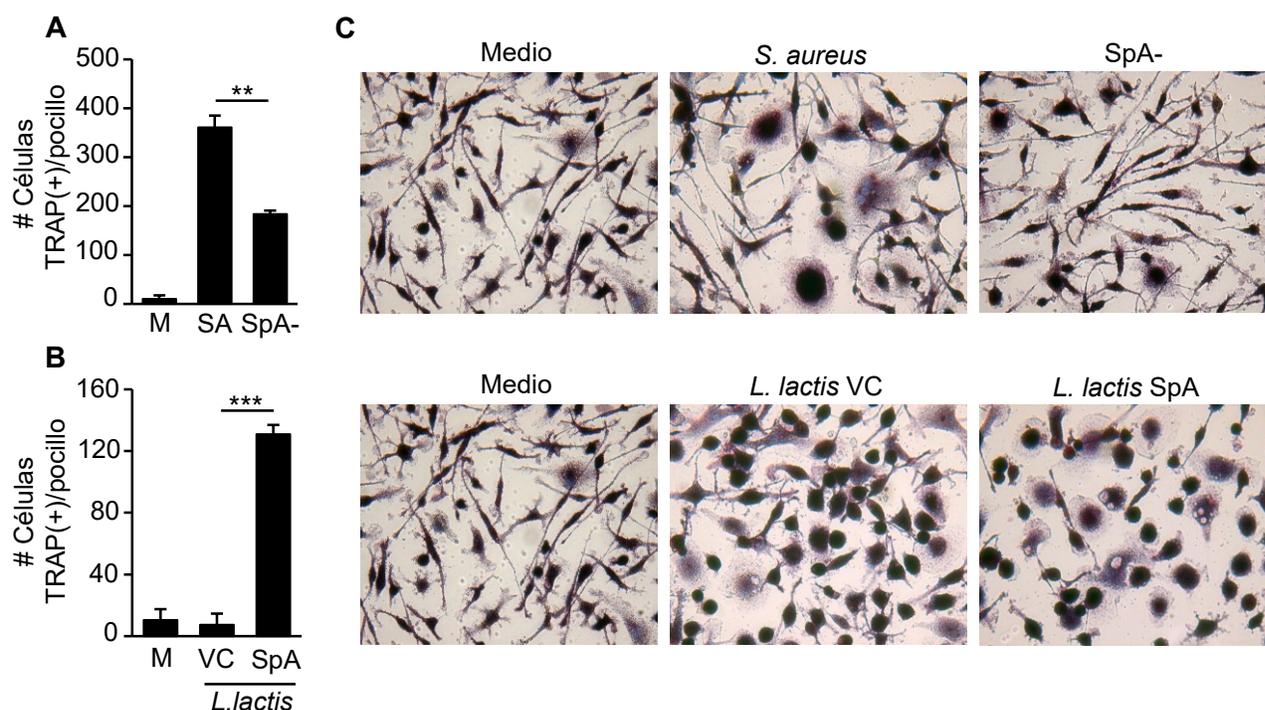


Figura 7. Osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* en precursores de origen humano. Monocitos de sangre periférica de dadores sanos fueron utilizados como precursores de osteoclastos y cultivados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con los estímulos indicados. A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras corresponden al promedio y el desvío estándar de dos dadores independientes analizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. (C) Aumento: 20X.

4.1.1.1. La proteína A de *S. aureus* induce la expresión de RANK.

La diferenciación de los osteoclastos requiere la presencia de dos factores críticos, M-CSF y RANKL. Este último interacciona con RANK en la superficie de los precursores de los osteoclastos y activa los factores de transcripción que determinan la diferenciación de los mismos a osteoclastos maduros [36]. Por lo tanto, decidimos estudiar si *S. aureus* podría inducir el incremento en la expresión de RANK en la superficie de los precursores de osteoclastos. Se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de RANK en precursores de osteoclastos estimulados con *S. aureus* (Figura 8A). A fin de determinar la contribución de la proteína A en la modulación de la expresión de RANK se estimularon precursores de osteoclastos con la mutante SpA- observándose una disminución significativa en los niveles de expresión respecto de los observados en respuesta a la cepa salvaje parental (Figura 8A). La capacidad de la proteína A de inducir la expresión de RANK se confirmó en osteoclastos diferenciados en respuesta a *L. lactis* SpA (Figura 8B).

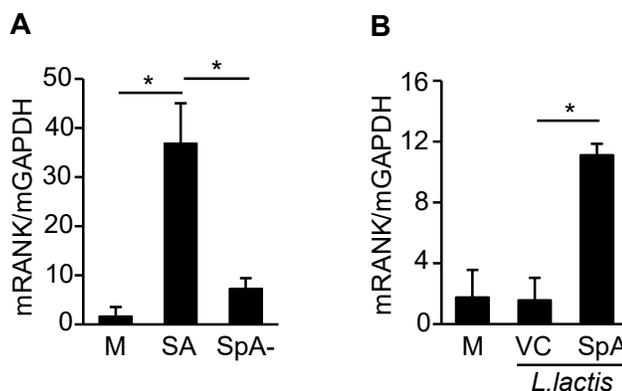


Figura 8: Inducción de la expresión de RANK por *S. aureus* y la proteína A. Se cuantificaron los niveles relativos de expresión de RANK mediante RT-PCR en tiempo real en osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus* (SA), la mutante SpA-, *L. lactis* VC o *L. lactis* SpA (10^8 UFC/ml) luego de 9 días de estimulación. Los datos fueron normalizados utilizando GAPDH como control. Las barras corresponden al promedio y el desvío estándar de dos experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.05$.

4.1.2. La proteína A contribuye a la producción de citoquinas pro-inflamatorias por precursores de osteoclastos estimulados con *S. aureus*.

Si bien RANKL es la principal molécula implicada en la osteoclastogénesis, en condiciones patológicas, la presencia de citoquinas inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α puede contribuir significativamente a la diferenciación de osteoclastos [76,164] motivo por el cual se evaluó la capacidad de la proteína A de inducir dichos mediadores en precursores de osteoclastos. La proteína A (expresada en la superficie de *L. lactis*) indujo un aumento significativo en los niveles de IL-1 β , IL-6

y TNF- α producidos por precursores de osteoclastos provenientes tanto de ratones BALB/c como de ratones C57CL/6 luego de 24 horas de estimulación (Figura 9A-F).

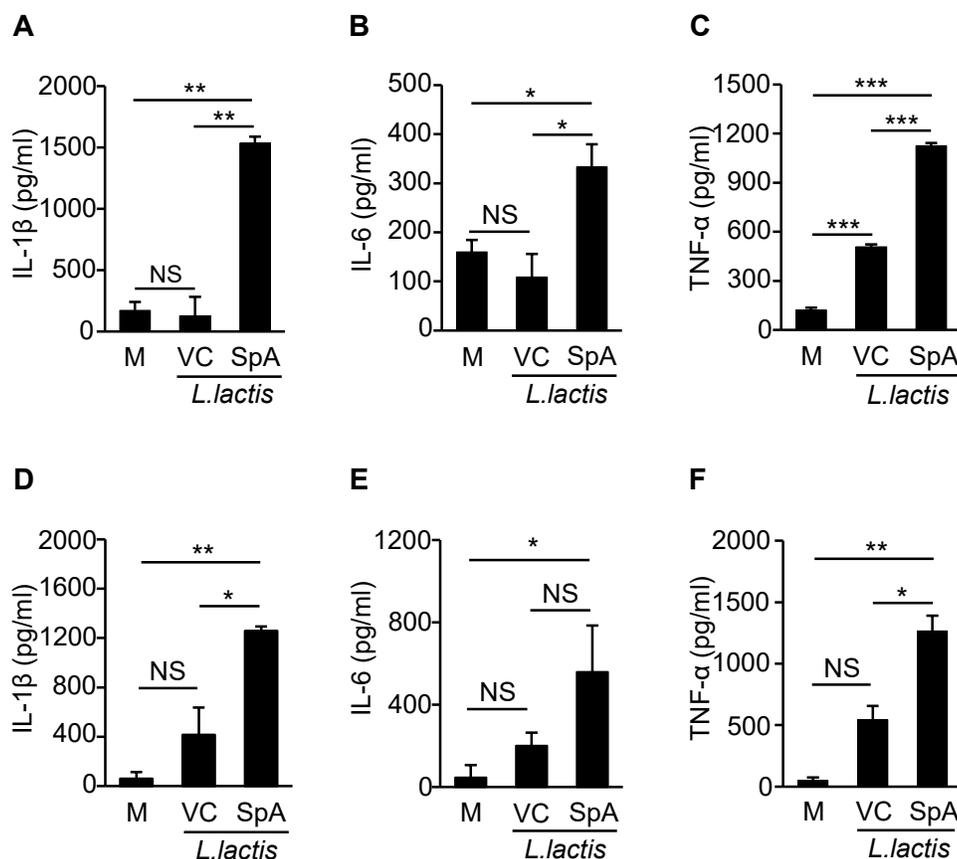


Figura 9. Producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la proteína A. Precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (A-C) o C57BL/6 (D-F) fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *L. lactis* VC (10^8 UFC/ml) o *L. lactis* SpA (10^8 UFC/ml). A las 24 horas luego de la estimulación se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico).* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$. NS: no significativo.

Al evaluar la producción de dichas citoquinas en respuesta a *S. aureus*, se observó un aumento significativo en los niveles de las mismas en respuesta a la cepa FPR3757 utilizando precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (Figura 10A-C) o C57BL/6 (Figura 10D-F). Más aún, en concordancia con lo observado en otros tipos celulares [154,156,158,159], se observó una disminución significativa en los niveles de producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α inducidos por la mutante SpA- respecto de los inducidos por *S. aureus* (Figura 10A-F) demostrando el rol de la proteína A en la inducción de mediadores inflamatorios en precursores de osteoclastos.

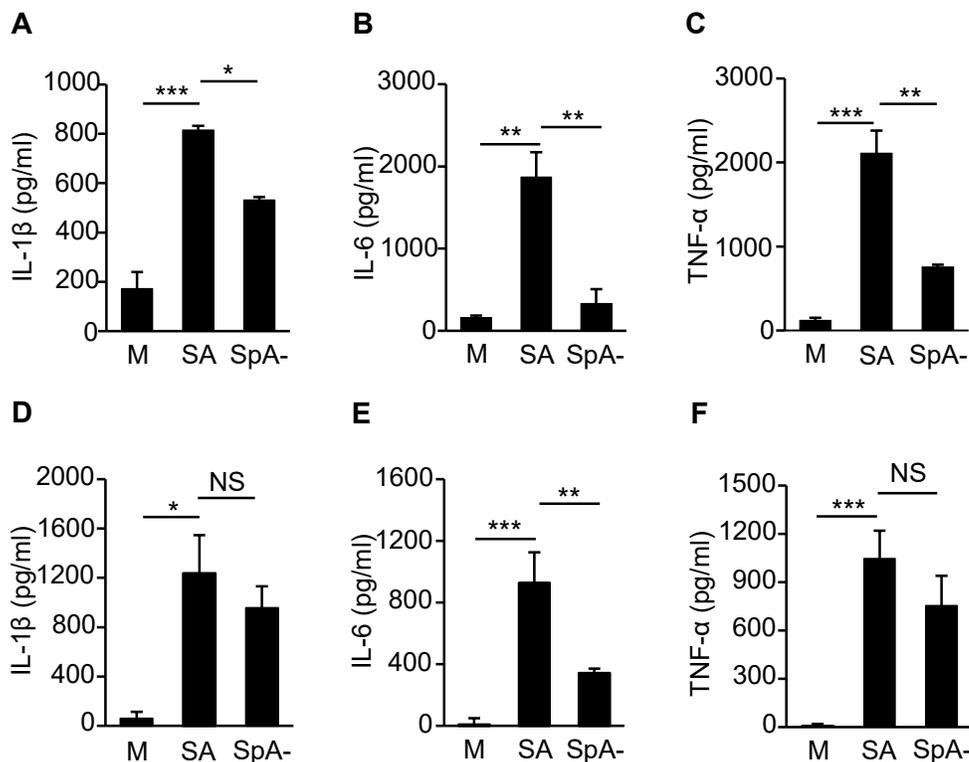


Figura 10. Producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a *S. aureus*. Precusores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (A-C) o C57BL/6 (D-F) fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *S. aureus* FPR3757 (SA, 10^8 UFC/ml) o la mutante (SpA-, 10^8 UFC/ml). A las 24 horas luego de la estimulación se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$. NS: no significativo.

Los resultados obtenidos fueron confirmados utilizando la cepa Newman de *S. aureus* observándose un aumento de IL-1 β , IL-6 y TNF- α con la cepa salvaje (Figura 11A-F). En dicho contexto genético, se corroboró la importancia de la proteína A en la inducción de mediadores inflamatorios ya que la estimulación con la mutante isogénica que no expresa proteína A indujo niveles de citoquinas proinflamatorias menores a los observados con la cepa salvaje (Figura 11A-F). La importancia de la proteína A en la inducción de mediadores inflamatorios fue además evidenciada mediante el uso de la cepa complementada que expresa SpA la cual indujo niveles de IL-1 β y de IL-6 comparables a los inducidos por la cepa salvaje (Figura 11D y 11E). La producción de TNF- α , sin embargo, no pudo ser complementada (Figura 11F).

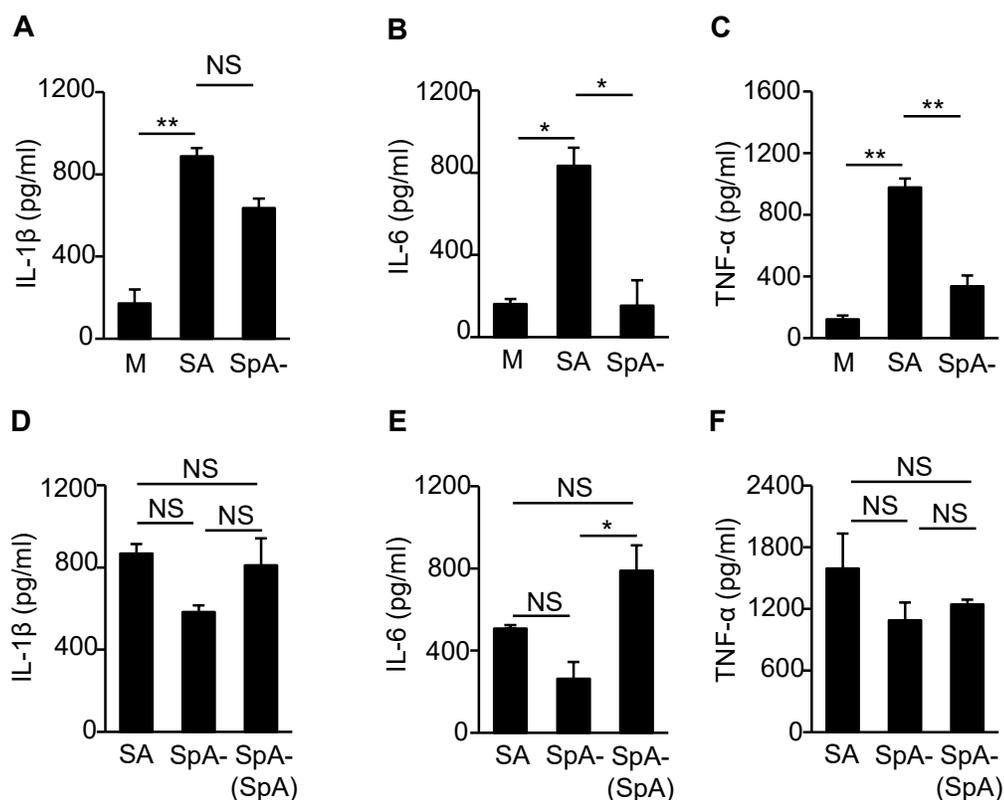


Figura 11. Producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a *S. aureus*. Precusores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (A-C) o C57BL/6 (D-F) fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *S. aureus* Newman (SA, 10^7 UFC/ml), la mutante isogénica que no expresa proteína A (SpA-, 10^7 UFC/ml) o la mutante SpA- complementada con SpA nativa (SpA⁻(SpA), 10^7 UFC/ml). A las 24 horas luego de la estimulación se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. NS: no significativo.

Finalmente, se corroboró la importancia de la proteína A en la inducción de citoquinas inflamatorias en precusores de osteoclastos de origen humano. *S. aureus* y la proteína A indujeron la producción de IL-1 β (Figura 12A y 12B) y TNF- α (Figura 12C y 12D) en precusores de osteoclastos diferenciados a partir de monocitos humanos, corroborándose la importancia relativa de la proteína A en dicho proceso (Figura 12A y 12C).

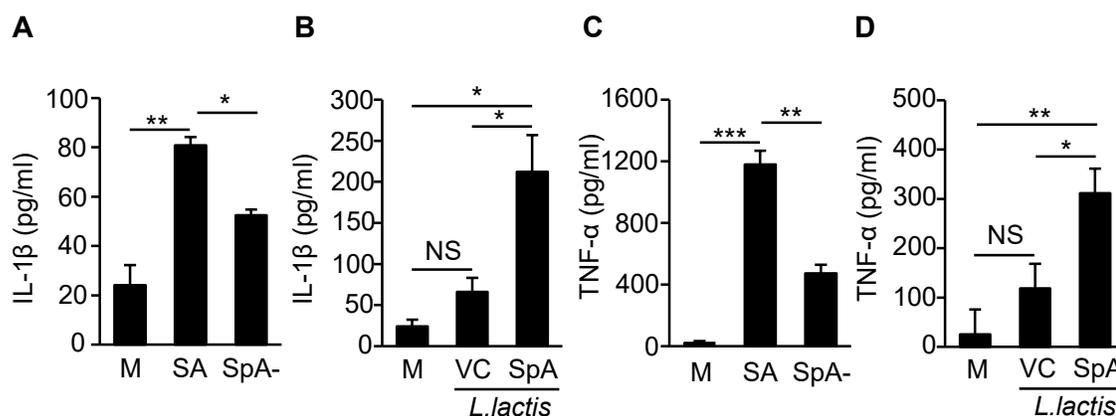


Figura 12. Respuesta inflamatoria inducida por *S. aureus* y la proteína A en precursores de osteoclastos humanos. Monocitos purificados de sangre periférica de donadores sanos fueron diferenciados a precursores de osteoclastos y estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *S. aureus* FPR3757 (SA, 10^8 UFC/ml) o la mutante (SpA-, 10^8 UFC/ml), *L. lactis* VC (10^8 UFC/ml) o *L. lactis* SpA (10^8 UFC/ml). A las 24 horas luego de la estimulación se cuantificaron los niveles de IL-1 β (A-B) y TNF- α (C-D) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de dos donadores independientes para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$. NS: no significativo.

4.1.3. La proteína A de *S. aureus* modula la actividad resorptiva de los osteoclastos.

Los osteoclastos tienen la habilidad única de reabsorber hueso para lo cual requieren proteinasas que degraden eficientemente la matriz ósea. Dado que las proteinasas más importantes para la función resorptiva de los osteoclastos son catepsina K y la metaloproteasa 9 (MMP-9) (que degrada colágeno tipo I, IV y V) [165,166], se estableció el rol de la proteína A en la inducción de dichas moléculas. Se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de catepsina K en osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus* o *L. lactis* SpA (Figura 13A). Por el contrario, los niveles de catepsina K en respuesta a la mutante SpA- fueron significativamente menores a los observados en respuesta a *S. aureus* (Figura 10A). Al evaluar la expresión de MMP-9 en los sobrenadantes de cultivo, se observó un aumento significativo en los niveles de MMP-9 en las células estimuladas con *S. aureus* comparados con los sobrenadantes de células control (Figura 13B) mientras que la mutante SpA- indujo niveles significativamente menores (Figura 10B). Las diferencias observadas entre los niveles de MMP-9 inducidos por *S. aureus* y la mutante SpA- se correlacionaron con las diferencias en la actividad gelatinasa de dicha proteínasa en respuesta a ambos estímulos (Figura 13C).

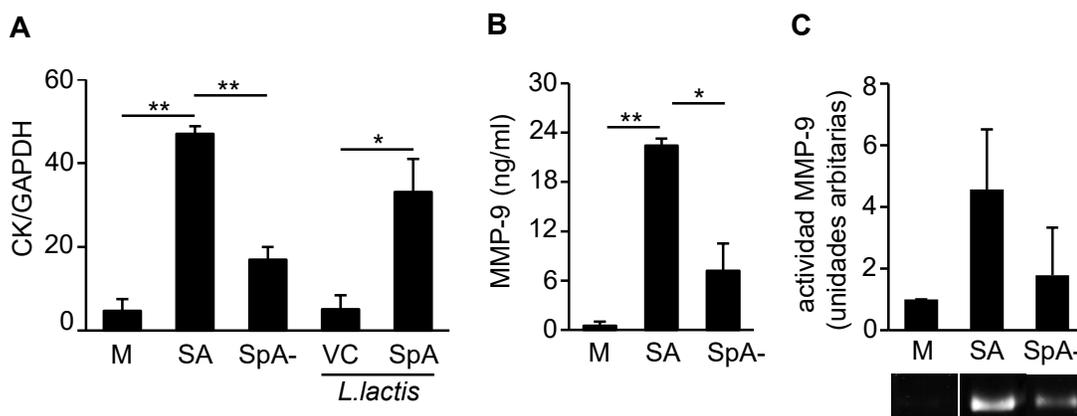


Figura 13. Producción de Catepsina K y MMP-9 en respuesta a *S. aureus* y la proteína A. (A) Niveles de transcripción de catepsina K (CK) determinados mediante RT-PCR en tiempo real en osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus* (SA), la mutante SpA-, *L. lactis* VC o *L. lactis* SpA (10^8 UFC/ml) después de 9 días de estimulación. Los datos fueron normalizados utilizando GAPDH como control. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de dos experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (B, C) Precursores de osteoclastos fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *S. aureus* o SpA- por 9 días. Se evaluó la expresión de MMP-9 por ELISA (B) y su actividad gelatinasa se detectó por zimografía (C). Las barras muestran el promedio y el desvío estándar de dos experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición.

Los osteoclastos metabólicamente activos no solo pueden degradar matriz orgánica, sino también matriz mineral, por lo tanto se realizaron experimentos para determinar la habilidad de los osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus* de reabsorber dentina. Al estimular precursores de osteoclastos con *L. lactis* SpA se observó la formación de lagunas de resorción (Figura 14A) indicando que la proteína A es suficiente para inducir no sólo la diferenciación sino también la activación de osteoclastos. Al evaluar la contribución relativa de la proteína A en la activación de osteoclastos estimulados con *S. aureus* se observó que su expresión es crítica para la resorción ósea (Figura 14B). Estos resultados permitieron demostrar que a pesar que otras moléculas además de la proteína A participan en la diferenciación de osteoclastos, ya que la mutante SpA- logró inducir la formación de células multinucleadas TRAP positivas (Figuras 6 y 7), la proteína A es crítica para la inducción de osteoclastos funcionalmente activos (Figura 14B).

