

**Universidad San Pablo-CEU  
CEU Escuela Internacional de Doctorado  
(CEINDO)**

**PROGRAMA DE DOCTORADO en MEDICINA TRASLACIONAL**



**CEU**

*Escuela Internacional  
de Doctorado*

**Papel del receptor de tipo I de la  
parathormona (PTH1R) y del cilio primario  
en la mecanotransducción ósea y en el  
reclutamiento y la diferenciación de  
precursores osteoclasticos por parte de  
células osteocíticas MLO-Y4**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:  
Irene Tirado Cabrera

Dirigida por:  
Dra. Arancha Rodríguez de Gortázar Alonso-Villalobos  
Dr. Juan Antonio Ardura Rodríguez

MADRID, 2023



TESIS DOCTORAL

IRENE TIRADO CABRERA

2023



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

HACEN CONSTAR:

Que Dña. Irene Tirado Cabrera ha realizado en el Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) bajo su dirección el trabajo titulado *“Papel del receptor de tipo I de la parathormona (PTH1R) y del cilio primario en la mecanotransducción ósea y en el reclutamiento y la diferenciación de precursores osteoclasticos por parte de células osteocíticas MLO-Y4 ”* con objeto de obtener el Grado de Doctora, y que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios y constituye una aportación original al tema.

MADRID, 16 de noviembre de 2023

Dña. Arancha Rodríguez de Gortázar Alonso-Villalobos    D. Juan Antonio Ardura Rodríguez



# ***Agradecimientos***



Tras un largo recorrido y habiendo llegado al final de este, me gustaría agradecer a todos los que han contribuido para que esto fuera posible.

En primer lugar, dar las gracias a la Universidad San Pablo CEU y a todo su personal docente y no docente, en especial al Departamento de Ciencias Médicas Básicas por toda la ayuda brindada y hospitalidad durante estos años. Expresar también mi gratitud a la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral por las becas de viaje recibidas para el congreso de Granada en 2018 y el congreso de Vitoria-Gasteiz en 2021, además de la beca FEIOMM de investigación en 2019.

Me gustaría agradecer también a mis directores de Tesis, a Arancha por tu gran optimismo, positividad y por tu amor a la ciencia. Gracias de corazón por haber sido mi mentora y haberme guiado durante estos años. Gracias por haber estado siempre al pie del cañón, haciendo que todo funcionara, por tu ayuda incondicional y tu enorme disponibilidad, aunque fuera en fin de semana. Y a Juanan por tu enorme paciencia, por estar siempre que se te necesita, por hacer que todo fluya más fácilmente y parezca más sencillo de lo que realmente es. Gracias por tu constante apoyo y por hacernos tener los pies sobre la tierra. Gracias a ambos por haberme ayudado en este largo camino y haberme guiado. Porque juntos formáis un gran equipo y no puedo estar más agradecida de formar parte de él.

A mi compañero Edu, por ser uno de mis mayores apoyos en el *lab* porque ha sido mi calma en tiempos de tempestad, y por transmitir esa alegría siempre. Porque es un gran amigo que siempre está dispuesto a escuchar y a ayudar. A Sara por esas largas horas contando cilios, helándose en el confocal aun llevando doble bata. A Joan, mi pequeño gran descubrimiento, gracias por alegrarnos el día con esa risa tan tuya, por ser un gran apoyo en esta etapa final y por hacer que tuviera otra perspectiva con el “si es que es más graciosa ella”. A José, nuestro último integrante y mi compi de despacho, gracias por hacer que

las tardes sean mucho más amenas y por animarme siempre. Agradecer también a Luis A. por su ayuda y disponibilidad.

A Irina, mi alma gemela, mi compañera de aventuras, gracias por haber aparecido en mi camino y haberlo hecho más fácil. Gracias por todas esas tardes hasta las tantas en el IMMA mano a mano, por tu ayuda y por ser como eres. Gracias por haber compartido tanto conmigo, por lo que hemos vivido y por lo que aún nos queda que vivir juntas. También mencionar a las *Ayusas*, Noe, Pepa y mi pelirroja Susana, por hacer que los primeros años en el IMMA fueran mucho más fáciles gracias a vuestra ayuda y consejos.

Agradecer también las tardes compartidas de risas, historias y trabajo con Sergio y Javi A. Gracias Sergio por tus bromas y tus consejos y gracias Javi A. por esos abrazos tan reconfortantes, por hacerme compañía mil y una tarde, en especial el día de los ELISAS, y gracias también por amenizarnos las tardes con tus sesiones de música. Gracias también a Vicent, a mi pesada favorita Inés y a Sara el haber estado alborotando y llenando de alegría el IMMA estos últimos años.

Dar las gracias también a Eli, Carmelita, Javi S., Leti, Marisa y David por todos los momentos vividos fuera del *lab*, por la amistad que hemos tenido desde el principio de esta etapa y por seguir conservándola. Gracias por haber formado parte de este camino.

También me gustaría expresar mi gratitud a los técnicos del IMMA, especialmente a Irene G. por haber sido más que una compañera de trabajo, por tus consejos, por estar siempre dispuesta a ayudar y porque te has robado un pedacito de mí. Gracias por haber estado cuando te he necesitado. A Vir por esos abrazos que me reconfortaban tanto y por nuestras charlas sanadoras, y a Luiz Z. por su amabilidad y por estar siempre dispuesto a ayudar. También me gustaría dar las gracias a Sonia, porque no sé qué habría hecho sin ti durante estos años en docencia, gracias por tu inmensa ayuda.

También quiero agradecer a mis compañeros de carrera, Pilar, Isa, Blanca, Ana, Lucía, Ana Palma y Ricky por los buenos años que vivimos juntos, especialmente a Pilar, mi tándem, gracias por haber compartido tantos momentos conmigo, por haber empezado juntas este camino que tan tedioso ha sido para ambas, por compartirlo, por haber estado siempre y por haber sido uno de mis mayores apoyos. A Isa, porque, aunque nuestra relación sea de amor-odio siempre estás cuando se te necesita, porque echo demasiado de menos nuestras noches de charlas hasta las antas, con un vinito y comida poco saludable junto con Pilar. Y a Blanca, por estar siempre y por hacer que la distancia y el tiempo no sean un inconveniente. También quiero mencionar a mi *Erasmus family* porque me dieron el mejor año de mi vida y porque a pesar del tiempo y la distancia siempre estáis presentes. Espero poder compartir muchos más momentos a vuestro lado.

Y por último y no menos importante, a mi familia. A ti Rober, por haberme aguantado sobre todo estos últimos meses, por hacer que todo fuera más fácil y sobre todo por esos abrazos de 20 segundos que tanto me gustan. Gracias por aparecer en mi vida cuando yo menos me lo esperaba y por haberme aportado tanto. A mis padres y a mi hermano, por ser los pilares fundamentales de mi vida, el motor que hace que todo funcione. Gracias de corazón, papá y mamá, por vuestro constante apoyo, por vuestra ayuda y por vuestros consejos, no sé qué haría sin vosotros. Gracias hermanito por hacer que sea mejor persona, por enseñarme tanto y por estar siempre. Sois la suerte de mi vida. A mi abuelita Juana, por su inmenso cariño. A mi abuelita Dolores, por ser como una segunda madre, por consentirme, cuidarme y quererme como solo ella sabe. Y a mi abuelito Jacinto, por sus sabios consejos, por esas luchas de dedo pulgar, por esos paseos por la tarde al río, por todos los buenos momentos que he vivido junto a ti, por haber estado y seguir estando, no sabes lo mucho que te echo de menos. Mi mayor objetivo siempre ha sido que te sintieras orgulloso de mí. Así que esto es por y para ti. ¡Te quiero!



# ***Resumen***



El hueso es un tejido dinámico que se remodela continuamente ante una gran variedad de estímulos, entre ellos el estímulo mecánico. Los osteocitos, las células más abundantes del tejido óseo, responden a las fuerzas mecánicas controlando la función de osteoblastos y osteoclastos. De modo que el aumento de actividad física conlleva un incremento de la formación ósea, mientras que la inmovilización aumenta la resorción. Además, la estimulación mecánica disminuye la apoptosis de los osteocitos y favorece la formación de hueso. El cilio primario, un orgánulo apendicular formado durante la fase quiescente del ciclo celular, se ha descrito como un potencial mecanosensor en las células óseas. Ciertas respuestas osteogénicas inducidas por flujo de fluido (FF) *in vitro* disminuyen por inhibición del cilio primario en osteocitos MLO-Y4. Otro potencial mecanosensor en el metabolismo óseo son las caveolas, pequeñas invaginaciones de membrana plasmática ricas en colesterol y fosfolípidos, cuya función principal es el reclutamiento de moléculas para obtener concentraciones apropiadas de efectores de señalización. El receptor de tipo 1 de la parathormona (PTH) (PTH1R) modula los efectos de osteoblastos, osteoclastos y osteocitos tras su activación por la PTH o la proteína relacionada con la PTH (PTHrP) en células osteoblásticas. Además, algunas acciones de PTH1R parecen desencadenarse directamente por estimulación mecánica. Por lo que se planteó que PTH1R forma un complejo de señalización en el cilio primario o en las caveolas esencial para la mecanotransducción en osteocitos, el cual afecta a la comunicación entre los osteocitos y los osteoclastos. El receptor PTH1R, el cilio primario y las caveolas forman parte de la maquinaria molecular responsable de transducir la estimulación mecánica para disminuir la migración y la diferenciación osteoclástica. Esto se produciría a través de la regulación de la secreción de las citoquinas promigratorias de monocitos CXCL5 e IL-6. También se determinó que, en condiciones de estimulación mecánica se produce la elongación del cilio primario, permitiendo una mayor movilización del receptor PTH1R al cilio, el cual se distribuye a lo largo de todo el cilio primario. Esto podría potencialmente aumentar la capacidad de los osteocitos para detectar estímulos mecánicos y, por consiguiente, que se activaran más fácilmente las vías de señalización de PTH1R. También se determinó que algunas vías de señalización

activadas por PTH1R, como la vía *Hedgehog*, en la cual está implicada la proteína GLI1, así como la activación de la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC), estaban implicadas tanto en la migración como en la diferenciación de las células monocíticas, puesto que tras la inhibición de GLI1, PKA y PKC se producía un incremento tanto en la migración como en la diferenciación de estas células. Este efecto se veía inhibido cuando se neutralizaba IL-6 en los secretomas de los osteocitos estimulados tanto mecánicamente con FF o con PTHrP (1-37). En conclusión, los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral indican que el cilio primario, las caveolas y PTH1R son necesarios en los osteocitos para una correcta comunicación con los osteoclastos y muestran que la estimulación mecánica inhibe el reclutamiento y la diferenciación de los osteoclastos a través de CXCL5, mientras que la activación de PTH1R y del cilio primario regula a los osteoclastos a través de IL-6.

**Palabras clave:** receptor de tipo 1 de la parathormona (PTH1R), proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), estímulo mecánico, flujo de fluido (FF), cilio primario, caveolas, osteocitos, osteoclastos, CXCL5, IL-6.

# ***Summary***



Bone is a dynamic tissue that continually remodels in response to a wide variety of stimuli, including mechanical stimuli. Osteocytes, the most abundant cells in bone tissue, respond to mechanical forces by controlling the function of osteoblasts and osteoclasts. Thus, increased physical activity leads to increased bone formation, while immobilization increases resorption. In addition, mechanical stimulation decreases osteocyte apoptosis and promotes bone formation. The primary cilium, an appendicular organelle formed during the quiescent phase of the cell cycle, has been described as a potential mechanosensor in bone cells. Certain osteogenic responses induced by fluid flow (FF) *in vitro* are diminished by inhibition of the primary cilium in MLO-Y4 osteocytes. Another potential mechanosensor in bone metabolism are caveolae, small plasma membrane invaginations rich in cholesterol and phospholipids, whose main function is the recruitment of molecules to obtain appropriate concentrations of signalling effectors. The parathyroid hormone (PTH) receptor type 1 (PTH1R) modulates the effects of osteoblasts, osteoclasts and osteocytes following activation by PTH or PTH-related protein (PTHrP) on osteoblastic cells. In addition, some actions of PTH1R appear to be directly triggered by mechanical stimulation. It was therefore proposed that PTH1R forms a signalling complex in the primary cilium or caveolae essential for mechanotransduction in osteocytes, which affects communication between osteocytes and osteoclasts. PTH1R receptor, primary cilium and caveolae are part of the molecular machinery responsible for transducing mechanical stimulation to decrease osteoclast migration and differentiation. This would occur through the regulation of the secretion of the cytokines CXCL5 and IL-6. It was also determined that, under mechanical stimulation, elongation of the primary cilium occurs, allowing for increased mobilization of the PTH1R receptor to the cilium, which is distributed throughout the primary cilium. This could potentially increase the ability of osteocytes to detect mechanical stimuli, and therefore more readily activate PTH1R signalling pathways. Signalling pathways activated by PTH1R, such as the Hedgehog pathway, in which GLI1 protein is involved, as well as activation of protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC), were also found to be involved in both migration and differentiation of monocytic cells, since inhibition



of GLI1, PKA and PKC resulted in an increase in both migration and differentiation of these cells. This effect was inhibited when IL-6 was neutralised in the secretomes of osteocytes stimulated either mechanically with FF or with PTHrP (1-37). In conclusion, the data obtained in this PhD thesis indicate that the primary cilium, caveolae and PTH1R are necessary in osteocytes for proper communication with osteoclasts and show that mechanical stimulation inhibits osteoclast recruitment and differentiation through CXCL5, while activation of PTH1R and primary cilium regulates osteoclasts through IL-6.

**Keywords:** parathyroid hormone (PTH) receptor type 1 (PTH1R), PTH-related protein (PTHrP), mechanical stimulation, fluid flow (FF), primary cilium, caveolae, osteocytes, osteoclasts, CXCL5, IL-6.

# ***Índice***



<b>Resumen</b> .....	13
<b>Summary</b> .....	17
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	27
<b>Introducción</b> .....	35
1. Tejido óseo.....	37
1.1. Composición y funciones del tejido óseo.....	37
1.2. Tipos de tejido óseo.....	45
1.3. Desarrollo y mantenimiento del tejido óseo.....	46
1.3.1. Osteogénesis.....	46
1.3.2. Modelado óseo.....	48
1.3.3. Remodelado óseo.....	49
2. Los osteocitos como reguladores del metabolismo óseo.....	53
2.1. Los osteocitos como reguladores de los osteoclastos: papel de RANKL.....	53
2.2. Papel de los osteocitos en la mecanotransducción ósea.....	56
2.2.1. Mecanorreceptores en el osteocito.....	57
2.2.2. Viabilidad osteocítica como respuesta biológica a la estimulación mecánica.....	60
3. Mecanismos reguladores del metabolismo del hueso.....	61
3.1. Sistema PTHrP/PTH1R y su papel en el metabolismo del hueso.....	61
3.2. El cilio primario como modulador del metabolismo óseo.....	68
3.2.1. Ciliogénesis. Estructura del cilio primario y sistema de transporte intraflagelar (IFT).....	68
3.2.2. El cilio primario como mecanotransductor.....	71



3.2.3. Vías de señalización relacionadas con el cilio primario. Señalización Hedgehog.....	73
3.3. Las caveolas como moduladoras del metabolismo óseo.....	75
3.3.1. Estructura y formación de las caveolas.....	75
3.3.2. Dinámica de las caveolas y función mecanosensora.....	79
3.3.3. Papel de las caveolas en tejido óseo.....	80
<b>Hipótesis.....</b>	<b>83</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>87</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>91</b>
1. Modelos experimentales in vitro.....	93
1.1. Células osteocíticas de ratón MLO-Y4.....	93
1.2. Macrófagos de ratón RAW 264.7.....	95
1.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de la capa leucocitaria.....	96
1.4. Células mononucleares de sangre periférica.....	97
2. Técnicas experimentales.....	99
2.1. Estímulos: agonista y antagonista/inhibidores.....	99
2.2. Estimulación mecánica mediante flujo de fluido (FF).....	100
2.3. Transfecciones transitorias.....	101
2.4. Inmunofluorescencia (IF).....	102
2.5. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	103
2.6. Extracción de proteínas y análisis de inmunotransferencia (IT).....	104
2.7. Análisis proteómico.....	106
2.8. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).....	107

2.9. Ensayo de migración celular.....	108
2.10. Generación de osteoclastos para la evaluación de la osteoclastogénesis.....	109
2.11. Análisis estadístico.....	110
<b>Resultados.....</b>	<b>111</b>
1. Estudio del efecto del secretoma de células osteocíticas estimuladas mecánicamente sobre la migración y la diferenciación de preosteoclastos.....	113
2. Localización del receptor PTH1R en el cilio primario de osteocitos estimulados mecánicamente.....3.....	121
3. Implicación de las vías Hegdehog, PKA y PKC en la regulación osteocítica de la migración de monocitos y de la osteoclastogénesis.....	126
4. Estudio proteómico del medio condicionado de las células osteocíticas MLO-Y4.....	132
5. Papel de CXCL5 e IL-6 en el reclutamiento y la diferenciación de los osteoclastos.....	144
6. Implicación de las caveolas en la comunicación entre las células osteocíticas y los precursores osteoclastícos.....	152
7. Papel de CXCL5 e IL-6 en el reclutamiento de precursores osteoclastícos en presencia o ausencia de caveolas en las células MLO-Y4.....	156
8. Efectos de las caveolas en el cilio primario de las células osteocíticas MLO-Y4.....	157
<b>Discusión.....</b>	<b>161</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>179</b>
<b>Conclusions.....</b>	<b>183</b>
<b>Limitaciones del estudio.....</b>	<b>187</b>
<b>Perspectivas futuras.....</b>	<b>191</b>



<b>Referencias</b> .....	195
<b>Anexos</b> .....	237

# ***Abreviaturas***



AC	Adenilato ciclasa
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
B2R	Receptor de bradicinina tipo 2
BCA	Ácido bicinconínico
BME	Medio basal <i>Eagle</i>
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas
BSA	Albúmina de suero bovino
BSP	Sialoproteína ósea
CaMKII	Vía de la proteína quinasa II dependiente de calmodulina
Cat K	Catepsina K
CAV	Caveolina
CCL2	Ligando 2 de quimioquina
CCL7	Ligando 7 de quimioquina
CE	Control estático
cFMS	Receptor del factor 1 estimulante de colonias de macrófagos
CFU-GM	Unidad formadora de colonias de granulocitos-macrófagos
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
<i>Col1a1</i>	Colágeno tipo 1 $\alpha$ -1
COX-2	Subunidad 2 del citocromo oxidasa
CST3	Cistatina 3
Cx	Conexina
CXCL5	Ligando 5 de quimioquina con motivo C-X-C
DC-STAMP	Proteína transmembrana específica de células dendríticas
DE	Desviaciones estándar
DKK	Proteína relacionada con Dickkopf
<i>Dlx5</i>	Gen <i>distal-less homeobox 5</i>
DMEM	Medio <i>Eagle</i> modificado de <i>Dulbecco</i>
DMP1	Proteína de matriz dentina 1
DYN2	Dinamina-2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima



ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
ET <sub>A</sub>	Receptor de endotelina subtipo A
FA	Fosfatasa alcalina
FF	Flujo de fluido
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FT	Fibras de transición
GANT61	Antagonista de GLI1 61
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GLI	Factor de transcripción de glioma
GLIF	Forma completa de GLI
GLP-1R	Receptor del péptido 1 similar al glucagón
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HC	Hidrato de cloral
Hh	<i>Hedgehog</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1</i>
HRP	Peroxidasa
IF	Inmunofluorescencia
IFT	Transporte intraflagelar
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IGFBP4	Proteína 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
IgG	Inmunoglobulina G
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IL	Interleuquina
INHBA	Inhibina beta A
IT	Inmunotransferencia
KIF13B	Quinesina-3 motora
KIF3A	Proteína similar a la quinesina
MAPK	Vía de la proteína quinasa activada por mitógenos
MC	Medio condicionado
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1

M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MEPE	Fosfoglicoproteína de matriz extracelular
MITF	Factor de transcripción asociado a microftalmía
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NFATc1	Factor nuclear de las células T activadas 1
NF-κB	Vía del factor nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
NUCB1	Nucleobindina-1
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Osterix
PAGE	Geles de poliacrilamida
PANX1	Panexina 1
PBS	Tampón fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFRα	Receptor α del factor de crecimiento derivado de plaqueta
PFA	Paraformaldehído
PGE	Prostaglandina
PI3-K	Fosfoinositol-3-quinasa
PIP	Fosfatidilinositol fosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PKD	Policistina
PLAU	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
PLC	Fosfolipasa C
Ptch1	<i>Patched 1</i>
PtdIns	Fosfatidilinositol
PTH	Parathormona
PTH1R	Receptor de tipo I de la PTH
PTHrP	Proteína relacionada con la PTH



qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa-B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B
RANTES	Quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por linfocitos T
RE	Retículo endoplasmático
RPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RUNX2	Factor de transcripción 2 relacionado con <i>Runt</i>
SAA3	Suero amiloide A3
SDF-1	Factor 1 derivado de células del estroma
SDS	Sulfato de dodecilo sódico
SEMA	Semaforina
Serpin C1	Antitrombina-III
SFB	Suero fetal bovino
SFT	Suero fetal de ternera
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
siARN	ARN de interferencia
SIBLING	<i>Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein</i>
SMO	<i>Smoothed</i>
SOST	Esclerostina
T/A	Temperatura ambiente
T/N	Toda la noche
TAK1	Quinasa 1 activada por el TGF- $\beta$
TBS	Tampón tris salino
TFA	Ácido trifluoroacético
TGFBI	Factor de crecimiento transformante inducido por beta
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TMT	<i>Tandem mass tag</i> , etiqueta de masa en tándem
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF6	TNF asociado al factor 6
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato

---

TRPV4	Receptor de potencial vaniloide 4
u.a.	Unidades arbitrarias
V-ATPasa	ATPasas vacuolares
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VGCC	Canal de calcio activado por voltaje
VPAC2	Receptor de péptido intestinal vasoactivo 2
Wnt	Proteína tipo <i>Wingless</i>
ZT	Zona de transición
$\alpha$ -MEM	Medio de cultivo esencial mínimo $\alpha$
$\beta$ AR	Receptor adrenérgico $\beta$ 2
$\mu$ OR	Receptor $\mu$ -opioide



# ***Introducción***



## 1. Tejido óseo

### 1.1. Composición y funciones del tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado compuesto por una matriz extracelular mineralizada y por células óseas. La matriz mineralizada incluye un componente mineral (65%), orgánico (25%) y agua (10%). El componente mineral del tejido óseo es crucial para mantener la fuerza y la rigidez ósea. El grado de mineralización del tejido óseo viene determinado principalmente por la tasa de recambio óseo, proceso que consiste en la renovación del tejido deteriorado (1). El **componente inorgánico** del hueso está constituido principalmente por iones de fosfato y calcio, aunque también se pueden encontrar cantidades significativas de bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, cinc, bario y estroncio (2,3). La mayor parte del **componente orgánico** es colágeno tipo I, pero también hay proteínas no colágenas que contribuyen a la mineralización y adhesión (1,4). El colágeno tipo I es depositado por los osteoblastos durante la formación ósea. Primero se sintetiza el procolágeno como precursor, el cual está formado por tres cadenas polipeptídicas en triple hélice, estabilizado por modificaciones postraduccionales y enlaces disulfuro. Tras su secreción en la matriz extracelular, el procolágeno se escinde de los extremos amino y carboxilo terminal, lo que permite el autoensamblaje espontáneo en fibrillas de colágeno que serán estabilizadas por modificaciones postraduccionales que permiten la formación de enlaces cruzados intermoleculares e interfibrilares (5). Las proteínas no colágenas regulan y dirigen la construcción y el mantenimiento de la matriz extracelular. Aunque estas proteínas solo representan un 2% del peso del hueso, juegan un papel crucial en la regulación de la formación y el tamaño de las fibrillas de colágeno, en el control de la mineralización y, además participan en la señalización y en la adhesión celular. Estas proteínas se dividen en varios grupos:

1. **Proteoglucanos**, que contribuyen en la regulación de la mineralización al afectar a la nucleación y al crecimiento del mineral de fosfato cálcico. Además, dirigen el desarrollo embrionario del esqueleto (6).

2. **Glucoproteínas**, participan en la regulación de la mineralización ósea. La fosfatasa alcalina (FA) es usada como un biomarcador de formación ósea. También interviene en la regulación de la adhesión y en el proceso de mineralización llevado a cabo por la vitronectina, una importante glucoproteína de adhesión celular (4,7).
3. Proteínas fosforiladas de la matriz como las proteínas **SIBLING** (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) que están asociadas con la mineralización ósea (4).
4. **Osteocalcina (OCN)**, mejora la unión del calcio y controla la agregación de mineral sobre la matriz orgánica. Se utiliza como marcador de formación ósea, aunque también podría regular a los osteoclastos y a sus precursores (8).
5. **Osteonectina**, se localiza en lugares de agregación mineral, por lo que podría promover la nucleación de nuevos minerales. También juega un papel importante en la proliferación osteoblástica. Además, se puede unir al factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) pudiendo regular su actividad (4,9).

El **agua** es el responsable de algunas de las propiedades hidráulicas de los tejidos duros, y las estructuras que presentan deshidratación tienen una mayor debilidad. La mayoría del agua presente en el hueso se estima que se localiza en el sistema canalicular, alrededor de los osteocitos y de sus proyecciones dendríticas (10).

Las células óseas que componen el hueso son:

- **Osteoblastos**, son células cuboidales, con un núcleo situado cerca de la membrana basal. Se localizan a lo largo de la superficie ósea y representan un 5% de las células óseas. Son responsables de la síntesis del colágeno tipo I y de la secreción de enzimas que promueven la mineralización de la matriz para facilitar la formación de hueso. Estas células muestran características morfológicas propias de

las células sintetizadoras de proteínas, incluyendo un abundante retículo endoplasmático rugoso (RER) y un prominente aparato de Golgi, así como varias vesículas de secreción (11). Los osteoblastos se diferencian a partir de las células madre mesenquimales. Para ello se requiere la expresión de genes específicos y de una serie de procesos programados, como la síntesis de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y miembros de la vía Wnt. La expresión del factor de transcripción relacionado con *Runt* (*Runx2*), el gen *distal-less homeobox 5* (*Dlx5*) y *osterix* (*Osx*) son cruciales en el proceso de diferenciación osteoblástica (12). Adicionalmente, *Runx2* es capaz de regular otros genes en osteoblastos como el colágeno tipo 1  $\alpha$ -1 (*Col1a1*), *Fa*, la sialoproteína ósea (*Bsp*) y *Ocn*. En el proceso de diferenciación de osteoblastos, cuando los progenitores osteoblásticos expresan *Runx2* y *Col1a1* se produce una fase de proliferación. En esta fase, los progenitores muestran altos niveles de *Fa*, considerándose preosteoblastos. La transición de los preosteoblastos a osteoblastos maduros se caracteriza por un incremento en la expresión de *Osx* y en la secreción de proteínas de matriz como OCN, BSP I/II y colágeno tipo I (13). Además, hay una serie de factores que tienen un papel fundamental en la diferenciación de los osteoblastos, como por ejemplo, el FGF. La interacción entre los osteoblastos y la matriz ósea a través de las integrinas también modula la diferenciación, la función y la supervivencia de los osteoblastos (14). Los osteoblastos maduros presentan procesos citoplasmáticos hacia la matriz ósea y alcanzan los procesos osteocitarios. En esta etapa, los osteoblastos maduros pueden sufrir apoptosis o convertirse en osteocitos (12,15). Entorno a un 60-80% de los osteoblastos sufren apoptosis tras el proceso de síntesis y mineralización de matriz. Las BMP además de desempeñar un papel importante en la diferenciación de los osteoblastos también inducen la apoptosis en progenitores osteoblásticos mesenquimales en los tejidos interdigitales durante el desarrollo de manos y pies, así como en osteoblastos maduros. La

señalización Wnt inhibe la apoptosis de los osteoblastos maduros y de los osteocitos. En cambio, la esclerostina, un antagonista de la vía Wnt, sintetizada por los osteocitos induce la apoptosis de los osteoblastos *in vitro*. La parathormona (PTH) y la carga mecánica reducen la síntesis de esclerostina, favoreciendo la diferenciación y la prolongación de vida de los osteoblastos (14).

- **Osteoclastos**, se originan de las células madre hematopoyéticas (16). El primer precursor reconocido del osteoclasto es la unidad formadora de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM) en la médula ósea. Los precursores mononucleares hematopoyéticos se fusionan para formar osteoclastos maduros, los cuales son multinucleados. Un osteoclasto maduro puede llegar a tener hasta 20 núcleos. El tamaño y el número de núcleos es importante en el proceso de resorción ósea, ya que los osteoclastos de mayor tamaño presentan una menor capacidad de resorción ósea (14). Recientemente, se ha comprobado que los osteoclastos maduros también pueden sufrir procesos, no solo de fusión, sino también de fisión, dando lugar a unas células llamadas osteomorfos. Los osteomorfos son células móviles capaces de volver a fusionarse y formar osteoclastos funcionales (17). Los precursores osteoclásticos proliferan en respuesta a factores de crecimiento como la interleuquina 3 (IL-3), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) para formar precursores comprometidos a la diferenciación de osteoclastos. Estos preosteoclastos mononucleares comprometidos se diferencian y se fusionan para formar osteoclastos multinucleados bajo la influencia del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL). También se requieren proteínas de membrana como la proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) y la subunidad D2 de la V-ATPasa (14). M-CSF, secretado por las células mesenquimales osteoprogenitoras y por los osteoblastos, contribuye a la diferenciación, migración y

supervivencia de los osteoclastos uniéndose al receptor del factor 1 estimulante de colonias de macrófagos (cFMS) presente en los precursores osteoclásticos. Mientras que RANKL, secretado por osteoblastos, osteocitos y células estromales, facilita la formación de osteoclastos cuando se une a su receptor RANK presente en los precursores osteoclásticos (18,19). RANKL media distintos aspectos de la diferenciación de osteoclastos, incluyendo la fusión de precursores mononucleares en células multinucleadas, la adquisición de marcadores específicos de osteoclastos, la adhesión de estas células a las superficies óseas, la estimulación de la resorción y promover la supervivencia de los osteoclastos. La expresión y secreción de RANKL por parte de los osteoblastos está regulada por hormonas y citoquinas como la vitamina D, la PTH, y por IL-1, IL-6 e IL-11, las cuales promueven la osteoclastogénesis (14). Por otro lado, la osteoprotegerina (OPG), la cual es producida por osteoblastos y células estromales entre otras células, se une a RANKL, evitando la interacción RANKL/RANK, dando lugar a la inhibición de la osteoclastogénesis (20,21). La interacción RANKL/RANK también promueve la expresión de otros factores osteoclastogénicos como el factor nuclear de las células T activadas 1 (NFATc1), el cual induce la expresión de la proteína DC-STAMP, esencial para la fusión de los precursores osteoclásticos (22). Cuando tiene lugar la interacción de NFATc1 con los factores de transcripción PU.1, cFos y el factor de transcripción asociado a microftalmía (MITF), se produce la regulación de genes específicos de osteoclastos como son: la fosfatasa ácida resistente al tartrato (*Trap*) o catepsina K, esenciales para la actividad de los osteoclastos (23). Los osteoclastos pueden expresar ATPasas vacuolares (V-ATPasa) en el borde ondulado de su membrana, donde bombean protones a las lagunas de resorción para disolver la hidroxiapatita (16). En esta región, los protones y las enzimas como TRAP, catepsina K y la metaloproteínasa 9 de matriz (MMP-9) son transportadas a los compartimentos llamados lagunas de *Howship*

permitiendo la degradación ósea (24,25). Tras completar la resorción ósea, los osteoclastos pueden sufrir muerte celular programada o apoptosis. M-CSF, RANKL, IL-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) son capaces de retrasar la apoptosis, a través de la activación de la vía de señalización de las quinasas ERK. La activación de ERK es esencial para mantener la supervivencia de los osteoclastos. El fosfoinositol-3-quinasa (PI3-K) presenta efectos antiapoptóticos en los osteoclastos y podría promover su supervivencia activando a la quinasa AKT, la cual es requerida para la diferenciación de los osteoclastos, pero no para su supervivencia, ya que AKT es un regulador negativo de la vía de señalización ERK. mTOR es otra diana de PI3-K-AKT requerida para las acciones antiapoptóticas de M-CSF, RANKL y TNF- $\alpha$ . mTOR inhibe las acciones de BIM, una proteína proapoptótica. ERK también regula a ciertas proteínas de supervivencia como a MTT y BCL-2. mTOR también es activado por las proteínas ERKs (14). Además de degradar el hueso, los osteoclastos también producen factores llamados clastoquinas que controlan a los osteoblastos durante el remodelado óseo, y también hay evidencias de que los osteoclastos pueden regular directamente el nicho de las células madre hematopoyéticas a través de sus efectos sobre la diferenciación de los osteoblastos, aunque no se ha identificado un mecanismo preciso (26).

- **Osteocitos**, son las células más abundantes, representan un 90% de las células óseas. Se localizan en el interior de las lagunas, rodeadas por la matriz ósea mineralizada y presentan una morfología dendrítica. Derivan de células madre mesenquimales a través de la diferenciación de los osteoblastos. En este proceso se distingue cuatro fases: osteoide-osteocito, preosteocito, osteocito joven y osteocito maduro. Al finalizar la formación ósea, una subpoblación de osteoblastos se convierte en osteocitos incorporándose en la matriz ósea. Este proceso va acompañado de cambios morfológicos y ultraestructurales.

El número de orgánulos como RER y aparato de Golgi disminuye, y el ratio núcleo/citoplasma también disminuye, puesto que se reduce la síntesis y secreción de proteínas (12,16). Durante el desarrollo de los procesos citoplasmáticos en los osteocitos, la proteína E11/GP38 presenta un papel importante, regulando la dinámica del citoesqueleto de actina. La inhibición de esta proteína en células osteocíticas MLO-Y4 muestran un bloqueo en la elongación de las dendritas, sugiriendo que E11/GP38 está implicada en la formación de las dendritas en los osteocitos (27). Mientras que el cuerpo celular del osteocito se encuentra dentro de la laguna, sus procesos citoplasmáticos (hasta 50 por cada célula) atraviesan diminutos túneles que se originan en el espacio lacunar denominados canalículos, formando el sistema lacunocanalicular del osteocito (28). Estos procesos citoplasmáticos se conectan con otros de osteocitos adyacentes por uniones comunicantes o *gap*, facilitando el transporte intercelular de pequeñas moléculas de señalización como prostaglandinas y óxido nítrico (NO) (29). Además, el sistema lacunocanalicular de los osteocitos está próximo al suministro vascular, por lo que el oxígeno y los nutrientes llegan fácilmente a los osteocitos (30). La comunicación que se produce célula-célula es posible gracias al líquido intersticial que fluye entre los osteocitos y los canalículos (31). Por el sistema lacunocanalicular, los osteocitos actúan como mecanosensores, ya que su red interconectada tiene la capacidad de detectar presiones y cargas mecánicas, contribuyendo así a la adaptación del hueso a las fuerzas mecánicas diarias (32,33). En respuesta a estímulos mecánicos, los osteocitos orquestan la formación de nuevo hueso reclutando a los osteoblastos. Esto es posible gracias a la detección de señales mecánicas (34) y a la liberación de moléculas de señalización como el NO (35), prostaglandinas (PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>) (36), esclerostina (37), ATP y Ca<sup>2+</sup> (38,39), entre otros, los cuales modulan la actividad de los osteoblastos (40). Los osteocitos maduros presentan una disminución en la expresión de los genes *Ocn*, *Bsp11*,



colágeno tipo I y *Fa*, en cambio, presenta una alta expresión de la proteína de matriz dentina 1 (DMP1) y SOST (38). Además, la esclerostina se une a LRP5/6, previniendo la activación de la vía Wnt. Los osteocitos en comparación con los osteoblastos presentan mayor proporción de proteínas relacionadas con la mineralización y el metabolismo del fosfato, incluyendo la fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE), DMP1 y FGF23, entre otros. Los osteocitos también expresan altos niveles del inhibidor de la formación ósea, la proteína 1 relacionada con Dickkopf (DKK-1) (14). Además, la expresión de genes anti-apoptóticos incrementa en los osteocitos expuestos a cizallamiento. Esta expresión parece depender de varias vías de señalización dentro del osteocito, en concreto, de la activación de integrinas y la consiguiente señalización a través de SRC quinasas, así como por la activación de receptores de prostaglandinas y la consiguiente señalización a través de la proteína quinasa A (PKA) o  $\beta$ -catenina (41). La existencia de estos procesos destaca la importancia de la relación entre la carga mecánica y la viabilidad de los osteocitos para la homeostasis del esqueleto (1). Cuando se produce la apoptosis de los osteocitos (42) se activa localmente a los osteoclastos, favoreciendo la resorción ósea. Una disminución de la secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (43), un incremento de la secreción de RANK-L (44,45) y de M-CSF (42), así como la formación de cuerpos apoptóticos de osteocitos (46) da lugar a la activación de los osteoclastos. Por tanto, la activación de los osteoclastos se produce por la pérdida de la inhibición constitutiva de los osteocitos sobre los osteoclastos (47) y por la liberación de factores estimuladores tras la muerte de los osteocitos (42). En base a lo expuesto anteriormente, podemos decir que los osteocitos son esenciales para la remodelación ósea, ya que gracias a su capacidad mecanosensora son capaces de regular la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos (30,48). Esto queda evidenciado en varios estudios, los cuales sugieren que el daño en la red de los

osteocitos podría afectar a la calidad del hueso al dificultar la reparación del hueso dañado o al promover un resorción ósea excesiva (1,49).

