

Universidad CEU San Pablo
CEINDO- CEU Escuela Internacional de Doctorado

Programa en Medicina Traslacional



**Papel del cilio primario y las
caveolas en las acciones
osteogénicas ejercidas por el
receptor de tipo I de la parathormona
(PTH1R) en células óseas**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Eduardo Martín Guerrero

Dirigida por:

Juan Antonio Ardura Rodríguez

Arancha Rodríguez de Gortázar Alonso-Villalobos

MADRID

2022

TESIS DOCTORAL

EDUARDO MARTÍN GUERRERO

2

0

2

2

Dña. Arancha Rodríguez de Gortázar Alonso-Villalobos y D. Juan Antonio Ardura Rodríguez, profesores de los departamentos de Ciencias Médicas Básicas, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad San Pablo CEU,

HACEN CONSTAR:

Que D. Eduardo Martín Guerrero ha realizado en el Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) bajo su dirección el trabajo titulado "*Papel del cilio primario y las caveolas en las acciones osteogénicas ejercidas por el receptor de tipo I de la parathormona (PTH1R) en células óseas*" con objeto de obtener el Grado de Doctor, y que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios y constituye una aportación original al tema.

MADRID, 24 de marzo de 2022



Arancha Rodríguez de Gortázar Alonso-Villalobos

Juan Antonio Ardura Rodríguez

Agradecimientos

Mucho tengo que agradecer en los ya más de cuatro años que ha durado esta etapa de mi vida. Muchas son las personas sin las que, sin duda, esta Tesis Doctoral no habría salido adelante.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Juan Antonio Ardura Rodríguez y Arancha Rodríguez de Gortázar Alonso-Villalobos, todo el esfuerzo y las horas que le han dedicado a que me desarrolle como investigador y, por qué no decirlo, como persona. Decirles a los dos que juntos forman un tándem increíble, y ojalá continúen juntos muchos años más para poder guiar y formar a nuevos investigadores como han hecho conmigo hasta hoy.

Juanan siempre está ahí, dispuesto a echarme una mano y a intentar hacerte la vida un poco más sencilla. De él admiro su asombrosa capacidad para conjugar tantísimas clases, su cargo académico y su actividad investigadora. Aún con todo eso, siempre está al tanto de los últimos avances en el campo de la fisiopatología ósea, con alguna idea para el próximo experimento o alguna propuesta para una nueva línea de investigación, y eso es algo asombroso. Quien me conoce bien sabe que para bromear me refiero a él como *Juan Antonio, mi mentor*, pero la realidad es que con todo lo que he aprendido de él, tanto a nivel académico como a nivel humano, no puedo estar más seguro de que lo es realmente. Muchas gracias.

De Arancha destacaría su visión positiva, esa que te hace contagiarte y pensar que puedes cumplir cualquier plazo o llegar a lo más alto. Siempre con trabajo duro, eso sí, porque también tiene esa pizca de mano dura que hace que no te duermas y que es tan necesaria en un director de Tesis. Además, la considero una persona brillante, por lo que nos ha demostrado tantas veces, por ejemplo, en los *Lab meetings*: con solo darle un rápido vistazo a un problema o a unos resultados, se le ocurre esa idea que hace que todo mejore. Por último, agradecerle todos los consejos que me ha dado durante este tiempo. Gracias.

Gracias también a la Universidad San Pablo CEU y a la Escuela Internacional de Doctorado por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica, así como por ofrecerme los recursos y herramientas necesarios para poder desarrollar mi Tesis Doctoral.

Muchas gracias a mi grupo de Investigación, no se me ocurre un mejor equipo con el que haber pasado estos 4 años. A Irene, mi compañera, con la que he pasado por tantas cosas que nos daría para escribir un libro. Días de lágrimas ha habido, para qué mentir, pero también muchos momentos buenos que me llevo para siempre, como los viajes a los Congresos o ese ¡Compañero! con el que me saludaba al entrar al laboratorio. Aunque ella crea que no, ya está a punto de ver que todo el duro trabajo de estos años, que ha sido muchísimo, tiene recompensa. También a Sara, por las horas compartidas de microscopía confocal (según ella tras ponerse la quinta bata, a temperatura polar), llenas de risas y de anécdotas.

No quiero olvidarme de todos mis compañeros del IMMA, tanto los que se fueron como a los que aún están allí. Entre los primeros, cómo olvidarme de las Ayuso, que tantas veces me sacaron de un apuro en mis primeros meses, o de Javi Sánchez, siempre dispuesto a un rato de charla para compartir nuestras penas. Entre los que permanecen, no puedo dejar de mencionar a nuestro gran equipo de técnicos. Aquí tengo que destacar a Irene Gutiérrez: a base de robarle la vida poco a poco a disgustos, conseguí abrirme un hueco en su corazoncito; aunque pensándolo bien, puede que no fuese tan difícil, porque es posible que no le quepa en el pecho. A los miembros del grupo "Labo", con los que tantos y tan buenos momentos he pasado dentro y fuera del laboratorio, incluyendo el rato del café, que tiene el mágico poder de hacerte ver que los problemas quizá no lo sean tanto.

Mención especial aquí a dos personas: Javi y Sergio, grandes virólogos y mejores personas, con los que nunca faltan las risas. A Javi, con su creatividad y su constancia, le auguro un éxito tras otro. Con Sergio me ha tocado en suerte compartir esta casi interminable carrera de fondo que es el doctorado hasta el último día. Y vaya si ha sido una suerte, porque creo que hablo por toda la gente que le conoce cuando digo que es un ejemplo a seguir, un tipo excepcional. A los dos, deciros que espero que haya muchos más momentos de risas aguardando para nosotros.

Gracias a Carmela, por aparecer en mi vida para ponerla patas arriba. Por enseñarme que no se deben dar las cosas por hechas. Por haber creído en mí sin reservas, desde el primer día. Por sorprenderme a diario, por haber renovado mis energías y por sacar siempre mi mejor versión. Y por todo lo que nos queda por vivir.

Para el final, agradecerle a mi familia y amigos, sin los que no sería la persona que soy hoy. A Mariano, a David y al resto de amigos de la Universidad con los que me inicié en este maravilloso mundo. Y a Elena, por todo lo que me dio en este tiempo, sin pedir nada a cambio, y por lo felices que fuimos. Gracias a mis abuelos, de los que aún sigo aprendiendo. También a mi hermano, por estar siempre. Por último, gracias a mis padres, por haberme intentado guiar siempre por el camino correcto y por hacerme ver cuando estaba a punto de salirme del mismo. Por haberme transmitido los valores de la humildad, el esfuerzo, el trabajo y las ganas de aprender. En definitiva, porque, aunque no se lo diga nunca, ellos son mis referentes.

Resumen

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra sometido de manera continua a remodelado para preservar su integridad estructural y regular la homeostasis mineral. El remodelado óseo es un proceso fisiológico que implica la resorción ósea por parte de los osteoclastos y la posterior formación de nuevo tejido mediada por los osteoblastos. Por otra parte, se ha propuesto que los osteocitos, las células más abundantes en el hueso, son los reguladores encargados de orquestar los efectos de osteoblastos y osteoclastos y modular, por tanto, el remodelado óseo. De esta forma, las alteraciones patológicas en el remodelado óseo que se basan en una mayor actividad de los osteoclastos frente a la de los osteoblastos son características del envejecimiento y pueden desembocar en patologías como la osteoporosis, una enfermedad sistémica del esqueleto caracterizada por una baja masa ósea y un deterioro progresivo de la microarquitectura esquelética. El receptor de tipo I de la parathormona (PTH1R), ampliamente descrito como regulador de la fisiopatología ósea, es un receptor acoplado a proteínas G cuya estimulación por sus ligandos parathormona (PTH) o proteína relacionada con la PTH (PTHrP, un importante regulador del remodelado y la formación ósea) activa diversas vías de señalización intracelular que varían dependiendo de las zonas subcelulares donde se localice el receptor, así como de las proteínas específicas a las que esté asociado. En este contexto, se ha descrito que PTH1R presenta dominios de unión asociados a diversas subestructuras celulares presentes en células óseas, como el cilio primario, un orgánulo apendicular formado durante la fase quiescente del ciclo celular, y las caveolas, pequeñas invaginaciones de membrana plasmática ricas en colesterol y fosfolípidos cuya principal función es el reclutamiento de moléculas para obtener concentraciones apropiadas de efectores de señalización. Sin embargo, de manera previa a la realización de esta Tesis Doctoral no se han descrito los efectos de la distinta señalización de PTH1R en función de su localización subcelular en células óseas. De esta forma, hemos caracterizado la localización de PTH1R y el cilio primario tanto en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 como en células osteocíticas MLO-Y4. Posteriormente, hemos demostrado que los efectos citoprotectores ejercidos por PTHrP en estas células son dependientes tanto de la presencia del cilio primario como del funcionamiento de la vía de

señalización Hedgehog (Hh), estrechamente relacionada con él; sin embargo, los efectos que ejerce PTHrP sobre la expresión de genes osteogénicos están modulados por mecanismos dependientes del cilio primario pero independientes de Hh. Además, la estimulación mecánica mediante Flujo de Fluido (FF) incrementa el número y la longitud de los cilios primarios, lo que podría contribuir a potenciar los efectos pro-supervivencia y las acciones osteogénicas desencadenadas por PTH1R tras ser estimulado con su ligando PTHrP. De manera análoga, se ha demostrado la localización de PTH1R en las caveolas de las células MC3T3-E1, lo que reduce la capacidad del receptor de difundir en la membrana plasmática, su internalización y la activación de las vías de señalización desencadenadas por él en respuesta al estímulo por ligando. En conclusión, los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral indican que la actividad de PTH1R podría ser regulada mediante la modulación de diversas estructuras subcelulares como PTH1R y las caveolas, lo que sugiere su utilidad como posible futura diana terapéutica en el tratamiento de patologías óseas asociadas al envejecimiento como la osteoporosis.

Palabras clave: receptor de parathormona, PTH1R, proteína relacionada con la parathormona, PTHrP, osteocitos, osteoblastos, hueso, cilio primario, caveolas, osteoporosis, envejecimiento.

Summary

Bone is a dynamic tissue that continuously undergoes continual remodeling to preserve its structural integrity and regulate mineral homeostasis. Bone remodeling is a physiological process that implies bone resorption by osteoclasts and subsequent bone formation mediated by osteoblasts. It has been proposed that osteocytes, the most important cells in bone tissue, are master regulators that orchestrate the effects of osteoblasts and osteoclasts in order to modulate bone remodeling. Thus, pathological alterations in bone remodeling that are based on increased osteoclast resorptive actions and reduced bone formation by osteoblasts are key features of aging and may lead to pathologies like osteoporosis, a systemic skeletal disease characterized by low bone density and a progressive deterioration of bone microarchitecture. Parathyroid hormone receptor type I (PTH1R), widely described as regulator of bone pathophysiology, is a G protein coupled receptor (GPCR) whose stimulation by its ligands parathormone (PTH) or PTH-related protein (PTHrP, a key regulator of bone remodeling and formation) triggers several intracellular signaling pathways depending on subcellular domains in which the receptor is located, and specific proteins associated with it. In this context, it has been described that PTH1R presents binding domains linked to several subcellular structures that are present in bone cells, such as the primary cilium, an appendicular organelle formed during quiescent phase of cell cycle, and caveolae, small invaginations of the plasma membrane enriched in cholesterol and phospholipids whose principal function is the recruitment of molecules in order to obtain appropriate concentrations of signaling effectors. However, prior to realization of the present Doctoral Thesis, it has not been described the effects of different PTH1R signaling depending on its subcellular location in bone cells. Therefore, we have characterized the location of PTH1R at the primary cilium of both pre-osteoblastic MC3T3-E1 and osteocytic MLO-Y4 cells. We have subsequently demonstrated that the cytoprotective effects performed by PTHrP are dependent on both the presence of the primary cilium and activation of hedgehog (Hh) signaling, closely related with primary cilium. Nevertheless, effects of PTHrP on osteogenic gene expression are also modulated by cilia-dependent mechanisms that are independent of Hh signaling. Moreover, mechanical stimulation by Fluid Flow

(FF) increases cilia length and number, which could probably contribute pro-survival effects and osteogenic actions triggered by PTH1R upon PTHrP stimulation. Analogously, we have described the location of PTH1R in the caveolae of MC3T3-E1 cells. Caveolar location of PTH1R reduces the ability of receptor to diffuse across the plasma membrane, its internalization and activation of the signaling pathways triggered by it in response to PTHrP stimulation. In conclusion, the data obtained in the present Doctoral Thesis indicate that PTH1R activity may be regulated through modulation of several subcellular structures such as the primary cilium and caveolae, which in turn suggest their utility as potential therapeutic targets in the treatment of skeletal pathologies related to aging like osteoporosis.

Keywords: parathyroid hormone receptor, PTH1R, parathyroid hormone related protein, PTHrP, osteocyte, osteoblast, bone, primary cilium, caveolae, aging, osteoporosis.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen | 7 |
| Summary | 10 |
| Lista de abreviaturas | 17 |
| 1. Introducción | 22 |
| 1.1. Tejido óseo..... | 23 |
| 1.1.1. Composición del tejido óseo..... | 23 |
| 1.1.2. Desarrollo y mantenimiento del tejido óseo..... | 30 |
| 1.1.2.1. Osteogénesis..... | 30 |
| 1.1.2.2. Modelado óseo..... | 32 |
| 1.1.2.3 Remodelado óseo..... | 33 |
| 1.1.2.4. Factores reguladores del metabolismo del hueso..... | 36 |
| 1.2. Sistema PTHrP/PTH1R y su papel en el metabolismo del hueso..... | 36 |
| 1.3. El cilio primario como modulador del metabolismo óseo..... | 42 |
| 1.3.1. Ciliogénesis. Estructura del cilio primario y Sistema de transporte intraflagelar (IFT) | 42 |
| 1.3.2. El cilio primario como mecanotransductor..... | 45 |
| 1.3.3. Vías de señalización relacionadas con el cilio primario. Señalización Hedgehog..... | 48 |
| 1.4. Las caveolas como moduladoras del metabolismo óseo..... | 54 |
| 1.4.1. Estructura y formación de las caveolas..... | 54 |
| 1.4.2. Dinámica de las caveolas y función mecanosensora..... | 57 |
| 1.4.3. Papel de las caveolas en tejido óseo | 58 |
| 2. Hipótesis | 61 |
| 3. Objetivos | 63 |
| 4. Material y métodos | 65 |
| 4.1. Modelos experimentales in vitro..... | 66 |
| 4.1.1. Células osteocíticas de ratón MYLO-Y4..... | 66 |
| 4.1.2. Células pre-osteoblásticas de ratón MC3T3-E1..... | 67 |
| 4.2. Técnicas experimentales..... | 69 |
| 4.2.1. Estímulos agonistas y antagonistas..... | 69 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2. Estimulación mecánica de las células mediante Flujo de Fluido (FF) | 70 |
| 4.2.3. Transfecciones transitorias..... | 71 |
| 4.2.4. Ensayos de viabilidad y proliferación celular | 72 |
| 4.2.5. Inmunofluorescencia..... | 73 |
| 4.2.6. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) | 73 |
| 4.2.7. Extracción de proteínas y análisis de Inmunoblot..... | 75 |
| 4.2.8. Estudios de microscopía confocal en células vivas. Estudios de movilidad e internalización de PTH1R..... | 78 |
| 4.2.9. Medida de calcio intracelular..... | 78 |
| 4.2.10. Recuperación de Fluorescencia tras fotoblanqueamiento (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching-FRAP</i>) | 79 |
| 4.2.11. Análisis estadístico..... | 81 |
| 5. Resultados | 82 |
| 5.1. Localización del receptor PTH1R en el cilio primario de células osteocíticas MYLO-Y4 y células pre-osteoblásticas MC3T3-E1..... | 83 |
| 5.2. Papel del cilio primario en la modulación de la inducción de genes formadores de hueso medida por PTHrP. Efectos sobre genes relacionados con los osteoblastos y los osteoclastos en células MYLO-Y4 y MC3T3-E1..... | 88 |
| 5.3. Papel del cilio primario en la supervivencia celular inducida por PTHrP en osteocitos MYLO-Y4 y en osteoblastos MC3T3-E1. | 97 |
| 5.4. Regulación del cilio primario en la acumulación de GLI1 dependiente de PTHrP en osteocitos MYLO-Y4 y en osteoblastos MC3T3-E1..... | 99 |
| 5.5. Papel de GLI1 en los efectos modulados por PTHrP en genes relacionados con osteoblastos/osteoclastos y la supervivencia celular en células osteocíticas MYLO-Y4 y en células osteoblásticas MC3T3-E1..... | 102 |
| 5.6. Efectos de la estimulación mecánica sobre la ciliogénesis y la estructura del cilio primario..... | 107 |

| | |
|---|------------|
| 5.7. Localización del receptor PTH1R en las caveolas de células osteoblásticas MC3T3-E1..... | 109 |
| 5.8. Efectos de la localización caveolar de PTH1R sobre su capacidad de internalización y movilidad en la membrana plasmática en respuesta a estimulación por ligando..... | 112 |
| 5.9. Efectos de la localización caveolar de PTH1R sobre las vías de señalización desencadenadas tras su estimulación por el ligando PTHrP en células osteoblásticas MC3T3-E1..... | 116 |
| 6. Discusión..... | 121 |
| 6.1. El cilio primario como modulador de la osteogénesis y la supervivencia celular inducida por PTHrP..... | 122 |
| 6.2. Efecto combinado de la estimulación por ligando y la estimulación mecánica e PTH1R en osteocitos y osteoblastos..... | 130 |
| 6.3. Las caveolas modulan la dinámica de movilización e internalización de PTH1R..... | 132 |
| 6.4. Las caveolas modulan la señalización desencadenada por PTH1R en respuesta a su estimulación por PTHrP..... | 135 |
| 6.5. Relación del cilio primario y las caveolas con patologías relacionadas con el envejecimiento | 139 |
| 7. Conclusiones..... | 142 |
| 8. Conclusions..... | 144 |
| 9. Limitaciones del estudio. Perspectivas futuras..... | 146 |
| 10. Referencias bibliográficas..... | 150 |

Lista de
abreviaturas

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|---|
| 7-DHC | 7-Dehidrocolesterol |
| 7-DHCR | 7-Dehidrocolesterol reductasa |
| α -MEM | Medio de cultivo esencial mínimo |
| AC | Adenilato ciclasa |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| B ₂ R | Receptor de tipo 2 de bradicidina |
| BBS | Síndrome de Bardet Biedl |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BMP | Proteínas óseas morfogénicas |
| BMPR1A | Receptor de tipo 1 de BMP |
| Ca _i ²⁺ | Calcio intracelular |
| Cat. K | Catepsina K |
| CAV1 | Caveolina-1 |
| CAV2 | Caveolina-2 |
| CAV3 | Caveolina-3 |
| COLI | Colágeno de tipo I |
| CREB | Elemento de respuesta del AMPc |
| DAG | Diacilglicerol |
| DAPI | 4',6 diamidino-2 fenilindol |
| DE | Desviación estándar |
| DHH | Desert hedgehog |
| EGTA | Ácido etilenglicoltetraacético |
| EEM | Error estándar de la media |
| EFG | Factor de crecimiento epidérmico |
| EGFR | Receptor de EGF |
| ERK1/2 | Quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 |
| ET _A R | Receptor de tipo A de endotelin |

| | |
|-------------------|---|
| ET _B R | Receptor de tipo B de endotelina |
| EVC | Proteínas de Ellis van Creveld |
| FA | Fosfatasa alcalina |
| FF | Flujo de fluido |
| FGF | Factor de crecimiento fibroblástico |
| FRAP | Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueamiento |
| GANT61 | Antagonista de GLI1 61 |
| GAPDH | Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| GLI | Oncogén asociado a glioma |
| GliA | Forma activa de Gli |
| GliF | Forma completa de Gli |
| GliR | Forma truncada/represora de Gli |
| GLP-1R | Receptor de tipo 1 del péptido similar a glucagón |
| GPCR | Receptor acoplado a proteína G |
| HC | Hidrato de cloral |
| Hh | Hedgehog |
| IFT | Transporte intraflagelar |
| IGF-1 | Factor de crecimiento similar a insulina 1 |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IHH | Indian hedgehog |
| IL | Interleuquina |
| IP3 | Inositol 3-fosfato |
| KIF7 | Miembro de la familia de las kinesinas 7 |
| M-CSF | Factor estimulante de las colonias de macrófagos |
| MAPK | Proteína quinasas activadas por mitógenos |
| MEC | Matriz extracelular |
| MKP | Fosfatasas asociadas a MAPK |
| MMP | Metaloproteinasas de matriz |

| | |
|-----------------------|---|
| NHERF1 | Factor regulador intercambiador Na ⁺ /H ⁺ 1 |
| OPG | Osteoprotegerina |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PC | Policistina |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PI(4,5)P ₂ | Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKB | Proteína quinasa B |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PLD | Fosfolipasa D |
| PS | Fosfatidilserina |
| PTCH1 | Patched 1 |
| PTH | Parathormona |
| PTH1R | Receptor de tipo I de la PTH |
| PTHrP | Proteína relacionada con la PTH |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| RANKL | Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B |
| RDI | Región de interés |
| RE | Retículo endoplásmico |
| RhoA | Miembro A de la familia de genes homólogos de Ras |
| Rho GEF | Factor intercambiador del nucleótido guanina Rho |
| Runx2 | Factor de transcripción 2 relacionado con Runt |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SFT | Suero fetal de ternera |
| SHH | Sonic hedgehog |
| siARN | ARN pequeño de interferencia |
| SMO | Smoothened |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| SMURF | Proteína E3 de ubiquitina |
| SOST | Esclerostina |
| SuFu | Supresor de Fused |
| TBS | Búfer Tris salino |
| TFG- β | Factor de crecimiento transformante beta |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TRPV4 | Receptor de potencial vaniloide 4 |
| u.a. | Unidades arbitrarias |
| UMO | Unidades multicelulares óseas |
| VPAC2 | Receptor de tipo 2 del péptido intestinal vasoactivo |
| VEGFR2 | Receptor de tipo 2 del factor de crecimiento endotelial vascular |

1. Introducción

1.1. Tejido óseo

1.1.1. Composición del tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que ejerce importantes funciones en el organismo: 1) proporciona un soporte mecánico debido a la resistencia y rigidez de la microarquitectura ósea, lo que permite adaptarse a cargas mecánicas y a la locomoción, 2) protege los órganos vitales gracias a una organización estructural que le capacita para absorber la mayor cantidad de energía con un mínimo daño, 3) proporciona el espacio -la médula ósea- donde tiene lugar la hematopoyesis, un proceso mediante el cual se diferencian las células sanguíneas circulantes maduras (incluyendo eritrocitos, granulocitos y monocitos, así como los linfocitos B), 4) mantenimiento de la homeostasis mineral, ya que actúa como almacén de diversos iones, principalmente calcio y fosfato y 5) endocrina, ya que participa en la regulación del metabolismo energético y el balance del fosfato mediante la secreción de Osteocalcina y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) 23, respectivamente (1–3). El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en constante cambio, debido a que es sometido de forma continua a remodelado óseo, un complejo proceso fisiológico en el que intervienen diferentes tipos de células óseas y que implica la destrucción (resorción) ósea y la posterior formación de nuevo hueso (4), con el objetivo de preservar la integridad estructural, regular la homeostasis mineral y adaptarse a diferentes tipos de carga mecánica (5). La estimulación mecánica es un potente inductor de la masa ósea. Este concepto fue introducido por Julius Wolff ya en 1892 y reformulado por Harold Frost en su teoría del mecanostato, en la que propone que el esqueleto se adapta a la carga mecánica mediante un sistema dual en el que se distinguen el modelado óseo (cambios en la morfología) y el remodelado óseo (recambio continuo), lo que induce un aumento o disminución de la masa ósea para favorecer esta adaptación (6,7). De este modo, la homeostasis esquelética y la masa ósea se mantienen estables bajo niveles fisiológicos de estimulación mecánica (800-1500 $\mu\epsilon$) (8), mientras que niveles excesivos (>15000 $\mu\epsilon$) o el déficit de estimulación mecánica (<800 $\mu\epsilon$) inducen un aumento en el remodelado óseo, con un mayor nivel de resorción

ósea y la consiguiente pérdida de hueso (9,10). Aunque los mecanismos exactos mediante los cuales el hueso percibe la estimulación mecánica no han sido aún completamente esclarecidos, se ha descrito que las células óseas son capaces de responder a diversos estímulos como las fuerzas intercelulares, la tensión ejercida por la matriz ósea y al paso de un flujo de fluido a través del hueso (11). Además, diversos experimentos en cultivos de células óseas han demostrado que el flujo de fluido dinámico estimula respuestas osteogénicas al tiempo que inhibe respuestas de degradación ósea (12).

El tejido óseo está formado por diversos tipos celulares y una matriz ósea compuesta fundamentalmente por un componente mineral, en su mayoría formado por cristales de hidroxiapatita (una sal insoluble de calcio y fósforo), pero que contiene además pequeñas cantidades de sodio, citrato, bicarbonato y magnesio. La matriz ósea también está compuesta por agua y un componente orgánico constituido por polisacáridos y diversas proteínas estructurales, predominantemente fibrillas de colágeno de tipo I (COLI, aunque también de los tipos III y IV) que son mineralizadas debido a la formación y depósito de los cristales de hidroxiapatita (13,14). A escala nanoscópica, las interacciones entre las fibrillas de colágeno y la hidroxiapatita son claves para dotar de fuerza y resistencia al hueso (15). En cuanto al componente celular del tejido óseo, destacan, entre otras, la presencia de tres tipos celulares:

- Los **osteoblastos** son células cuboidales polarizadas que se sitúan a lo largo de la superficie ósea y comprenden aproximadamente el 5% del total de las células residentes en el hueso. Presentan un abundante retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi, así como un gran número de vesículas secretoras, por lo que son células con gran capacidad de síntesis y secreción de proteínas (2). Proceden de células osteoprogenitoras de origen mesenquimal que expresan el factor de transcripción relacionado con Runt -RUNX2- (16). La osteoblastogénesis se inicia con una fase de proliferación, en la que estos precursores se diferencian a pre-osteoblastos debido a un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina (FA). La transición a osteoblastos maduros está determinada por un incremento en los niveles de expresión de Osterix, así

como por la secreción de diversas proteínas de matriz ósea como Osteocalcina y COLI. Al mismo tiempo, los osteoblastos experimentan diversos cambios morfológicos, convirtiéndose en grandes células cuboidales. Posteriormente, se produce la deposición de una matriz no mineralizada, denominada osteoide, debido a la secreción de COLI y otros componentes orgánicos (Osteocalcina, Sialoproteína ósea, Osteopontina y Osteonectina) por parte de los osteoblastos maduros. A continuación, se produce la mineralización del osteoide, iniciada con la liberación de vesículas de matriz- unas partículas recubiertas de membrana localizadas selectivamente en los lugares de iniciación de la calcificación- desde el dominio apical de la membrana de los osteoblastos (17). Estas vesículas se unen a diversos compuestos orgánicos del osteoide, entre los que se incluyen los proteoglucanos. Los osteoblastos secretan enzimas que degradan estos proteoglucanos, lo que permite la liberación de sus iones de calcio y su posterior inmovilización dentro de las vesículas de matriz. Por otro lado, los osteoblastos también secretan en este punto FA que degrada los compuestos que contienen fosfatos, lo que promueve la acumulación de iones fosfato dentro de las vesículas de matriz (2,18). En el interior de estas vesículas se produce un incremento en la actividad de diversas fosfatasas y de moléculas de unión a calcio, lo que da lugar a los primeros cristales minerales de hidroxapatita. Finalmente, se produce una supersaturación de iones calcio y fosfato en el interior de la matriz que desemboca en su ruptura y en la liberación de los cristales de hidroxapatita a la matriz ósea, donde se produce la formación de nuevos cristales a partir de cristales preexistentes (17). Durante la formación ósea, algunos osteoblastos se incorporan a la matriz celular y se diferencian a osteocitos. Este proceso requiere el reclutamiento y diferenciación de nuevas células progenitoras mesenquimales para mantener una fracción de osteoblastos formadores de hueso (14). Otra fracción de los osteoblastos maduros pierde su capacidad metabólica y migran hacia la superficie ósea, dando lugar a las células de recubrimiento (19). Estas son células aplanadas y quiescentes que se asocian entre sí

y con las prolongaciones de los osteocitos (2). Sin embargo, la mayor parte de los osteoblastos maduros mueren por apoptosis tras realizar su función formadora de matriz (20).

- Los **osteoclastos** son células gigantes y multinucleadas que proceden de la fusión de precursores mononucleares hematopoyéticos del linaje monocito-macrófago (21). Son una población escasa en el esqueleto, ya que únicamente representan el 1-2% de las células óseas (22). La diferenciación de los osteoclastos se produce en respuesta a la secreción de diversos factores como el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) por parte de osteoprogenitores mesenquimales y osteoblastos, o del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) por parte de osteocitos y osteoblastos (2). Los osteoclastos activos son células polarizadas que realizan la degradación o resorción del hueso durante el proceso del remodelado óseo. Presentan dominios basolaterales que no están en contacto con la matriz ósea y desempeñan funciones secretoras, así como una zona de sellado compuesta por un anillo de actina y otras proteínas, que sí está en contacto con la matriz y delimita la laguna o zona de resorción (2). En esta zona de contacto con la matriz ósea, diversas ATPasas vacuolares osteoclásticas bombean protones (H^+) junto con iones cloro (Cl^-) a las lagunas de resorción, donde se combinan para formar HCl. El bajo pH alcanzado en la laguna de resorción provoca la activación de diversas enzimas, como metaloproteinasas de matriz (MMPs) o catepsina K, que degradan la matriz de colágeno del hueso (3,23). La superficie donde se ha llevado a cabo la resorción ósea es “limpiada” por las células de recubrimiento y probablemente también por macrófagos (24). A continuación, los osteoprogenitores mesenquimales migran a nichos proporcionados por los vasos sanguíneos en el hueso en el que se está llevando a cabo el remodelado, e inician su diferenciación para rellenar el espacio resultante tras la resorción. Este hecho permite afirmar que la resorción ósea y la formación de hueso están acopladas durante el remodelado óseo (3). Una vez completado el proceso de resorción ósea, los osteoclastos inician

apoptosis en respuesta a diferentes señales mediadas, en parte, por los osteoblastos (23,25). Por otro lado, estudios recientes han revelado que osteoclastos estimulados con RANKL pueden fisionarse dando lugar a células hijas llamadas osteomorfos. Estas, a su vez, pueden eventualmente volver a fusionarse por distintos estímulos, generando, de nuevo, osteoclastos activos (26).

- Los **osteocitos** constituyen la población más abundante de células óseas -más del 90%- (27). Proceden de la diferenciación de osteoblastos que quedan embebidos en la matriz ósea mineralizada (28). Participan en el inicio de la mineralización del osteoide a través de la secreción de diversas proteínas. Además, limitan la mineralización secundaria y conservan la flexibilidad de la matriz, a través de la regulación del número de autofagosomas ejercida por la efrina B2 a través de la señalización RhoA-ROCK (29). Se localizan en el interior de cavidades llamadas lagunas, donde conforman una red interconectada a través de prolongaciones citoplasmáticas -dendritas- que se extienden a través de unos conductos denominados canalículos. Las dendritas osteocitarias permiten la rápida transducción de señales entre células osteocíticas y también con los osteoblastos, los osteoclastos y la médula ósea (30,31). El espacio pericelular entre las membranas plasmáticas de los osteocitos y el tejido mineralizado se encuentra relleno por el glucocálix, una matriz rica en proteoglicanos que ancla las dendritas a los canalículos y que resulta necesaria para iniciar una señalización dependiente de la liberación de prostaglandina E2 en respuesta a estimulación mecánica (32). Además, el espacio pericelular está lleno de fluido intersticial. De este modo, los gradientes de presión generados por las cargas mecánicas sobre el hueso resultan en un flujo oscilante de líquido intersticial que se extiende por la red lacuno-canalicular de osteocitos desde las regiones de alta presión a otras de una menor presión (33). Como consecuencia, se genera tensión en los espacios lacunares y una deformación de los osteocitos lo suficientemente intensa para que se desencadenen respuestas al estímulo mecánico (33,34). Gracias al sistema canalicular y

a la red dendrítica, los osteocitos son las células óseas con mayor sensibilidad al estrés mecánico, particularmente a los estímulos de flujo de fluido pulsátiles, por lo que actúan como mecanosensores orquestando los efectos de los osteoblastos y los osteoclastos en el remodelado óseo (35). Sin embargo, se ha observado que tanto los osteoblastos (36) como los osteoprogenitores mesenquimales (37,38) son también capaces de responder a estímulos mecánicos. Para percibir los estímulos mecánicos, los osteocitos precisan de diferentes elementos celulares capaces de transducir las señales al interior celular. Son los denominados mecanosensores, entre los que se encuentran:

- A) **Citoesqueleto (filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos):** diversos estudios han mostrado la importancia de los filamentos de F-actina en el mantenimiento de la morfología osteocítica, la tensión de membrana y la capacidad mecanosensora (39), así como el papel de los microtúbulos en la regulación de la apertura de los canales de calcio y la expresión génica durante la mecanotransducción (40).
- B) **Integrinas:** son heterodímeros formados por una subunidad α y otra β : la subunidad α es la responsable de la especificidad de ligando extracelular, mientras que la subunidad β participa en vías de señalización intracelulares (41). Se ha demostrado que la disminución de la expresión de la integrina $\beta 1$ reduce la formación de hueso inducida por carga mecánica (42). Además, en tejido óseo se ha observado que las uniones de integrina a las paredes canaliculares resultan altamente estimuladas por flujo de fluido (43).
- C) **Conexinas:** son proteínas que forman parte de las uniones nexo y los hemicanales que permiten la unión funcional entre células vecinas. Las uniones nexo permiten el intercambio directo de iones, nucleótidos, moléculas pequeñas y segundos mensajeros -como Adenosín trifosfato (ATP), prostaglandinas e

inositol-3 fosfato (IP3)- (44). En el esqueleto, las uniones nexos son particularmente abundantes en osteocitos y osteoblastos, siendo la conexina 43 la más expresada en estos tipos celulares y encontrándose implicada en la formación, diferenciación y supervivencia de osteoblastos (45). Además, la conexina 43 contribuye a la coordinación del remodelado óseo en respuesta a factores anabólicos o carga mecánica (46).

- D) **Canales iónicos:** durante la mecanotransducción celular, el evento que tiene lugar más temprano es un aumento en la concentración de calcio intracelular (Ca^{2+}) por movilización desde almacenes intracelulares o entrada desde el exterior de la célula (6). Esta movilización de calcio es desencadenada por la activación de canales iónicos mecanosensibles que se abren en respuesta a cambios en la tensión en la membrana plasmática y membranas intracelulares inducidos por la carga mecánica (47).
- E) **Cilio primario:** su papel como mecanotransductor y regulador del metabolismo óseo resulta de especial interés en esta Tesis, por lo que se expone con mayor detalle en el punto 1.3.
- F) **Caveolas:** al igual que ocurre con el cilio primario, su papel como mecanotransductor y regulador del metabolismo óseo resulta de especial interés en esta Tesis, por lo que se expone en el punto 1.4.

Los osteocitos también modulan las acciones de osteoblastos y osteoclastos mediante la liberación de factores hormonales. Uno de los mecanismos mediante el que los osteocitos controlan la masa ósea es la secreción de esclerostina (SOST), un regulador negativo de la formación de hueso. SOST inhibe la señalización Wnt/ β -catenina (48) mediante la unión a los correceptores de Wnt, las proteínas 5 y 6 relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad. Como consecuencia, se induce la fosforilación de β -catenina por parte de la glucógeno sintasa

quinasa 3, lo que evita la translocación al núcleo de la β -catenina, así como su unión a diversos factores de transcripción (49).

Además, los osteocitos actúan como células endocrinas en el control de la homeostasis del fósforo, mediante la secreción FGF23, un regulador del consumo de fósforo renal (50). Al igual que los osteoblastos, los osteocitos son capaces de secretar RANKL, que se une a su receptor RANK en la superficie de los osteoclastos y sus precursores para dirigir la diferenciación, fusión y activación osteoclástica. Sin embargo, los osteocitos y osteoblastos también son capaces de liberar osteoprotegerina (OPG), una proteína que funciona como un receptor señuelo soluble para RANKL, por lo que se considera un regulador negativo de la diferenciación y activación de los osteoclastos mediante el bloqueo de la interacción RANK/RANKL (7,25). Por tanto, el equilibrio en la producción de OPG/RANKL por parte de los osteocitos y osteoblastos resulta clave para el desarrollo del remodelado óseo.

Además de los tipos celulares mencionados, en el tejido óseo también se encuentran macrófagos encargados de la secreción de citoquinas -como los macrófagos medulares y los osteomacs (51)-, las células reversas, localizadas en la superficie del hueso entre las fases de formación y resorción ósea, y el dosel de remodelado, un conjunto de células del linaje osteoblástico que se levanta de la superficie del hueso cuando la resorción da inicio al proceso de remodelado óseo (52). Por otro lado, diversos tipos celulares presentes en la médula ósea pueden ejercer un papel regulador de la masa ósea (53,54).

1.1.2. Desarrollo y mantenimiento del tejido óseo

1.1.2.1. Osteogénesis

El desarrollo del tejido óseo, la osteogénesis u osificación comienza en humanos en el primer trimestre de gestación y continúa en los primeros años postnatales. Se distinguen dos tipos distintos de acuerdo con el proceso que inicia la osificación:

- Osificación endocondral: Permite la formación de los huesos del esqueleto axial y apendicular a partir de un molde de cartílago hialino que posteriormente será reemplazado por hueso. Este tipo de osificación ocurre en los huesos de las extremidades y huesos axiales, como el fémur, la tibia, las vértebras y la pelvis (55,56), así como en la curación de fracturas que requieren inmovilización o algún tipo de fijación interna (57). El desarrollo del hueso endocondral comienza con una condensación de células mesenquimales. Las células situadas en el núcleo de la zona de condensación mesenquimal experimentan un proceso de diferenciación, dando lugar a condrocitos que secretan una matriz rica en colágeno de los tipos II, IX y XI, mientras que suprimen la expresión de COLI. Las células en la periferia de la condensación mesenquimal, por su parte, forman una capa de tejido conjuntivo llamado pericondrio. Tras una rápida fase de proliferación, los condrocitos del cartílago primordial resultante abandonan el ciclo celular, se hipertrofian y entran en apoptosis. Alternativamente, se ha observado en este punto que los condrocitos hipertróficos pueden transdiferenciarse directamente en osteoblastos para formar una matriz ósea (58–60). Se produce a continuación una invasión vascular desde el cartílago hipertrófico y las células de la parte interna del pericondrio se diferencian a osteoblastos que comienzan a secretar matriz ósea. La continua proliferación de los condrocitos menos maduros en las epífisis, seguida por su hipertrofia y su eventual recambio por células óseas cerca de la diáfisis resulta en un desplazamiento de la placa de crecimiento. Este desplazamiento da lugar a un crecimiento longitudinal de los elementos esqueléticos que ocurre hasta la adolescencia, momento en el que la placa de crecimiento también es osificada y cesa su elongación (61).
- Osificación intramembranosa: se produce cuando el tejido mesenquimal es directamente reemplazado por hueso, sin pasar por un proceso intermedio de formación de cartílago (56,62). Este tipo de osificación ocurre en los huesos del cráneo, clavícula y mandíbula,

además de en los procesos de curación de fracturas en los que los huesos son tratados con una reducción anatómica abierta y fijación con una placa metálica (57). La osificación intramembranosa también requiere que ocurra una condensación de células mesenquimales, en las que las células osteoprogenitoras proliferan rápidamente. A continuación, se produce la migración de las células progenitoras fuera de las condensaciones y se produce una mineralización inicial. Posteriormente, las porciones osificadas se engrosan y forman una estructura trabecular, en la que osteoblastos diferenciados forman las primeras espículas óseas, que después se fusionan formando trabéculas que al interconectarse dan lugar al tejido óseo (63).

1.1.2.2. Modelado óseo

El modelado óseo tiene lugar en una superficie ósea preexistente, a menudo en el hueso fetal y durante las etapas del desarrollo, aunque también se da de forma menos prominente en el esqueleto adulto (64). Consiste en la adaptación de las estructuras óseas en respuesta a carga mecánica, mediante el cambio en su tamaño y su forma. En el modelado óseo en condiciones fisiológicas, la formación y la resorción ósea actúan de manera coordinada. De este modo, un estímulo mecánico por encima de cierto umbral inducirá un aumento de la formación ósea dirigido por los osteoblastos, lo que conduce a un aumento de la masa ósea para modelar la forma, tanto longitudinal como radial, de los huesos. Por el contrario, la ausencia de carga mecánica, así como cargas mecánicas de una intensidad baja, conducen a un aumento de la resorción local por parte de los osteoclastos. Aparte del modelado óseo macroscópico, se ha identificado también un proceso de modelado microscópico (o mini-modelado), en el que las células de recubrimiento óseo se transforman en osteoblastos activos que dirigen el depósito de nueva matriz ósea sobre hueso existente sin que ocurra resorción osteoclástica (65).

1.1.2.3. Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso que ocurre de forma secuencial y que implica el acoplamiento de la formación y la resorción óseas, lo que a su vez requiere la comunicación directa entre los diferentes tipos celulares óseos. Las células del linaje osteoblástico (osteoblastos, osteocitos y células de recubrimiento) y los osteoclastos, así como sus precursores, trabajan de manera conjunta y se organizan en unas unidades especializadas llamadas unidades multicelulares óseas (UMO), cuyo principal propósito es facilitar el remodelado óseo en condiciones fisiológicas (66). La regulación del remodelado óseo es compleja, debido a la implicación de múltiples factores como la parathormona (PTH), OPG, RANKL, estrógenos, etc., que actúan a lo largo de las siete fases en las que se divide el remodelado: quiescencia, activación, resorción, reversa, formación, mineralización y terminación. Siguiendo a la fase inicial **quiescente** sin remodelado, ocurre una **fase de activación** en respuesta a la detección de señales iniciadoras del remodelado. Estas señales pueden tomar diversas formas, como daño estructural óseo debido a sobrecarga mecánica (67), falta de estimulación mecánica (9) o liberación de hormonas (como los estrógenos o la PTH). Durante esta fase, los osteoblastos y los osteocitos responden a las señales generadas por los osteocitos en respuesta a estimulación mecánica o a señales endocrinas mediante la liberación de factores osteoclastogénicos, entre los que se encuentran RANKL y M-CSF. Estos factores inducen el reclutamiento de precursores del linaje monocito-macrófago a la superficie del hueso y su posterior diferenciación a osteoclastos maduros que inician el proceso de resorción ósea. Los osteoblastos también liberan MMPs en respuesta a señales mecánicas (68) y endocrinas (69) de remodelado. Esto conduce a la degradación del osteoide no mineralizado de la matriz ósea, exponiendo sitios para el anclaje de los osteoclastos a la matriz mineralizada (70). En la **fase de resorción**, los osteoclastos se anclan a diversos puntos en la matriz ósea, generándose un microambiente conocido como “zona sellada”, a la que los osteoclastos bombean diversos iones y proteasas para degradar la matriz mineral ósea. Como resultado de la resorción, se genera una cavidad en la superficie ósea, la laguna de Howship (71). En la **fase reversa**, los osteoclastos

cesan su actividad y entran en apoptosis, al tiempo que unas células mononucleares de origen indeterminado, posiblemente los osteomacs (debido a su localización en las UMO y su capacidad de secreción de MMPs), degradan la matriz demineralizada y no digerida que recubre la laguna de Howship. Esto prepara a la superficie del hueso para la formación ósea mediada por los osteoblastos (70). Además, en esta fase participan células mesenquimales que colaboran con las células mononucleares en la producción de diversas señales que permiten la transición desde la resorción ósea a la formación de hueso en la UMO. Durante la **fase de formación**, las células progenitoras mesenquimales y los osteoblastos tempranos comienzan a diferenciarse y a secretar moléculas que darán lugar al osteoide. Estos factores incluyen COL1 -el principal componente orgánico del hueso-, diversas proteínas no colagenosas – incluyendo proteoglucanos y otras proteínas glucosiladas- y lípidos (70). A continuación, ocurre la **fase de mineralización** de la matriz orgánica, dirigida en gran medida por la actividad de la FA (72). Finalmente, en la **fase de terminación**, la expresión de SOST por parte de los osteocitos evita que continúe la formación de nuevo hueso y su posterior mineralización (66) (Fig. 1).

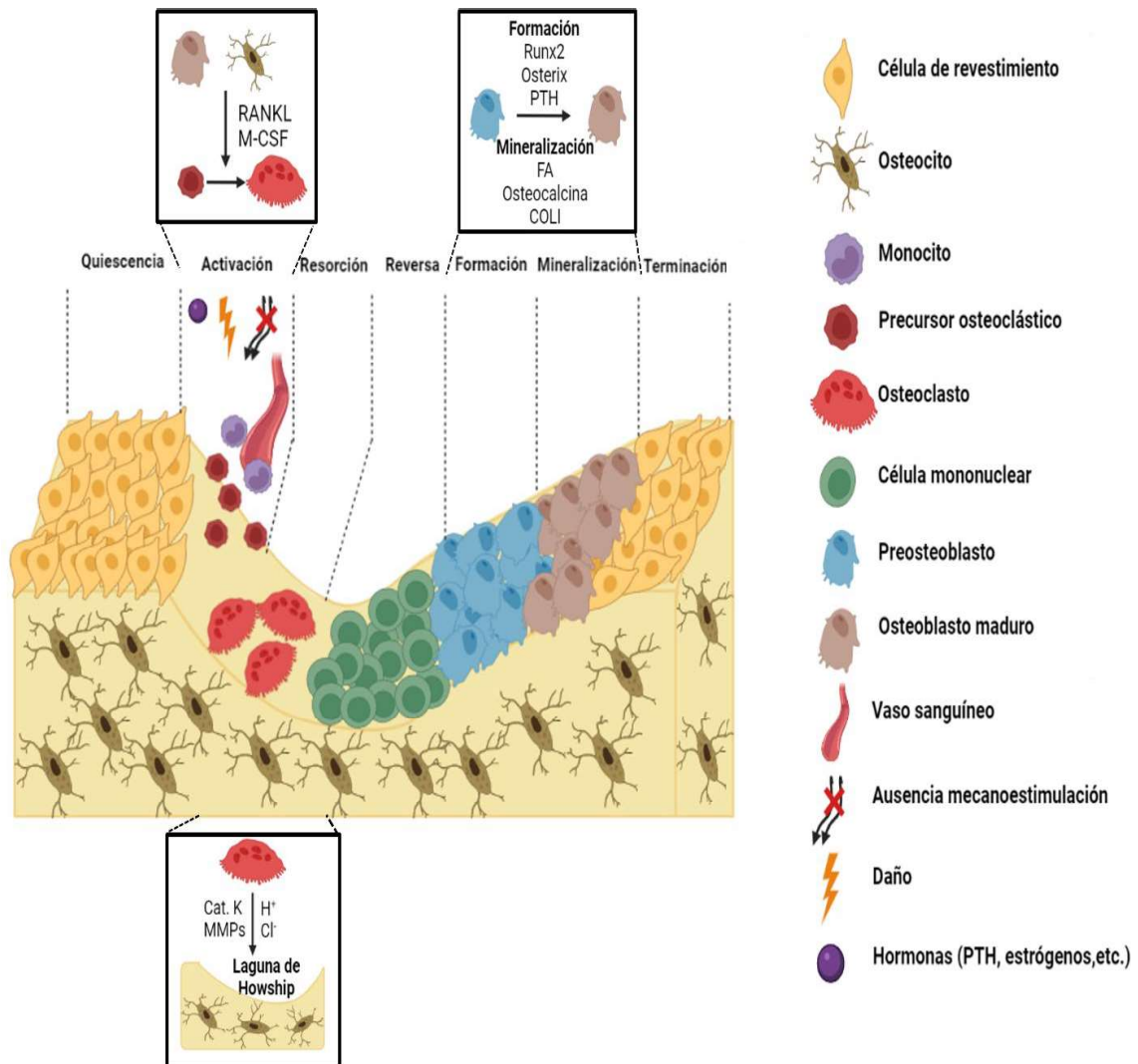


Figura 1. Descripción del proceso de remodelado óseo. Tras una **fase inicial quiescente**, se produce una **fase de activación** en respuesta a daño estructural, falta de estimulación mecánica o la liberación de hormonas. En esta fase, los osteocitos y osteoblastos liberan diversos factores osteoclastogénicos que inducen el reclutamiento de células progenitoras hematopoyéticas a la superficie del hueso y su posterior diferenciación a osteoclastos maduros. Los osteoclastos llevan a cabo entonces la **fase de resorción**, en la que se anclan a diversos puntos de la matriz ósea y bombean diversos iones y proteasas, originándose como resultado la laguna de Howship. Durante la **fase reversa**, los osteoclastos cesan su actividad y entran en apoptosis, al tiempo que diversas células mononucleares degradan la matriz demineralizada que recubre la laguna de Howship. A continuación, tiene lugar la **fase de formación**, en la que los osteoblastos sintetizan el osteoide en respuesta a diversos factores como RUNX2, Osterix o PTH. Posteriormente, se produce la **fase de mineralización**, dirigida en gran medida por la actividad de la FA, en la que tiene lugar la deposición de la matriz mineralizada. Finalmente, durante la **fase de terminación**, los osteocitos expresan SOST para evitar que continúe la formación de nuevo hueso. RUNX2: factor de transcripción 2 relacionado con Runt; FA: Fosfatasa alcalina. **Figura realizada con el software BioRender.**

1.1.2.4. Factores reguladores del metabolismo del hueso

El principal factor extrínseco que regula el remodelado óseo es la carga mecánica (73), mientras que a nivel intrínseco existe una gran diversidad de factores que coordinan las acciones de osteoblastos y osteoclastos para el mantenimiento de una correcta homeostasis ósea. Por un lado, factores sistémicos como 1,25(OH)₂ vitamina D₃, calcitonina, estrógenos, andrógenos, hormona tiroidea, insulina, glucocorticoides y hormona de crecimiento. También se encuentran implicados en este proceso citoquinas y factores de crecimiento locales como RANK/RANKL, M-CSF, proteínas óseas morfogénicas (BMP), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR), FGF, interleuquinas (IL), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) y ligandos Wnt y sus antagonistas (66). La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), un factor de acción local, y el receptor común para PTH y PTHrP de tipo 1 (PTH1R) resultan de especial interés en esta Tesis, por lo que su implicación en el metabolismo óseo se desarrolla a continuación.