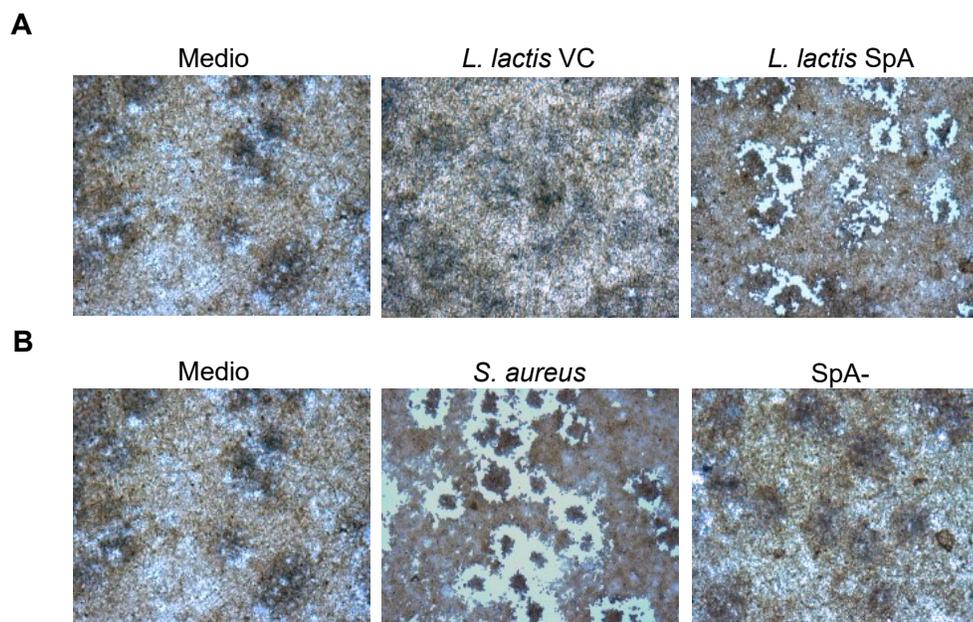


Figura 14. Modulación de la actividad resortiva de los osteoclastos por *S. aureus* y la proteína A. Precusores de osteoclastos provenientes de ratones C57BL/6 fueron cultivados en discos de dentina y estimulados con *L. lactis* SpA (**A**), *S. aureus* o la mutante isogénica SpA- (**B**) durante 9 días. Se evaluaron las lagunas de resorción por microscopia. Aumento: 20X.

4.1.4. Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos utilizando pares de cepas isogénicas que difieren en la expresión de proteína A y el sistema de expresión heterólogo en *L. lactis* permitieron demostrar que la proteína A de *S. aureus* tiene la capacidad de inducir la diferenciación de osteoclastos a partir de precursores murinos y humanos y de modular la expresión de RANK en los mismos.

Asimismo, se demostró el rol de la proteína A en la producción temprana de IL-1 β , IL-6 y TNF- α por precursores de osteoclastos en respuesta al estímulo con *S. aureus*.

La estimulación con proteína A provocó un aumento en los niveles de catepsina K y MMP-9, que junto a los ensayos funcionales de resorción ósea en matrices de dentina, demostraron que la proteína A es crítica en la modulación de la actividad resortiva de los osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus*.

4.2. ROL DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LOS RECEPTORES TNFR1 Y EGFR EN LA DIFERENCIACIÓN Y ACTIVACIÓN DE OSTEOCLASTOS INDUCIDA POR LA PROTEÍNA A DE *S. aureus*.

Dada la importancia de la interacción de la proteína A con los receptores TNFR1 y EGFR en la inducción de cascadas de señalización intracelular en diferentes tipos celulares incluyendo macrófagos [154,158,159,167], se investigó a continuación la participación de la señalización a través de dichos receptores en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*.

4.2.1. La proteína A de *S. aureus* induce osteoclastogénesis a través de la señalización mediada por TNFR1 y EGFR.

Luego de demostrar la capacidad de la proteína A de *S. aureus* de inducir la diferenciación de osteoclastos, se evaluó la participación de la señalización vía TNFR1 en dicho proceso. Para ello, los precursores de osteoclastos provenientes de ratones deficientes en la expresión de TNFR1 (*tnfr1*^{-/-}) fueron estimulados con proteína A recombinante (SpA-D) o *L. lactis* SpA. Se observó una disminución significativa en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a proteína A a partir de precursores provenientes de ratones *tnfr1*^{-/-} en comparación con los diferenciados a partir de precursores de ratones salvajes C57BL/6 (Figura 15A). En estos ensayos se utilizó TNF- α como control positivo, que es capaz de inducir la diferenciación a osteoclastos en ausencia de RANKL [77,168]. Asimismo, se descartó la posibilidad de que los precursores provenientes de ratones *tnfr1*^{-/-} tuviesen una capacidad intrínseca de diferenciación disminuida mediante la determinación de la respuesta a RANKL (Figura 15A).

A fin de evaluar la contribución de EGFR en la diferenciación de osteoclastos se estimularon precursores provenientes de ratones salvajes C57BL/6 con proteína A (SpA-D) o con la mutante SpAL17A, la cual posee un reemplazo por alanina de un aminoácido crítico para el reconocimiento de SpA por EGFR y el cual es irrelevante para el reconocimiento de SpA por TNFR1 [159]. Se observó una disminución significativa en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a SpAL17A en comparación con los diferenciados en respuesta a SpA-D, demostrando el rol de la señalización vía EGFR en la osteoclastogénesis inducida por la proteína A de *S. aureus* (Figura 15B). En base a estos resultados, se evaluó posteriormente la importancia de la señalización conjunta por ambos receptores en la osteoclastogénesis inducida por la proteína A. Para ello, se estimularon precursores de osteoclastos de ratones *tnfr1*^{-/-} (que no pueden señalizar vía TNFR1) con la mutante SpAL17A (la cual no es reconocida por EGFR, pero si por TNFR1). En células donde la señalización por ambos receptores fue bloqueada, el número de osteoclastos maduros resultó equivalente al observado en las células control sin estimular (Figura 15B). Estos resultados sugieren que la proteína A induce

osteoclastogénesis activando mayoritariamente los receptores de TNF- α y EGF en precursores de osteoclastos.

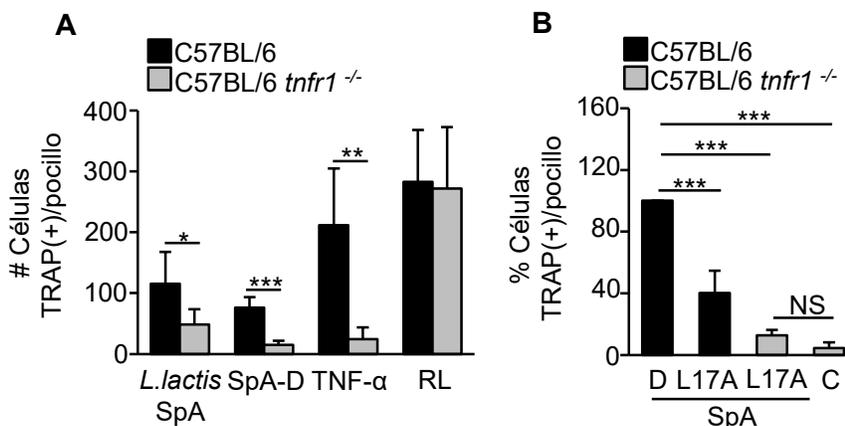


Figura 15. Vías de señalización involucradas en la osteoclastogénesis inducida por la proteína A de *S. aureus*. Precursores de osteoclastos provenientes de ratones C57BL/6 (barras negras) o deficientes en la expresión de TNFR1 (*tnfr1*^{-/-}) (barras grises) fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *L. lactis* SpA (10⁸ UFC/ml), la región D de la proteína A (SpA-D 0.5 nM), la mutante L17A (SpA-L17A 0.5 nM) o GST como control negativo (C 0.5 nM). TNF- α (10 μ g/ml) y RANKL (50 ng/ml) fueron utilizados como control positivo. A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). **P* <0.05, ***P* <0.01, ****P* <0.001. NS: no significativo.

4.2.2. La señalización por TNFR1 y EGFR posee un rol en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*.

A fin de determinar la participación de la señalización vía TNFR1 en la diferenciación de osteoclastos inducida por *S. aureus*, los precursores provenientes de ratones salvajes C57BL/6 y ratones *tnfr1*^{-/-} fueron estimulados con la bacteria completa. Se observó una disminución significativa en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus* a partir de los precursores provenientes de ratones *tnfr1*^{-/-} en comparación con los diferenciados a partir de precursores de ratones salvajes C57BL/6 (Figura 16A). Asimismo, se evaluó el rol de la señalización por TNFR1 en respuesta a moléculas de *S. aureus* diferentes de la proteína A. Para ello, se realizaron ensayos de osteoclastogénesis utilizando precursores provenientes de ratones *tnfr1*^{-/-} estimulados con la mutante isogénica SpA-. El número de osteoclastos fue menor al observado cuando se estimularon con la misma cepa precursores de ratones salvajes C57BL/6 aunque las diferencias no resultaron significativas (Figura 16A).

A fin de determinar el rol de EGFR en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*, se estimularon precursores de osteoclastos con *S. aureus* o con una mutante isogénica que carece de la expresión de proteína A y se encuentra complementada con un vector de expresión conteniendo

SpAL17A (la cual no puede señalizar por EGFR). Como control se utilizó la mutante SpA- y la mutante SpA- complementada con la proteína A nativa (SpA-(SpA)). El estímulo con la mutante SpA- complementada con SpAL17A (SpA-(L17A)) indujo un número significativamente menor de osteoclastos en comparación con los inducidos por *S. aureus* (Figura 16B). Más aún el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a la mutante SpA-(L17A) no difirió del observado al estimular con la mutante SpA- (Figura 16B). Paralelamente, la mutante SpA- complementada con SpA (SpA-(SpA)) restituyó los valores de diferenciación observados con la cepa parental (Figura 16B). Estos resultados permitieron demostrar que la señalización por TNFR1 y EGFR contribuye significativamente a la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*.

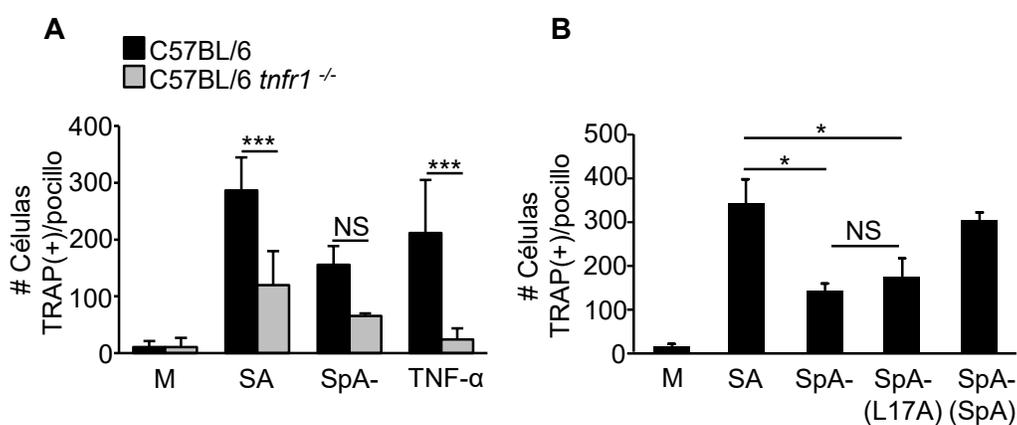


Figura 16. Vías de señalización involucradas en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*. (A) Precusores de osteoclastos provenientes de ratones C57BL/6 (barras negras) o ratones deficientes en la expresión de TNFR1 (*tnfr1*^{-/-}) (barras grises) fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *S. aureus* FPR3757 (SA, 10⁸ UFC/ml) o la mutante isogénica SpA- (10⁸ UFC/ml). TNF-α (10 μg/ml) se utilizó como control positivo. (B) Precusores de osteoclastos provenientes de ratones C57BL/6 fueron estimulados con *S. aureus* Newman (SA), la mutante isogénica SpA- o las cepas complementadas SpA-(SpAL17A) y SpA-(SpA) (10⁷ UFC/ml). A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). **P* <0.05, ****P* <0.001. NS: no significativo.

4.2.3. El TNF-α inducido por la proteína A de *S. aureus* contribuye a la diferenciación de osteoclastos.

Dado que la proteína A de *S. aureus* podría inducir la diferenciación de osteoclastos por acción directa sobre TNFR1 o en forma indirecta vía la inducción de TNF-α, se evaluó si la osteoclastogénesis estaba mediada por dicha citoquina. Para ello, los precusores de los osteoclastos provenientes de ratones salvajes C57BL/6 fueron estimulados con la proteína A (SpA-D) y la mutante SpAL17A, en presencia y ausencia de un anticuerpo neutralizante anti-TNF-α. Se observó una disminución significativa en el número de osteoclastos en respuesta a SpA-D en presencia del

anticuerpo anti-TNF- α (Figura 17A) indicando que el mismo es necesario para la inducción de osteoclastogénesis por la proteína A. Más aún al estimular las células con la mutante SpAL17A (la cual no es reconocida por EGFR y sólo puede señalizar vía TNFR1) en presencia del anticuerpo anti-TNF- α no se observaron diferencias en la diferenciación de osteoclastos con respecto a las células no tratadas (Figura 17A) destacando la importancia del TNF- α en la osteoclastogénesis inducida por la proteína A.

Luego, se evaluó la importancia relativa de la señalización por TNF- α en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*. La diferenciación de osteoclastos resultó significativamente menor en precursores estimulados con *S. aureus* en presencia de un anticuerpo anti-TNF- α (Figura 17B), en comparación a la observada en ausencia del anticuerpo. Al evaluar el rol del TNF- α inducido por moléculas de *S. aureus* diferentes de la proteína A, mediante el uso de la mutante isogénica SpA-, se observó una contribución significativa del mismo en la inducción de osteoclastogénesis (Figura 17B). En conjunto estos resultados indican que TNF- α juega un rol preponderante en la inducción de osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*, tanto dependiente de la proteína A como aquella inducida por otros componentes de la bacteria.

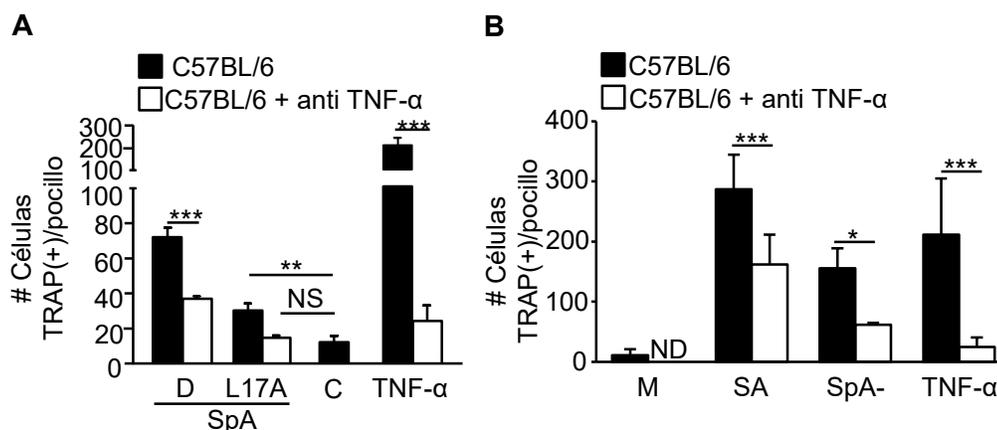


Figura 17. Rol de TNF- α en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* y la proteína A. Precursores de osteoclastos provenientes de ratones C57BL/6 fueron estimulados en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de un anticuerpo anti-TNF α (10 μ g/ml). En (A) las células fueron estimuladas con la región D de la proteína A (SpA-D, 0.5 nM), la mutante L17A (SpA-L17A, 0.5 nM) o GST como control negativo (C, 0.5 nM). En (B) las células fueron estimuladas con *S. aureus* FPR3757 (SA, 10⁸ UFC/ml) o la mutante isogénica SpA- (10⁸ UFC/ml). TNF- α (10 μ g/ml) se utilizó como control positivo. A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). **P* <0.05, ***P* <0.01 ****P* <0.001. ND: no determinado, NS: no significativo.

4.2.4. La señalización vía TNFR1 es crítica para la funcionalidad de los osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus*.

Se evaluó a continuación la importancia de la señalización por TNFR1 en la modulación de la actividad resortiva de los osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus*. Dado que se ha reportado que la señalización vía TNFR1 puede modular la expresión de catepsina K [95], se determinó la contribución de dicho receptor en la regulación de dicha proteinasa por *S. aureus*. Para ello se realizaron los experimentos utilizando precursores de osteoclastos provenientes de ratones *tnfr1*^{-/-}. Se observó que en ausencia del receptor, los niveles de expresión de catepsina K en respuesta al estímulo con *S. aureus* no difirieron de los niveles basales, a diferencia de lo observado en las células de ratones salvajes C57BL/6 (Figura 18A).

Luego decidimos evaluar la actividad de los osteoclastos en respuesta al estímulo con *S. aureus* en ausencia de TNFR1. La ausencia de lagunas de resorción en cultivos de precursores de osteoclastos provenientes de ratones deficientes en TNFR1 estimulados con *S. aureus* evidenció la importancia de TNFR1 para la diferenciación de osteoclastos funcionalmente activos (Figura 18B y 18C). Por lo tanto, nuestros resultados indicaron que la señalización vía este receptor es crítica para la funcionalidad de los osteoclastos.

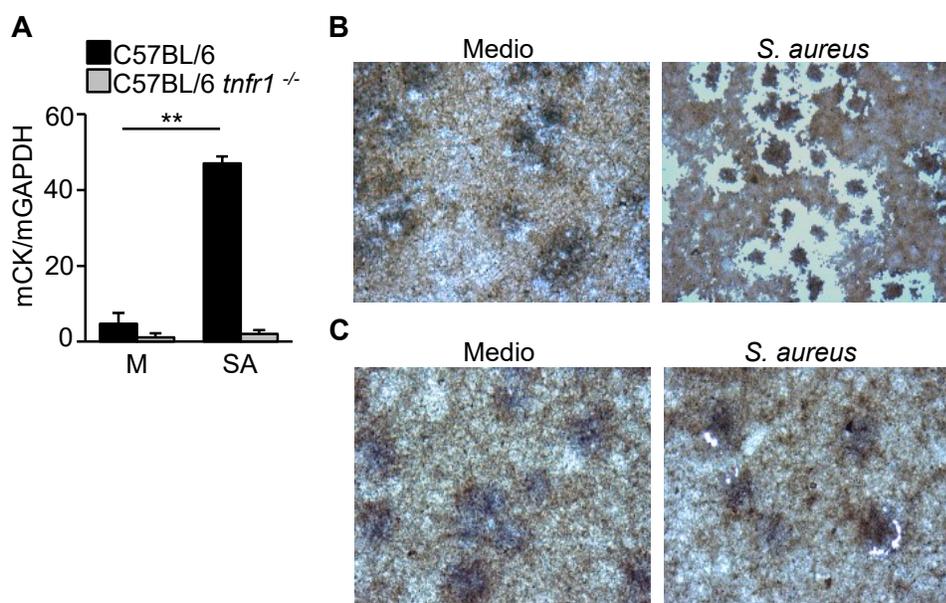


Figura 18. Rol de TNFR1 en la actividad de los osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus*. (A) Niveles de transcripción de CK mediante RT-PCR en tiempo real en osteoclastos de ratones C57BL/6 salvajes (barras negras) o ratones deficientes en la expresión de TNFR1 (*tnfr1*^{-/-}) (barras grises) diferenciados en respuesta a *S. aureus* (10^8 UFC/ml) durante 9 días. Los datos fueron normalizados utilizando GAPDH como control. Las barras muestran el promedio y el desvío estándar de dos experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). $^{**}P < 0.01$. (B-C) Se cultivaron precursores de osteoclastos de ratones C57BL/6 (B) o *tnfr1*^{-/-} (C) en discos de dentina y se estimularon con *S. aureus* durante 9 días (10^8 UFC/ml). Las lagunas de resorción se evidenciaron por microscopía óptica. Aumento: 20X.

4.2.5. Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación permitieron demostrar que la osteoclastogénesis inducida por la proteína A de *S. aureus* se encuentra mediada por la señalización de los receptores TNFR1 y EGFR. Además, se demostró la importancia de la señalización por TNF- α en la diferenciación de osteoclastos estimulados con *S. aureus*. TNFR1 tendría un papel preponderante en la inducción de osteoclastos maduros capaces de resorber matriz en respuesta a *S. aureus*.

4.3. CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA A EN LA DEGRADACIÓN ÓSEA CARACTERÍSTICA DE LA OSTEOMIELITIS POR *S. aureus*.

Luego de establecer la importancia de la expresión de la proteína A en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*, se procedió a evaluar su contribución en el desarrollo de osteomielitis por *S. aureus*, utilizando dos modelos de infección experimental. En primer lugar se utilizó un modelo murino de infección ósea descrito previamente. Los modelos murinos de osteomielitis descritos en la literatura [161] permiten evaluar el desarrollo de lesiones óseas que presentan un correlato con las observadas en pacientes con osteomielitis y proporcionan varias ventajas por sobre los modelos en animales de mayor porte. No obstante, una de las desventajas que ofrece el modelo murino es que el tiempo de permanencia de la bacteria en hueso es limitado y por lo tanto no es posible evaluar la patología de la infección a tiempos prolongados luego del desafío. Es por ello que, además, se utilizó un modelo de osteomielitis experimental en rata descrito previamente [162,169] el cual permitió el seguimiento de la infección durante 15 semanas luego del desafío experimental.

4.3.1. Contribución de la señalización inducida por la proteína A de *S. aureus* en el desarrollo de osteomielitis en un modelo experimental murino.

4.3.1.1. La proteína A induce la diferenciación de osteoclastos durante la infección *in vivo* con *S. aureus*.

Luego de caracterizar la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* y la proteína A *in vitro*, se evaluó el impacto de la presencia de *S. aureus* en el hueso infectado sobre la diferenciación temprana de osteoclastos. Para ello, grupos de ratones BALB/c de 10 semanas de edad fueron inoculados intramedularmente en la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1×10^6 UFC de *S. aureus* o de la mutante isogénica SpA- y vehículo (PBS) como control. A las 48 horas luego del desafío se realizaron ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo*. Para ello, los precursores de osteoclastos provenientes de los ratones infectados o control se estimularon con M-CSF y RANKL y se determinó el número de osteoclastos a los 5 días. Los precursores de osteoclastos provenientes

de animales infectados con *S. aureus* mostraron mayor capacidad de diferenciarse a osteoclastos maduros en respuesta a RANKL que aquellos provenientes de animales inoculados con PBS (control) (Figura 19B). Por el contrario, el potencial osteoclastogénico de los precursores provenientes de ratones desafiados con la mutante SpA- no difirió del observado en el grupo control inoculado con PBS (Figura 19B). Estos resultados demuestran la importancia de la proteína A de *S. aureus* en el primado de precursores de osteoclastos durante los estadios iniciales de la infección. Al evaluar la colonización bacteriana en hueso de los ratones infectados, no se observaron diferencias significativas en la carga bacteriana en los ratones desafiados con *S. aureus* con respecto a los inoculados con la mutante SpA-, indicando que las diferencias observadas en el potencial osteoclastogénico de las células provenientes de ambos grupos de ratones no se deben a diferencias en la cantidad de bacteria presente en el hueso (Figura 19C).