En cuanto a su utilidad, el hueso es un órgano multifuncional y desempeña distintos papeles, entre los que se encuentran: a) **sopORTE mecánico**, requiere una microarquitectura ósea con cierto grado de fuerza y rigidez para adaptarse a la carga mecánica y a la locomoción; b) **protección**, especialmente de zonas vitales como el torso y la cabeza, organizándose de una forma que pueda absorber la máxima energía proporcionando el mínimo daño; c) **mantenimiento de la homeostasis mineral**; ya que sirve como reserva de iones, especialmente de calcio y fosfato; d) **hematopoyética**, las regiones compuestas en gran parte de hueso esponjoso, como la cresta ilíaca, las vértebras y el fémur son fuentes de células sanguíneas durante toda la vida; y también desempeña una importante e) **función endocrina**, ya que participa en la regulación del metabolismo energético y del balance del fosfato mediante la secreción de OCN y de FGF23, respectivamente (4,9,16).

## 1.2. Tipos de tejido óseo.

A nivel macroscópico el hueso se puede dividir en hueso cortical y hueso esponjoso. Estos tipos de hueso no solo se distinguen por su porosidad sino también por su localización y su función.

- **Hueso cortical**: es un hueso duro y compacto, siendo la mayor parte de su volumen matriz mineralizada. Está compuesto por osteonas conocidas como sistema haversiano, que consiste en laminillas concéntricas dispuestas alrededor de un canal por el que circulan vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Los canales haversianos del hueso cortical presentan una porosidad en torno al 3-5%, aunque esta aumenta con la edad. El hueso cortical es el principal componente de los ejes y las diáfisis de los huesos largos y cortos de las extremidades. También se encuentra alrededor del hueso esponjoso del cuerpo

vertebral, las metáfisis de los huesos largos, de la cresta ilíaca y del cráneo. Su principal función es proporcionar soporte mecánico y protección (4).

- **Hueso esponjoso:** es un hueso de estructura porosa que se compone de trabéculas, cada una de ellas de aproximadamente 200 µm de espesor, pero solo comprende alrededor del 25 al 30% del volumen total de tejido, siendo el resto espacio ocupado por la médula ósea. Este tejido se localiza principalmente en la metáfisis de los huesos largos, en las vértebras, costillas y cresta ilíaca. La principal función del hueso esponjoso es metabólica, aunque su estructura dispuesta en trabéculas permite aumentar la capacidad de soporte mecánico redirigiendo la carga soportada por el hueso cortical (4).

La localización de estos dos tipos de hueso da lugar a cuatro superficies óseas distintas: trabecular, intracortical, endocortical y la superficie perióstica (50).

### **1.3. Desarrollo y mantenimiento del tejido óseo**

#### **1.3.1. Osteogénesis**

El desarrollo del tejido óseo u osteogénesis comienza en humanos en el primer trimestre de gestación y continúa en los primeros años postnatales. Se distinguen dos tipos diferentes en función del ambiente en el cual se inicia la osificación:

- **Osificación intramembranosa:** este proceso tiene lugar en zonas de tejido conjuntivo embrionario muy vascularizado formado en su mayoría por células mesenquimales. El hueso se produce directamente a partir de las condensaciones de células mesenquimales, sin necesidad de formar cartílago (51,52). Las células mesenquimales se condensan, proliferan y se diferencian directamente en osteoblastos para formar huesos intramembranosos. El factor de transcripción RUNX2 juega un

papel indispensable en este proceso. Los osteoblastos comienzan a secretar matriz ósea, y algunos de ellos quedan atrapados en la matriz convirtiéndose en osteocitos (53). 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, las cuales al interconectarse dan lugar al tejido óseo. Mediante este proceso se forman los huesos planos tales como los del cráneo, la escápula y la clavícula (54).

- **Osificación endocondral:** es el principal proceso responsable para formar gran parte del esqueleto de los mamíferos en las etapas iniciales del desarrollo fetal, generando hueso a través de un cartílago intermedio. La transición de tejido mesenquimal a cartílago hialino, y de este a hueso está estrechamente ligada a la diferenciación de condrocitos, osteoblastos y la diferenciación vascular (55). El proceso de osificación endocondral incluye distintas etapas; la condensación de células mesenquimales, la diferenciación y maduración de los condrocitos y el desarrollo de los osteoblastos (51). El desarrollo del hueso endocondral comienza con la condensación de células mesenquimales de la cresta neural en la región craneofacial o del mesodermo en otras partes del cuerpo. Tras la condensación mesenquimal, las células del centro de condensación se diferencian a condrocitos que secretan matriz rica en colágeno tipo II, IX y XI, y proteoglucanos específicos como agreganos, donde la expresión del colágeno I se suprime. Las células de la periferia de la condensación forman el pericondrio, el cual continúa expresando colágeno tipo I. El cartílago se agranda mediante la proliferación de condrocitos y la producción de matriz. Los condrocitos del centro del molde del cartílago dejan de proliferar, se hipertrofian y empiezan a sintetizar colágeno tipo X. Los condrocitos hipertróficos expresan marcadores moleculares como MMP13 y FA, dirigiendo la mineralización de su matriz circundante (56–58) y también atraen vasos sanguíneos mediante la

producción de VEGF (59). Los condrocitos hipertróficos dirigen a las células pericondrales adyacentes para que se conviertan en osteoblastos, gracias a la actuación de RUNX2. A continuación, los condrocitos hipertróficos sufren apoptosis y la matriz cartilaginosa que queda sirve como molde para los osteoblastos, los cuales invaden el cartílago junto con los vasos sanguíneos y depositan matriz mineralizada (55,56). Mediante este proceso, el tejido óseo prácticamente reemplaza al tejido hialino quedando éste último únicamente restringido a la placa de crecimiento epifisaria que es la responsable de que los huesos largos continúen creciendo en longitud hasta la adolescencia, cuando dicha placa es también osificada (60,61).

Ambos tipos de osificación intervienen durante la reparación de las fracturas óseas (62).

### **1.3.2. Modelado óseo**

El modelado óseo consiste en la adaptación de las estructuras óseas en respuesta a la carga mecánica, produciéndose un cambio tanto en la forma como en el tamaño (63), gracias a procesos que no se presentan en la misma superficie: la formación de hueso por parte de los osteoblastos o a la reabsorción de hueso por los osteoclastos. Esto contrasta con la remodelación ósea, en la que la actividad de osteoblastos y osteoclastos se produce secuencialmente, de forma acoplada, en una superficie ósea determinada. Aunque la formación y resorción del modelado son procesos localmente independientes, ambos tienen que ser coordinados para mantener la forma del hueso (64). El modelado óseo ocurre siempre en una superficie ósea preexistente, motivo por el cual las fases iniciales de la osificación intramembranosa y endocondral no son consideradas como modelado óseo (65). La actividad de modelado puede producirse en superficies óseas periósticas, endocorticales y trabeculares. La principal señal para el modelado óseo es la deformación local del tejido. El proceso de modelado ocurre en dos etapas: activación y formación o degradación. La activación involucra el reclutamiento de precursores que se diferencian en osteoblastos u

osteoclastos maduros. Adicionalmente, las células de revestimiento (osteoblastos quiescentes de forma plana que cubren las superficies óseas) también pueden ser estimuladas para diferenciarse en osteoblastos maduros y producir matriz. Una vez que las células son activadas, se lleva a cabo el proceso de formación o resorción según las necesidades óseas (66). El modelado óseo es más destacado durante el crecimiento y el desarrollo, y sirve principalmente para remodelar el hueso o cambiar la posición de la corteza respecto a su eje central. El esqueleto adulto también experimenta modelado pero, en ausencia de patologías, es menos frecuente (63). Tanto el modelado de formación como el de resorción desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la forma del hueso durante el crecimiento asociado a la osificación endocondral. Para mantener una forma adecuada de los huesos largos, ambos tipos de modelado se coordinan en la región metafisaria. A medida que el hueso se alarga, el modelado de resorción elimina hueso de las superficies periósticas, mientras que el modelado de formación añade hueso nuevo a las superficies endocorticales (66).

### 1.3.3. Remodelado óseo

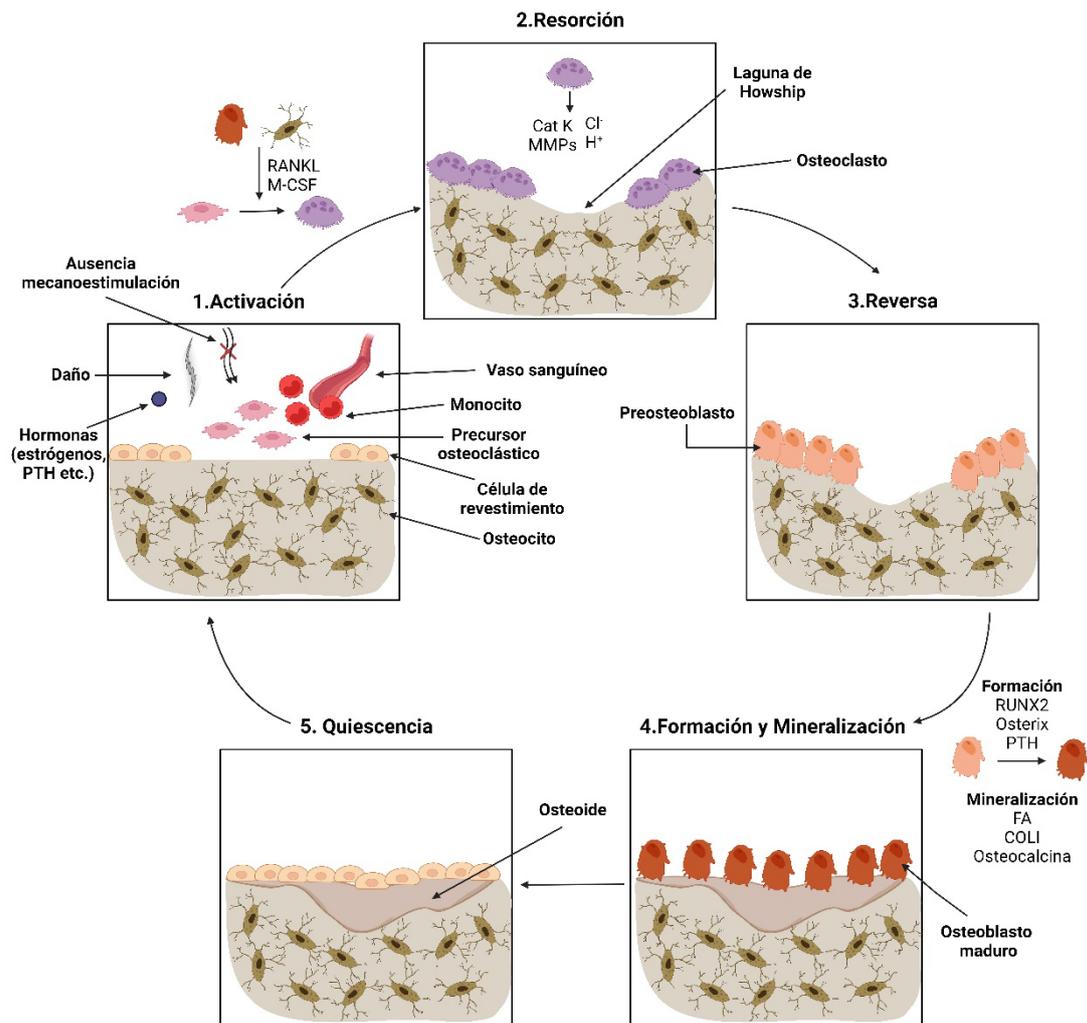
El remodelado óseo es un proceso que ocurre de forma secuencial y que involucra tanto a la formación como a la degradación ósea, por lo que se requiere la comunicación directa entre los distintos tipos de células óseas. La función primaria del remodelado es renovar el esqueleto así como reparar pequeños daños óseos (microfracturas), lo que permite un mantenimiento correcto de la homeostasis mineral y de la integridad ósea (66). El hueso al ser un tejido metabólicamente activo sufre un continuo proceso de remodelado, lo que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional (67). Los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos sintetizan y secretan moléculas de señalización paracrina, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas para mantener la remodelación y la arquitectura del esqueleto (16). La unidad multicelular ósea que remodela el hueso consiste en la actividad conjunta de los osteoclastos, que degradan el hueso, los osteoblastos que



forman hueso, así como la asociación de vasos sanguíneos (14). El remodelado óseo ocurre en cualquiera de los cuatro tipos de superficie ósea: perióstica, endocortical, intracortical y trabecular; aunque el remodelado perióstico es menos frecuente. En humanos, el proceso de remodelado normalmente tarda entre 4-6 meses (66), y consta de cinco fases: activación, resorción, reversa, formación y quiescente. En la **fase de activación**, los precursores hematopoyéticos en circulación o de la médula ósea son reclutados a las unidades multicelulares óseas donde posteriormente se fusionan y se diferencian a osteoclastos maduros. Esta diferenciación es posible gracias a la acción de una serie de moléculas secretadas por osteoblastos y osteocitos que afectan a la osteoclastogénesis, entre las que se encuentran: M-CSF, RANKL, OPG, el receptor señuelo de RANKL, semaforina 3A (SEMA3A) y la familia de genes Wnt 5A (*WNT5A*) y 16 (*WNT16*) (16). El reclutamiento de los precursores osteoclasticos a los sitios de remodelado óseo es controlado por distintos factores como los gradientes de calcio, citoquinas derivadas de osteoblastos y osteoclastos y metaloproteinasas de matriz. Posteriormente, las células de revestimiento se retraen de la superficie ósea para que los osteoclastos maduros puedan unirse a la matriz mineralizada (68). En la **fase de resorción**, los osteoclastos se polarizan; de modo que, pueden observarse cuatro tipos de dominios de membrana: la zona de sellado y el borde ondulado que están en contacto con la matriz ósea, así como los dominios basolateral y secretor funcional, que no están en contacto con la matriz ósea (24,69). La polarización de los osteoclastos durante la resorción ósea implica la reorganización del citoesqueleto de actina, en el que se forma un anillo de actina F que comprende una zona densa de podosomas altamente dinámicos y, en consecuencia, se aísla un área de la membrana orientada hacia la matriz ósea que se convierte en borde ondulado. Este dominio solo se forma cuando los osteoclastos están en contacto con la matriz mineralizada extracelular, en un proceso en el cual, integrinas  $\alpha_v\beta_3$  como el CD44, median la adhesión de los podosomas de los osteoclastos a la superficie ósea (70,71). El mantenimiento del borde ondulado es esencial para la actividad de los osteoclastos (12). Estas células digieren la matriz mineral ósea, mediante la secreción de protones y proteasas, tales como

la catepsina K y la MMP-9, y como resultado de esta resorción, se forma la laguna de *Howship* (6,72). **La fase reversa** se caracteriza por la cesión de la actividad resortiva y la iniciación de la formación ósea. Una vez que los osteoclastos han terminado de resorber el hueso, los fragmentos de colágeno que quedan en la superficie ósea tienen que ser eliminados, para que se pueda formar hueso nuevo por parte de los osteoblastos. Se cree que esto lo hace una forma especializada de célula de revestimiento óseo, la cual depositaría una fina capa de matriz ósea nueva (6,66). En la **fase de formación**, la síntesis de la matriz ósea por parte de los osteoblastos ocurre en dos etapas: se deposita la matriz orgánica (osteóide) y se produce la mineralización. En la primera etapa, los osteoblastos secretan proteínas colágenas, principalmente colágeno tipo I, y proteínas no colágenas (OCN, osteonectina, BSP II, y osteopontina), y proteoglicanos, los cuales forman la matriz orgánica. Posteriormente la mineralización de la matriz ósea tiene lugar en dos fases: la vesicular y la fibrilar. La fase vesicular ocurre cuando porciones de membrana con un diámetro variable que oscila entre 30 y 200 nm, denominadas vesículas matriciales, se liberan desde el dominio de la membrana apical de los osteoblastos hacia la matriz ósea recién formada, en la cual se unen a los proteoglicanos y otros componentes orgánicos. Debido a su carga negativa, los proteoglicanos sulfatados inmovilizan los iones de calcio que se almacenan dentro de las vesículas de la matriz. Cuando los osteoblastos secretan enzimas que degradan los proteoglicanos, los iones calcio se liberan de los proteoglicanos y atraviesan los canales de calcio presentes en la membrana de las vesículas de la matriz. Estos canales están formados por proteínas denominadas anexinas (73,74). Por otro lado, los componentes que contienen el fosfato son degradados gracias a la FA secretada por los osteoblastos, liberando iones fosfato dentro de las vesículas de la matriz. Luego, los iones de fosfato y calcio que se encuentran dentro de las vesículas, forman los cristales de hidroxiapatita (75). La fase fibrilar ocurre cuando la saturación de iones fosfato y calcio dentro de las vesículas matriciales permite la ruptura de estas estructuras y los cristales de hidroxiapatita se extienden alrededor de la matriz (76). Cuando ya se ha formado el hueso necesario, los osteocitos secretan esclerostina dando lugar a la inhibición de la

diferenciación de los osteoblastos y por tanto, inhibiendo la formación de hueso de una forma paracrina (77). Después de la mineralización, los osteoblastos pueden sufrir apoptosis, convertirse en células de revestimiento o quedarse embebidos en la matriz ósea mineralizada y diferenciarse a osteocitos (6). **La fase quiescente**, se produce al finalizar un ciclo de remodelado óseo. La superficie ósea resultante se recubre de células de revestimiento óseo y la matriz dentro de la unidad de remodelación continuará mineralizándose con el tiempo. En un momento dado, la mayoría de las superficies óseas del hueso se encontrarán en estado de quiescencia (66,68) (Figura 1).



**Figura 1. Esquema del proceso de remodelado óseo en el cual se muestran las distintas fases (activación, resorción, reversa, formación-mineralización y quiescencia), así como los factores moleculares implicados.** PTH: hormona paratiroidea; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANK: ligando del receptor activador de NF-κB; Cat K: catepsina K; MMPs: metaloproteinasas de matriz; RUNX2: factor de transcripción 2 relacionado con *Runt*; FA: fosfatasa alcalina; COL1: colágeno tipo 1α. Figura creada con BioRender.