1.2. Sistema PTHrP/PTH1R y su papel en el metabolismo óseo

La proteína relacionada con la parathormona o PTHrP fue descrita en un inicio como el factor responsable de la hipercalcemia maligna de origen humoral (74). Durante la década de los 80, se produjo el aislamiento y la clonación de su gen, *PTHrP*, situado en humanos en el brazo corto del cromosoma 12 (75). Esto permitió observar que los genes *PTHrP* y *PTH* estaban relacionados, al poseer una organización exón/intrón idéntica tanto en la porción que codifica las secuencias pre-pro como en la encargada de codificar la porción inicial de los péptidos maduros. De este modo, PTH y PTHrP presentan un alto grado de homología en su porción amino terminal, compartiendo 8 de los primeros 13 aminoácidos y una estructura secundaria similar en los siguientes 21 aminoácidos (76). Esta homología en las secuencias permite que ambos péptidos se unan y activen al mismo receptor, el receptor de tipo 1 de la PTH (PTH1R), un receptor con siete dominios transmembranales que pertenece a la

familia B de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Este receptor se une y activa, además de a PTH y a PTHrP, a sus péptidos amino-terminales biológicamente activos PTH (1-34) y PTHrP (1-36), así como a diversas variantes amino-terminales modificadas como la PTH de larga actuación (77) y abaloparatide, el análogo 1-34 de la PTHrP empleado en el tratamiento de la osteoporosis (78). Sin embargo, existen diferencias entre el mecanismo de acción de la PTH, de carácter endocrino, y el de PTHrP, que tiene la capacidad para actuar de forma paracrina, autocrina o incluso intracrina en gran variedad de tejidos (79). A diferencia de PTH, que es sintetizada únicamente en las glándulas paratiroides, la PTHrP se expresa principalmente en hueso, cartílago, dientes, estómago, páncreas, sistema cardiovascular-renal, pulmones, útero, placenta, vejiga y glándulas mamarias, entre otros tejidos y órganos (80). En hueso, se expresa en las células del linaje osteoblástico (osteoblastos, osteocitos y células de recubrimiento) y actúa como promotor de la formación de hueso tanto en condiciones fisiológicas (81) como patológicas (82). En ese contexto, PTHrP promueve la proliferación celular, supervivencia, migración y diferenciación de los osteoblastos. Estas funciones anabólicas tienen lugar si PTHrP o PTH se administran de forma intermitente, y se basan en el aumento en el reclutamiento y activación de las UMO tras la activación de PTH1R. Esto provoca la diferenciación de células osteoprogenitoras mesenquimales, inhibe la apoptosis en osteoblastos y osteocitos (83) y reduce la producción del inhibidor de formación ósea SOST en estos últimos (84). Se ha discutido que el proceso de diferenciación osteoblástica asociado a esta estimulación intermitente podría ser independiente del proceso de resorción ósea (85), o bien estar influido por la liberación de diversos factores de crecimiento -como $TGF\beta$ o IGF-1- que durante el proceso de resorción incrementarían la disponibilidad de células precursoras mesenquimales o su diferenciación a linaje osteoblástico (86–88). Sin embargo, cuando el patrón de estimulación de PTH1R es continuo, se incrementan los efectos de la resorción ósea (89). Esto es debido a que la estimulación continuada con PTH/PTHrP activa a PTH1R en las células óseas de tal forma que induce la formación de osteoclastos a través de la estimulación de la expresión del factor pro-osteoclastogénico RANKL en los osteoblastos (75,90).

La estimulación continua con PTH o PTHrP también promueve la diferenciación de células CD4+ *naive* a células T *helper* 17, una población presente en la médula ósea que estimula la osteoclastogénesis a través de la secreción de diversas citoquinas -IL17A, RANKL, TNF, IL-1 e IL-6- y la inducción de la producción de RANKL en las células del linaje osteoblástico (54).

En humanos, las secuencias transcritas por procesamiento alternativo de PTHrP dan como resultado tres ARNm que producen tres isoformas proteicas de 139, 141 y 173 aminoácidos (75). Estos péptidos iniciales se procesan post-traduccionalmente generando una serie de péptidos biológicos solapantes. Por un lado, la región N-terminal, conformada por los aminoácidos 1-36 (o 1-37), secretada por diversos tipos celulares y encargada de unirse y activar a PTH1R (91–93). Sin embargo, en osteocitos se ha descrito que PTHrP es secretada en forma completa, sin haberse detectado la secreción de isoformas de peso molecular más bajo que contengan el dominio N-terminal. Esta forma completa de PTHrP secretada por los osteocitos actúa tanto a través de mecanismos mediados por PTH1R, como mediante acciones independientes de él, con el objetivo de estimular la formación de hueso y modular la fuerza ósea en hueso cortical adulto (94). En segundo lugar, la región media de PTHrP estimula el transporte de calcio en la placenta y regula los niveles de bicarbonato en riñón. Su secreción se ha observado en forma de péptidos con los aminoácidos 38-94, 38-95 y 38-101 (95), que incluyen además una secuencia de localización nuclear. Por último, se pueden generar distintos fragmentos C-terminales de PTHrP que contienen los aminoácidos 107-138 y 109-138, que inhiben la función osteoclástica al tiempo que activan la proliferación de los osteoblastos (75,96). PTHrP (1-37) ejerce sus efectos mediante su unión a dos regiones diferentes de PTH1R. Así, los aminoácidos entre las posiciones 15-34 de PTHrP interactúan con el extremo amino-terminal de PTH1R (97), lo que proporciona una fuente de energía para la unión (98), mientras que los residuos 1-14 interactúan con las hélices transmembranales y los giros o “loops” extracelulares (99), induciendo cambios conformacionales en el receptor que inician la señalización intracelular (100). La transducción de señales intracelulares de PTH1R es mediada

principalmente por las proteínas G heterotriméricas G_s , $G_{q/11}$, G_i (101,102) y G_{12}/G_{13} (103) (Fig. 2).

En células osteoblásticas, PTH1R señaliza predominantemente a través del reclutamiento de la proteína G_{α_s} , activando la vía de señalización adenilato ciclasa (AC)/adenosín monofosfato cíclico (AMPC)/proteína quinasa A (PKA), lo que desemboca en la regulación de diversos factores de transcripción como SOST y RANKL (102). Alternativamente, puede actuar a través de G_{α_q} , activando en este caso a la fosfolipasa C (PLC) que inicia una cascada de señalización en la que, o IP3 estimula la liberación de Ca^{2+} para activar la proteína quinasa C (PKC), o bien el diacilglicerol (DAG) activa directamente a PKC (76,102). PTHrP es también capaz de estimular la fosfolipasa D (PLD) a través de un mecanismo iniciado por $G_{\alpha_{12}}$ y $G_{\alpha_{13}}$ y en el que actúan como intermediarios el factor intercambiador del nucleótido guanina Rho (Rho GEF) y el miembro A de la familia de genes homólogos de Ras (RhoA) (102,104). Además, la internalización mediada por β -arrestinas del PTH1R tras su estimulación con PTHrP puede activar a las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), sin la intervención de proteínas G (76,105,106). Tradicionalmente, se consideraba que el reclutamiento y la activación de G_{α_i} ejercía efectos inhibitorios sobre la señalización, aunque recientemente se ha observado que el aclarado de fragmentos de membrana EGF fijadores de heparina, que es dependiente de G_{α_i} , induce la transactivación del receptor de EFG -EGFR- y la estimulación de la vía de señalización de las quinasas ERK1/2 (102,107) (Fig. 2).

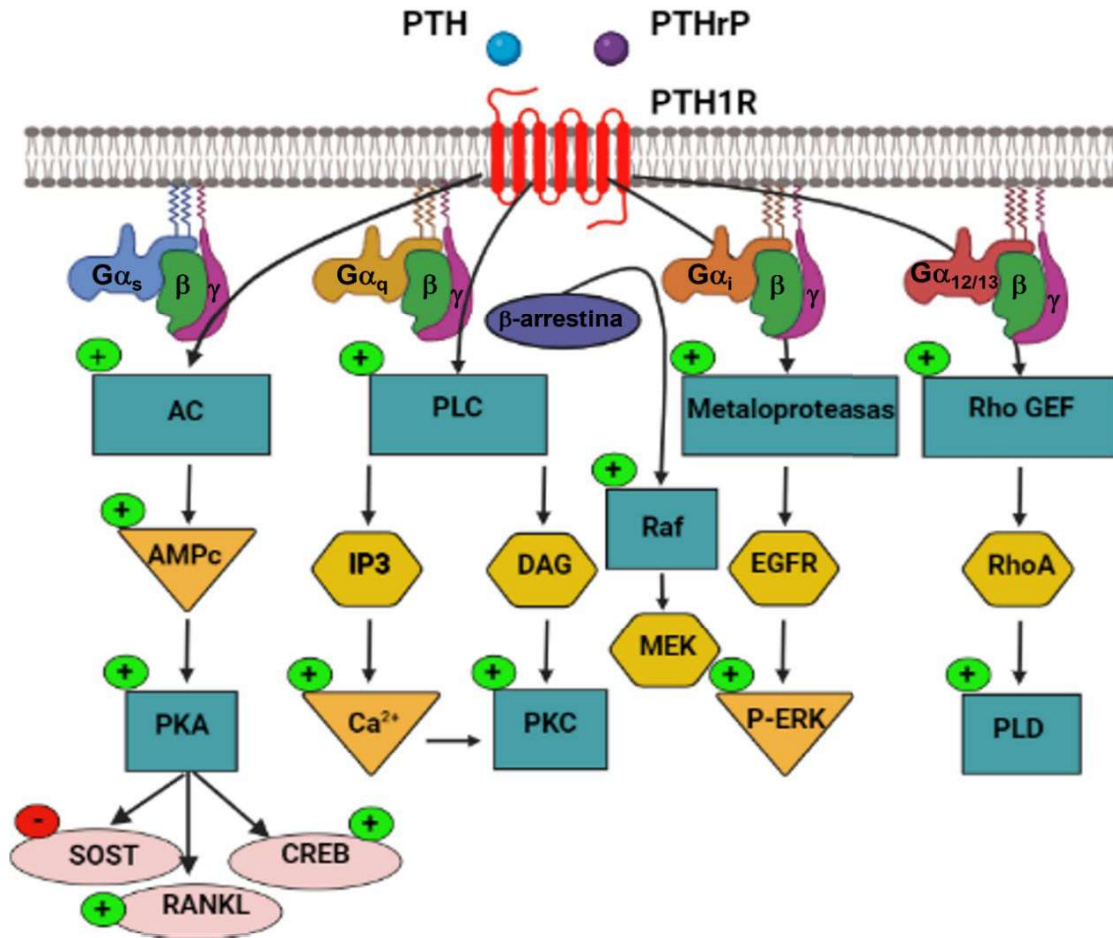


Figura 2. Esquema de las vías de señalización de PTH1R. Gas: proteína G de la familia α_s ; G α_q : proteína G de la familia α_q ; G α_i : proteína G de la familia α_i ; G $\alpha_{12/13}$: proteína G de la familia $\alpha_{12/13}$; AC: adenilato ciclasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; PKA: proteína quinasa A; SOST: esclerostina; RANKL: ligando del receptor activador nuclear kappa B; CREB: proteína de respuesta al elemento de unión a AMPc; PLC: fosfolipasa C; DAG: diacilglicerol; IP3: fosfatidilinositol (1,4,5)-trifosfato; PKC: proteína quinasa C; Ca²⁺: ion calcio; Raf: protooncogén serina/treonina proteína quinasa; MEK: proteína quinasa activada por mitógenos; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; P-ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares fosforiladas; Rho GEF: factor intercambiador de guanina de la familia de homólogos de Ras; RhoA: miembro A de la familia de homólogos de Ras; PLD: fosfolipasa D. **Figura realizada con el software BioRender.**

A pesar de que PTH y PTHrP se unen y activan a PTH1R de modo similar, estudios en humanos han mostrado que la estimulación con PTH induce niveles circulantes más altos de calcio y 1,25-(OH)₂ vitamina D que la estimulación con PTHrP (108). Por ello, se ha determinado que PTH y PTHrP se unen de manera diferente al receptor, induciendo patrones distintos de señalización. La unión de PTH a PTH1R se ve favorecida cuando este no está acoplado a proteínas G,

promoviendo un estado conformacional conocido como G^0 , que permite que el receptor pase por múltiples rondas de activación de proteínas G, lo que genera una mayor cantidad de AMPc durante más tiempo que la obtenida tras la unión de PTHrP, que forma un complejo ligando-receptor más lábil (109). Estos complejos PTHrP-PTH1R son internalizados por las β -arrestinas y degradados rápidamente en proteasomas, mientras que los complejos PTH-PTH1R internalizados en endosomas son capaces de continuar la señalización y, por tanto, la producción de AMPc (110). Estas diferencias en la cinética de unión a PTH1R podrían explicar los diferentes efectos biológicos ejercidos por PTH y PTHrP.

En base a los mecanismos mencionados, la activación por ligando de la señalización de PTH1R desempeña un papel clave en el remodelado óseo y la formación de hueso *in vivo*, con una compleja modulación ejercida por diversas vías de señalización y distintos procesos celulares (111,112). En células del linaje osteoblástico, modula las tasas de proliferación, reduce la apoptosis (83) y produce gran variedad de factores de señalización implicados en el metabolismo óseo (105). La activación de PTH1R induce la expresión de genes formadores de hueso en osteoblastos, como *RUNX2*, *Osteocalcina* y *FA*, al tiempo que regula la resorción ósea mediante la modulación del eje *OPG/RANKL* (113). La regulación ejercida por PTH1R sobre la formación ósea y los genes implicados en el remodelado podría estar directamente asociada con un incremento en la supervivencia de osteocitos y osteoblastos. En este contexto, se ha observado que *RUNX2* media efectos anti-apoptóticos en osteoblastos que han sido relacionados con las acciones osteoformadoras de PTH (114) y *OPG* parece prevenir la apoptosis osteocítica (115). Por otro lado, se ha descrito un tipo de activación de PTH1R mediante estimulación mecánica, de manera independiente de ligando, que además ejerce efectos pro-supervivencia en células osteocíticas (116), lo que indica un posible papel del receptor de PTH como mecanosensor en osteocitos y osteoblastos (117).

Por tanto, dado que PTH1R es capaz de detectar estímulos mecánicos, y las células óseas presentan diversos mecanosensores, es posible que PTH1R movilice a uno de estos sensores y se asocie con él para potenciar la recepción

de señales causadas por la mecanoestimulación. Entre las observaciones que apoyan esta idea, se ha observado que la cola C-terminal de PTH1R presenta dos dominios para su transporte al cilio primario (VPMG y VGPR), además de haberse descrito el transporte de PTH1R al cilio primario en células del núcleo pulposo en respuesta a mecanoestimulación (118). De manera análoga, se ha observado una secuencia de aminoácidos en el segundo giro intracelular de PTH1R que incluye un dominio de unión a caveolina. Además, se ha identificado la co-localización de PTH1R y caveolina-3 en cardiomiocitos humanos (119). **Sin embargo, el transporte de PTH1R a las caveolas o el cilio primario, así como el tipo o la intensidad de estímulo causante de la movilización entre estos dos compartimentos aún no ha sido estudiado. De manera similar, no se ha profundizado en el estudio de las vías de señalización intracelular y las respuestas extracelulares desencadenadas por PTH1R asociadas con el cilio primario y las caveolas en condiciones fisiológicas o relacionadas con el envejecimiento.**

1.3. El cilio primario como modulador del metabolismo óseo

1.3.1. Ciliogénesis. Estructura del cilio primario y Sistema de transporte intraflagelar (IFT)

El cilio primario es un orgánulo único apendicular inmóvil basado en microtúbulos que es ensamblado y desensamblado en cada ciclo de división celular (120). Aparece en la mayor parte de tejidos animales (121), incluyendo pulmón, riñón, corazón (122), neuronas (123), condrocitos (124), células mononucleares aisladas de sangre periférica y médula ósea (125) y hueso (126). Rodeando al cilio primario, se extiende una membrana ciliar continua con la membrana plasmática y que presenta una composición lipídica y de receptores que capacitan al cilio primario para detectar señales extracelulares. Los estímulos detectados por el cilio primario son transmitidos a las células con el objetivo de regular diversos procesos fisiológicos o del desarrollo como la proliferación o la diferenciación celular.

La biogénesis del cilio primario en el linaje osteoblástico comienza cuando una célula en la fase G0-G1 del ciclo celular entra en quiescencia, en un proceso probablemente inducido por la señalización BMP a través de su receptor de tipo 1 (127) o en respuesta a estímulos extrínsecos como estrés mecánico (126). En ese momento, en el interior celular comienzan una serie de procesos para el desarrollo del cilio completo partiendo de un centriolo madre (129), incluido el acoplamiento de pequeñas vesículas citoplasmáticas. Estas vesículas se fusionan, generando una gran vesícula ciliar que encapsula el centriolo madre. A continuación, este centriolo se convierte en el cuerpo basal del cilio primario, que consiste en un centriolo maduro conectado con un centriolo inmaduro, rodeados ambos por una densa matriz pericentriolar rica en proteínas (129). Al mismo tiempo, se produce la migración del centriolo hacia la superficie celular, al tiempo que se elongan los dos microtúbulos internos de cada uno de los tripletes. Esto da lugar a una estructura que contiene un anillo de nueve dobletes de microtúbulos externos, denominado axonema 9+0 (130,131). Además, durante este proceso, diversos apéndices centriolares en la base del axonema se convierten en las fibras de transición. A medida que el axonema se elonga, deforma la vesícula ciliar, lo que da lugar a una membrana externa –vaina o *sheath* ciliar- y a una membrana interna -eje o *shaft* ciliar-, que rodean al propio axonema y a la parte distal del centriolo madre. Finalmente, se produce el acoplamiento a la membrana plasmática. Este proceso, mediado por las fibras de transición, consiste en la exocitosis de la vesícula ciliar y su posterior fusión con la membrana plasmática, lo que expone el cilio primario al espacio extracelular. En la fusión, la vaina ciliar da origen al bolsillo ciliar, mientras que el eje ciliar forma la membrana del cilio. Así, el axonema continúa elongándose desde su extremo apical hasta alcanzar su longitud completa (131–133) (Fig. 3A). (133,134). En algunos tipos celulares, por el contrario, el axonema proyecta directamente desde la membrana plasmática, en un proceso denominado ciliogénesis extracelular (133,135) (Fig. 3B). Además, en células polarizadas de epitelio renal se ha descrito un método alternativo para la génesis del cilio primario. En estas células, la ciliogénesis se inicia con la formación de un puente celular durante la citocinesis. Este puente celular es repartido entre las dos

células hijas, rodeado por parches de membrana compactos y movilizados hacia el centrosoma, donde se inicia la elongación del axonema (133,134).

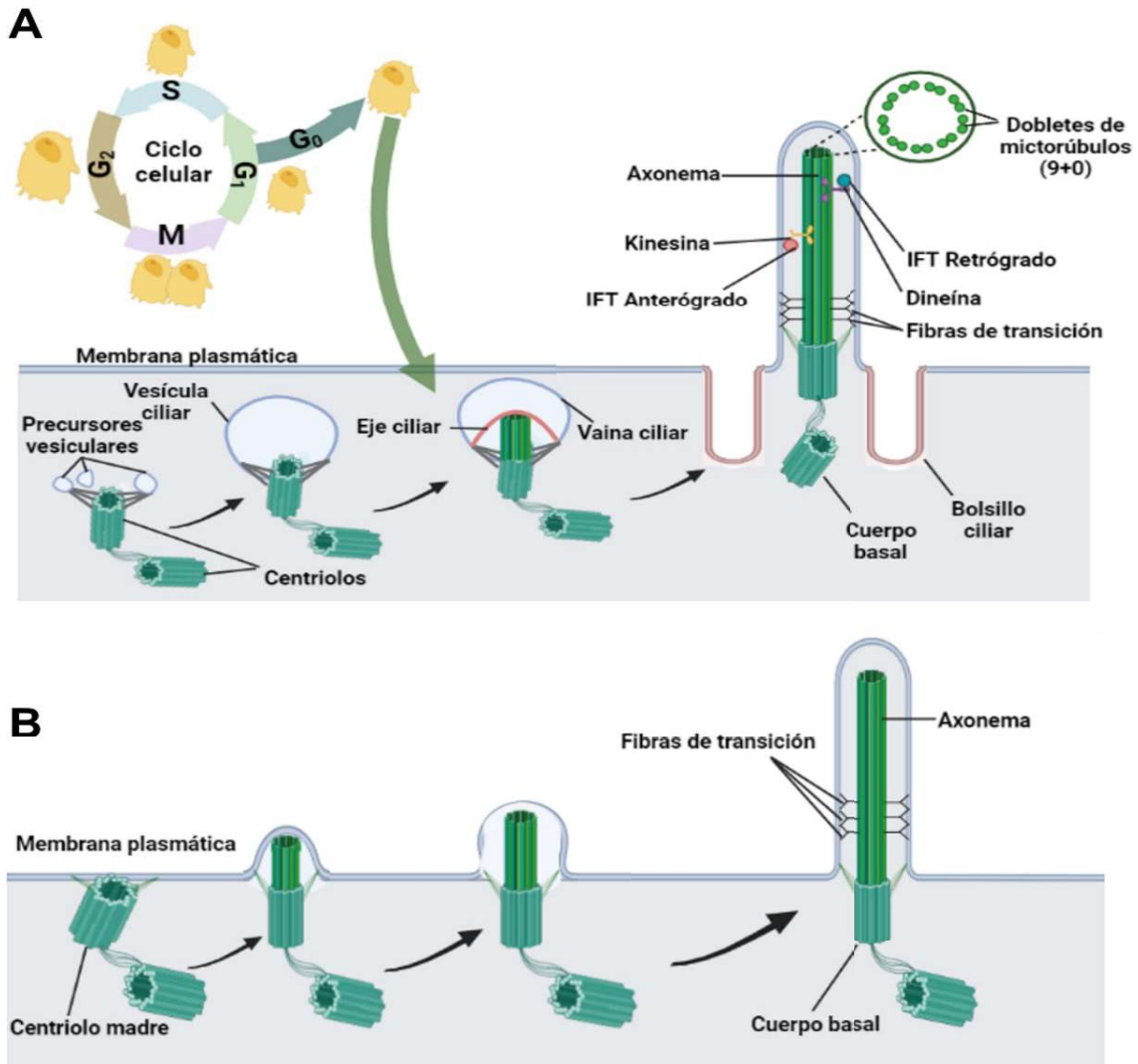


Figura 3. Estructura del cilio primario y proceso de ciliogénesis. (A) Ciliogénesis intracelular. La biogénesis del cilio primario inicia cuando una célula entra en quiescencia. En el interior celular, se produce el acoplamiento de pequeñas vesículas citoplásmicas al extremo distal del centriolo madre. A continuación, se inicia la conversión del centriolo madre en el cuerpo basal del cilio primario, y la migración hacia la membrana plasmática. Durante este proceso, los dos microtúbulos internos de cada uno de los tripletes se elongan a través del aporte de lípidos y proteínas, dando lugar a un axonema 9+0, al tiempo que diversos apéndices centriolares se convierten en fibras de transición. A medida que el axonema se elonga, deforma la vesícula ciliar, lo que da lugar a una membrana externa – vaina o *sheath* ciliar- y a una membrana interna –eje o *shaft* ciliar-, que rodean al propio axonema y a la parte distal del centriolo madre. Finalmente, se produce el acoplamiento a la membrana plasmática, en el que la vaina ciliar da origen al bolsillo ciliar, mientras que el eje ciliar forma la membrana del cilio. En este punto, el axonema continúa elongándose hasta alcanzar su longitud completa. **(B) Ciliogénesis extracelular.** Alternativamente, en ciertos tipos celulares, el axonema puede proyectar directamente desde la membrana plasmática. **Figura realizada con el software BioRender.**

El cilio primario presenta en su membrana diversos receptores, así como componentes que participan en diversas vías de señalización. Sin embargo, el cilio conforma un compartimento o sistema semi-cerrado y no posee ninguna capacidad de síntesis proteica. Esta característica indica que las proteínas y receptores ciliares deben ser importados, retenidos, exportados (136) y transportados a lo largo del cilio a través del sistema de transporte intraflagelar (IFT), regulado por las proteínas IFT (137,138). Se han identificado 22 proteínas IFT, clasificadas clásicamente en dos complejos: IFT-A, formado por proteínas que se unen con la proteína motora dineína-2 para mover las proteínas desde el extremo distal del cilio al cuerpo basal (transporte retrógrado), e IFT-B, formado por los subcomplejos nuclear y periférico, encargado del transporte desde el cuerpo basal hasta el extremo distal del cilio mediante la unión a la proteína motora kinesina-II, (transporte anterógrado) (36,137). A pesar de esta clasificación, también se ha observado que algunos componentes de los complejos IFT-A e IFT-B pueden participar en el transporte ciliar en ambas direcciones (139). Por ejemplo, las proteínas IFT25 e IFT27, pertenecientes al complejo IFT-B, pueden exportar diversos componentes de la vía de señalización Hedgehog (Hh) a través de un proceso de transporte retrógrado (120,139–141).

1.3.2. El cilio primario como mecanotransductor

El cilio primario es capaz de captar diversas señales extracelulares de tipo morfogénico, químico o **mecánico**, y transmitir las al interior celular. La transmisión de estímulos mecánicos desde el exterior al interior celular resulta de especial importancia en un tejido encargado del soporte y la coordinación del movimiento como es el tejido óseo, dado que hay un amplio rango de fuerzas mecánicas que ocurren de forma diaria durante la actividad cotidiana: la deformación/tensión en el hueso, el flujo de fluido, vibraciones y daño (142). Esta denominada mecano-sensibilidad responde a características estructurales del cilio primario. Aunque su axonema presenta cierta resistencia a curvarse como consecuencia de la tensión mecánica gracias a la distribución espacial de los dobletes de microtúbulos, la falta de conexiones radiales y uniones de nexina

entre los microtúbulos causa una menor rigidez ante la flexión que la observada en cilios móviles, por lo que el cilio primario experimentará una mayor tensión que un cilio más rígido cuando ambos son expuestos a fuerzas de la misma intensidad (130). Además, se ha propuesto que la curvatura del cilio contribuye a la apertura de diversas moléculas en la superficie de la membrana ciliar, incluyendo canales iónicos (130). Por otro lado, se ha propuesto que la interacción entre integrinas del cilio y las fibras de colágeno de la matriz extracelular (MEC) también es relevante en los mecanismos de mecanotransducción (143). El cilio primario puede expresar en su membrana diferentes tipos de integrinas y el proteoglicano NG2, que actúan como receptores para diversas moléculas de la MEC, lo que permite la unión directa entre el cilio primario y las fibras de colágeno de la matriz (144). Esta observación sugiere que la funcionalidad ciliar se encuentra mediada, al menos en parte, por proteínas de adhesión. En este contexto, la expresión de NEDD9, una proteína que media la señalización de las integrinas y su anclaje a la matriz, induce la resorción del cilio primario (143,145). Además, se ha propuesto que el cilio primario actúa transmitiendo estímulos mecánicos desde las fibras de colágeno de la matriz hacia el citoesqueleto celular, regulando de este modo la actividad de los canales de sodio mec-4 y mec-10 (pertenecientes a la superfamilia EnaC) y convirtiendo así los estímulos mecánicos en respuestas eléctricas (130). La localización del cilio primario permite que esté también estrechamente asociado con el aparato de Golgi, lo que sugiere una potencial relación entre el cilio primario y la dirección de la secreción celular de componentes de la MEC y/o el mantenimiento de la forma celular a través de los microtúbulos del citoesqueleto (146). Por otro lado, la membrana ciliar contiene diversas moléculas que pueden traducir de manera directa estímulos externos en señales intracelulares, incluyendo GPCRs -como PTH1R (118,147)-, canales iónicos de calcio -como el receptor de potencial vaniloide 4 o TRPV4 (148), el canal de calcio de tipo L Cav1.2 y Policistina (PC) 2 (149)- y moléculas que al recibir un estímulo mecánico sufren proteólisis y se convierten en factores de transcripción -como PC1 (150)-. TRPV4 es un canal iónico de calcio enriquecido en la membrana ciliar, dada su preferencia espacial por las áreas celulares que reciben una

intensa mecanoestimulación. TRPV4 permite la entrada de Ca^{2+} al cilio primario en respuesta a la estimulación mecánica, resultando clave para la señalización de calcio que desemboca la diferenciación osteogénica de células progenitoras de médula ósea, aunque no en la de osteoblastos (148). Además, esta señalización de calcio protege frente a la apoptosis. Otros canales iónicos participan en las respuestas de calcio inducidas por el cilio primario, como PC2 y Cav 1.2 Sin embargo, las respuestas de calcio iniciadas por estos canales iónicos presentan una particularidad, ya que la señalización iniciada por PC2 es liberada al citoplasma, mientras que la iniciada por Cav 1.2 es retenida en el cilio primario. Esto sugiere que es la combinación de diversos receptores la responsable de la transferencia de calcio entre el cilio primario y el citoplasma en respuesta a diferentes tipos de estimulación mecánica (151). El cilio primario también forma complejos con PC1, un GPCR cuyo dominio extracelular actúa como mecanosensor (152). Su extremo C-terminal interactúa con diversas proteínas, como la paxilina o la tuberina, lo que resulta en la activación de ERK. La inhibición de la expresión del gen que codifica para PC1 (*PKD1*) induce osteopenia marcada por la reducción en RUNX2, un descenso en la relación OPG/RANKL y defectos en la señalización de Ca^{2+} en respuesta a estimulación mecánica. Se ha descrito además que tanto PC1 como la variante PC2 se expresan en osteocitos y osteoblastos, modulando el balance entre la inducción de osteoblastogénesis o adipogénesis en células progenitoras mesenquimales (153). Las acciones de estos mecanotransductores del cilio primario son mediadas por diversos factores y vías de señalización, incluyendo Hh, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Wnt/ β -catenina, TGF- β , BMP y FGF, entre otras (120). De este modo, el cilio primario es capaz de modular la formación ósea inducida por carga mecánica (154–156) mediante la coordinación de la proliferación de osteoblastos formadores de hueso y el reemplazamiento continuado de células osteoprogenitoras desde la médula ósea en respuesta a factores paracrinos secretados por osteocitos mecanosensibles (148,157).

1.3.3. Vías de señalización relacionadas con el cilio primario. Señalización Hedgehog

Como se ha comentado anteriormente, el cilio primario actúa como un centro organizador de la señalización. Son varias las vías de señalización dependientes del cilio primario (120). De entre todas ellas, dado su papel en los procesos de osificación y su relevancia como molécula señalizadora del cilio primario, es en los efectos de la vía Hh en los que se centra la presente Tesis Doctoral. La vía de señalización Hh desempeña un papel crucial en el desarrollo del esqueleto. Los mamíferos contienen tres genes encargados de la codificación de tres ligandos hh: Sonic Hedgehog (*SHH*), un regulador del modelado de las extremidades durante el desarrollo, Indian Hedgehog (*IHH*), un modulador de la osificación endocondral, y Desert Hedgehog (*DHH*), implicado en el desarrollo de las gónadas y la diferenciación sexual (158,159). En vertebrados, la señal Hh se transduce fundamentalmente en el cilio primario (160) a través de una vía evolutivamente conservada que desemboca en la activación de unos factores de transcripción de la familia de los oncogenes asociados a glioma: GLI1, GLI2 y GLI3. GLI2 y GLI3 son los principales mediadores de la vía de señalización, mientras que GLI1 es el efector final de la vía. En ausencia de ligando hh, principal activador de esta vía de señalización, el receptor Patched1 (PTCH1) se localiza en la membrana ciliar. PTCH1 es un receptor con doce dominios transmembranales que inhibe la señalización Hh a través de la inducción de la degradación y/o la movilización en vesículas intracelulares de la proteína Smoothed (SMO), una proteína con siete dominios transmembranales (161). En su estado inactivo, SMO es inhibido por PTCH1 no por unión directa, sino a través de la regulación de una molécula moduladora de SMO. Esta molécula probablemente sea algún precursor del colesterol, ya que se ha observado que la deficiencia de 7-dehidrocolesterol reductasa (7DHCR), que cataliza la conversión del 7DHC en colesterol, está relacionada con un incremento en la habilidad de PTCH1 para bloquear la señalización Hh, lo que probablemente se deba a la acumulación de este precursor (162). De este modo, SMO es estabilizada en la cara interna de la membrana, lo que promueve la retención de las formas completas de GLI (GliF) 2 y 3 (sobre todo esta última) por parte de la

proteína Supresor de Fused (SuFu), en un proceso en el que también estabilizado por la proteína similar a kinesina 7 (KIF7). En ese momento se produce la activación de la AC3, que a su vez activa a PKA (163). Esta fosforila a GliF, lo que promueve su procesamiento proteolítico, generándose formas truncadas de GLI (GliR) que son translocadas al núcleo, donde funcionan como represores transcripcionales de los genes diana de la señalización Hh (158,160) (Fig. 4A). Sin embargo, cuando el ligando hh se une a PTCH1, se produce la salida de este último del cilio, lo que incrementa la disponibilidad de ligandos de SMO -principalmente colesterol o derivados del colesterol- en la membrana ciliar. Estos ligandos se unen al dominio extracelular de SMO, activándolo. Así, SMO activado es transportado al cilio primario, donde es fosforilado, lo que inhibe la función de la PKA y permite el movimiento del complejo GLI2/3-SuFu desde la base del cilio hasta el extremo apical (161). Allí, SMO es capaz de bloquear a SuFu, liberando la represión ejercida sobre GliF2/3. De este modo, se inhibe la producción de GliR, y en su lugar se produce la conversión de las formas GliF en las formas activadas (GliA) que son translocadas al núcleo y estimulan la expresión de los genes diana de la vía, entre ellos *GLI1* y *PTCH1* (158,161) (Fig. 4B). Además de esta vía, conocida como señalización Hh canónica, existen otros tipos de señalización Hh no canónica, que implican mecanismos independientes de GLI o de SMO para la regulación de *GLI* (120). Una de las vías no canónicas de señalización Hh activa a las GTPasas RhoA y RAC1 a través de proteínas $G_{\alpha i}$ para la regulación del citoesqueleto de actina en diversos tipos celulares, como fibroblastos y células endoteliales (164). Se ha descrito que el cilio primario promueve la osteogénesis mediante el balance de las vías canónica (Hh-Gli) y no canónica (Hh- $G_{\alpha i}$ -RhoA) de la señalización Hh (60,165).

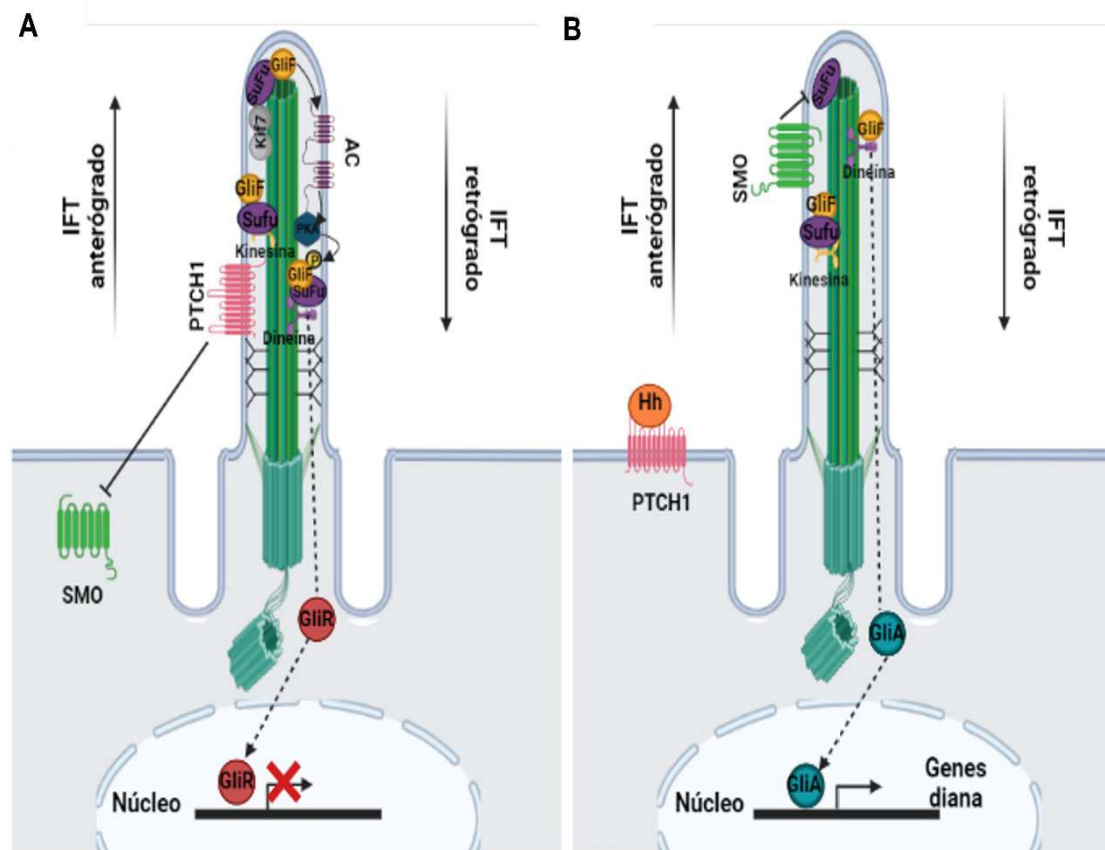


Figura 4. Descripción de la señalización Hedgehog (Hh) en el cilio primario. (A) En ausencia de ligando Hh, el represor Patched1 (PTCH1) se encuentra en la membrana ciliar, lo que evita la entrada de Smoothened (SMO) en el cilio. De este modo, se promueve el procesamiento proteolítico de los factores de transcripción GLI2 y GLI3, lo que genera formas truncadas que son retenidas por la proteína supresora de fused (SuFu) y la proteína similar a kinesina 7 (KIF7). Esto produce la activación de la Adenilato Ciclasa (AC) 3, que a su vez activa a la proteína quinasa A (PKA). Así, las formas truncadas de GLI2 y GLI3 quedan retenidas en la base del cilio, donde funcionan como represores transcripcionales de los genes diana de la vía Hh. **(B)** La unión del ligando Hh a los dominios extracelulares de PTCH1 produce la salida de este último del cilio y su posterior internalización en la base ciliar. Esto provoca el enriquecimiento y activación de SMO en el cilio, lo que resulta en una disociación de SuFu de los factores de transcripción GLI. Esto promueve la formación de las formas activas de GLI, cuya acumulación en el extremo distal del cilio induce la expresión de los genes diana de la vía de señalización. **Figura realizada con el software BioRender.**

En cuanto a los efectos inducidos por el cilio primario a través de la vía Hh en hueso, se ha observado que SHH es capaz de estimular la osteogénesis durante el desarrollo mandibular (166). Por otro lado, defectos en la expresión del cilio primario regulan la invasividad de los osteoblastos a través de la sobreexpresión de IHH, favoreciendo que las células experimenten un cambio en su patrón de expresión génica, que pasa de condrogénica a osteogénica, lo que desencadena

osteogénesis ectópica en el desarrollo mandibular (167). Diversas proteínas ciliares, como las proteínas homólogas Ellis van Creveld (EVC) 1 y 2, localizadas en el cuerpo basal y en la base del axonema de los osteoblastos (168), son capaces de modular su diferenciación a través de la señalización *Ihh* (138). Este proceso se inicia con la formación de un complejo EVC1/2 en la base del cilio primario que interactúa con SMO, permitiendo el reclutamiento del complejo GLI3F-SuFu al extremo apical del cilio y su posterior disociación, con la consecuente translocación nuclear de GliF (169). También se ha observado, en células con defectos en la formación del cilio primario y la expresión de PC1, una activación de la vía de señalización Hh que permite rescatar el fenotipo osteopénico inducido por la falta de PC1 a través de la sobreexpresión del efector final de la vía GLI2 y el consiguiente aumento en los niveles de RUNX2 (170). La vía de señalización Hh también modula la formación y el remodelado óseo en respuesta a estimulación mecánica, de manera dependiente del cilio primario. Se ha observado la implicación de IHH, a través de mecanismos dependientes del cilio primario, en la mecanotransducción en respuesta a carga hidrostática en las placas de crecimiento en cartílago (171). Además, diversos miembros de la vía Hh, como PTCH1, GLI1 y GLI3, han sido identificados como parte de una red molecular asociada con ZIC1, un factor de transcripción neural que desempeña un importante rol en la mecanotransducción inducida por flujo de fluido en osteocitos (172). En conjunto, estas observaciones indican que el cilio primario puede activar o suprimir la vía Hh bajo determinadas circunstancias (173) con repercusiones en la fisiopatología ósea.

Por otro lado, la regulación ejercida por diversos factores sobre la vía Hh también induce cambios en la fisiología del cilio primario en células del linaje óseo. Así, el factor similar a Kruppel 4, que suprime la actividad de la vía Hh, inhibe la diferenciación osteoblástica al tiempo que promueve la formación y mantenimiento del cilio primario, si bien induce una reducción de su longitud, cuando es añadido a osteoblastos en cultivo. Además, induce una baja tasa de mineralización, manteniendo a los osteoblastos en un estado inmaduro con una reducida expresión de genes osteoblásticos (174). Por el contrario, se ha observado que la estimulación de la vía Hh produce una elongación significativa

del cilio, así como la diferenciación de osteoprogenitores de médula ósea a osteoblastos (175).

La señalización Hh también interacciona con otras vías relacionadas con el cilio primario, ya que se ha observado que Gli3R interactúa con las proteínas SMAD, efectores de la vía BMP (176). La señalización BMP regula positivamente la señalización Ihh a través de su receptor de tipo 1A (BMPR1A) en células progenitoras mesenquimales para el mantenimiento de la homeostasis en las suturas craneales (177). En este caso, la señalización Ihh dependiente de BMP actúa sinérgicamente con RANK y RANKL para regular la actividad de los osteoclastos (178), evidenciando la posible existencia de una retroalimentación positiva BMP/Ihh que regula el remodelado óseo.

De especial interés resulta la regulación positiva que ejerce Ihh sobre los efectos de PTHrP durante la osificación endocondral (179–181). La osificación endocondral está modulada por el cilio primario y diversas proteínas ciliares como EVC (Evc1 media tanto la señalización Ihh tanto dependiente como independiente de PTHrP) (171,182). Las células en la zona de reposo de la placa de crecimiento en desarrollo secretan PTHrP que mantiene la proliferación de los condrocitos al tiempo que inhibe su diferenciación hacia un fenotipo hipertrófico (183). IHH, por su parte, es producida por condrocitos pre-hipertróficos, en los que promueve la proliferación al tiempo que crea un sistema de retroalimentación negativo con PTHrP para mantener la longitud de la placa de crecimiento (184,185). De esta forma, la expresión de PTHrP inducida por IHH en los condrocitos de la zona de reposo periarticular y en el pericondrio mantiene la proliferación de los condrocitos en la interfase de las zonas de proliferación e hipertrofia, promueve la supervivencia de los condrocitos en estado proliferativo a través de la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2 e inhibe la diferenciación hacia condrocitos hipertróficos (183,186,187). Se ha descrito que el control que ejerce IHH sobre PTHrP ocurre a través de la inhibición de la función represora de Gli3R, lo que requiere el correcto funcionamiento de la señalización Hh (61). Además, PTHrP reprime la expresión de IHH en condrocitos hipertróficos en los que la expresión de PTH1R es dominante – los condrocitos proliferativos expresan bajos niveles de PTH1R, lo

que genera una retroalimentación negativa-(188). Así, la supresión de la hipertrofia mantiene a los condrocitos proliferando, y la distancia entre las células que producen PTHrP y las que producen IHH se mantiene constante (189). Por tanto, PTHrP regula principalmente la hipertrofia e IHH regula la proliferación de los condrocitos (190). Finalmente, los condrocitos detienen su proliferación debido a la regulación de moléculas como $TGF\alpha$ /EGFR o FGF (188,191). Una vez detiene la proliferación, los condrocitos activan procesos apoptóticos y mueren o se transdiferencian a osteoblastos (183,192,193).

También se ha demostrado que la señalización Hh induce indirectamente la maduración osteoclástica y la resorción ósea, ya que niveles incrementados en la señalización Hh en osteoblastos maduros promueven la expresión de RANKL a través de la sobreexpresión de PTHrP, que actúa a través de PKA y de su factor de transcripción proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc (CREB) (194). En este mismo sentido, otros estudios describen que SHH, además de incrementar la expresión de Osterix e incrementar la producción de osteoblastos, es capaz también de incrementar indirectamente la actividad de los osteoclastos, lo que resulta en una mayor resorción ósea (195). Así mismo, la señalización Shh se activa en osteoblastos en puntos de remodelado de fracturas para regular la proliferación y diferenciación osteoblástica, así como la osteoclastogénesis y vascularización (196). Resultados similares se han observado para los niveles de expresión de IHH y PTCH1, incrementados durante las etapas iniciales de la reparación de fracturas (197), en las que se produce resorción de hueso.

1.4. Las caveolas como moduladoras del metabolismo óseo

1.4.1. Estructura y formación de las caveolas

Las caveolas son invaginaciones submicroscópicas de membrana plasmática ricas en colesterol y fosfolípidos, relacionadas con las balsas lipídicas y abundantes en diversos tipos celulares en mamíferos (198,199). Los principales elementos estructurales de las caveolas son las caveolinas. Las caveolinas son componentes integrales de membrana con capacidad para unirse a colesterol, y se han descrito 3 isoformas: caveolina-1 (CAV1) -que presenta dos isoformas (CAV1 α y CAV1 β) originadas por dos sitios alternativos de iniciación de la transcripción (200)-, esencial para la formación de las caveolas en diversos tipos celulares-, caveolina-2 (CAV2), no esencial para la formación de caveolas, y caveolina-3 (CAV3), predominante en la formación de caveolas en células musculares. Otros componentes de las caveolas son las cavinas, así como un gran número de proteínas accesorias que se asocian con las caveolas para regular diversos aspectos de su formación y función. Existen 4 isoformas de cavina, siendo cavina-1 (también llamada PTRF) la única esencial en la formación de las caveolas, mientras que cavina-2 (una fosfatidilserina), cavina-3 (regula la difusión de las caveolas) y cavina-4 (específica de músculo, una fosfatidilserina -PS- y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato -PI(4,5)P₂-) no resultan imprescindibles en su ensamblaje (201) (Fig. 5A). Además, CAV1 forma dominios no caveolares en la membrana plasmática, que han sido relacionados con la unión de CAV1 al receptor del factor de crecimiento epidérmico y la posterior regulación de la señalización inducida por este último, la modulación de la endocitosis dependiente de balsas lipídicas a través de la alteración de la composición lipídica de ciertos dominios de las balsas (202) y la formación de oligómeros de CAV1 que se unen a proteínas y lípidos para regular la organización de la membrana plasmática, la superficie de señalización celular y las uniones de adhesión focal (203). Además, se ha relacionado la presencia de estos microdominios no caveolares de CAV1 con la activación de la señalización Shh, dado que se ha detectado la presencia de balsas lipídicas enriquecidas en CAV1 en la proteína E3 de ubiquitina de los tipos 1 y 2 (SMURF1 y SMURF2).