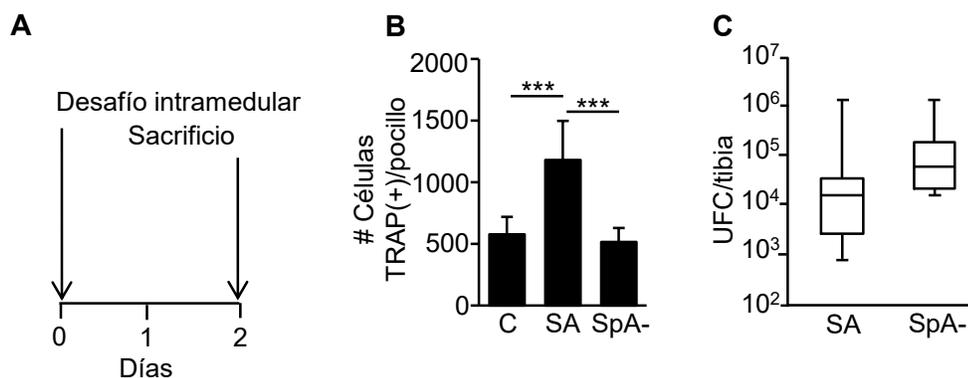


Figura 19. Rol de la presencia de la proteína A en el primado de osteoclastos durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. (A) Diseño experimental. Ratones BALB/c fueron inoculados intramedularmente en la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1×10^6 UFC de *S. aureus* (SA) o la mutante SpA- o PBS (C) como control. (B) Cuarenta y ocho horas luego del desafío se obtuvieron precursores de osteoclastos, los cuales fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con RANKL (50 ng/ml). A los 5 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de los valores obtenidos para cada grupo de ratones (n=5-6 ratones por grupo, evaluados en 3 experimentos independientes). Las células provenientes de los ratones individuales fueron ensayadas en pocillos por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). $**P < 0.01$. (C) Carga bacteriana en hueso de ratones inoculados con *S. aureus* (SA) o la mutante SpA-. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo (n=14-12) con sus respectivas medianas, máximo y mínimo.

4.3.1.2. TNFR1 posee un rol crítico en la diferenciación de osteoclastos durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.

Luego de demostrar la participación de la señalización a través de TNFR1 en la diferenciación y funcionalidad de los osteoclastos *in vitro*, evaluamos la importancia de dicho receptor en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* durante los estadios iniciales de la infección. Para ello, grupos de ratones C57BL/6 salvajes o deficientes en TNFR1 (*tnfr1^{-/-}*) de 10 semanas de edad fueron inoculados intramedularmente en la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1×10^6 UFC de *S. aureus* o PBS (como control) y a las 48 horas luego del desafío se realizaron ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo* (Figura 20A). Para ello, los precursores de osteoclastos provenientes de los ratones infectados o control se estimularon con M-CSF y RANKL y se determinó el número de osteoclastos a los 5 días. El número de osteoclastos diferenciados en respuesta a RANKL a partir de precursores provenientes de animales C57BL/6 desafiados con *S. aureus* fue significativamente mayor que el observado a partir de precursores provenientes de ratones control (Figura 20B). A su vez, la cantidad de núcleos presentes en los osteoclastos diferenciados a partir de precursores provenientes de ratones desafiados con *S. aureus* resultó mayor a 5 en comparación con los provenientes de animales inoculados con PBS en los cuales los osteoclastos presentaron 3 núcleos (Figura 20D).

Al evaluar la diferenciación de precursores de osteoclastos obtenidos de ratones *tnfr1^{-/-}* inoculados con *S. aureus* se observó que se comportaron de manera equivalente al grupo inoculado con PBS tanto a nivel del número de osteoclastos diferenciados (Figura 20B) como en la cantidad de núcleos presentes en los mismos (Figura 20E). Estos resultados demuestran la importancia de la señalización por TNFR1 en el primado de osteoclastos durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Las diferencias observadas en la capacidad de diferenciación de osteoclastos no se debieron a diferencias en la colonización bacteriana del hueso dado que al evaluar la carga bacteriana en ratones salvajes o *tnfr1^{-/-}* no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 20C).

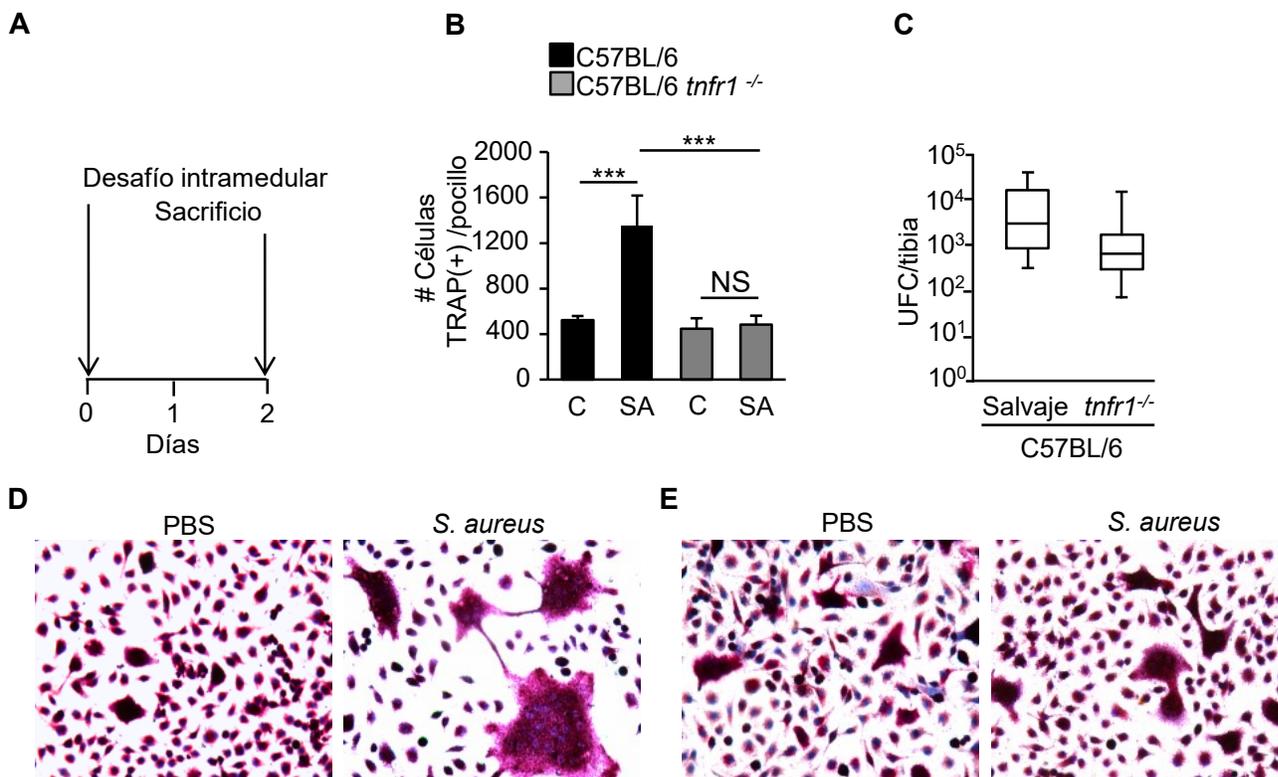


Figura 20. Vías de señalización implicadas en la diferenciación de osteoclastos durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. (A) Diseño experimental. Ratones C57BL/6 (B, D) o *tnfr1*^{-/-} (B, E) fueron inoculados intramedularmente en la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1x10⁶ UFC de *S. aureus* (SA) o PBS (C) como control. (B, D, E) Cuarenta y ocho horas luego del desafío se obtuvieron precursores de osteoclastos, los cuales fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con RANKL (50 ng/ml). A los 5 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de los valores obtenidos para cada grupo de ratones (n=3-7 ratones por grupo, evaluados en 3 experimentos independientes). Las células provenientes de cada ratón fueron ensayadas en pocillos por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). ***P < 0.001. NS: no significativo. (D, E) Aumento: 20X. (C) Carga bacteriana en hueso. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo (n=8-10) con sus respectivas medianas, máximo y mínimo.

4.3.1.3. La proteína A contribuye a la inducción de mediadores inflamatorios durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.

Considerando que *S. aureus* y la proteína A indujeron niveles significativos de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en precursores de osteoclastos *in vitro*, se cuantificaron los niveles de dichas citoquinas durante la infección ósea *in vivo* y se evaluó la contribución de la proteína A en la inducción de las mismas. Para ello, grupos de ratones fueron inoculados intramedularmente en la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1x10⁶ UFC de *S. aureus*, la mutante SpA- o PBS como control. A los 14 días luego del desafío se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en hueso. La infección por *S. aureus* y la mutante isogénica SpA- indujo un aumento significativo en la producción de IL-1 β (Figura 21B y 21C) el cual no se observó en los animales control (21A). Sin embargo, los niveles de

dicha citoquina en respuesta a la mutante SpA- fueron menores a los observados en respuesta a *S. aureus*. A su vez, los niveles de IL-1 β en la tibia izquierda infectada resultaron significativamente menores en los ratones desafiados con la mutante SpA- respecto del grupo inoculado con *S. aureus* (Figura 21D).

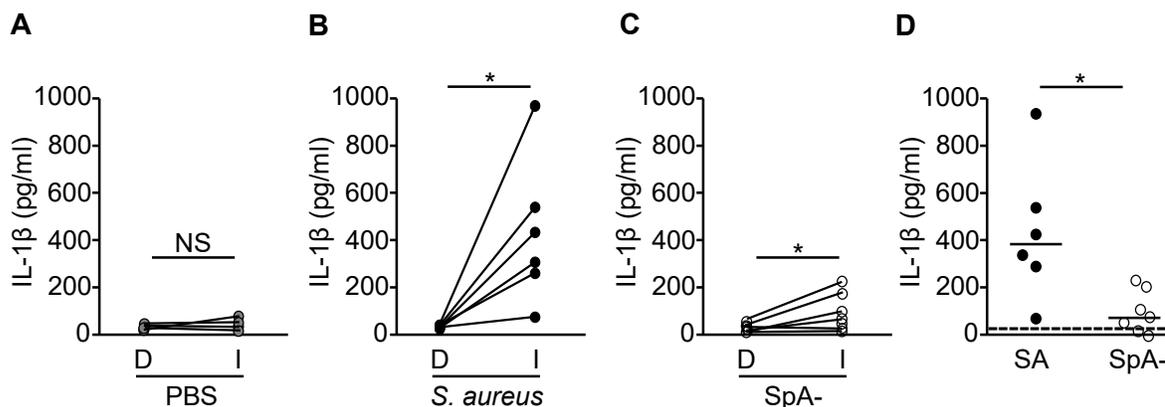


Figura 21. Inducción de IL-1 β durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Se cuantificaron los niveles de IL-1 β por ELISA en el sobrenadante de los homogenatos de hueso de ratones inoculados con PBS (n=4) (A), *S. aureus* (n=6) (B) o la mutante SpA- (n=7) (C) a los 14 días luego del desafío. Cada par de puntos corresponde a los valores obtenidos en la tibia izquierda inoculada (I) y la tibia derecha no inoculada (D) para cada ratón individual. Los datos fueron analizados mediante la prueba pareada no paramétrica de Wilcoxon * $P < 0.05$. NS: no significativo. (D) Cada punto representa los niveles de IL-1 β en la tibia izquierda de ratones desafiados con *S. aureus* o la mutante SpA-. La línea punteada indica la mediana de los valores obtenidos para la tibia izquierda de ratones inoculados con PBS. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Mann Whitney * $P < 0.05$.

Al evaluar la producción de IL-6 se observó mayor dispersión entre animales individuales en la inducción de dicha citoquina que la observada en la producción de IL-1 β . Sin embargo, los niveles de IL-6 producidos en respuesta a la infección con *S. aureus* fueron mayores a los observados en los ratones desafiados con la mutante SpA- (Figura 22B y 22C). La ausencia de la proteína A en la infección resultó en una menor producción de IL-6 en comparación a los niveles observados en ratones desafiados con *S. aureus* (Figura 22D).

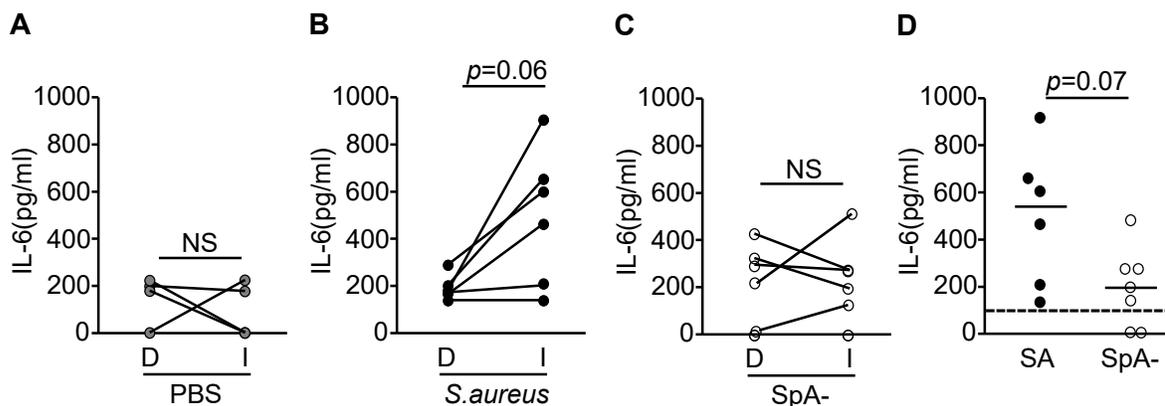


Figura 22. Inducción de IL-6 durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Se cuantificaron los niveles de IL-6 por ELISA en el sobrenadante de los homogenatos de hueso de ratones inoculados con PBS (n=4) (A), *S. aureus* (n=6) (B) o la mutante SpA- (n=7) (C) a los 14 días luego del desafío. Cada par de puntos corresponde a los valores obtenidos en la tibia izquierda inoculada (I) y la tibia derecha no inoculada (D) para cada ratón individual. Los datos fueron analizados mediante la prueba pareada no paramétrica de Wilcoxon. NS: no significativo (D) Cada punto representa los niveles de IL-6 en la tibia izquierda de ratones desafiados con *S. aureus* o la mutante SpA-. La línea punteada indica la mediana de los valores obtenidos para la tibia izquierda de ratones inoculados con PBS. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Mann Whitney. NS: no significativo.

En forma similar a lo observado respecto de IL-1 β , se detectó una menor inducción de TNF- α frente al desafío con la mutante SpA- (Figura 23C) en comparación a la producción de dicha citoquina en respuesta a *S. aureus* (Figura 23B). Los niveles de TNF- α inducidos en las tibias infectadas por la mutante SpA- resultaron menores en comparación a los observados en respuesta a *S. aureus* (Figura 23D). Se evaluaron, además, los niveles de IL-10 e INF- γ presentes en hueso durante la infección ósea en respuesta a *S. aureus*, no se observándose producción de dichas citoquinas (resultados no mostrados).

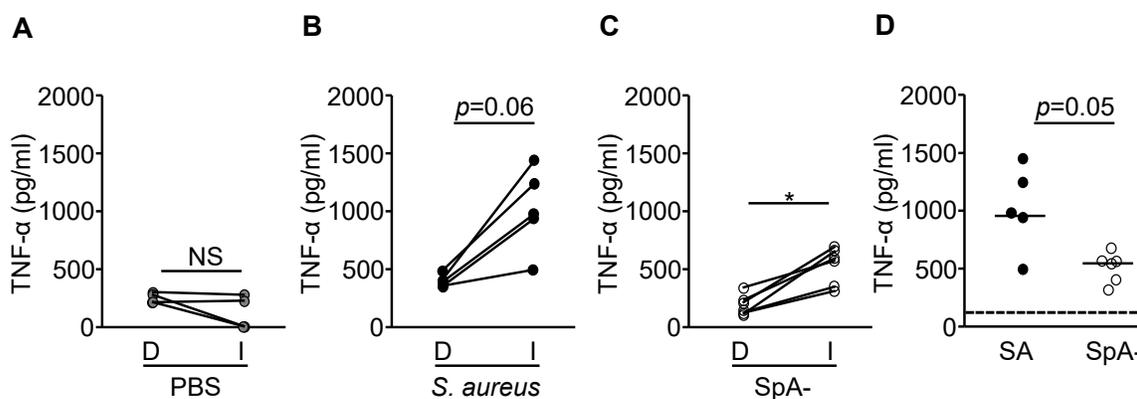


Figura 23. Inducción de TNF- α durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Se cuantificaron los niveles de TNF- α por ELISA en el sobrenadante de los homogenatos de hueso de ratones inoculados con PBS (n=4) (A), *S. aureus* (n=5) (B) o la mutante SpA- (n=6) (C) a los 14 días luego del desafío. Cada par de puntos corresponde a los valores obtenidos en la tibia izquierda inoculada (I) y la tibia derecha no inoculada (D) para cada ratón individual. Los datos fueron analizados mediante la prueba pareada no paramétrica de Wilcoxon * $P < 0.05$. (D) Cada punto representa los niveles de TNF- α en la tibia izquierda de ratones desafiados con *S. aureus* o la mutante SpA-. La línea punteada indica la mediana de los valores obtenidos para la tibia izquierda de ratones inoculados con PBS. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Mann Whitney.

4.3.1.4. La expresión de proteína A contribuye al daño óseo durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.

Posteriormente, determinamos las consecuencias de la presencia de los niveles de citoquinas incrementados y de la actividad osteoclastogénica exacerbada durante la infección experimental por *S. aureus* en la integridad del hueso a los 14 días luego del desafío experimental. Para ello, grupos de ratones BALB/c de 10 semanas de edad fueron inoculados intramedularmente en la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1×10^6 UFC de *S. aureus* o de la mutante SpA-. Como control se utilizaron grupos de ratones inoculados con PBS. Se evaluaron los cambios en la densidad mineral ósea volumétrica de las tibias desafiadas con *S. aureus* mediante el análisis de imágenes de microtomografía computada (micro-CT). Se cuantificó el grado de destrucción de la masa ósea cortical y la formación de tejido óseo nuevo a los 14 días luego del desafío. La infección por *S. aureus* indujo un incremento significativo en la pérdida de hueso cortical afectando áreas de la tibia, tanto cercanas, como lejanas del punto de inoculación (Figura 24A y 24B). Por el contrario, la destrucción ósea observada en respuesta al desafío con la mutante SpA- se localizó principalmente en el área cercana al punto de inoculación y resultó equivalente a la observada en los ratones inoculados con PBS (Figura 24A y 24B). Vistas completas en 3D de huesos representativos de cada grupo pueden observarse siguiendo los siguientes enlaces:

Control (<https://youtu.be/BqAqYbS-4Uo>)

S. aureus (<https://youtu.be/vX3nzw18WNw>)

SpA- (<https://youtu.be/v3cXOCnq0Ac>)

Al evaluar la formación reactiva de hueso, se observó mayor formación de hueso nuevo en las tibias de los ratones desafiados con la mutante SpA-, respecto de la cuantificada en huesos inoculados con *S. aureus* aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 24C). Al evaluar la carga bacteriana en hueso a los 14 días luego de la inoculación no se observaron diferencias en la colonización entre los huesos de los ratones infectados con *S. aureus* y aquellos inoculados con la mutante SpA- (Figura 24 D).

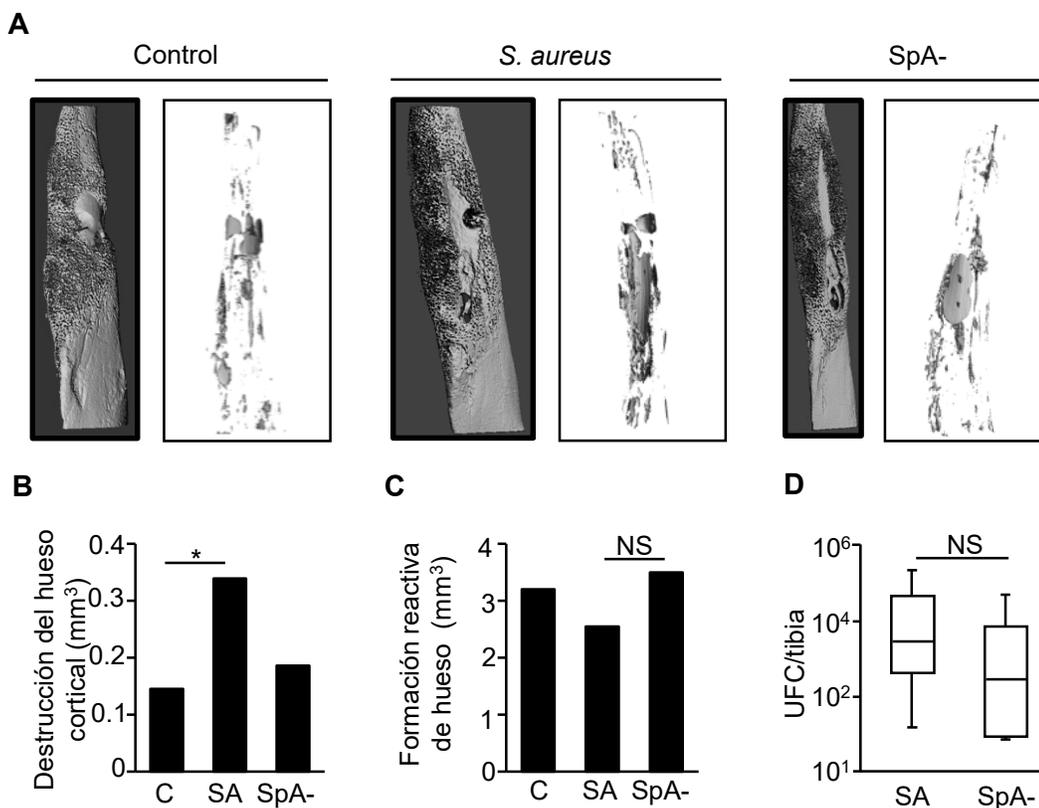


Figura 24. Cambios en la densidad mineral ósea volumétrica inducidos por la proteína A de *S. aureus*. Análisis por micro-CT de tibias inoculadas con *S. aureus* (SA), la mutante SpA- o PBS como control a los 14 días luego del desafío. **(A)** Para cada par de imágenes, en el panel izquierdo las zonas de bordes irregulares corresponden a la formación reactiva de hueso y en el panel derecho se muestran en gris las áreas de hueso dañadas. **(B)** Cuantificación de la destrucción de hueso cortical. **(C)** Formación reactiva de hueso. **(B, C)** Las barras representan la mediana para cada grupo (*S. aureus*: n=5, SpA-: n=5, PBS: n=3). Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Mann Whitney **P* <0.05. **(D)** Carga bacteriana en hueso de ratones inoculados con *S. aureus* (SA) o la mutante SpA-. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo (n=8-13) con sus respectivas medianas, máximo y mínimo.