## 2. Los osteocitos como reguladores del metabolismo óseo

### 2.1. Los osteocitos como reguladores de los osteoclastos: papel de RANKL

RANKL es una proteína transmembrana de tipo II perteneciente a la familia TNF. La cola citoplasmática se localiza en el extremo N-terminal, mientras que el dominio TNF de unión al receptor se localiza en el extremo C-terminal (78). RANKL es expresado por una gran cantidad de células, incluyendo osteoblastos,



osteocitos, condrocitos hipertróficos, células T, células epiteliales de glándulas mamarias y células estromales (79). Los condrocitos y los osteoblastos son la principal fuente de RANKL en la osteoclastogénesis producida durante el desarrollo esquelético, mientras que RANKL derivado de los osteocitos contribuye a la remodelación ósea en la etapa adulta (80). En estudios *in vitro* se ha demostrado que se requiere RANKL para la formación de los osteoclastos en presencia de M-CSF, sugiriendo su importancia en la regulación de la diferenciación de los osteoclastos (81). Además, hay estudios que han mostrado que RANKL es indispensable para la formación, fusión, activación y supervivencia de los osteoclastos gracias a la unión con su receptor, RANK, presente en los osteoclastos y en sus precursores (16,79). De modo que, la señalización RANKL-RANK activa la diferenciación y función de los osteoclastos, e inhibe su apoptosis. Los osteocitos son una gran fuente de RANKL (82), el cual induce osteoclastogénesis y resorción ósea, y también son capaces de expresar OPG. Por tanto, los osteocitos controlan la osteoclastogénesis mediante el incremento de la expresión/disponibilidad de RANKL y el descenso de la expresión/disponibilidad de OPG, o a la inversa, para disminuir la actividad resorptiva (83). La secreción de esclerostina por parte de los osteocitos, incrementa la relación RANKL/OPG. La expresión de RANKL también se rige por la conexina 43 (Cx43), una proteína que permite la formación de uniones comunicantes entre osteocitos formando una red conectada de células. Además, la canalización a través de Cx43 controla la supervivencia de los osteocitos (84). Una carga mecánica óptima induce la función y la supervivencia de los osteocitos. Sin embargo, una fuerza excesiva en el hueso da lugar a la apoptosis de los osteocitos, produciéndose liberación de RANKL en ellos, e induciendo así la formación de osteoclastos y favoreciendo procesos de resorción ósea (85). La formación de osteoclastos en circunstancias donde se produce inflamación también depende de la presencia de RANKL (80). La expresión de RANKL en los osteocitos se induce tanto por vías locales como sistémicas, funcionando también a nivel local o a nivel sistémico en modelos de enfermedades inflamatorias. RANKL se expresa como una proteína unida a membrana (mRANKL), la cual puede escindirarse y pasar a la circulación como RANKL

soluble (sRANKL) (86). La estimulación *in vitro* de los precursores osteoclasticos con la proteína recombinante sRANKL permite la formación de osteoclastos maduros (87). Pero estudios genéticos recientes realizados en ratones han confirmado que RANKL unido a la membrana es el necesario para la osteoclastogénesis fisiológica *in vivo* (88). Otros estudios, muestran que RANKL producido por los osteocitos es proporcionado a los precursores osteoclasticos unido a la membrana a través de las prolongaciones citoplasmáticas, las cuales son capaces de llegar a los compartimentos medulares y periósticos (89). En un estudio se reveló que OPG es necesaria para la correcta transferencia de RANKL desde el aparato de Golgi a los lisosomas secretores. Además, OPG sirve como receptor señuelo de RANKL (90) (Figura 2).

Así mismo, la unión de RANKL a RANK da lugar a la activación de cascadas de señalización que incluyen la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la vía del factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) a través del TNF asociado al factor 6 (TRAF6) y de la quinasa 1 activada por el TGF- $\beta$  (TAK1). Estas vías de señalización son compartidas por otras citoquinas como TNF, IL-1 y la señalización del receptor *Toll-like*, lo que sugiere que RANKL estimula distintos sistemas de señalización (80).

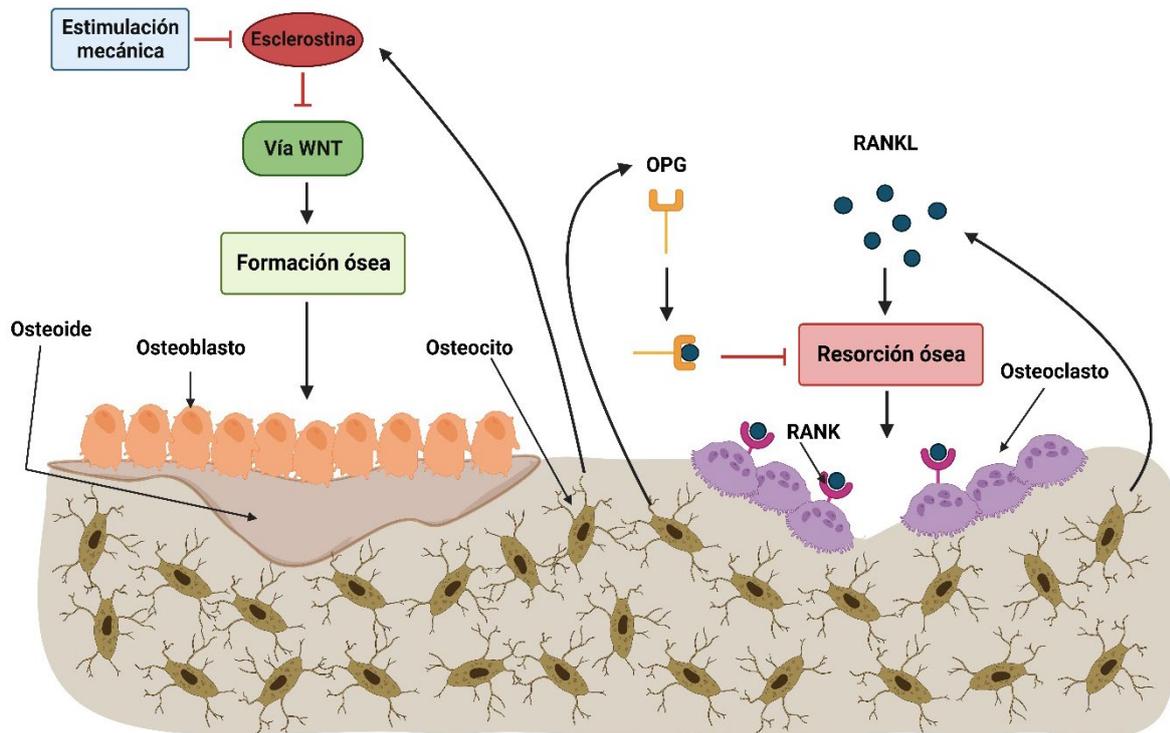


Figura 2. Esquema representativo de la regulación osteocítica en la formación y la resorción ósea. Figura creada con el software BioRender.

## 2.2. Papel de los osteocitos en la mecanotransducción ósea

La carga mecánica es un regulador clave en el mantenimiento y la formación del hueso. Este hecho fue descrito en 1890 por Wolff y reformulado más tarde por Harold Frost como la teoría del mecanoestado, según la cual nuestro esqueleto reacciona a la intensidad de carga mecánica que recibe formando más hueso ante la actividad física o disminuyendo su masa ante la falta de estímulos mecánicos (como ocurre en personas inmovilizadas persistentemente o en astronautas) o ante una sobrecarga (91). El mantenimiento de la postura corporal y el desplazamiento del organismo originan puntos de carga y tensión mecánica en el hueso que dan lugar a fuerzas de compresión, tracción, cizallamiento, flexión y torsión. Como resultado de estas fuerzas, se crean corrientes de flujo intersticial en torno a las células óseas (92).

Los osteocitos se distribuyen de forma regular a lo largo del hueso cortical y trabecular, incluso en áreas de matriz mineralizada carentes de vascularización, lo cual podría servir como una amplia red de control de la carga que se infiltra en cada milímetro cúbico de tejido óseo. Además, los osteocitos están interconectados (y con células superficiales como las células de revestimiento óseo, los osteoblastos y las células vasculares) a través de un gran número de prolongaciones citoplasmáticas que se unen entre sí y transmiten información célula-célula a través de uniones comunicantes. Los osteocitos son capaces de responder a la energía mecánica aplicada al hueso y traducirla en señales intercelulares con efectos biológicos en el hueso. Además, son más sensibles al estímulo mecánico que los osteoblastos (83). Curiosamente, las proyecciones citoplasmáticas de los osteocitos son más mecanosensibles que el cuerpo celular, aunque este también tiene un papel fundamental en la mecanotransducción (93,94). Durante la carga mecánica, el fluido intersticial fluye por los compartimentos que albergan los osteocitos (lagunas) y a través de los canales que comunican las lagunas (canalículos) con la superficie del hueso, donde se encuentran los osteoblastos (95). La estimulación mecánica del osteocito induce la liberación de ATP, PGE<sub>2</sub>, NO y del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) favoreciendo la formación ósea. De modo que los osteocitos son capaces de responder a la estimulación mecánica dando lugar a la liberación de moléculas que regulan tanto la función de los osteoblastos como la de los osteoclastos (96–98). Por lo que el flujo de fluido a través del sistema lacunocanalicular puede ser un posible mecanismo, por el cual los gradientes de presión debidos a la actividad física inducen la tensión de cizallamiento en las membranas celulares (83). En cambio, en ausencia de estimulación mecánica, los osteocitos producen señales que inducen el reclutamiento y la diferenciación de precursores osteoclasticos, estimulando la resorción ósea (99).

### **2.2.1. Mecanorreceptores en el osteocito**

Como células mecanosensoras, los osteocitos deben estar equipados con diferentes elementos celulares capaces de detectar estímulos y transducir estas

señales hacia el interior celular. Estos elementos celulares son los denominados mecanosensores, entre los que se encuentran:

- **Citoesqueleto:** forma un vínculo mecánico entre el entorno extracelular y el compartimento intracelular y es un efector central de la mecanotransducción. Hay tres tipos de filamentos en el citoesqueleto: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios (92). La longitud de los filamentos, la geometría del entrecruzamiento, las proteínas de unión y las propiedades mecánicas de los componentes del citoesqueleto determinan las características mecánicas de la red citoesquelética y de los osteocitos (93). Los filamentos de actina facilitan la mecanotransducción al permitir la transmisión directa de las señales mecánicas de las dendritas al cuerpo celular del osteocito (100,101). Por otro lado, los microtúbulos están involucrados en la regulación de la apertura de los canales de calcio y en la expresión génica durante la mecanotransducción (102).
- **Conexinas (Cx):** son proteínas que forman parte de las uniones comunicantes o *gap* y los hemicanales, facilitando el transporte de pequeñas moléculas como  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y  $\text{PGE}_2$ . La Cx43 es la más abundante en osteoblastos y osteocitos. Los hemicanales de Cx43 en los osteocitos se abren por estímulo mecánico y promueven la viabilidad celular mediante la liberación de  $\text{PGE}_2$  y la activación de sus receptores. La Cx43 es esencial para el desarrollo normal del esqueleto, así como para la diferenciación osteoblástica y la mineralización (103,104).
- **Integrinas:** son una familia de proteínas transmembrana heterodiméricas compuestas por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (105), que unen proteínas intracelulares del citoesqueleto interno a proteínas de la matriz extracelular, y que también facilitan la interacción con otras células y actúan como receptores de señalización. La adhesión resultante por la actividad de integrinas interviene en la formación de estructuras mecanosensibles que desempeñan un papel destacado en la mecanotransducción (106,107). En particular, la subunidad  $\alpha 5$  puede

actuar como una proteína de fijación que, cuando se ve perturbada por la tensión de cizallamiento, abre hemicanales en los osteocitos, permitiendo la liberación de PGE<sub>2</sub> y ATP. Las fuerzas mecánicas aplicadas a los receptores de integrina  $\alpha 5\beta 1$  desencadenan la señalización de calcio intracelular a través de la activación ultrarrápida de los canales iónicos como el receptor de potencial vaniloide 4 (TRPV4) (108). Varias observaciones sugieren que las integrinas median los efectos del estrés mecánico en los osteocitos. Las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$  se expresan en los osteocitos y se localizan en el cuerpo celular y en las proyecciones citoplasmáticas, respectivamente (109,110). El estímulo mecánico *in vitro* activa la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en osteoblastos y osteocitos, lo que induce la apertura de hemicanales, permitiendo así la liberación de factores anabólicos (109,111). Se ha descrito que la integrina  $\alpha 5\beta 3$  podría mediar la mecanotransducción a través de DMP1 en osteocitos (112). A este respecto, una disminución en la expresión de la integrinas  $\alpha 5\beta 1$  reduce la formación de hueso inducido por estímulo mecánico (113).

- **Canales iónicos** como por ejemplo **TRPV4**, el cual juega un papel importante en el remodelado óseo. El TRPV4 osteocítico induce flujo de Ca<sup>2+</sup> y activación de la vía de la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) por el estrés de cizallamiento inducido por flujo de fluido. Esto da lugar a la disminución de la expresión génica y proteica de esclerostina, por lo que se produce un incremento en la formación ósea (102,114). Dos proteínas transmembrana de la familia de las policistina, la policistina-1 (PKD1) y la policistina-2 (PKD2), también participan en la mecanosensibilidad ósea. PKD1 es un receptor perteneciente a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), mientras que PKD2 es un canal de calcio. El **complejo PKD1-PKD2** se localiza en el cilio primario de osteoblastos y osteocitos. Los ratones que sufren una delección de *Pkd1* o *Pkd2* en los osteoblastos, muestran un descenso de masa ósea. Del mismo modo, la deficiencia de *Pkd1* o *Pkd2* afecta a la diferenciación de los osteoblastos debido a

una disminución en la regulación de *Runx2*. De modo que, PKD1 y PKD2 regulan la formación ósea mediada por osteoblastos mediante estímulos mecánicos (104). El **canal de calcio activado por voltaje (VGCC) de tipo L**, contribuye a la interacción entre la formación ósea y la señalización de PTH. En los osteocitos de rata, los VGCC activados por PTH muestran un mayor flujo de  $Ca^{2+}$  por un estímulo hipotónico (115).

- **Cilio primario:** su papel como mecanorreceptor y regulador del metabolismo óseo resulta de especial interés en esta Tesis, por lo que se expone con mayor detalle en el punto 3.2.
- **Caveolas:** al igual que ocurre con el cilio primario, su función como mecanorreceptor y regulador del metabolismo óseo es de especial interés en esta Tesis, por lo que se expone con mayor detalle en el punto 3.3.

### 2.2.2. Viabilidad osteocítica como respuesta biológica a la estimulación mecánica

La apoptosis de los osteocitos guarda una estrecha relación con la estimulación mecánica externa, ya que el estímulo mecánico se trasmite a los osteocitos y controla la expresión de RANKL (115). Estudios *in vivo* muestran que cuando no hay carga mecánica se incrementa el número de osteocitos que sufren apoptosis, mientras que la estimulación mecánica es capaz de mantener la viabilidad osteocítica (116). Un posible mecanismo por el cual la tensión de cizallamiento modula la apoptosis de los osteocitos es que el flujo de fluido es capaz de acelerar el suministro de nutrientes y oxígeno en estas células para mantener su viabilidad y promover la actividad osteocítica (117,118). Otro mecanismo podría ser que la tensión de cizallamiento induce la inactivación de varias vías apoptóticas como, por ejemplo, la vía mitocondrial regulada por BCL-2 y las vías de señalización ERK5-AKT-FOXO3a-BIM/FasL (119,120). También se ha observado que la estimulación mecánica por estiramiento preserva la viabilidad de los osteocitos a través de la activación de las ERKs y la transcripción de nuevos genes. El efecto del estiramiento de los osteocitos se

transmite mediante integrinas y moléculas citoesqueléticas y catalíticas, como las quinasas SRC (121).

La muerte de los osteocitos parece comprometer la función mecanosensorial de la red de osteocitos y disminuye la competencia mecánica del esqueleto. En este sentido, el aumento de la fragilidad ósea que resulta del exceso de glucocorticoides o de la deficiencia de esteroides sexuales en animales y humanos se asocia con una mayor prevalencia de la apoptosis de osteocitos (122,123). Por tanto, la vida media de los osteocitos podría estar regulada por los estímulos mecánicos. Los niveles fisiológicos de carga impuestos al hueso *in vivo* parecen disminuir el número de osteocitos apoptóticos (124). Por otra parte, la falta de estimulación mecánica inducida en el hueso se asocia a un aumento del número de osteocitos hipóxicos, efecto que se invierte con la carga, sugiriendo que las fuerzas mecánicas facilitan la difusión del oxígeno y la supervivencia de los osteocitos (125). Además, el ATP extracelular, liberado por los osteocitos apoptóticos a través de los canales de panexina 1 (PANX1), es una importante señal que desencadena la expresión de RANKL en osteocitos secundarios y activa el remodelado óseo (126). Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de la apoptosis de los osteocitos no es suficiente para prevenir la pérdida de masa ósea inducida por la falta de estímulos mecánicos (99).

### 3. Mecanismos reguladores del metabolismo del hueso

#### 3.1. Sistema PTHrP/PTH1R y su papel en el metabolismo del hueso

El receptor de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) de tipo 1 (PTH1R) es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), el cual se expresa en la superficie de osteoblastos, osteocitos y en células de riñón, entre otras (127–129). PTH1R puede desencadenar varias vías de señalización intracelular en hueso, jugando un papel importante en la formación y el remodelado óseo (130,131). Este receptor transmite estímulos proporcionados por dos ligandos polipeptídicos diferentes: PTH, la cual es secretada por las



glándulas paratiroides, y PTHrP, secretada por un amplio número de tejidos (132). Aunque PTH y PTHrP señalizan a través del mismo receptor y tienen perfiles agonistas similares (133), las funciones biológicas de estos dos ligandos son distintas. PTH actúa de forma endocrina en las células óseas y renales, regulando los niveles de calcio y fósforo en sangre; además desempeña un papel protector en la mediación de la remodelación del esqueleto. En cambio, PTHrP actúa de forma paracrina promoviendo la proliferación y diferenciación celular en los tejidos en desarrollo (134,135). PTH o PTHrP se unen al PTH1R de las células del linaje osteoblástico y pueden producir tanto efectos anabólicos como catabólicos dependiendo del método de administración (128). La administración de PTH o PTHrP de forma intermitente tiene efectos anabólicos óseos, actúa directamente sobre los osteoblastos promoviendo la osteoblastogénesis y reduciendo la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (117,136). Un incremento en la diferenciación de los osteoblastos en lugar de su proliferación parece ser el principal mecanismo por el cual PTH o PTHrP estimula la osteoblastogénesis (137). PTHrP es capaz de inducir la detención del crecimiento en fase G1 del ciclo celular en osteoblastos diferenciados actuando sobre las proteínas ciclina D1, CDK1 p21, p27 y p16 (138). Esto muestra la importancia de PTHrP en el recambio óseo y sugiere que PTHrP desempeña un papel clave en múltiples etapas del desarrollo óseo a través de sus efectos en la supervivencia celular (128). En cambio, la pauta de administración continua, tanto de PTH como de PTHrP, desencadena efectos catabólicos sobre el hueso. Esto se atribuye al incremento en la expresión de RANKL y al descenso en la expresión de OPG, promoviendo así la resorción ósea (139). Así mismo, la producción excesiva de PTH tras un hiperparatiroidismo primario o una deficiencia de calcio podría dar lugar a pérdida de masa ósea, que se atribuye a la regulación positiva del FGF23 y a la supresión de la diferenciación y mineralización de los osteoblastos, así como al incremento de la osteoclastogénesis (140,141).