SMURF 1 y 2 son inducidas por SHH y se asocian a PTCH1, induciendo su posterior endocitosis, lo que resulta fundamental para su salida del cilio primario y la posterior activación de la vía de señalización Shh (204). Otro estudio ha demostrado que CAV1 forma microdominios de membrana especializados en la zona de transición del cilio primario, para cuyo establecimiento son necesarias diversas proteínas ciliares como la kinesina-3 motora KIF13B y la nefrocistina 4. Estos microdominios son esenciales para que se produzca la acumulación de SMO dependiente de SHH en el cilio primario, así como la activación de la expresión de los genes diana mediada por GLI (205).

La formación de las caveolas se inicia con la síntesis de CAV1 en el RE. Tras la síntesis inicial se produce el transporte de oligómeros de caveolina, primero al Golgi y después a la superficie celular en un proceso dependiente de colesterol (206,207). Por su parte, las cavinas forman complejos hetero-oligoméricos en el citosol que se asocian con los dominios enriquecidos en CAV1 en la membrana plasmática, pero no en el Golgi, para generar la superficie caveolar (201). Debido a la baja afinidad en la unión entre la CAV1 y la cavina, es necesario que esta última se una también a dos lípidos de membrana, la PS y el PI(4,5)P₂, para generar el dominio caveolar. Tras su formación, las caveolas pueden desensamblarse, produciéndose la endocitosis de complejos que contienen complejos formados por oligómeros de cavinas unidas a CAV1. Estos complejos pueden tener diversos destinos: por un lado, pueden ser degradados en endosomas tempranos. Por otro, puede producirse la separación de la CAV1, que se recicla a la membrana plasmática para iniciar la nueva formación de dominios caveolares, mientras que las cavinas permanecen en el citosol y pueden colaborar también en la formación de nuevas caveolas (Fig. 5B) (201).

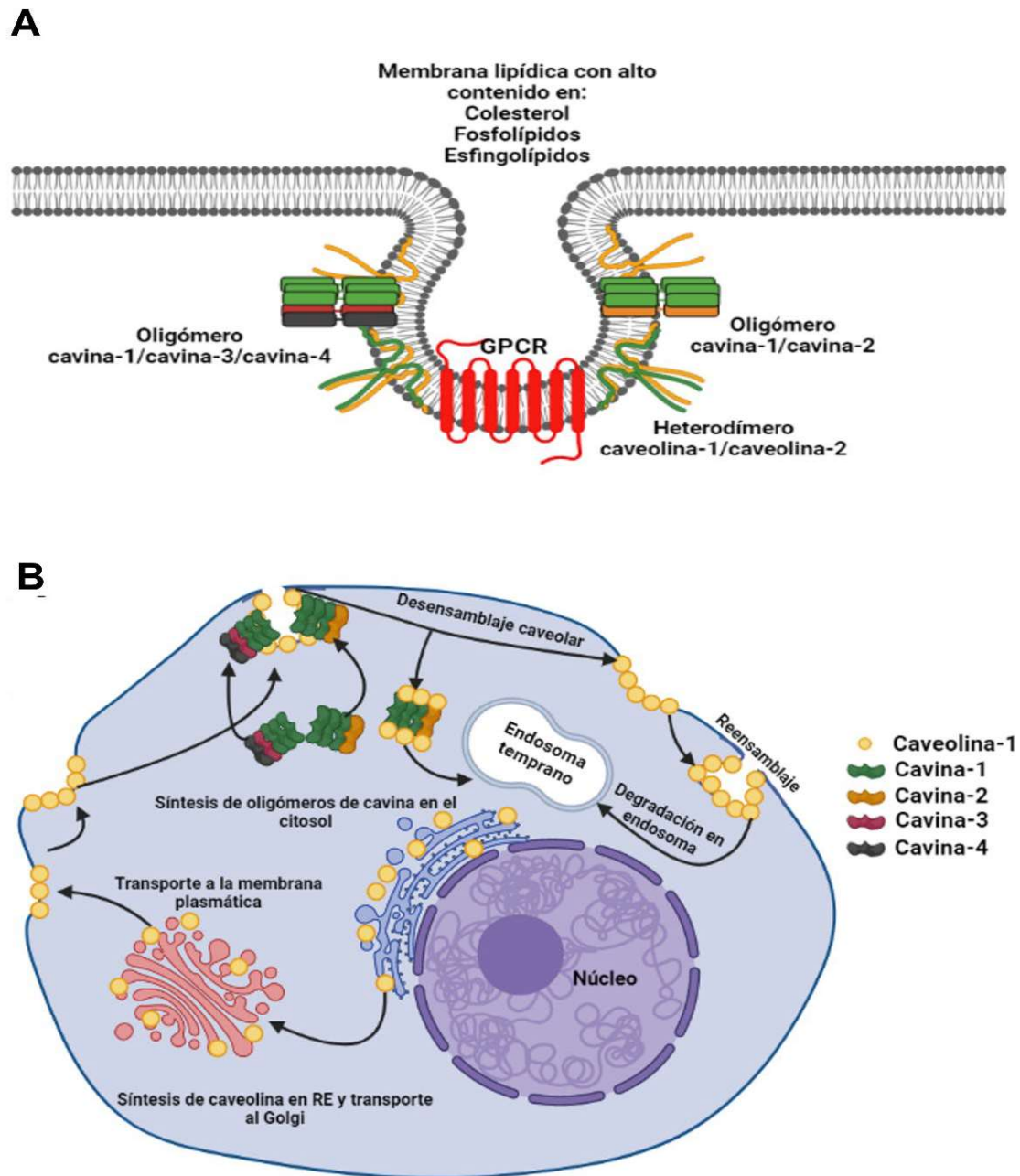


Figura 5. Formación y morfología de las caveolas. (A) Estructura y componentes de una caveola. (B) La proteína estructural de las caveolas, caveolina-1 (CAV1) es sintetizada en el retículo endoplásmico, desde donde es transportada al Golgi y, posteriormente, a la membrana plasmática. Allí se produce el reclutamiento de diversos complejos homo y hetero-oligoméricos de cavinas citoplasmáticas. Las caveolas pueden sufrir endocitosis, dando origen a complejos de caveolina-cavinas que se dirigen a endosomas para su degradación, o bien son desensamblados. Las cavinas liberadas de estos complejos pueden ser degradadas, interactuar con diversas dianas intracelulares o re-asociarse a caveolina en la membrana para volver a formar las caveolas. La caveolina, una vez liberada, es internalizada y degradada mediante el sistema endo-lisosomal. **Figura realizada con el software BioRender.**

La principal función de las caveolas es el reclutamiento de moléculas reguladoras para obtener una concentración apropiada de efectores de la señalización (198). Diversos receptores se localizan en las caveolas debido a que presentan dominios de unión a caveola (de tipo $\Phi X\Phi XXXX\Phi$, $\Phi XXXX\Phi XX\Phi$, o $\Phi X\Phi XXXX\Phi XX\Phi$; donde Φ representa un aminoácido aromático y X representa cualquier aminoácido) en su estructura (208–210). Entre los receptores localizados en caveolas se encuentran varios GPCRs, como el receptor del péptido intestinal vasoactivo 2 (VPAC2) y el receptor similar a glucagón de tipo 1 (GLP-1R) (208,209). Las caveolas también han sido propuestas como elementos estructurales necesarios para la transducción de las señales de tipo $G_{\alpha q}$ (211), ya que el silenciamiento de la expresión de CAV1 inhibe la señalización de los receptores acoplados a proteínas $G_{\alpha q}$ (212,213). Además, se ha observado que Cav1 se une a $G_{\alpha q}$ tras la activación del receptor muscarínico de acetilcolina (214), lo que impide las interacciones con las subunidades $G_{\beta\gamma}$ que son necesarias para finalizar la señalización, prolongando así la señalización de PLC β /Ca²⁺.

1.4.2. Dinámica de las caveolas y función mecanosensora

Las caveolas son estructuras dinámicas cuya internalización se ve estimulada por cavina-3 e inhibida por la ATPasa EHD2 (215). En fibroblastos, se ha observado que las caveolas mantienen el recubrimiento de cavina durante la endocitosis, se fusionan con endosomas tempranos y posteriormente son recicladas a la membrana plasmática, en un ciclo constitutivo en el que no se produce la degradación de las caveolinas y las cavininas. Aparte de entrar en esta vía cíclica de reciclaje, las caveolas pueden desensamblarse bajo ciertas condiciones, lo que representa un evento crucial de su función de mecanoprotección celular. Ante un incremento de la tensión en la membrana plasmática, se pierde la estructura caveolar y se reduce la asociación entre caveolinas y cavininas, con la liberación de diversos subcomplejos de cavininas (cavina-1/cavina-2 y cavina-1/cavina-3) al citosol (216). Además, el aplastamiento de las caveolas puede amortiguar cambios en la tensión de la

membrana plasmática, manteniendo así la integridad de membrana ante estímulos mecánicos y promoviendo la supervivencia celular (198). También se ha empleado la extensión celular como modelo para caracterizar la capacidad mecanosensible de las caveolas, ya que induce la fosforilación de CAV1, lo que activa diversas vías de señalización que conducen a distintos cambios transcripcionales. La extensión cíclica de las células también provoca la disociación de cavina-1 al tiempo que incrementa su reciclaje mediante degradación mediada por el proteasoma, lo que requiere la exposición y posterior ubiquitinación del sitio de unión para PI(4,5)P₂. Así se mantienen los niveles de cavina-1 bajos en el citosol mientras equilibran los niveles de cavina-1 y CAV1 en la membrana plasmática (201,217). En células endoteliales en cultivo, se ha observado que el esfuerzo por tensión laminar incrementa el número de caveolas (218) y favorece la activación de diversas vías de señalización por parte de CAV1, desencadenando, entre otros efectos, la liberación de óxido nítrico y la consiguiente vasodilatación (219). En respuesta a la estimulación mecánica, EHD2 es liberada de las caveolas, SUMOtilada y translocada al núcleo, donde regula la transcripción de diversos genes, incluyendo aquellos que codifican la expresión de los componentes de las caveolas. Así, EHD2 es necesaria para mantener el reservorio de caveolas en la membrana plasmática durante las variaciones en la tensión de la membrana plasmática inducidas por estrés mecánico (220). También en células endoteliales, se ha descrito que el incremento en el flujo de fluido promueve la translocación de diversas moléculas a las caveolas que inducen la activación de diversas vías de señalización de proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK) como es el caso de ERK1/2 (221).

1.4.3. Papel de las caveolas en tejido óseo

Las acciones de las caveolas en el remodelado óseo muestran hasta el momento resultados contradictorios. En las células osteocíticas MLO-Y4, la estimulación de la supervivencia celular a través de la activación de β -catenina y de ERK1/2 inducida en respuesta a carga mecánica resulta inhibida al interrumpir la formación de las caveolas por silenciamiento de CAV1 (222,223). En este

contexto, la inducción de la supervivencia en osteocitos mediante estimulación mecánica ha sido asociada con una osteoclastogénesis reducida, así como con protección frente a la pérdida de hueso (9).

Además, CAV1 es necesaria para la mecanotransducción mediada por el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial de tipo 2 (VEGFR2) en osteocitos (224). De manera similar, se ha observado que CAV1, la más abundante en las caveolas de osteoblastos (225), contribuye con los efectos proliferativos ejercidos por la leptina en este tipo celular, los cuales están mediados por la activación de la proteína quinasa B (PKB, también llamada AKT) (226). Además, la señalización desencadenada por el receptor purinérgico P2X₇R, presente en las caveolas en los osteoblastos, es capaz de inducir la endocitosis de CAV1. Así mismo, parece que CAV1 ejerce una modulación de los efectos de la señalización del receptor, ya que su internalización incrementa los niveles de Ca²⁺ liberados tras la estimulación de P2X₇R, lo que conduce a una mayor mineralización en células osteoblásticas (225). Además de los efectos de CAV1 en células óseas, también se ha descrito que la sobreexpresión de CAV3 promueve la formación de hueso a través de la vía Wnt en ratas osteoporóticas (227).

Por el contrario, otros estudios han descrito que silenciamiento de Cav1 en macrófagos derivados de médula ósea reduce la osteoclastogénesis (228,229), a través de la inactivación de los efectos de RANKL (229), es decir, inhibiendo la estimulación de ERK1/2 y de la quinasa N-terminal c-Jun, que a su vez activa el factor nuclear de las células T activadas, un regulador clave de la osteoclastogénesis (230). También se ha descrito que el silenciamiento de CAV1 en cultivos primarios de células estromales incrementa la osteoblastogénesis, induciendo la formación de hueso (231).

Curiosamente, se ha observado que el silenciamiento de CAV1 en diferentes tipos celulares incrementa la longitud ciliar a través de vías de señalización que implican RhoA/ROCK (232). Además, se ha relacionado la expresión incrementada de CAV1 (210) y el incremento en el porcentaje y longitud del cilio primario (233) con diversos procesos asociados a senescencia y estrés oxidativo durante el envejecimiento. **Pese a todo lo descrito, la posible interacción**

entre el cilio primario y las caveolas en las células óseas en relación al receptor PTH1R en condiciones fisiopatológicas aún no han sido aclarados.

2. Hipótesis

En base a estos antecedentes, en la presente Tesis Doctoral hipotetizamos que la movilización de PTH1R al cilio primario o a las caveolas modula las distintas vías de señalización activadas por el receptor en respuesta a estimulación mediante su ligando agonista PTHrP, en osteocitos y osteoblastos.

3. *Objetivos*

- 1) Determinar la posible co-localización del cilio primario y PTH1R en células osteocíticas y osteoblásticas.
- 2) Evaluar el papel ejercido por el cilio primario sobre los cambios en la expresión génica inducidos por PTH1R en respuesta a estímulo por ligando.
- 3) Caracterizar el papel ejercido por el cilio primario sobre los efectos ejercidos por PTH1R en la supervivencia celular en respuesta a estímulo por ligando.
- 4) Determinar la posible co-localización de PTH1R y las caveolas en células osteoblásticas.
- 5) Estudiar los efectos de la posible interacción entre PTH1R y las caveolas en la capacidad de movilización e internalización de receptor.
- 6) Analizar los efectos de la posible interacción entre PTH1R y las caveolas en las vías de señalización desencadenadas por el receptor en respuesta a estímulo por ligando.

4. Materiales y

Métodos

4.1. Modelos experimentales *in vitro*

4.1.1. Células osteocíticas de ratón MLO-Y4

Las células osteocíticas de ratón MLO-Y4 fueron generosamente proporcionadas por la Dra Lynda Bonewald, puesto que dicha línea celular fue desarrollada por su grupo de investigación (234). Las células fueron cultivadas empleando medio de cultivo esencial mínimo α (α -MEM) suplementado con un 2,5% de suero fetal de ternera (SFT), un 2,5% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, y se incubaron en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ a 37 °C. Las células se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm² en placas de cultivo convencionales o en portaobjetos de vidrio (FlexCell International Corp., Hillsborough, NC, EEUU), o con una densidad de 50.000 células/cm² en portaobjetos de cultivo celular con cámara Falcon® (Falcon), siendo todas las superficies de cultivo recubiertas con una matriz de colágeno de tipo I (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, EEUU). Las células se mantuvieron en cultivo hasta que se encontraban casi totalmente confluentes, momento en el cual se reemplazó el medio de cultivo por α -MEM sin rojo de fenol, sin SFB y sin SFT durante 24 horas. Transcurridas estas, las células fueron estimuladas con PTHrP (1-37; Bachem, Bubendorf, Suiza) a una concentración de 100 nM, empleando un vehículo apropiado como control en los casos en los que fuese necesario (tampón fosfato salino -PBS-, pH:7.4). Alternativamente, las células se estimularon mediante flujo de fluido laminar (FF, descrito en el apartado 4.2.2). En algunos casos, los cambios inducidos por los estímulos se evaluaron a tiempos no superiores a 30 minutos (análisis de fosforilación proteica mediante inmunoblot, inmunofluorescencia), mientras que, para la evaluación de los cambios inducidos en la expresión génica y proteica, las células se mantuvieron en α -MEM sin SFB ni SFT y con PTHrP (1-37) 100 nM durante 1, 6 o 24 horas. Para los ensayos de viabilidad celular, el péptido exógeno se añadía 1 hora antes de la privación de suero del medio, que comprometía la supervivencia celular. En algunos de estos experimentos, las células fueron transfectadas de manera transitoria con ARN pequeño de interferencia (siARN) 24 horas antes de la

estimulación con PTHrP (1-37). En los casos en los que se utilizaron inhibidores, estos eran añadidos 1 hora antes de la estimulación con el péptido. Los esquemas experimentales correspondientes se muestran en la Figura 6. Los detalles de cada una de las técnicas experimentales y estímulos utilizados se desarrollan en el apartado 4.2.

4.1.2. Células pre-osteoblásticas de ratón MC3T3-E1

Las células pre-osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 subclon 4 (American Type Culture Collection: CRL - 2593 - 6), se cultivaron con α -MEM suplementado con un 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomicina (100 μ g/ml) en atmósfera húmeda a una temperatura de 37 °C y CO₂ al 5%. Las células se sembraron a una densidad de 15.000 células/cm² en placas de cultivo convencionales, o con una densidad de 30.000 células/cm² en portaobjetos de cultivo celular con cámara, llevándose a cabo los protocolos experimentales descritos en el apartado 4.1.1. También se sembraron con una densidad de 5.000 células/cm² en placas de cultivo de 35 mm de diámetro *ibidi*® (ibidi GmbH; Planegg, Alemania) para la realización de diversas técnicas de microscopía confocal. En estos ensayos, las células eran transfectadas de manera transitoria empleando diversos ARNs pequeños de interferencia (siARNs) o plásmidos durante 24 horas, tras lo que se reemplazaba el medio de cultivo por α -MEM sin rojo de fenol y sin SFB, y se procedía a la estimulación con PTHrP (1-37) 100 nM. Los cambios inducidos por el ligando se evaluaron inmediatamente después del estímulo (evaluación de la movilización de Ca²⁺ y de AMPc, estudios de movilización e internalización de PTH1R, cálculo de las fracciones móvil e inmóvil de PTH1R mediante FRAP). Los esquemas experimentales correspondientes se muestran en la Figura 6. Los detalles de cada una de las técnicas experimentales y estímulos utilizados se desarrollan en el apartado 4.2.

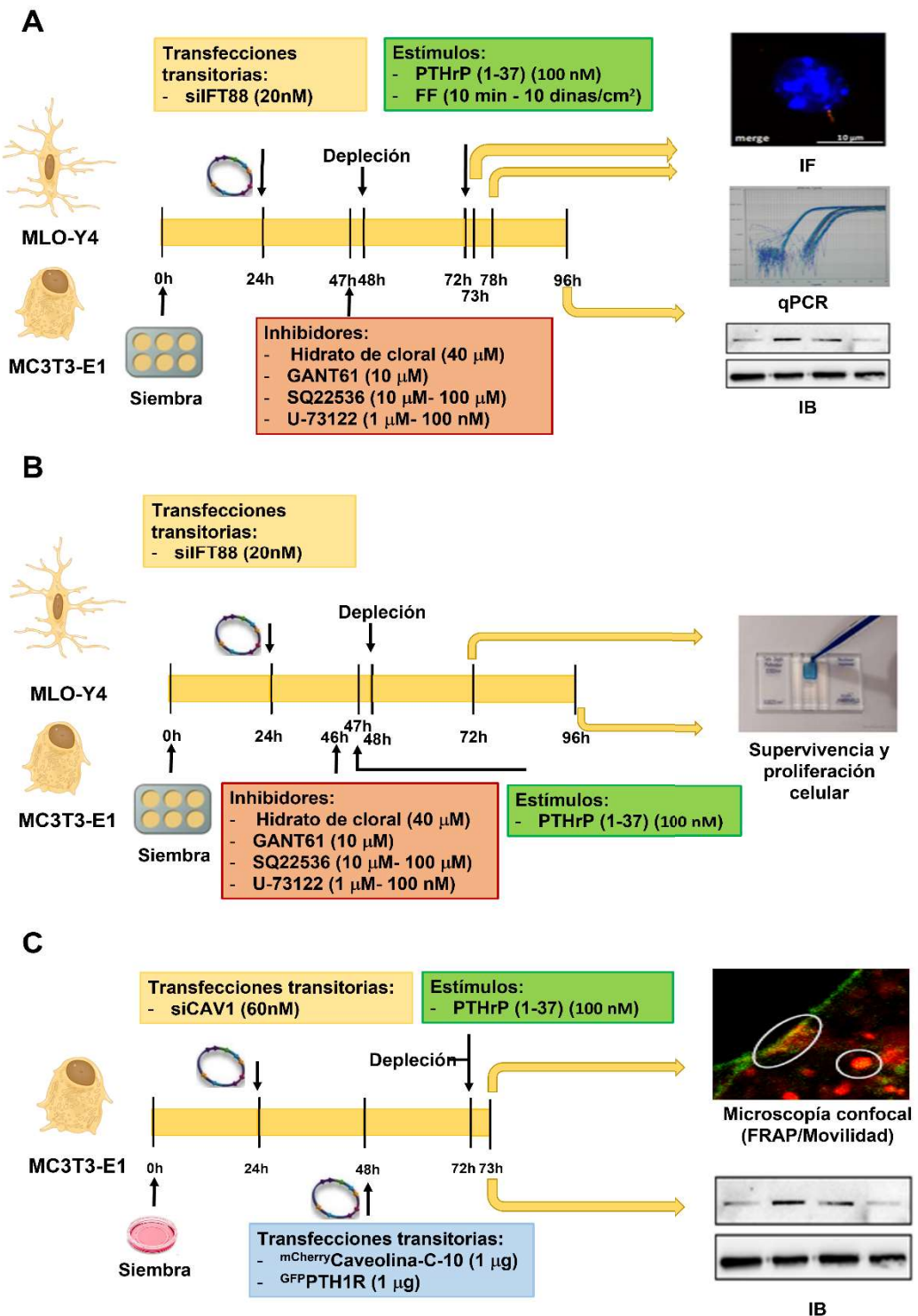


Figura 6. Esquema experimental mostrando los diferentes protocolos llevados a cabo in vitro en las células osteocíticas de ratón MLO-Y4 y en células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1. (A) Diversos experimentos llevados a cabo en ambas líneas celulares. (B) Experimentos de supervivencia realizados en ambas líneas celulares. (C) Experimentos de microscopía confocal en MC3T3-E1. IF: inmunofluorescencia; IB: inmunoblot; RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real; FF: flujo de fluido; siFT88: siARN IFT88; siCAV1: siARN Caveolina-1.

4.2. Técnicas experimentales

4.2.1. Estímulos agonistas y antagonistas

Tabla I. Relación de estímulos empleados.

| Agonistas | | | |
|---|---|--------------------------|------------------------|
| Nombre | Descripción | C. Comercial | Concentración |
| PTHrP (1-37) | h PTHrP N-terminal | Bachem | 100 nM |
| Ionomicina | Ionóforo que aumenta $[Ca^{2+}]$ | Sigma Aldrich | 10 μ M |
| Antagonistas | | | |
| Nombre | Descripción | C. Comercial | Concentración |
| 1-[6-[[[(17 β)-3-metoxiestra1,3,5(10)-trieno-17-il]amino]hexil]-1H-pirrol2,5-diona (U73122) | Inhibidor de la PLC | Santa Cruz Biotechnology | 1 μ M-100 nM |
| Hidrato de cloral (HC) | Inhibidor de la formación del cilio primario | Sigma Aldrich | 40 μ M-1 mM |
| 9-THF-Ade (SQ22536) | Inhibidor de la ciclase A que bloquea la liberación de AMPc | Santa Cruz Biotechnology | 100 μ M-10 μ M |
| 2,2'-[[Dihidro-2-(4-piridinil)-1,3(2H,4H)-pirimidinediyl]bis(metilen)]bis[N,N-dimetilbenzenamina (GANT61) | Inhibidor anti-proliferativo de la vía de señalización Hh | Santa Cruz Biotechnology | 10 μ M |
| Ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) | Quelante de Ca^{2+} | Panreac | 10 mM |

4.2.2. Estimulación mecánica de las células mediante Flujo de Fluido (FF)

Las células MLO-Y4 fueron sembradas en portaobjetos de vidrio de la forma indicada en el apartado 4.1.1. Tras 24 horas de incubación en medio de cultivo sin rojo de fenol y sin suero, se introdujeron en una cámara hermética metálica Flexcell Streamer® (Flexcell International Corp.) que formaba un circuito cerrado con una botella llena de medio de cultivo. Este medio resultaba bombeado sobre la monocapa celular en condiciones de esterilidad de manera constante gracias a una bomba peristáltica Masterflex Fluid Flow System (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, EEUU), según parámetros establecidos por el programa informático Streamsoft v4.1 (10 dinas/cm²) (Fig. 7). La intensidad empleada para la estimulación se halla dentro del rango que se estima experimentan las células óseas en situación fisiológica in vivo (116,235). En paralelo, se sembraron células MLO-Y4 en portaobjetos de vidrio que no fueron sometidas a estímulo mecánico por FF, que servían como controles estáticos

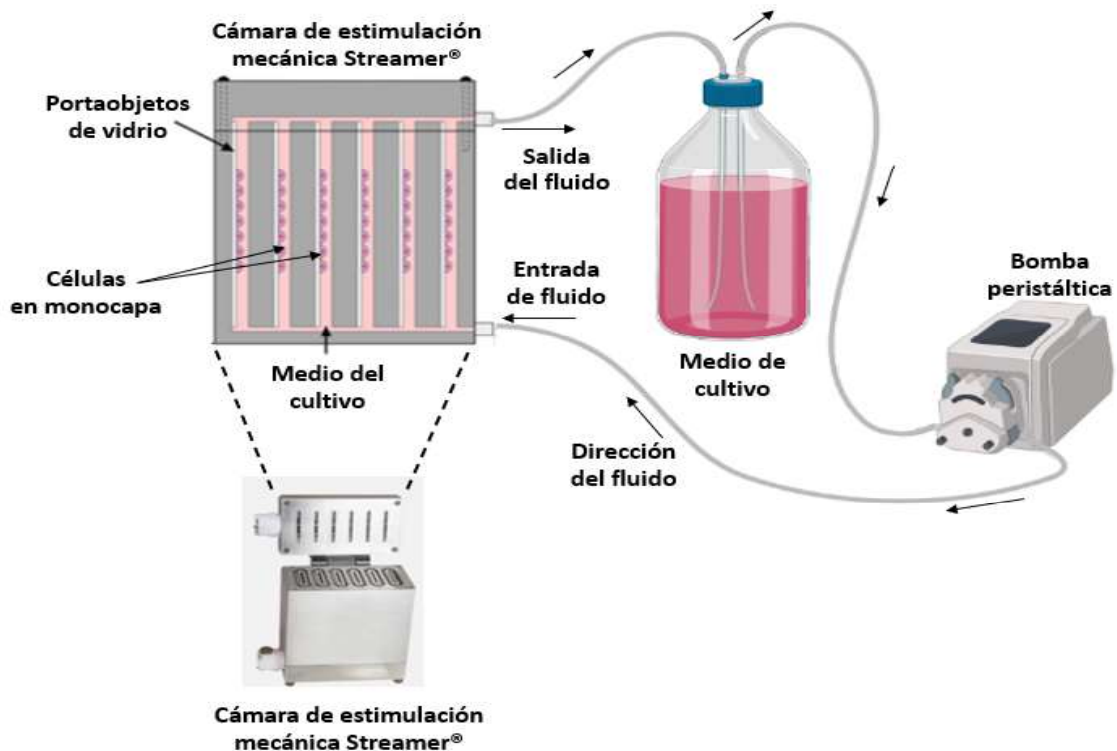


Figura 7. Esquema de estimulación mecánica mediante el paso de fluido (medio de cultivo) sobre monocapa celular de manera controlada. Figura realizada empleando el software BioRender, modificada de <https://www.flexcellint.com>.

4.2.3. Transfecciones transitorias

Para la inducción específica de un silenciamiento génico transitorio, se emplearon distintas secuencias de siARN. Para ello, se sembraron las células MLO-Y4 y MC3T3-E1 a una densidad de 25.000 células/cm² o de 15.000 células/cm², respectivamente, en placas de cultivo con su medio de cultivo habitual (y recubiertas por una matriz de colágeno tipo I en el caso de las células MLO-Y4). Al día siguiente, se añadieron los siARNs específicos, empleando como agente de transfección lipofectamina RNAiMax (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) diluida en medio Optimem® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El agente de transfección se mantuvo en el cultivo durante toda la noche a 37 °C, y fue reemplazado posteriormente por medio de cultivo sin rojo de fenol y sin suero para la realización de los diferentes experimentos.

Para llevar a cabo el silenciamiento del cilio primario, las células fueron transfectadas con un sistema de 3 dúplex de siARN (cada uno de ellos a una concentración final de 20 nM) dirigidos contra diferentes secuencias codificantes del gen *Ift88* de ratón y generadas por la tecnología Ambion (186729; 186730; 186731; Thermo Fisher Scientific,). Para el silenciamiento del gen *Cav1*, se empleó una única secuencia, a una concentración final de 60 nM, diseñada por la tecnología *Custom SMARTpool* (L-058415-00; Dharmacon, Lafayette, CO, EEUU). Como control negativo para evaluar la posible interferencia del ARN fuera de la diana de interés y verificar la precisión de los cambios génicos inducidos de manera específica por los siARNs en los diferentes parámetros evaluados, se utilizó una secuencia de siARN no codificante ("*Scrambled*") (control siRNA- A; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Además, se comprobó la eficiencia del silenciamiento en todos los casos mediante qPCR en tiempo real y análisis de inmunoblot. En el silenciamiento del gen IFT88 se analizó, además, el número de células que presentaban cilio primario tras la transfección.

Por otro lado, las células MC3T3-E1 fueron transfectadas de manera transitoria con un plásmido portador de ADN codificante para caveolina-1 humana fusionado con el gen reportero m-Cherry (^{m-Cherry}caveolin-C-10), suministrado generosamente por el Dr. M. Davidson (Florida State University, Tallahassee,

Florida, EEUU) (236), con un plásmido portador de ADNc codificante para PTH1R humano fusionado con el gen reportero *green fluorescent protein* -GFP- (^{GFP}PTH1R), generosamente suministrado por el Dr. P. Friedman (Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, PA, EEUU) (110,237). Las células se sembraron como se indica en el apartado 4.1.2 y, al día siguiente, se transfectaron durante toda la noche a 37° C con 1 µg de los plásmidos ^{m-Cherry}caveolin-C-10 o ^{GFP}PTH1R, empleando Lipofectamina 3000® (Life Technologies) diluida en Optimem® como agente de transfección, siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurridas 24 horas, se llevaron a cabo diversas técnicas de microscopía confocal para el estudio de la señalización, la localización y la movilidad intracelular de PTH1R.

4.2.4. Ensayos de viabilidad y proliferación celular

Tras la estimulación con el agonista PTHrP (1-37) durante 1 hora, las células MLO-Y4 y MC3T3-E1 se mantuvieron en medio sin SFB durante 24 o 48 horas. Transcurridos estos periodos de ausencia de suero, se recogieron en un mismo tubo tanto las células no adheridas como las adheridas para cada pocillo (tras su tripsinización con tripsina 0,25% y EDTA 1mM) y se resuspendieron en medio de cultivo para su posterior tinción con azul tripano al 0,04% en PBS (1:1, v:v). A continuación, se contó con ayuda de un hemocitómetro el número de células vivas y muertas -las primeras excluyen el azul tripano, mientras que las segundas lo captan- (238), calculándose de este modo el porcentaje de células muertas sobre el total de cada pocillo.

Adicionalmente, las células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 fueron estimuladas con PTHrP (1-37) en presencia de SFB durante 24 o 48 horas con el objetivo de llevar a cabo un ensayo de proliferación celular. Para ello, se recogieron en un mismo tubo las células y las no adheridas (de nuevo, mediante tripsinización) y se resuspendieron en medio de cultivo con SFB. Posteriormente, se contó con un hemocitómetro el número total de células en cada pocillo tras 24 y 48 horas de estimulación con PTHrP (1-37) para determinar la proliferación celular.

4.2.5. Inmunofluorescencia

Las células se fijaron empleando p-formaldehído al 4% en tampón fosfato salino, pH:7.4 (para los anticuerpos anti-tubulina α acetilada, anti-PTH1R y anti-CAV1), o con metanol a -20 °C (para los anticuerpos anti-Arl13b y anti-tubulina γ) y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS, a pH 7,4 durante 10 minutos. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas, las células se incubaron durante 1 hora en albúmina de suero bovino (ASB) suplementada con un 5% de suero de cabra. A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos monoclonales producidos en ratón anti-tubulina α acetilada, anti-tubulina γ o anti-CAV1 (Sigma Aldrich) diluidos 1:1000 en solución de bloqueo, o bien con los anticuerpos policlonales producidos en conejo anti-PTH1R (1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-PTH1R (extracelular) (1:200, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) y anti-ARL13b (1:500, Proteintech, Rosemont, IL). Se realizaron varios lavados con PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugado con Alexa fluor 488, anti-IgG de ratón conjugada con Alexa fluor 546 o anti-IgG de conejo conjugado con Alexa fluor 568 (Invitrogen), durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo tras varios lavados, se llevó a cabo el marcaje nuclear con 4', 6 - diamidino- 2 - fenolindol (DAPI; 1:10000, Sigma Aldrich). Se empleó el reactivo FluorSafe (Calbiochem, La Jolla, CA) como medio de montaje, y las muestras se examinaron empleando el modelo de microscopio Leica DM 5500B, evaluándose tanto el porcentaje de células que presentaban cilio primario, así como la longitud de este, empleando el software ImageJ. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados y las condiciones de incubación se muestran en la Tabla III.

4.2.6. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Se llevó a cabo la extracción del ARN total mediante un método estándar con Trizol® (Ambion, Foster City, CA) a 4° C. A continuación, se cuantificó la cantidad de ARN obtenido con un sistema NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), y se llevó a cabo la retrotranscripción (a partir de 1-2 μ g de ARN) para la obtención del ADN complementario (ADNc) empleando el ensayo *high capacity cDNA*

reverse transcription (Applied Biosystems, Grand Island, NY), en un termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C. Para la realización de PCR en tiempo real se empleó un sistema 7900HT Fast Real – Time PCT System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EEUU), usando una mezcla de reacción Sybr premix ex Taq (Takara, Otsu, Japón) y cebadores específicos no marcados para los genes de ratón *Opg*, *Rankl*, *Osteocalcina*, *Runx2*, *Fa*, *Osterix*, *Ihh* y *Cav1*, empleando como gen constitutivo β -*actina* (Tabla II). La evaluación de *Osterix*, *Runx2* y *Fa* sólo se realizó en las células MC3T3-E1, dado que estos factores han sido definidos principalmente como marcadores de osteoblastos (239). De forma alternativa, se emplearon sondas *Taqman MGB* para la detección de *Iff88* (Mm01313467; Thermo Fisher Scientific) y el gen constitutivo o *housekeeping 18S* (4318839; Assay – by – Design; Applied Biosystems). El protocolo realizado cuando se emplearon cebadores consistió en una reacción inicial de 10 minutos a 95° C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C y 15 segundos a 72 °C; finalmente, la temperatura aumentaba a 95 °C, bajaba a 65 °C durante 15 segundos, y volvía a subir a 95° C, para la obtención de la curva de disociación. Cuando se emplearon sondas Taqman, el protocolo constaba de una incubación inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

La eficacia de la amplificación de estos genes fue del 100 %. Los cambios en la expresión génica se representaron como niveles de expresión del gen relativizado respecto a su control correspondiente (según las condiciones experimentales), expresado como unidades arbitrarias (u.a.). Para ello, se empleó el algoritmo comparativo de umbral de ciclo delta – delta ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), donde Ct representa el ciclo umbral de PCR en el que el programa detecta por primera vez un incremento de la fluorescencia respecto a la señal basal; y $\Delta Ct = Ct$ del gen de interés – Ct del gen control endógeno (β -*actina* o *18S*, según los casos). Las secuencias de los cebadores empleados se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Primers utilizados en los estudios mediante PCR.

| Gen | Sentido (5' -3') | Antisentido (5' -3') |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Ihh</i> | CCCCAACTACAATCCCGACATC | CGCCAGCAGTCCATACTTATTTTCG |
| <i>Opg</i> | CAGAGCGAAACACAGTTTG | CACACAGGGTGACATCTATTC |
| <i>Rankl</i> | TGTACTTTTCGAGCGCAGATG | AGGCTTGTTTCATCCTCCTG |
| <i>Runx2</i> | CCTGAACTCTGCACCAAGTCCT | TCATCTGGCTCAGATAGGAGGG |
| <i>Osteocalcina</i> | GCAATAAGGTAGTGAACAGACTCC | CCATAGATGCGTTTGTAGGCGG |
| <i>Fa</i> | CCAGAAAGACACCTTGACTGTGG | TCTTGTCCGTGTCGCTCACCAT |
| <i>Osterix</i> | CTGCCTGACTCCTTGGGACC | GCCATAGTGAGCTTCTTCCTCAA |

4.2.7. Extracción de proteínas y análisis de Inmunoblot

Se extrajo la fracción proteica total empleando el buffer RIPA (Sigma Aldrich), suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail Set I*; Calbiochem) y fosfatasas (*Phosphatase inhibitor cocktail Set II*; Calbiochem) cuando fuese necesario. Las células se mantuvieron en este buffer durante 30 minutos a 4 °C, y posteriormente se centrifugaron a 12.000 g y 4 °C durante 20 minutos para la recogida de los sobrenadantes. En ellos, se determinó el contenido total de proteína mediante un ensayo estándar del ácido bicinconínico *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), empleando albúmina de suero bovino (ABS) como estándar. Después, se prepararon extractos proteicos (de entre 25 y 30 µg) que fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10-12,5 % en presencia de SDS y en condiciones reductoras. A continuación, los geles fueron transferidos a membranas de

nitrocelulosa (Bio – Rad, Hercules, CA) mediante un sistema húmedo, a 100 V y 4 °C durante 1 hora. Estas membranas fueron bloqueadas empleando leche desnatada al 5% en tampón Tris Salino (BTS; Tris base 0,2 M; NaCl 1,5 M) con un 0,1% de Tween20 (Sigma Aldrich) en PBS a pH 7,4, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpos policlonales de conejo anti-GLI1 y anti-PTCH1 (1:1000, Elabscience, Wuhan, PRC), anti-IFT88 (1:1000, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EEUU), anti-PTH1R (1:1000, Invitrogen) anti-fosfo-P42/44 (P-Erk 1/2), anti-P42/44 (ERK1/2) (1:1000, Cell Signaling Technologies; Danvers, MA), o con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CAV1 (1:1000, Sigma Aldrich) y anti-SMO (1:500, Santa Cruz Biotechnology). Como controles de carga, se emplearon los anticuerpos de ratón anti-tubulina α (1:10000, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y gliceraldehido 3 – fosfato deshidrogenasa (GAPDH; 1:5000, Merck Millipore). Al día siguiente, se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgGs de ratón o conejo conjugados con peroxidasa (Abcam), durante una hora a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (Bio – Rad), y la intensidad de las bandas obtenidas fue cuantificada empleando dos programas informáticos diferentes: QuantityOne™ e ImageLab™ (Bio - Rad). Los anticuerpos primarios y secundarios empleados y las condiciones de incubación se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Relación de anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia (IF) e inmunoblot (IB).

| Antígeno | Anticuerpo primario | Incubación | Anticuerpo secundario | Incubación |
|--|--|------------|--|------------|
| Tubulina α (IB) | Monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, Reino Unido) [1:10000] | | IgG de cabra anti-conejo Peroxidasa/HRP (Elabscience) (IB) | |
| (GAPDH) (IB) | Monoclonal de ratón (Merck Millipore, Burlington, MA, EEUU) [1:5000] | | IgG de conejo anti-ratón (HRP) (Abcam) (IB) | |

| | | | | |
|--|--|--------------|---|------------|
| Phospho P-42/44 MAPK (P-ERK 1/2) (IB) | Policlonal de conejo (Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU) [1:1000] | T/N, 4 °C | IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abcam) (IB) | 1h, T/A |
| P42/44 MAPK (ERK1/2) (IB) | Policlonal de conejo (Cell Signaling) [1:1000] | | IgG de cabra anti-ratón AlexaFluor488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (IF) | |
| CAV1 (IB/IF) | Monoclonal de ratón (Sigma Aldrich, St Louis, MO) [1:1000] | | IgG de cabra anti-ratón AlexaFluor 546 (Invitrogen) (IF) | |
| GLI1 (IB) | Policlonal de conejo (Elabscience, Wuhan, RPC) [1:1000] | | | |
| PTCH1 (IB) | Policlonal de conejo (Elabscience) [1:1000] | | | |
| SMO (E-5) (IB) | Monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tx) [1:500] | | | |
| Tubulina γ (IF) | Monoclonal de ratón (Sigma Aldrich) | | | |
| ARL13b (IF) | Policlonal de conejo (Proteintech, Rosemont, IL) [1:500] | | | |
| Tubulina α acetilada (IF) | Monoclonal de ratón [1:1000] (Sigma Aldrich) | | IgG de cabra anti-conejo AlexaFluor 568 (Invitrogen) (IF) | |
| PTH1R (ext) (IF) | Policlonal de conejo (Alomone Labs, Jerusalén, Israel) [1:100] | | | |
| PTH1R (IB) | Policlonal de conejo (Invitrogen, Carlsbad, CA) [1:1000] | | | |
| IFT88 (IB) | Policlonal de conejo (Merck Millipore) [1:1000] | | | |

| | | | | |
|------------------------|--|--|--|--|
| β-catenina (IB) | Policlonal de ratón (Abcam) [1:1000] | | | |
|------------------------|--|--|--|--|

T/N: toda la noche; T/A: temperatura ambiente; HRP: peroxidasa.

4.2.8. Estudios de microscopía confocal en células vivas. Estudios de movilidad e internalización de PTH1R

Las células MC3T3-E1 fueron cultivadas en placas *ibidi*® (Ibidi GmbH). 24 horas después de la siembra, eran transfectadas con 1 µg de los plásmidos mCherryCaveolin-C10 y GFPPTH1R e incubadas a 37 °C durante toda la noche. Después, se reemplazaba el medio de crecimiento habitual con el agente de transfección, por medio de cultivo sin SFB y sin rojo de fenol para su posterior observación mediante microscopía confocal. Las células fueron entonces estimuladas con PTHrP (1-37) 100 nM durante 30 minutos en los que se tomaron imágenes con el equipo Leica DMI8 (Leica) a intervalos de 10 segundos, con el objetivo de determinar la localización subcelular de PTH1R, así como su capacidad de movilización e internalización tras la estimulación con su ligando agonista, mediante el análisis de la fluorescencia GFPPTH1R en regiones de interés seleccionadas en la membrana plasmática a lo largo del tiempo.

4.2.9. Medida de calcio intracelular

Para medir las fluctuaciones en los niveles de Ca_i^{2+} en las células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, se empleó el indicador de calcio Fluo 4-AM, una molécula que presenta un aumento de la fluorescencia al unirse a Ca^{2+} , mientras que presenta escasa fluorescencia en el caso de no estar unida a él. Las células MC3T3-E1 se sembraron en placas tipo *ibidi*® con una densidad de 5.000 células/cm². Transcurridas 24 horas, se transfectaron de manera transitoria con siARN dirigido contra una secuencia de *Cav1*, y fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, dependiendo de las condiciones experimentales, fueron transfectadas con el plásmido GFPPTH1R, o co-transfectadas mediante la incubación simultánea con los plásmidos GFPPTH1R y mCherryCaveolina-C-10. 24 horas después, se realizaron varios lavados con medio

α -MEM sin rojo de fenol, y se incubaron con Fluo 4-AM 2 μ M en el mismo medio utilizado para los lavados, a temperatura ambiente durante media hora en oscuridad. La molécula indicadora de Ca^{2+} puede añadirse directamente disuelta en el medio a las placas de cultivo ya que posee una modificación con residuos de acetoximetil éster hidrofóbicos que permiten a la molécula Fluo 4-AM atravesar la membrana citoplasmática y que una vez en el interior celular son eliminados por esterasas inespecíficas (237,240). Transcurridos los 30 minutos, las células se lavaron de nuevo y se repitió la incubación anterior en oscuridad. A continuación, se procedió a la observación con el microscopio confocal Leica DMI8: se capturaron imágenes tras la estimulación con el ligando PTHrP (1-37) 100 nM, a intervalos de 1 segundo durante 10 minutos. Para cada condición experimental, se cuantificaron las fluctuaciones de Ca_i^{2+} en al menos 18 células.

4.2.10. Recuperación de Fluorescencia tras fotoblanqueamiento (*Fluorescence Recovery After Photobleaching-FRAP*)

Las MC3T3-E1 se sembraron en placas ibidi® de 35mm con una densidad de 5.000 células/cm², y se transfectaron posteriormente siguiendo un protocolo experimental igual al descrito en el apartado 3.2.8. El fotoblanqueamiento dirigido de áreas fluorescentes se realizó empleando un microscopio confocal DMI8, y se realizó en regiones de interés circulares de 2 μ m de diámetro localizadas en la membrana plasmática y adyacentes a la superficie de la placa de cultivo. El blanqueamiento se realizó mediante 5 repeticiones de 863 milisegundos con un láser de una longitud de onda de 488 nm. Para evitar una foto-oxidación excesiva, se calibró previamente la potencia del láser y la duración del blanqueo para eliminar en torno al 80-90% de la fluorescencia verde, y se tomaron imágenes tanto antes del blanqueo (a intervalos de 1 segundo durante un tiempo total de 10 segundos) como después del blanqueo, a intervalos de 2 segundos durante 2,5 minutos.

Las curvas de recuperación de fluorescencia se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = (I_{\text{blanqueo}} - I_{\text{back}} / I_{\text{Ref}} - I_{\text{back}}) * 100$$

Donde I_{blanqueo} es la intensidad de fluorescencia de cada uno de los puntos que sufrieron fotoblanqueo, I_{back} es la intensidad de fluorescencia del fondo (background), I_{Ref} es la intensidad de fluorescencia en regiones control localizadas en una zona celular lejana a la que sufrió el fotoblanqueamiento. También se calculó la fracción móvil (en porcentaje) del receptor PTH1R mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fracción móvil} = (I_{\text{postBM}} - I_{\text{ITB}} / I_{\text{ITB}} - I_{\text{preBM}}) * 100$$

Donde I_{postBM} es la intensidad de fluorescencia media en la meseta de la curva obtenida tras el fotoblanqueamiento, I_{ITB} es la intensidad de fluorescencia obtenida inmediatamente tras el blanqueo, e I_{preBM} es la intensidad de fluorescencia media en la meseta observada antes del fotoblanqueamiento.

El fundamento del ensayo FRAP se describe en la Figura 8.