4.3.2. Contribución de la señalización inducida por la proteína A de *S. aureus* en el desarrollo de osteomielitis en un modelo experimental en rata.

A fin de evaluar el impacto de la expresión de la proteína A en el desarrollo de osteomielitis experimental a tiempos prolongados luego del desafío, grupos de ratas de 7 semanas de edad de la

cepa Wistar fueron inoculadas en la tibia izquierda con 1×10^6 UFC de *S. aureus* o la mutante isogénica que no expresa proteína A (SpA-). Dada la importancia de la actividad de las metaloproteinasas en la degradación ósea y en particular el rol de la MMP-9 en la degradación de colágeno, se determinó la actividad de la misma en los homogenatos de las tibias infectadas, como un indicador de la presencia de osteoclastos funcionales. A las 10 semanas luego de la inoculación se observó que la actividad proteolítica de MMP-9 resultó ser significativamente mayor en la tibia de las ratas desafiadas con *S. aureus* respecto de las desafiadas con la mutante SpA- (Figura 25).

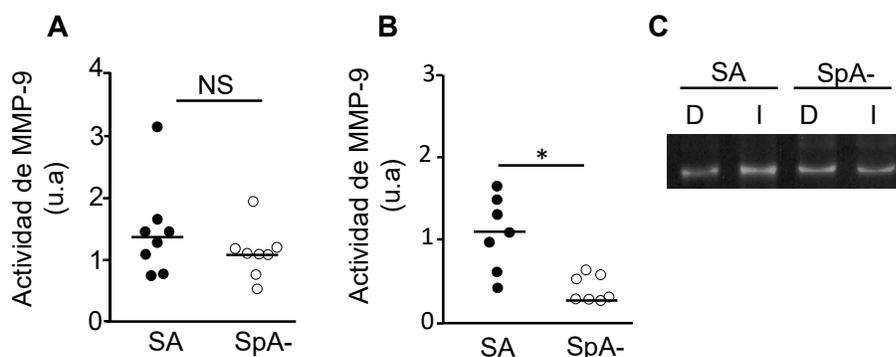


Figura 25. Contribución de la proteína A de *S. aureus* en la producción de MMP-9 *in vivo* durante la osteomielitis experimental. Grupos de ratas fueron desafiadas con *S. aureus* o la mutante SpA-. Se determinó la actividad proteolítica de MMP-9 en los homogenatos de las tibias infectadas como medida indirecta de actividad de los osteoclastos y se calculó el cociente de actividad entre la tibia infectada y la control a las 96 horas (n=8) **(A)** y 10 semanas (n=7) **(B)** luego del desafío. Cada punto corresponde a un animal individual. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Mann Whitney * $P < 0.05$. **(C)** Gel representativo de la actividad proteolítica de MMP-9.

Paralelamente, al evaluar macroscópicamente la lesión ósea generada por la infección se observó un engrosamiento del hueso en el punto de inoculación (respecto del diámetro del hueso derecho no infectado) el cual se definió como el índice osteomielítico (I.O.). Al comparar el I.O. en los diferentes grupos, se observó que el mismo resultó significativamente mayor en ratas inoculadas con *S. aureus* con respecto al observado en ratas inoculadas con la mutante SpA- a todos los tiempos evaluados (96 horas, 10 y 15 semanas), siendo mayor la lesión a las 15 semanas post-inoculación (Figura 26A-C).

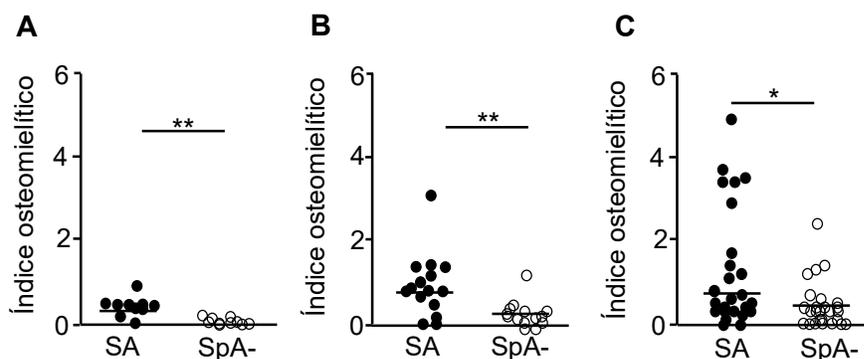


Figura 26. Contribución de la proteína A de *S. aureus* en el daño óseo durante la osteomielitis experimental. Grupos de ratas fueron desafiadas con *S. aureus* o la mutante SpA-. Se determinó el I.O. a las 96 horas (n=10) (A), 10 semanas (n= 15-14) (B) y 15 semanas (n=25-24) (C) luego del desafío. Cada punto corresponde a una ratita individual. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Mann Whitney * $P < 0.05$.

El análisis histopatológico de cortes de hueso obtenidos a las 96 horas luego de la inoculación reveló congestión y un exudado leve de neutrófilos en el sitio de inoculación el cual fue similar en las ratas desafiadas con *S. aureus* respecto de las inoculadas con la mutante SpA- (Figura 27C y 27E). A las 15 semanas luego del desafío se observó en tibias provenientes de animales inoculados con *S. aureus* la presencia de abscesos con picocitos y leucocitos polimorfonucleares (Figura 27D) y zonas de degradación ósea y formación de secuestros (fragmentos de hueso necrótico, no vascularizado) (Figura 27D). Por el contrario, las imágenes de los huesos provenientes de ratas inoculadas con la mutante SpA- (Figura 27F) en las cuales el tejido de granulación fue proporcionalmente mayor que los abscesos, resultaron similares a las de los animales inoculados con PBS (Figura 27B) y mostraron estructuras óseas conservadas.

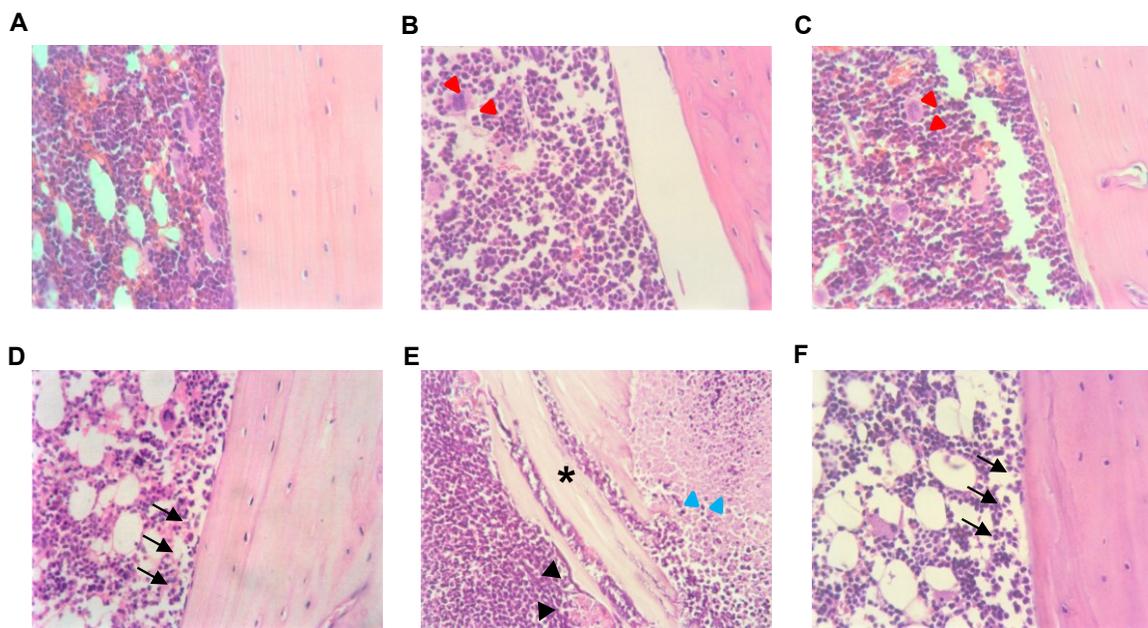


Figura 27. Contribución de la proteína A de *S. aureus* en el daño óseo durante la osteomielitis experimental. Grupos de ratas fueron desafiadas con *S. aureus* (B, E) la mutante SpA- (C, F) o PBS (A, D) como control. Se determinaron los cambios histopatológicos a las 96 horas (A, B, C) y 15 semanas (D, E, F) luego del desafío. En (B, C) se observa un infiltrado inflamatorio leve (puntas de flecha rojas). En (E) se observa un intenso infiltrado inflamatorio de la médula ósea (punta de flecha negra), fragmentos de hueso necrótico (asterisco) y un absceso (puntas de flecha azul). En (F) se observa la infección mayoritariamente resuelta en comparación con el hueso control (D) donde se distinguen estructuras óseas conservadas (flechas negras). (A-F): Aumento 45X.

Luego se evaluó la presencia de osteoclastos en cortes histológicos de hueso de los diferentes grupos de ratas. Se observó la presencia de un mayor número de osteoclastos en las tibias provenientes de ratas inoculadas con *S. aureus* en comparación con las provenientes de ratas inoculados con la mutante SpA- (Figura 28) las cuales resultaron similares al grupo control.

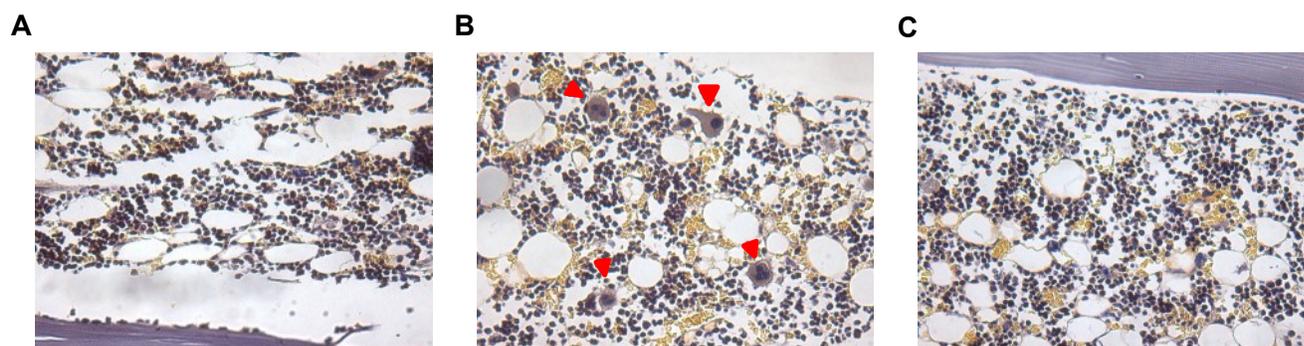


Figura 28. Contribución de la proteína A de *S. aureus* en la diferenciación de osteoclastos *in vivo*. Grupos de ratas fueron desafiadas con *S. aureus* (B), la mutante SpA- (C), o PBS (A) como control. A las 15 semanas luego del desafío se realizó la tinción de TRAP en cortes de hueso de los diferentes grupos. Las puntas de flecha rojas señalan osteoclastos. Aumento: 40x.

Al evaluar el desarrollo de la infección ósea, se observó que la disminución de las lesiones óseas en las ratas inoculadas con la mutante SpA- respecto de las desafiadas con *S. aureus*, se acompañó de una reducción significativa en la carga bacteriana en hueso a las 10 y 15 semanas luego del desafío (Figura 29A y 29B). Debido a que durante las infecciones crónicas por *S. aureus*, en particular la osteomielitis, se ha descrito la formación de variantes puntiformes [142,170] evaluamos si las diferencias observadas en la eliminación bacteriana entre las dos cepas se debía a la formación diferencial de dichas variantes. El porcentaje de variantes puntiformes observado a las 15 semanas luego del desafío no sólo resultó similar entre las dos cepas sino que fue lo suficientemente bajo como para descartar que la aparente mayor eliminación de la mutante SpA- se debiera a una mayor transformación hacia el fenotipo de variante puntiforme (Figura 29C).

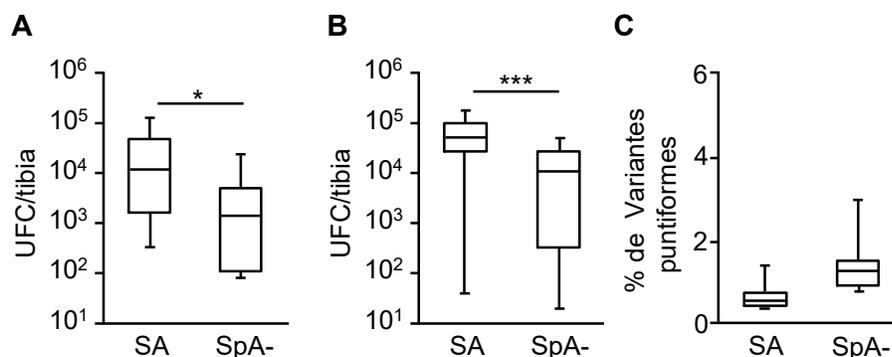


Figura 29. Contribución de la proteína A en la colonización bacteriana durante la osteomielitis experimental por *S. aureus*. Carga bacteriana en hueso de ratas inoculadas con *S. aureus* (SA) o la mutante SpA- a las 10 semanas (n= 15-14) (A) y a las 15 semanas (B) (n=25-24) y (C) (n=16-11) luego del desafío. En (B) la colonización corresponde a las UFC totales. En (C) se muestra el porcentaje de UFC que corresponden a variantes puntiformes. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Mann Whitney * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

4.3.3. Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que la proteína A posee un rol crítico en la activación temprana de osteoclastos y en la inducción de mediadores inflamatorios durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Asimismo, se demostró la importancia de la señalización por TNFR1 en el primado de osteoclastos durante la osteomielitis experimental. La expresión de la proteína A resultó, además, crítica en el desarrollo de daño óseo, evidenciado por alteraciones histopatológicas en el tejido óseo y por la inducción de cambios en la densidad mineral ósea volumétrica durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.

4.4. IMPACTO DE LA NEUTRALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA A EN LA OSTEOCLASTOGÉNESIS DURANTE LOS ESTADIOS INICIALES DE LA INFECCIÓN ÓSEA POR *S. aureus*.

Luego de establecer la importancia de la proteína A en la inducción de osteoclastogénesis y el impacto de dicho proceso en el daño óseo durante la infección por *S. aureus* se evaluó la potencialidad del uso de anticuerpos neutralizantes contra la proteína A para prevenir la diferenciación de osteoclastos y la inducción de mediadores inflamatorios.

4.4.1. La neutralización de la proteína A previene la diferenciación de osteoclastos y la producción de mediadores inflamatorios inducidos por *S. aureus in vitro*.

La potencialidad del uso de un anticuerpo neutralizante contra la proteína A se evaluó en primera instancia en ensayos *in vitro*. Para ello, los precursores de osteoclastos fueron estimulados con *L. lactis* que expresa SpA (*L. lactis* SpA) en presencia o ausencia de dicho anticuerpo. Se determinó que la presencia del anticuerpo produjo un bloqueo significativo de la diferenciación de osteoclastos en respuesta a *L.lactis* SpA. Se verificó la especificidad del bloqueo del anticuerpo contra la proteína A estimulando células con RANKL en presencia de dicho anticuerpo (Figura 30A y 30B).

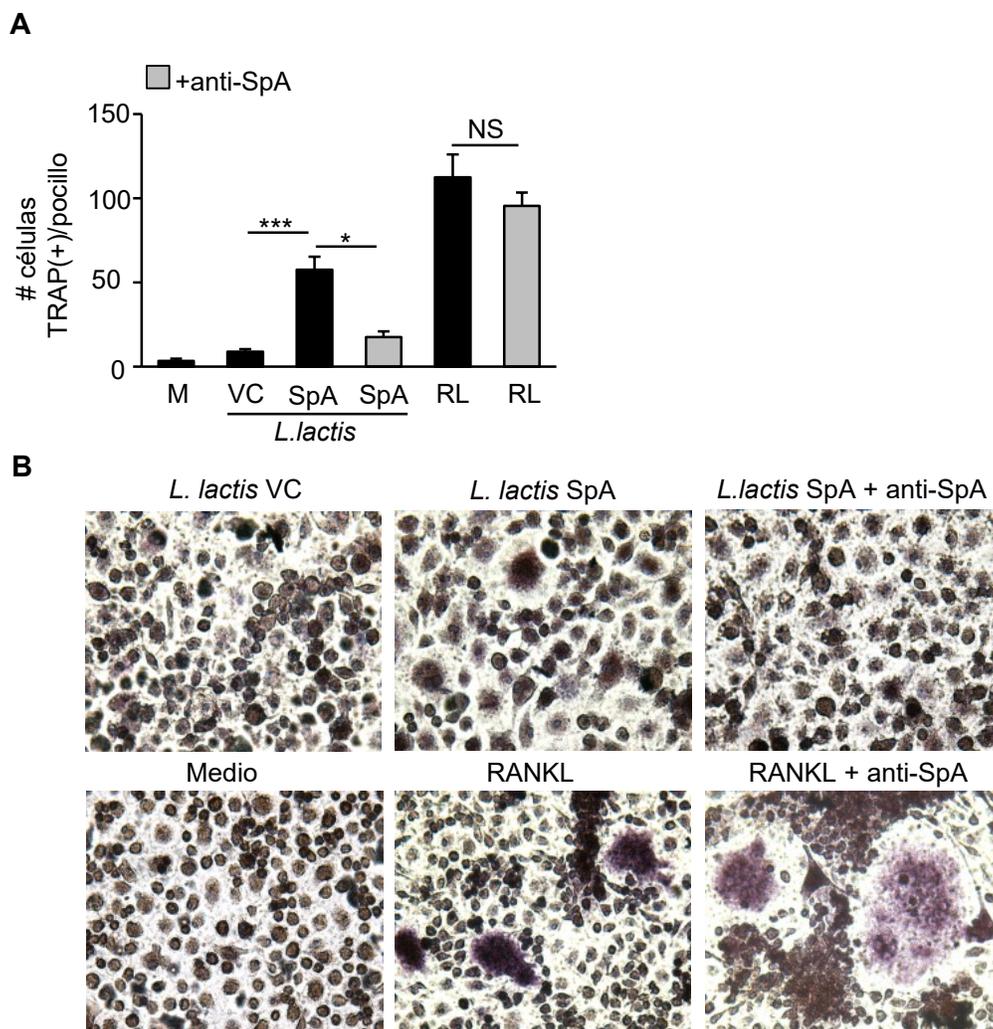


Figura 30. Inhibición de la osteoclastogénesis inducida por la proteína A mediante un anticuerpo neutralizante. (A) Precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con suspensiones bacterianas (10^8 UFC/ml) inactivadas previamente por calentamiento de *L. lactis* portando un vector control (*L. Lactis* VC) o expresando proteína A (*L. Lactis* SpA) en presencia (barras grises) o ausencia (barras negras) de un anticuerpo neutralizante contra la proteína A (500 μ g/ml). RANKL (RL, 50 ng/ml) fue utilizado como control positivo. A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). NS: no significativo * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. **(B)** Aumento: 20X

Posteriormente, se evaluó el potencial de bloqueo del anticuerpo anti-proteína A en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*. Se observó, en presencia del anticuerpo, una disminución significativa en el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a *S. aureus* respecto del obtenido en ausencia del anticuerpo (Figura 31A y 31B). Los niveles de osteoclastogénesis resultaron equivalentes a los observados en respuesta a la mutante que no expresa proteína A (Figura 31A).

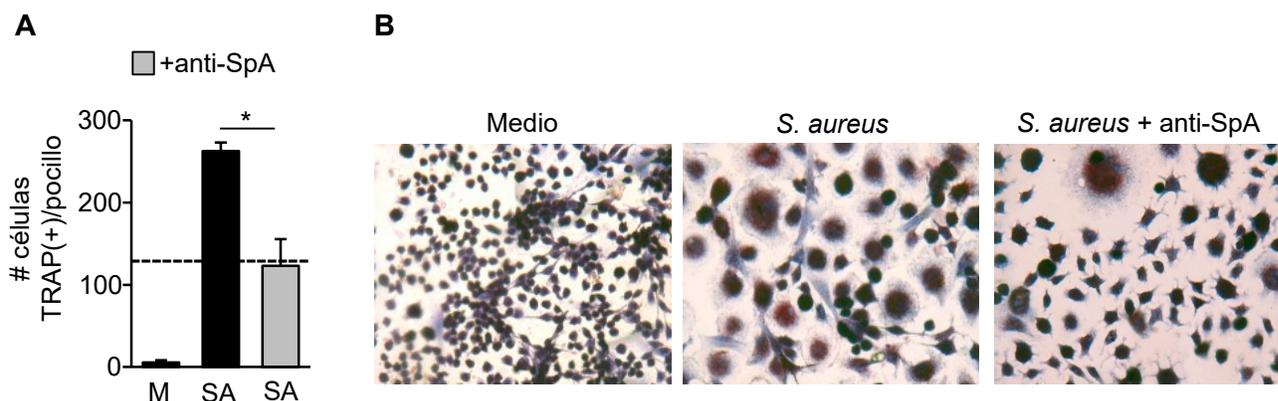


Figura 31. Inhibición de la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* mediante un anticuerpo neutralizante contra la proteína A. (A) Precusores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con una suspensión bacteriana (10^8 UFC/ml) inactivada por calentamiento de *S. aureus* FPR3757 (SA) en presencia (barra gris) o ausencia (barra negra) de un anticuerpo neutralizante contra la proteína A (500 μ g/ml). A los 9 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. La línea de puntos representa el número de osteoclastos diferenciados en respuesta a la mutante que no expresa proteína A (SpA-). Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.05$. (B) Aumento: 20X.

Se determinó asimismo, la capacidad del anticuerpo neutralizante contra la proteína A de inhibir la inducción de citoquinas pro-inflamatorias. Para ello se evaluó la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en precusores de osteoclastos estimulados con *S. aureus* en presencia y ausencia de dicho anticuerpo. Se observó que la neutralización de la proteína A inhibió significativamente la producción de citoquinas inflamatorias (Figura 32A-C). Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α producidos por los precusores de osteoclastos en presencia del anticuerpo fueron equivalentes a los inducidos por la mutante SpA- (Figura 32A-C).