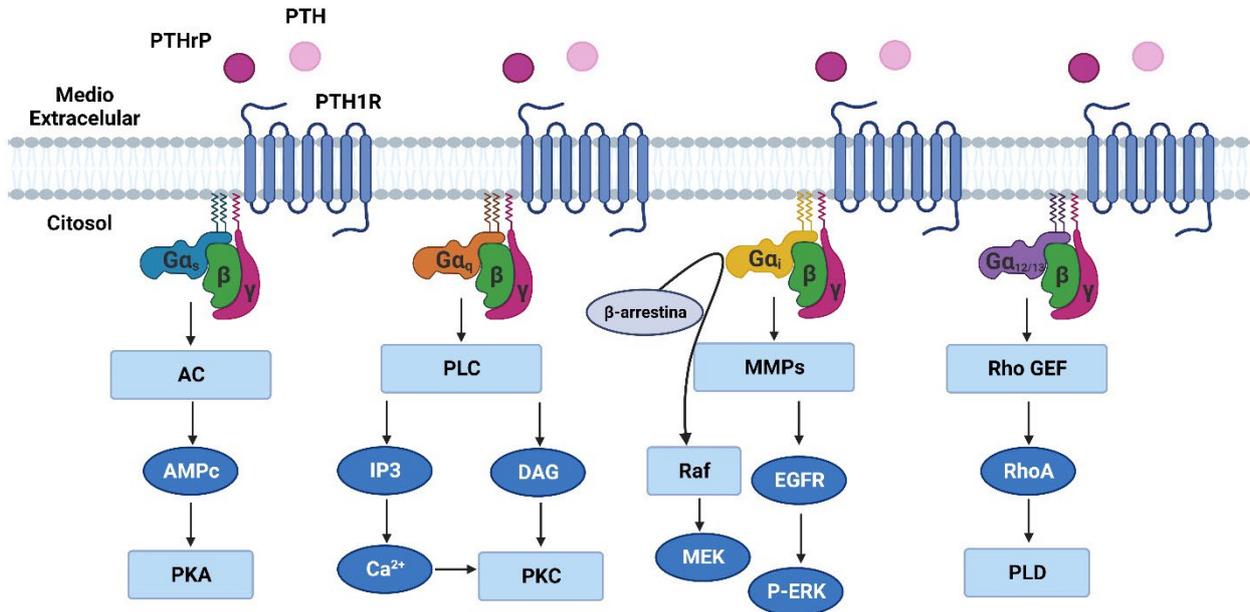
Algunas de las acciones de PTH y de PTHrP en el hueso parecen ser indirectas, a través de otras células presentes en el entorno óseo, ya que los efectos de PTH1R no son exclusivos de las células óseas, también tiene efectos

en el sistema inmune. Por ejemplo, los linfocitos T también expresan PTH1R, y podrían desempeñar un papel importante tanto en las acciones catabólicas como anabólicas de PTH en el hueso (142–148).

De modo que, el sistema PTHrP/PTH1R juega un papel fundamental en la preservación de la masa ósea (130) y funciona como una vía esencial en la preservación de la viabilidad osteocítica. La activación de PTH1R en los osteocitos podría promover el acoplamiento intercelular mediado por uniones comunicantes, incrementar la expresión de MMP9 y potenciar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de calcio intracelular activados por estiramiento. Esta activación también podría ampliar la respuesta osteogénica a la carga mecánica *in vivo*, permitiendo proteger a los osteocitos de la apoptosis (149,150). Los GPCRs podrían participar en la transducción de señales mecánicas, de manera que PTH1R junto con los canales de calcio intracelulares activados por estiramiento podrían ser parte del mismo sistema mecanosensor (151). Cabe destacar que tanto las vías intracelulares de calcio como las dependientes del AMPc activadas por la regulación de PTHrP, como se muestra en un estudio *in vitro*, podrían cooperar en el mantenimiento de la viabilidad de las células MLO-Y4 (117).

PTH1R señala principalmente acoplándose a la vía de señalización intracelular  $\text{G}\alpha_s$ -adenilil ciclasa-AMPc-proteína quinasa A (PKA), pero también puede acoplarse a la vía  $\text{G}\alpha_q$ -fosfolipasa C (PLC)  $\beta$ -inositol trifosfato- $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático-proteína quinasa C (PKC) (152–155), a la vía  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -fosfolipasa D-proteína transformadora RhoA (156), y a la vía  $\beta$ -arrestina-quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) (157,158). Mientras PTH modula genes clave que controlan el remodelado óseo a través de la vía de señalización AMPc/PKA (159,160), la señalización PKC no es necesaria o puede ser inhibidora de las acciones anabólicas de PTH (161,162). La unión de PTH a PTH1R también transloca la  $\beta$ -arrestina a la membrana celular (163), la cual regula positivamente la activación del AMPc inducido por PTH, y estimula la vía de señalización ERK1/2 (128). La translocación de  $\beta$ -arrestinas a la membrana

celular inducida por PTH contribuye a la acción anabólica de PTH en el hueso, independientemente de la señalización clásica de la proteína G (164) (Figura 3).



**Figura 3. Esquema de las vías de señalización de PTH1R.** G $\alpha_s$ : proteína G de la familia  $\alpha_s$ ; G $\alpha_q$ : proteína G de la familia  $\alpha_q$ ; G $\alpha_i$ : proteína G de la familia  $\alpha_i$ ; G $\alpha_{12/13}$ : proteína G de la familia  $\alpha_{12/13}$ ; AC: adenilato ciclasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; PKA: proteína quinasa A; PLC: fosfolipasa C; IP3: fosfatidilinositol (1,4,5)-trifosfato; Ca<sup>2+</sup>: ion calcio; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinasa C; MMPs: metaloproteinasas; 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.

Las cadenas polipeptídicas completas de PTHrP y de PTH contienen 141 y 84 residuos de aminoácidos, respectivamente, pero los fragmentos N-terminales formados por los primeros 34 aminoácidos en ambos ligandos contienen los elementos funcionales para la interacción con el receptor PTH1R (134,153). PTH y PTHrP se distinguen entre los ligandos peptídicos de la familia de receptores tipo B por contener segmentos C-terminales alargados. Las funciones biológicas de estos segmentos no están aún claras, aunque se han identificado algunas respuestas funcionales, como la capacidad del fragmento C-terminal de PTH para inducir efectos pro-apoptóticos en los osteocitos (165),

y la capacidad de los fragmentos que abarcan la región media de PTHrP, para inducir efectos proliferativos en las células óseas y en las células de músculo liso vascular a través de un mecanismo intracrino (166–168). Tales efectos de los fragmentos del extremo C-terminal probablemente no impliquen unión a PTH1R, sino a otros receptores o mediadores de proteínas que aún no han sido identificados. La relación estructura-actividad del ligando y los estudios de mutagénesis del receptor indican que los péptidos bioactivos PTH (1-34) y PTHrP (1-34) interactúan con PTH1R a través de un mecanismo de dos componentes (169). De modo que los residuos 15-34 de PTH (1-34) y los residuos 12-34 de PTHrP, interactúan con el dominio extracelular aminoterminal de PTH1R (sitio 1) (170), mientras que los residuos de PTH (1-14) y de PTHrP (1-11) interactúan con los dominios transmembrana y con los bucles de conexión extracelular de PTH1R (sitio 2) (171). Las interacciones con el sitio 1 proporcionan la mayor parte del impulso energético para la unión, mientras que el contacto con el sitio 2 induce los cambios conformacionales en el receptor que inicia el acoplamiento y la activación de las proteínas G que conducen a la estimulación de las vías de señalización intracelular (172,173). Los residuos de las posiciones 2, 5 y 8 son de especial relevancia para la unión al receptor y la inducción de la señalización del AMPc en ambos péptidos (173,174). La delección de los residuos 1-6 de PTH (1-34) produce análogos que ya no activan la señalización a través de la vía AMPc-PKA, sino que funcionan como antagonistas competitivos de la señalización AMPc mediada por PTH1R (175).

A pesar de que PTH y PTHrP se unen y activan a PTH1R de modo similar, estudios en humanos han mostrado que la estimulación exógena con PTH(1-34) induce niveles séricos más altos de calcio,  $1,25\text{-(OH)}_2$  vitamina  $D_3$  y de marcadores de resorción ósea en comparación con la estimulación con PTHrP (1-36) (176,177). De modo que se ha determinado que PTH y PTHrP se unen de forma distinta al receptor, induciendo patrones diferentes de señalización. La unión de PTH (1-34) a PTH1R se ve favorecida cuando este no está acoplado a proteínas G, promoviendo un estado conformacional conocido como  $R^0$ , 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 (1-36), el cual se une de forma más lábil al receptor (178). A los pocos minutos de la unión inicial, la mayoría de los complejos PTH(1-34)-PTH1R colocalizan con  $G\alpha_s$  y la adenilil ciclasa en endosomas tempranos, los cuales son capaces de seguir con la producción de AMPc (179). La  $\beta$ -arrestina puede unirse a este complejo prolongando aún más la señalización de AMPc. La terminación de la producción de AMPc se produce cuando la  $\beta$ -arrestina se disocia del complejo y se produce la unión de un retrómero, un complejo multimérico implicado en el transporte retrógrado de proteínas desde los endosomas tempranos al Golgi (180). Esto coincide con la acidificación de los endosomas promovidas por la PKA-vATPasa, dando lugar a la disociación del complejo PTH-PTH1R (181).

Las modificaciones en las vías de señalización de PTH1R tienen consecuencias en los efectos biológicos de los osteocitos. En este sentido, la delección de *Pth1r* en osteocitos de un modelo de ratón (DMP1-KOPTH1R) provoca un fenotipo de bajo recambio óseo con un aumento moderado de la masa ósea, relacionado con la disminución de la actividad osteoclástica dependiente de RANKL (96,139). La sobreexpresión de PTH1R en osteocitos de ratón (DMP1-CaPTH1R) induce un aumento de la masa y del remodelado óseo. En este modelo, la inhibición de la vía de señalización Wnt abolió el fenotipo mencionado anteriormente de aumento de la masa ósea, pero sin afectar al incremento en el remodelado óseo (182). Estos estudios sugieren dos vías dependientes de PTH1R en el osteocito, una permite la formación de hueso (dependiente de SOST) y la otra, la resorción ósea (dependiente de RANKL). Además, la ausencia de *Pth1r* en los osteocitos reduce los efectos anabólicos inducidos por la administración intermitente de PTH en ratones DMP1-KOPTH1R (96,139). Otro estudio señala a  $G\alpha_s$ /AMPc como la vía específica necesaria para el aumento de la masa ósea por PTH en el linaje osteoblástico (183). Así mismo, PTH1R en osteocitos parece ser también necesario para la respuesta ósea a la estimulación mecánica, como se muestra en ratones DMP1-KOPTH1R, donde las acciones anabólicas de la carga mecánica se vieron perjudicadas (96).

Recientemente, nuestro grupo y otros han descrito que la estimulación mecánica puede activar directamente a PTH1R sin estimulación de su ligando, indicando la importancia del receptor de PTH como mecanosensor en osteocitos y osteoblastos (117,184). En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que PTH1R es un componente fundamental en el proceso de transducción de señales mecánicas en las células osteocíticas MLO-Y4. En estas células, la activación de PTH1R independientemente de su ligando ocurre inmediatamente después de la estimulación mecánica con flujo de fluido, gracias a un aumento de la afluencia de calcio intracelular (117). Además, el flujo de fluido induce un incremento de PTH1R en la membrana plasmática de las células MLO-Y4, e *in vivo*, la carga mecánica en combinación con un tratamiento breve con péptidos derivados de PTHrP previene la fragilidad ósea inducida por la diabetes (185,186).

Dado que PTH1R es capaz de detectar estímulos mecánicos, y las células óseas presentan diversos mecanosensores, podría ser posible que este receptor se movilice a una de estas estructuras mecanosensibles, asociándose con ellas y potenciando así, las respuestas celulares. Hay estudios que demuestran que la región C-terminal de PTH1R contiene dos dominios que permiten su transporte al cilio primario (VPMG y VGPR). Además se ha descrito que en células del núcleo pulposo, PTH1R se transporta al cilio primario en respuesta a la mecanoestimulación (187). De forma similar, se ha observado una secuencia de aminoácidos en el segundo giro intracelular de PTH1R que incluye un dominio de unión a caveolina. Así mismo, se ha identificado la colocalización de PTH1R y caveolina-3 en cardiomiocitos humanos (188). Sin embargo, la movilización de PTH1R al cilio primario o a las caveolas, así como el estímulo que da lugar a este transporte no está muy claro. De forma similar, habría que profundizar en el estudio de las vías de señalización intracelular y las respuestas extracelulares desencadenadas por PTH1R asociadas con el cilio primario y con las caveolas en condiciones fisiológicas.

### **3.2. El cilio primario como modulador del metabolismo óseo**

#### **3.2.1. Ciliogénesis. Estructura del cilio primario y sistema de transporte intraflagelar (IFT)**

El cilio primario es un orgánulo único, apendicular e inmóvil constituido por microtúbulos que se extienden desde la superficie apical de casi todas las células de mamíferos, como por ejemplo las células epiteliales del riñón o las células óseas, entre otras (189). El cilio primario está compuesto por un **cuerpo basal**, desde donde se proyecta el **axonema**, una estructura central basada en microtúbulos, el cual está rodeado por una **membrana ciliar**, una extensión de la membrana plasmática que presenta una composición lipídica, además de receptores que capacitan al cilio primario para detectar señales extracelulares (190,191).

La ciliogénesis en el linaje osteoblástico comienza cuando la célula en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular entra en quiescencia. En ese momento, en el interior de las células comienzan una serie de eventos para el desarrollo del cilio partiendo de centriolos madre (192). En el citoplasma hay pequeñas vesículas que se fusionan formando una gran vesícula ciliar, la cual encapsula al centriolo madre. Posteriormente, este centriolo se convierte en el cuerpo basal del cilio primario, que consiste en un centriolo maduro conectado a un centriolo inmaduro, rodeados ambos por una matriz pericentriolar rica en proteínas (192). Poco a poco, el centriolo va migrando hacia la superficie apical de la célula, y se va produciendo la elongación de los dos microtúbulos internos de cada uno de los tripletes. Esto da lugar a una estructura que consiste en nueve dobletes de microtúbulos externos, los cuales sirven de base para la estructura y la rigidez (193), pero carece del par central necesario para generar fuerza motriz. Esta estructura se conoce como axonema y adopta el patrón “9+0” (194,195). A medida que el axonema se va elongando, se produce la deformación de la vesícula ciliar, dando lugar a una membrana externa, vaina ciliar, y a una membrana interna, eje ciliar, que rodean al axonema y a la parte distal del centriolo madre. Además, el extremo distal del cuerpo basal y una zona especializada apical funcionan como barrera de permeabilidad entre el cilio y el

citoplasma, denominada "puerta ciliar", que consta de dos subregiones que incluyen las fibras de transición (FT) y la zona de transición (ZT), la cual tiene una organización modular sofisticada con componentes que regulan el tráfico intracelular hacia y desde el cilio (189,196). En la fase final, se produce el acoplamiento a la membrana plasmática. Esto es posible porque se produce la exocitosis de la vesícula ciliar y se fusiona con la membrana plasmática, exponiendo al cilio al espacio extracelular (Figura 4). En el proceso de fusión, el eje ciliar forma la membrana del cilio, mientras que la vaina ciliar da origen al bolsillo ciliar. El bolsillo ciliar es un dominio de membrana en la base del cilio que se cree que media la actividad endocítica ciliar y el tráfico vesicular, y puede actuar como interfaz con el citoesqueleto de actina (197–199). Además, el cilio primario carece de una serie de componentes axonémicos presentes en otras estructuras ciliares, como las conexiones radiales, los brazos de dineína y los enlaces de nexina. Se cree que la ausencia de estos componentes refuerza el axonema e incrementan su rigidez (200). A nivel ultraestructural, la diferencia

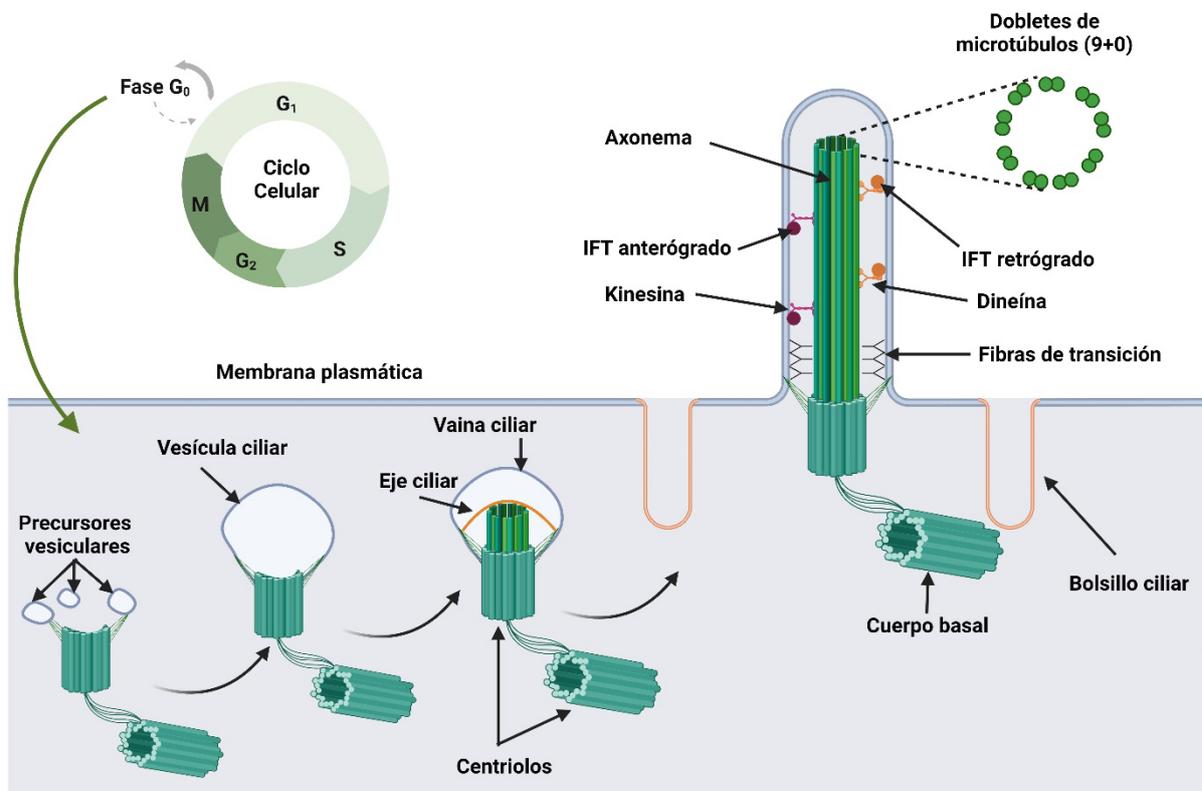


Figura 4. Estructura del cilio primario y proceso de ciliogénesis intracelular. Figura realizada con BioRender.

más destacada entre la estructura de los dobletes es que consiste en un microtúbulo completo (el túbulo A) conectado a un segundo microtúbulo incompleto (el túbulo B) compuesto por menos protofilamentos (191).