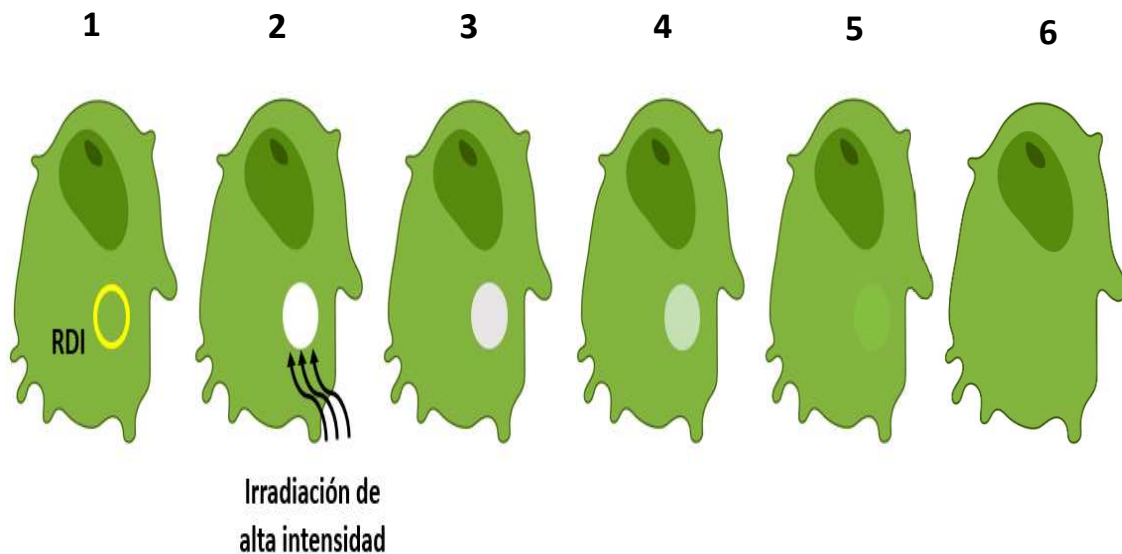


Figura 8. Representación esquemática de la técnica de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueamiento (FRAP). 1) se selecciona una región de interés (RDI) de 2 μm de diámetro en una célula transfectada con fluorescencia GFP. 2) se fotoblanquean las moléculas GFP dentro de la RDI mediante pulsos de alta intensidad con un láser de longitud de onda 488 nm. 3-6) proteínas conjugadas con GFP se movilizan a la RDI desde zonas adyacentes, causando una recuperación de la señal fluorescente. **Figura realizada con el software BioRender.**

4.2.11. Análisis estadístico

Los resultados de esta Tesis están expresados como las medias \pm desviaciones estándar (DE), o como las medias \pm errores estándar de la media (EEM), según se indique. En primer lugar, los datos obtenidos experimentalmente fueron sometidos a una prueba de normalidad y homocedasticidad. Dado que no podía asumirse la distribución normal de los datos, el análisis se llevó a cabo mediante un ANOVA no paramétrico de la varianza (Kruskal-Wallis). Las pruebas post-hoc realizadas para la comparación de los diferentes grupos dos a dos fueron el test de Dunn y el de Mann-Whitney, considerándose significativo un p valor $< 0,05$. Los análisis y las representaciones gráficas se llevaron a cabo con el programa informático Graphpad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU).

5. Resultados

5.1. Localización del receptor PTH1R en el cilio primario de células osteocíticas MLO-Y4 y células osteoblásticas MC3T3-E1

El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral fue determinar la posible co-localización espacio-temporal entre el receptor de tipo I de la PTH y el cilio primario en osteocitos y osteoblastos. El transporte de PTH1R al cilio primario había sido descrito previamente en células del núcleo pulposo en respuesta a estrés mecánico (118), pero hasta el momento no había sido caracterizado en células del hueso. Para ello, se sembraron las células MLO-Y4 y MC3T3-E1 tal y como se indica en los apartados 4.1.1 y 4.1.2, respectivamente. Una vez los cultivos se encontraron casi totalmente confluentes, se reemplazó el medio de crecimiento habitual por medio sin suero con el objetivo de inducir la entrada de los cultivos en fase G0, dado que el cilio primario emerge durante la fase quiescente del ciclo celular (241). Posteriormente, las células se estimularon o no con PTHrP (1-37) 100 nM. El estudio de la posible co-localización se llevó a cabo mediante la realización de inmunofluorescencia en la que se utilizó un anticuerpo específico para el marcaje de PTH1R, mientras que para el marcaje del cilio primario se empleó un anticuerpo anti-tubulina α acetilada, ya que la acetilación de esta proteína es esencial para el ensamblaje y elongación del cilio primario (242).

Así, observamos mediante microscopía epifluorescente que PTH1R y el cilio primario co-localizaban en células osteocíticas MLO-Y4 y en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, tanto en condiciones control no estimuladas (Fig. 9A y 9C, respectivamente), como tras la estimulación durante 30 minutos con el ligando PTHrP (1-37) (Fig. 9B y 9D). Además, mediante el uso de microscopía confocal corroboramos estas observaciones en células osteocíticas MLO-Y4 (Fig. 10A).

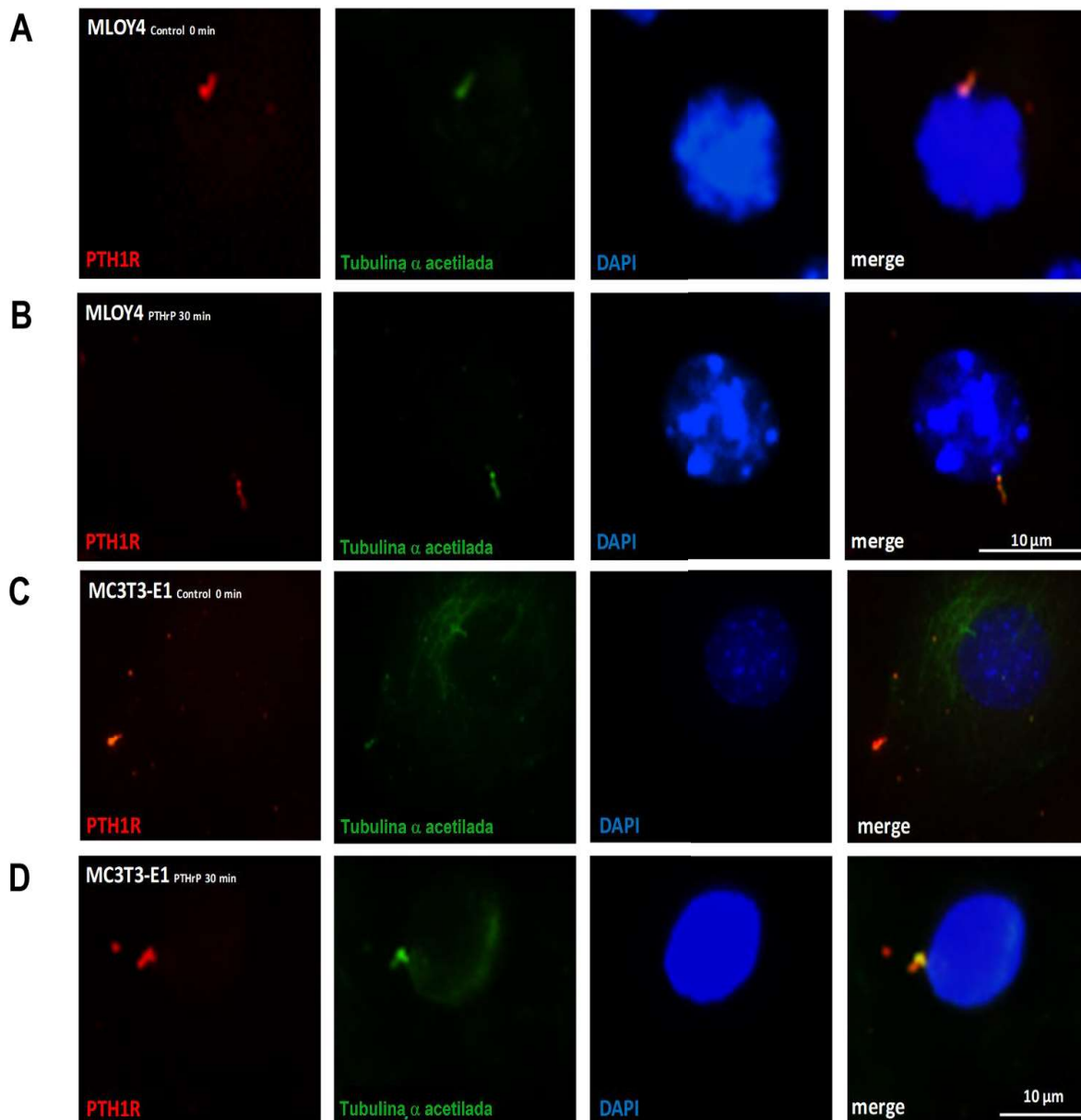


Figura 9. PTH1R se sitúa en el cilio primario en células osteoclásticas MLO-Y4 y en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. (A-D) Se estimularon las células con PTHrP (1-37; 100 nM) o con un vehículo apropiado (control) durante 30 minutos. El marcaje doble mediante inmunofluorescencia se realizó con un anticuerpo primario de ratón anti-tubulina α acetilada para el marcaje del cilio primario y un anticuerpo primario de conejo anti-PTH1R para el receptor de PTH. Se emplearon los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor 488 y anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 568 como secundarios para el cilio primario y PTH1R, respectivamente. Para el marcaje nuclear en azul, se utilizó 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las imágenes superpuestas en verde, rojo y azul (merge) permiten observar la localización de PTH1R en el cilio primario. Las imágenes representan el resultado de tres observaciones independientes. IgG: Inmunoglobulina G; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH.

Para comprobar que el marcaje de tubulina α acetilada era específico del cilio primario, se llevaron a cabo co-inmunofluorescencias con anticuerpos anti-tubulina α acetilada y anti-ARL13b, una GTPasa reguladora que controla la señalización Shh en el cilio primario (243) (Fig.10C y 11A). ARL13b ha sido caracterizado y empleado previamente como un marcador ciliar (244). La especificidad de los anticuerpos empleados se valoró también mediante la inclusión de controles negativos, para los anticuerpos anti-PTH1R (Fig.10B), anti- ARL13b (Fig. 10D y 11B) y anti-tubulina α acetilada (Fig.10E y 11C). De manera similar, la especificidad en el marcaje ciliar de Arl13b se comprobó en células MLO-Y4 y MC3T3-E1 mediante co-inmunofluorescencia con tubulina γ , un marcador del cuerpo basal del cilio primario (245) (Fig.10F y 11D, respectivamente).

Estas inmunofluorescencias también permitieron observar que, en ausencia del cilio primario, el receptor PTH1R se distribuye a lo largo de la membrana plasmática y, en menor medida, el citoplasma (Fig. 11E).

Dado que la capacidad de señalización del cilio primario depende del tráfico de proteínas dentro y fuera del cilio a través de las proteínas IFT y las proteínas motoras quinesinas/dineínas (137), la localización de PTH1R en el cilio primario sugiere que este podría participar como un transductor de la señalización en los microdominios ciliares. Esta observación refuerza la idea propuesta del cilio primario como un nexo de señalización que transduce al interior de la célula diversos estímulos extracelulares (246), pudiendo modular así el comportamiento de las células óseas.

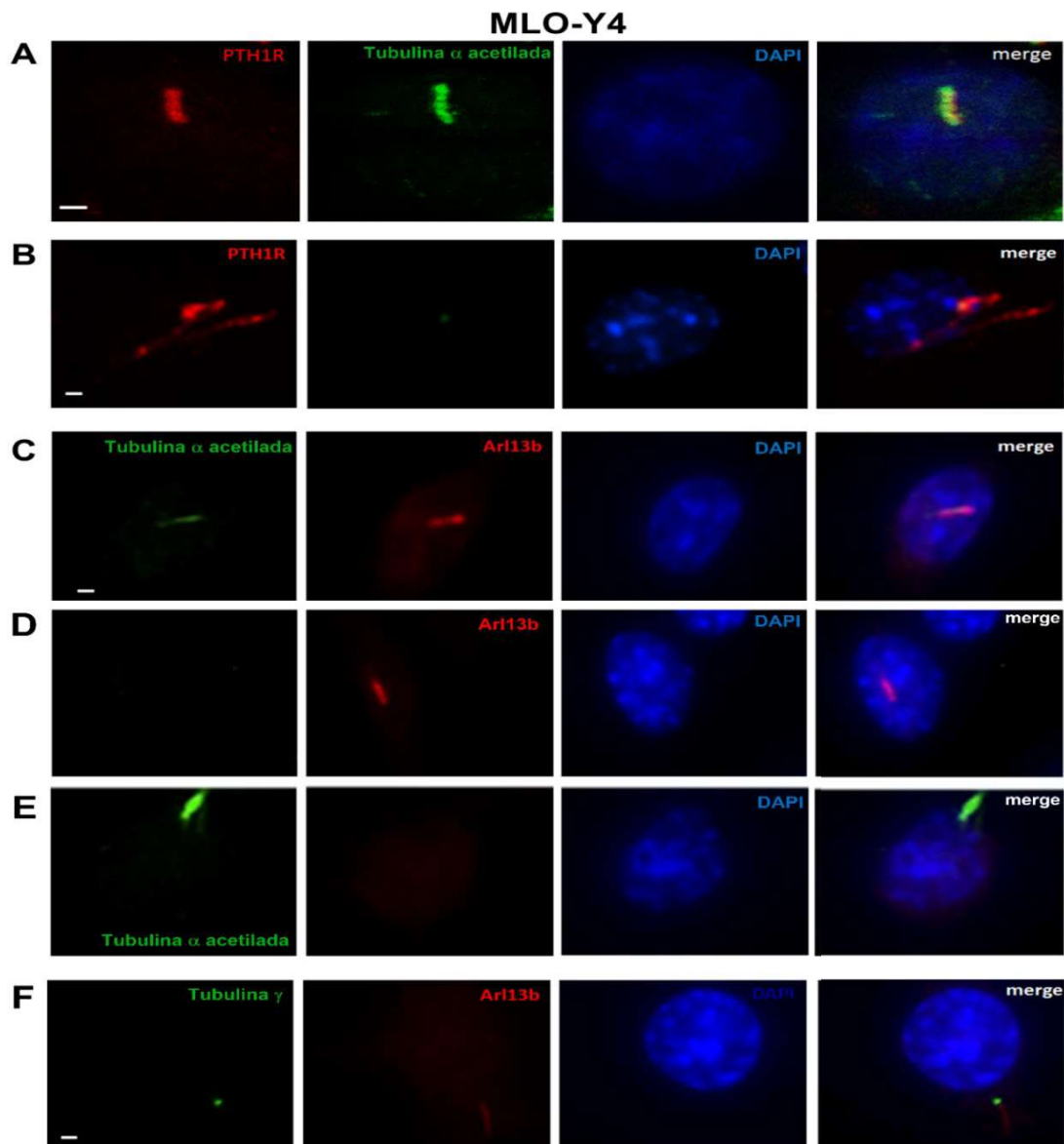


Figura 10. El marcaje de tubulina α acetilada es específico en el cilio primario en células osteocíticas MLO-Y4. (A) Imágenes de microscopía confocal de la localización de PTH1R en el cilio primario, en células osteocíticas MLO-Y4. El marcaje doble mediante inmunofluorescencia se realizó de la forma descrita en la Figura 5. (B) Control negativo para el anticuerpo anti-PTH1R. (C) Tinción doble inmunofluorescente del cilio primario en células MLO-Y4, realizado con los anticuerpos primarios anti-tubulina α acetilada y el anticuerpo de conejo anti-ARL13b. Se emplearon los anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor 488 y anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 568, respectivamente. (D) Control negativo para el anticuerpo anti-ARL13b. (E) Control negativo para el anticuerpo anti-tubulina α acetilada. (F) Marcaje doble del cilio primario mediante inmunofluorescencia en células MLO-Y4, con el anticuerpo primario de ratón anti-tubulina γ (marcador del cuerpo basal) y anti-ARL13b, empleándose como anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor 488 y anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 568, respectivamente. En todos los casos, el marcaje nuclear azul se llevó a cabo con DAPI. Las imágenes superpuestas en verde, rojo y azul (merge) muestran la localización de PTH1R en el cilio primario. Las imágenes representan el resultado de tres observaciones independientes. IgG: Inmunoglobulina G; PTH: hormona paratiroidea; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; DAPI: 4', 6 - diamino - 2 - fenilindol.

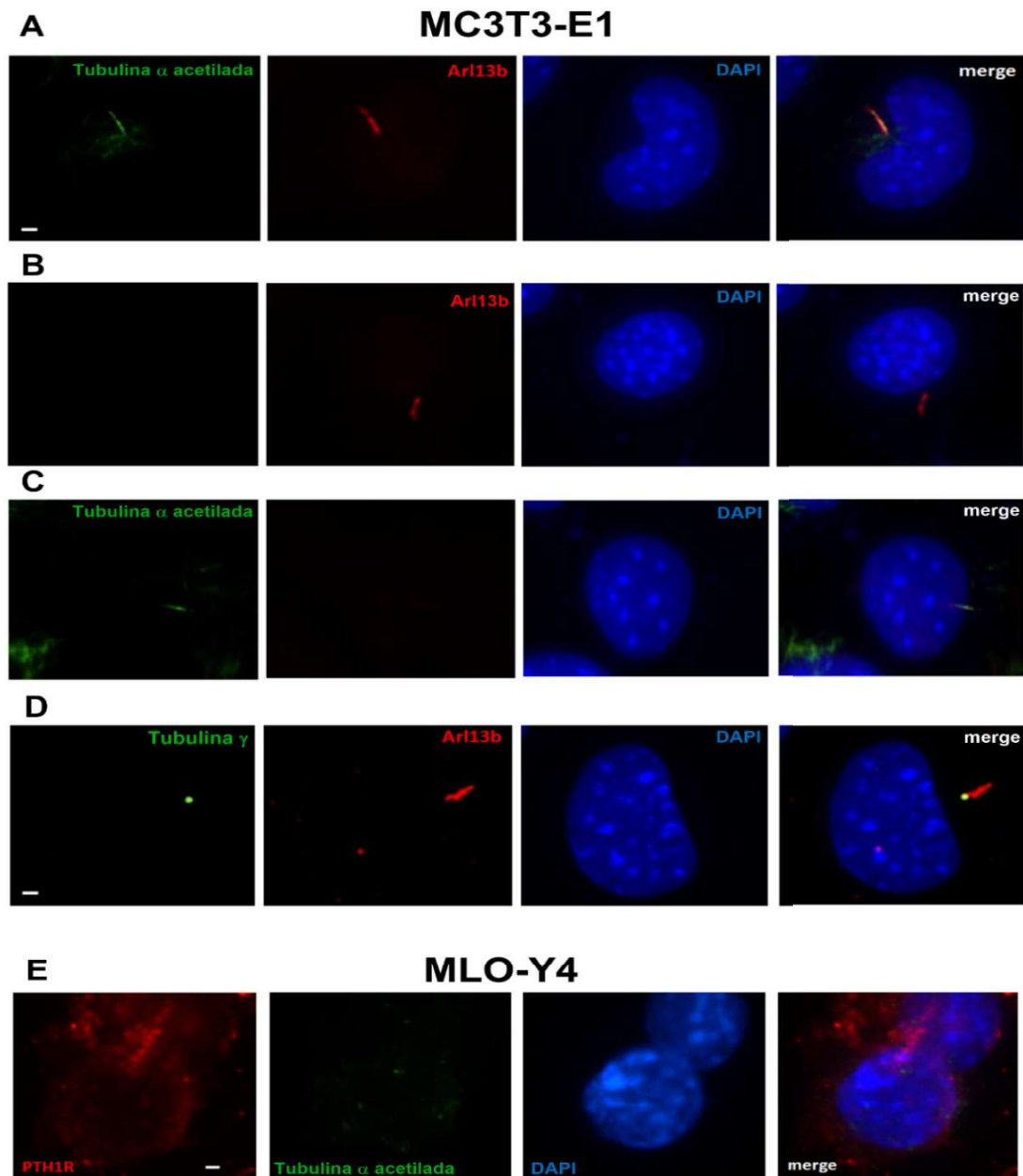


Figura 11. El marcaje de tubulina α acetilada es específico en el cilio primario de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. (A) Marcaje doble del cilio primario mediante inmunofluorescencia en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, con los anticuerpos primarios anti-tubulina α acetilada y anti-ARL13b. Se incluyen controles negativos para los anticuerpos utilizados. (B) Control negativo del anticuerpo anti-ARL13b. (C) Control negativo del anticuerpo anti-tubulina α acetilada. (D) Marcaje doble del cilio primario mediante inmunofluorescencia, con los anticuerpos primarios anti-tubulina γ y anti-ARL13b. La relación de anticuerpos secundarios para cada una de las inmunofluorescencias es igual a la descrita en la Figura 6. En todos los casos, el marcaje nuclear azul se llevó a cabo con DAPI. Las imágenes superpuestas en verde, rojo y azul (merge) indican la especificidad de los distintos anticuerpos empleados para el marcaje del cilio primario. (E) Localización de PTH1R en ausencia de cilio primario en células osteocíticas MLO-Y4. Las imágenes representan el resultado de tres observaciones independientes. PTH: hormona paratiroidea; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH.

5.2. Papel del cilio primario en la modulación de la inducción de genes formadores de hueso mediada por PTHrP. Efectos sobre genes relacionados con los osteoblastos y los osteoclastos en células MLO-Y4 y MC3T3-E1

Para valorar si la localización de PTH1R en el cilio primario implica una interacción entre ambos que afecta a la regulación de diversos genes osteogénicos, se inhibió la formación del cilio primario en células osteocíticas y osteoblásticas de manera previa a la estimulación con el ligando PTHrP. Se emplearon para ello dos estrategias distintas: el silenciamiento del gen que codifica IFT88 -una proteína clave para la ciliogénesis y la competencia funcional del cilio primario (247)- o mediante la pre-incubación con el inhibidor de la formación del cilio hidrato de cloral -HC- (248). En primer lugar, observamos que tanto el silenciamiento de *Ift88* como la incubación con HC redujeron de manera significativa el porcentaje de células MLO-Y4 y MC3T3-E1 que presentaban cilio primario (Fig.12 A-B). El HC además redujo la longitud del cilio primario en ambas líneas celulares (Fig.12 C-D). Estos resultados nos permitieron validar ambas pautas de inhibición del cilio por lo que en esta Tesis Doctoral se utilizaron indistintamente, según el tipo de experimento.

La estimulación con PTHrP (1-37) durante 30 minutos no ejercía ningún efecto sobre el porcentaje de células que presentaban cilio primario (Fig.12 A-B), así como tampoco afectaba significativamente a la longitud de este en ambas líneas celulares (Fig.12 C-D).

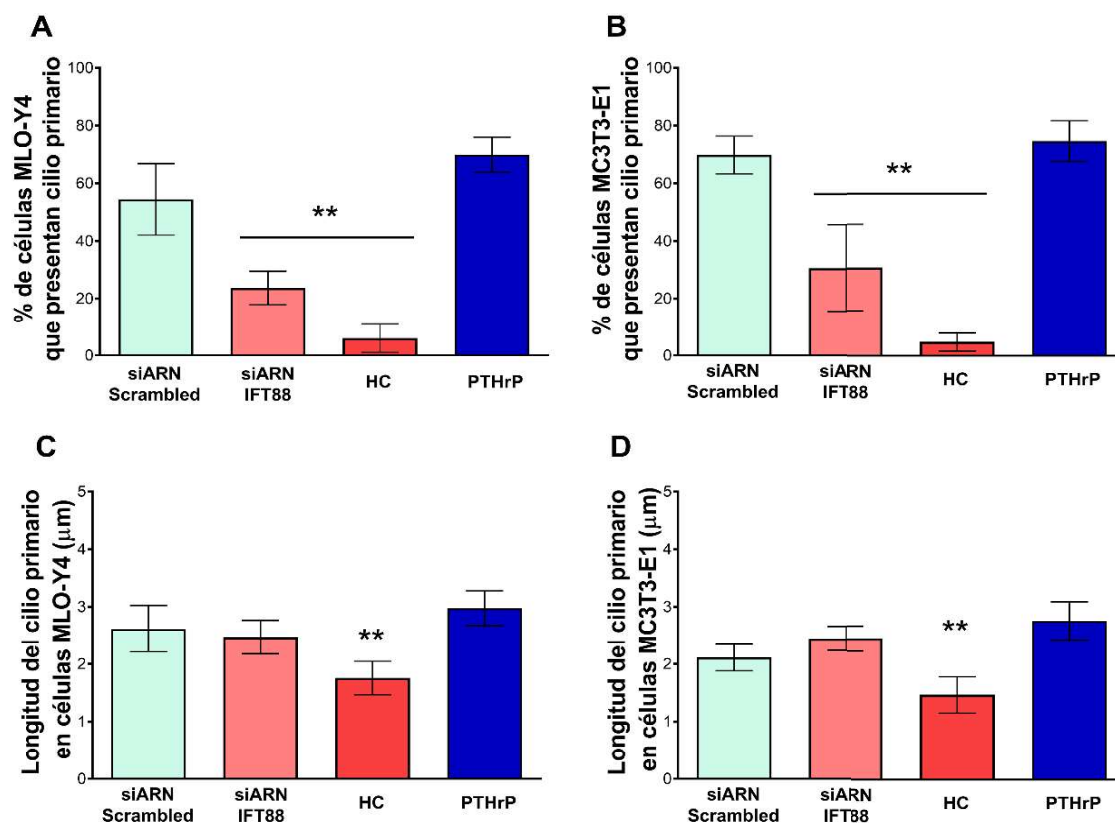


Figura 12. Los métodos empleados para la inhibición del cilio primario reducen el porcentaje de células ciliadas. En células osteocíticas MLO-Y4 y en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, se evaluó el porcentaje de células que presentaban cilio primario (**A y B**), así como la longitud de este (**C y D**) mediante el software ImageJ. (**A-D**) Las células fueron silenciadas con tres siARNs dirigidos contra *Ift88*, con siARN Scrambled, pre-incubadas con HC 40 μM o estimuladas con PTHrP (1-37) 100 nM durante 24 horas, tal y como se indica en el apartado 4. Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes. PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; DE: desviación estándar; siARN: ARN pequeño de interferencia.

También confirmamos la eficacia del silenciamiento de *Ift88*. Observamos la disminución de aproximadamente un 60% de la expresión génica de este marcador, así como la reducción en torno al 50% de su expresión proteica, en comparación con las células transfectadas con silenciadores para secuencia “Scrambled” (secuencia no complementaria a ningún gen de la célula, utilizado para descartar posibles efectos derivados del protocolo de transfección no específicos del siARN utilizado en cada caso), tanto en osteocitos MLO-Y4 (Fig. 13 A-B) como en osteoblastos MC3T3-E1 (Fig.14 A-B).

A continuación, analizamos el papel del cilio primario en la modulación de genes implicados en la formación y remodelado óseo inducidos por PTHrP. Se

analizaron mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión de ARNm de los siguientes genes: *Rankl*, un factor inductor de la diferenciación y activación de los osteoclastos (249); su receptor soluble señuelo *Opg*, que actúa bloqueando los efectos de RANKL; *Osteocalcina*, marcador producido durante el proceso de mineralización ósea tardía y encargada del control de la masa, el tamaño y la orientación ósea de forma directa, a través de la regulación de la deposición y organización de la matriz mineralizada o indirecta, mediante la modulación de las acciones de los osteoblastos (250,251); *Runx2*, un factor de transcripción esencial para la diferenciación de los osteoblastos, ya que dirige a las células mesenquimales multipotentes para su diferenciación al linaje osteoblástico, modula la progresión de los pre-osteoblastos a osteoblastos inmaduros e inhibe la posterior maduración y transición de los osteoblastos a osteocitos (16,252), además de ser un inductor de la mineralización ósea (253); *Fosfatasa alcalina (Fa)*, un marcador de formación de hueso y remodelado óseo (254) que actúa incrementando las tasas locales de fosfato inorgánico en hueso, lo que facilita la mineralización (72) y *Osterix*, un factor de transcripción importante en la diferenciación de los osteoblastos y la mineralización ósea (255).

En las células MLO-Y4, la estimulación con el ligando agonista PTHrP (1-37) incrementó los niveles de expresión de ARNm de *Opg* y produjo un aumento en la relación *Opg/Rankl* sin afectar a la expresión de *Rankl* (Fig. 13C-E); también se observó que la estimulación con el ligando PTHrP inducía un incremento en los niveles de expresión de *Osteocalcina* (Fig.13 F).

En las células MC3T3-E1, la estimulación con PTHrP aumentó también los niveles de expresión de *Osteocalcina* y *Opg*, así como la relación *Opg/Rankl* sin afectar a los niveles de expresión de *Rankl* (Fig.14C-F), de manera similar a lo observado en MLO-Y4. Además, en los osteoblastos, PTHrP incrementó los niveles de expresión de los genes osteogénicos *Runx2* y *Fa* (Fig. 14 G-H), mientras que la expresión de *Osterix* no se elevó de forma significativa tras la estimulación con el péptido (Fig. 14I). En ambas líneas celulares, la inhibición del cilio primario mediante el silenciamiento de *Iff88* no afectó a los niveles de *Opg*, pero sí indujo una sobreexpresión de *Rankl* en condiciones control no estimuladas con el péptido (Fig. 13C-D y 14C-D), lo que causó un descenso en

la relación *Opg/Rankl* que se mantenía incluso tras la estimulación con PTHrP (Fig. 13E y 14E). Adicionalmente, el silenciamiento de *Iff88* inhibió el incremento de expresión de *Osteocalcina* dependiente de PTHrP en osteocitos y osteoblastos (Fig. 13F y 14F), así como la sobreexpresión de *Runx2* y *Fa* ósea observada en osteoblastos (Fig. 14G-H).

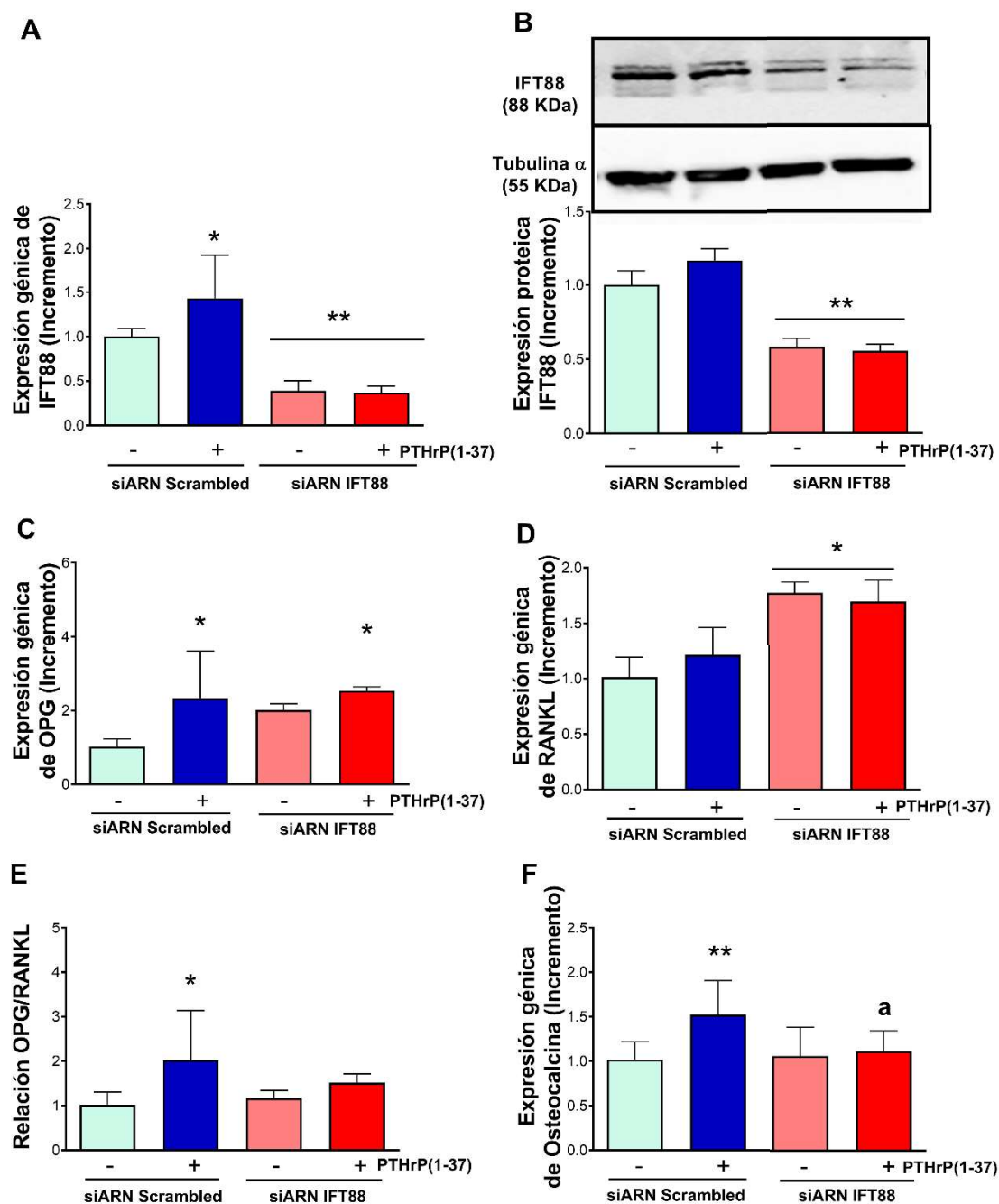


Figura 13. El cilio primario media los efectos de PTHrP sobre la expresión de genes osteogénicos en células osteocíticas MLO-Y4. Las células MLO-Y4 fueron transfectadas con una mezcla de tres siARNs dirigidos contra secuencias específicas del gen *Ift88*, o con siARN Scrambled durante 24 horas. Después, fueron sometidas a 24 horas de privación de suero, seguidas de estimulación con PTHrP (1-37) 100 nM durante 6 (**A**, **B** y **F**) o 24 horas (**C-E**). La eficiencia del silenciamiento de IFT88 fue comprobada mediante qPCR (**A**) e inmunoblot (**B**). Los niveles de expresión de ARNm de *Opg* (**C**), *Rankl* (**D**) y *Osteocalcina* (**F**), así como la relación *Opg*/*Rankl* (**E**), fueron analizados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. * $p < .05$ versus (-) siARN Scrambled control; ** $p < .01$ versus (-) siARN Scrambled control; ^a $p < .05$ versus siARN Scrambled + PTHrP (1-37). ARNm: ARN mensajero; OPG: osteoprotegerina; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear -kappa B; DE: desviación estándar; siARN: ARN pequeño de interferencia.

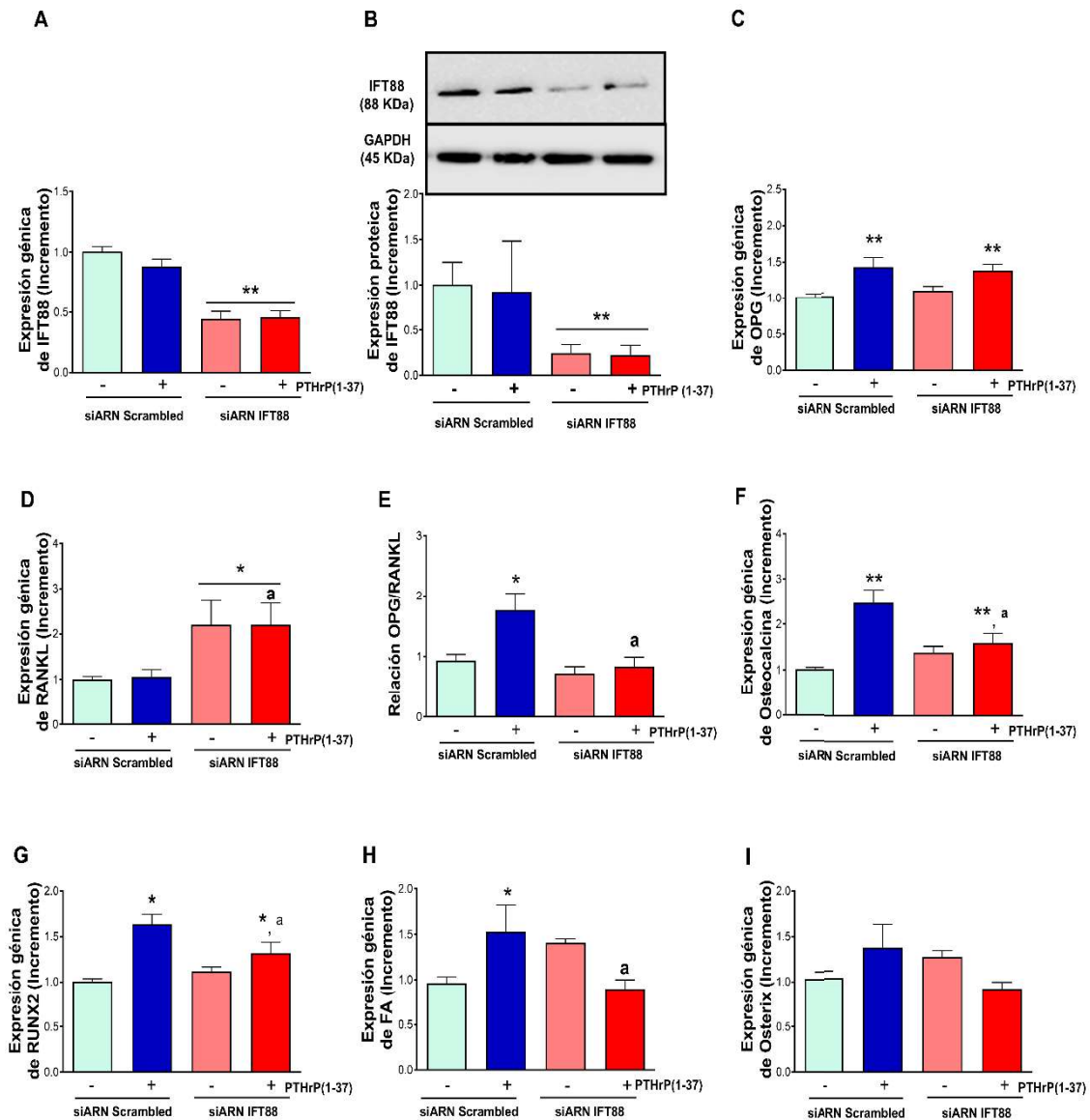


Figura 14. El cilio primario media los efectos de PTHrP sobre la expresión de genes osteogénicos en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. Las células MC3T3-E1 fueron transfectadas con una mezcla de tres siARNs dirigidos contra secuencias específicas del gen *Ift88*, o con siARN Scrambled durante 24 horas. Transcurridas, fueron sometidas a 24 horas de privación de suero, seguidas de estimulación con PTHrP (1-37) 100 nM durante 24 horas (A-I). La eficiencia del silenciamiento de IFT88 fue comprobada mediante PCR (A) e inmunoblot (B). Los niveles de expresión de ARNm de *Opg* (C), *Rankl* (D), *Osteocalcina* (F), *Runx2* (G), *Fa* (H) y *Osterix* (I) así como la relación *Opg/Rankl* (E), fueron analizados mediante RT-qPCR. Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. * $p < .05$ versus (-) siARN Scrambled control; ** $p < .01$ versus (-) siARN Scrambled control; ap $< .05$ versus siARN Scrambled + PTHrP (1-37). ARNm: ARN mensajero; OPG: osteoprotegerina; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear - kappa B; Runx2: factor de transcripción 2 relacionado con runt; DE: desviación estándar; siARN: ARN pequeño de interferencia; RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

La pre-incubación de ambas líneas celulares con HC indujo efectos similares a los causados por el silenciamiento de *Ift88* en osteocitos y osteoblastos (Fig. 15 y 16). Sin embargo, a diferencia de lo observado tras el silenciamiento de *Ift88*, el hidrato de cloral no indujo la sobreexpresión de *Rankl*, por lo que la relación *Opg/Rankl* se mantuvo sin cambios en las células MLO-Y4 (Fig. 15 B-C) y MC3T3-E1 (Fig. 16 B-C). Estas diferencias podrían ser explicadas debido a que el silenciamiento de *Ift88* y la pre-incubación con HC ejercen distintas acciones a la hora de inhibir al cilio primario. Mientras que el silenciamiento de *Ift88* reduce la expresión de una proteína fundamental para la ciliogénesis, el tratamiento con HC elimina de manera farmacológica el cilio primario mediante el desensamblaje del citoesqueleto. Además, al ser un método no específico de inhibición causa más daño celular (248).

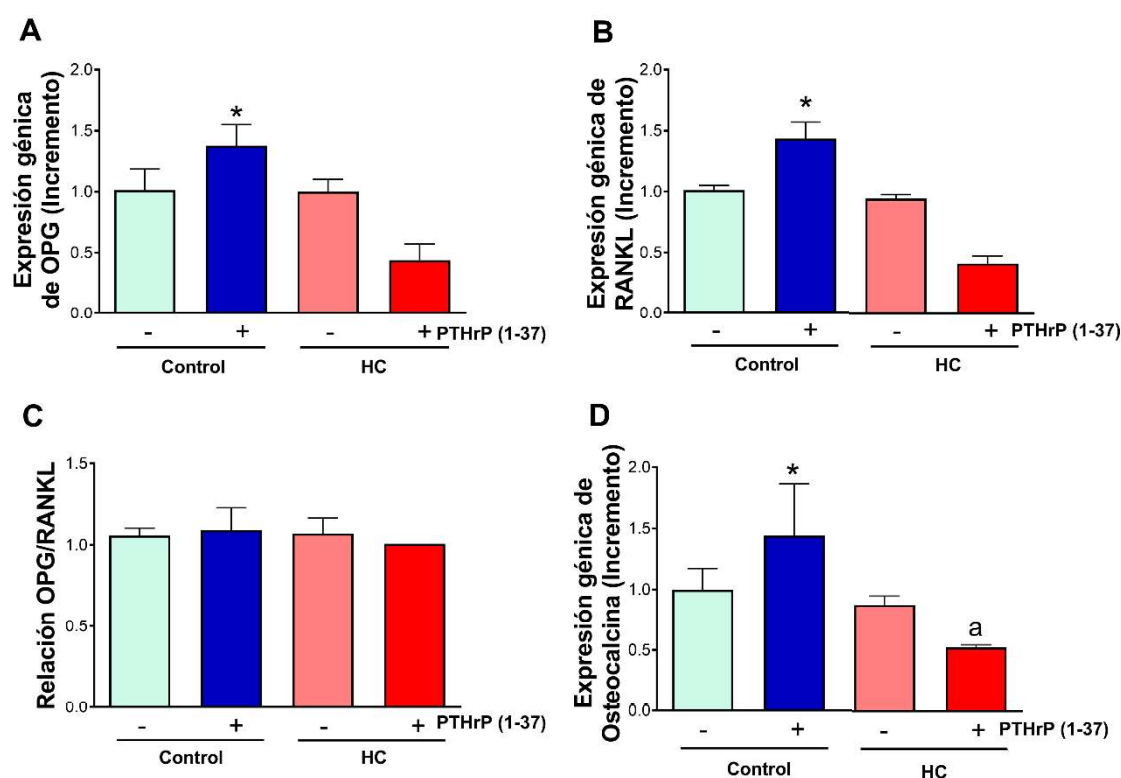


Figura 15. El cilio primario media los efectos de PTHrP sobre la expresión de genes osteogénicos en células osteocíticas MLO-Y4. (A-D) Se pre-incubaron las células MLO-Y4 con hidrato de cloral 40 μ M durante 6 horas en ausencia de suero. Posteriormente, fueron estimuladas con PTHrP 100 nM durante 24 horas. Los niveles de expresión de ARNm de *Opg* (A), *Rankl* (B) y *Osteocalcina* (D), así como la relación *Opg/Rankl* (C), fueron analizados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. * $p < .05$ versus (-) Control; ^a $p < .05$ versus Control + PTHrP (1-37).

ARNm: ARN mensajero; OPG: osteoprotegerina; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear - kappa B; DE: desviación estándar; HC: hidrato de cloral.

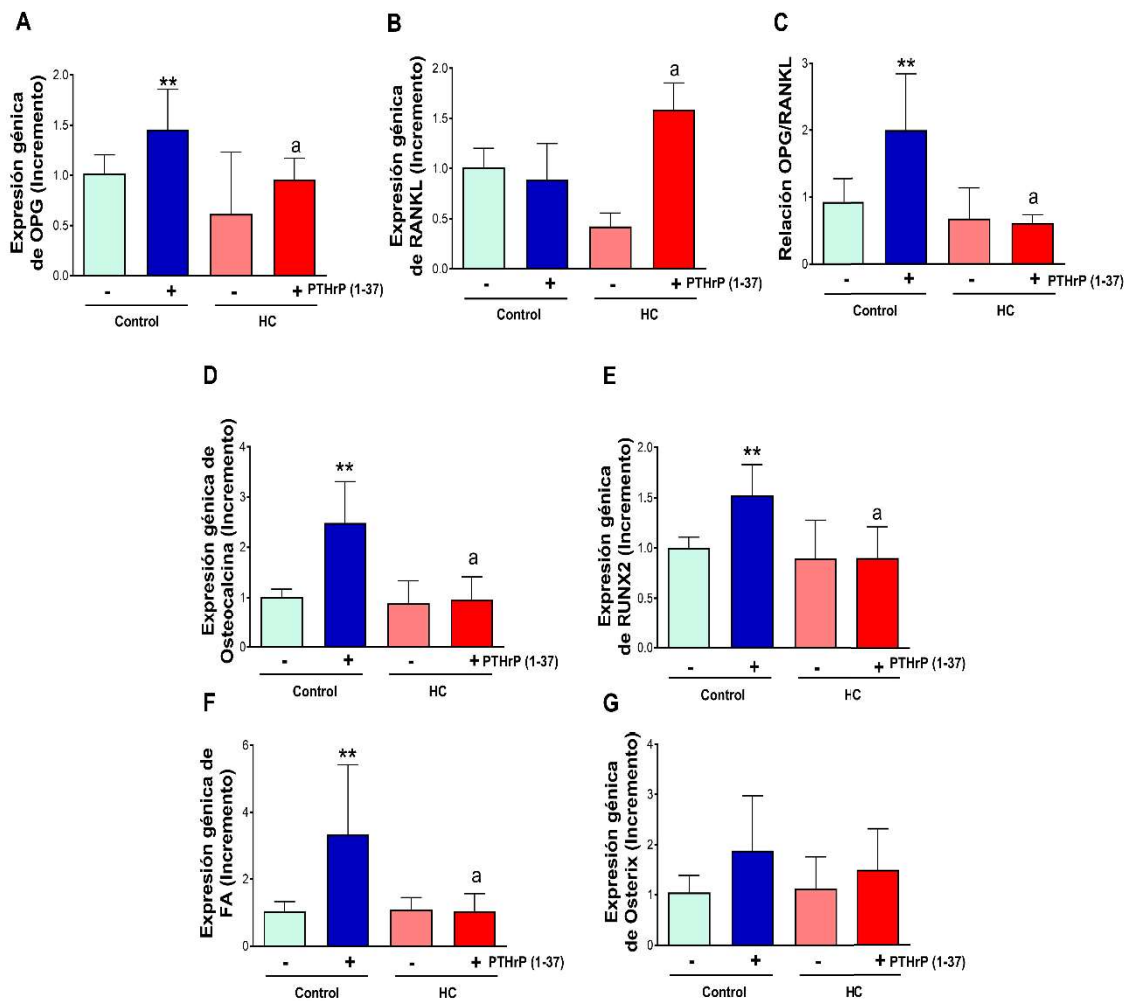


Figura 16. El cilio primario media los efectos de PTHrP sobre la expresión de genes osteogénicos en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. (A-G) Se pre-incubaron las células MC3T3-E1 con hidrato de cloral 40 μ M durante 6 horas en ausencia de suero. Posteriormente, se estimularon durante 24 horas con PTHrP 100 nM. Los niveles de expresión de ARNm de *Opg* (A), *Rankl* (B), *Osteocalcina* (D), *Runx2* (E), *Fa* (F) y *Osterix* (G), así como la relación *Opg/Rankl* (C), fueron analizados mediante RT-qPCR. Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. *p < .05 versus (-) Control; **p < .01 versus (-) Control; ap < .05 versus Control +PTHrP (1-37). ARNm: ARN mensajero; OPG: osteoprotegerina; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear -kappa B; Runx2: factor de transcripción relacionado con runt 2; DE: desviación estándar; HC: hidrato de cloral; RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

Por otro lado, el silenciamiento de *Ift88* en células MLO-Y4 y MC3T3-E1 no redujo los niveles de ARNm de *Pth1r* (Fig. 17 A-B, respectivamente). Por el contrario, en las células MLO-Y4 se observó un incremento en los niveles de expresión de *Pth1r*, que sin embargo no se observaba en las células MC3T3-E1.

Por lo tanto, parece probable que los efectos inhibitorios del silenciamiento del cilio primario sobre las acciones inducidas por PTHrP no sean ejercidos a través de la regulación de los niveles de *Pth1r*.