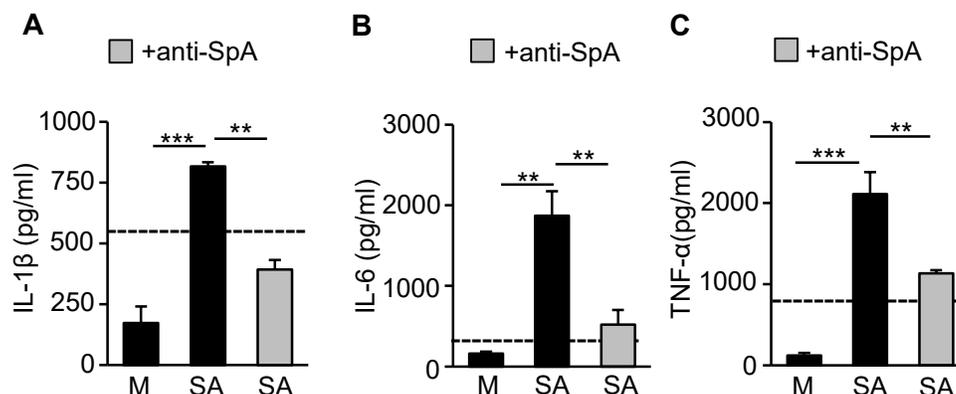


Figura 32. Inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta al estímulo con *S. aureus* por neutralización de la proteína A. Precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c fueron estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con *S. aureus* FPR3757 (SA, 10^8 UFC/ml) en presencia (barra gris) o ausencia (barra negra) de un anticuerpo neutralizante contra la proteína A (500 μ g/ml). A las 24 horas luego de la estimulación se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de tres experimentos independientes realizados en pocillos por duplicado para cada condición. La línea de puntos representa el promedio de citoquinas producidas en respuesta a la mutante SpA-. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.4.2. La neutralización de la proteína A previene la diferenciación de osteoclastos inducida por *S. aureus* *in vivo*.

Considerando que mediante la neutralización de la proteína A se logró un bloqueo significativo en la osteoclastogénesis y se previno significativamente la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en respuesta a *S. aureus* *in vitro*, se procedió a evaluar la capacidad de dicho anticuerpo de prevenir la diferenciación de osteoclastos durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Para ello, grupos de ratones de 10 semanas de edad fueron inmunizados pasivamente por ruta intraperitoneal con el anticuerpo neutralizante contra la proteína A o con suero normal de conejo (placebo) 24 horas antes del desafío intramedular de la tibia izquierda con una suspensión conteniendo 1×10^6 UFC de *S. aureus* o PBS como control (Figura 33A). A las 48 horas luego del desafío se realizaron ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo*. Los precursores de osteoclastos provenientes de animales inmunizados con el anticuerpo contra la proteína A y desafiados con *S. aureus* no sólo mostraron menor capacidad de diferenciarse a osteoclastos maduros en respuesta a RANKL que aquellos provenientes de animales placebo desafiados con *S. aureus*, sino que su capacidad de diferenciación no difirió de la observada en el grupo control inoculado con PBS (Figura 33B y 33D). Estos resultados demuestran la importancia de la neutralización de la proteína A en la prevención del primado de precursores de osteoclastos durante los estadios iniciales de la infección por *S. aureus*. Considerando la relevancia de este resultado y que la interacción entre la bacteria y el huésped puede variar de acuerdo al hospedador y por lo tanto la acción del anticuerpo

también puede verse afectada, los resultados obtenidos con precursores de osteoclastos provenientes de ratones BALB/c (Figura 33B y 33D) fueron confirmados utilizando precursores provenientes de ratones C57BL/6 (Figura 33C y 33E).

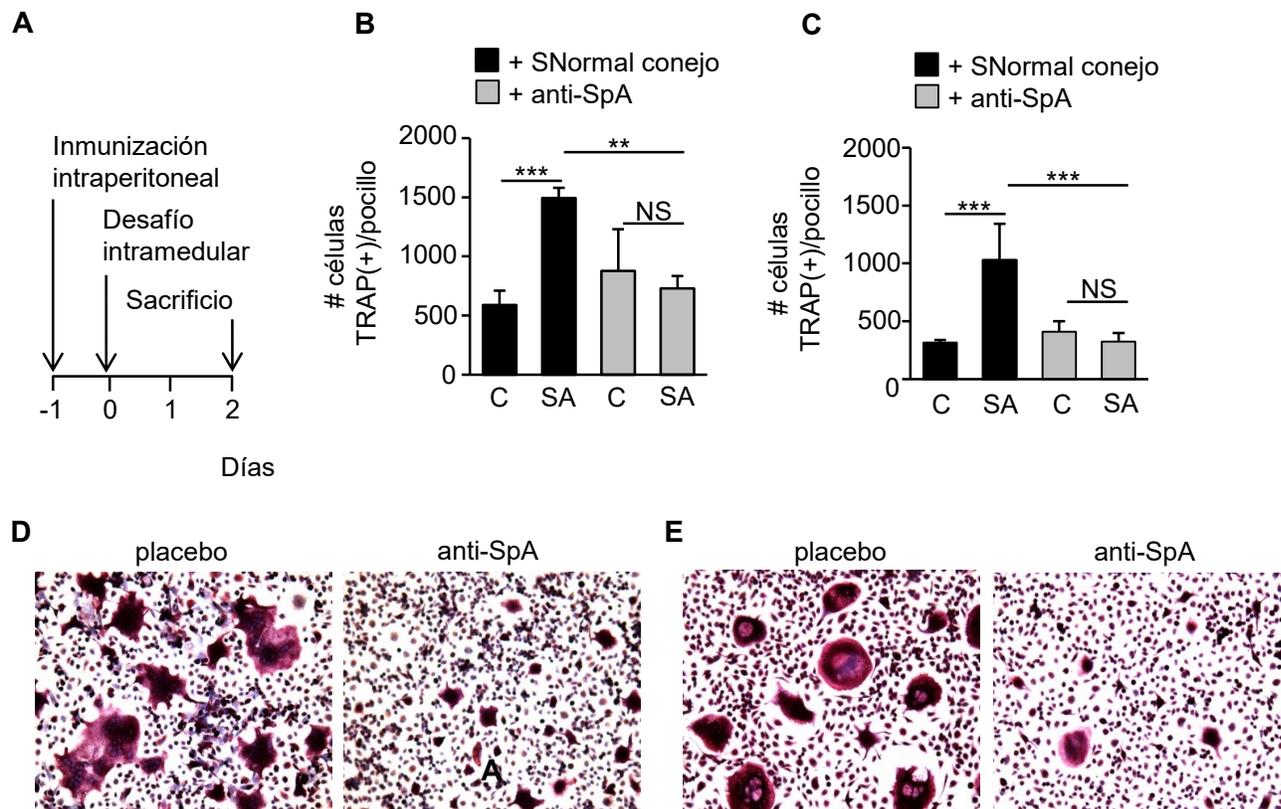


Figura 33. Inhibición del primado de osteoclastos inducido por *S. aureus* mediante neutralización de la proteína A. (A) Diseño experimental. La inmunización se realizó a razón de 75 mg de anticuerpo por kg de peso. El grupo placebo recibió suero normal de conejo. El desafío se realizó con PBS (C) o *S. aureus* (SA, 10^6 UFC/tibia). **(B-E)** Cuarenta y ocho horas luego del desafío de ratones BALB/c **(B, D)** o C57BL/6 **(C, E)** se obtuvieron precursores de osteoclastos los cuales fueron subsecuentemente estimulados en presencia de M-CSF (30 ng/ml) con RANKL (50ng/ml). A los 5 días luego de la estimulación se cuantificó el número de osteoclastos. Las barras indican el promedio y el desvío estándar de los valores obtenidos para cada grupo de ratones (n=2). Las células provenientes de cada ratón fueron ensayadas en pocillos por triplicado. Los datos fueron analizados mediante el test de Bonferroni (ANOVA paramétrico). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. **(D, E)** Aumento: 10X placebo: *S. aureus* + Suero normal de conejo; anti-SpA: *S. aureus* + anticuerpo contra SpA.

4.4.3. La neutralización de la proteína A modula la producción de mediadores inflamatorios durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.

En función de los resultados obtenidos que demuestran la factibilidad de utilizar un anticuerpo neutralizante contra la proteína para prevenir la diferenciación de osteoclastos durante los estadios iniciales de la infección por *S. aureus*, se decidió evaluar la capacidad de dicho anticuerpo de inhibir la inducción de respuesta inflamatoria en hueso. Para ello, en un primer experimento exploratorio grupos de ratones de 10 semanas de edad fueron inmunizados pasivamente por ruta intraperitoneal

Considerando que una única inmunización previa al desafío con *S. aureus* no resultó efectiva para inhibir la producción de mediadores inflamatorios, se evaluó a continuación un esquema de inmunización que contempló dos dosis de anticuerpo contra la proteína A (grupo inmunizado) o dos dosis de suero normal de conejo (grupo placebo) (Figura 35).

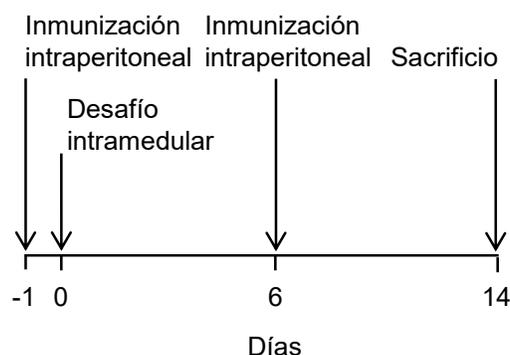


Figura 35. Diseño experimental. La inmunización se realizó a razón de 75 mg de anticuerpo por kg de peso en los días indicados. El grupo placebo recibió suero normal de conejo. El desafío se realizó con *S. aureus* (SA, 10^6 UFC/tibia).

Al evaluar la respuesta inflamatoria en hueso a los 14 días luego de la infección se observó que el esquema de inmunización utilizado resultó efectivo para inhibir la producción de IL-1 β durante la infección por *S. aureus* (Figura 36A y 36B). Los niveles de dicha citoquina en la tibia infectada a los 14 días luego del desafío con *S. aureus* resultaron menores en los ratones inmunizados que en el grupo control (Figura 36C).

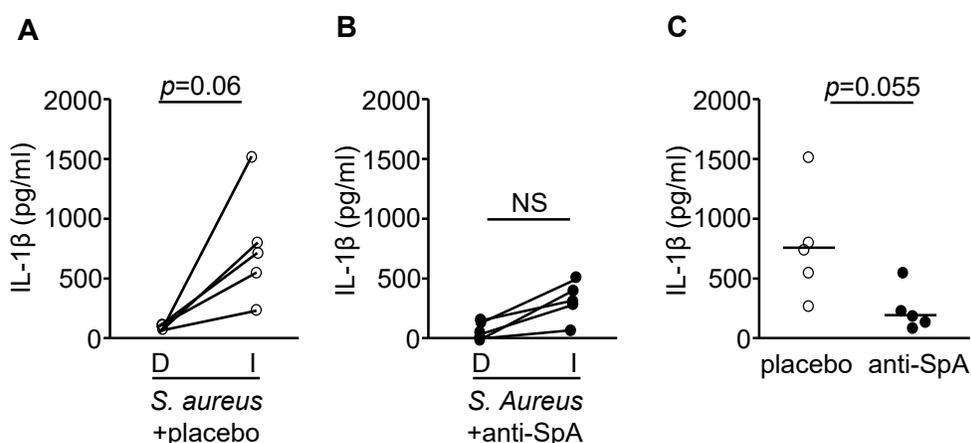


Figura 36. Efecto de la neutralización de la proteína A en la producción de IL-1 β en respuesta al desafío con *S. aureus*. Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados por ruta intraperitoneal con suero normal de conejo (placebo, n=5) (A, C) o un anticuerpo contra la proteína A (anti-SpA, n=5) (B, C) 24 horas previas y 6 días luego del desafío con *S. aureus* (SA) (10^6 UFC/tibia). A los 14 días se cuantificaron los niveles de IL-1 β por ELISA en los homogenatos de hueso. Cada par de puntos corresponde a los valores obtenidos para la tibia izquierda inoculada (I) y la tibia derecha no inoculada (D) en cada ratón individual. (C) Los puntos representan los niveles de IL-1 β en la tibia izquierda de ratones individuales pertenecientes al grupo placebo o inmunizados (anti-SpA). Los datos fueron analizados mediante la prueba pareada no paramétrica de Wilcoxon. NS: no significativo.

En contraposición a lo observado al utilizar una única dosis de anticuerpo, no se observó bloqueo de la producción de IL-6 frente al desafío con *S. aureus* (Figura 37A y 37B). Los niveles de IL-6 no difirieron entre los ratones inmunizados con respecto a los que recibieron suero normal de conejo (Figura 37C).

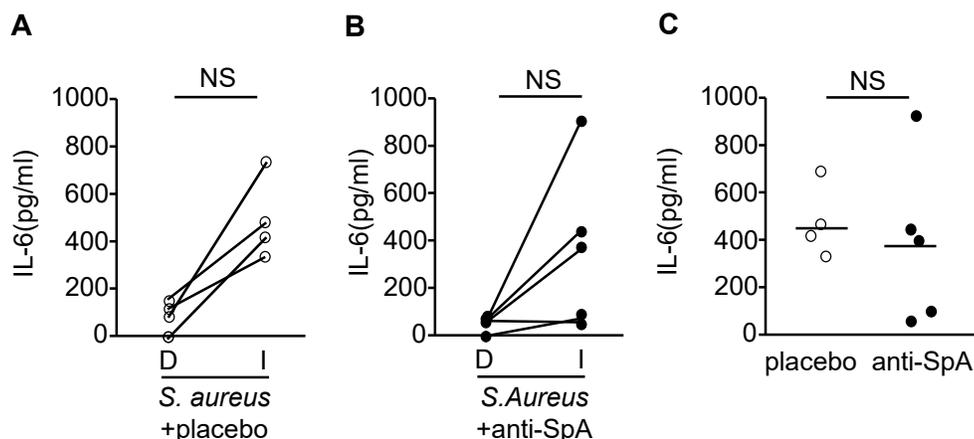


Figura 37. Efecto de la neutralización de la proteína A en la producción de IL-6 en respuesta al desafío con *S. aureus*. Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados por ruta intraperitoneal con suero normal de conejo (placebo, n=4) (A, C) o un anticuerpo contra la proteína A (anti-SpA, n=5) (B, C) 24 horas previas y 6 días posteriores al desafío intramedular con *S. aureus* (SA) (10^6 UFC/tibia). A los 14 días luego de la inoculación se cuantificaron los niveles de IL-6 por ELISA en los homogenatos de hueso. Cada par de puntos corresponde a los valores obtenidos para la tibia izquierda inoculada (I) y la tibia derecha no inoculada (D) en cada ratón individual. (C) Los puntos representan los niveles de IL-6 detectados en la tibia izquierda de ratones individuales pertenecientes al grupo placebo o inmunizados (anti-SpA). Los datos fueron analizados mediante la prueba pareada no paramétrica de Wilcoxon. NS: no significativo.

En forma similar a lo observado respecto de IL-1 β , se detectó una menor inducción de TNF- α frente al desafío con *S. aureus* en el grupo inmunizado con el anticuerpo contra la proteína A (Figura 38A y 38B) a diferencia de los resultados obtenidos utilizando una única dosis de anticuerpo (Figura 34D). Los niveles de TNF- α inducidos en hueso durante la infección por *S. aureus* resultaron menores en el grupo inmunizado en comparación con el grupo placebo aunque las diferencias no alcanzaron aún significancia estadística (Figura 38C).

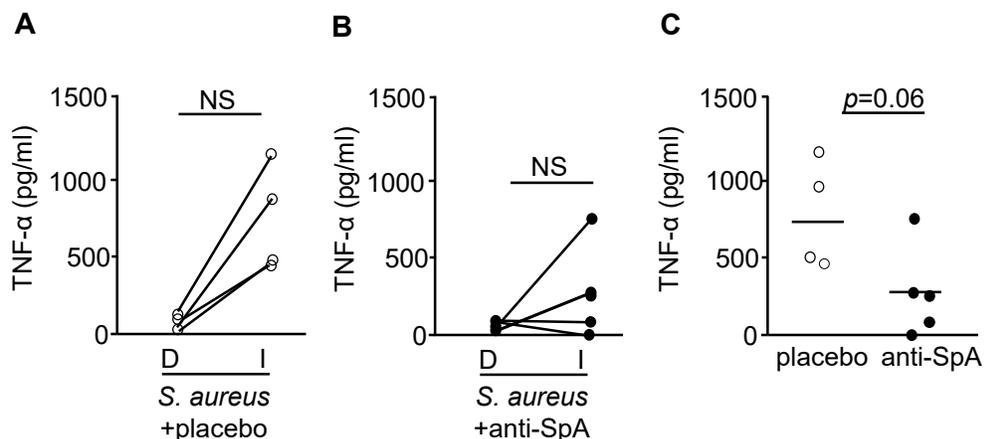


Figura 38. Efecto de la neutralización de la proteína A en la producción de TNF- α en respuesta al desafío con *S. aureus*. Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados por ruta intraperitoneal con suero normal de conejo (placebo, n=4) (A, C) o un anticuerpo contra la proteína A (anti-SpA, n=5) (B, C) 24 horas previas y 6 días posteriores al desafío intramedular con *S. aureus* (SA) (10^6 UFC/tibia). A los 14 días luego de la inoculación se cuantificaron los niveles de TNF- α por ELISA en los homogenatos de hueso. Cada par de puntos corresponde a los valores obtenidos para la tibia izquierda inoculada (I) y la tibia derecha no inoculada (D) en cada ratón individual. (C) Los puntos representan los niveles de TNF- α detectados en la tibia izquierda de ratones individuales pertenecientes al grupo placebo o inmunizados (anti-SpA). Los datos fueron analizados mediante la prueba pareada no paramétrica de Wilcoxon. NS: no significativo.

4.4.4. Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos indican la capacidad de un anticuerpo neutralizante contra la proteína A de prevenir la diferenciación de osteoclastos inducida durante los estadios iniciales de la infección por *S. aureus*. Asimismo se demostró la potencialidad de disminuir la respuesta inflamatoria desencadenada durante la infección por *S. aureus* mediante la neutralización de la proteína A. No obstante, resulta necesario realizar futuros experimentos ajustando la dosis y los tiempos de administración del anticuerpo anti-proteína A para corroborar la importancia de la neutralización de esta proteína en la reducción de los mediadores de daño óseo.

5. DISCUSIÓN.

5.1. DISCUSIÓN.

La osteomielitis presenta un alto nivel de importancia dentro de la salud pública, sin embargo, aunque resulte sorprendente, existe un escaso conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la degradación ósea que se observa como consecuencia de la infección por *S. aureus*. Con el fin de lograr un mayor entendimiento de la patogenia de las infecciones óseas por este patógeno varios estudios se han concentrado en la interacción *in vitro* de *S. aureus* con los osteoblastos [38,71] debido a la reconocida capacidad de dichas células de sensar y responder a las señales del medio externo y modular la diferenciación y funcionalidad de los osteoclastos [9]. Más recientemente se ha demostrado que los osteoclastos pueden reconocer señales del medio externo además de las provistas por los osteoblastos y modular así su propia diferenciación [38,171,172]. Es por ello, que en el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio de la interacción de *S. aureus* con los osteoclastos, células críticas en la degradación ósea y hasta la actualidad muy poco estudiadas en el contexto de la infección bacteriana.

Nuestro grupo de investigación ha identificado a la proteína A de *S. aureus* como un inductor clave de la respuesta inflamatoria debido a su capacidad de interactuar con TNFR1 y EGFR desencadenando mecanismos de señalización que conducen a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias [154–156,159]. La importancia de dichas cascadas de señalización en el metabolismo óseo, sientan sobre bases seguras nuestra hipótesis de que la proteína A podría desempeñar un rol clave en la diferenciación y la activación de los osteoclastos. En el presente trabajo demostramos la importancia de la expresión de la proteína A en la inducción de mediadores inflamatorios y la consecuente activación de osteoclastos. Los resultados obtenidos permiten concluir que dicha proteína constituye un factor de virulencia crítico en el desarrollo de daño óseo que se observa durante la osteomielitis por *S. aureus*.

Algunos componentes de *S. aureus* han sido propuestos como partícipes de las infecciones óseas debido a su capacidad de modular positiva y negativamente la actividad de los osteoclastos *in vitro* [9]. Se ha descrito que las lipoproteínas y las proteínas de superficie de *S. aureus* estimulan la maduración y activación de osteoclastos [173–175]. Paralelamente se ha demostrado la capacidad de los ácidos lipoteicoicos de *S. aureus* de inhibir la osteoclastogénesis vía TLR2 [176]. Las controversias encontradas acerca de factores de la bacteria que conducen a la activación o inhibición de los osteoclastos denotan la necesidad de tener en cuenta que los ensayos *in vitro* pueden no ser representativos de los eventos que ocurren durante la infección *in vivo*. Nuestros resultados permitieron evidenciar un rol crítico de la proteína A en la inducción de osteoclastogénesis en respuesta a la estimulación *in vitro* y más importante aún durante la infección *in vivo* con

S. aureus. Es meritorio destacar que los hallazgos obtenidos no estarían restringidos a células murinas ya que demostramos que durante la estimulación de precursores de osteoclastos obtenidos a partir de monocitos humanos, la expresión de proteína A contribuyó significativamente a la inducción de osteoclastogénesis. Los estudios *in vivo*, utilizando un modelo murino de infección ósea [161], permitieron demostrar el impacto de la proteína A en la diferenciación temprana de osteoclastos durante los estadios iniciales de la infección por *S. aureus*. El primado diferencial de los precursores de osteoclastos en respuesta a la proteína A durante la infección por *S. aureus* podría deberse a una alteración de la respuesta fisiológica de los precursores de osteoclastos a RANKL, como ya ha sido documentado en otras condiciones patológicas asociadas a la pérdida de la masa ósea [177]. En este sentido, se demostró un aumento de la expresión de RANK durante la estimulación *in vitro* con *S. aureus* la cual resultó dependiente de la expresión de la proteína A y podría estar alterando la respuesta a RANKL y favoreciendo la expansión de la masa osteoclástica activa capaz de formar nuevos sitios de resorción ósea [36]. La capacidad de la proteína A de activar NF- κ B [154], un factor de transcripción crítico en la diferenciación de osteoclastos [35], y la importancia de la señalización a través de RANK en la activación de otros factores de transcripción que inducen la diferenciación de osteoclastos [36], podrían asimismo explicar el rol de la proteína A en la inducción de osteoclastogénesis durante la infección por *S. aureus*. A pesar de que otras moléculas de *S. aureus* distinta de la proteína A inducen la diferenciación de osteoclastos, nuestros estudios demuestran que la proteína A es crítica para la diferenciación de osteoclastos funcionalmente activos. Los osteoclastos diferenciados en ausencia de proteína A carecieron de la capacidad de degradar matrices de dentina y de liberar MMP-9 y expresar catepsina K. Por lo tanto el efecto de la proteína A sobre las capacidades funcionales de los osteoclastos podría tener un impacto significativo en el daño óseo que se observa durante la osteomielitis por *S. aureus*.