Dado que el cilio primario no presenta maquinaria para la formación de proteínas, todas las proteínas ciliares se forman en otras partes de la célula y son movilizadas al cilio a través de un proceso llamado transporte intraflagelar (IFT), un sistema de tráfico bidireccional que transporta proteínas a lo largo del axonema regulado por las proteínas IFT (195,201). Existen dos complejos: IFT-A compuesto por seis proteínas IFT que se unen con la proteína motora dineína-2, favoreciendo el transporte retrógrado, es decir, desde el extremo distal del cilio al cuerpo basal, e IFT-B compuesto por al menos 14 proteínas, entre las que se encuentra la proteína IFT88. Este complejo se asocia con la proteína motora kinesina-II, favoreciendo el transporte anterógrado, desde el cuerpo basal hasta el extremo distal del cilio (202–204). En la mayoría de los casos, la pérdida de alguna proteína que forma el complejo IFT-B da lugar a un acortamiento o a la ausencia del cilio primario (205–207). Por el contrario, la pérdida de alguna proteína del complejo IFT-A parece no implicar alteraciones en la ciliogénesis (208,209). Por lo tanto, la delección del gen *Ift88* produce alteraciones en la formación del cilio primario, dado que IFT88 es una proteína clave para la ciliogénesis (210,211). De modo que el transporte intraflagelar interviene tanto en el ensamblaje como en la reabsorción del cilio. Se ha comprobado que la longitud del cilio y su estructura está reguladas por el extremo distal del cilio, dado que es un compartimento regulador de los complejos GLI-SUFU, los efectores de la señalización *Hedgehog* (189).

Aunque los cilios primarios son ubicuos y se encuentran en casi todos los tipos de células humanas, excepto en las de linaje mieloide y linfoide (212), su presencia no es constante en estas células. La aparición de cilios primarios depende del ciclo celular y es un proceso dinámico de ensamblaje y reabsorción. El ensamblaje del cilio se produce a través de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina

cuando la célula entra en estado quiescente y la reabsorción se produce antes de que la célula entre en mitosis (201).

### 3.2.2. El cilio primario como mecanotransductor

El cilio primario se comporta como una “antena” celular que recibe diversas señales extracelulares incluyendo estímulos mecánicos y señales químicas, y las transduce en respuestas de señalización intracelular (189,213,214). La localización espacio-temporal de receptores específicos, canales iónicos (215–217) y componentes de señalización a lo largo del eje del cilio incluye proteínas involucradas en la regulación del remodelado óseo como *hedgehog* (HH), GPCRs de clase A, B y F, receptores  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGFR $\alpha$ ) y receptores de la matriz extracelular (MEC) (190), los cuales hacen posible su capacidad de detección (218). Dado que el cilio primario tiene unas características estructurales especiales y contacta directamente con el medio extracelular, se cree que el cilio primario podría funcionar como quimiosensor, mecanosensor o sensor osmótico para controlar el desarrollo óseo (201,219). En los osteocitos, el cilio primario es un importante sensor de las respuestas a la estimulación mecánica y coordina la adaptación ósea inducida por la carga (220–222). Además, se ha demostrado que el cilio primario de las células osteocíticas MLO-Y4 y de las células osteoblásticas MC3T3-E1 se extiende desde la superficie celular y se desvía durante el flujo de fluido. Sin embargo, las respuestas celulares de los osteoblastos y osteocitos al flujo de fluido disminuyeron significativamente tras la inhibición de la formación y función del cilio primario (223,224). El cilio primario de los osteocitos se encarga de detectar y mediar las señales de estimulación electromagnética, regulando así la actividad y la función osteoclástica (213). La reciente descripción del papel de PTH1R como mecanosensor en la membrana celular de osteocitos y osteoblastos (117,225), sugiere que este receptor GPCR podría ser especialmente abundante en un orgánulo enfocado a la detección de estímulos mecánicos como es el cilio primario (226). De hecho, estudios de nuestro laboratorio demuestran que PTH1R induce acciones de supervivencia a través de un mecanismo dependiente del cilio primario y de GLI1, tanto en osteocitos

como en osteoblastos (226). Sin embargo, se desconoce si PTH1R puede movilizarse hacia el cilio primario durante la estimulación mecánica y cómo esta translocación afecta a la comunicación osteocito-osteoclasto.

Una característica interesante del cilio es su capacidad para ajustar la morfología en respuesta a las condiciones ambientales. La elongación del cilio para aumentar su capacidad de detección de señales o la reabsorción para disminuir su capacidad de respuesta a las señales, tienen un sentido intuitivo como mecanismo de adaptación de señales sensoriales. De hecho, los cilios parecen actuar como antenas autoajustables y modifican su tamaño y forma en función de la intensidad de las señales que detectan (189). Los segundos mensajeros y el sistema IFT desempeñan un papel clave en el ajuste de la forma y el tamaño de los cilios en respuesta a estímulos extracelulares. La estimulación mecánica de células epiteliales disminuye los niveles de AMPc y acorta los cilios; esto se debe a la regulación negativa de la señalización de la quinasa dependiente de AMPc y al transporte IFT anterógrado (227). Del mismo modo, se ha demostrado que PGE<sub>2</sub> es un regulador positivo de la ciliogénesis al aumentar el transporte intraflagelar anterógrado a través de su receptor EP4, que se localiza en la membrana ciliar y actúa activando la cascada de señalización AMPc (228,229). La señalización del fosfatidilinositol (PtdIns) y las proporciones celulares del fosfatidilinositol fosfato (PIP) están implicadas en la desestabilización del axonema ciliar, que puede tener un papel regulador en la señalización de *Hedgehog* (230). Así mismo, la carga mecánica activa múltiples vías de señalización, dando lugar a respuestas osteogénicas y antirresortivas. En cuestión de segundos o minutos tras la exposición al flujo de fluido, los osteocitos responden con liberación de NO, ATP, Ca<sup>2+</sup> y PGE<sub>2</sub>. Estas respuestas iniciales conducen a efectos secundarios que median en la remodelación ósea, incluyendo aumentos en la subunidad 2 del citocromo oxidasa (COX-2) y en la secreción de PGE<sub>2</sub>, indicando un mayor metabolismo de la matriz ósea (224,231–233). Kwon *et al.* observaron que el segundo mensajero AMPc mostraba una disminución rápida y transitoria dependiente del cilio primario después de aplicar flujo de fluido oscilatorio durante 2 minutos. Esto dio lugar a

un aumento de la expresión del gen *Cox2*. Además, la adenilato ciclasa 6 (AC6) se localiza en el cilio primario de células MLO-Y4, la cual es esencial para el incremento de la expresión de *Cox2* inducido por el flujo. De modo que se sugirió un mecanismo por el cual la flexión del cilio provoca una afluencia de  $Ca^{2+}$  a través de los canales iónicos, lo que inhibe la función de AC6, provocando una disminución del AMPc y un aumento de la expresión de *Cox2* (234). También se ha descrito que el complejo policistina 1/2 se localizan en el cilio primario de las células óseas. Cuando los ratones presentan mutaciones en el gen que codifica *Pkd1* se observa una disminución de la densidad mineral, del volumen óseo trabecular y del grosor cortical. También, hay una disminución de la expresión génica de los marcadores osteoblásticos, *Runx2*, osterix y osteocalcina, además de una disminución en el ratio *Opg/Rankl*. Estos resultados implican al complejo policistina 1/2 y al cilio primario en la mecanotransducción ósea (195,235). Las acciones de estos mecanotransductores del cilio primario son mediadas por diversos factores y vías de señalización, incluyendo Hh, PDGF, Wnt/ $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$ , BMP y FGF, entre otras (236). De este modo, el cilio primario es capaz de modular la formación ósea inducida por carga mecánica (220,237,238) 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 los osteocitos mecanosensibles (223,239).

### 3.2.3. Vías de señalización relacionadas con el cilio primario. Señalización *Hedgehog*

El cilio primario desempeña un papel esencial en la transducción de señales de las vías de *Hedgehog*, que es especialmente importante en el desarrollo del esqueleto, como se demuestra en varios modelos de ratón (197,240,241). De hecho, se ha demostrado que *Indian Hedgehog* (IHH) es una molécula de señalización clave en la osificación endocondral, ya que regula la maduración de los condrocitos, mientras que *Sonic Hedgehog* (SHH) y sus efectores posteriores son necesarios en etapas más tardías para el modelado del esqueleto en formación.

La señalización Shh controla el desarrollo temprano de las extremidades y la asimetría del eje izquierda-derecha a través de dianas génicas y factores de transcripción de glioma (GLI) (242). Algunos miembros de la familia GLI, como GLI2 y GLI3, colocalizan en el cilio primario y son los principales mediadores de la vía de señalización, mientras que GLI1 es el efector final de la vía (243). *Patched 1* (PTCH1) es un receptor transmembrana de las proteínas *Hedgehog* que está altamente enriquecido en la membrana de la base y el eje del cilio primario (240). La localización de estos receptores y los miembros de la familia GLI sugiere un papel funcional en el cilio primario mediado por la mecanotransducción. De modo que el cilio primario es esencial para la señalización de Shh (217). El evento iniciador de la señalización Hh implica el movimiento recíproco de las proteínas transmembrana, PTCH1 y *Smoothed* (SMO) en el cilio primario. En ausencia del ligando SHH, el receptor PTCH1 se localiza en la membrana ciliar, y regula negativamente la señalización Hh suprimiendo la actividad de SMO (240). De alguna manera, PTCH1 impide el enriquecimiento de SMO en la membrana ciliar, el cual es necesario para la propagación de la señal. Esta interrupción bloquea la transducción de la señal Hh, lo que sugiere que SMO activa la vía descendente en el cilio primario. Sin estimulación Hh, SMO está presente en vesículas intracelulares y las proteínas GLI se procesan a su forma represora en la punta ciliar (215). Cuando el ligando SHH interactúa con el receptor de PTCH1 (240), este receptor desaparece del cilio, permitiendo que la proteína transmembrana SMO circule a través del cilio para activar la señalización descendente (244). Esto da lugar a un aumento de los niveles de las formas completas de GLI (GliF) 2 y 3 en la región distal de los cilios. GliF 2 y 3 son entonces transportados desde la parte distal hacia el cuerpo basal del cilio, y de ahí al núcleo, permitiendo promover la señalización *Hedgehog*. De modo que la señalización Hh culmina en la conversión de los factores de transcripción GLI de represores a activadores (245,246). Por tanto, el cilio primario es un regulador crítico de la vía Hh, donde el movimiento regulado de PTCH1 fuera y SMO dentro del cilio puede crear un interruptor mediante el cual las células pueden activar y desactivar la señalización Hh durante el desarrollo y el control de la homeostasis tisular (247,248). En este

escenario, la unión de ligandos a PTCH1 en el cilio activa la vía Hh mediante la eliminación de PTCH1 del cilio (240) en un proceso que está asociado con el enriquecimiento ciliar de SMO (244).

La señalización Ihh controla la osificación endocondral, es decir, la conversión del cartílago mineralizado en hueso (249). La señalización Wnt interacciona de forma sinérgica pero separada con la señalización Ihh, regulando la diferenciación osteoblástica, la actividad de los condrocitos y la formación de la articulación sinovial en el hueso endocondral en desarrollo (250). También se ha comprobado que el sistema IFT juega un papel importante en la señalización Ihh. Cuando se produce la delección de *Ift88* en ratones, se inhibe la formación del cilio primario resultando en: una reducción de la expresión de *Ptch1* y *Gli1* en huesos largos, una disminución de la longitud de las extremidades y una formación ósea endocondral defectuosa (206,251). Otro ejemplo de la implicación del sistema IFT en la señalización de Ihh es la inactivación de la proteína similar a la quinesina (KIF3A) en el cartílago, que da lugar a anomalías en el desarrollo y la organización de la placa de crecimiento, una baja expresión de *Ihh* y una formación ósea endocondral anormal (252). La expresión de *Ihh* se localiza en regiones de contracciones embrionarias repetidas, lo que sugiere que IHH participa en la mecanorregulación de la formación ósea (253). Otro estudio demostró que la carga mecánica repetida provoca un aumento de la expresión de *Ihh in vivo*, lo que sugiere que el cilio primario como mecanosensor puede ser necesario para el desarrollo esquelético (254).

### 3.3. Las caveolas como moduladoras del metabolismo óseo

#### 3.3.1. Estructura y formación de las caveolas

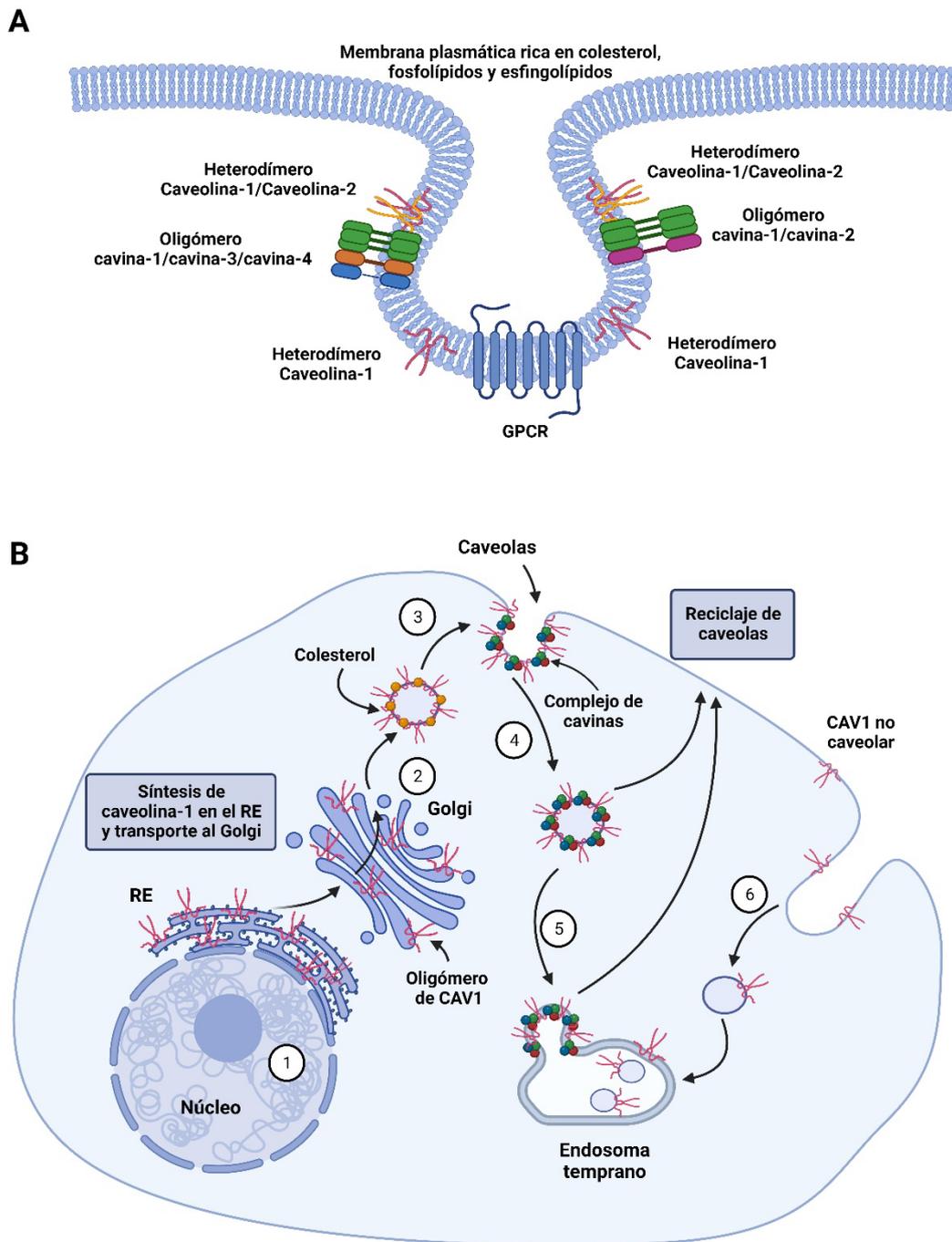
Las caveolas son invaginaciones microscópicas, las cuales se encuentran situadas en dominios de membrana plasmática enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y proteínas. Hasta el momento sólo se han identificado caveolas en vertebrados (255–257). Los principales componentes estructurales de las caveolas son las caveolinas. Las caveolinas son proteínas pequeñas (20-23 kDa) con una secuencia altamente conservada en la evolución que tienen la



capacidad de unirse al colesterol puesto que son componentes integrales de la membrana. Existen hasta el momento tres miembros de esta familia descritos y reconocidos en mamíferos: **caveolina-1 (CAV-1)**, **caveolina-2 (CAV-2)** y **caveolina-3 (CAV-3)**. La proteína CAV-1 es la más relevante, al ser necesaria para la biogénesis de las caveolas, excepto en el caso de las células musculares, en las que la proteína principal que conforma estos dominios es CAV-3 (258,259). En concreto, se ha estimado que cada caveola contiene unas 140-150 moléculas individuales de CAV-1 (260). Una década después de la caracterización de las caveolinas como componentes estructurales de las caveolas se descubrió una nueva familia determinante para el funcionamiento y biogénesis de estas, las cavininas, unas proteínas periféricas de membrana (257). La familia de las cavininas está compuesta por cuatro miembros: **cavina-1** (también llamada PTRF), la única esencial en la formación de las caveolas, que se une a fosfatidilserina y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, **cavina-2**, la cual se une a fosfatidilserina, **cavina-3**, que también se une a la fosfatidilserina y regula el tráfico de las caveolas y **cavina-4**, específica de músculo y que presenta unión tanto a fosfatidilserina como a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (261–263). Todas ellas tienen una secuencia y una estructura tridimensional muy similar (264) y se asocian formando complejos homo- y hetero-oligoméricos que se unen a las caveolas en células que expresan caveolinas contribuyendo a su estabilización en la membrana plasmática (265,266) (Figura 5A). Además de las caveolinas y las cavininas existen otras proteínas que se asocian directamente con las caveolas y regulan su dinámica, morfología e internalización (262). Entre estas proteínas, que se concentran sobre todo en la parte del cuello de la caveola, es decir, la región más próxima a la membrana plasmática, está la dinamina-2 (DYN2), una GTPasa que media la internalización de las caveolas al posibilitar la escisión de la membrana plasmática (267), y EHD2, una ATPasa de tipo dinamina que participa en la endocitosis (279), así como PACSIN2 (también denominada Syndapin2), que contiene un dominio de unión a curvaturas de membrana (dominio F-BAR) y participa en la morfogénesis de estas estructuras (268). Además de en las caveolas, CAV-1 también está presente en otras localizaciones celulares, como por ejemplo en la membrana plasmática (269).