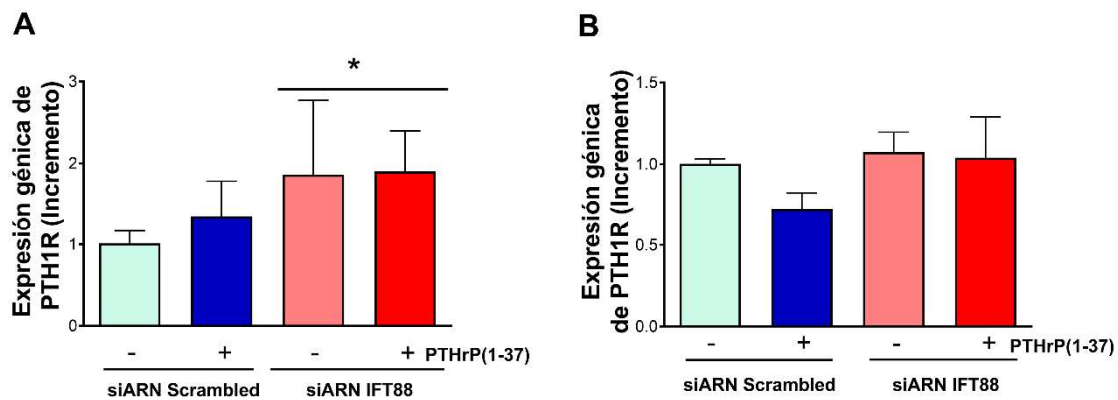


Figura 17. Las acciones inhibitorias del silenciamiento del cilio primario sobre los efectos de PTHrP no son debidas a la regulación de los niveles de ARNm de PTH1R. (A-B) Las células MLO-Y4 y MC3T3-E1 fueron transfectadas con una mezcla de tres siARNs dirigidos contra secuencias específicas del gen *Ift88*, o con siARN Scrambled durante 24 horas. Transcurridas, fueron sometidas a privación de suero durante 6 horas, seguidas de estimulación con PTHrP (1-37) 100 nm durante 24 horas. Se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de *Pth1r* en células osteocíticas MLO-Y4 **(A)** y en células osteoblásticas MC3T3-E1 **(B)**. Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. * $p < .05$ (-) siARN Scrambled control. ARNm: ARN mensajero; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; siARN: ARN pequeño de interferencia; RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real; DE: desviación estándar.

En conjunto, estos datos sugieren que el cilio primario podría modular las acciones osteogénicas de PTHrP a través de la regulación de *Osteocalcina*, *Runx2* y *Fa* en osteocitos y osteoblastos. Además, los datos sugieren que el cilio primario regula los niveles de *RANKL* en ambos tipos celulares actuando como un represor de su expresión, lo que afecta a las acciones de PTHrP sobre el eje *Opg/Rankl*. De manera similar, el cilio primario regula también los niveles de *Pth1r* en osteocitos.

5.3. Papel del cilio primario en la supervivencia celular inducida por PTHrP en osteocitos MLO-Y4 en osteoblastos MC3T3-E1

Nuestro grupo de investigación había demostrado previamente la activación de PTH1R en osteocitos mediante mecanismos tanto dependientes como independientes de PTHrP, lo que constituye un evento crucial para el mantenimiento de la viabilidad osteocítica (116). Para determinar si el cilio primario media los efectos comentados de PTH1R sobre la viabilidad celular, inhibimos en osteocitos MLO-Y4 y en pre-osteoblastos MC3T3-E1 la formación del cilio primario, mediante transfección con siARNs específicos dirigidos contra *Ift88* (Fig. 18A) o mediante pre-incubación con HC (Fig. 18B). Posteriormente, ambas líneas celulares fueron estimuladas con PTHrP de manera previa a privación de suero que se llevó a cabo para comprometer la viabilidad celular. Los porcentajes de muerte celular fueron calculados mediante el método de exclusión en azul tripano, a las 24 y a las 48 horas.

El péptido PTHrP redujo de manera significativa el porcentaje de muerte celular inducido por la ausencia de suero en ambas líneas celulares, tanto a las 24 como a las 48 horas (Fig. 18 A-B). Sin embargo, estos efectos pro-supervivencia ejercidos por PTHrP fueron revertidos tras inhibir la formación del cilio primario, por cualquiera de las dos aproximaciones mencionadas anteriormente, en ambas líneas celulares (Fig. 18 A-B). Además, PTHrP incrementó el número de osteoblastos en cultivo, lo que sugiere efectos proliferativos del péptido en células osteoblásticas MC3T3-E1 que se vieron además potenciados por el silenciamiento de *Ift88* (Fig. 18C). Estos resultados sugieren que el cilio primario regula las acciones pro-supervivencia dependientes de PTHrP en células osteocíticas y osteoblásticas, y su presencia podría contrarrestar, al menos parcialmente, las acciones proliferativas de PTHrP en células osteoblásticas.

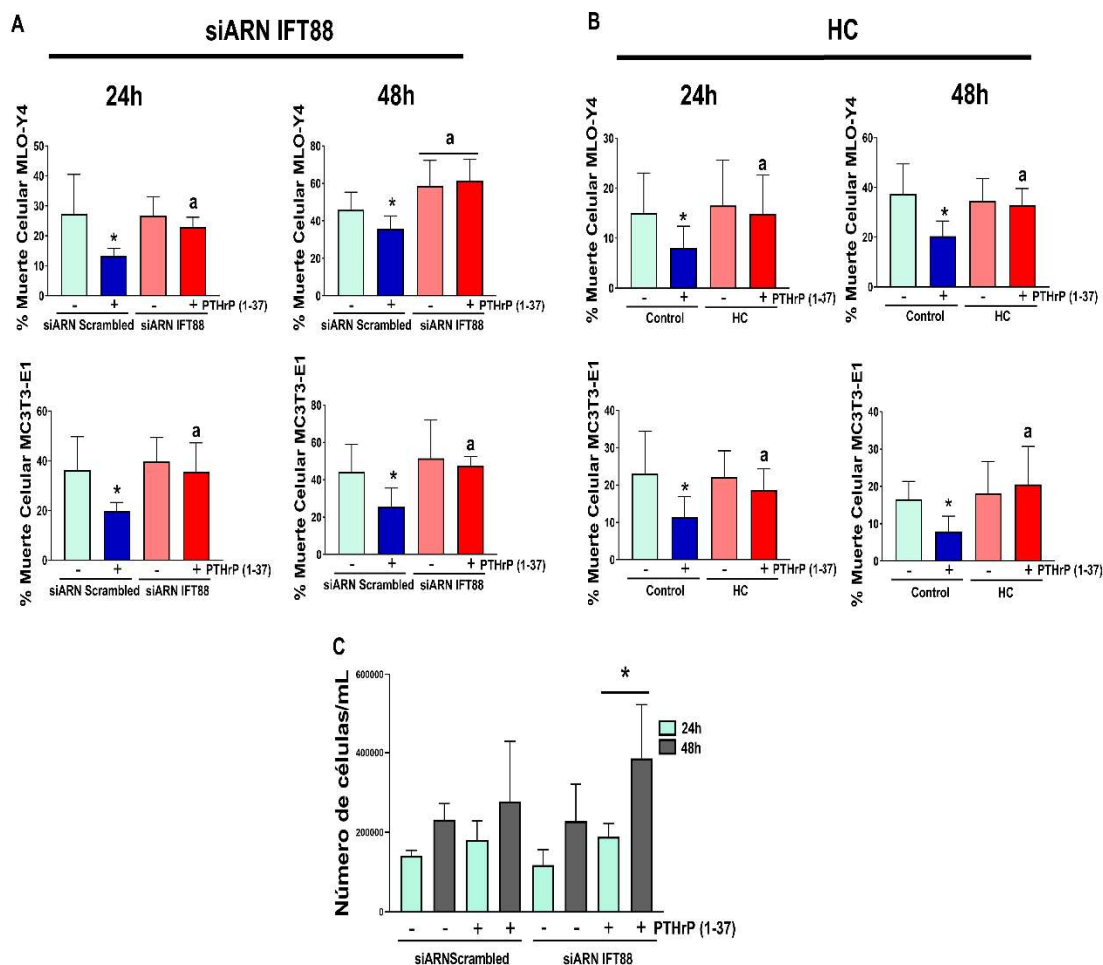


Figura 18. El cilio primario media los efectos pro-supervivencia ejercidos por PTHrP en células osteocíticas MLO-Y4 y en células osteoblásticas MC3T3-E1, mientras que contrarresta los efectos proliferativos de PTHrP en células osteoblásticas MC3T3-E1. (A) Las células MLO-Y4 y MC3T3-E1 fueron transfectadas durante 24 horas con una mezcla de tres siARNs dirigidos contra la secuencia del gen IFT88 de ratón o con siARN Scrambled. Posteriormente, se estimularon con PTHrP (1-37) 100 nM durante 1 hora, seguida 24 o 48 horas de privación de suero. **(B)** Alternativamente, ambas líneas celulares fueron tratadas con PTHrP durante 1 hora para después ser incubadas con hidrato de cloral 40 μ M en ausencia de suero durante 24 o 48 horas. El porcentaje de muerte celular se obtuvo mediante el método de exclusión en azul de tripano, según se describe en el apartado 3.2.4. **(C)** Los osteoblastos MC3T3-E1 fueron transfectados con una mezcla de tres siARNs contra IFT88 y después estimulados con PTHrP (1-37) 100 nM durante 24 o 48 horas. Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. * $p < .05$ versus (-) siARN Scrambled control **(A y C)**; * $p < .05$ versus (-) Control **(B)**. ^a $p < .05$ versus siARN Scrambled + PTHrP (1-37) **(A)**. ^a $p < .05$ versus siARN Control + PTHrP (1-37) **(B)**. PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; DE: desviación estándar; siARN: ARN pequeño de interferencia.

5.4. Regulación del cilio primario en la acumulación de GLI1 dependiente de PTHrP en osteocitos MLO-Y4 y en osteoblastos MC3T3-E1

El cilio primario constituye un importante centro de señalización celular (256). Una de las vías de señalización estrechamente relacionadas con el cilio primario, como ya se ha mencionado previamente en la introducción, es la señalización Hh. El cilio primario es capaz de promover osteogénesis a través del balance entre las vías canónicas (Hh-Gli) y no canónicas (Hh-Gai-RhoA) de la señalización (60,165). Así, se ha observado que el cilio primario es capaz de estimular la osteogénesis durante el desarrollo mandibular a través de la regulación de SHH (166). También durante el desarrollo mandibular, el cilio primario ejerce una regulación sobre los niveles de IHH, lo que a su vez mantiene el patrón de expresión condrogénico en las células progenitoras y evita que ocurra una osteogénesis ectópica (167). El cilio primario también promueve la diferenciación de los osteoblastos durante el proceso de osificación endocondral a través de la señalización *lhh* (61,161). Además, también se ha descrito la relación entre IHH y PTHrP en la regulación de la osificación endocondral, como se ha descrito en el apartado 1.3.3 (Karp et al., 2000; Whitfield, 2008; Xiang et al., 2014). En conjunto, estos datos aportan evidencia de una regulación compleja de la vía de señalización Hh en la que podrían actuar de manera conjunta el cilio primario y el ligando PTHrP.

Por tanto, nuestro siguiente paso fue evaluar si el cilio primario tiene la capacidad de modular la activación de la vía de señalización Hh mediada por PTHrP. Para ello, inhibimos la formación del cilio primario mediante las 2 aproximaciones comentadas anteriormente: transfección con siARNs específicos dirigidos contra *lft88*, o pre-incubación con HC. Observamos que la estimulación con el péptido incrementó los niveles proteicos de GLI1 -un factor de transcripción que es sobreexpresado tras la activación de la señalización Hh (Lee, Platt, Censullo, & Ruiz i Altaba)- en osteocitos MLO-Y4 y en pre-osteoblastos MC3T3-E1 (Fig. 19A-B, respectivamente). Además, no se observaron cambios en la expresión proteica de PTCH1, el receptor al que se une el ligando Hh para iniciar la vía de señalización (257) (Fig. 19C-D) o de SMO, encargada de la transducción de la señal al núcleo (258) (datos no mostrados). Por el contrario, sí se detectaron

niveles elevados de ARNm del ligando iniciador de la vía *Ihh* (184) tras la estimulación con PTHrP, en ambos tipos celulares (Fig. 19E-F). Además, la sobreexpresión de GLI1 inducida por PTHrP se revirtió en osteocitos y osteoblastos pre-tratados con HC (Fig. 19A-B), al igual que ocurrió con la sobreexpresión de *Ihh* en células transfectadas con los siRNAs de *Iff88* (Fig. 19E-F). Estos datos sugieren que la estimulación de la señalización Hh por parte de PTHrP requiere de la presencia de un cilio primario funcional en osteocitos y osteoblastos.

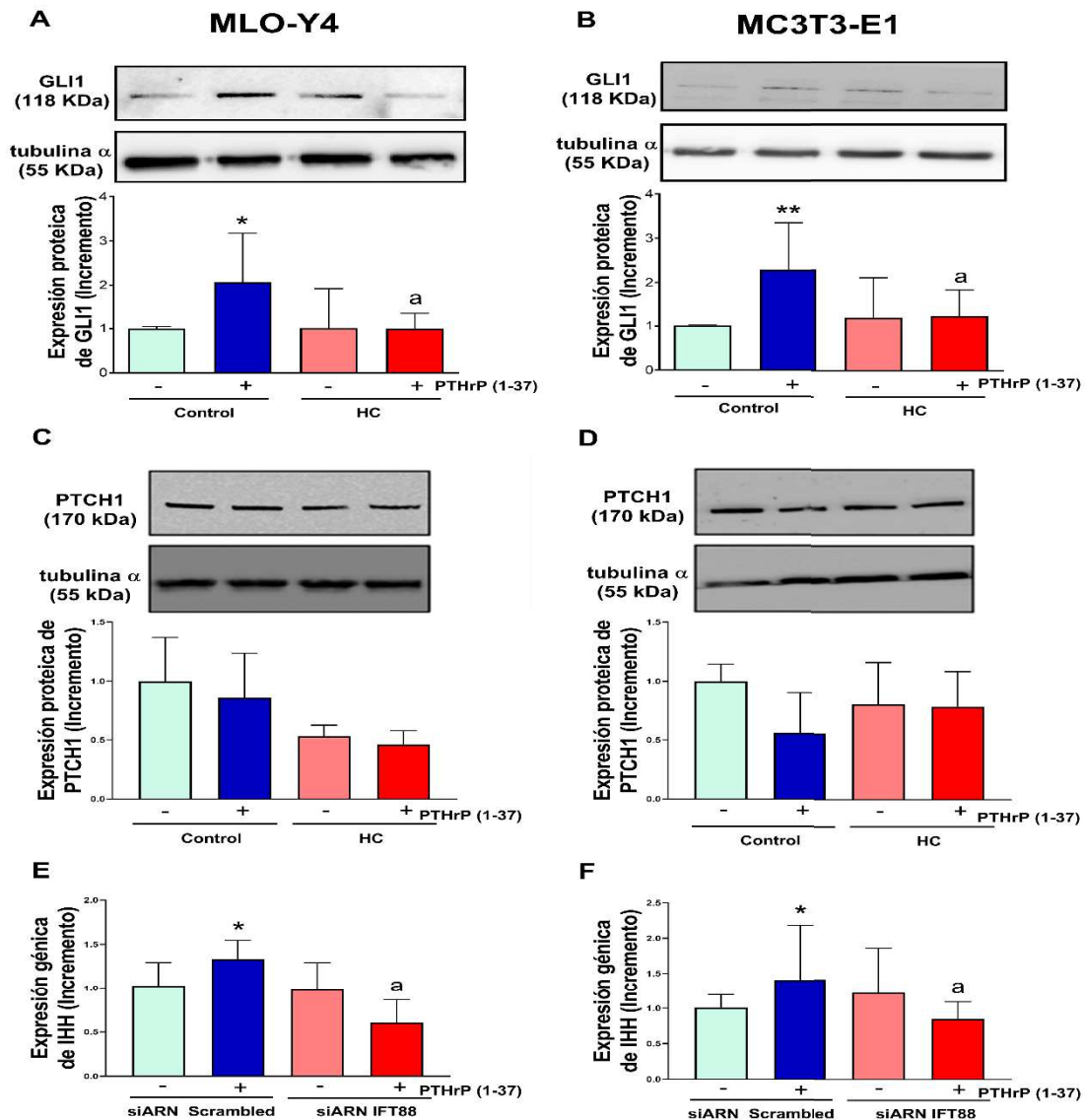


Figura 19. El cilio primario media la sobreexpresión del factor de transcripción GLI1 y el aumento en los niveles de expresión de ARNm de *Ihh* dependientes de PTHrP en células osteocíticas MLO-Y4 y en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. (A-D) Las células MLO-Y4 (A y C) y MC3T3-E1 (B y D) fueron pre-tratadas o no (control) con HC 40 μ M durante 6 horas, tras las cuales fueron estimuladas con PTHrP (1-37) 100 nM durante 24 horas. Los niveles de expresión proteica de GLI1 y de PTCH1 fueron analizados mediante inmunoblot, empleándose tubulina α como control de carga. Se analizaron las bandas de 118 kDa y las de 170 kDa, correspondientes al tamaño predicho para GLI1 y PTCH1, respectivamente. Se muestran autorradiogramas representativos para cada condición. (E-F) Alternativamente, ambos tipos celulares fueron transfectados con una mezcla de tres siARNs dirigidos contra secuencias específicas del gen *Ift88*, o con siARN Scrambled durante 24 horas. Transcurridas, fueron sometidas a 24 horas de privación de suero, seguidas de estimulación con PTHrP (1-37) 100 nM durante 24 horas. Los niveles de expresión de ARNm de *Ihh* fueron analizados mediante RT-qPCR. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < .05$ versus (-) Control (A-B); * $p < .05$ versus (-) siARN Scrambled control (E-F); ** $p < .01$ versus (-) Control; ^a $p < .05$ versus Control + PTHrP (1-37) (A-B); ^a $p < .05$ versus siARN Scrambled control + PTHrP (1-37) (E-F). ARNm: ARN mensajero; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: hormona relacionada con la PTH; DE: desviación estándar; siARN: ARN pequeño de interferencia.

5.5. Papel de GLI1 en los efectos modulados por PTHrP en genes relacionados con osteoblastos/osteoclastos y la supervivencia celular en células osteocíticas MLO-Y4 y en células osteoblásticas MC3T3-E1

A continuación, se determinó la relevancia de GLI1 sobre la inducción de la expresión génica y los efectos pro-supervivencia llevados a cabo por PTHrP en células osteocíticas y osteoblásticas. Para ello, se procedió a la pre-incubación de ambas líneas celulares con el inhibidor GANT61, que actúa inhibiendo de forma específica GLI1 (259,260). La pre-incubación de ambos tipos celulares con GANT61 revirtió la sobreexpresión de GLI1 inducida por PTHrP (Fig. 20A y 21A). En cuanto al análisis de la expresión génica, observamos que la inhibición de GLI1 indujo en osteocitos y osteoblastos un incremento en los niveles de expresión de *Rankl*, lo que se tradujo en una disminución de la relación *Opg/Rankl* (Fig. 20B-D y 21B-D), de manera similar a la observada tras el silenciamiento del cilio primario (Fig. 13C-E y 14C-E) o tras su inhibición con HC (Fig. 15B-D y 16B-D). Sin embargo, no se vieron afectadas por la inhibición de GLI1 la sobreexpresión de *Osteocalcina* inducida por PTHrP en osteocitos y osteoblastos (Fig. 20E y 21E), así como la sobreexpresión de *Runx2* observada en osteoblastos (Fig. 21F).

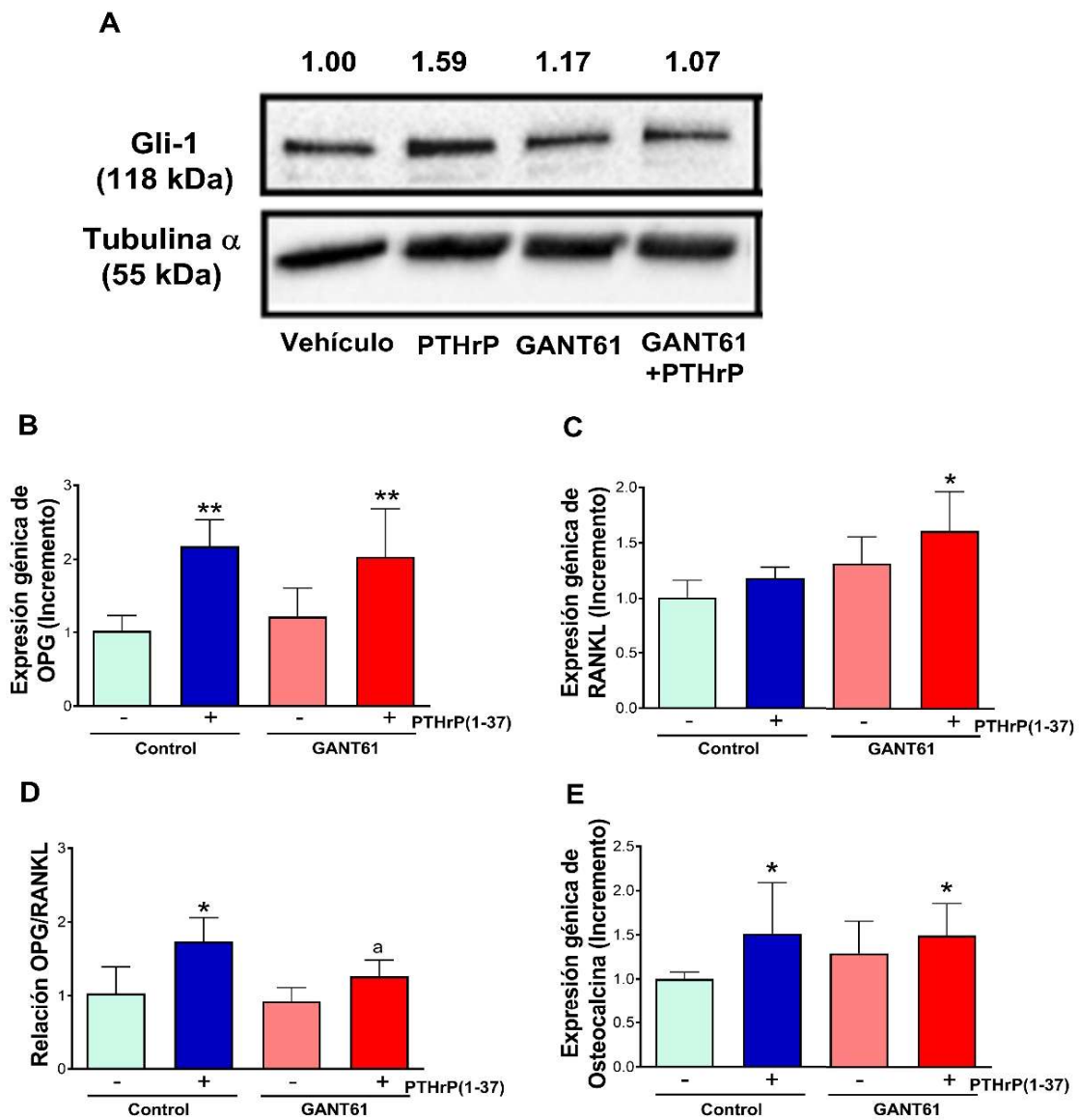


Figura 20. El factor de transcripción GLI1 regula la expresión génica en las células osteocíticas MLO-Y4. (A-E) Las células osteocíticas MLO-Y4 fueron pretratadas o no (control) con GANT61 10 μ M durante 1 hora, de manera previa a privación de suero y estimulación con PTHrP 100 nM durante 6 horas. **(A)** Autorradiogramas representativos que muestran cómo GANT61 revierte la sobreexpresión de GLI1 inducida por PTHrP. Se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real los niveles de expresión de ARNm de *Opg* **(B)**, *Rankl* **(C)**, *Osteocalcina* **(E)**, así como la relación *Opg/Rankl* **(D)**. * $p < .05$ versus (-) Control; ** $p < .01$ versus (-) control; ^a $p < .05$ versus Control + PTHrP (1-37). ARNm: ARN mensajero; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa B; DE: desviación estándar.

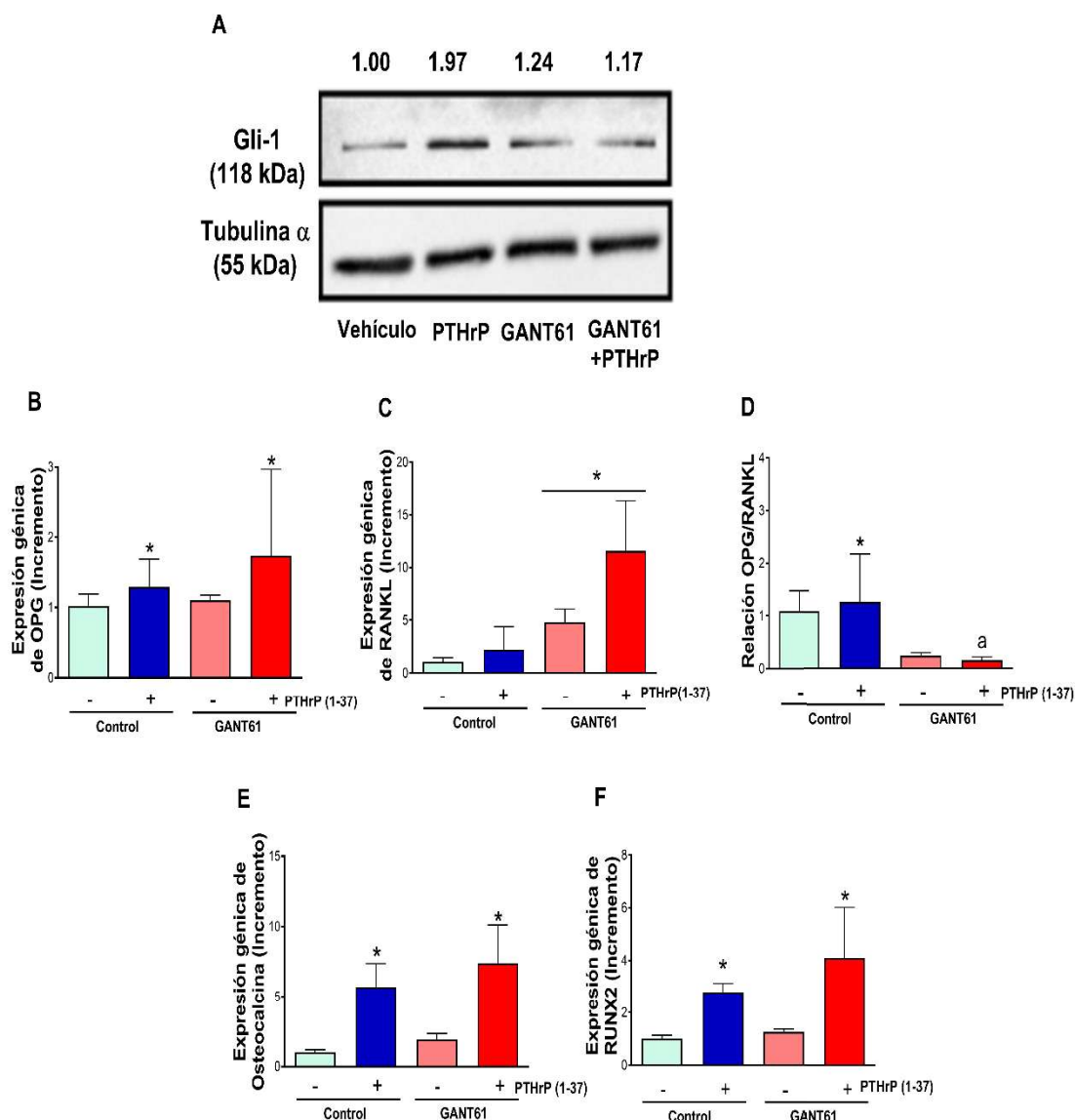


Figura 21. El factor de transcripción GLI1 regula la expresión génica en las células osteoblásticas MC3T3-E1. (A-F) Las células osteoblásticas MC3T3-E1 fueron pretratadas o no (control) con GANT61 10 μ M durante 1 hora, de manera previa a privación de suero y estimulación con PTHrP 100 nM durante 6 horas. **(A)** Autorradiogramas representativos que muestran como GANT61 revierte la sobreexpresión de GLI1 inducida por PTHrP. Se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real los niveles de expresión de ARNm de *Opg* **(B)**, *Rankl* **(C)**, *Osteocalcina* **(E)** y *Runx2* **(F)**, así como la relación *Opg/Rankl* **(D)**. * $p < .05$ versus (-) Control; ^a $p < .05$ versus Control + PTHrP (1-37). ARNm: ARN mensajero; PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa B; DE: desviación estándar.

Por el contrario, la inhibición de Gli1 con GANT61 sí revirtió los efectos pro-supervivencia ejercidos por PTHrP a 24 y 48 horas en osteocitos (Fig. 22A-B) y en osteoblastos (Fig. 22C-D).

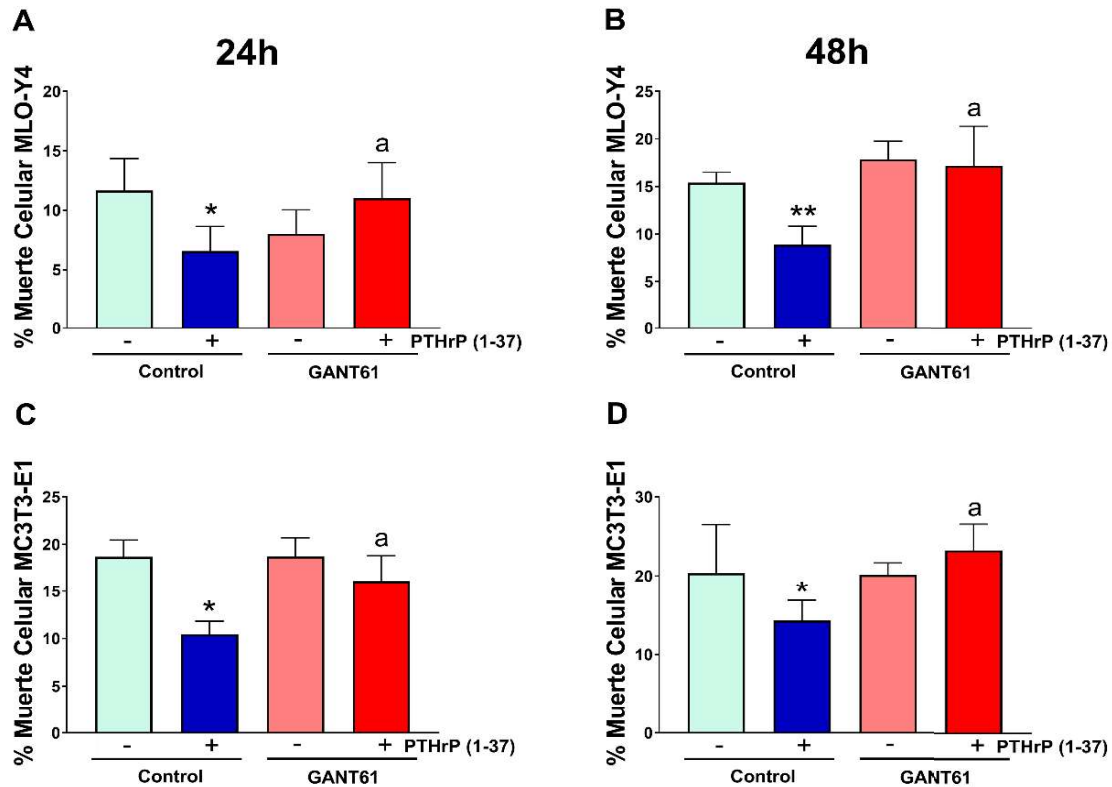


Figura 22. El factor de transcripción Gli1 regula los efectos pro-supervivencia ejercidos por PTHrP en osteocitos MLO-Y4 y en osteoblastos MC3T3-E1. Las células osteocíticas MLO-Y4 (A-B) y las células osteoblásticas MC3T3-E1 (C-D) se incubaron con GANT61 10 μ M durante 1 hora, y después se estimularon 1 hora con PTHrP (1-37) 100 nM. Transcurrida, se incubaron en condiciones de privación de suero durante 24 (A y C) o 48 horas (B y D). El porcentaje de muerte celular se calculó mediante el método de exclusión con azul de tripano, como se describe en el apartado 3.2.4. Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. * $p < .05$ versus (-) Control; ** $p < .01$ versus (-) control; ^a $p < .05$ versus Control + PTHrP (1-37). PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; DE: desviación estándar.

Considerando estos resultados, quisimos estudiar los mecanismos de señalización regulados por PTH1R que podrían estar actuando como mediadores de este mecanismo citoprotector. Para ello, utilizamos inhibidores farmacológicos de dos de las principales vías de señalización -AMPc y Ca^{2+} - tras la activación del receptor (102,105,110). Para inhibir el AMPc, se utilizó SQ-

22536, un inhibidor específico de la adenilato ciclasa A que evita la conversión del ATP a AMPc y su posterior liberación (261,262). Como inhibidor de la liberación de Ca^{2+} se empleó U-73122, un antagonista de la PLC que evita la liberación de Ca^{2+} desde el RE (263). Estos inhibidores se añadían al medio de cultivo de las células de manera previa a la estimulación con PTHrP (1-37), y se observó que ambos inhibían los efectos pro-supervivencia inducidos por PTHrP (1-37) (Fig. 23).

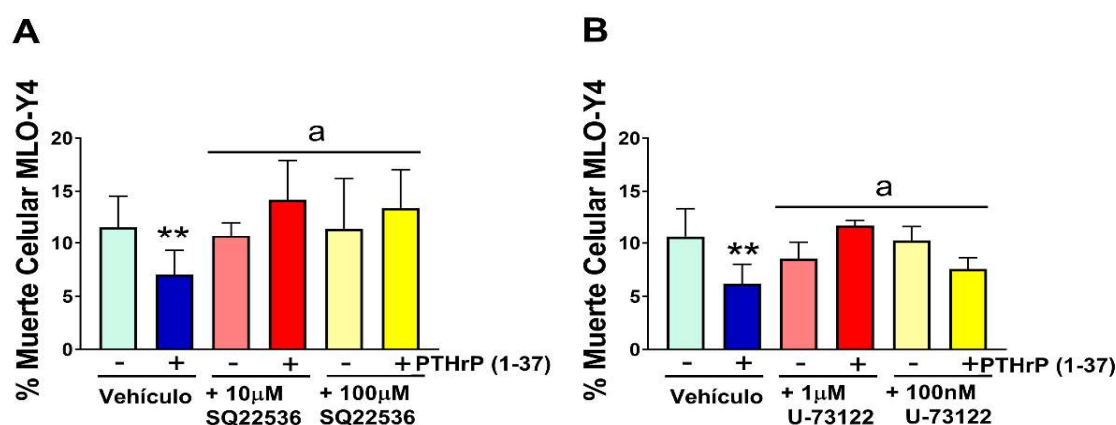


Figura 23. Las vías de señalización desencadenadas por PTH1R y dependientes de AMPc y de Ca_i^{2+} regulan los efectos pro-supervivencia ejercidos por PTHrP en osteocitos MLO-Y4. Las células osteocíticas MLO-Y4 se incubaron con SQ22536 10 μM o 100 μM 1 (A), o bien con U-73122 (B) 1 μM o 100 nM durante 1 hora. A continuación, se estimularon con PTHrP (1-37) 100 nM durante 1 hora. Transcurrida, se incubaron en condiciones de privación de suero durante 24 horas. El porcentaje de muerte celular se calculó mediante el método de exclusión con azul de tripano, como se describe en el apartado 3.2.4. Los resultados representan la media \pm la DE de tres experimentos independientes. **p < .01 versus (-) Control; ap < .05 versus Control + PTHrP (1-37). PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; DE: desviación estándar.

Estos datos sugieren que no solo la vía de señalización Hh, sino también otras vías de señalización desencadenadas por PT1HR que utilizan AMPc como segundo mensajero o que requieren de la participación de la PLC y la posterior liberación de Ca_i^{2+} también están implicadas en la supervivencia celular inducida por PTHrP en osteocitos. **Basándonos en estas observaciones, proponemos que PTHrP regula diversos genes osteogénicos a través de mecanismos dependientes del cilio primario pero independientes de la vía de señalización Hh, y que induce la supervivencia celular en osteocitos y**

osteoblastos a través de mecanismos dependientes tanto del cilio primario como de la vía Hh.

5.6. Efectos de la estimulación mecánica sobre la ciliogénesis y la estructura del cilio primario

En la presente Tesis hemos demostrado la influencia del cilio primario en las respuestas osteogénicas y la supervivencia celular inducidas por el ligando PTHrP. Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente la capacidad de PTH1R para actuar como sensor de estímulos mecánicos en osteocitos MLO-Y4 (116). Además, el cilio primario ha sido descrito como un orgánulo orientado hacia la detección de estímulos mecánicos como la deformación/tensión en el hueso, el flujo de fluido, vibraciones y daño (142).

Por lo tanto, nos planteamos estudiar la respuesta a mecanoestimulación como posible mecanismo modulador adicional de la señalización del eje cilio primario/PTH1R desencadenada por ligando. Para ello, se sometieron las células MLO-Y4 a movimiento laminar mediante FF, un procedimiento que implica la circulación de medio de cultivo sobre la monocapa de células, durante 10 minutos a una intensidad de 10 dinas/cm², un régimen de estimulación con comprobados efectos anti-apoptóticos en células osteocíticas MLO-Y4 (222,223). La evaluación de los efectos de la estimulación con FF sobre el cilio primario se llevó a cabo en primer lugar mediante el recuento del porcentaje de células que presentaban cilio primario (Fig. 24A-B), así como la medida de la longitud de los cilios tras el estímulo (Fig. 24C-D). Observamos que la estimulación mecánica mediante FF aumentó de manera significativa el número de células MLO-Y4 que presentaban cilio primario a partir de los 30 minutos posteriores a la finalización del estímulo, con una tendencia ascendente hasta las 6 horas posteriores al FF (Fig. 24A). La mecanoestimulación con FF también indujo un aumento en el porcentaje de células MC3T3-E1 ciliadas, en este caso desde 1 hora después del final del FF, observándose de nuevo la tendencia ascendente comentada en las células MLO-Y4 (Fig. 24B). En las células MC3T3-E1, el FF incrementó además la longitud del cilio primario entre los 10 minutos y la hora posteriores a la realización del estímulo mecánico (Fig. 24D),

mientras que no se observaron cambios inducidos por el FF en la longitud del cilio en las células MLO-Y4 (Fig. 24C).

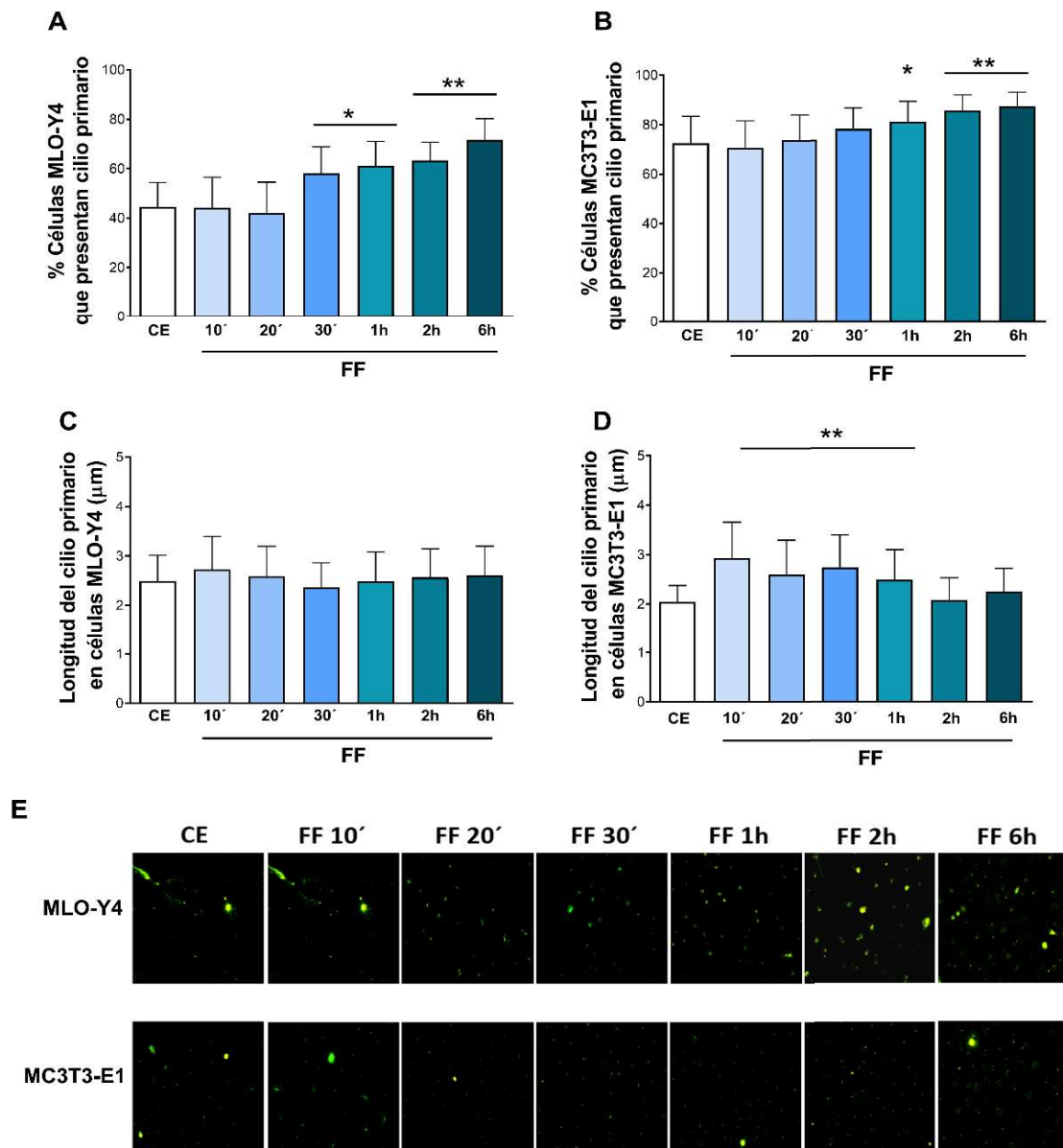


Figura 24. La estimulación mecánica mediante FF aumenta el porcentaje de células MLO-Y4 y MC3T3-E1 que presentan cilio primario, así como la longitud del mismo en osteoblastos MC3T3-E1. En células osteocíticas MLO-Y4 y en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, se evaluó el porcentaje de células que presentaban cilio primario (A-B), así como la longitud de este (C-D) mediante el software ImageJ. (A-D) Se estimularon o no (CE) las células con FF con una intensidad de 10 dinas/cm² durante 10 minutos, tal y como se indica en el apartado 3.2.2, tomándose imágenes entre los 10 minutos y las 6 horas posteriores a la finalización del estímulo, evaluadas bajo microscopio de fluorescencia. Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes. (E) Se muestran imágenes representativas de cada una de las condiciones estudiadas. *p < .05 versus CE; **p < .01 versus CE. FF: flujo de fluido; CE: control estático; DE: desviación estándar.

El aumento del porcentaje de células que presentan cilio primario, así como el incremento de la longitud del mismo observado en los osteoblastos MC3T3-E1 sugieren que el estímulo mecánico podría contribuir a potenciar los efectos pro-supervivencia y las acciones osteogénicas desencadenadas por PTH1R tras ser estimulado con su ligando PTHrP.

5.7. Localización del receptor PTH1R en las caveolas de células osteoblásticas MC3T3-E1

Se han identificado diversos receptores acoplados a proteínas G en las caveolas, incluyendo VPAC-2 (208) y GLP-1R (209). Con estos antecedentes, tratamos de identificar la posible localización de PTH1R en caveolas de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1. Para ello, se llevaron a cabo inmunofluorescencias en las que se emplearon anticuerpos específicos para la detección de PTH1R y CAV1 endógenos. Así, observamos que ambos marcajes co-localizaron en las células osteoblásticas MC3T3-1 (Fig. 25), lo que indica que parte de los receptores PTH1R se sitúa, en condiciones nativas, en las caveolas de los osteoblastos MC3T3-E1.

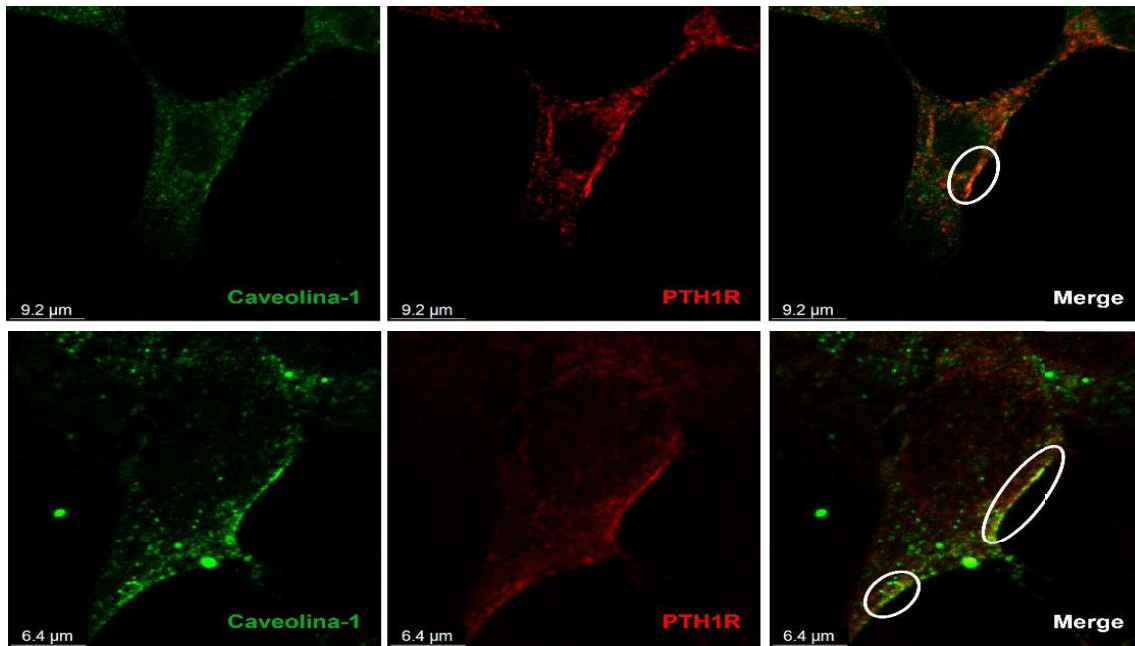


Figura 25. Parte del PTH1R nativo situado en membrana se localiza en las caveolas de células osteoblásticas MC3T3-E1. El marcaje doble mediante inmunofluorescencia se realizó con un anticuerpo primario de ratón anti-CAV1 para el marcaje del cilio primario y un anticuerpo primario de conejo anti-PTH1R para el receptor de PTH. Se emplearon los anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón conjugado AlexaFluor 488 y anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 568 como secundarios para CAV1 y PTH1R, respectivamente. Las imágenes superpuestas en verde y rojo (merge) indican la localización de PTH1R en las caveolas. Las imágenes representan el resultado de tres observaciones independientes. PTH: hormona paratiroidea; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH.

Una vez observado que parte de los receptores PTH1R se sitúan en las caveolas, decidimos estudiar la localización y movilidad del receptor tras estimular con el ligando PTHrP, en células vivas, mediante microscopía confocal. Para ello, las células MC3T3-E1 se transfectaron con dos plásmidos; uno que sobreexpresa PTH1R unido a la proteína fluorescente verde GFP o GFP^{PTH1R} , y otro que sobreexpresa CAV1 unida a la proteína fluorescente roja m-Cherry o $m-Cherry^{Caveolin-C-10}$. Mediante esta técnica, pudimos corroborar las observaciones realizadas con PTH1R y CAV1 nativa, comprobando la localización de GFP^{PTH1R} en las caveolas de las células MC3T3-E1 (Fig. 26). Además, pudimos observar que la localización se produce tanto en parches en la membrana plasmática como en vesículas a nivel citoplásmico (Fig. 26), lo que indica que una parte de los receptores PTH1R se sitúa en las caveolas de osteoblastos MC3T3-E1 que sobreexpresan CAV1.