La osteoclastogénesis inducida por la proteína A resultó dependiente de la señalización mediada por los receptores TNFR1 y EGFR. En estudios previos se ha demostrado un rol para TNF- α en la diferenciación de osteoclastos [76,164]. La señalización vía TNFR1 ha sido implicada asimismo en la osteoclastogénesis inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) [178]. Nuestros resultados indican que *S. aureus* y la proteína A indujeron la liberación temprana de TNF- α . La neutralización de TNF- α en los ensayos *in vitro* nos permitió demostrar que la osteoclastogénesis inducida por la proteína A sería mayoritariamente secundaria al TNF- α producido como consecuencia de la interacción de la proteína A con TNFR1 [158]. Los resultados obtenidos demuestran asimismo, que otras moléculas de *S. aureus* inductoras de TNF- α aumentan la osteoclastogénesis [173]. En este sentido, hemos descrito recientemente a la proteína Sbi como un potente inductor de la señalización vía TNFR1 en macrófagos [179].

Distintos autores han clasificado a la población de osteoclastos en pequeños cuando contienen entre 2 y 5 núcleos y grandes cuando poseen 10 o más núcleos [180,181] e interesantemente se ha demostrado la presencia de osteoclastos de gran tamaño en las enfermedades óseas [182]. En este trabajo se observó que el primado de los precursores durante la infección *in vivo* por *S. aureus* indujo osteoclastos de mayor tamaño y con mayor cantidad de núcleos (más de 5) que los observados durante la estimulación con la bacteria *in vitro*. El rol crítico de la señalización por TNFR1 en la diferenciación de osteoclastos inducida durante la infección *in vivo* por *S. aureus* fue evidenciado no sólo por la diferenciación de un número menor de osteoclastos en ausencia de TNFR1 sino que además los osteoclastos presentaron menor cantidad de núcleos (3). Se ha reportado una mayor expresión de catepsina K y MMP-9 en osteoclastos de mayor tamaño en relación a los pequeños, así como también una mayor expresión de RANK, TNFR1 y c-fms en la superficie de los mismos lo cual los hace más respondedores a las señales exógenas. El tamaño de los osteoclastos estaría, por lo tanto, directamente relacionado con la funcionalidad de los mismos [38,39] y explicaría en parte la pérdida de masa ósea en muchas condiciones inflamatorias [183,184].

Nuestros resultados indican que además de TNFR1, EGFR participa en la osteoclastogénesis inducida por la proteína A de *S. aureus*. El rol de EGFR en la formación y distribución de osteoclastos en el hueso ha sido demostrada previamente utilizando embriones deficientes en la expresión de EGFR (*egfr*^(-/-)) [185]. Asimismo, ensayos *in vitro* han demostrado que la interacción de RANKL con su receptor RANK activa EGFR induciendo su fosforilación la cual es crítica para la diferenciación de osteoclastos [185,186]. Nuestro grupo de investigación ha demostrado la capacidad de la proteína A de inducir la fosforilación de EGFR y su activación [155,159] lo cual podría explicar la importancia de la señalización de la proteína A vía EGFR en la osteoclastogénesis. Durante el proceso de osteoclastogénesis la E-cadherina es una proteína crítica para el reconocimiento entre los precursores de osteoclastos y la formación de células multinucleadas [37]. Asimismo, se ha propuesto un rol para la calpaína en el re-arreglo del citoesqueleto que permite la formación del borde rugoso [187]. La señalización vía proteína A-EGFR induce re-arreglos del citoesqueleto y modificaciones de las uniones estrechas mediante la activación de m-calpaína en células epiteliales favoreciendo la invasión de *S. aureus* [188]. Por lo tanto, la señalización por la vía de EGFR inducida por la proteína A podría tener un impacto en la etapa de fusión de los precursores de osteoclastos y en los re-arreglos del citoesqueleto que conducen a la formación del borde rugoso y la laguna de resorción durante la infección por *S. aureus*. Experimentos futuros permitirán verificar esta hipótesis.

Un hallazgo interesante de este trabajo es que a pesar de que la diferenciación de osteoclastos inducida por la proteína A es dependiente tanto de TNFR1 como de EGFR, en ausencia de TNFR1 los osteoclastos diferenciados no son funcionalmente activos. Esto probablemente se deba

a que en ausencia de TNFR1 no hay inducción de catepsina K, una proteinasa crítica para la degradación de la matriz. Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados utilizando RANKL como inductor de osteoclastogénesis en los cuales se demuestra que la actividad resorptiva de los osteoclastos no es modulada por EGFR a diferencia de la participación de dicho receptor en la formación de células multinucleadas [185]. Conocer los mecanismos por los cuales los osteoclastos se diferencian y polarizan formando una cavidad rica en proteinasas que degradan hueso es imprescindible para un mayor entendimiento de la patogenia de las infecciones óseas.

En las enfermedades óseas crónicas se ha demostrado la importancia de las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la progresión de la enfermedad y destrucción de la masa ósea [75]. En este trabajo demostramos que la proteína A induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por precursores de osteoclastos durante el estímulo *in vitro* con *S. aureus*. Nuestros hallazgos son coincidentes con estudios recientes en los que se demostró que *S. aureus* modula la producción de citoquinas en precursores de osteoclastos y aumenta la actividad de resorción de osteoclastos maduros en ausencia de osteoblastos [130]. En relación a la infección *in vivo*, se ha demostrado la producción local de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a *S. aureus* en un modelo experimental [189]. Nuestro trabajo constituye un avance significativo en la temática ya que por primera vez se identifica a un componente bacteriano, la proteína A, como crítico para la inducción de mediadores inflamatorios durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Los niveles elevados de TNF- α han sido asociados con los cambios histopatológicos que se observan durante la osteomielitis incluyendo la destrucción ósea y formación de hueso nuevo [190]. Estudios realizados por otros autores revelaron niveles elevados de dicha citoquina en las cavidades articulares y los han asociado al daño articular observado durante las artritis por *S. aureus* [191]. En este trabajo la disminución de los niveles de TNF- α en respuesta a la infección con la mutante que no expresa proteína A podría explicar parcialmente el menor daño óseo observado en ausencia de la expresión dicha proteína. El daño óseo observado durante la infección con *S. aureus* también se ha asociado a una producción elevada de IL-1 β e IL-6 durante los estadios iniciales de la infección [189]. En nuestro modelo de osteomielitis experimental demostramos que la proteína A participa en la liberación de dichos mediadores inflamatorios lo cual, junto a la capacidad de los osteoblastos de liberar estas citoquinas [192,193], podría contribuir a aumentar la degradación del hueso durante la osteomielitis [77–79].

En el modelo utilizado, no se detectó la producción de IL-10 durante la infección ósea en respuesta a *S. aureus*. Utilizando modelos animales se ha descrito un rol protector de la IL-10 en la degradación del hueso observada en distintas enfermedades óseas [194,195] posiblemente debido a una inhibición de la osteoclastogénesis mediada por la disminución de la expresión del factor nuclear de células T activadas (NFAT) o por favorecer la diferenciación de osteoblastos [196]. En vista de la

degradación ósea que se observa durante la infección por *S. aureus* no resulta sorprendente la ausencia de producción de IL-10 en los huesos infectados. Considerando que *S. aureus* induce la producción de IFN- γ en otros modelos experimentales [197], se evaluó su inducción durante la infección ósea no detectándose niveles significativos de producción. El efecto del INF- γ en las patologías óseas es controversial. Hay estudios que demuestran que dicha citoquina promueve la resorción ósea en distintas condiciones patológicas. Se ha reportado el efecto benéfico de la misma en el tratamiento de la osteopetrosis a través de la restitución de la formación de osteoclastos y degradación ósea [198]. Otros estudios en cambio han demostrado un rol inhibitorio de dicha citoquina en la degradación ósea mediante un mecanismo que involucra la disminución del calcio presente en el suero [199]. Si bien en nuestro modelo experimental no se observó producción endógena de IFN- γ , se requieren estudios cinéticos para descartar o confirmar la participación de la misma en la infección ósea por *S. aureus*.

En este trabajo se evaluó el daño óseo inducido durante la infección experimental por *S. aureus* mediante el análisis de las imágenes obtenidas por micro tomografía computada, una tecnología que utiliza imágenes de alta resolución. Se demostró que la diferenciación y la activación de los osteoclastos observada en los ensayos *in vitro* y *ex vivo* en respuesta a la proteína A se correlacionó con un aumento de la destrucción del hueso cortical en ratones infectados con *S. aureus* que expresa dicha proteína. Nuestros resultados concuerdan con observaciones previas que indican que la expresión de *sae*, un regulador positivo de la proteína A [200], contribuye a la destrucción ósea [161]. Asimismo, el ambiente inflamatorio generado en respuesta a la infección con *S. aureus* podría contribuir a este proceso [76].

Al evaluar la formación reactiva de hueso demostramos una mayor formación de hueso nuevo en ausencia de la proteína A. Esto podría deberse a una mayor deposición de matriz por parte de los osteoblastos. Recientemente, y con alta relación a este trabajo, se ha demostrado que la interacción *in vitro* de la proteína A de *S. aureus* con TNFR1 expresado en la superficie de osteoblastos desencadena eventos que debilitarían al hueso durante la osteomielitis. La presencia de *S. aureus* inhibe la mineralización ósea por parte de los osteoblastos, disminuye su proliferación y promueve su apoptosis lo cual explicaría en parte el daño óseo observado durante la osteomielitis por este microorganismo [157]. El efecto deletéreo de la proteína A sobre los osteoblastos permitiría explicar nuestros resultados que evidencian una mayor formación reactiva de hueso en ausencia de dicha proteína. Asimismo, se demostró que la proteína A induce un aumento en la expresión de RANKL por parte de los osteoblastos [157]. Las evidencias experimentales indican que la patogenia de la infección ósea sería un proceso complejo donde la funcionalidad de los osteoclastos y los osteoblastos así como la comunicación entre ellos estaría afectada. Por lo tanto, resulta evidente que

modelos experimentales *in vivo* que permitan recapitular los diferentes procesos que tienen lugar durante la infección son sumamente necesarios para lograr un mejor entendimiento de la patogenia de la osteomielitis por *S. aureus*.

Una de las desventajas que ofrecen los modelos murinos que simulan la osteomielitis originada por contaminación directa del hueso, es que el tiempo de permanencia de la bacteria en el tejido óseo es limitado y por lo tanto no es posible evaluar la patología de la infección a tiempos prolongados luego del desafío [161]. Se ha descrito un modelo murino de osteomielitis crónica que permite evaluar la infección por períodos prolongados de tiempo. Sin embargo, en dicho modelo la llegada de la bacteria al hueso tiene lugar por vía hematogena [201]. Lo cual no sería representativo de las infecciones asociadas a implantes, las cuales poseen la mayor incidencia dentro de las osteomielitis por *S. aureus* [2]. Por lo tanto, en este trabajo, a fin de evaluar el rol de la proteína A en la infección ósea por períodos más prolongados se utilizó un modelo de osteomielitis experimental en rata descrito previamente [162,169] que permitió evaluar los cambios histopatológicos las 15 semanas luego del desafío. La falta de congestión y edema así como la ausencia de un exudado de neutrófilos y la escasa formación de secuestros en los animales desafiados con la mutante que no expresa proteína A, permitieron demostrar el rol de la proteína A en el daño histológico que se observa durante la progresión de la enfermedad en la osteomielitis por *S. aureus*.

Además, se demostró una mayor depuración de la cepa que no expresa proteína A lo cual podría explicarse en parte por la reducción de potenciales nichos de persistencia al formarse menos secuestros. Asimismo, en ausencia de proteína A la eliminación bacteriana podría verse favorecida dado el reconocido rol de la misma en la evasión de la opsonofagocitosis [104].

En aislamientos clínicos provenientes de pacientes con infección crónica, como en el caso de las osteomielitis secundarias al reemplazo de articulaciones, [148] se han identificado variantes puntiformes. Nuestros estudios *in vivo* permitieron evidenciar la formación de variantes puntiformes a las 15 semanas luego del desafío lo cual es indicativo de la representatividad del modelo utilizado. La cuantificación de las variantes puntiformes en hueso permitió demostrar que la menor colonización bacteriana observada en respuesta a la mutante que no expresa proteína A no se debe a una mayor formación de variantes puntiformes indicando que en ausencia de expresión de proteína A no se favorece específicamente dicho cambio fenotípico. Hasta el presente, los mecanismos precisos mediante los cuales la presencia de *S. aureus* conduce al daño óseo durante la osteomielitis no se conocen en su totalidad. Los resultados obtenidos en este trabajo junto con hallazgos recientes de otros investigadores [157] demuestran la capacidad de un mismo factor de virulencia, la proteína A, de poseer blancos en las dos poblaciones celulares críticas para el metabolismo óseo modulando

positivamente la actividad de osteoclastos y negativamente la actividad de los osteoblastos [157] contribuyendo así a la degradación ósea característica de la osteomielitis.

El manejo del paciente con osteomielitis en la actualidad es complejo debido a que un gran porcentaje de casos son refractarios al tratamiento con antibiótico. Aun cuando el tratamiento con antibiótico resulte exitoso, un interrogante permanente para el médico tratante es cuando el hueso se encuentra realmente libre de microorganismos. En este sentido, es importante considerar que el tratamiento actual de la osteomielitis no contempla estrategias que permitan disminuir el daño óseo y evitar por lo tanto la formación de nichos donde la bacteria pueda ocultarse y persistir protegida del sistema inmune del huésped y de la acción de antibióticos. El uso combinado de antibióticos y terapias co-adyuvantes que permitan prevenir el daño óseo constituiría un avance significativo en el manejo del paciente con osteomielitis.

Al respecto de las posibles estrategias para prevenir el daño óseo, diversos estudios han sugerido la potencialidad de utilizar anticuerpos para el tratamiento de enfermedades óseas de origen metabólico. Actualmente la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos) y en Argentina el ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica), ha aprobado el primer agente biológico para tratar la pérdida ósea originada por la osteoporosis. Se trata de un anticuerpo humanizado (Denosumab) que se une con alta afinidad a RANKL previniendo la interacción de éste con su receptor RANK. Este anticuerpo no sólo se ha utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de osteoporosis resultando en un aumento de la densidad ósea [202], sino que recientemente se ha propuesto el tratamiento combinado del anticuerpo junto a la terapia con bifosfonatos para la pérdida ósea posmenopáusica [203]. A pesar que estos agentes podrían utilizarse en enfermedades donde la destrucción ósea está causada por la infección bacteriana, no es sencillo predecir cuáles podrían ser los resultados considerando que los mismos afectan al metabolismo óseo en general y el microambiente del hueso en presencia de microorganismos multiplicándose posee características propias. En modelos murinos de artritis por *S. aureus* el uso de bifosfonatos, corticosteroides o tratamientos orientados contra RANKL han resultado efectivos para prevenir la pérdida ósea [204,205].

Recientemente, en forma paralela al desarrollo de nuestra investigación, se ha propuesto el uso de anticuerpos monoclonales anti-glucosaminidasa para el tratamiento de osteomielitis asociada a prótesis causada por *S. aureus* [206]. Utilizando un modelo murino la administración del anticuerpo por vía parenteral resultó efectiva para disminuir la severidad de la infección medida como la reducción de la carga bacteriana en la tibia, la disminución de la degradación del hueso acompañada de una menor formación de abscesos, todos parámetros importantes en el desarrollo de osteomielitis

por *S. aureus*. Debido a la facilidad de la vía de administración del anticuerpo podría representar una estrategia adecuada para la inmunización de pacientes en riesgo.

En este trabajo hemos demostrado que en ausencia de expresión de proteína A disminuye la respuesta inflamatoria que conduce a la actividad resorptiva incrementada de los osteoclastos y a la degradación de hueso cortical durante la osteomielitis por *S. aureus*. Por lo tanto, evaluamos la potencialidad de utilizar un anticuerpo neutralizante contra la proteína A durante los estadios iniciales de la infección para prevenir la diferenciación de osteoclastos y la respuesta inflamatoria que conduce al daño óseo. Demostramos por primera vez la potencialidad de neutralizar la proteína A para bloquear el primado de precursores de osteoclastos durante los estadios iniciales de la infección por *S. aureus*. Debido a la importancia de la proteína A en la interacción inicial de la bacteria con el hospedador, su neutralización podría representar un punto de control clave para evitar la degradación ósea y el desarrollo de osteomielitis. La terapia con anticuerpos neutralizantes de la proteína A podría ser implementada en forma preventiva en pacientes que tengan programada una cirugía de reemplazo articular o por fracturas expuestas. No obstante es necesario aun validar, utilizando modelos experimentales, la capacidad del anticuerpo contra la proteína A de disminuir efectivamente el daño óseo como consecuencia de la infección. Nuestros resultados indicaron que una única inmunización previa al desafío con el anticuerpo neutralizante resultó efectiva para prevenir el primado de los precursores de osteoclastos. Sin embargo, una única dosis de anticuerpo no resultó efectiva para inhibir la producción de mediadores pro-inflamatorios a los 14 días luego del desafío. Los resultados obtenidos utilizando una segunda dosis de anticuerpo parecieron indicar que si se sostienen los niveles de anticuerpo neutralizante podría inhibirse la producción de citoquinas pro-inflamatorias. En base a los resultados obtenidos consideramos que en futuros experimentos debe evaluarse la administración de un número mayor de dosis de anticuerpo o concentraciones más elevadas del mismo para evaluar la potencialidad de la neutralización de la proteína A de bloquear la respuesta inflamatoria en hueso y por lo tanto prevenir el daño óseo observado durante la osteomielitis experimental por *S. aureus*.

La neutralización de la proteína A ha sido sugerida previamente para la prevención de la formación de biofilms por *S. aureus* [150], así como para prevenir apoptosis de osteoblastos y desmineralización ósea [157]. Respecto de la neutralización de la proteína A en otros modelos de infección, se ha demostrado que la inmunización pasiva de ratones con anticuerpos monoclonales contra una variante de la proteína A (SpAKKAA) fue capaz de reducir la carga bacteriana y la formación de abscesos en el riñón en un modelo murino de bacteriemia por *S. aureus* [207]. Asimismo, se ha demostrado el rol protector de una vacuna multi-componente que incluye SpAKKAA en un modelo de bacteriemia en ratones leucopénicos [208,209]. Estos antecedentes denotan la

potencialidad del uso de anticuerpos contra la proteína A para prevenir diferentes infecciones por *S. aureus*. Nuestros resultados utilizando una mutante SpA- demuestran además, la factibilidad de neutralizar la proteína A sin la consecuente inducción de variantes puntiformes que podrían formarse ante la presión selectiva de los anticuerpos.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un avance en el entendimiento de las bases moleculares de los mecanismos que desencadenan el daño óseo y contribuyen a la persistencia bacteriana durante la osteomielitis por *S. aureus*. Considerando el impacto que dicha enfermedad posee en la salud pública es sumamente necesario contar con estrategias terapéuticas alternativas a las actuales. En este sentido, el presente trabajo nos permite sugerir que la proteína A podría ser considerada como un potencial nuevo blanco terapéutico en el diseño de terapias complementarias a las convencionales para la prevención y tratamiento de la osteomielitis por *S. aureus*.

6. CONCLUSIONES.

6.1. CONCLUSIONES.

1. La proteína A desempeña un rol crítico en la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus* como se demostró mediante ensayos *in vitro* y modelos experimentales de infección ósea *in vivo*.
2. La proteína A de *S. aureus* induce la diferenciación de osteoclastos a través de la interacción con TNFR1 y EGFR. Mientras que ambos receptores participan del proceso de diferenciación, la señalización por TNFR1 es determinante para la función resortiva.
3. Componentes bacterianos diferentes de la proteína A participan de la osteoclastogénesis inducida por *S. aureus*. Sin embargo la proteína A es crítica para la diferenciación de osteoclastos funcionalmente activos.
4. La proteína A contribuye significativamente al primado de precursores de osteoclastos durante los estadios iniciales de la infección *in vivo* por *S. aureus*.
5. Durante el desarrollo de osteomielitis por *S. aureus* la proteína A desempeñaría un rol fundamental en la inducción del daño óseo y contribuiría además a la persistencia de la bacteria en el hueso.
6. La neutralización de la proteína A permite disminuir la activación de los osteoclastos en etapas tempranas de la infección y podría modular la producción de mediadores inflamatorios contribuyendo potencialmente a disminuir el daño óseo durante osteomielitis por *S. aureus*.

6.2. CONCLUSION GENERAL.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron elucidar algunas de las bases moleculares de los mecanismos involucrados en el daño óseo y la persistencia bacteriana durante la osteomielitis por *S. aureus*. Considerando la necesidad de tratamientos alternativos para las infecciones óseas por este microorganismo, los estudios futuros que deriven de este trabajo permitirán establecer la factibilidad de considerar a la proteína A como un potencial nuevo blanco terapéutico.

Andrea Mendoza Bertelli
TESISTA

Marta Mollerach
CONSEJERO DE TESIS

Marisa I. Gómez
DIRECTOR

María Victoria Delpino
DIRECTOR ADJUNTO

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.D. Daniel P. Lew , M.D., and Francis A. W Aldvogel, Osteomyelitis, N. Engl. J. Med. Volume 336 (1997) 999–1007.
- [2] D.P. Lew, F.A. Waldvogel, Osteomyelitis, (2004) 369–379.
- [3] S. Chihara, J. Segreti, Osteomyelitis, Disease-a-Month. 56 (2010) 6–31. doi:10.1016/j.disamonth.2009.07.001.
- [4] F. Arocha, F. Espinoza, P. Lizcano, K. Parra, A. Bracho, Tratamiento de osteomielitis vertebral por *Candida* spp. con caspofungina: Presentación de un caso y revisión de la bibliografía, Kasma. 33 (2005) 64–73.
- [5] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. Planell, Biomaterials in orthopaedics, J. R. Soc. Interface. 5 (2008) 1137–1158. doi:10.1098/rsif.2008.0151.
- [6] R.O. Darouiche, Treatment of infections associated with surgical implants., N. Engl. J. Med. 350 (2004) 1422–1429. doi:10.1056/NEJMra035415.
- [7] A. Trampuz, K.E. Piper, M.J. Jacobson, A.D. Hanssen, K.K. Unni, D.R. Osmon, J.N. Mandrekar, F.R. Cockerill, J.M. Steckelberg, J.F. Greenleaf, R. Patel, Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection, N Engl J Med. 357 (2007) 654–63.
- [8] Que YA, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. ,eds, Churchill-Livingstone-Elsevier.Philadelphia, USA, electronic version (2010).
- [9] J.A. Wright, S.P. Nair, Interaction of staphylococci with bone, Int. J. Med. Microbiol. 300 (2010) 193–204. doi:10.1016/j.ijmm.2009.10.003.
- [10] B. Healy, A. Freedman, Infections., BMJ. 332 (2006) 838–41. doi:10.1136/bmj.332.7545.838.
- [11] B.H. Ziran, Osteomyelitis, J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care. 62 (2007) S59–S60. doi:10.1097/TA.0b013e318065abbd.
- [12] S. Aslam, R.O. Darouiche, Prosthetic Joint Infections, Curr. Infect. Dis. Rep. 14 (2012) 551–557. doi:10.1007/s11908-012-0284-2.
- [13] W.E. Shams, R.P. Rapp, Methicillin-resistant staphylococcal infections: an important consideration for orthopedic surgeons., Orthopedics. 27 (2004) 565–568.
- [14] M.F.Q. Kluytmans-Vandenbergh, J.A.J.W. Kluytmans, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives., Clin. Microbiol. Infect. 12 Suppl 1 (2006) 9–15. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01341.x.
- [15] B. Lindeque, J. Rutigliano, A. Williams, J. McConnell, Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among orthopedic patients at a large academic hospital., Orthopedics. 31 (2008).