Un estudio ha demostrado que CAV-1 forma microdominios de membrana especializados en la zona de transición del cilio primario, para cuyo establecimiento son necesarias diversas proteínas ciliares como la quinesina-3 motora (KIF13B) y la nefrocistina 4 (270). Otro estudio ha demostrado que las caveolinas se localizan en la base del cilio primario y que CAV-1 desempeña un papel esencial en la regulación de la composición y la función de la membrana ciliar (271).

La formación de las caveolas se inicia con la síntesis de CAV-1 en el RE, donde forma oligómeros resistentes a los detergentes. Estos oligómeros atraviesan el complejo de Golgi y llegan a la superficie celular en un proceso dependiente del colesterol (272,273). Por otro lado, las cavininas forman complejos hetero-oligoméricos en el citosol que se asocian con dominios enriquecidos en CAV-1 en la membrana plasmática, pero no en el complejo de Golgi, generando caveolas superficiales (261). La composición lipídica, las proteínas accesorias y la arquitectura de los dominios superficiales enriquecidos con caveolina pueden intervenir en la asociación de cavininas para garantizar que las caveolas sólo se formen en la superficie celular. Las cavininas poseen sitios de unión para dos lípidos de membrana distintos, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol bifosfato. Sin embargo, la unión a lípidos por sí sola parece ser insuficiente para su reclutamiento a la superficie, que además requiere CAV-1. También se ha demostrado que la unión de las cavininas a CAV-1 por sí solas es de baja avididad, lo cual sugiere que podrían ser necesarias múltiples interacciones de baja afinidad con lípidos y proteínas de membrana para generar el dominio caveolar (261). Tras su formación, las caveolas pueden desensamblarse, produciéndose la endocitosis de complejos que contienen componentes formados por oligómeros de cavininas unidas a CAV-1. Estos complejos pueden tener diversos destinos, pueden ser degradados en endosomas tardíos. También se puede producir la separación de CAV-1, que se recicla a la membrana plasmática para iniciar la nueva formación de dominios caveolares, mientras que las cavininas permanecen en el citosol y pueden colaborar además en la formación de nuevas caveolas (255) (Figura 5B).



**Figura 5. Formación y morfología de las caveolas.** (A) Estructura y componentes de la caveola. (B) Representación del tráfico de CAV-1 a lo largo del sistema de endomembranas celulares: (1) CAV-1 se integra en la MP en el RER durante la traducción; (2) Posteriormente pasa a través del sistema de membranas que compone el aparato de Golgi, donde oligomeriza y se asocia a moléculas de colesterol; (3) Desde el Golgi, las vesículas con CAV-1 oligomerizada viajan hasta la MP, y una vez en la MP reclutan el complejo de las cavinas para conformar las caveolas; (4 y 5) Las caveolas se endocitan desde la MP a endosomas tempranos, y también trafican en el sentido contrario, reciclándose de nuevo a la MP para el mantenimiento de la homeostasis de las caveolas; (6) En la MP también se puede encontrar CAV-1 no caveolar que se puede internalizar por vías de endocitosis independientes de caveolas. Figura realizada con el software BioRender.

Entre las funciones más destacadas de CAV-1 se encuentra su participación en la regulación de diferentes rutas de señalización celular (255). Esta regulación es dependiente en muchas ocasiones de la interacción directa de CAV-1 con moléculas reguladoras o de la localización de estas en las caveolas, como es el caso de las proteínas G heterotriméricas, SRC quinasas, integrinas, ERK1/2, PKC, PI3K, H-Ras, eNOS y diferentes canales iónicos (274,275). La interacción de CAV-1 con esas moléculas reguladoras tiene lugar frecuentemente a través de su dominio CSD (276). El control de diferentes rutas de señalización determina en última instancia su implicación en el control del comportamiento celular, afectando a procesos biológicos tales como migración, polarización, supervivencia, apoptosis y proliferación (277). Además del control de la señalización, CAV-1 y otros componentes de las caveolas están implicadas en otros procesos, como por ejemplo, en la regulación de la endocitosis independiente de clatrina (278) y en el control de procesos metabólicos (279). Finalmente, una de las funciones que está adquiriendo una mayor relevancia es su contribución en procesos de mecanotransducción de señales, tal y cómo se detalla en el apartado siguiente.

### 3.3.2. Dinámica de las caveolas y función mecanosensora

CAV-1 y las caveolas contribuyen a la adaptación y a la percepción de diferentes señales mecánicas, generalmente relacionadas con cambios en la tensión de la membrana plasmática, tales como el estiramiento, el estrés por flujo superficial o la pérdida de adhesión al sustrato (280). Las caveolas se aplanan en respuesta a estímulos mecánicos, como el estiramiento de la membrana plasmática, y ese aplanamiento promueve su desensamblaje y la liberación de algunos de sus componentes (281). Este aplanamiento de las caveolas, además de afectar a procesos de señalización, constituye un sistema de adaptación y de protección de la célula frente al estiramiento mecánico, ya que provee material de membrana adicional a la superficie celular actuando a modo de amortiguador (255,281,282). Otro estímulo mecánico diferente, la pérdida de adhesión al sustrato, determina una disminución en la densidad de caveolas en la membrana plasmática (283), lo que se correlaciona con la internalización de CAV-1 y su

acumulación en endosomas de reciclaje, en un proceso que es dependiente de DYN2 y de la integridad del citoesqueleto (282,284). La internalización de CAV-1 puede ser también independiente de caveolas (285), por lo que no se puede descartar que la entrada de CAV-1 cuando las células pierden la adhesión al sustrato pueda ser un proceso independiente de la internalización de estos dominios de membrana.

### 3.3.3. Papel de las caveolas en el tejido óseo

Hasta el momento se han descrito resultados contradictorios en relación con las acciones de las caveolas en el remodelado óseo. Las caveolas y CAV-1 se han encontrado tanto en osteoblastos murinos como en humanos (286,287). Como era de esperar, en las caveolas de las células óseas se encuentran complejos de señalización de membrana enriquecidos con CAV-1 (288), incluida la molécula de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (289), la cual está implicada en el desarrollo óseo (290). La acumulación de  $\beta$ -catenina es esencial para la mecanotransducción y su localización en las caveolas es necesaria para la activación de la vía de señalización CAV-1/ERK que conduce a la supervivencia de los osteocitos, pero esto se ve inhibido cuando se interrumpe la formación de las caveolas a través del silenciamiento de *Cav-1* (121,291). Además, CAV-1 es necesaria para la mecanotransducción mediada por el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial de tipo 2 (VEGFR2) en los osteocitos (292). Otro estudio, ha determinado que la sobreexpresión de *Cav-1* mejora la calcificación de la matriz en células osteoblásticas MC3T3-E1, mientras que, la supresión de *Cav-1* la disminuye (293). También se ha determinado que la activación del receptor purinérgico P2X<sub>7</sub>R induce la endocitosis de CAV-1 en los osteoblastos. Además, CAV-1 atenúa la señalización mediada por P2X<sub>7</sub>R tras su activación, sugiriendo que las caveolas desempeñan un papel en la función de los osteoblastos y en la mineralización ósea. Dada la importancia del P2X<sub>7</sub>R en la respuesta de los osteoblastos, la importancia del hueso en la carga mecánica y el papel de las caveolas en la mecanotransducción en otros tipos celulares, se podría decir que esta interacción alteraría la respuesta de los osteoblastos a la carga prolongada (294). Otro estudio ha determinado que la presencia de

CAV-1 es fundamental en los efectos proliferativos que ejerce la leptina en los osteoblastos a través de la activación de AKT (295). Además de los efectos de CAV-1 en células óseas, también se ha descrito que la sobreexpresión de Cav-3 promueve la formación de hueso a través de la vía Wnt en ratas osteoporóticas (296).

Por el contrario, hay estudios en los que se ha comprobado que, ratones CAV-1<sup>-/-</sup> de 8 semanas de edad presentan una morfología alterada del cartílago de crecimiento caracterizada por hipercelularidad y un mayor número de trabéculas (297). La ausencia de Cav-1 en ratones de 5 a 8 semanas da lugar a huesos corticales más grandes y aumenta la cantidad total de hueso tanto en el compartimento trabecular como en el cortical. Estos aumentos van acompañados de una mayor resistencia mecánica. Los estudios celulares sugieren que la etiología del aumento del tamaño y la cantidad de hueso se debe, al menos en parte, a efectos directos sobre la función de los osteoblastos, ya que en ausencia de Cav-1, las células osteoprogenitoras favorecen el fenotipo osteoblasto (298). También, se ha demostrado que la expresión de CAV-1 aumenta durante la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea, y su supresión mejora dicha diferenciación. El aumento de la expresión de CAV-1 observado durante la osteogénesis es probablemente un mecanismo de retroalimentación negativa (299). CAV-1 probablemente amortigua la señalización pro-osteogénica secuestrando mediadores de señalización en las caveolas de la superficie celular y/o impulsando su internalización a través de la endocitosis de las caveolas (300).



***Hipótesis***



En base a estos antecedentes, en la presente Tesis Doctoral hipotetizamos que los efectos mecánicos sobre los osteocitos afectan a su comunicación con los osteoclastos y sus progenitores a través de la mecanotransducción mediada por PTH1R y el cilio primario. El receptor PTH1R podría formar un cuerpo de señalización o signalosoma en el cilio primario, que sería fundamental para la señalización por estímulo mecánico.



# ***Objetivos***



Como objetivo general planteamos identificar los factores que regulan la comunicación osteocito-osteoclasto en relación con la posible movilización de PTH1R a cilio o caveolas, así como, estudiar los mecanismos que afectan a esta comunicación.

Para alcanzar este objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la implicación del cilio primario y de PTH1R en las señales inducidas en el osteocito por la mecanotransducción, o por PTHrP (1-37), que afectan al reclutamiento y a la diferenciación de precursores osteoclásticos.
2. Analizar la movilidad de PTH1R a lo largo del cilio primario.
3. Evaluar el efecto del estímulo mecánico por FF en la longitud del cilio primario.
4. Determinar la implicación de diferentes vías de señalización de PTH1R en el reclutamiento y la diferenciación de precursores osteoclásticos.
5. Analizar el secretoma de los osteocitos estimulados mecánicamente por FF con o sin activación de PTH1R.
6. Determinar el efecto de las caveolas en la comunicación osteocito-osteoclasto.
7. Estudiar la implicación de las caveolas en la movilización de PTH1R al cilio primario.



# ***Materiales y Métodos***



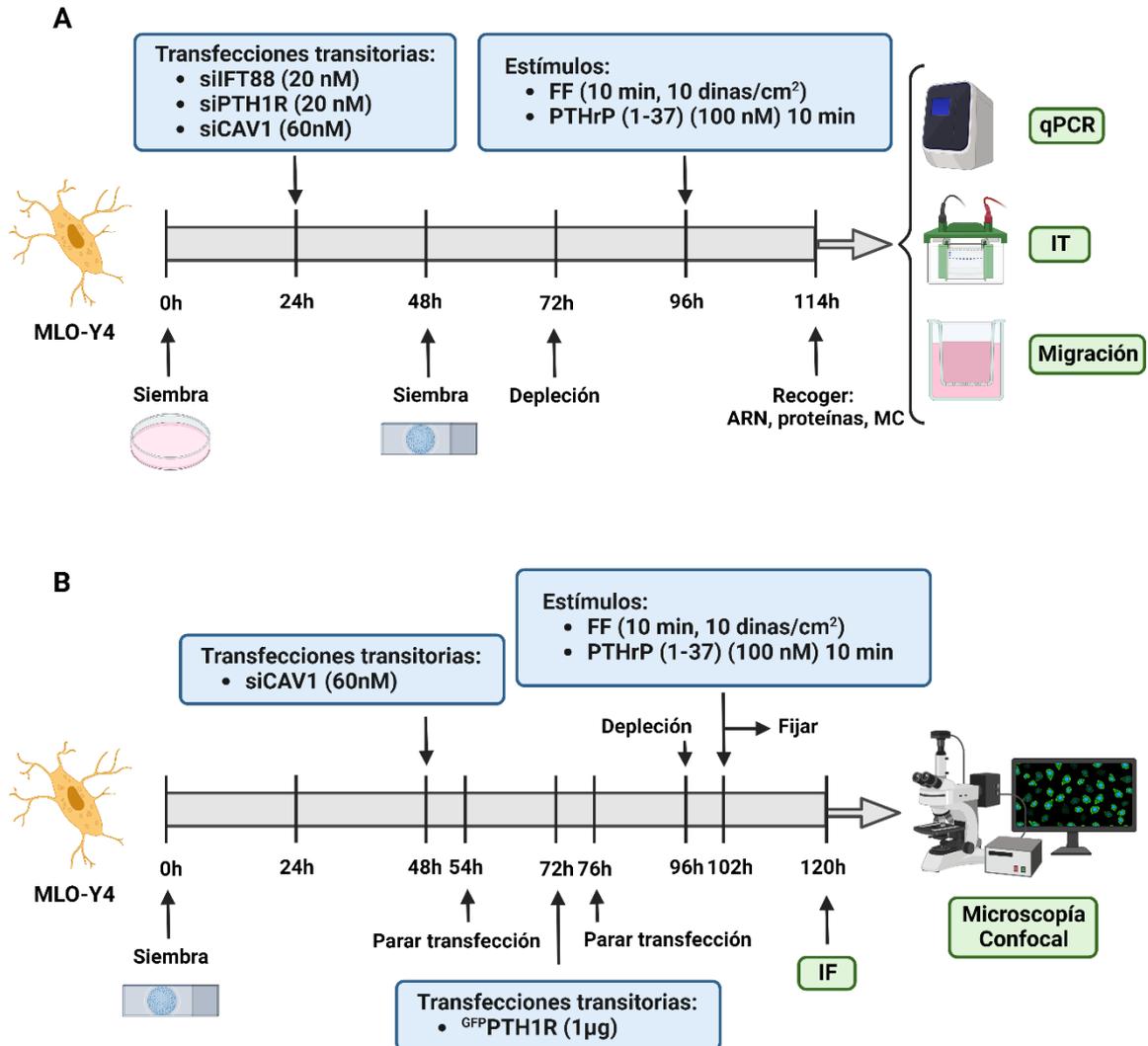
## 1. Modelos experimentales *in vitro*

### 1.1. Células osteocíticas de ratón MLO-Y4

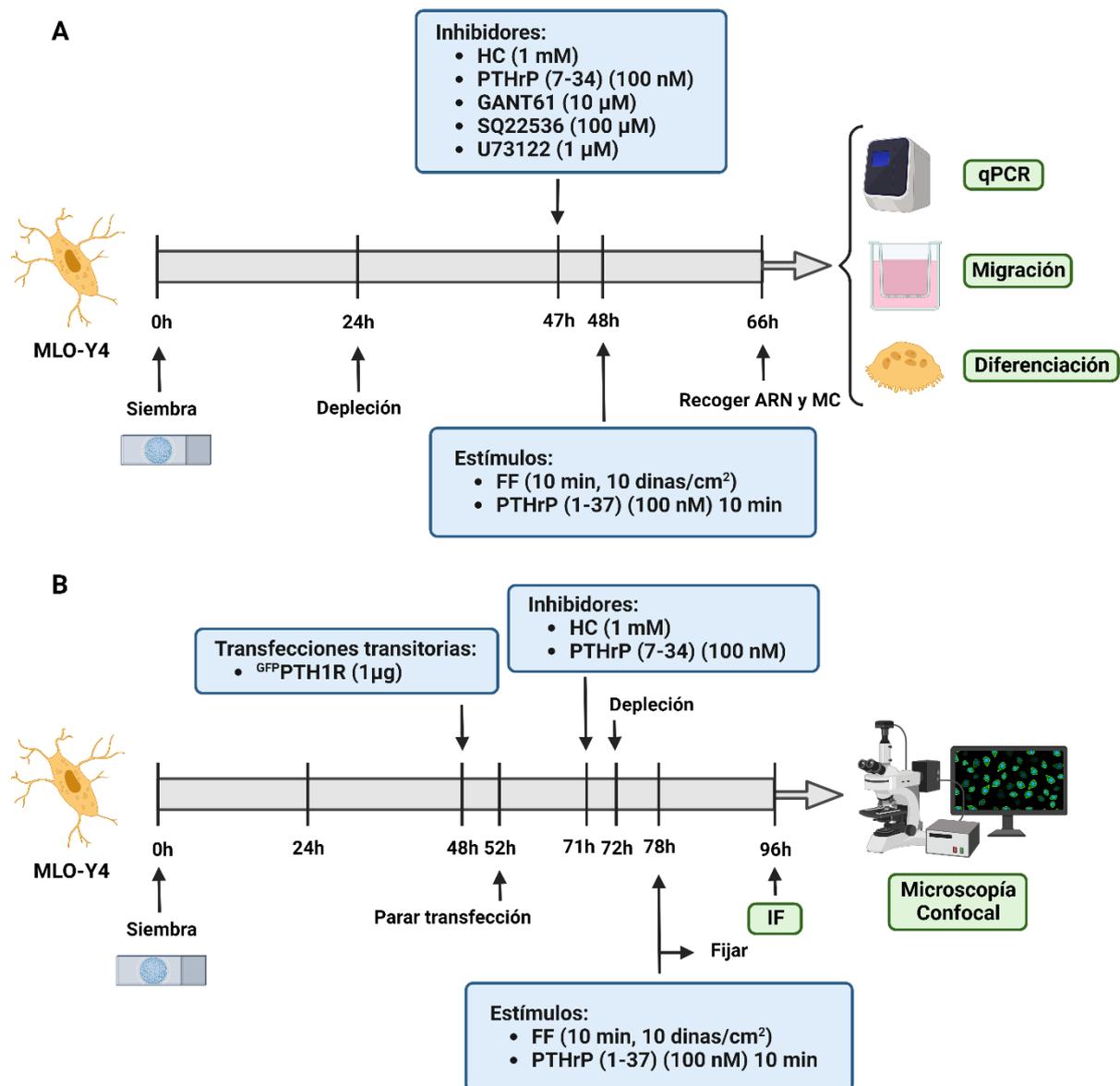
Las células osteocíticas de ratón MLO-Y4 fueron generosamente suministradas por la Dra. L. Bonewald (Universidad de Missouri, Kansas City, MO, EEUU), cuyo grupo desarrolló esta línea celular (301). Estas células se sembraron en medio de cultivo esencial mínimo  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) suplementado con suero fetal bovino (SFB) y suero fetal de ternera (SFT), cada uno al 2,5%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, en atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Las células se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo convencionales o en portaobjetos de vidrio (FlexCell International Corp., Hillsborough, NC, EEUU), revestidas con una matriz de colágeno tipo I (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, EEUU). Las células se mantuvieron en cultivo hasta que estuvieron casi totalmente confluentes. Al día siguiente, se reemplazó el medio de cultivo por medio  $\alpha$ -MEM sin rojo fenol con 1% de SFB y las células se mantuvieron en esta condición durante 24 horas. Posteriormente, las células se estimularon mecánicamente por flujo de fluido laminar (FF, descrito en el apartado 2.2) o mediante la utilización del péptido exógeno PTHrP (1–37) (Bachem, Bubendorf, Suiza) a una concentración de 100 nM durante 10 minutos. Las células que no fueron estimuladas serán los controles estáticos (CE). Después, las células se incubaron durante 18 horas con  $\alpha$ -MEM sin rojo fenol, sin SFB y sin SFT. Transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción del RNA para evaluar la expresión génica o a la extracción de proteínas para determinar los niveles proteicos mediante inmunotransferencia. También, se llevó a cabo la recogida de medios condicionados (MC). En ciertos experimentos, la extracción del RNA se realizó a las 6 horas.