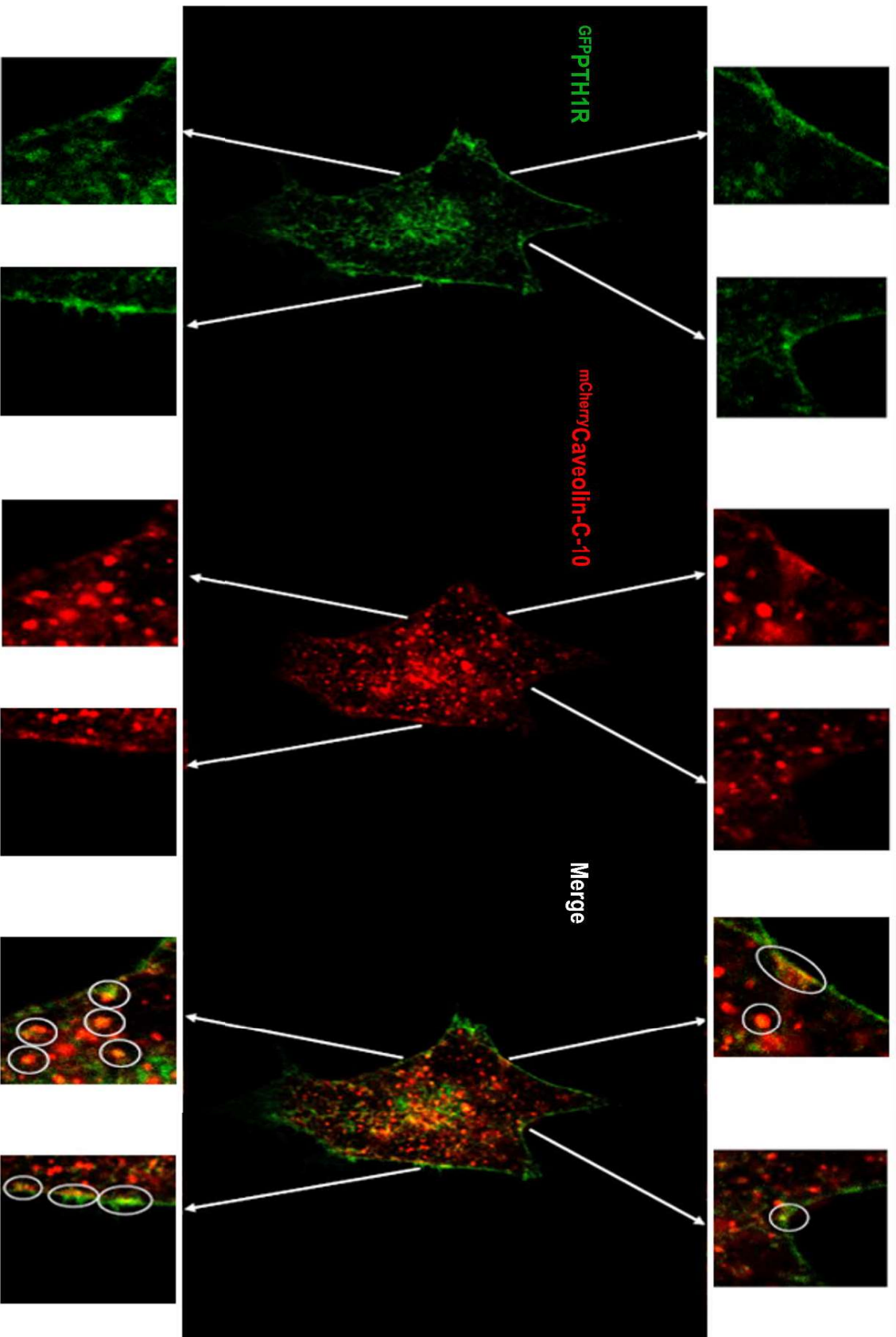


Figura 26. Parte del receptor PTH1R se sitúa en las caveolas de células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 que sobreexpresan caveolina-1. Las células MC3T3-E1 se transfectaron con los plásmidos GFPPTH1R o mCherryCaveolin-C-10 durante 24 horas. Posteriormente, se estimularon con PTHrP (1-37) 100 nM durante 30 minutos. Una vez transcurridos, se analizó la localización de PTH1R y CAV1 mediante imágenes a tiempo real con un microscopio confocal. Se muestran imágenes ampliadas para observar la co-localización tanto a nivel de membrana como citoplásmico. Se cuantificaron entre 10-30 células para cada condición experimental. PTH: hormona paratiroidea; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; CAV1: caveolina-1

5.8. Efectos de la localización caveolar de PTH1R sobre su capacidad de internalización y movilidad en la membrana plasmática en respuesta a estimulación por ligando

Dada la capacidad de las caveolas para reclutar gran cantidad de moléculas de señalización y receptores, es posible que la localización caveolar de PTH1R pueda modular su dinámica de movilidad en la membrana plasmática. Por tanto, se procedió al estudio de la internalización del receptor tras la estimulación con el ligando PTHrP, en células vivas transfectadas con los plásmidos ^{GFP}PTH1R y ^{m-Cherry}Caveolin-C-10. Para ello, se seleccionaron regiones de la membrana plasmática en las que PTH1R co-localizaba con las caveolas y otras zonas de membrana donde no se producía esta co-localización (Fig. 27A). A continuación, se monitorizó mediante microscopía confocal la intensidad de la fluorescencia de ^{GFP}PTH1R en áreas previamente seleccionadas durante los 30 minutos posteriores a la estimulación con PTHrP (Fig. 27B). Este periodo de tiempo ha demostrado ser suficiente para observar la internalización causada por ligandos de PTH1R previamente (237), en estudios asociados a procesos de desensibilización o persistencia de respuesta del receptor (110,264). Observamos que la fluorescencia ^{GFP}PTH1R se redujo de forma significativa en aquellas regiones de membrana en las que PTH1R no se situaba en las caveolas, mientras que el descenso de fluorescencia fue mucho menor en zonas en las que PTH1R co-localizaba con CAV1. Estos resultados indican que la presencia de PTH1R en las caveolas reduce su internalización en respuesta a la estimulación con PTHrP.

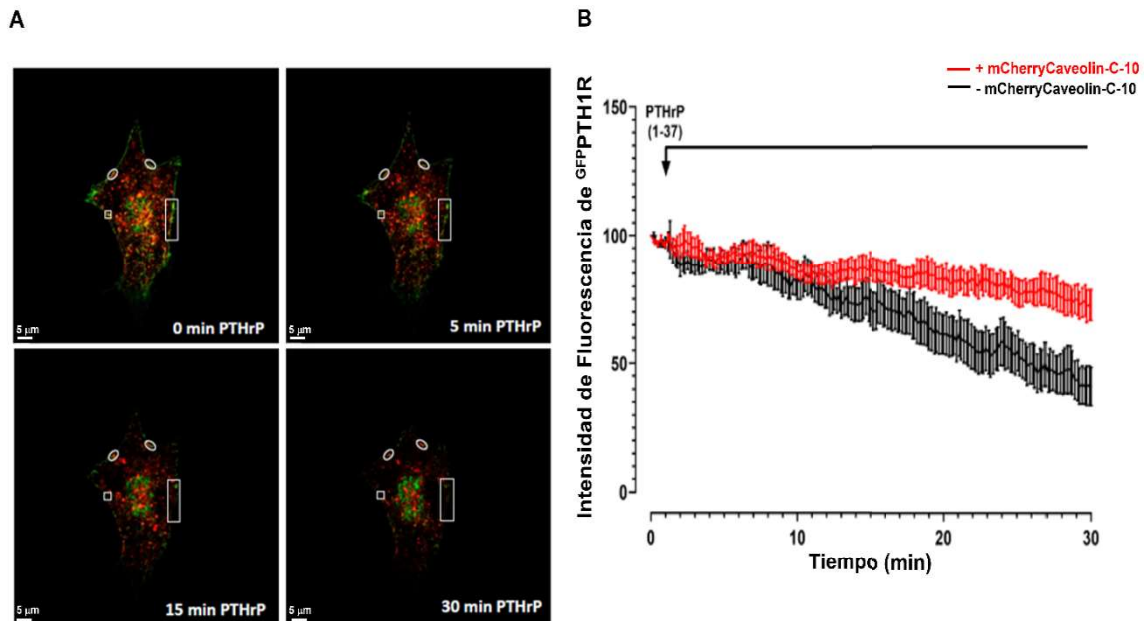


Figura 27. La localización de PTH1R en las caveolas reduce su movilidad en respuesta a la estimulación con PTHrP, en células osteoblásticas MC3T3-E1. (A-B) Las células MC3T3-E1 se transfecaron con los plásmidos GFP^{PTH1R} o $mCherry^{Caveolin-C10}$ durante 24 horas. A continuación, se analizó la localización e internalización de PTH1R tras la estimulación con PTHrP (1-37) 100 nM durante 30 minutos, mediante imágenes a tiempo real con un microscopio confocal y el análisis de la intensidad de fluorescencia GFP. **(A)** *Time course* de la localización de PTH1R en condiciones no estimuladas, y tras 5, 15 y 30 minutos de estimulación con PTHrP (1-37) 100 nM, en las que se muestran regiones en las que el receptor co-localiza o no con las caveolas. **(B)** Análisis de la intensidad de fluorescencia de GFP^{PTH1R} durante los 30 minutos posteriores a la estimulación con PTHrP (1-37) 100 nm, en el que se comparan zonas en las que PTH1R co-localiza con CAV1 (en rojo) con otras en las que no se observa co-localización (en negro). PTH: hormona paratiroidea; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; CAV1: caveolina-1.

También se analizó en células vivas, mediante FRAP, la movilidad en membrana plasmática de PTH1R en función de la presencia o no de caveolas. Se analizaron las células MC3T3-E1 transfecadas con un siARN dirigido contra una secuencia específica del gen de caveolina-1 o con siARN "Scrambled", transfecadas o no con los plásmidos GFP^{PTH1R} y $mCherry^{Caveolin-C-10}$. Se seleccionaron regiones de interés (RDI) situadas en la membrana plasmática (Fig. 28A), en las que se llevó a cabo el fotoblanqueamiento de la fluorescencia verde de GFP^{PTH1R} (Fig. 28B). Obtuvimos imágenes por microscopía confocal en células vivas tras el fotoblanqueamiento, con el objetivo de determinar la capacidad de movilidad del

receptor en función de su localización en la membrana plasmática y de las moléculas a las que se encuentre asociado (Fig. 28C). Se midió la recuperación de fluorescencia para las distintas condiciones estudiadas, observándose que la inhibición de la formación de las caveolas mediante el silenciamiento con siARN de *Cav1* producía una mayor recuperación de fluorescencia que la obtenida en condiciones de CAV1 nativa (Fig. 28D). Estos datos muestran, además, un aumento en el porcentaje de la fracción móvil del receptor PTH1R en células osteoblásticas cuando se inhibe la expresión de CAV1 (Fig. 28E). Por el contrario, la sobreexpresión de CAV1 ejerció el efecto contrario, produciendo una disminución en la recuperación de fluorescencia (Fig. 28D) y, por tanto, un descenso en la movilidad del receptor (Fig. 28E). También se representa el porcentaje de la fracción inmóvil del receptor para cada una de las condiciones estudiadas (Fig. 28F).

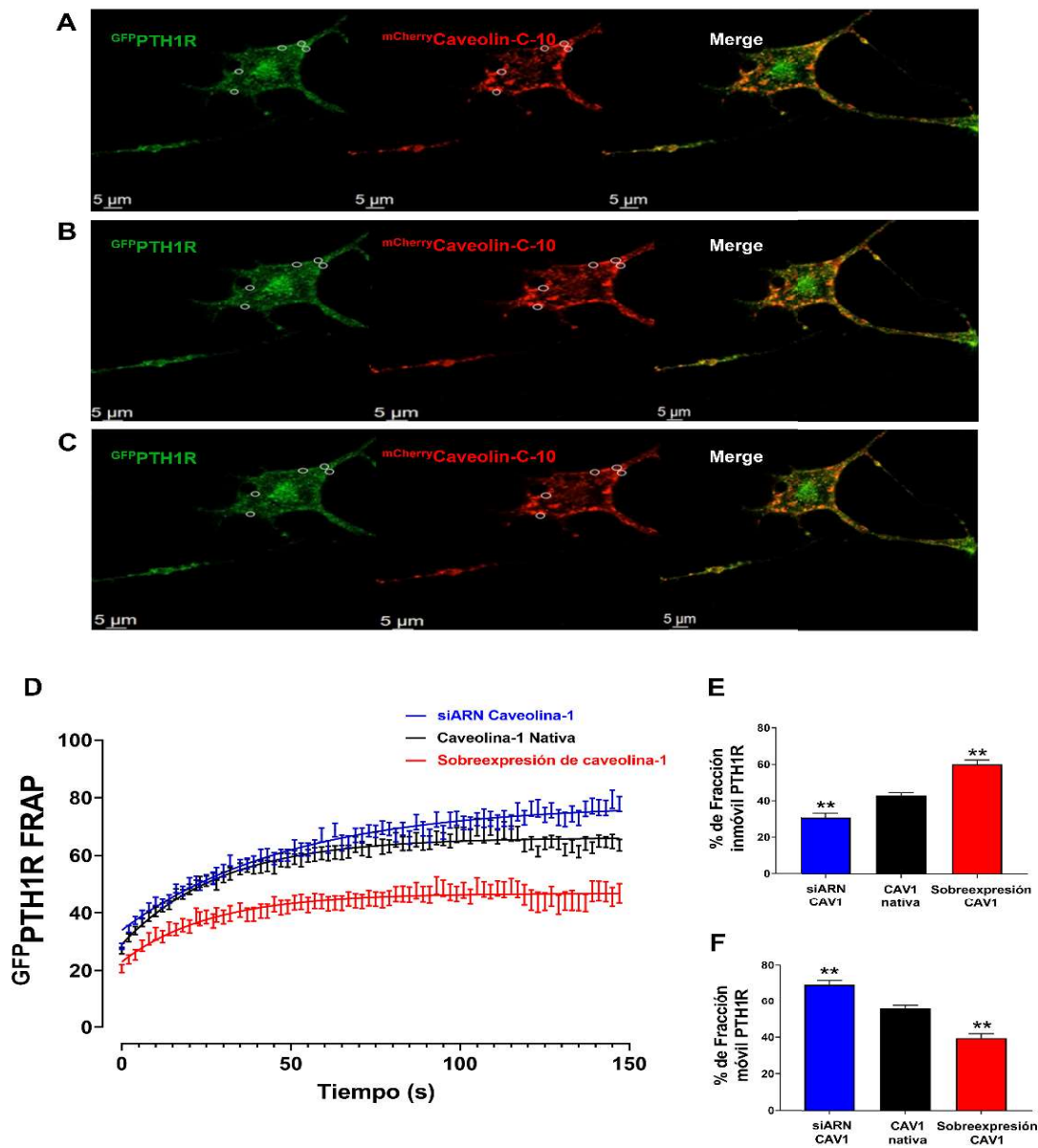


Figura 28. La localización de PTH1R en las caveolas reduce su movilidad en células osteoblásticas MC3T3-E1. (A-F) Las células MC3T3-E1 se transfirieron durante 24 horas con un siARN específico de *Cav1* o con una secuencia inespecífica Scrambled a modo de control, y posteriormente fueron transfiridas o no durante 24 horas con un plásmido GFP^{PTH1R} y un plásmido $mCherry^{Caveolin-C-10}$. De manera previa a la realización del FRAP, se reemplazó el medio de las células por α -MEM sin rojo de fenol, para reducir al máximo la fluorescencia del fondo de la placa. Se determinó la movilidad de PTH1R mediante FRAP. **(A)** Se seleccionaron regiones de interés de 2 μm de diámetro. **(B)** Se llevó a cabo el fotoblanqueamiento en estas regiones de interés usando un láser de 488 nm con un 50% de intensidad, empleando 5 pulsos de blanqueamiento de 863 ms cada uno. **(C)** Se tomaron imágenes durante los 150 segundos posteriores al blanqueamiento. **(D)** FRAP calculado en ausencia o en presencia de CAV1. **(E)** Cálculo del porcentaje de fracción móvil de PTH1R en presencia o en ausencia de CAV1. **(F)** Cálculo del porcentaje de fracción inmóvil de PTH1R en presencia o en ausencia de CAV1. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. ** $p < .01$ vs CAV1 nativa. PTH: hormona paratiroidea; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH. CAV1: Caveolina-1; EEM: error estándar de la media.

Seguidamente evaluamos si la estimulación del PTH1R por su ligando PTHrP podría modular la movilidad e internalización del receptor en función de la presencia o no de caveolas en los osteoblastos. Para ello, se llevó a cabo FRAP comparando células MC3T3-E1 que expresaban CAV1 de forma nativa, que sobreexpresaban CAV1 mediante transfección con el plásmido ^{mCherry}Caveolin-C-10 y que presentaban inhibición de la formación de las caveolas por silenciamiento contra el gen de *Cav1*. Analizamos, para cada una de estas situaciones, unas condiciones control no estimuladas frente al estímulo con PTHrP (Fig. 29). Tanto en las células en las que se indujo la sobreexpresión de CAV1 como en aquellas que presentaban CAV1 nativa, la estimulación con PTHrP aceleró la recuperación de fluorescencia respecto a los controles no estimulados (Fig. 29 A y B), lo que indica un aumento en la movilidad del receptor cuando es estimulado con PTHrP. Esto implica que al menos una fracción del PTH1R está retenido en las caveolas y es liberado en respuesta a la estimulación por ligando. Sin embargo, en las células en las que se inhibió la formación de las caveolas se observó que la recuperación de fluorescencia, y por tanto la movilidad del receptor, también aumentaban tras la estimulación con PTHrP (Fig. 29 C). Estos resultados sugieren la presencia de otras estructuras celulares, aparte de las caveolas, que también retienen al PTH1R en la membrana plasmática y lo liberan en respuesta a la estimulación por ligando PTHrP.

5.9. Efectos de la localización caveolar de PTH1R sobre las vías de señalización desencadenadas tras su estimulación por el ligando PTHrP en células osteoblásticas MC3T3-E1

Basándonos en la capacidad de las caveolas para retener parcialmente a PTH1R, decidimos analizar los posibles efectos de esta potencial interacción sobre algunas de las principales vías de señalización desencadenadas por el receptor en respuesta a estímulo por ligando, como la liberación de Ca_i^{2+} (265) o la fosforilación de ERK 1/2 (266). En primer lugar, se analizó la función que podría desempeñar CAV1 sobre la liberación de Ca_i^{2+} inducida al estimular con PTHrP (1-37). Observamos que la inhibición de CAV1 por silenciamiento inducía

un aumento tanto en la duración como en la magnitud de la respuesta de calcio respecto a la observada en condiciones de caveolina nativa (Fig. 30A). Sin embargo, la sobreexpresión de CAV1 (Fig. 30A) ejercía el efecto contrario, provocando una reducción en la liberación de Ca_i^{2+} intracelular.

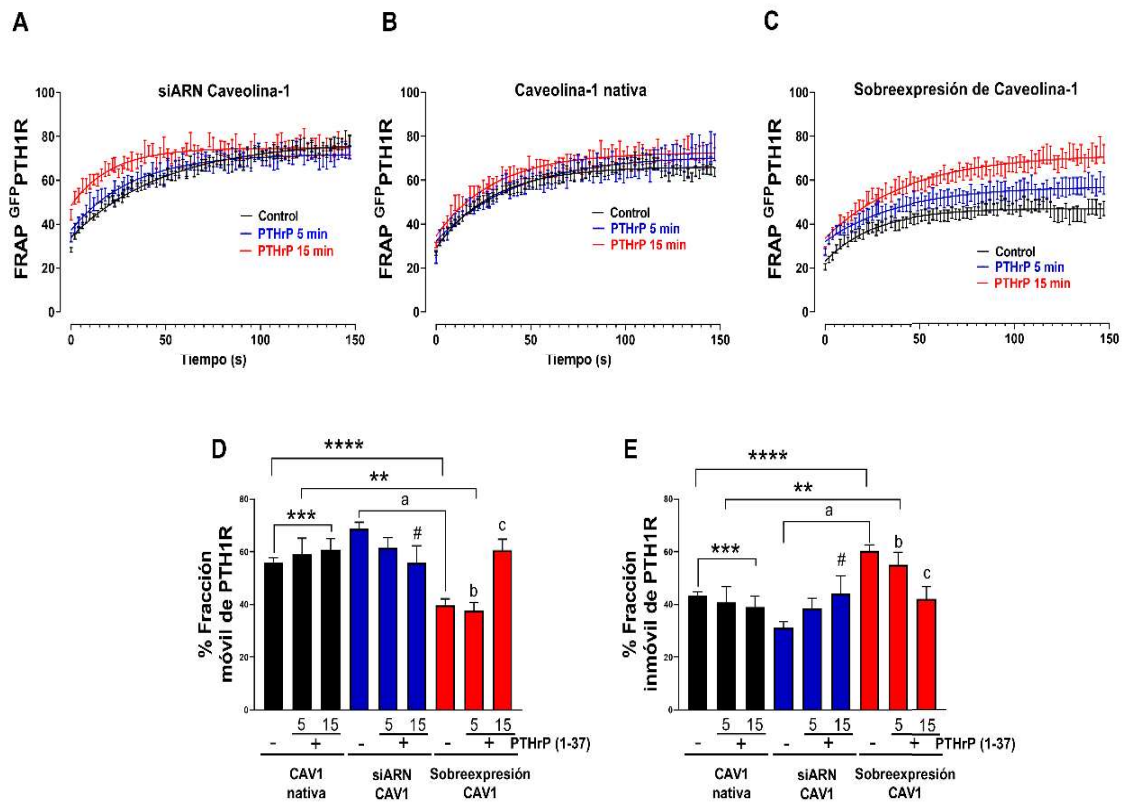


Figura 29. Al menos una parte de PTH1R es retenido en las caveolas y liberado en respuesta a la estimulación con PTHrP en células osteoblásticas MC3T3-E1. (A-C) Las células MC3T3-E1 se transfectaron durante con un siRNA específico contra *Cav1* o con una secuencia inespecífica Scrambled a modo de control. Posteriormente, fueron también transfectadas o no durante toda la noche con un plásmido ^{GFP}PTH1R y un plásmido ^{mCherry}Caveolin-C10. A continuación, se estimularon o no con PTHrP (1-37) 100 nM durante 5 o 15 minutos para analizar la movilidad de PTH1R mediante FRAP. **(A)** FRAP calculado y porcentaje de fracción móvil de PTH1R en ausencia de CAV1. **(B)** FRAP calculado y porcentaje de fracción móvil de PTH1R en presencia de CAV1 nativa. **(C)** FRAP calculado y porcentaje de fracción móvil de PTH1R en células que sobreexpresan CAV1. Los resultados representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes. ***p<0.001 vs (-) CAV1 nativa. ****p<0.0001 vs (-) CAV1 nativa. **p<.01 vs CAV1 nativa + PTHrP 5'. ap<.0001 Vs (-) siARN CAV1. bp<.001 Vs siARN CAV1 +PTHrP 5' cp<. Vs (-) Sobreexpresión CAV1. #<.05 vs (-) siARN CAV1 PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; siARN: ARN pequeño de interferencia; EEM: error estándar de la media.

Además, en las células que sobreexpresaban CAV1, se observaron diferencias entre aquellas que presentaban una alta sobreexpresión del plásmido mCherryCaveolin-C10 y las que presentaban una baja sobreexpresión del mismo. Las células con una alta sobreexpresión del plásmido reducían con una intensidad mayor la liberación de Ca^{2+} intracelular inducida al estimular con PTHrP, en comparación con células con baja sobreexpresión de CAV1 (Fig. 30B).

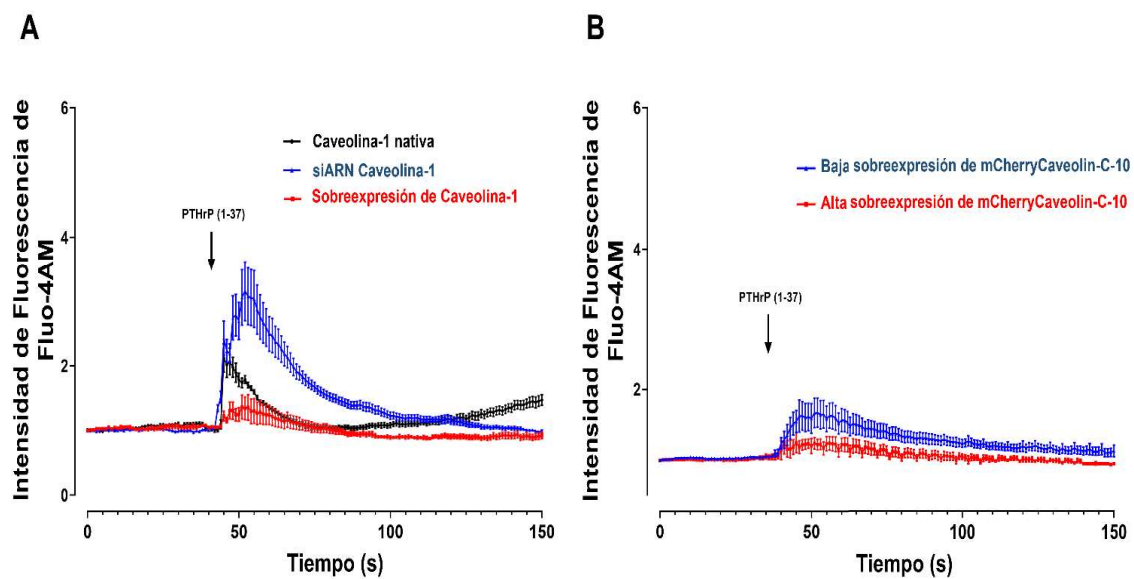


Figura 30. La localización de PTH1R en las caveolas reduce la liberación de Ca^{2+} en células osteoblásticas MC3T3-E1. (A-B) Las células MC3T3-E1 se transfectaron durante 24 horas con un siRNA específico contra *Cav1* o con una secuencia inespecífica Scrambled a modo de control. Posteriormente fueron también transfectadas o no durante toda la noche con un plásmido $\text{GFP}^{\text{PTH1R}}$ y un plásmido mCherryCaveolin-C10. Finalmente, se estimularon o no con PTHrP (1-37) 100 nM durante 10 minutos, para analizar la liberación de Ca^{2+} mediante incubación con el marcador de Ca^{2+} Fluo-4AM, a través de la toma de imágenes a intervalos de un segundo con un microscopio confocal. (A) Intensidad del Fluo-4AM en condiciones de CAV1 nativa, silenciamiento de CAV1 o sobreexpresión de CAV1, tras estimular con PTHrP. (B) Intensidad de Fluo-4AM en células con alto grado de sobreexpresión de CAV1 y células con bajo grado de sobreexpresión de CAV1. Los resultados representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes. Se cuantificaron al menos 18 células para cada condición experimental. PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; CAV1: caveolina-1; DE: Desviación estándar. siARN: ARN pequeño de interferencia.

De manera similar, se procedió a estudiar el efecto que podrían ejercer las caveolas sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida al estimular con PTHrP. Para

ello, se silenció o sobreexpresó CAV1 de forma previa a la estimulación con PTHrP. En primer lugar, la inhibición de CAV1 indujo unos niveles más altos de fosforilación de ERK 1/2 comparada con la de células con CAV1 nativa. Esta sobreestimulación fue similar a la observada en todos los grupos en todos los grupos tras 5 minutos con PTHrP, independientemente de la presencia de CAV1 o no (Fig. 31A).

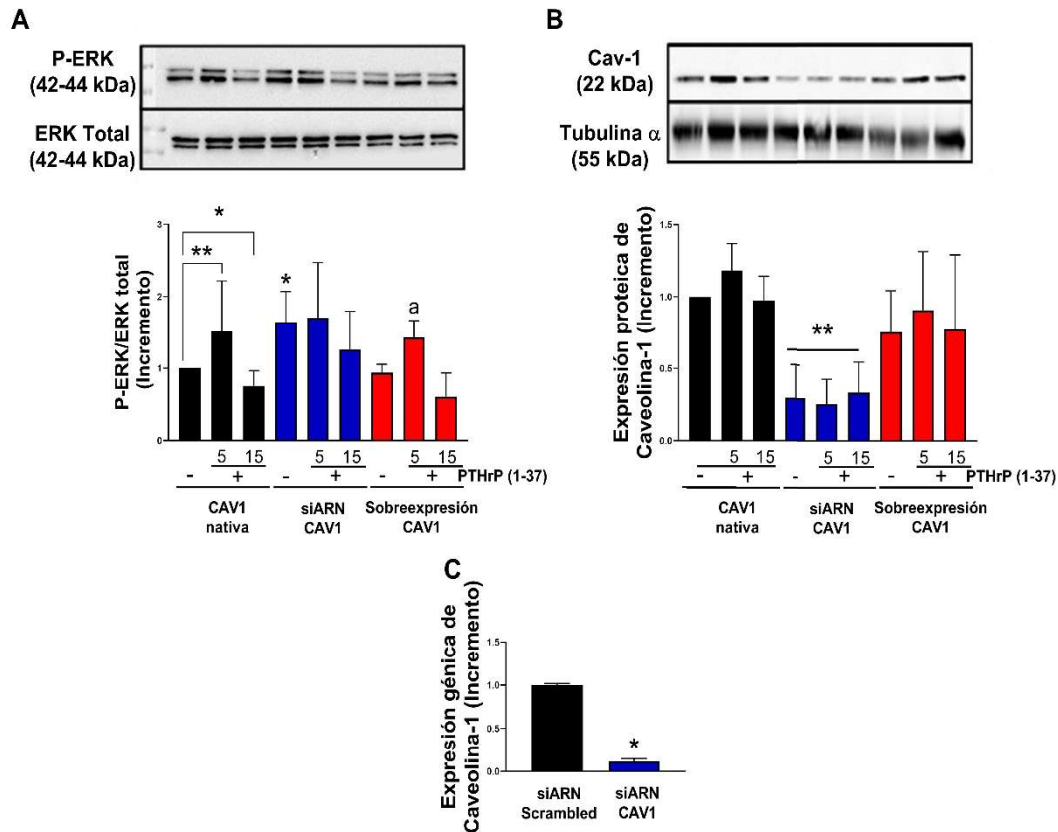


Figura 31. La localización de PTH1R en las caveolas reduce la fosforilación de ERK en células osteoblásticas MC3T3-E1. (A-B) Las células MC3T3-E1 se transfectaron durante 24 horas con un siRNA específico contra *Cav1* o con una secuencia Scrambled a modo de control. Posteriormente, se transfectaron o no durante 24 horas con un plásmido *mCherry*Caveolin-C10. Finalmente, se estimularon o no con PTHrP (1-37) durante 5 o 15 minutos. Se analizaron las bandas de 42-44 kDa, correspondientes a los tamaños predichos para P-ERK y ERK TOTAL (A), y las bandas de 22 kDa, correspondientes al tamaño predicho para CAV1 (B), empleándose tubulina α como control de carga. Se muestran autorradiogramas representativos para cada condición. (C) Control de silenciamiento de *Cav1* en el que se analizaron los niveles de expresión de ARNm mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Los resultados representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes. * $p < .05$ vs (-) CAV1 nativa. ** $p < .01$ vs (-) CAV1 nativa. ^a $p < .05$ vs (-) Sobreexpresión CAV1. PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; CAV1: caveolina-1; ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares; DE: Desviación estándar; siARN: ARN pequeño de interferencia.

Además, para los diferentes niveles de CAV1 estudiados se observa una disminución de la fosforilación de ERK a los 15 minutos del estímulo con PTHrP que no se ve afectada por la presencia o no de CAV1 (Fig. 31A). Por tanto, estos datos sugieren que la ausencia de CAV1 fomenta la fosforilación basal de ERK1/2, pero no parece afectar a la capacidad de PTHrP para fosforilar y posteriormente defosforilar ERK1/2 en células osteoblásticas MC3T3-E1.

En conjunto, estos resultados muestran que la localización de PTH1R en las caveolas reduce su movilidad y su capacidad de señalización en respuesta a la estimulación por su ligando PTHrP, en células osteoblásticas MC3T3-E1.

6. Discusión

6.1. El cilio primario como modulador de la osteogénesis y la supervivencia celular inducida por PTHrP

La activación de PTH1R en osteocitos y osteoblastos es un evento crucial en la formación y el mantenimiento óseo (81,82). Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la activación del receptor por el ligando PTHrP favorece la supervivencia celular en osteocitos y osteoblastos (116,238,267,268), al tiempo que promueve acciones osteogénicas mediante la regulación de genes implicados en el remodelado óseo en ambos tipos celulares (113,269,270). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a estas respuestas son complejos y no están completamente esclarecidos, en parte debido a la dificultad para realizar estudios *in vitro* con osteocitos como consecuencia de su naturaleza (células diferenciadas terminalmente) y localización (embebidos en la matriz ósea). Por tanto, existen dificultades para el establecimiento de líneas inmortalizadas que presenten un fenotipo similar al de los osteocitos *in vivo*. En la presente Tesis Doctoral, los estudios sobre células osteocíticas se han realizado en la línea celular MLO-Y4, inmortalizada a partir de osteocitos de huesos largos de ratón por el grupo de la Dra. L. Bonewald (234), una investigadora pionera y experta en este tipo celular (Bonewald, 2006, 2007). Esta línea celular ha sido y es ampliamente utilizada en el estudio de los osteocitos *in vitro*, debido a que expresan genes de manera similar a los osteocitos *in vivo*, caracterizándose por altos niveles de expresión de osteocalcina, E11 y Conexina-43 y baja expresión de FA. A pesar de ello, carecen del marcador osteocítico SOST (272), un importante inhibidor de la diferenciación osteoblástica que actúa sobre la vía Wnt/ β -catenina (273). Por otro lado, su morfología es similar a la de los osteocitos *in vivo*, presentando dendritas, y son capaces de desarrollar el cilio primario. Para los estudios en osteoblastos se empleó la línea de células pre-osteoblásticas de ratón MC3T3-E1, que exhibe un comportamiento muy similar al observado en cultivos primarios de osteoblastos procedentes de la bóveda craneal. Estas células presentan una gran capacidad de diferenciación y mineralización cuando son cultivadas en presencia de ácido ascórbico y fosfato inorgánico (274). Además, expresan diversos marcadores osteoblásticos, incluyendo Sialoproteína ósea (BSP), Colágeno, Osteocalcina y

PTH1R (274). Se ha demostrado que esta línea celular es útil para el estudio de los mecanismos de activación de PTH1R y sus efectos sobre la supervivencia celular (268) y el remodelado óseo (269).

En la presente Tesis Doctoral, se ha descrito que la comunicación entre las vías de señalización inducidas por PTH1R y el cilio primario desempeña un papel fundamental en la supervivencia y en las acciones osteogénicas de osteocitos y osteoblastos a través de la activación de vías de señalización tanto dependientes como independientes de Hh. La presencia de PTH1R en el cilio primario de osteocitos y osteoblastos no había sido descrita de forma previa. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral demuestran que PTH1R se localiza en el cilio primario de osteocitos y osteoblastos, tanto en ausencia de estimulación (condiciones control) como tras la estimulación de ambos tipos celulares con el ligando PTHP (1-37). Esta observación se ve apoyada por estudios recientes en los que, mediante estimulación mecánica, se incrementaba la señalización de PTH a través del transporte de PTH1R al cilio primario en células del núcleo pulposo en los discos intervertebrales (118). Por tanto, es posible que la estimulación mecánica de osteocitos y osteoblastos también incremente el transporte de PTH1R al cilio primario, promoviendo las repuestas generadas por este receptor. En todo caso, serán necesarios más estudios para analizar las implicaciones moleculares de este proceso. La localización de PTH1R en el cilio primario podría potencialmente fomentar interacciones con proteínas específicas del cilio, como ocurre, por ejemplo, con el anclaje de algunos GPCRs, incluyendo el receptor de tipo I de la hormona concentradora de melanina y el receptor de tipo III de somatostatina. Estos receptores se unen al cilio primario de neuronas hipocámpales a través de un complejo multiproteico de proteínas relacionadas con el síndrome de Bardet-Biedl (BBS), denominado BBsoma (275). Se ha descrito que la unión de PTH1R a diversas moléculas influye en la señalización inducida por el receptor (102,276,277). Además, se ha observado que la activación por ligando de PTH1R cuando se localiza en el cilio primario células del núcleo pulposo induce la activación de la señalización TGF- β para mantener la homeostasis de los discos intervertebrales durante el envejecimiento (118). Por lo tanto, la activación de PTH1R en los microdominios del cilio primario de

células óseas podría desencadenar la activación de maquinaria molecular específica que no se activa en otras regiones de la membrana plasmática y conducir a la estimulación de vías de señalización específicas del cilio primario. En este sentido, hemos observado que PTHrP induce la sobreexpresión del ligando iniciador de la vía de señalización Hh, IHH, así como del efector final de la vía, GLI1. La sobreexpresión de estos factores desencadena acciones promotoras de supervivencia, dependientes de GLI, exclusivamente en aquellas células que presentan cilio primario. La vía Hh es inducida por el cilio primario en células de hueso que desempeñan un papel predominante en la osificación endocondral durante el desarrollo del esqueleto (189). Estudios previos han demostrado que la señalización Hh requiere la presencia de un cilio primario funcional, ya que la delección de diversos genes que codifican proteínas IFT asociadas a la formación del cilio como, por ejemplo, IFT80, bloquea la ciliogénesis e inhibe la señalización Hh en cartílago postnatal durante la formación de hueso (278). De manera similar, se han demostrado interacciones entre Hh y la señalización inducida por PTHrP en condrocitos y osteoblastos en un estadio temprano de diferenciación (279,280), en el que se ha descrito que la señalización Hh promueve la diferenciación e incrementa la expresión de PTHrP en osteoblastos a través de la activación de GLI1 (279). Por otro lado, la activación constitutiva del receptor PTH1R inhibe la diferenciación condrogénica inducida por Hh a través de la inhibición de PKA (280). Sin embargo, previamente a nuestros estudios no se habían estudiado las acciones específicas de PTHrP sobre la señalización Hh en osteocitos y osteoblastos. En ratones con activación genética constitutiva de la vía Hh específica en osteoblastos maduros, se ha observado una mayor formación ósea debida al incremento de la supervivencia y proliferación de osteoblastos, así como a la estimulación de la osteogénesis (194). El análisis de la expresión génica de estos osteoblastos ha revelado que la sobreestimulación de la vía Hh no modifica los niveles del marcador de diferenciación temprana *Runx2*, pero sí induce la sobreexpresión de los marcadores de diferenciación osteoblástica *Osterix* -también un marcador temprano- y *Osteocalcina* -marcador tardío osteoblástica (194). De forma similar, en la presente Tesis Doctoral observamos una estimulación de la vía Hh

dependiente de PTHrP que, a través de la sobreexpresión de GLI1, incrementa la supervivencia celular y modula la expresión génica de diversos marcadores relacionados con el remodelado óseo en osteocitos, como la relación *Opg/Rankl*. Por otro lado, se ha demostrado que niveles altos de señalización Hh mantenidos en el tiempo en osteoblastos maduros co-cultivados con precursores mononucleares incrementan la osteoclastogénesis (194). Este efecto se atribuye a la sobreexpresión de RANKL inducida por la activación permanente de la vía Hh y modulada por PTHrP. De este modo, los ratones en los que la señalización Hh está constitutivamente activada en osteoblastos presentan un cierto nivel de osteogénesis, aunque en ellos prevalece la resorción ósea, lo que genera un hueso frágil y poroso (194). En este contexto, otros estudios han demostrado que la administración continua de PTH induce la liberación de diversos factores de crecimiento, como TGF- β , IL-6 y TNF- α para inducir la diferenciación de células CD4+ naive a células Th17 (54), células que promueven la osteoclastogénesis mediante la secreción de IL-17, TNF- α , IL-1 e IL-6 (281). Todo ello conlleva la inducción de la expresión de RANKL en las células del linaje osteoblástico, incluyendo los osteocitos (282). Los efectos observados en osteoblastos con la señalización Hh constitutivamente activada son similares a los producidos por la activación sostenida de PTH y PTHrP sobre PTH1R, traducida en un descenso de la relación OPG/RANKL que estimula la resorción ósea. Por el contrario, la estimulación intermitente con los ligandos de PTH1R ejerce el efecto opuesto, incrementando la relación OPG/RANKL y favoreciendo la formación de hueso, en un proceso regulado por el mismo receptor actuando sobre un grupo similar de genes (89,113). El patrón de estimulación empleado en los experimentos de esta Tesis Doctoral simula un patrón intermitente de estimulación -dada la exposición relativamente breve de las células al péptido PTHrP- y muestra únicamente características osteogénicas dirigidas por la activación de la señalización Hh en osteocitos y osteoblastos. Así, en contra de lo observado en casos con estimulación continua, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que la estimulación transitoria de la vía Hh con PTHrP induce efectos pro-supervivencia y desencadena respuestas osteogénicas, minimizando la expresión de señales resorptivas, en osteocitos y osteoblastos. En

contraste, estudios recientes han demostrado que la inhibición de la vía Hh en macrófagos derivados de médula ósea induce diferenciación osteoclástica mediada por la reducción en los niveles de expresión de los factores de la vía Hh, SMO y GLI1 (283). Estas observaciones indican diversas funciones de la vía de señalización Hh en función del tipo celular en el que se exprese, así como de sus patrones y tiempos de activación.

Con respecto a los efectos en la supervivencia celular inducidos por GLI1 observados en osteocitos y osteoblastos, se han asociado incrementos de supervivencia celular en diversos tipos celulares con modulación ejercida por GLI (194,284,285). En células de carcinoma de colon, la activación de los factores de transcripción GLI favorece la supervivencia celular al menos a dos niveles: mediante la prevención de daño en el ADN (285) y también por activación de la región promotora de BCL-2, una proteína de la familia de proteínas anti-apoptóticas Bcl2 (junto con BCL-xl) que actúan inhibiendo la actividad de las proteínas BAX para prevenir la liberación de caspasas desde las mitocondrias. Otros estudios han determinado que el incremento BCL2/BAX actúa como modulador de la apoptosis inducida por la activación del receptor de andrógenos en osteocitos y osteoblastos (286). También en el tejido óseo, diversos modelos *in vivo* han demostrado que la sobreexpresión de BCL-2 induce un incremento en la proliferación de osteoblastos sin afectar a los procesos apoptosis, al tiempo que inhibe su diferenciación, mientras que, por el contrario, induce apoptosis en osteocitos (287). Por el contrario, en ratones transgénicos que sobreexpresan BCL-xl, sí se observa una inhibición de la apoptosis en osteoblastos, al tiempo que presentan una diferenciación osteoblástica y un desarrollo de los osteocitos normal, lo que indica que BCL-2 y BCL-xl desempeñan distintas funciones en la diferenciación celular y la apoptosis en células óseas (288). En células de condrosarcoma, se ha descrito un arresto en la fase G2/M del ciclo celular que conduce a un descenso de la supervivencia, a través de la modulación de BCL-2 y BCL-xl, así como de la inducción de autofagia dependiente de la defosforilación de m-TOR (284). Estos procesos se encuentran modulados por la activación de la señalización ERK1/2, una vía implicada en la regulación de diversos procesos relacionados con el descenso en la proliferación, como la

apoptosis, autofagia y senescencia *in vivo* e *in vitro* (284,289). Relativo a esta regulación en hueso, se ha observado que la represión de la señalización ERK1/2 refuerza la inhibición de GLI1 de manera independiente de SMO, al tiempo que reduce la expresión de RUNX2, con el objetivo de evitar una proliferación celular excesiva (290). Por tanto, la regulación de GLI parece desempeñar un papel clave en la regulación de la supervivencia en los diferentes estados de diferenciación de los osteoblastos, dado que GLI afecta tanto a osteoblastos como a osteocitos.

PTH y PTHrP señalizan a través del mismo receptor y tienen perfiles agonistas similares al estimular las vías de señalización dependientes de PTH1R (102). Así, es posible que ambos péptidos tengan efectos similares en osteocitos y osteoblastos. Sin embargo, PTHrP y PTH muestran un agonismo parcial en el que regulan de manera diferente diversas vías de señalización intracelular como la vía dependiente del AMPc, lo que genera diferencias sustanciales en los niveles intracelulares de AMPc tras estimular con uno u otro péptido (102). Así, es posible que, aunque PTH y PTHrP puedan estimular al mismo receptor, desencadenen diferentes duraciones y magnitudes de activación de GLI1 en osteocitos y osteoblastos. Estas diferencias pueden implicar cambios en la supervivencia celular y en las respuestas de expresión génica inducidas por PTH o PTHrP. Además, observamos que algunas acciones desencadenadas por PTHrP, como la sobreexpresión de *Runx2* y *Osteocalcina* o el incremento de *Opg* no se ven afectadas por la inhibición de GLI1 o el silenciamiento de *Ift88*, respectivamente. Estudios previos muestran que *Osteocalcina* y *Runx2* son sobreexpresados por PTHrP (1-37) o por el péptido análogo PTH (1-34) a través de la activación de señalización dependiente de AMPc (291–293). Sin embargo, no se observa que la estimulación de la vía Hh inducida por PTHrP produzca una regulación de los niveles de *Osteocalcina* en osteocitos y osteoblastos, así como tampoco modula los niveles de expresión de *Runx2* en osteoblastos, lo que sugiere que existen vías alternativas relacionadas con el cilio primario por las que PTHrP modula estos factores. *Osteocalcina* es un marcador de diferenciación terminal de osteoblastos que modula la mineralización ósea (251). Con anterioridad se ha demostrado que la activación de PTH1R mediante

ligando -en este caso, PTH (1-34)- incrementa la expresión de Osteocalcina (294) y RUNX2 (295) *in vivo*. De forma similar, se ha descrito en células progenitoras mesenquimales un incremento en los niveles de expresión de Osteocalcina y RUNX2 inducido mediante la activación de las vías de señalización BMP-2, Wnt/ β -catenina y FGF (296–298), estrechamente relacionadas con el cilio primario (246,299–301). Por lo tanto, es posible que la estimulación por ligando de PTH1R active estas vías de señalización en el cilio primario para inducir la expresión de *Osteocalcina* y *Runx2* en células óseas, aunque serán necesarios más estudios para analizar los efectos de la activación de otras vías de señalización asociadas al cilio primario sobre las acciones de PTH1R en la osteogénesis y regulación del remodelado óseo. Por otro lado, se ha observado que RUNX2 induce la expresión de diversos genes relacionados con la vía de señalización Hh, incluyendo *Ihh* y *Gli1* (298), lo que permitiría proponer que RUNX2 actúa como modulador de la activación de la vía Hh observada en osteocitos y osteoblastos.

PTH y PTHrP también regulan los niveles de OPG a través de la activación del AMPc en células estromales de médula ósea (302). Ambos péptidos reducen la expresión de OPG al tiempo que inducen la sobreexpresión de RANKL, siendo ambos procesos mediados por la señalización AMPc/PKA. El descenso resultante en la relación OPG/RANKL se traduce en un incremento de la osteoclastogénesis cuando las células estromales son co-cultivadas con precursores osteoclásticos (302,303). Sin embargo, en estas células, la estimulación directa de PKC con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato provoca un aumento en la expresión de OPG sin afectar a la expresión de RANKL, lo que se traduce en un aumento de la relación OPG/RANKL que antagoniza los efectos mediados por AMPc/PKA, promoviendo la osteogénesis (302,303). De manera similar, es posible que el aumento en los niveles de *Opg* observado en osteocitos y osteoblastos en esta Tesis se deba a una activación de PKC inducida por la estimulación de PTH1R, a través del reclutamiento de la proteína $G_{\alpha q}$ y la activación de PLC (102). En este contexto, en la presente Tesis Doctoral se ha observado que esta vía de señalización está implicada en la inducción de supervivencia en osteocitos en respuesta a la estimulación con PTHrP. Los

efectos pro-supervivencia de PKC han sido previamente descritos (116,304), lo que refuerza la idea de que pueda desempeñar, en estas condiciones, funciones osteogénicas a través de la sobreexpresión de OPG. En conjunto, nuestros datos sugieren que la señalización PTH1R en osteocitos y osteoblastos -al menos las vías de señalización relacionadas con AMPc y PLC- no se ve afectada por el silenciamiento del cilio primario o la inhibición de GLI1.