- [16] K. Azzam, K. McHale, M. Austin, J.J. Purtill, J. Parvizi, Outcome of a second two-stage re implantation for periprosthetic knee infection, in: Clin. Orthop. Relat. Res., 2009: pp. 1706–1714.
- [17] E. Ghanem, K. Azzam, M. Seeley, A. Joshi, J. Parvizi, Staged revision for knee arthroplasty infection: What is the role of serologic tests before reimplantation?, Clin. Orthop. Relat. Res. 467 (2009) 1699–1705. doi:10.1007/s11999-009-0742-9.
- [18] H.J. Cooper, C.J. Della Valle, The two-stage standard in revision total hip replacement., Bone Joint J. 95 B (2013) 84–87. doi:10.1302/0301-620X.95B11.32906.
- [19] J. Parvizi, K. Azzam, E. Ghanem, M.S. Austin, R.H. Rothman, Periprosthetic infection due to resistant staphylococci: Serious problems on the horizon, in: Clin. Orthop. Relat. Res., 2009: pp. 1732–1739.
- [20] B. Spellberg, B.A. Lipsky, Systemic Antibiotic Therapy for Chronic Osteomyelitis in Adults, Clin. Infect. Dis. 54 (2012) 393–407. doi:10.1093/cid/cir842.
- [21] E. Rubinstein, Y. Keynan, Vancomycin Revisited – 60 Years Later, Front. Public Heal. 2 (2014). doi:10.3389/fpubh.2014.00217.
- [22] D.P. Levine, Vancomycin: a history., Clin. Infect. Dis. 42 Suppl 1 (2006) S5–12. doi:10.1086/491709.
- [23] K. Kosowska-Shick, L.M. Ednie, P. McGhee, K. Smith, C.D. Todd, A. Wehler, P.C. Appelbaum, Incidence and characteristics of vancomycin non susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Hershey Medical Center, Antimicrob. Agents Chemother. 52 (2008) 4510–4513.
- [24] S. Ikeda, H. Hanaki, C. Yanagisawa, Y. Ikeda-Dantsuji, H. Matsui, M. Iwatsuki, K. Shiomi, T. Nakae, K. Sunakawa, S. Omura, Identification of the active component that induces vancomycin resistance in MRSA., J. Antibiot. (Tokyo). 63 (2010) 533–538.
- [25] A. Corso, L. Guerriero, F. Pasterán, P. Ceriana, R. Callejo, M. Prieto, E. Tuduri, H. Lopardo, C. Vay, J. Smayevsky, M. Tokumoto, J.M. Alvarez, P.R. Pardo, M. Galas, [Capability of national reference laboratories in Latin America to detect emerging resistance mechanisms]., Rev. Panam. Salud Publica. 30 (2011) 619–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358413>.
- [26] L. Tuchscher, B. Löffler, F.R. Buzzola, D.O. Sordelli, *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression., Future Microbiol. 5 (2010) 1823–1832.
- [27] L. Tuchscher, C.A. Kreis, V. Hoerr, L. Flint, M. Hachmeister, J. Geraci, S. Bremer-Streck, M. Kiehntopf, E. Medina, M. Kribus, M. Raschke, M. Pletz, G. Peters, B. Löffler, *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants

- during chronic osteomyelitis, *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016) 438–448. doi:10.1093/jac/dkv371.
- [28] B. Clarke, Normal bone anatomy and physiology., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3 Suppl 3 (2008) 1–15. doi:10.2215/CJN.04151206.
- [29] L.J. Raggatt, N.C. Partridge, Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 25103–25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087.
- [30] S.L. Teitelbaum, Bone Resorption by Osteoclasts, *Science.* 289 (2000) 1504–1508. doi:10.1126/science.289.5484.1504.
- [31] J.M. Hodge, M.A. Kirkland, G.C. Nicholson, Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis, *J Cell Biochem.* 102 (2007) 759–768. doi:10.1002/jcb.21331.
- [32] N.J. Horwood, V. Kartsogiannis, J.M. Quinn, E. Romas, T.J. Martin, M.T. Gillespie, Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 (1999) 144–50. doi:10.1006/bbrc.1999.1623.
- [33] T. Kawai, T. Matsuyama, Y. Hosokawa, S. Makihira, M. Seki, N.Y. Karimbux, R.B. Goncalves, P. Valverde, S. Dibart, Y.P. Li, L.A. Miranda, C.W. Ernst, Y. Izumi, M.A. Taubman, B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease, *Am J Pathol.* 169 (2006) 987–998. doi:10.2353/ajpath.2006.060180.
- [34] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, S.I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro, *Endocrinology.* 139 (1998) 1329–1337. doi:10.1210/en.139.3.1329.
- [35] T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, J.M. Penninger, RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease, *Trends Mol. Med.* 12 (2006) 17–25.
- [36] A. Takaoka, T. Taniguchi, New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism., *Cancer Sci.* 94 (2003) 405–11. doi:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01455.x.
- [37] C. Fiorino, R.E. Harrison, E-cadherin is important for cell differentiation during osteoclastogenesis, *Bone.* 86 (2016) 106–118.
- [38] K. Matsuo, N. Irie, Osteoclast-osteoblast communication, *Arch. Biochem. Biophys.* 473 (2008) 201–209.
- [39] M. Ishii, Y. Saeki, Osteoclast cell fusion: Mechanisms and molecules, *Mod. Rheumatol.* 18 (2008) 220–227. doi:10.1007/s10165-008-0051-2.
- [40] Z. Li, K. Kong, W. Qi, Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development

- and remodeling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 345–350. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.147.
- [41] Y. M.P., Y. J.G., Osteoclastogenesis - Current knowledge and future perspectives, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 8 (2008) 204–216.
- [42] H.K. Väänänen, M. Horton, The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure., *J. Cell Sci.* 108 (Pt 8 (1995) 2729–2732.
- [43] C.E. Brinckerhoff, L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 207–14. doi:10.1038/nrm763.
- [44] H. Nagase, R. Visse, G. Murphy, Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs., *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 562–73. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
- [45] R. Visse, H. Nagase, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry, *Circ. Res.* 92 (2003) 827–839. doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- [46] W. Peng, J. Yan, Y. Wan, B. Wang, J. Tao, G. Yang, H. Pan, J. Wang, Matrix Metalloproteinases: A Review of Their Structure and Role in Systemic Sclerosis, *J. Clin. Immunol.* 32 (2012) 1409–1414. doi:10.1007/s10875-012-9735-7.
- [47] D. Sbardella, G.F. Fasciglione, M. Gioia, C. Ciaccio, G.R. Tundo, S. Marini, M. Coletta, Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 119–208. doi:10.1016/j.mam.2011.10.015.
- [48] H. Nagase, Activation mechanisms of matrix metalloproteinases., *Biol. Chem.* 378 (1997) 151–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165065> (accessed November 10, 2016).
- [49] K. Brew, D. Dinakarpandian, H. Nagase, Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477 (2000). doi:10.1016/S0167-4838(99)00279-4.
- [50] F.H. Drake, R. a Dodds, I.E. James, J.R. Connor, C. Debouck, S. Richardson, E. Lee-Rykaczewski, L. Coleman, D. Rieman, R. Barthlow, G. Hastings, M. Gowen, Cathepsin K, but not cathepsin B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12511–12516. doi:10.1074/jbc.271.21.12511.
- [51] D.J. Rieman, H.A. McClung, R.A. Dodds, S.M. Hwang, M.W. Holmes, I.E. James, F.H. Drake, M. Gowen, Biosynthesis and processing of cathepsin K in cultured human osteoclasts., *Bone.* 28 (2001) 282–9.
- [52] B.R. Troen, The regulation of cathepsin K gene expression., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068 (2006) 165–72. doi:10.1196/annals.1346.018.
- [53] M.A. Horton, The alpha v beta 3 integrin “vitronectin receptor”., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29

- (1997) 721–725. doi:10.1016/S1357-2725(96)00155-0.
- [54] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M. a. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D. Marshak, Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science* (80-.). 284 (1999) 143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143.
- [55] Jensen, Gopalakrishnan, J.J. Westendorf, Regulation of Gene Expression in Osteoblasts, *Biofactors*. 36 (2010) 25–32. doi:10.1002/biof.72.Regulation.
- [56] A. Rutkovskiy, K.-O. Stenslkken, I.J. Vaage, Osteoblast Differentiation at a Glance, *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 22 (2016) 95–106. doi:10.12659/MSMBR.901142.
- [57] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. De Crombrughe, The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell*. 108 (2002) 17–29. doi:10.1016/S0092-8674(01)00622-5.
- [58] P.H. Anderson, G.J. Atkins, A.G. Turner, M. Kogawa, D.M. Findlay, H.A. Morris, Vitamin D metabolism within bone cells: Effects on bone structure and strength, *Mol. Cell. Endocrinol.* 347 (2011) 42–47. doi:10.1016/j.mce.2011.05.024.
- [59] G. Lombardi, C. Di Somma, M. Rubino, A. Faggiano, L. Vuolo, E. Guerra, P. Contaldi, S. Savastano, A. Colao, The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics., *J. Endocrinol. Invest.* 34 (2011) 18–22.
- [60] S. Advani, D. LaFrancis, E. Bogdanovic, P. Taxel, L.G. Raisz, B.E. Kream, Dexamethasone suppresses in vivo levels of bone collagen synthesis in neonatal mice., *Bone*. 20 (1997) 41–6.
- [61] R. Pacifici, Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade., *Endocrinology*. 139 (1998) 2659–61. doi:10.1210/endo.139.6.6087.
- [62] H. Hu, M.J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D.M. Ornitz, F. Long, Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development., *Development*. 132 (2005) 49–60. doi:10.1242/dev.01564.
- [63] G. Chen, C. Deng, Y.P. Li, TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2012) 272–288. doi:10.7150/ijbs.2929.
- [64] G.S. Stein, J.B. Lian, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, M. Montecino, A. Javed, S.K. Zaidi, D.W. Young, J.-Y. Choi, S.M. Pockwinse, Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression., *Oncogene*. 23 (2004) 4315–4329. doi:10.1038/sj.onc.1207676.
- [65] A. Neve, A. Corrado, F.P. Cantatore, Osteoblast physiology in normal and pathological conditions, *Cell Tissue Res*. 343 (2011) 289–302. doi:10.1007/s00441-010-1086-1.
- [66] E.F. Eriksen, Cellular mechanisms of bone remodeling, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 11 (2010) 219–227. doi:10.1007/s11154-010-9153-1.

- [67] S. Mohan, D.J. Baylink, Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption., *Horm. Res.* 45 Suppl 1 (1996) 59–62.
- [68] M. Centrella, T.L. McCarthy, E. Canalis, Transforming growth factor-beta and remodeling of bone., *J. Bone Jt. Surg.* 73 (1991).
- [69] T.J. Martin, E.H. Allan, P.W.M. Ho, J.H. Gooi, J.M.W. Quinn, M.T. Gillespie, V. Krasnoperov, N.A. Sims, Communication between ephrinB2 and EphB4 within the osteoblast lineage., *Adv. Exp. Med. Biol.* 658 (2010) 51–60. doi:10.1007/978-1-4419-1050-9_6.
- [70] J. Ryu, H.J. Kim, E.-J. Chang, H. Huang, Y. Banno, H.-H. Kim, Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling., *EMBO J.* 25 (2006) 5840–51. doi:10.1038/sj.emboj.7601430.
- [71] J.D. Malone, S.L. Teitelbaum, G.L. Griffin, R.M. Senior, A.J. Kahn, Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents, *J. Cell Biol.* 92 (1982) 227–230. doi:10.1083/jcb.92.1.227.
- [72] X. Li, L. Qin, M. Bergenstock, L.M. Bevelock, D. V. Novack, N.C. Partridge, Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33098–33106. doi:10.1074/jbc.M611781200.
- [73] L.F. Bonewald, The amazing osteocyte, *J. Bone Miner. Res.* 26 (2011) 229–238. doi:10.1002/jbmr.320.
- [74] S.P. Nair, S. Meghji, M. Wilson, K. Reddi, P. White, B. Henderson, Bacterially induced bone destruction: Mechanisms and misconceptions, *Infect. Immun.* 64 (1996) 2371–2380.
- [75] D.R. Haynes, Bone lysis and inflammation, *Inflamm. Res.* 53 (2004) 596–600.
- [76] K.T. Steeve, P. Marc, T. Sandrine, H. Dominique, F. Yannick, IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology, *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004) 49–60. doi:10.1016/j.cytogfr.2003.10.005.
- [77] Y. Azuma, K. Kaji, R. Katogi, S. Takeshita, A. Kudo, Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4858–4864.
- [78] O. Kudo, A. Sabokbar, A. Pocock, I. Itonaga, Y. Fujikawa, N.A. Athanasou, Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism, *Bone.* 32 (2003) 1–7. doi:10.1016/S8756-3282(02)00915-8.
- [79] J.H. Kim, H.M. Jin, K. Kim, I. Song, B.U. Youn, K. Matsuo, N. Kim, The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1., *J. Immunol.* 183 (2009) 1862–1870. doi:10.4049/jimmunol.0803007.
- [80] R. Baum, E.M. Gravallese, Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases, *Curr. Osteoporos. Rep.* 12 (2014) 9–16. doi:10.1007/s11914-013-0183-y.

- [81] N. Tomomatsu, K. Aoki, N. Alles, N.S. Soysa, A. Hussain, H. Nakachi, S. Kita, H. Shimokawa, K. Ohya, T. Amagasa, LPS-induced inhibition of osteogenesis is TNF-alpha dependent in a murine tooth extraction model., *J. Bone Miner. Res.* 24 (2009) 1770–1781. doi:10.1359/jbmr.090410.
- [82] D.C. Lacey, P.J. Simmons, S.E. Graves, J.A. Hamilton, Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation, *Osteoarthr. Cartil.* 17 (2009) 735–742. doi:10.1016/j.joca.2008.11.011.
- [83] L. Gilbert, X. He, P. Farmer, J. Rubin, H. Drissi, A.J. van Wijnen, J.B. Lian, G.S. Stein, M.S. Nanes, Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 2695–2701. doi:10.1074/jbc.M106339200.
- [84] P. Stashenko, F.E. Dewhirst, M.L. Rooney, L.A. Desjardins, J.D. Heeley, Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro., *J. Bone Miner. Res.* 2 (1987) 559–65. doi:10.1002/jbmr.5650020612.
- [85] R.L. Jilka, R.S. Weinstein, T. Bellido, A.M. Parfitt, S.C. Manolagas, Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): Modulation by Growth Factors and Cytokines, *J. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 793–802. doi:10.1359/jbmr.1998.13.5.793.
- [86] S.D. Shapiro, Diverse roles of macrophage matrix metalloproteinases in tissue destruction and tumor growth, in: *Thromb. Haemost.*, 1999: pp. 846–849.
- [87] T. Okamoto, T. Akuta, F. Tamura, A. van der Vliet, T. Akaike, Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation, *Biol. Chem.* 385 (2004) 997–1006. doi:10.1515/BC.2004.130.
- [88] Y. Rengel, C. Ospelt, S. Gay, Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction., *Arthritis Res. Ther.* 9 (2007) 221.
- [89] K. Sundaram, R. Nishimura, J. Senn, R.F. Youssef, S.D. London, S. V. Reddy, RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 168–178. doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.001.
- [90] M.T. Engsig, Q.J. Chen, T.H. Vu, a C. Pedersen, B. Therkidsen, L.R. Lund, K. Henriksen, T. Lenhard, N.T. Foged, Z. Werb, J.M. Delaissé, Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 879–889. doi:10.1083/jcb.151.4.879.
- [91] D. Ben David, A.Z. Reznick, S. Srouji, E. Livne, Exposure to pro-inflammatory cytokines upregulates MMP-9 synthesis by mesenchymal stem cells-derived osteoprogenitors, *Histochem. Cell Biol.* 129 (2008) 589–597. doi:10.1007/s00418-008-0391-1.

- [92] C. Filanti, G.R. Dickson, D. Di Martino, V. Ulivi, C. Sanguineti, P. Romano, C. Palermo, P. Manduca, The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14., *J. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 2154–2168. doi:10.1359/jbmr.2000.15.11.2154.
- [93] C.-L. Tsai, W.-C. Chen, H.-L. Hsieh, P.-L. Chi, L.-D. Hsiao, C.-M. Yang, TNF- α induces matrix metalloproteinase-9-dependent soluble intercellular adhesion molecule-1 release via TRAF2-mediated MAPKs and NF- κ B activation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells., *J. Biomed. Sci.* 21 (2014) 12. doi:10.1186/1423-0127-21-12.
- [94] R. Scian, P. Barrionuevo, G.H. Giambartolomei, C. a Fossati, P.C. Baldi, M.V. Delpino, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with *Brucella abortus*., *Infect. Immun.* 79 (2011) 192–202. doi:10.1128/IAI.00934-10.
- [95] P.M. Keegan, C.L. Wilder, M.O. Platt, Tumor necrosis factor alpha stimulates cathepsin K and V activity via juxtacrine monocyte-endothelial cell signaling and JNK activation, *Mol. Cell. Biochem.* 367 (2012) 65–72.
- [96] A. Kassem, C. Lindholm, U.H. Lerner, Toll-Like receptor 2 stimulation of osteoblasts mediates *Staphylococcus aureus* induced bone resorption and osteoclastogenesis through enhanced RANKL, *PLoS One.* 11 (2016) 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0156708.
- [97] L. Hao, G. Zhu, Y. Lu, M. Wang, J. Jules, X. Zhou, W. Chen, Deficiency of cathepsin K prevents inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis and periodontitis and reveals its shared osteoimmune role, *FEBS Lett.* 589 (2015) 1331–1339. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.008.
- [98] M.T. Moran, J.P. Schofield, a R. Hayman, G.P. Shi, E. Young, T.M. Cox, Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K., *Blood.* 96 (2000) 1969–1978.
- [99] H. Zinsser, H.P. Willett, D.B. Amos, W.K. Joklik, *Zinsser microbiología*, Panamericana, 1986.
- [100] B. Fournier, D.J. Philpott, Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 521–540.
- [101] F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus* infections., *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 520–532. doi:10.1056/NEJM199808203390806.
- [102] E. By, K.B. Crossley, K.K. Jefferson, G.L. Archer, V.G. Fowler Jr, *Staphylococci in Human Disease*, (n.d.).
- [103] J.E. (John E. Bennett, R. Dolin, M.J. Blaser, R.G. (Robert G. Douglas, Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, n.d.

- [104] T.J. Foster, Immune evasion by staphylococci, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 948–958. doi:10.1038/nrmicro1289.
- [105] T.J. Foster, J.A. Geoghegan, V.K. Ganesh, M. Höök, Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*, *Nat.Rev.Microbiol.* 12 (2014) 49–62.
- [106] T.J. Foster, M. Höök, Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*, *Trends Microbiol.* 6 (1998) 484–488.
- [107] B. Sinha, P.P. Franc, O. Nu, P. Vaudaux, T.J. Foster, D.P. Lew, Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$, 1 (1999) 101–117.
- [108] S. Ahmed, S. Meghji, R.J. Williams, B. Henderson, J.H. Brock, S.P. Nair, *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria, *Infect. Immun.* 69 (2001) 2872–2877. doi:10.1128/IAI.69.5.2872-2877.2001.
- [109] M.O. Elasri, J.R. Thomas, R.A. Skinner, J.S. Blevins, K.E. Beenken, C.L. Nelson, M.S. Smeltzer, M.S. Smelter, *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis, *Bone.* 30 (2002) 275–280. doi:10.1016/S8756-3282(01)00632-9.
- [110] L. Montanaro, C. Renata Arciola, L. Baldassarri, E. Borsetti, Presence and expression of collagen adhesin gene (*cna*) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections, *Biomaterials.* 20 (1999) 1945–1949. doi:10.1016/S0142-9612(99)00099-X.
- [111] H. s Tung, B. Guss, U. Hellman, L. Persson, K. Rubin, C. Rydén, C. Ryden, A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family, *Biochem.J.* 345 Pt 3 (2000) 611–619. doi:10.1042/0264-6021:3450611.
- [112] D.G. Meeker, K.E. Beenken, W.B. Mills, A.J. Loughran, H.J. Spencer, W.B. Lynn, M.S. Smeltzer, Evaluation of antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on activity in an established biofilm., *Antimicrob. Agents Chemother.* (2016). doi:10.1128/AAC.01251-16.
- [113] M.C.. R. Hudson W.K.; Frankenburg, K.P, *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone associated biomaterials, *FEMS Microbiol. Lett.* 173 (1999) 6.
- [114] N.R.P. Projan S J, *The molecular basis of pathogenicity, The Staphy*, Churchill Livingstone, New York, 1997.
- [115] T. Jin, Y.L. Zhu, J. Li, J. Shi, X.Q. He, J. Ding, Y.Q. Xu, Staphylococcal protein A, Panton-Valentine leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis., *Cell. Physiol. Biochem.* 32 (2013) 322–33. doi:10.1159/000354440.

- [116] A.C. Crémieux, O. Dumitrescu, G. Lina, C. Vallee, J.F. Côté, M. Muffat-Joly, T. Lilin, J. Etienne, F. Vandenesch, A. Saleh-Mghir, Panton-Valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis, *PLoS One*. 4 (2009) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0007204.
- [117] M. Otto, *Staphylococcus aureus* toxins, *Curr. Opin. Microbiol.* 17 (2014) 32–37. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004.
- [118] J.-P. Rasigade, S. Trouillet-Assant, T. Ferry, B.A. Diep, A. Sapin, Y. Lhoste, J. Ranfaing, C. Badiou, Y. Benito, M. Bes, F. Couzon, S. Tigaud, G. Lina, J. Etienne, F. Vandenesch, F. Laurent, PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts., *PLoS One*. 8 (2013) e63176. doi:10.1371/journal.pone.0063176.
- [119] B. Davido, A. Saleh-Mghir, F. Laurent, C. Danel, F. Couzon, L. Gatin, F. Vandenesch, J.P. Rasigade, A.C. Crémieux, Phenol-soluble modulins contribute to early sepsis dissemination not late local USA300-osteomyelitis severity in rabbits, *PLoS One*. 11 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0157133.
- [120] M.D. Turner, B. Nedjai, T. Hurst, D.J. Pennington, Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843 (2014) 2563–2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
- [121] R. Ning, X. Zhang, X. Guo, Q. Li, Attachment of *Staphylococcus aureus* is required for activation of nuclear factor kappa B in human osteoblasts, *Acta Biochim.* 42 (2010) 883–892. doi:10.1093/abbs/gmq096.Advance.
- [122] I. Marriott, D.M. Rati, S.H. McCall, S.L. Tranguch, Induction of Nod1 and Nod2 Intracellular Pattern Recognition Receptors in Murine Osteoblasts following Bacterial Challenge, *Infect. Immun.* 73 (2005) 2967–2973. doi:10.1128/IAI.73.5.2967-2973.2005.
- [123] T. Claro, A. Widaa, C. McDonnell, T.J. Foster, F.J. O'Brien, S.W. Kerrigan, *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection., *Microbiology*. 159 (2013) 147–54. doi:10.1099/mic.0.063016-0.
- [124] I. Marriott, D.L. Gray, D.M. Rati, V.G. Fowler, M.E. Stryjewski, L.S. Levin, M.C. Hudson, K.L. Bost, Osteoblasts produce monocyte chemoattractant protein-1 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue, *Bone*. 37 (2005) 504–512. doi:10.1016/j.bone.2005.05.011.
- [125] N.A. Gasper, C.C. Petty, L.W. Schrum, I. Marriott, K.L. Bost, Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4, *Infect. Immun.* 70 (2002) 4075–4082.