En esta Tesis Doctoral se muestra por primera vez que el cilio primario es un importante mediador de las acciones de PTH1R en osteocitos y osteoblastos. Además, la activación de la vía de señalización hedgehog parece ser un evento indispensable mediante el que PTH1R y el cilio primario cooperan para inducir la supervivencia celular. **Nuestros resultados indican que PTH1R induce acciones pro-supervivencia a partir de mecanismos tanto dependientes del cilio primario como de la activación de Hh, mientras que modula las respuestas osteogénicas a través de vías dependientes del cilio primario pero independientes de GLI1 en osteocitos y osteoblastos (Fig. 32).**

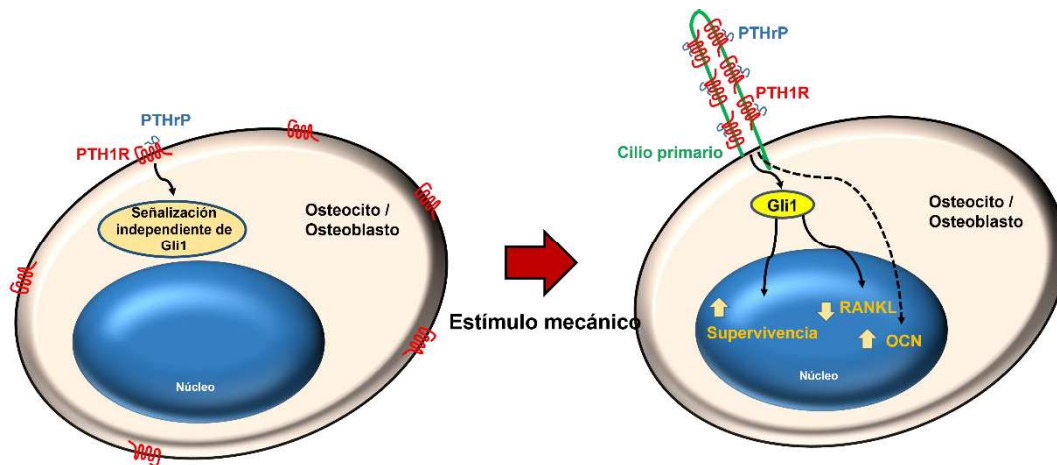


Figura 32. Mecanismo propuesto para la regulación del cilio primario sobre los efectos pro-supervivencia y las acciones osteogénicas de PTHrP en osteocitos y osteoblastos. PTHrP induce acciones pro-supervivencia a través de mecanismos dependientes del cilio primario y de Gli1, e induce la sobreexpresión de los genes osteogénicos *Runx2*, *Osteocalcina* y *Fa* a través de mecanismos dependientes del cilio primario pero independientes de Gli1, en osteocitos y osteoblastos. PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; Runx2: factor 2 de transcripción relacionado con Runt; Fa: Fosfatasa alcalina.

6.2. Efecto combinado de la estimulación por ligando y la estimulación mecánica de PTH1R en osteocitos y osteoblastos

En la presente Tesis Doctoral se ha determinado que la estimulación mecánica mediante el paso de flujo de fluido (FF) incrementa el porcentaje de células que presentan cilio primario en osteocitos y osteoblastos y produce un aumento en la longitud del cilio primario observado en osteoblastos. Anteriormente, se ha descrito que interacciones hidrodinámicas incrementan la longitud del cilio primario de diversos tipos celulares (130), en un proceso que probablemente implique un descenso en los niveles de Ca^{2+} , un aumento en los niveles de AMPc y PKA (305), y la regulación de la vía de señalización m-TOR (306,307); sin embargo, la regulación ejercida por esta vía sobre la longitud del cilio ha mostrado resultados controvertidos hasta el momento. Por un lado, se ha descrito que el inhibidor de la vía m-TOR, rapamicina, induce ciliogénesis, produciendo, sin embargo, un acortamiento del cilio primario (308), mientras que su activación incrementa la longitud del cilio primario (309). Por el contrario, otros estudios en células epiteliales renales y endoteliales indican que la rapamicina

induce un aumento en la longitud del cilio primario que incrementa la sensibilidad a la estimulación por flujo de fluido (307). Por tanto, la vía m-TOR modula la ciliogénesis y la estabilidad ciliar en algunos tipos de células, aunque los mecanismos moleculares mediante los que llevaría a cabo esta regulación en células óseas aún no han sido estudiados.

Los receptores y enzimas de la vía de señalización Notch, implicados en la diferenciación osteoblástica, la función osteoclástica dependiente de osteoblastos y el destino celular en células progenitoras mesenquimales (310), pueden también encontrarse localizados en el cilio primario. En este sentido, la activación de Notch es capaz de modular ciliogénesis (311), incrementar la longitud del cilio primario (312) y la inducción de la vía Hh mediante la acumulación de SMO en el cilio (246,313). Por ello Notch podría ser otro candidato a modular las propiedades del cilio primario en células óseas en respuesta a estímulo mecánico. Por otro lado, el aumento en el número de células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica podría estar inducido por la expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2, ya que ha sido descrito como un inductor de la ciliogénesis y de la vía de señalización Hh (314) implicado en las propiedades mecánicas del hueso y la formación de hueso en respuesta a estimulación mecánica (315). En base a estas observaciones, y dada la naturaleza del cilio primario como centro organizador de señalización, es posible que el aumento en la ciliogénesis y longitud del cilio primario observados en esta Tesis Doctoral en respuesta a la estimulación con FF puedan potenciar la señalización de PTH1R inducida por ligando. En este contexto, se ha observado que PTHrP ejerce efectos aditivos a la carga mecánica en el incremento de la formación ósea y la prevención de la apoptosis osteocítica a través de la activación de ERK1/2 y la translocación nuclear de β -catenina (267), lo que serviría de apoyo a la hipótesis anteriormente propuesta.

Varios estudios han relacionado diversos cambios en la ciliogénesis y el porcentaje de células con cilio primario con distintos procesos asociados con el envejecimiento o senescencia, así como con diversas patologías. Así, se ha observado en fibroblastos senescentes un aumento en la frecuencia y longitud del cilio primario que correlacionan con bajos niveles de expresión de la vía Hh

(233). Por el contrario, en células del disco intervertebral se ha observado que el envejecimiento induce un descenso en el porcentaje y la longitud del cilio primario (316). Además, se ha establecido una correlación entre la elongación del cilio primario y la alteración de la mecanotransducción celular en osteoblastos de pacientes con escoliosis idiopática, lo que conlleva una reducción en los niveles de diversos factores osteogénicos como BMP-2 y RUNX2 (317).

Por lo tanto, es posible que incrementos en el porcentaje y la longitud del cilio primario debidos a causas fisiológicas, como la estimulación mecánica debida a interacciones hidrodinámicas, sean capaces de promover la señalización anabólica de diversos receptores acoplados a él, como es el caso de PTH1R, mientras que alteraciones en la ciliogénesis o incrementos/reducciones en la longitud ciliar debidas a patologías, senescencia o envejecimiento, reduzcan la señalización de diversos receptores acoplados al cilio primario.

6.3. Las caveolas modulan la dinámica de movilización e internalización de PTH1R

Con anterioridad, se ha descrito la localización de diversos GPCRs en las caveolas de diversos tipos celulares, como el receptor B2 de bradicidina, el receptor β -adrenérgico, el receptor de colecistoquinina, los receptores A₁ de adenosina, los receptores muscarínicos de acetilcolina, el receptor de endotelina A (ET_AR), VPAC2 y GLP-1R (208,209,318–323). Sin embargo, la presencia de PTH1R en las caveolas de osteoblastos no había sido descrita con anterioridad. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral demuestran que parte del conjunto de receptores PTH1R endógenos situado en la membrana plasmática se sitúan en las caveolas de las células osteoblásticas MC3T3-E1. Además, la sobreexpresión simultánea del receptor conjugado con la proteína fluorescente verde GFP^(GFPPTH1R) y de CAV1 conjugada con la proteína fluorescente roja mCherry (^{m-Cherry}Caveolin-C-10), permitió observar que la co-localización no solo se produce a nivel de la membrana plasmática, sino que también se produce en endosomas localizados en el citoplasma. Esto indica que la internalización del

receptor puede producirse también a partir de endosomas derivados de las caveolas, como ha sido descrito para GLP-1R tras su activación (209). En otros GPCRs estudiados hasta la fecha en distintos tipos celulares, la localización en las caveolas puede darse tras la activación del receptor por la unión del agonista, como en el caso del receptor de bradicidina, los receptores de tipo I y II de angiotensina y el receptor muscarínico m2 de acetilcolina (319,324,325). También puede ocurrir que el receptor se encuentre localizado en las caveolas en ausencia de estimulación y que se produzca la salida del mismo de las caveolas tras su activación, como ocurre en el receptor A₁ de adenosina, el receptor β₂-adrenérgico y el receptor B₂ de bradicidina (318,322). Al igual que ocurre con PTH1R en la presente Tesis Doctoral, la activación por ligando del receptor ET_AR no modifica, al menos durante varios minutos tras la estimulación, su localización caveolar (326).

De manera similar a lo observado en el cilio primario, la localización de PTH1R en las caveolas puede promover interacciones con otras proteínas localizadas en esta región de la membrana plasmática, lo que podría desencadenar la activación de maquinaria molecular específica que no se activa en otras regiones de la membrana plasmática. Esta localización temporal también podría modular la activación del receptor de un modo distinto, ya sea modificando la magnitud o temporalidad, respecto a la activación en otras zonas de la membrana plasmática. A este respecto, estudios previos han demostrado que la localización de diversos GPCRs en las caveolas puede modular su estabilidad (326), internalización (209,327) y su capacidad de señalización (321).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, la localización de PTH1R en las caveolas de células osteoblásticas reduce su capacidad de internalización en respuesta a su activación por el ligando PTHrP (1-37). Cuando PTH1R se localiza en la membrana plasmática y es estimulado por los ligandos PTH/PTHrP, se produce rápidamente el reclutamiento de las β-arrestinas 1 y 2, las cuales inducen la internalización del complejo ligando-receptor en endosomas (110,328). El proceso de internalización del receptor difiere en función del ligando, ya que los endosomas que contienen complejos PTH-PTH1R-arrestina son muy estables y continúan señalizando durante largos

periodos de tiempo (>30 minutos) a través de la activación del AMPc (109), mientras que los complejos PTHrP-PTH1R-arrestina son más inestables y son degradados rápidamente tras la internalización, estando su capacidad de señalización además limitada a la membrana plasmática (264). En ambos casos, PTH1R puede ser reciclado a la membrana plasmática (329). Estudios previos han demostrado que las caveolas constituyen una vía alternativa con distintos compartimentos celulares para conseguir dirigir los ligandos que capturan a los endosomas tardíos/lisosomas (330), en un proceso que implica la fosforilación de las caveolinas, el reclutamiento y la activación de la proteína motora dinamina y la reorganización del citoesqueleto (330). En este contexto, se ha observado que los GPCRs VPAC2 y GLP-1R son internalizados al interior celular asociados con CAV1 en células de músculo liso y células β , respectivamente (208,209). Por otro lado, en células óseas se ha observado que CK2.3, un péptido que actúa mimetizando la activación de BMPRIa y estimulando la vía de señalización ERK para la inducción de osteogénesis, es internalizado en un proceso mediado por las caveolas (331). Además, otros componentes de las caveolas, como la cavina-1, tienen la capacidad de alterar la internalización de vesículas extracelulares derivadas de células de cáncer de próstata que metastatizan a hueso, para atenuar la osteoclastogénesis y la proliferación osteoblástica mediadas por estas vesículas (332). Por tanto, es posible que la internalización de PTH1R cuando se localiza en las caveolas ocurra de forma diferente a la internalización mediada por β -arrestinas que tiene lugar en la membrana plasmática y, debido a ello, podamos observar diferencias en las cinéticas de internalización. En cualquier caso, serán necesarios más experimentos para identificar la maquinaria molecular encargada de la internalización de PTH1R en los osteoblastos en relación a las caveolas.

En esta Tesis Doctoral también se ha observado que la localización de PTH1R en las caveolas reduce su capacidad de difusión en la membrana plasmática, tanto en condiciones control (no estimuladas) como tras la estimulación con PTHrP (1-37). Estudios previos mediante la técnica de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueamiento (FRAP) han mostrado un incremento en el porcentaje de fracción inmóvil del receptor de tipo 2 de bradicidina (B_2R)

cuando este se localiza en las caveolas (333), lo que probablemente se deba a una barrera que ralentiza la difusión en los microdominios caveolares y, que de forma no específica, afecta a grandes proteínas transmembranales. Un efecto similar podría estar ocurriendo también con PTH1R en los osteoblastos. Por otro lado, la estimulación de PTH1R con el ligando PTHrP (1-37) incrementa el porcentaje de fracción móvil del receptor tanto en presencia como en ausencia o sobreexpresión de CAV1. Esto sugiere por una parte que el ligando puede causar disociación del receptor con estructuras que lo inmovilicen en membrana, como puede ser la caveolina-1. Además, indica que, aparte de las caveolas, deben existir otras estructuras moleculares en la membrana plasmática que retienen a PTH1R y que causan baja difusión del receptor en ausencia de caveolina. En este contexto, se ha observado que PTH1R presenta un dominio de anclaje al citoesqueleto de actina y de unión al factor regulador intercambiador Na^+/H^+ 1 (NHERF1), una proteína que ensambla complejos macromoleculares y regula la localización, movilidad y señalización de diversos GPCRs. De esta forma, cuando se produce la activación de PTH1R, NHERF1 se disocia rápidamente del receptor e induce su agregación en grandes complejos enriquecidos en ezrina (una proteína de unión a actina) y clatrina, y se produce una interacción entre PTH1R y ezrina, de manera que se induce un cambio conformacional que estabiliza al primero en la membrana plasmática y produce la rápida inactivación de la ezrina (237,334). Esto favorece la internalización y correcta señalización del receptor. También, se ha observado que el reclutamiento de β -arrestinas al receptor no se produce hasta que no se ha disociado de NHERF1 (237), lo que afecta a la localización, difusión y capacidad de señalización del receptor.

6.4. Las caveolas modulan la señalización desencadenada por PTH1R en respuesta a su estimulación por PTHrP

Los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que la localización de PTH1R en las caveolas reduce la señalización desencadenada por el receptor en respuesta al estímulo por el ligando PTHrP. Por un lado, se ha observado que

la presencia de PTH1R en las caveolas reduce la liberación de Ca_i^{2+} inducida por PTHrP (1-37). Diversos trabajos han indicado que CAV1 actúa como un modulador positivo de la señalización de Ca_i^{2+} , por ejemplo, en receptores muscarínicos de células de tiroides. Tras la interacción con el receptor, CAV1 modula la liberación de Ca_i^{2+} a través de su unión a $G_{\alpha q}$, lo que provoca la liberación del dímero $G\beta\gamma$, prolongando así el tiempo en el que el heterotrímero se encuentra disociado, y causando una señalización de Ca^{2+} sostenida (214). De manera similar, el silenciamiento de la expresión de CAV1 reduce la intensidad de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por los receptores de bradicidina e histamina en células musculares lisas (335,336). Además, la deficiencia de CAV1 en células endoteliales se ha asociado a deficiencias en la vasodilatación inducida por la señalización de Ca^{2+} en respuesta a estrés mecánico y a acetilcolina (337). Sin embargo, estudios recientes en la línea celular osteoblástica MC3T3-E1 han demostrado que CAV1 atenúa la liberación de Ca_i^{2+} inducida por la activación de un receptor purinérgico de ATP, $\text{P2X}_7\text{R}$. La activación de este receptor en células del linaje osteoblástico induce la expresión de diversos marcadores génicos como Osterix y Osteocalcina, lo que conduce a un incremento en la osteogénesis (338). La regulación ejercida por CAV1 sobre la señal de Ca_i^{2+} inducida por $\text{P2X}_7\text{R}$ podría actuar como un mecanismo para evitar la señalización continua por parte del receptor, dado que la activación permanente del receptor induce apoptosis en diversas líneas celulares, lo que tiene implicaciones en la mineralización y la proliferación ósea, si bien es cierto que en células óseas no se ha visto activación de caspasas tras la activación de $\text{P2X}_7\text{R}$ (225,339). Así, una fracción de receptores $\text{P2X}_7\text{R}$ se sitúa en las caveolas, aunque sin interaccionar directamente con CAV1. Su activación mediante la estimulación con ATP induce la endocitosis de las caveolas, lo que puede alterar la disponibilidad de diversas proteínas asociadas con la vía de señalización de $\text{P2X}_7\text{R}$ localizadas en la membrana plasmática. Por lo tanto, es posible que la menor liberación de Ca_i^{2+} observada tras sobreexpresar CAV1 en esta Tesis Doctoral responda a un mecanismo regulador por parte de CAV1 sobre PTH1R, que conduzca a su endocitosis con el objetivo de evitar su

activación prolongada, de manera similar a la regulación ejercida sobre P2X₇R en células osteoblásticas.

Por otro lado, se analizaron los efectos de la localización de PTH1R en las caveolas sobre la capacidad del receptor para inducir fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la estimulación por ligando. Así, observamos que el silenciamiento de *Cav1* indujo hiperfosforilación de ERK1/2 en condiciones basales (no estimuladas), que no se veía incrementada tras la estimulación con PTHrP. Anteriormente, se ha descrito en fibroblastos -tanto *in vivo* como *in vitro*- (340,341) que la inhibición de la expresión de CAV1 induce estimulación permanente de la cascada ERK1/2 iniciada por la activación de diversos GPCRs. Esto se traduce en la regulación de diversas respuestas de crecimiento o diferenciación (342). De manera similar, la sobreexpresión de CAV1 también inhibe la activación de la señalización ERK1/2 inducida por el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), reduciendo la proliferación celular en células endoteliales fetoplacentales ovinas (343). Por otro lado, se ha observado en osteocitos que la estimulación mecánica activa VEGFR2 a través de un mecanismo dependiente de CAV1, lo que a su vez promueve la activación de ERK1/2 e induce efectos anti-apoptóticos (224). En este sentido, se ha demostrado que la integridad de las caveolas es necesaria para la activación de la señalización ERK1/2, ya que se ha observado que, si bien la inhibición de las caveolas empleando agentes de depleción del colesterol como metil β ciclodextrina inducen niveles basales más altos de fosforilación de ERK1/2 (343), se reduce la capacidad de diversos receptores, sean o no GPCRs, para inducir respuestas de activación de la señalización ERK1/2, como ocurre con VEGF2, CaR -un receptor sensor de calcio- o ET_BR (326,340,343). Por lo tanto, es posible que la señalización ERK1/2 inducida por PTH1R en las caveolas se desencadene de manera similar a la inducida por los receptores previamente comentados, y que la retención de ERK1/2 por parte de CAV1 en las caveolas impida su translocación al núcleo y reduzca la proliferación y supervivencia celular. La activación constitutiva de ERK1/2 que se produce al inhibir la expresión de CAV1, si bien se ha descrito que puede tener efectos pro-supervivencia en diversos tipos celulares, como las células estromales del

endotelio (344), los cardiomiocitos (345) y los osteocitos (223), podría desembocar en una proliferación celular descontrolada, dando lugar a la aparición de tumores a través de la activación de ciclinas D dependientes de quinasas y de la vía de señalización m-TOR (346,347). En contraste, también se ha descrito que la activación permanente de ERK1/2 es capaz de inducir la detención de la proliferación, apoptosis, autofagia y senescencia (289), como ocurre en fibroblastos transformados de ratón (348) o en queratinocitos humanos (349), entre otros tipos celulares. Por tanto, el proceso de defosforilación de ERK1/2 resulta un proceso clave para evitar la activación constitutiva de la señalización. Nuestros resultados nos permiten observar que la estimulación con PTHrP durante 15 minutos dio lugar a la defosforilación de las células hiperfosforiladas, probablemente debido a la activación de fosfatasas asociadas a MAPK (MKP) como MKP1, que en células óseas reduce los niveles de fosforilación de ERK1/2 para proteger a las células del estrés oxidativo (350) y para disminuir la proliferación celular excesiva (351,352).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que las caveolas, y en particular CAV1, actúan como moduladores negativos de la movilidad, internalización y señalización inducida por la activación por ligando de PTH1R (Fig. 33). Esto puede deberse a que las caveolas se encuentran compartimentalizadas y presentan numerosas diversas moléculas que podrían reducir la accesibilidad de otras moléculas que en diferentes circunstancias se asociarían a PTH1R cuando el receptor se encuentra en las caveolas. De este modo, las proteínas G que se acoplan al receptor activado podrían tener mayor dificultad para desplazarse por la caveola y transducir sus señales. El propio ligando podría tener dificultado su acceso al receptor cuando este se encuentra situado en las caveolas.

Por el contrario, como se comentó en la introducción, se ha descrito que la capacidad de las caveolas para regular su forma o el tráfico molecular hacia/desde la membrana plasmática para adaptarse a estímulos mecánicos es capaz de inducir la activación de diversas vías de señalización en distintos tipos celulares (221,223). En células del linaje osteoblástico, se ha observado que Cav1 resulta esencial para la activación de la señalización ERK1/2 en respuesta

a mecanoestimulación, lo que promueve la supervivencia celular (223,224). Estos efectos pro-supervivencia requieren de la presencia de caveolas funcionales (222). Además, se ha descrito previamente que estos efectos pro-supervivencia que implican la fosforilación de ERK1/2 están modulados por PTH1R (116). Sin embargo, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de CAV1 no induce un incremento de la fosforilación de ERK1/2 ni un mayor aumento de la respuesta a la estimulación por ligando. Por tanto, es posible que la activación de PTH1R mediante estimulación mecánica ejerza efectos diferentes a la activación por ligando cuando el receptor se encuentra en las caveolas.

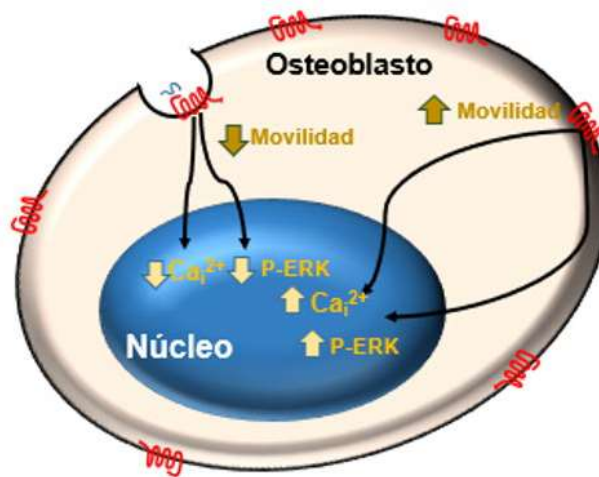


Figura 33. Mecanismo propuesto para la activación del PTH1R en las caveolas de osteoblastos. La localización de PTH1R en las caveolas reduce su movilidad, su capacidad de internalización, la liberación de Ca^{2+} y la fosforilación de ERK1/2 inducida por su estimulación con el ligando PTHrP. PTH: hormona paratiroidea; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo I de la PTH Ca^{2+} : calcio intracelular; ERK1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares.

6.5. Relación del cilio primario y las caveolas con patologías relacionadas con el envejecimiento

Estudios previos han descrito la presencia de un número aumentado de caveolas en diversas patologías relacionadas con el envejecimiento (353,354). Según los resultados obtenidos en esta Tesis, puede sugerirse que la abundancia de caveolas esté actuando como un inhibidor de la señalización y produzca una

reducción en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Además, la expresión de CAV1 se encuentra incrementada en diversos tipos de células senescentes, como fibroblastos (355) o células estromales de médula ósea (356), células no activas metabólicamente que se acumulan en los tejidos durante el envejecimiento. También se ha demostrado que la señalización p53-p21, mediada por CAV1, promueve la adquisición de un fenotipo senescente cuando las células del núcleo pulposo son sometidas a estrés oxidativo, como ocurre en diversas enfermedades crónicas asociadas con el envejecimiento, como la osteoporosis (357). Además, CAV1 puede promover daño en el ADN a través del bloqueo de EGFR o elevando los niveles de radicales libres mediante la inhibición de diversos antioxidantes como Trx1 y Nrf2 (358,359). Por tanto, se ha propuesto que el número incrementado de caveolas observado en las células senescentes no sean funcionales. Paradójicamente, la reducción en los niveles de expresión de CAV1 también puede inducir senescencia de forma prematura, de manera que CAV1 representa un regulador pleiotrópico de la senescencia celular. Niveles elevados de CAV1 contribuyen al desarrollo de senescencia replicativa prematura en respuesta a estrés celular, mientras que su deficiencia promueve senescencia prematura en células quiescentes a través de la inducción de la formación del cilio primario y de alteraciones en la función mitocondrial (360). Por lo tanto, de acuerdo a la bibliografía y a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, parece que el número de caveolas afecta a una amplia cantidad de vías de señalización y respuestas celulares, en las que participa tanto como modulador positivo como negativo.

Por otro lado, se han relacionado anomalías en el porcentaje de células que presentan cilio primario, así como en la longitud del mismo, con la progresión de diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, especialmente aquellas relacionadas con neurodegeneración, como las enfermedades de Alzheimer o Parkinson. De este modo, se ha observado un alargamiento del cilio primario relacionado con el envejecimiento en diversos tipos neuronales (361). Se ha descrito que, durante el desarrollo, tanto el cilio primario como las vías de señalización relacionadas con él modulan la proliferación y quiescencia de células progenitoras neurales, lo que podría contribuir a la regulación del

envejecimiento (362). En este contexto, se ha relacionado la deficiencia en la activación de las vías de señalización Shh, Wnt o Notch con diversas alteraciones metabólicas relacionadas con el envejecimiento (363–365). Además, se ha relacionado la incapacidad para desensamblar de forma correcta el cilio primario con el desarrollo de senescencia prematura (360).

De este modo, puede proponerse que la modulación del tráfico del receptor PTH1R por la membrana plasmática, entre diversos centros transductores de señalización, como el cilio primario o las caveolas, podría constituir una potencial diana terapéutica en el tratamiento de diversas patologías asociadas al envejecimiento, como la osteoporosis.

7. Conclusiones

1. Parte de los receptores de tipo I de la PTH se localizan en el cilio primario de osteocitos y osteoblastos, tanto en ausencia de estimulación como tras su activación por el ligando PTHrP.
2. PTHrP regula la expresión de diversos genes osteogénicos a través de mecanismos dependientes del cilio primario pero independientes de la vía de señalización Hh.
3. PTHrP induce la supervivencia celular en osteocitos y osteoblastos a través de mecanismos dependientes tanto del cilio primario como de la vía Hh.
4. La estimulación mecánica mediante FF incrementa el porcentaje de células óseas que presentan cilio primario, así como la longitud del mismo en osteoblastos.
5. Una fracción de los receptores PTH1R se sitúan en las caveolas de células osteoblásticas.
6. La localización de PTH1R en las caveolas reduce su capacidad de difusión en la membrana plasmática, así como su internalización.
7. La localización de PTH1R en las caveolas disminuye la liberación de Ca^{2+} y la fosforilación de ERK1/2 inducidas por la estimulación con el ligando PTHrP.

La localización de PTH1R en diferentes subestructuras de la membrana plasmática, como el cilio primario o las caveolas, modula su capacidad de activación y las vías de señalización desencadenadas por él en respuesta a la estimulación por su ligando PTHrP, en osteocitos y osteoblastos.

8. Conclusions

1. A pool of PTH type I receptors is located in the Primary cilium of osteocytes and osteoblasts, both in the absence or presence of PTHrP ligand stimulation.
2. PTHrP regulates the expression of several osteogenic genes through primary cilium-dependent and Hh signaling-independent mechanisms.
3. PTHrP induces cell survival in osteocytes and osteoblasts through primary cilium- and Hh signaling-dependent mechanisms.
4. Mechanical stimulation by FF increases the percentage of bone cells that present primary cilia, as well as the length of primary cilium in osteoblasts.
5. At least a fraction of PTH1R is located in the caveolae of osteoblastic cells.
6. Caveolar location of PTH1R reduces the receptor diffusion at the plasma membrane, as well as its internalization.
7. Caveolar location of PTH1R decreases Ca_i^{2+} release and phosphorylation of ERK1/2 induced by PTHrP ligand stimulation.

PTH1R location in different subcellular structures in the plasma membrane, such as the primary cilium and caveolae, modulates receptor activation and signaling pathways induced by PTHrP ligand stimulation, in osteocytes and osteoblasts.

9. Limitaciones

del estudio.

Perspectivas

futuras

En la presente Tesis Doctoral existen diversas limitaciones a tener en cuenta. En primer lugar, la totalidad de los experimentos se ha llevado a cabo empleando líneas celulares de ratón establecidas. Esto significa que en esta Tesis Doctoral no se han analizado los efectos de la distinta señalización de PTH1R en función de su localización subcelular en organismos completos, por lo que serán necesarios más experimentos en diversos modelos animales que corroboren los resultados obtenidos. En relación a los modelos celulares empleados, las células MLO-Y4 son células osteocíticas que presentan diferencias en cuanto a los niveles de expresión de ciertos marcadores clásicos de osteocitos, siendo la más destacable la ausencia de expresión de SOST. Algo similar ocurre con las células MC3T3-E1, ya que, aunque se comportan de manera similar a osteoblastos primarios de la bóveda craneal, no pueden considerarse osteoblastos en sentido estricto, sino células pre-osteoblásticas. De nuevo, este hecho deja patente la necesidad de experimentos en modelos animales que corroboren los resultados obtenidos.

La hipótesis más aceptada actualmente sobre cómo las células óseas sienten *in vivo* la estimulación mecánica se basa en el aumento del flujo de fluido intersticial en el sistema lacuno-canalicular. Por tanto, la técnica aplicada para la estimulación mecánica de las líneas celulares MLO-Y4 y MC3T3-E1, el FF, es capaz de afectar a la deformación celular a través de la simulación de un flujo sobre una monocapa de células, todo ello dentro del rango fisiológico estimulado para osteocitos y osteoblastos *in vivo*. Sin embargo, los osteocitos *in vivo* se encuentran embebidos en matriz ósea en un entorno tridimensional, no dispuestos como una monocapa, por lo que serían necesarios más experimentos en modelos animales que confirmen los resultados obtenidos en esta Tesis.

Por otro lado, los experimentos realizados mediante la sobreexpresión del plásmido ^{mCherry}Caveolin-C-10 inducen un mayor nivel de expresión de CAV1, por encima de niveles basales en las células. De manera similar, se ha observado que el silenciamiento de *Cav1* utilizando un siRNA específico reduce sus niveles de expresión. Sin embargo, serían necesarios análisis complementarios que permitiesen determinar si este aumento o reducción en la

expresión de CAV1 se traduce realmente en un mayor o menos número de caveolas funcionales.

En cuanto a las perspectivas para futuros estudios, será necesario, como se comentó anteriormente, realizar experimentos en modelos animales y/o análisis en muestras humanas que confirmen la validez de los resultados obtenidos.

También existe la posibilidad de estudiar la influencia de otras vías de señalización moduladas por el cilio primario sobre los efectos pro-supervivencia y la regulación de genes osteogénicos ejercidos por PTHrP y el cilio primario. Entre estas vías de señalización, destaca la señalización Wnt/ β -catenina (120), que ejerce una regulación sobre el metabolismo óseo y la osteogénesis (366) y cuya activación ha sido relacionada con promoción de la supervivencia en células de la microglía (367). También la vía TGF- β /BMP, relacionada con la osteoblastogénesis y la mineralización ósea (368,369), así como con regulación de la supervivencia (370), podría ser una potencial candidata para continuar con nuestros estudios.

Como se ha descrito en la presente Tesis Doctoral, la estimulación mecánica mediante FF incrementa el porcentaje de células que presentan cilio primario tanto en osteocitos como en osteoblastos, así como un aumento en la longitud del cilio en estas últimas. De cara a futuros estudios, sería conveniente analizar la implicación de diversas vías de señalización que puedan encontrarse implicadas en este aumento del porcentaje de células ciliadas, así como de las vías encargadas de la modulación de la longitud del cilio primario. De manera complementaria, se debería estudiar si el incremento de la longitud o del porcentaje de células con cilio primario afecta de algún modo a los efectos pro-supervivencia y a la regulación de genes osteogénicos ejercida por PTH1R tras su activación por ligando PTHrP.

Por otro lado, en esta Tesis Doctoral se ha descrito la co-localización de PTH1R y de CAV1, y como ésta afecta a la capacidad de difusión e internalización del receptor. Sin embargo, no se han realizado análisis para la observación de la integridad estructural y funcional de las caveolas, que serían convenientes para la validación de los resultados obtenidos. Además, sería interesante analizar

cómo la posible localización de PTH1R en las caveolas modifica su mecanismo de internalización, y si en él también intervienen las β -arrestinas.

También se han estudiado los efectos de la co-localización de PTH1R y CAV1 sobre diversas vías de señalización desencadenadas por el receptor en respuesta a la estimulación por PTHrP, como la liberación de Ca_i^{2+} o la fosforilación de ERK1/2. De cara a futuros estudios, sería interesante analizar cómo la posible localización subcelular de PTH1R en las caveolas afecta a otras vías de señalización desencadenadas por PTH1R tras su activación por ligando, como la vía AC/AMPc/PKA, con efectos descritos en la regulación de diversos genes implicados en la regulación del metabolismo óseo, como SOST y RANKL.

10. Referencias

bibliográficas

1. Burr DB, Allen MR. Basic and Applied Bone Biology. Basic and Applied Bone Biology. 2013. 1-373 p.
2. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–17.
3. Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. Vol. 6, *Bone Research*. 2018.
4. Xu H, Gu S, Riquelme MA, Burra S, Callaway D, Cheng H, et al. Connexin 43 channels are essential for normal bone structure and osteocyte viability. *J Bone Miner Res*. 2015;30(3):550–62.
5. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):229–38.
6. Qin L, Liu W, Cao H, Xiao G. Molecular mechanosensors in osteocytes. Vol. 8, *Bone Research*. 2020.
7. Uda Y, Azab E, Sun N, Shi C, Pajevic PD. Osteocyte Mechanobiology. Vol. 15, *Current Osteoporosis Reports*. 2017. p. 318–25.
8. Rubin CT, Sommerfeldt DW, Judex S, Qin YX. Inhibition of osteopenia by low magnitude, high-frequency mechanical stimuli. Vol. 6, *Drug Discovery Today*. 2001. p. 848–58.
9. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res*. 2006;21(4):605–15.
10. Bikle DD, Sakata T, Halloran BP. The impact of skeletal unloading on bone formation. Vol. 16, *Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*. 2003. p. 45–54.
11. Coughlin TR, Voisin M, Schaffler MB, Niebur GL, McNamara LM. Primary

- cilia exist in a small fraction of cells in trabecular bone and marrow. *Calcif Tissue Int.* 2014;96(1):65–72.
12. Malone AMDD, Anderson CT, Tummala P, Kwon RY, Johnston TR, Stearns T, et al. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13325–30.
 13. Unal M, Creecy A, Nyman JS. The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone. Vol. 16, *Current Osteoporosis Reports.* 2018. p. 205–15.
 14. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. Vol. 23, *Tissue Engineering - Part B: Reviews.* 2017. p. 268–80.
 15. Nair AK, Gautieri A, Chang SW, Buehler MJ. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nat Commun.* 2013;4.
 16. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. Vol. 99, *Journal of Cellular Biochemistry.* 2006. p. 1233–9.
 17. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. Vol. 5, *Current rheumatology reports.* 2003. p. 222–6.
 18. Boivin G, Bala Y, Doublier A, Farlay D, Ste-Marie LG, Meunier PJ, et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone.* 2008;43(3):532–8.
 19. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115–37.
 20. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res.* 1998;13(5):793–802.
 21. Jacome-Galarza CE, Percin GI, Muller JT, Mass E, Lazarov T, Eitler J, et

- al. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature*. 2019;568(7753):541–5.
22. Väänänen HK, Zhao H. Osteoclast Function. Biology and Mechanisms. In: *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set*. 2008. p. 193–209.
 23. Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. Vol. 92, *Journal of Dental Research*. 2013. p. 860–7.
 24. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*. 2014;3.
 25. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast–osteoclast interactions. Vol. 59, *Connective Tissue Research*. 2018. p. 99–107.
 26. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P, et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell*. 2021;184(5):1330–1347.e13.
 27. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007. p. 281–90.
 28. Weinbaum S, Duan Y, Thi MM, You L. An integrative review of mechanotransduction in endothelial, epithelial (renal) and dendritic cells (osteocytes). Vol. 4, *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2011. p. 510–37.
 29. Vrahnas C, Blank M, Dite TA, Tatarczuch L, Ansari N, Crimeen-Irwin B, et al. Increased autophagy in EphrinB2-deficient osteocytes is associated with elevated secondary mineralization and brittle bone. *Nat Commun*. 2019;10(1).
 30. Hemmatian H, Bakker AD, Klein-Nulend J, van Lenthe GH. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. Vol. 15, *Current Osteoporosis Reports*. 2017. p. 401–11.

31. Temiyasathit S, Jacobs CR. Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010. p. 422–8.
32. Burra S, Nicoletta DP, Francis WL, Freitas CJ, Mueschke NJ, Poole K, et al. Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(31):13648–53.
33. Van Tol AF, Schemenz V, Wagermaier W, Roschger A, Razi H, Vitieneš I, et al. The mechanoresponse of bone is closely related to the osteocyte lacunocanalicular network architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(51):32251–9.
34. Anderson CT, Castillo AB, Brugmann SA, Helms JA, Jacobs CR, Stearns T. Primary cilia: Cellular sensors for the skeleton. Vol. 291, *Anatomical Record*. 2008. p. 1074–8.
35. Kamioka H, Yamashiro T. [Mechanosensitivity of osteocytes]. Vol. 22, *Clinical calcium*. 2012. p. 697–704.
36. Yuan X, Serra RA, Yang S. Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. Vol. 1335, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015. p. 78–99.
37. Chen JC, Jacobs CR. Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells. Vol. 4, *Stem Cell Research and Therapy*. 2013.
38. Hoey DA, Tormey S, Ramcharan S, O'Brien FJ, Jacobs CR. Primary cilia-mediated mechanotransduction in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(11):2561–70.
39. Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res*. 1998;13(10):1555–68.
40. Lyons JS, Joca HC, Law RA, Williams KM, Kerr JP, Shi G, et al. Microtubules tune mechanotransduction through NOX2 and TRPV4 to

- decrease sclerostin abundance in osteocytes. *Sci Signal*. 2017;10(506).
41. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. Vol. 339, *Cell and Tissue Research*. 2010. p. 269–80.
 42. Litzenger JB, Tang WJ, Castillo AB, Jacobs CR. Deletion of $\beta 1$ integrins from cortical osteocytes reduces load-induced bone formation. *Cell Mol Bioeng*. 2009;2(3):416–24.
 43. Vaughan TJ, Mullen CA, Verbruggen SW, McNamara LM. Bone cell mechanosensation of fluid flow stimulation: a fluid–structure interaction model characterising the role integrin attachments and primary cilia. *Biomech Model Mechanobiol*. 2015;14(4):703–18.
 44. Buo AM, Stains JP. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. In: *FEBS Letters*. 2014. p. 1315–21.
 45. Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol*. 2000;151(4):931–43.
 46. Grimston SK, Brodt MD, Silva MJ, Civitelli R. Attenuated response to in vivo mechanical loading in mice with conditional osteoblast ablation of the connexin43 gene (*Gja1*). *J Bone Miner Res*. 2008;23(6):879–86.
 47. Yu K, Sellman DP, Bahraini A, Hagan ML, Elsherbini A, Vanpelt KT, et al. Mechanical loading disrupts osteocyte plasma membranes which initiates mechanosensation events in bone. *J Orthop Res*. 2018;36(2):653–62.
 48. Dallas SL, Moore DS. Using confocal imaging approaches to understand the structure and function of osteocytes and the lacunocanalicular network. Vol. 138, *Bone*. 2020.
 49. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. Vol. 34, *Endocrine Reviews*. 2013. p. 658–90.
 50. Xiao Z, Huang J, Cao L, Liang Y, Han X, Quarles LD. Osteocyte-specific deletion of *Fgfr1* suppresses FGF23. *PLoS One*. 2014;9(8).

51. Miron RJ, Bosshardt DD. OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. Vol. 82, *Biomaterials*. 2016. p. 1–19.
52. Sims NA, Martin TJ. Coupling signals between the osteoclast and osteoblast: How are messages transmitted between these temporary visitors to the bone surface? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6(MAR).
53. Tencerova M, Kassem M. The bone marrow-derived stromal cells: Commitment and regulation of adipogenesis. Vol. 7, *Frontiers in Endocrinology*. 2016.
54. Li JY, D'Amelio P, Robinson J, Walker LD, Vaccaro C, Luo T, et al. IL-17A Is Increased in Humans with Primary Hyperparathyroidism and Mediates PTH-Induced Bone Loss in Mice. *Cell Metab*. 2015;22(5):799–810.
55. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. Vol. 40, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008. p. 46–62.
56. Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, et al. Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. Vol. 189, *American Journal of Pathology*. 2019. p. 1495–500.
57. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551–5.
58. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KSE. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(33):12097–102.
59. Hallett SA, Ono W, Ono N. Growth plate chondrocytes: Skeletal development, growth and beyond. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
60. Wei X, Hu M, Mishina Y, Liu F. Developmental regulation of the growth plate and cranial synchondrosis. *J Dent Res*. 2016;95(11):1221–9.

61. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. Vol. 5, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013.
62. Franz-Odenaal TA. Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci.* 2011;16(7):2734–46.
63. Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. Vol. 242, *Developmental Dynamics.* 2013. p. 909–22.
64. Parfitt AM, Travers R, Rauch F, Glorieux FH. Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. *Bone.* 2000;27(4):487–94.
65. Yamamoto T, Hasegawa T, de FRAITAS PHL, Hongo H, Zhao S, Yamamoto T, et al. Histochemical characteristics on minimodeling-based bone formation induced by anabolic drugs for osteoporotic treatment. Vol. 42, *Biomedical Research (Japan).* 2021. p. 161–71.
66. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. Vol. 31, *Physiology.* 2016. p. 233–45.
67. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: Complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res.* 2002;17(5):907–14.
68. Yang CM, Chien CS, Yao CC, Hsiao L Der, Huang YC, Wu CB. Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 2004;279(21):22158–65.
69. Partridge NC, Jeffrey JJ, Ehlich LS, Teitelbaum SL, Fliszar C, Welgus HG, et al. Hormonal regulation of the production of collagenase and a collagenase inhibitor activity by rat osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology.* 1987;120(5):1956–62.
70. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. Vol. 285, *Journal of Biological Chemistry.* 2010. p. 25103–8.
71. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Vol. 289, *Science.* 2000.

- p. 1504–8.
72. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. Vol. 754, *Gene*. 2020.
 73. Du J, Yang J, He Z, Cui J, Yang Y, Xu M, et al. Osteoblast and Osteoclast Activity Affect Bone Remodeling Upon Regulation by Mechanical Loading-Induced Leukemia Inhibitory Factor Expression in Osteocytes. *Front Mol Biosci*. 2020;7.
 74. Wysolmerski JJ, Stewart AF. The physiology of parathyroid hormone-related protein: An emerging role as a developmental factor. Vol. 60, *Annual Review of Physiology*. 1998. p. 431–60.
 75. Wysolmerski JJ. Parathyroid hormone-related protein: An update. Vol. 97, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012. p. 2947–56.
 76. Frieling JS, Lynch CC. Proteolytic regulation of parathyroid hormone-related protein: Functional implications for skeletal malignancy. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
 77. Shimizu M, Joyashiki E, Noda H, Watanabe T, Okazaki M, Nagayasu M, et al. Pharmacodynamic Actions of a Long-Acting PTH Analog (LA-PTH) in Thyroparathyroidectomized (TPTX) Rats and Normal Monkeys. *J Bone Miner Res*. 2016;31(7):1405–12.
 78. Bhattacharyya S, Pal S, Chattopadhyay N. Abaloparatide, the second generation osteoanabolic drug: Molecular mechanisms underlying its advantages over the first-in-class teriparatide. Vol. 166, *Biochemical Pharmacology*. 2019. p. 185–91.
 79. Suva LJ, Friedman PA. PTH and PTHrP Actions on Bone. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2020. p. 27–45.
 80. Lai NB, Martinez D. Physiological roles of parathyroid hormone-related protein. *Acta Biomed*. 2019;90(4):518–24.
 81. Martin TJ. Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone

- formation. Vol. 115, *Journal of Clinical Investigation*. 2005. p. 2322–4.
82. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. Vol. 393, *The Lancet*. 2019. p. 364–76.
 83. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. Vol. 40, *Bone*. 2007. p. 1434–46.
 84. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*. 2005;37(2):148–58.
 85. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*. 2005;11(2):76–81.
 86. Martin TJ. Bone Biology and Anabolic Therapies for Bone: Current Status and Future Prospects. *J Bone Metab*. 2014;21(1):8.
 87. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-B1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 2009;15(7):757–65.
 88. Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, et al. Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2012;18(7):1095–101.
 89. Leder BZ. Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs in Osteoporosis Therapy. Vol. 15, *Current Osteoporosis Reports*. 2017. p. 110–9.
 90. Miao D, He B, Jiang Y, Kobayashi T, Sorocéanu MA, Zhao J, et al. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2402–11.
 91. Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE, Syme CA, Galbiati F, Bisello A, et al. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: Conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology*. 2004;145(6):2815–23.

92. Esbrit P, Herrera S, Portal-Núñez S, Nogués X, Díez-Pérez A. Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs as Osteoporosis Therapies. Vol. 98, *Calcified Tissue International*. 2016. p. 359–69.
93. Portal-Núñez S, Ardura JA, Lozano D, Martínez De Toda I, De La Fuente M, Herrero-Beaumont G, et al. Parathyroid hormone-related protein exhibits antioxidant features in osteoblastic cells through its N-terminal and osteostatin domains. *Bone Jt Res*. 2018;7(1):58–68.
94. Ansari N, Ho PWM, Crimeen-Irwin B, Poulton IJ, Brunt AR, Forwood MR, et al. Autocrine and Paracrine Regulation of the Murine Skeleton by Osteocyte-Derived Parathyroid Hormone-Related Protein. *J Bone Miner Res*. 2018;33(1):137–53.
95. Soifer NE, Dee KE, Insogna KL, Burtis WJ, Matovcik LM, Wu TL, et al. Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types. *J Biol Chem*. 1992;267(25):18236–43.
96. Jans DA, Thomas RJ, Gillespie MT. Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP): A Nucleocytoplasmic Shuttling Protein with Distinct Paracrine and Intracrine Roles. *Vitam Horm*. 2003;66:345–84.
97. Lee C, Gardella TJ, Abou-Samra AB, Nussbaum SR, Segre G V., Potts JT, et al. Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology*. 1994;135(4):1488–95.
98. Caulfield MP, McKee RL, Goldman ME, Duong LT, Fisher JE, Gay CT, et al. The bovine renal parathyroid hormone (Pth) receptor has equal affinity for two different amino acid sequences: The receptor binding domains of pth and pth-related protein are located within the 14-34 region. *Endocrinology*. 1990;127(1):83–7.
99. Gardella TJ, Juppner H, Wilson AK, Keutmann HT, Abou-Samra AB, Segre G V., et al. Determinants of [Arg2]PTH-(1-34) binding and signaling in the transmembrane region of the parathyroid hormone receptor.

- Endocrinology. 1994;135(3):1186–94.
100. Castro M, Nikolaev VO, Palm D, Lohse MJ, Vilardaga JP. Turn-on switch in parathyroid hormone receptor by a two-step parathyroid hormone binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(44):16084–9.
 101. Gardella TJ, Vilardaga JP. International union of basic and clinical pharmacology. XCIII. the parathyroid hormone receptors—family B G protein–coupled receptors. *Pharmacol Rev*. 2015;67(2):310–37.
 102. Ardura JA, Portal-Núñez S, Alonso V, Bravo B, Gortazar AR. Handling Parathormone Receptor Type 1 in Skeletal Diseases: Realities and Expectations of Abaloparatide. Vol. 30, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2019. p. 756–66.
 103. Singh ATK, Gilchrist A, Voyno-Yasenetskaya T, Radeff-Huang JM, Stern PH. G α 12/G α 13 subunits of heterotrimeric G proteins mediate parathyroid hormone activation of phospholipase D in UMR-106 osteoblastic cells. *Endocrinology*. 2005;146(5):2171–5.
 104. Singh ATK, Bhattacharyya RS, Radeff JM, Stern PH. Regulation of parathyroid hormone-stimulated phospholipase D in UMR-106 cells by calcium, MAP kinase, and small G proteins. *J Bone Miner Res*. 2003;18(8):1453–60.
 105. Cheloha RW, Gellman SH, Vilardaga JP, Gardella TJ. PTH receptor-1 signalling - Mechanistic insights and therapeutic prospects. Vol. 11, *Nature Reviews Endocrinology*. 2015. p. 712–24.
 106. Syme CA, Friedman PA, Bisello A. Parathyroid hormone receptor trafficking contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinases but is not required for regulation of cAMP signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11281–8.
 107. Sneddon WB, Friedman PA. β -arrestin-dependent parathyroid hormone-stimulated extracellular signal-regulated kinase activation and parathyroid hormone type 1 receptor internalization. *Endocrinology*.

- 2007;148(8):4073–9.
108. Horwitz MJ, Tedesco MB, Sereika SM, Syed MA, Garcia-Ocaña A, Bisello A, et al. Continuous PTH and PTHrP infusion causes suppression of bone formation and discordant effects on 1,25(OH)₂ vitamin D. *J Bone Miner Res.* 2005;20(10):1792–803.
 109. Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G, Vilaradaga JP. Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-Gβγ complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(4):1530–5.
 110. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, et al. Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol.* 2011;7(5):278–84.
 111. Powell WF, Barry KJ, Tulum I, Kobayashi T, Harris SE, Bringhurst FR, et al. Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses. *J Endocrinol.* 2011;209(1):21–32.
 112. Rhee Y, Allen MR, Condon K, Lezcano V, Ronda AC, Galli C, et al. PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intracortical remodeling. *J Bone Miner Res.* 2011;26(5):1035–46.
 113. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: Anabolic and catabolic actions on the skeleton. Vol. 22, *Current Opinion in Pharmacology.* 2015. p. 41–50.
 114. Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, et al. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts: A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50259–72.
 115. Weinstein RS, Wan C, Liu Q, Wang Y, Almeida M, O'Brien CA, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell.* 2010;9(2):147–61.

116. Maycas M, Ardura JA, De Castro LF, Bravo B, Gortázar AR, Esbrit P. Role of the Parathyroid Hormone Type 1 Receptor (PTH1R) as a Mechanosensor in Osteocyte Survival. *J Bone Miner Res.* 2015;30(7):1231–44.
117. Zhang YL, Frangos JA, Chachisvilis M. Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2009;296(6).
118. Zheng L, Cao Y, Ni S, Qi H, Ling Z, Xu X, et al. Ciliary parathyroid hormone signaling activates transforming growth factor- β to maintain intervertebral disc homeostasis during aging. *Bone Res.* 2018;6(1).
119. Monego G, Arena V, Pasquini S, Stigliano E, Fiaccavento R, Leone O, et al. Ischemic injury activates PTHrP and PTH1R expression in human ventricular cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(4):427–34.
120. Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. Vol. 15, *Nature Reviews Nephrology.* 2019. p. 199–219.
121. Satir P, Christensen ST. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu Rev Physiol.* 2007;69(1):377–400.
122. Li S, Jin S, Jin C. The correlative hypotheses between Pitchfork and Kif3a in palate development. *Med Hypotheses.* 2019;126:23–5.
123. Ma X, Peterson R, Turnbull J. Adenylyl Cyclase type 3, a marker of primary cilia, is reduced in primary cell culture and in lumbar spinal cord in situ in G93A SOD1 mice. *BMC Neurosci.* 2011;12.
124. Yuan X, Yang S. Deletion of IFT80 impairs epiphyseal and articular cartilage formation due to disruption of chondrocyte differentiation. *PLoS One.* 2015;10(6).
125. Singh M, Chaudhry P, Merchant AA. Primary cilia are present on human blood and bone marrow cells and mediate Hedgehog signaling. *Exp Hematol.* 2016;44(12):1181–1187.e2.

126. Nguyen AM, Jacobs CR. Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes. Vol. 54, *Bone*. 2013. p. 196–204.
127. Komatsu Y, Kaartinen V, Mishina Y. Cell cycle arrest in node cells governs ciliogenesis at the node to break left-right symmetry. *Development*. 2011;138(18):3915–20.
128. Uzbekov RE, Maurel DB, Aveline PC, Pallu S, Benhamou CL, Rochefort GY. Centrosome fine ultrastructure of the osteocyte mechanosensitive primary cilium. In: *Microscopy and Microanalysis*. 2012. p. 1430–41.
129. Basten SG, Giles RH. Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis. Vol. 2, *Cilia*. 2013.
130. Hoey DA, Downs ME, Jacobs CR. The mechanics of the primary cilium: An intricate structure with complex function. Vol. 45, *Journal of Biomechanics*. 2012. p. 17–26.
131. Rohatgi R, Snell WJ. The ciliary membrane. Vol. 22, *Current Opinion in Cell Biology*. 2010. p. 541–6.
132. Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: Cilia defects and ciliopathies. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. p. 880–93.
133. Bernabé-Rubio M, Alonso MA. Routes and machinery of primary cilium biogenesis. Vol. 74, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017. p. 4077–95.
134. Labat-de-Hoz L, Rubio-Ramos A, Casares-Arias J, Bernabé-Rubio M, Correas I, Alonso MA. A Model for Primary Cilium Biogenesis by Polarized Epithelial Cells: Role of the Midbody Remnant and Associated Specialized Membranes. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021.
135. Pedersen LB, Schrøder JM, Satir P, Christensen ST. The ciliary cytoskeleton. *Compr Physiol*. 2012;2(1):779–803.
136. Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF. Scoring a backstage pass: Mechanisms of

- ciliogenesis and ciliary access. *J Cell Biol.* 2012;197(6):697–709.
137. Martin L, Kaci N, Estibals V, Goudin N, Garfa-Traore M, Benoist-Lasselin C, et al. Constitutively-active FGFR3 disrupts primary cilium length and IFT20 trafficking in various chondrocyte models of achondroplasia. *Hum Mol Genet.* 2018;27(1):1–13.
138. Zaghoul NA, Brugmann SA. The emerging face of primary cilia. Vol. 49, *Genesis.* 2011. p. 231–46.
139. Eguether T, SanAgustin JT, Keady BT, Jonassen JA, Liang Y, Francis R, et al. IFT27 links the centrosome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment. *Dev Cell.* 2014;31(3):279–90.
140. Keady BT, Samtani R, Tobita K, Tsuchya M, San Agustin JT, Follitt JA, et al. IFT25 Links the Signal-Dependent Movement of Hedgehog Components to Intraflagellar Transport. *Dev Cell.* 2012;22(5):940–51.
141. Eguether T, Cordelieres FP, Pazour GJ. Intraflagellar transport is deeply integrated in hedgehog signaling. *Mol Biol Cell.* 2018;29(10):1178–89.
142. Jacobs CR, Temiyasathit S, Castillo AB. Osteocyte Mechanobiology and Pericellular Mechanics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12(1):369–400.
143. Seeger-Nukpezah T, Golemis EA. The extracellular matrix and ciliary signaling. Vol. 24, *Current Opinion in Cell Biology.* 2012. p. 652–61.
144. McGlashan SR, Jensen CG, Poole CA. Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(9):1005–14.
145. Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell.* 2007;129(7):1351–63.
146. Farnum CE, Wilsman NJ. Orientation of Primary Cilia of Articular Chondrocytes in Three-Dimensional Space. *Anat Rec.* 2011;294(3):533–49.

147. Martín-Guerrero E, Tirado-Cabrera I, Buendía I, Alonso V, Gortázar AR, Ardura JA. Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation. *J Cell Physiol.* 2020;
148. Hoey DA, Kelly DJ, Jacobs CR. A role for the primary cilium in paracrine signaling between mechanically stimulated osteocytes and mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(1):182–7.
149. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003;33(2):129–37.
150. Low SH, Vasanth S, Larson CH, Mukherjee S, Sharma N, Kinter MT, et al. Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell.* 2006;10(1):57–69.
151. Prasad RM, Jin X, Nauli SM. Sensing a sensor: Identifying the mechanosensory function of primary cilia. Vol. 4, *Biosensors.* 2014. p. 47–62.
152. Ta CM, Vien TN, Ng LCT, DeCaen PG. Structure and function of polycystin channels in primary cilia. *Cell Signal.* 2020;72.
153. Xiao Z, Zhang S, Cao L, Qiu N, David V, Quarles LD. Conditional disruption of Pkd1 in osteoblasts results in osteopenia due to direct impairment of bone formation. *J Biol Chem.* 2010;285(2):1177–87.
154. Temiyasathit S, Tang WJ, Leucht P, Anderson CT, Monica SD, Castillo AB, et al. Mechanosensing by the primary cilium: Deletion of Kif3a reduces bone formation due to loading. *PLoS One.* 2012;7(3).
155. Lee KL, Hoey DA, Spasic M, Tang T, Hammond HK, Jacobs CR. Adenylyl cyclase 6 mediates loading-induced bone adaptation in vivo. *FASEB J.* 2014;28(3):1157–65.
156. Rais Y, Reich A, Simsa-Maziel S, Moshe M, Idelevich A, Kfir T, et al. The

- growth plate's response to load is partially mediated by mechano-sensing via the chondrocytic primary cilium. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(3):597–615.
157. Leucht P, Monica SD, Temiyasathit S, Lenton K, Manu A, Longaker MT, et al. Primary cilia act as mechanosensors during bone healing around an implant. *Med Eng Phys.* 2013;35(3):392–402.
158. Chen Y, Jiang J. Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. Vol. 23, *Cell Research.* 2013. p. 186–200.
159. Pachernegg S, Georges E, Ayers K. The Desert Hedgehog Signalling Pathway in Human Gonadal Development and Differences of Sex Development. *Sexual Development.* 2021.
160. Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the primary cilium. Vol. 6, *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2018.
161. Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. Vol. 7, *International journal of oral science.* 2015. p. 73–9.
162. Roberts B, Casillas C, Alfaro AC, Jägers C, Roelink H. Patched1 and patched2 inhibit smoothened non-cell autonomously. *Elife.* 2016;5(AUGUST).
163. Gigante ED, Caspary T. Signaling in the primary cilium through the lens of the Hedgehog pathway. Vol. 9, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology.* 2020.
164. Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR, Riobo NA. Heterotrimeric Gi proteins link hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem.* 2011;286(22):19589–96.
165. Moran J, G. Sanderson K, Maynes J, Vig A, Batmanabane V, Kannu P, et al. IFT80 mutations cause a novel complex ciliopathy phenotype with retinal degeneration. *Clin Genet.* 2018;94(3–4):368–72.
166. Kitamura A, Kawasaki M, Kawasaki K, Meguro F, Yamada A, Nagai T, et

- al. *Ift88* is involved in mandibular development. *J Anat.* 2020;236(2):317–24.
167. Kinumatsu T, Shibukawa Y, Yasuda T, Nagayama M, Yamada S, Serra R, et al. TMJ development and growth require primary cilia function. *J Dent Res.* 2011;90(8):988–94.
168. Ruiz-Perez VL, Blair HJ, Rodrigues-Andres ME, Blanco MJ, Wilson A, Liu YN, et al. *Evc* is a positive mediator of *Ihh*-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. *Development.* 2007;134(16):2903–12.
169. Humke EW, Dorn K V., Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 2010;24(7):670–82.
170. Qiu N, Cao L, David V, Darryl Quarles L, Xiao Z. *Kif3a* deficiency reverses the skeletal abnormalities in *Pkd1* deficient mice by restoring the balance between osteogenesis and adipogenesis. *PLoS One.* 2010;5(12).
171. Shao YY, Wang L, Welter JF, Ballock RT. Primary cilia modulate *Ihh* signal transduction in response to hydrostatic loading of growth plate chondrocytes. *Bone.* 2012;50(1):79–84.
172. Kalogeropoulos M, Varanasi SS, Olstad OK, Sanderson P, Gautvik VT, Reppe S, et al. *Zic1* transcription factor in bone: neural developmental protein regulates mechanotransduction in osteocytes. *FASEB J.* 2010;24(8):2893–903.
173. Wong SY, Seol AD, So PL, Ermilov AN, Bichakjian CK, Epstein EH, et al. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat Med.* 2009;15(9):1055–61.
174. Takeuchi Y, Kito A, Itoh S, Naruse H, Fujikawa J, Sadek KM, et al. Kruppel-Like Factor 4 represses osteoblast differentiation via ciliary Hedgehog signaling. *Exp Cell Res.* 2018;371(2):417–25.
175. Upadhyai P, Guleria VS, Udupa P. Characterization of primary cilia features

- reveal cell-type specific variability in in vitro models of osteogenic and chondrogenic differentiation. *PeerJ*. 2020;8.
176. Liu F, Massague J, Ruiz i Altaba A. Carboxy-terminally truncated Gli3 proteins associated with Smads [1]. Vol. 20, *Nature Genetics*. 1998. p. 325–6.
177. Chen JC, Hoey DA, Chua M, Bellon R, Jacobs CR. Mechanical signals promote osteogenic fate through a primary cilia-mediated mechanism. *FASEB J*. 2016;30(4):1504–11.
178. Guo Y, Yuan Y, Wu L, Ho TV, Jing J, Sugii H, et al. BMP-IHH-mediated interplay between mesenchymal stem cells and osteoclasts supports calvarial bone homeostasis and repair. *Bone Res*. 2018;6(1).
179. Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development* [Internet]. 2000;127(3):543–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10631175>
180. Whitfield JF. The solitary (primary) cilium-A mechanosensory toggle switch in bone and cartilage cells. Vol. 20, *Cellular Signalling*. 2008. p. 1019–24.
181. Xiang W, Jiang T, Guo F, Xu T, Gong C, Cheng P, et al. Evaluating the role of PTH in promotion of chondrosarcoma cell proliferation and invasion by inhibiting primary cilia expression. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):19816–31.
182. Pacheco M, Valencia M, Caparrós-Martín JA, Mulero F, Goodship JA, Ruiz-Perez VL. Evc works in chondrocytes and osteoblasts to regulate multiple aspects of growth plate development in the appendicular skeleton and cranial base. *Bone*. 2012;50(1):28–41.
183. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Vol. 423, *Nature*. 2003. p. 332–6.
184. Ohba S. Hedgehog signaling in skeletal development: Roles of indian hedgehog and the mode of its action. Vol. 21, *International Journal of*

- Molecular Sciences. 2020. p. 1–17.
185. Gao Y, Gui F, Li D, Zhang R, Sun Q, Guo X. Fluoride regulates the expression of extracellular matrix HSPG and related signaling pathways FGFR3 and Ihh/PTHrP feedback loop during endochondral ossification. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020;73.
 186. Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida K, Weir E, et al. Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol*. 1997;136(1):205–13.
 187. Nishimori S, Lai F, Shiraishi M, Kobayashi T, Kozhemyakina E, Yao TP, et al. PTHrP targets HDAC4 and HDAC5 to repress chondrocyte hypertrophy. *JCI insight*. 2019;4(5).
 188. Schipani E, Provot S. PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP Receptor in Endochondral Bone Development. Vol. 69, *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. 2003. p. 352–62.
 189. Ohba S. Hedgehog signaling in endochondral ossification. Vol. 4, *Journal of Developmental Biology*. 2016.
 190. Van Donkelaar CC, Huiskes R. The PTHrP-Ihh feedback loop in the embryonic growth plate allows PTHrP to control hypertrophy and Ihh to regulate proliferation. *Biomech Model Mechanobiol*. 2007;6(1–2):55–62.
 191. Zhang X, Siclari VA, Lan S, Zhu J, Koyama E, Dupuis HL, et al. The critical role of the epidermal growth factor receptor in endochondral ossification. *J Bone Miner Res*. 2011;26(11):2622–33.
 192. Jing Y, Wang Z, Li H, Ma C, Feng J. Chondrogenesis Defines Future Skeletal Patterns Via Cell Transdifferentiation from Chondrocytes to Bone Cells. Vol. 18, *Current Osteoporosis Reports*. 2020. p. 199–209.
 193. Wolff LI, Hartmann C. A Second Career for Chondrocytes—Transformation into Osteoblasts. Vol. 17, *Current Osteoporosis Reports*. 2019. p. 129–37.

194. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, Young M, et al. Hedgehog Signaling in Mature Osteoblasts Regulates Bone Formation and Resorption by Controlling PTHrP and RANKL Expression. *Dev Cell*. 2008;14(5):674–88.
195. Kiuru M, Solomon J, Ghali B, Van Der Meulen M, Crystal RG, Hidaka C. Transient overexpression of Sonic hedgehog alters the architecture and mechanical properties of trabecular bone. *J Bone Miner Res*. 2009;24(9):1598–607.
196. Fuchs S, Dohle E, Kirkpatrick CJ. Sonic Hedgehog-Mediated Synergistic Effects Guiding Angiogenesis and Osteogenesis. In: *Vitamins and Hormones*. 2012. p. 491–506.
197. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K ichi, Matsuoka H, Nakamura T. Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;262(2):443–51.
198. Parton RG, Del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):98–112.
199. Pike LJ. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res*. 2006;47(7):1597–8.
200. Scherer PE, Tang ZL, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution: Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem*. 1995;270(27):16395–401.
201. Parton RG, Tillu VA, Collins BM. Caveolae. Vol. 28, *Current Biology*. 2018. p. R402–5.
202. Lajoie P, Nabi IR. Regulation of raft-dependent endocytosis. Vol. 11, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007. p. 644–53.
203. Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. Vol. 185,

- Journal of Cell Biology. 2009. p. 381–5.
204. Yue S, Tang LY, Tang Y, Tang Y, Shen QH, Ding J, et al. Requirement of Smurf-mediated endocytosis of Patched1 in sonic hedgehog signal reception. *Elife*. 2014;2014(3).
 205. Schou KB, Mogensen JB, Morthorst SK, Nielsen BS, Aleliunaite A, Serra-Marques A, et al. KIF13B establishes a CAV1-enriched microdomain at the ciliary transition zone to promote Sonic hedgehog signalling. *Nat Commun*. 2017;8.
 206. Gambin Y, Ariotti N, McMahon K-A, Bastiani M, Sierrecki E, Kovtun O, et al. Single-molecule analysis reveals self assembly and nanoscale segregation of two distinct cavin subcomplexes on caveolae. *Elife*. 2014;3.
 207. Hayer A, Stoeber M, Bissig C, Helenius A. Biogenesis of caveolae: Stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*. 2010;11(3):361–82.
 208. Mahavadi S, Bhattacharya S, Kim J, Fayed S, Al-Shboul O, Grider JR, et al. Caveolae-dependent internalization and homologous desensitization of VIP/PACAP receptor, VPAC2, in gastrointestinal smooth muscle. *Peptides*. 2013;43:137–45.
 209. Syme CA, Zhang L, Bisello A. Caveolin-1 regulates cellular trafficking and function of the glucagon-like peptide 1 receptor. *Mol Endocrinol*. 2006;20(12):3400–11.
 210. Zou H, Stoppani E, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. *Mech Ageing Dev*. 2011;132(11–12):533–42.
 211. Mizuno N, Itoh H. Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. Vol. 17, *NeuroSignals*. 2009. p. 42–54.
 212. Bhatnagar A, Sheffler DJ, Kroeze WK, Compton-Toth B, Roth BL. Caveolin-1 interacts with 5-HT_{2A} serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected G_q-coupled protein receptors. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34614–23.

213. Gonzalez E, Nagiel A, Lin AJ, Golan DE, Michel T. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40659–69.
214. Sengupta P, Philip F, Scarlata S. Caveolin-1 alters Ca²⁺ signal duration through specific interaction with the Gαq family of G proteins. *J Cell Sci*. 2008;121(9):1363–72.
215. Morén B, Shah C, Howes MT, Schieber NL, McMahon HT, Parton RG, et al. EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Mol Biol Cell*. 2012;23(7):1316–29.
216. Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*. 2011;144(3):402–13.
217. Parton RG, Kozlov MM, Ariotti N. Caveolae and lipid sorting: Shaping the cellular response to stress. Vol. 219, *Journal of Cell Biology*. 2020.
218. Boyd NL, Park H, Yi H, Boo YC, Sorescu GP, Sykes M, et al. Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2003;285(3 54-3).
219. Albinsson S, Shakirova Y, Rippe A, Baumgarten M, Rosengren BI, Rippe C, et al. Arterial remodeling and plasma volume expansion in caveolin-1-deficient mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(3).
220. Torrino S, Shen W, Blouin CM, Mani SK, de Lesegno CV, Bost P, et al. EHD2 is a mechanotransducer connecting caveolae dynamics with gene transcription. *J Cell Biol*. 2018;217(12):4092–105.
221. Rizzo V, Sung A, Oh P, Schnitzer JE. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J Biol Chem*. 1998;273(41):26323–9.
222. Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: Requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2005;289(3

- 58-3).
223. Gortazar AR, Martin-Millan M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T. Crosstalk between caveolin-1/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and β -catenin survival pathways in osteocyte mechanotransduction. *J Biol Chem*. 2013;288(12):8168–75.
 224. de Castro LF, Maycas M, Bravo B, Esbrit P, Gortazar A. VEGF receptor 2 (VEGFR2) activation is essential for osteocyte survival induced by mechanotransduction. *J Cell Physiol*. 2015;230(2):278–85.
 225. Gangadharan V, Nohe A, Caplan J, Czymmek K, Duncan RL. Caveolin-1 regulates P2X7 receptor signaling in osteoblasts. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2015;308(1):C41–50.
 226. Zou L, Zhang G, Liu L, Chen C, Cao X, Cai J. Caveolin-1 is critical in the proliferative effect of leptin on osteoblasts through the activation of Akt. *Mol Med Rep*. 2016;14(3):1915–22.
 227. Yang RB, Lin FF, Yang J, Chen B, Zhang MH, Lu QP, et al. Overexpression of CAV3 facilitates bone formation via the Wnt signaling pathway in osteoporotic rats. *Endocrine*. 2019;63(3):639–50.
 228. Lee YD, Yoon SH, Park CK, Lee J, Lee ZH, Kim HH. Caveolin-1 regulates osteoclastogenesis and bone metabolism in a sex-dependent manner. *J Biol Chem*. 2015;290(10):6522–30.
 229. Lee YD, Yoon SH, Ji E, Kim HH. Caveolin-1 regulates osteoclast differentiation by suppressing cFms degradation. *Exp Mol Med*. 2015;47(10).
 230. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. Vol. 83, *Journal of Molecular Medicine*. 2005. p. 170–9.
 231. Rubin J, Schwartz Z, Boyan BD, Fan X, Case N, Sen B, et al. Caveolin-1 knockout mice have increased bone size and stiffness. *J Bone Miner Res*. 2007;22(9):1408–18.

232. Rangel L, Bernabé-Rubio M, Fernández-Barrera J, Casares-Arias J, Millán J, Alonso MA, et al. Caveolin-1 α regulates primary cilium length by controlling RhoA GTPase activity. *Sci Rep.* 2019;9(1).
233. Gallage S, Gil J. Primary cilia and senescence: A sensitive issue. Vol. 13, *Cell Cycle.* 2014. p. 2653–4.
234. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res.* 1997;12(12):2014–23.
235. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech.* 1994;27(3):339–60.
236. Hanson CA, Drake KR, Baird MA, Han B, Kraft LJ, Davidson MW, et al. Overexpression of Caveolin-1 Is Sufficient to Phenocopy the Behavior of a Disease-Associated Mutant. *Traffic.* 2013;14(6):663–77.
237. Ardura JA, Wang B, Watkins SC, Vilardaga JP, Friedman PA. Dynamic Na⁺-H⁺ exchanger regulatory factor-1 association and dissociation regulate parathyroid hormone receptor trafficking at membrane microdomains. *J Biol Chem.* 2011;286(40):35020–9.
238. Alonso V, De Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol.* 2008;217(3):717–27.
239. Baek WY, Lee MA, Ji WJ, Kim SY, Akiyama H, De Crombrughe B, et al. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res.* 2009;24(6):1055–65.
240. Tan JHY, Ludeman JP, Wedderburn J, Canals M, Hall P, Butler SJ, et al. Tyrosine sulfation of chemokine receptor CCR2 enhances interactions with both monomeric and dimeric forms of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *J Biol Chem.* 2013;288(14):10024–34.

241. Jiang H, Liu S, Cheung MH, Amin A, Liang C. FOP Negatively Regulates Ciliogenesis and Promotes Cell Cycle Re-entry by Facilitating Primary Cilia Disassembly. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8.
242. Nakakura T, Asano-Hoshino A, Suzuki T, Arisawa K, Tanaka H, Sekino Y, et al. The elongation of primary cilia via the acetylation of α -tubulin by the treatment with lithium chloride in human fibroblast KD cells. *Med Mol Morphol.* 2015;48(1):44–53.
243. Mariani LE, Bijlsma MF, Ivanova AI, Suciú SK, Kahn RA, Caspary T. Arl13b regulates Shh signaling from both inside and outside the cilium. *Mol Biol Cell.* 2016;27(23):3780–90.
244. Higginbotham H, Guo J, Yokota Y, Umberger NL, Li J, Verma N, et al. Arl13b-regulated activities of primary cilia are essential for the formation of the polarized radial glial scaffold. *Nat Neurosci.* 2013;16(8):1000–7.
245. Sarkisian MR, Siebzehnrubl D, Hoang-Minh L, Deleyrolle L, Silver DJ, Siebzehnrubl FA, et al. Detection of primary cilia in human glioblastoma. *J Neurooncol.* 2014;117(1):15–24.
246. Moore ER, Jacobs CR. The primary cilium as a signaling nexus for growth plate function and subsequent skeletal development. Vol. 36, *Journal of Orthopaedic Research.* 2018. p. 533–45.
247. Takei R, Katoh Y, Nakayama K. Robust interaction of IFT70 with IFT52–IFT88 in the IFT-B complex is required for ciliogenesis. *Biol Open.* 2018;7(5):bio033241.
248. Deren ME, Yang X, Guan Y, Chen Q. Biological and chemical removal of primary cilia affects mechanical activation of chondrogenesis markers in chondroprogenitors and hypertrophic chondrocytes. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2).
249. Kovács B, Vajda E, Nagy EE. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences.* 2019.

250. Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1409(1):79–84.
251. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone.* 1998;23(3):187–96.
252. Hong W, Wei Z, Qiu Z, Li Z, Fu C, Ye Z, et al. Atorvastatin promotes bone formation in aged apoE^{-/-} mice through the Sirt1-Runx2 axis. *J Orthop Surg Res.* 2020;15(1).
253. Xing L, Geng Y, Li W, Lin L, Xu P. Expression of RUNX2/LAPTM5 in MC3T3-E1 osteoblastic cells with induced mineralization. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2021;41(9):1394–9.
254. Chen H, Li J, Wang Q. Associations between bone-alkaline phosphatase and bone mineral density in adults with and without diabetes. *Med (United States).* 2018;97(17).
255. Liu Q, Li M, Wang S, Xiao Z, Xiong Y, Wang G. Recent Advances of Osterix Transcription Factor in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020.
256. Berbari NF, O'Connor AK, Haycraft CJ, Yoder BK. The Primary Cilium as a Complex Signaling Center. Vol. 19, *Current Biology.* 2009.
257. Kowatsch C, Woolley RE, Kinnebrew M, Rohatgi R, Siebold C. Structures of vertebrate Patched and Smoothed reveal intimate links between cholesterol and Hedgehog signalling. Vol. 57, *Current Opinion in Structural Biology.* 2019. p. 204–14.
258. Jeng KS, Sheen IS, Leu CM, Tseng PH, Chang CF. The role of smoothed in cancer. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* 2020. p. 1–20.
259. Wei M, Ma R, Huang S, Liao Y, Ding Y, Li Z, et al. Oroxylin A increases the

- sensitivity of temozolomide on glioma cells by hypoxia-inducible factor 1 α /hedgehog pathway under hypoxia. *J Cell Physiol.* 2019;234(10):17392–404.
260. Zhu G, Zhou J, Song W, Wu D, Dang Q, Zhang L, et al. Role of GLI-1 in epidermal growth factor-induced invasiveness of ARCaP e prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;30(2):904–10.
261. Cho HJ, Cho JY, Rhee MH, Park HJ. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner. *Eur J Pharmacol.* 2007;558(1–3):43–51.
262. Liu D, Wang Y, Pan Z, Huang Z, Chen F. cAMP regulates 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 and Sp1 expression in MLO-Y4/MC3T3-E1 cells. *Exp Ther Med.* 2020;
263. Hu XM, Zhang HHL, Xu H, Zhang HHL, Chen LP, Cui WQ, et al. Chemokine receptor CXCR4 regulates CaMKII/CREB pathway in spinal neurons that underlies cancer-induced bone pain. *Sci Rep.* 2017;7(1).
264. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, et al. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol.* 2009;5(10):734–42.
265. Taylor CW, Tovey SC. From parathyroid hormone to cytosolic Ca²⁺ signals. Vol. 40, *Biochemical Society Transactions.* 2012. p. 147–52.
266. Cupp ME, Nayak SK, Adem AS, Thomsen WJ. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide domains contributing to activation of different PTH receptor-mediated signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;345(3):404–18.
267. Maycas M, McAndrews KA, Sato AY, Pellegrini GG, Brown DM, Allen MR, et al. PTHrP-Derived Peptides Restore Bone Mass and Strength in Diabetic Mice: Additive Effect of Mechanical Loading. *J Bone Miner Res.* 2017;32(3):486–97.
268. Chukkapalli S, Levi E, Rishi AK, Datta NS. PTHrP attenuates osteoblast

- cell death and apoptosis induced by a novel class of anti-cancer agents. *Endocrine*. 2016;51(3):534–44.
269. Wang J, Li J, Yang L, Zhou Y, Wang Y. Dose-dependence of PTH-related peptide-1 on the osteogenic induction of MC3T3-E1 cells in vitro. *Med (United States)*. 2017;96(17).
270. Wein MN. Parathyroid Hormone Signaling in Osteocytes. Vol. 2, *JBMR Plus*. 2018. p. 22–30.
271. Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *BoneKEy-Osteovision*. 2006;3(10):7–15.
272. Compton JT, Lee FY. Current concepts review: A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. Vol. 96, *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*. 2014. p. 1659–68.
273. Zagrodna A, Józków P, Médraś M, Majda M, Słowińska-Lisowska M. Sclerostin as a novel marker of bone turnover in athletes. *Biol Sport*. 2016;33(1):83–7.
274. Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res*. 1999;14(6):893–903.
275. Schou KB, Pedersen LB, Christensen ST. Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep*. 2015;16(9):1099–113.
276. Yang Y, Wang B. Disruption of β -catenin binding to parathyroid hormone (PTH) receptor inhibits PTH-stimulated ERK1/2 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464(1):27–32.
277. N. Bohinc B, Gesty-Palmer D. Biased Agonism at the Parathyroid Hormone Receptor: A Demonstration of Functional Selectivity in Bone Metabolism. *Mini-Reviews Med Chem*. 2012;12(9):856–65.
278. Yuan X, Cao J, He X, Serra R, Qu J, Cao X, et al. Ciliary IFT80 balances

- canonical versus non-canonical hedgehog signalling for osteoblast differentiation. *Nat Commun.* 2016;7.
279. Jemtland R, Divieti P, Lee K, Segre G V. Hedgehog promotes primary osteoblast differentiation and increases PTHrP mRNA expression and iPTHrP secretion. *Bone.* 2003;32(6):611–20.
280. Deckelbaum RA, Chan G, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC. Ihh enhances differentiation of CFK-2 chondrocytic cells and antagonizes PTHrP-mediated activation of PKA. *J Cell Sci.* 2002;115(14):3015–25.
281. Komatsu N, Takayanagi H. Autoimmune Arthritis. The Interface Between the Immune System and Joints. In: *Advances in Immunology.* 2012. p. 45–71.
282. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006;203(12):2673–82.
283. Kohara Y, Haraguchi R, Kitazawa R, Imai Y, Kitazawa S. Hedgehog inhibitors suppress osteoclastogenesis in in vitro cultures, and deletion of SMO in macrophage/osteoclast lineage prevents age-related bone loss. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).
284. Sun Y, Guo W, Ren T, Liang W, Zhou W, Lu Q, et al. Gli1 inhibition suppressed cell growth and cell cycle progression and induced apoptosis as well as autophagy depending on ERK1/2 activity in human chondrosarcoma cells. *Cell Death Dis.* 2014;5(1).
285. Mazumdar T, DeVecchio J, Agyeman A, Shi T, Houghton JA. Blocking hedgehog survival signaling at the level of the GLI genes induces DNA damage and extensive cell death in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2011;71(17):5904–14.
286. Wiren KM, Toombs AR, Semirale AA, Zhang X. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: Requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone.* 2006;38(5):637–51.

287. Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, et al. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. *PLoS One*. 2011;6(11).
288. Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, Komori T. Overexpression of BCLXL in Osteoblasts Inhibits Osteoblast Apoptosis and Increases Bone Volume and Strength. *J Bone Miner Res*. 2016;31(7):1366–80.
289. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence. Vol. 277, *FEBS Journal*. 2010. p. 2–21.
290. Hasan MR, Takatalo M, Ma H, Rice R, Mustonen T, Rice DPC. Rab23 coordinates early osteogenesis by repressing FGF10-PERK1/2 and gli1. *Elife*. 2020;9:1–35.
291. Tsai JA, Bucht E, Stark A, Sjöstedt U, Töning O. Parathyroid hormone-related protein (1-37) induces cAMP response in human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*. 1998;62(3):250–4.
292. Wang BL, Dai CL, Quan JX, Zhu ZF, Zheng F, Zhang HX, et al. Parathyroid hormone regulates osterix and Runx2 mRNA expression predominantly through protein kinase A signaling in osteoblast-like cells. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(2):101–8.
293. Yu XP, Chandrasekhar S. Parathyroid hormone (PTH 1-34) regulation of rat osteocalcin gene transcription. *Endocrinology*. 1997;138(8):3085–92.
294. Bi F, Shi Z, Jiang S, Guo P, Yan S. Intermittently administered parathyroid hormone [1–34] promotes tendon-bone healing in a rat model. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):17366–79.
295. Ouyang N, Li H, Wang M, Shen H, Si J, Shen G. The Transcription Factor Foxc1 Promotes Osteogenesis by Directly Regulating Runx2 in Response of Intermittent Parathyroid Hormone (1–34) Treatment. *Front Pharmacol*. 2020;11.

296. Chen XJ, Shen YS, He MC, Yang F, Yang P, Pang FX, et al. Polydatin promotes the osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells by activating the BMP2-Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2019;112.
297. Dong M, Jiao G, Liu HH, Wu W, Li S, Wang Q, et al. Biological Silicon Stimulates Collagen Type 1 and Osteocalcin Synthesis in Human Osteoblast-Like Cells Through the BMP-2/Smad/RUNX2 Signaling Pathway. *Biol Trace Elem Res.* 2016;173(2):306–15.
298. Komori T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. Vol. 43, *Molecules and cells.* 2020. p. 168–75.
299. Wang XJ, Zhang J, Liu F, Zhou XS, Zhao ZT, Guo XS, et al. Effect of primary cilia expression rate on Wnt/ β signaling pathway in tibial growth plate chondrocytes from chronic renal insufficiency young rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2019;99(46):3645–51.
300. Mönnich M, Borgeskov L, Breslin L, Jakobsen L, Rogowski M, Doganli C, et al. CEP128 Localizes to the Subdistal Appendages of the Mother Centriole and Regulates TGF- β /BMP Signaling at the Primary Cilium. *Cell Rep.* 2018;22(10):2584–92.
301. Pala R, Alomari N, Nauli SM. Primary cilium-dependent signaling mechanisms. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences.* 2017.
302. Kondo H, Guo J, Bringhurst FR. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2002;17(9):1667–79.
303. Brändström H, Björkman T, Ljunggren Ö. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(3):831–5.
304. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and

- tumor suppression. Vol. 48, *Seminars in Cancer Biology*. 2018. p. 36–52.
305. Besschetnova TY, Kolpakova-Hart E, Guan Y, Zhou J, Olsen BR, Shah J V. Identification of Signaling Pathways Regulating Primary Cilium Length and Flow-Mediated Adaptation. *Curr Biol*. 2010;20(2):182–7.
306. Lai Y, Jiang Y. Reciprocal regulation between primary cilia and mtorc1. Vol. 11, *Genes*. 2020. p. 1–15.
307. Sherpa RT, Atkinson KF, Ferreira VP, Nauli SM. RAPAMYCIN INCREASES LENGTH AND MECHANOSENSORY FUNCTION OF PRIMARY CILIA IN RENAL EPITHELIAL AND VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS. *Int Educ Res J [Internet]*. 2016;2(12):91–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529994> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5436805>
308. Takahashi K, Nagai T, Chiba S, Nakayama K, Mizuno K. Glucose deprivation induces primary cilium formation through mTORC1 inactivation. *J Cell Sci*. 2018;131(1).
309. Rosengren T, Larsen LJ, Pedersen LB, Christensen ST, Møller LB. TSC1 and TSC2 regulate cilia length and canonical Hedgehog signaling via different mechanisms. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(14):2663–80.
310. Tamamura Y, Sakamoto K, Katsube K ichi, Yamaguchi A. Notch signaling is involved in Fgf23 upregulation in osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;518(2):233–8.
311. Marcet B, Chevalier B, Coraux C, Kodjabachian L, Barbry P. MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. Vol. 10, *Cell Cycle*. 2011. p. 2858–64.
312. Lopes SS, Lourenço R, Pacheco L, Moreno N, Kreiling J, Saúde L. Notch signalling regulates left-right asymmetry through ciliary length control. *Development*. 2010;137(21):3625–32.
313. Stasiulewicz M, Gray SD, Mastromina I, Silva JC, Björklund M, Seymour

- PA, et al. A conserved role for Notch signaling in priming the cellular response to Shh through ciliary localisation of the key Shh transducer Smo. *Dev.* 2015;142(13):2291–303.
314. Martin-Hurtado A, Martin-Morales R, Robledinos-Antón N, Blanco R, Palacios-Blanco I, Lastres-Becker I, et al. NRF2-dependent gene expression promotes ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Sci Rep.* 2019;9(1).
315. Sun YX, Xu AH, Yang Y, Li J. Role of Nrf2 in bone metabolism. Vol. 22, *Journal of Biomedical Science.* 2015.
316. Li X, Yang S, Han L, Mao K, Yang S. Ciliary IFT80 is essential for intervertebral disc development and maintenance. *FASEB J.* 2020;34(5):6741–56.
317. Oliazadeh N, Gorman KF, Eveleigh R, Bourque G, Moreau A. Identification of Elongated Primary Cilia with Impaired Mechanotransduction in Idiopathic Scoliosis Patients. *Sci Rep.* 2017;7.
318. Chini B, Parenti M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: How, when and why do they go there? Vol. 32, *Journal of Molecular Endocrinology.* 2004. p. 325–38.
319. Ishizaka N, Griendling KK, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: Relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension.* 1998;32(3):459–66.
320. Lamb ME, De Weerd WFC, Leeb-Lundberg LMF. Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: Arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. *Biochem J.* 2001;355(3):741–50.
321. Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. Differential targeting of β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae: A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(52):41447–57.

322. Lasley RD, Narayan P, Uittenbogaard A, Smart EJ. Activated cardiac adenosine A1 receptors translocate out of caveolae. *J Biol Chem.* 2000;275(6):4417–21.
323. Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(28):17744–8.
324. Shmuel M, Nodel-Berner E, Hyman T, Rouvinski A, Altschuler Y. Caveolin 2 regulates endocytosis and trafficking of the M1 muscarinic receptor in MDCK epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18(5):1570–85.
325. Lamb ME, Zhang C, Shea T, Kyle DJ, Leeb-Lundberg LMF. Human B1 and B2 bradykinin receptors and their agonists target caveolae-related lipid rafts to different degrees in HEK293 cells. *Biochemistry.* 2002;41(48):14340–7.
326. Yamaguchi T, Murata Y, Fujiyoshi Y, Doi T. Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *Eur J Biochem.* 2003;270(8):1816–27.
327. Estall JL, Yusta B, Drucker DJ. Lipid raft-dependent glucagon-like peptide-2 receptor trafficking occurs independently of agonist-induced desensitization. *Mol Biol Cell.* 2004;15(8):3673–87.
328. Castro M, Dicker F, Vilardaga JP, Krasel C, Bernhardt M, Lohse MJ. Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and β -arrestins. *Endocrinology.* 2002;143(10):3854–65.
329. Ferrari SL, Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Bisello A. Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves β -arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy. *J Biol Chem.* 1999;274(42):29968–75.
330. Kiss AL, Botos E. Endocytosis via caveolae: Alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol*

- Med. 2009;13(7):1228–37.
331. Vratsha V, Booksh K, Duncan RL, Nohe A. Mechanisms of cellular internalization of quantum dot@conjugated bone formation mimetic peptide CK2.3. *Nanomaterials*. 2018;8(7).
 332. Inder KL, Ruelcke JE, Petelin L, Moon H, Choi E, Rae J, et al. Cavim-1/PTRF alters prostate cancer cell-derived extracellular vesicle content and internalization to attenuate extracellular vesicle-mediated osteoclastogenesis and osteoblast proliferation. *J Extracell Vesicles*. 2014;3(1).
 333. Calizo RC, Scarlata S. Discrepancy between fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching diffusion measurements of G-protein-coupled receptors. *Anal Biochem*. 2013;440(1):40–8.
 334. Guo J, Song L, Liu M, Mahon MJ. Fluorescent ligand-directed colocalization of the parathyroid hormone 1 receptor with the brush-border scaffold complex of the proximal tubule reveals hormone-dependent changes in ezrin immunoreactivity consistent with inactivation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2012;1823(12):2243–53.
 335. Prakash YS, Thompson MA, Vaa B, Matabdin I, Peterson TE, He T, et al. Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(5).
 336. Sathish V, Thompson MA, Sinha S, Sieck GC, Prakash YS, Pabelick CM. Inflammation, caveolae and CD38-mediated calcium regulation in human airway smooth muscle. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(2):346–51.
 337. Goedicke-Fritz S, Kaistha A, Kacik M, Markert S, Hofmeister A, Busch C, et al. Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/KCa in caveolae of endothelial cells. *Eur J Cell Biol*. 2015;94(7–9):391–400.

338. Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, Sims SM, et al. P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: A signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol.* 2008;181(5):859–71.
339. Li J, Liu D, Ke HZ, Duncan RL, Turner CH. The P2X7 nucleotide receptor mediates skeletal mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42952–9.
340. Kifor O, Kifor I, Moore FD, Butters RR, Cantor T, Gao P, et al. Decreased expression of caveolin-1 and altered regulation of mitogen-activated protein kinase in cultured bovine parathyroid cells and human parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4455–64.
341. Galbiati F, Volonté D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, et al. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J.* 1998;17(22):6633–48.
342. Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. Vol. 273, *Journal of Biological Chemistry.* 1998. p. 1839–42.
343. Liao WX, Feng L, Zhang H, Zheng J, Moore TR, Chen DB. Compartmentalizing VEGF-induced ERK2/1 signaling in placental artery endothelial cell caveolae: A paradoxical role of caveolin-1 in placental angiogenesis in vitro. *Mol Endocrinol.* 2009;23(9):1428–44.
344. Fluhr H, Spratte J, Bredow M, Heidrich S, Zygmunt M. Constitutive activity of Erk1/2 and NF- κ B protects human endometrial stromal cells from death receptor-mediated apoptosis. *Reprod Biol.* 2013;13(2):113–21.
345. Sun MH, Chen XC, Han M, Yang YN, Gao XM, Ma X, et al. Cardioprotective effects of constitutively active MEK1 against H₂O₂-induced apoptosis and autophagy in cardiomyocytes via the ERK1/2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;512(1):125–30.

346. Tong S, Zhou T, Meng Y, Xu D, Chen J. AMPK decreases ERK1/2 activity and cancer cell sensitivity to nutrition deprivation by mediating a positive feedback loop involving eEF2K. *Oncol Lett.* 2020;20(1):61–6.
347. Zi X, Agarwal R. Modulation of mitogen-activated protein kinase activation and cell cycle regulators by the potent skin cancer preventive agent silymarin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263(2):528–36.
348. Stefanelli C, Tantini B, Fattori M, Stanic' I, Pignatti C, Clo C, et al. Caspase activation in etoposide-treated fibroblasts is correlated to ERK phosphorylation and both events are blocked by polyamine depletion. *FEBS Lett.* 2002;527(1–3):223–8.
349. Lee ER, Kang YJ, Kim JH, Lee HT, Cho SG. Modulation of apoptosis in HaCaT keratinocytes via differential regulation of ERK signaling pathway by flavonoids. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31498–507.
350. Ardura JA, Portal-Núñez S, Castelbón-Calvo I, Martínez de Toda I, De la Fuente M, Esbrit P. Parathyroid Hormone-Related Protein Protects Osteoblastic Cells From Oxidative Stress by Activation of MKP1 Phosphatase. *J Cell Physiol.* 2017;232(4):785–96.
351. Horsch K, De Wet H, Schuurmans MM, Allie-Reid F, Cato ACB, Cunningham J, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1/dual specificity phosphatase 1 mediates glucocorticoid inhibition of osteoblast proliferation. *Mol Endocrinol.* 2007;21(12):2929–40.
352. Sanderson M, Gijzen HS Van, Hough S, Ferris WF. The role of MKP-1 in the anti-proliferative effects of glucocorticoids in primary rat pre-osteoblasts. *PLoS One.* 2015;10(8).
353. Park WY, Park JS, Cho KA, Kim DI, Ko YG, Seo JS, et al. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem.* 2000;275(27):20847–52.
354. Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. Vol. 39, *Cancer and Metastasis Reviews.* 2020. p. 397–414.

355. Wheaton K, Sampsel K, Boisvert FM, Davy A, Robbins S, Riabowol K. Loss of functional caveolae during senescence of human fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2001;187(2):226–35.
356. Sun C, Wang N, Huang J, Xin J, Peng F, Ren Y, et al. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C prevents bone marrow stromal cell senescence in vitro. *J Cell Biochem.* 2009;108(2):519–28.
357. Ding L, Zeng Q, Wu J, Li D, Wang H, Lu W, et al. Caveolin-1 regulates oxidative stress-induced senescence in nucleus pulposus cells primarily via the p53/p21 signaling pathway in vitro. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):9521–7.
358. Volonte D, Liu Z, Musille PM, Stoppani E, Wakabayashi N, Di YP, et al. Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Mol Biol Cell.* 2013;24(12):1852–62.
359. Volonte D, Galbiati F. Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Rep.* 2009;10(12):1334–40.
360. Jeffries EP, Di Filippo M, Galbiati F. Failure to reabsorb the primary cilium induces cellular senescence. *FASEB J.* 2019;33(4):4866–82.
361. Guadiana SM, Parker AK, Filho GF, Sequeira A, Semple-Rowland S, Shaw G, et al. Type 3 adenylyl cyclase and somatostatin receptor 3 expression persists in aged rat neocortical and hippocampal neuronal cilia. *Front Aging Neurosci.* 2016;8(MAY).
362. Li A, Saito M, Chuang JZ, Tseng YY, Dedesma C, Tomizawa K, et al. Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):402–11.
363. Sun F, Mao X, Xie L, Ding M, Shao B, Jin K. Notch1 signaling modulates neuronal progenitor activity in the subventricular zone in response to aging and focal ischemia. *Aging Cell.* 2013;12(6):978–87.

364. Tirou L, Russo M, Faure H, Pellegrino G, Demongin C, Daynac M, et al. Sonic Hedgehog receptor Patched deficiency in astrocytes enhances glucose metabolism in mice. *Mol Metab.* 2021;47.
365. Inestrosa NC, Tapia-Rojas C, Lindsay CB, Zolezzi JM. Wnt Signaling Pathway Dysregulation in the Aging Brain: Lessons From the Octodon degus. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8.
366. Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, et al. The regulation of bone metabolism and disorders by wnt signaling. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences.* 2019.
367. Zheng H, Jia L, Liu CC, Rong Z, Zhong L, Yang L, et al. TREM2 promotes microglial survival by activating wnt/ β -catenin pathway. *J Neurosci.* 2017;37(7):1772–84.
368. Han L, Wang B, Wang R, Gong S, Chen G, Xu W. The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor. Vol. 10, *Stem Cell Research and Therapy.* 2019.
369. Güemes M, Garcia AJ, Rigueur D, Runke S, Wang W, Zhao G, et al. GATA4 is essential for bone mineralization via $ER\alpha$ and TGF β /BMP pathways. *J Bone Miner Res.* 2014;29(12):2676–87.
370. Luo K. Signaling cross talk between TGF- β /Smad and other signaling pathways. Vol. 9, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2017.