- [126] C. Jin, R.A. Flavell, Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation., *J. Clin. Immunol.* 30 (2010) 628–31. doi:10.1007/s10875-010-9440-3.
- [127] J.L. Granick, S.I. Simon, D.L. Borjesson, Hematopoietic Stem and Progenitor Cells as Effectors in Innate Immunity, *Bone Marrow Res.* 2012 (2012) 1–8. doi:10.1155/2012/165107.
- [128] M. Sioud, Y. Fløisand, NOD2/CARD15 on bone marrow CD34+ hematopoietic cells mediates induction of cytokines and cell differentiation., *J. Leukoc. Biol.* 85 (2009) 939–46. doi:10.1189/jlb.1008650.
- [129] M. Sioud, Y. Fløisand, L. Forfang, F. Lund-Johansen, Signaling through Toll-like Receptor 7/8 Induces the Differentiation of Human Bone Marrow CD34+ Progenitor Cells along the Myeloid Lineage, *J. Mol. Biol.* 364 (2006) 945–954. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.054.
- [130] S. Trouillet-Assant, M. Gallet, P. Nauroy, J.-P. Rasiqade, S. Flammier, P. Parroche, J. Marvel, T. Ferry, F. Vandenesch, P. Jurdic, F. Laurent, Dual Impact of Live *Staphylococcus aureus* on the Osteoclast Lineage, Leading to Increased Bone Resorption., *J. Infect. Dis.* (2014) 1–11. doi:10.1093/infdis/jiu386.
- [131] R.A. Brady, J.G. Leid, J.H. Calhoun, J.W. Costerton, M.E. Shirtliff, Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52 (2008) 13–22. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x.
- [132] N.K. Archer, M.J. Mazaitis, J.W. Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, M.E. Shirtliff, *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease., *Virulence.* 2 (2011) 445–459. doi:10.4161/viru.2.5.17724.
- [133] T.F.C. Mah, G.A. O'Toole, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends Microbiol.* 9 (2001) 34–39. doi:10.1016/S0966-842X(00)01913-2.
- [134] J.W. Costerton, K.J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta, T.J. Marrie, Bacterial biofilms in nature and disease., *Annu. Rev. Microbiol.* 41 (1987) 435–64. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002251.
- [135] F. Fitzpatrick, H. Humphreys, J.P. O'Gara, Evidence for icaADBC-Independent Biofilm Development Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 1973–1976. doi:10.1128/JCM.43.4.1973-1976.2005.
- [136] C.J. Sanchez, C.L. Ward, D.R. Romano, B.J. Hurtgen, S.K. Hardy, R.L. Woodbury, A. V Trevino, C.R. Rathbone, J.C. Wenke, *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption *in vitro.*, *BMC Musculoskelet. Disord.* 14 (2013) 187. doi:10.1186/1471-2474-14-187.
- [137] J. Josse, F. Velard, S.C. Gangloff, *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5 (2015) Article 85.

- doi:10.3389/fcimb.2015.00085.
- [138] S.P. Nair, M. Bischoff, M.M. Senn, B. Berger-Bächi, The sigma B regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts, *Infect. Immun.* 71 (2003) 4167–4170. doi:10.1128/IAI.71.7.4167-4170.2003.
- [139] M. Jevon, C. Guo, B. Ma, N. Mordan, S.P. Nair, M. Harris, B. Henderson, G. Bentley, S. Meghji, Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts, *Infect. Immun.* 67 (1999) 2677–2681.
- [140] K.A. Tucker, S.S. Reilly, C.S. Leslie, M.C. Hudson, Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts., *FEMS Microbiol. Lett.* 186 (2000) 151–6.
- [141] J.K. Ellington, A. Elhofy, K.L. Bost, M.C. Hudson, Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in *Staphylococcus aureus* invasion of normal osteoblasts., *Infect. Immun.* 69 (2001) 5235–42. doi:10.1128/iai.69.9.5235-5242.2001.
- [142] L. Tuchscher, E. Medina, M. Hussain, W. Völker, V. Heitmann, S. Niemann, D. Holzinger, J. Roth, R.A. Proctor, K. Becker, G. Peters, B. Löffler, *Staphylococcus aureus* phenotype switching: An effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection, *EMBO Mol. Med.* 3 (2011) 129–141.
- [143] R.C. Massey, A. Buckling, S.J. Peacock, Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*., *Curr. Biol.* 11 (2001) 1810–4.
- [144] L.G. Garcia, S. Lemaire, B.C. Kahl, K. Becker, R.A. Proctor, O. Denis, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke, Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of in vitro, animal and clinical data, *J. Antimicrob. Chemother.* 68 (2013) 1455–1464. doi:10.1093/jac/dkt072.
- [145] B. Löffler, L. Tuchscher, S. Niemann, G. Peters, *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes, *Int. J. Med. Microbiol.* 304 (2014) 170–176. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.011.
- [146] L. Tuchscher, V. Heitmann, M. Hussain, D. Viemann, J. Roth, C. von Eiff, G. Peters, K. Becker, B. Löffler, *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence, *J. Infect. Dis.* 202 (2010) 1031–40. doi:10.1086/656047.
- [147] F. Van Bambeke, M. Barcia-Macay, S. Lemaire, P.M. Tulkens, Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: Current views and perspectives, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 9 (2006) 218–230.
- [148] R.A. Proctor, C. von Eiff, B.C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, G. Peters, Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 295–305. doi:10.1038/nrmicro1384.

- [149] A. Forsgren, Significance of protein a production by staphylococci., *Infect. Immun.* 2 (1970) 672–3.
- [150] N. Merino, A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray, J. Valle, C. Solano, E. Calvo, J.A. Lopez, T.J. Foster, J.R. Penadés, I. Lasa, Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 832–843.
- [151] C. Goerke, S. Campana, M.G. Bayer, G. Döring, K. Botzenhart, C. Wolz, Direct quantitative transcript analysis of the agr regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro., *Infect. Immun.* 68 (2000) 1304–11.
- [152] M. Uhlén, B. Guss, B. Nilsson, S. Gatenbeck, L. Philipson, M. Lindberg, Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications., *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 1695–702.
- [153] T. Moks, L. Abrahmsén, B. Nilsson, U. Hellman, J. Sjöquist, M. Uhlén, Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains., *Eur. J. Biochem.* 156 (1986) 637–43.
- [154] M.I. Gómez, A. Lee, B. Reddy, A. Muir, G. Soong, A. Pitt, A. Cheung, A. Prince, *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1., *Nat. Med.* 10 (2004) 842–848.
- [155] C. Gai, C. Gonzalez, C. Ledo, A. Garofalo, M.S. Di Genaro, D.O. Sordelli, M.I. Gomez, Shedding of tumor necrosis factor receptor 1 induced by protein a decreases tumor necrosis factor alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection, *Infect. Immun.* 81 (2013) 4200–4207. doi:10.1128/IAI.00919-13.
- [156] F.J. Martin, M.I. Gomez, D.M. Wetzel, G. Memmi, M. O’Seaghdha, G. Soong, C. Schindler, A. Prince, *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1931–1939.
- [157] T. Claro, A. Widaa, M. O’Seaghdha, H. Miajlovic, T.J. Foster, F.J. O’Brien, S.W. Kerrigan, *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis., *PLoS One.* 6 (2011) e18748. doi:10.1371/journal.pone.0018748.
- [158] M.I. Gómez, M. O’Seaghdha, M. Magargee, T.J. Foster, A.S. Prince, M.O. Seaghdha, M. Magargee, T.J. Foster, A.S. Prince, *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20190–20196. doi:10.1074/jbc.M601956200.
- [159] M.I. Gomez, M.O. Seaghdha, A.S. Prince, *Staphylococcus aureus* protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling, *EMBO J.* 26 (2007) 701–709. doi:10.1038/sj.emboj.7601554.
- [160] U.K. LAEMMLI, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of

- Bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680–685. doi:10.1038/227680a0.
- [161] J.E. Cassat, N.D. Hammer, J.P. Campbell, M. a Benson, D.S. Perrien, L.N. Mrak, M.S. Smeltzer, V.J. Torres, E.P. Skaar, A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis., *Cell Host Microbe*. 13 (2013) 759–72. doi:10.1016/j.chom.2013.05.003.
- [162] S.M. Lattar, M.N. Llana, P. Denoël, S. Germain, F.R. Buzzola, J.C. Lee, D.O. Sordelli, Protein antigens increase the protective efficacy of a capsule-based vaccine against *Staphylococcus aureus* in a rat model of osteomyelitis, *Infect. Immun.* 82 (2014) 83–91.
- [163] M.S. Hibbs, K.A. Hasty, J.M. Seyer, A.H. Kang, C.L. Mainardi, Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase., *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 2493–2500.
- [164] J. Lam, S. Takeshita, J.E. Barker, O. Kanagawa, F.P. Ross, S.L. Teitelbaum, TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 1481–1488.
- [165] J.M. Delaissé, T.L. Andersen, M.T. Engsig, K. Henriksen, T. Troen, L. Blavier, J.M. Delaissé, T.L. Andersen, M.T. Engsig, K. Henriksen, T. Troen, L. Blavier, Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities, *Microsc. Res. Tech.* 61 (2003) 504–513. doi:10.1002/jemt.10374.
- [166] M. Bossard, T. Tomaszek, S. Thompson, B. Amegadzie, C. Hanning, C. Jones, J. Kurdyla, D. McNulty, F. Drake, M. Gowen, M. Levy, Proteolytic Activity of Human Osteoclast Cathepsin K, *J. Biol. Chem.* 271 (1996).
- [167] A. Garofalo, C. Gai, S. Lattar, N. Gardella, M. Mollerach, B.C. Kahl, K. Becker, A.S. Prince, D.O. Sordelli, M.I. Gómez, The length of the *Staphylococcus aureus* protein a polymorphic region regulates inflammation: Impact on acute and chronic infection, *J. Infect. Dis.* 206 (2012) 81–90. doi:10.1093/infdis/jis311.
- [168] K. Kobayashi, N. Takahashi, E. Jimi, N. Udagawa, M. Takami, S. Kotake, N. Nakagawa, M. Kinoshita, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, T. Morinaga, K. Higashio, T.J. Martin, T. Suda, Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 275–86.
- [169] N. Spagnolo, F. Greco, A. Rossi, L. Ciolli, A. Teti, P. Posteraro, Chronic staphylococcal osteomyelitis: A new experimental rat model, *Infect. Immun.* 61 (1993) 5225–5230.
- [170] R. a. Proctor, A. Kriegeskorte, B.C. Kahl, K. Becker, B. Löffler, G. Peters, *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4 (2014) 1–8. doi:10.3389/fcimb.2014.00099.

- [171] B. Henderson, S.P. Nair, Hard labour: Bacterial infection of the skeleton, *Trends Microbiol.* 11 (2003) 570–577.
- [172] M.V. Delpino, P. Barrionuevo, G.C. Macedo, S.C. Oliveira, S. Di Genaro, R. Scian, M.C. Miraglia, C. a Fossati, P.C. Baldi, G.H. Giambartolomei, Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to *Brucella abortus* infection requires TLR2/MyD88-dependent TNF- α production., *J. Leukoc. Biol.* 91 (2012) 285–98. doi:10.1189/jlb.04111185.
- [173] J. Kim, J. Yang, O.-J. Park, S.-S. Kang, W.-S. Kim, K. Kurokawa, C.-H. Yun, H.-H. Kim, B.L. Lee, S.H. Han, Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation., *J. Bone Miner. Res.* 28 (2013) 2381–91. doi:10.1002/jbmr.1973.
- [174] Y.S. Lau, W. Wang, A. Sabokbar, H. Simpson, S. Nair, B. Henderson, A. Berendt, N.A. Athanasou, *Staphylococcus aureus* capsular material promotes osteoclast formation, *Injury.* 37 (2006).
- [175] S. Meghji, S.J. Crean, P.A. Hill, M. Sheikh, S.P. Nair, K. Heron, B. Henderson, E.B. Mawer, M. Harris, Surface-associated protein from *Staphylococcus aureus* stimulates osteoclastogenesis: possible role in *S. aureus*-induced bone pathology., *Br. J. Rheumatol.* 37 (1998) 1095–1101.
- [176] J. Yang, Y.H. Ryu, C.-H. Yun, S.H. Han, Impaired osteoclastogenesis by staphylococcal lipoteichoic acid through Toll-like receptor 2 with partial involvement of MyD88., *J. Leukoc. Biol.* 86 (2009) 823–831. doi:10.1189/jlb.0309206.
- [177] B.S. Herrera, A.S. Bastos, L.S. Coimbra, S.A. Teixeira, C. Rossa, T.E. Van Dyke, M.N. Muscara, L.C. Spolidorio, Peripheral Blood Mononuclear Phagocytes From Patients With Chronic Periodontitis Are Primed for Osteoclast Formation, *J. Periodontol.* 85 (2014) e72–e81. doi:10.1902/jop.2013.130280.
- [178] H. Ochi, Y. Hara, M. Tagawa, K. Shinomiya, Y. Asou, The roles of TNFR1 in lipopolysaccharide-induced bone loss: Dual effects of TNFR1 on bone metabolism via osteoclastogenesis and osteoblast survival, *J. Orthop. Res.* 28 (2010) 657–663. doi:10.1002/jor.21028.
- [179] C.D. Gonzalez, C. Ledo, C. Gai, A. Garófalo, M.I. Gómez, The Sbi Protein Contributes to *Staphylococcus aureus* Inflammatory Response during Systemic Infection., *PLoS One.* 10 (2015) e0131879. doi:10.1371/journal.pone.0131879.
- [180] R.L. Lees, J.N. Heersche, Differences in regulation of pH(i) in large (≥ 10 nuclei) and small (≤ 5 nuclei) osteoclasts., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) C751–C761.
- [181] R.L. Lees, J.N. Heersche, Macrophage colony stimulating factor increases bone resorption in dispersed osteoclast cultures by increasing osteoclast size., *J. Bone Miner. Res.* 14 (1999)

- 937–45. doi:10.1359/jbmr.1999.14.6.937.
- [182] L.X. Xu, T. Kukita, Y. Nakano, H. Yu, T. Hotokebuchi, T. Kuratani, T. Iijima, T. Koga, Osteoclasts in normal and adjuvant arthritis bone tissues express the mRNA for both type I and II interleukin-1 receptors., *Lab. Invest.* 75 (1996) 677–87.
- [183] H. Takayanagi, Inflammatory bone destruction and osteoimmunology, *J. Periodontal Res.* 40 (2005) 287–293. doi:10.1111/j.1600-0765.2005.00814.x.
- [184] S. Takeshita, N. Namba, J.J. Zhao, Y. Jiang, H.K. Genant, M.J. Silva, M.D. Brodt, C.D. Helgason, J. Kalesnikoff, M.J. Rauh, R.K. Humphries, G. Krystal, S.L. Teitelbaum, F.P. Ross, SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts, *Nat. Med.* 8 (2002) 943–949. doi:10.1038/nm752.
- [185] K. Wang, H. Yamamoto, J.R. Chin, Z. Werb, T.H. Vu, Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 53848–53856. doi:10.1074/jbc.M403114200.
- [186] T. Yi, H.L. Lee, J.H. Cha, S. Il Ko, H.J. Kim, H.I. Shin, K.M. Woo, H.M. Ryoo, G.S. Kim, J.H. Baek, Epidermal growth factor receptor regulates osteoclast differentiation and survival through cross-talking with RANK signaling, *J. Cell. Physiol.* 217 (2008) 409–422. doi:10.1002/jcp.21511.
- [187] M. Marzia, R. Chiusaroli, L. Neff, N.-Y. Kim, A.H. Chishti, R. Baron, W.C. Horne, Calpain is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin., *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 9745–54. doi:10.1074/jbc.M513516200.
- [188] G. Soong, F.J. Martin, J. Chun, T.S. Cohen, D.S. Ahn, A. Prince, *Staphylococcus aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35891–35898. doi:10.1074/jbc.M111.295386.
- [189] T. Yoshii, S. Magara, D. Miyai, H. Nishimura, E. Kuroki, S. Furudoi, T. Komori, C. Ohbayashi, Local Levels of Interleukin-1B, -4, -6, and Tumor Necrosis Factor A in an Experimental Model of Murine Osteomyelitis Due To *Staphylococcus aureus*, *Cytokine.* 19 (2002) 59–65. doi:10.1006/cyto.2002.1039.
- [190] A. Littlewood-Evans, M. Hattenberger, C. Luscher, A. Pataki, O. Zak, T. O'Reilly, Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats, *Infect. Immun.* 65 (1997) 3438–3443.
- [191] Y.X. Zhao, A. Ljungdahl, T. Olsson, A. Tarkowski, In situ hybridization analysis of synovial and systemic cytokine messenger RNA expression in superantigen-mediated *Staphylococcus aureus* arthritis., *Arthritis Rheum.* 39 (1996) 959–67.

- [192] I. Marriott, D.L. Gray, S.L. Tranguch, V.G. Fowler, M. Stryjewski, L. Scott Levin, M.C. Hudson, K.L. Bost, K.L. Bost, Osteoblasts express the inflammatory cytokine interleukin-6 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue., *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 1399–406. doi:10.1016/S0002-9440(10)63226-9.
- [193] K.L. Bost, W.K. Ramp, N.C. Nicholson, J.L. Bento, I. Marriott, M.C. Hudson, *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production., *J. Infect. Dis.* 180 (1999) 1912–20. doi:10.1086/315138.
- [194] M.E.R. van Meegeren, G. Roosendaal, N.W.D. Jansen, M.J.G. Wenting, A.C.W. van Wesel, J.A.G. van Roon, F.P.J.G. Lafeber, IL-4 alone and in combination with IL-10 protects against blood-induced cartilage damage, *Osteoarthr. Cartil.* 20 (2012) 764–772. doi:10.1016/j.joca.2012.04.002.
- [195] M.E.R. van Meegeren, G. Roosendaal, K. Coeleveld, L. Nieuwenhuizen, S.C. Mastbergen, F.P.J.G. Lafeber, A single intra-articular injection with IL-4 plus IL-10 ameliorates blood-induced cartilage degeneration in haemophilic mice., *Br. J. Haematol.* 160 (2013) 515–20. doi:10.1111/bjh.12148.
- [196] R. Dresner-Pollak, N. Gelb, D. Rachmilewitz, F. Karmeli, M. Weinreb, Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones., *Gastroenterology.* 127 (2004) 792–801.
- [197] R.M. McLoughlin, J.C. Lee, D.L. Kasper, A.O. Tzianabos, IFN-gamma regulated chemokine production determines the outcome of *Staphylococcus aureus* infection., *J. Immunol.* 181 (2008) 1323–1332. doi:181/2/1323 [pii].
- [198] L.L. Key, R.M. Rodriguiz, S.M. Willi, N.M. Wright, H.C. Hatcher, D.R. Eyre, J.K. Cure, P.P. Griffin, W.L. Ries, Long-Term Treatment of Osteopetrosis with Recombinant Human Interferon Gamma, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1594–1599. doi:10.1056/NEJM199506153322402.
- [199] M. Tohkin, S. Kakudo, H. Kasai, H. Arita, Comparative study of inhibitory effects by murine interferon gamma and a new bisphosphonate (alendronate) in hypercalcemic, nude mice bearing human tumor (LJC-1-JCK)., *Cancer Immunol. Immunother.* 39 (1994) 155–60.
- [200] R.P. Novick, Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1429–1449. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x.
- [201] S.A. Horst, V. Hoerr, A. Beineke, C. Kreis, L. Tuchscher, J. Kalinka, S. Lehne, I. Schleicher, G. Köhler, T. Fuchs, M.J. Raschke, M. Rohde, G. Peters, C. Faber, B. Löffler, E. Medina, A novel mouse model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that closely mimics the human infection: An integrated view of disease pathogenesis, *Am. J. Pathol.* 181 (2012) 1206–1214. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.005.

- [202] C. Bruhn, [Denosumab. The first inhibitor of RANK-ligand for treatment of osteoporosis]., *Med. Monatsschr. Pharm.* 33 (2010) 370–5.
- [203] P.J. Kostenuik, S.Y. Smith, R. Samadfam, J. Jolette, L. Zhou, M.S. Ominsky, Effects of Denosumab, Alendronate, or Denosumab Following Alendronate on Bone Turnover, Calcium Homeostasis, Bone Mass and Bone Strength in Ovariectomized Cynomolgus Monkeys, *J. Bone Miner. Res.* 30 (2015) 657–669. doi:10.1002/jbmr.2401.
- [204] M. Verdrengh, H. Carlsten, C. Ohlsson, A. Tarkowski, Addition of bisphosphonate to antibiotic and anti-inflammatory treatment reduces bone resorption in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis., *J. Orthop. Res.* 25 (2007) 304–310.
- [205] M. Verdrengh, M. Bokarewa, C. Ohlsson, M. Stolina, A. Tarkowski, RANKL-targeted therapy inhibits bone resorption in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis, *Bone*. 46 (2010) 752–758.
- [206] J.J. Varrone, K.L.D.M. Bentley, S.N. Bello-irizarry, K. Nishitani, A. Manuscript, NIH Public Access, 32 (2015) 1389–1396. doi:10.1002/jor.22672.Passive.
- [207] H.K. Kim, C. Emolo, A.C. DeDent, F. Falugi, D.M. Missiakas, O. Schneewind, Protein A-specific monoclonal antibodies and prevention of *Staphylococcus aureus* disease in mice, *Infect. Immun.* 80 (2012) 3460–3470. doi:10.1128/IAI.00230-12.
- [208] H.-Y.H.K. Kim, A.G. Cheng, H.-Y.H.K. Kim, D.M. Missiakas, O. Schneewind, Nontoxigenic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice., *J. Exp. Med.* 207 (2010) 1863–70. doi:10.1084/jem.20092514.
- [209] S. Rauch, P. Gough, H.K. Kim, O. Schneewind, D. Missiakas, Vaccine Protection of Leukopenic Mice against *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection., *Infect. Immun.* 82 (2014) 4889–98. doi:10.1128/IAI.02328-14.