En algunos experimentos, las células se transfectaron de manera transitoria con ARN de interferencia (siARN) 48 o 72 horas antes de la estimulación mecánica o de la estimulación con PTHrP (1-37). En algunos casos, también se transfectaron con plásmidos 24 horas antes de las estimulaciones, como se describe posteriormente. Cuando se utilizaron antagonistas/inhibidores, se

añadieron a las células 1 hora antes de la estimulación mecánica o del péptido exógeno PTHrP. El esquema experimental correspondiente se muestra en las Figuras 6 y 7. Los detalles de cada una de las técnicas experimentales y estímulos utilizados se desarrollan en el apartado 2.



**Figura 6.** Esquema experimental mostrando los diferentes protocolos de transfecciones transitorias y estímulos llevados a cabo *in vitro* en las células osteocíticas de ratón MLO-Y4. **(A)** Experimentos de expresión génica y proteica en células MLO-Y4, y migración utilizando los MC obtenidos de MLO-Y4. **(B)** Experimentos de microscopía confocal en células MLO-Y4. qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; IT: inmunotransferencia; IF: inmunofluorescencia; FF: flujo de fluido; MC: medio condicionado; siFT88: silenciamiento de *Ift88*; siPTH1R: silenciamiento de *Pth1r*; siCAV-1: silenciamiento de *Cav-1*. Imagen realizada con el software BioRender.



**Figura 7.** Esquema experimental mostrando los diferentes protocolos de transfecciones transitorias, inhibiciones y estímulos llevados a cabo *in vitro* en las células osteocíticas de ratón MLO-Y4. (A) Experimentos de expresión génica en células MLO-Y4, y experimentos de migración y diferenciación hacia osteoclastos utilizando los MC obtenidos de MLO-Y4. (B) Experimentos de microscopía confocal en células MLO-Y4. qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; IF: inmunofluorescencia; FF: flujo de fluido; MC: medio condicionado; HC: hidrato de cloral; GANT61: antagonista de GLI1; SQ22536; inhibidor de la ciclasa A; U73122: inhibidor de la fosfolipasa C. Imagen realizada con el software BioRender.

## 1.2. Macrófagos de ratón RAW 264.7

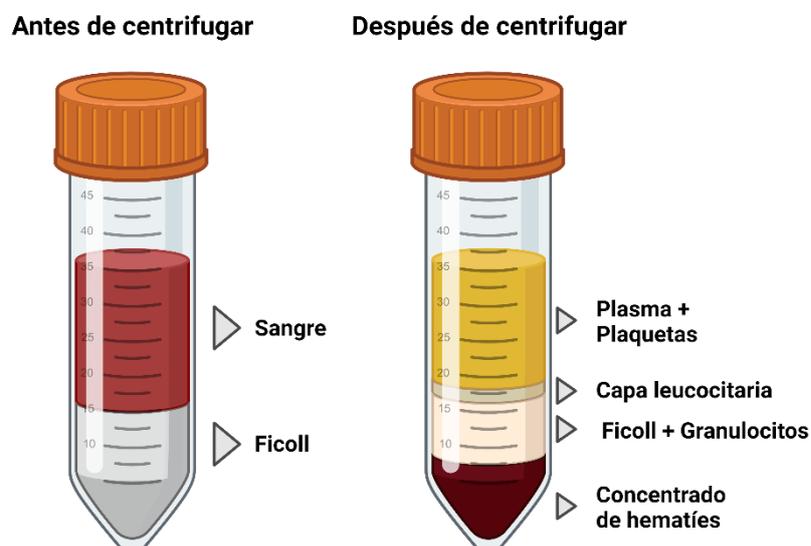
Las células RAW 264.7 (TIB-71™; ATCC) se cultivaron en medio *Eagle* modificado de *Dulbecco* (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) suplementado con

SFB al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Las células se sembraron en placas de cultivo convencionales a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup>, hasta alcanzar una confluencia del 70%. Para el ensayo de migración, se sembraron 50.000 células en cada pocillo de tipo *Transwell*<sup>®</sup> (Corning Costar, Cambridge, MA, EEUU), y después se incubaron durante 6 horas con el mismo medio de cultivo. Además, se utilizó un 20% de los distintos MC de las células MLO-Y4. El esquema experimental correspondiente se muestra en la Figura 9. Los detalles de esta técnica se describen en el apartado 2.9.

### **1.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de la capa leucocitaria**

La sangre, obtenida del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, se diluyó 1:1 con medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Life Technologies) en un tubo Falcon de 50 ml. Por otro lado, se prepararon tubos Falcon de 50 ml con 1/3 de volumen de Ficoll (15 ml aproximadamente). El volumen total de sangre diluida en RPMI se repartió equitativamente entre tubos que contenían el Ficoll. Para ello, se añadió 2/3 de volumen de la sangre diluida, con extremo cuidado (gota a gota, con flujo lento y constante) sobre el Ficoll contenido en cada tubo. Los tubos se centrifugaron a 800 g durante 40 minutos sin aceleración ni deceleración. Una vez finalizada la centrifugación, se recogió el halo blanquecino conteniendo las CMSP de los tubos (Figura 8), y se depositó en nuevos tubos Falcon de 50 ml. Posteriormente, se realizaron 2 lavados, resuspendiendo el pellet celular en 45 ml de tampón fosfato salino (PBS) 1X, y centrifugando a 250 g durante 10 minutos. Antes de la segunda centrifugación, se tomó una muestra y se diluyó 1:1 con el reactivo azul de tripán (Sigma-Aldrich) para determinar el número de células totales con la Cámara de *Neubauer*. De las células obtenidas, se sembraron 250.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo convencionales con el medio  $\alpha$ -MEM suplementado con un 10% de SFT, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, además de añadir 20

ng/ml de M-CSF (ProSpec, Ness-Ziona, Israel). El medio se cambió cada 3 días conteniendo 20 ng/ml de M-CSF, hasta alcanzar el 90% de confluencia.



**Figura 8. Diagrama esquemático de la separación de los componentes de la sangre utilizando un gradiente de densidad.** Figura realizada con el software BioRender.

#### 1.4. Células mononucleares de sangre periférica

Las CMSP para generar osteoclastos humanos *in vitro* se aislaron a partir de la capa leucocitaria. Estas células se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con un 10% de SFT, 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, en atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Los monocitos humanos se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 90%. Para el ensayo de migración, se sembraron 50.000 células en cada pocillo de tipo *Transwell*<sup>®</sup> (Corning Costar), y después se incubaron durante 6 horas con el medio de cultivo mencionado anteriormente. Además, se utilizó un 20% de los distintos MC de las células MLO-Y4. Para el experimento de diferenciación, se sembraron 20.000 células en cada pocillo con el medio  $\alpha$ -MEM suplementado con un 10% de SFT en presencia de citoquinas pro-osteoclastogénicas (M-CSF y RANKL), además de añadir un 20% de los MC de las células MLO-Y4. El esquema experimental correspondiente se muestra en las Figuras 9 y 10. Los detalles de estas técnicas se describen en los apartados 2.9 y 2.10.

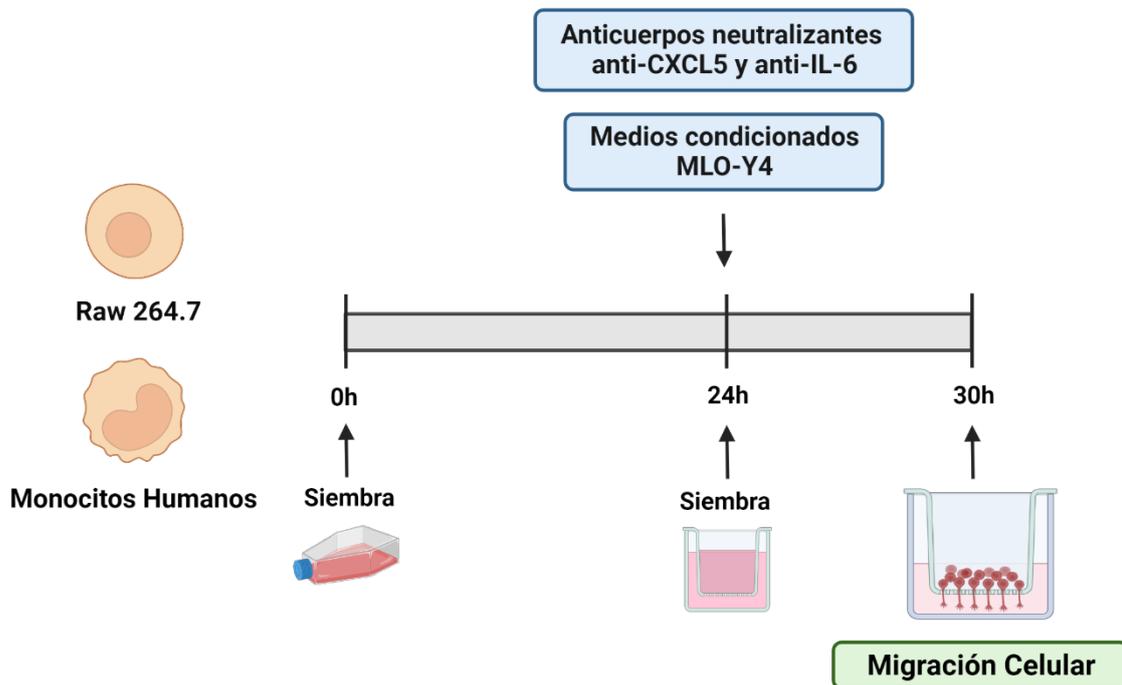


Figura 9. Esquema experimental de la migración celular realizada en la línea celular RAW 264.7 y en monocitos humanos extraídos de sangre periférica. CXCL5: Ligando 5 de quimioquina con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina 6. Imagen realizada con el software BioRender.

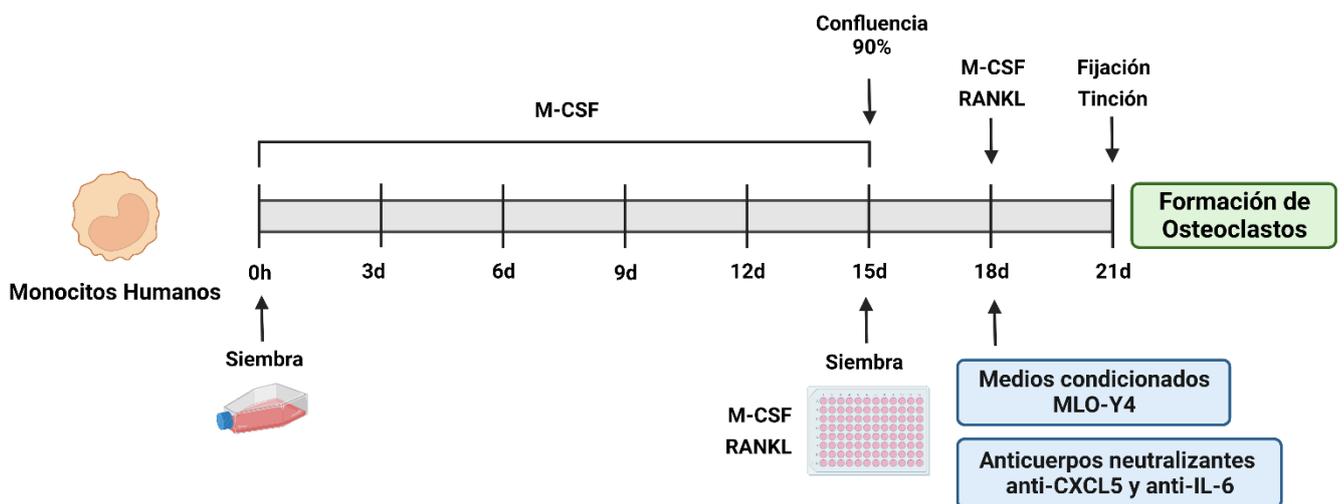


Figura 10. Diagrama experimental de la generación de osteoclastos para la evaluación de la osteoclastogénesis realizada a partir de monocitos humanos extraídos de sangre periférica. CXCL5: Ligando 5 de quimioquina con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina 6. Imagen realizada con el software BioRender.

## 2. Técnicas experimentales

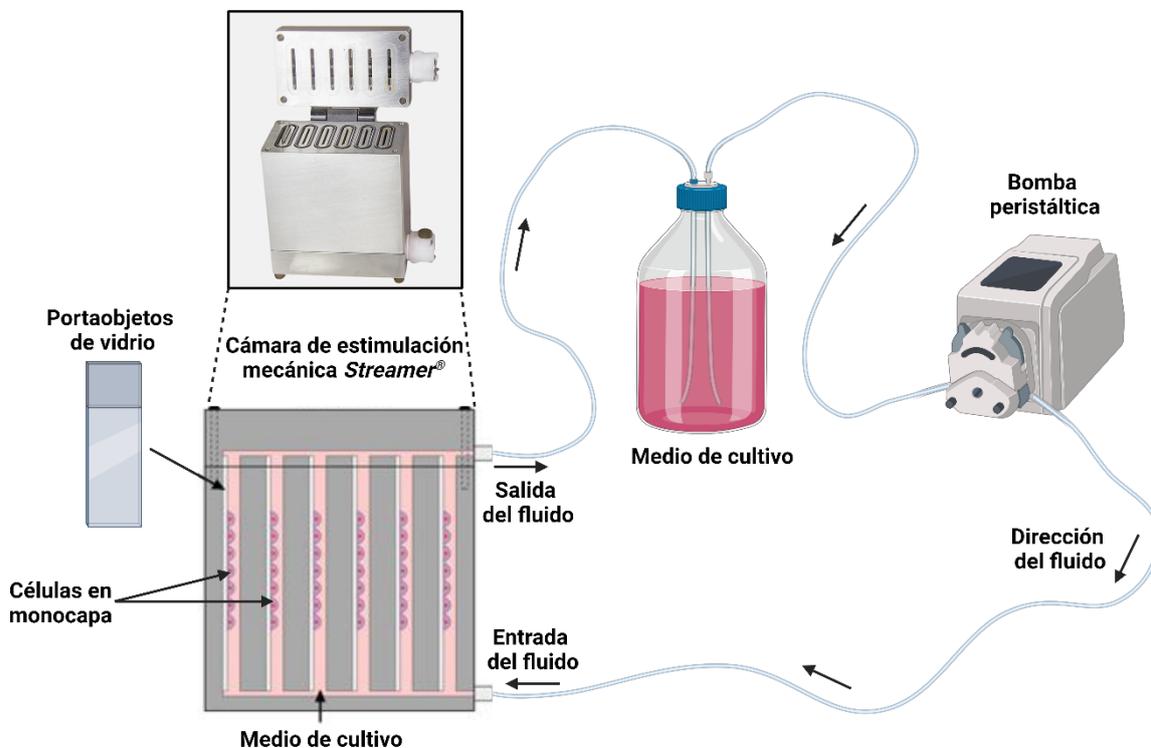
### 2.1. Estímulos: agonistas y antagonistas/inhibidores

Tabla 1. Relación de estímulos utilizados.

<b>Agonistas</b>			
<b>Reactivos</b>	<b>Descripción</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dosis</b>
PTHrP (1-37)	(rh) PTHrP N-terminal	Bachem	100 nM
<b>Antagonistas/Inhibidores</b>			
<b>Reactivos</b>	<b>Descripción</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dosis</b>
PTHrP (7-34)	Antagonista competitivo de PTH1R	Bachem	100 nM
Hidrato de cloral (HC)	Inhibidor de la formación del cilio primario	Sigma Aldrich	1 mM
2,2'-[[Dihidro-2-(4-piridinil)-1,3(2H,4H)-pirimidinediyl]bis(metilen)]bis[N,N-dimetilbenzenamina (GANT61)	Inhibidor antiproliferativo de la vía de señalización Hh	Santa Cruz Biotechnology	10 $\mu$ M
9-THF-Ade (SQ22536)	Inhibidor de ciclasa A que bloquea la liberación de AMPc	Santa Cruz Biotechnology	100 $\mu$ M
1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-metoxiestra1,3,5(10)-trieno-17-il]amino]hexil]-1H-pirrol2,5-diona (U73122)	Inhibidor de PLC	Santa Cruz Biotechnology	1 $\mu$ M

## 2.2. Estimulación mecánica mediante flujo de fluido (FF)

Las células MLO-Y4 fueron sembradas en portaobjetos de vidrio revestidos con una matriz de colágeno tipo I como se indica en el apartado 1.1. Tras 6 o 24 horas de incubación en medio de cultivo sin rojo fenol y con 1% de suero, los portaobjetos se introdujeron en una cámara hermética y metálica Flexcell Streamer® (Flexcell International Corp.), la cual formaba un circuito cerrado junto con una botella llena de medio de cultivo  $\alpha$ -MEM sin rojo fenol. Este medio fue bombeado sobre la monocapa celular en condiciones de esterilidad y de forma 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/cm<sup>2</sup>) y durante 10 minutos (Figura 11). La intensidad empleada para la estimulación se halla dentro del rango que se estima que experimentan las células óseas en situación fisiológica *in vivo* (117,302). 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 11. Esquema de la estimulación mecánica *in vitro* mediante el paso de fluido (medio de cultivo) sobre una monocapa celular de forma controlada.** Figura realizada con el software BioRender.

### 2.3. Transfecciones transitorias

Para la inducción específica de un silenciamiento génico transitorio, se emplearon distintas secuencias de siARN. Para ello, se sembraron 200.000 células MLO-Y4 en portaobjetos de vidrio o en placas P-100 recubiertas por colágeno tipo I, utilizando su medio de cultivo habitual con antibióticos y suplementado con SFB y SFT. Al día siguiente, se añadieron los siARNs específicos, empleando como agente de transfección lipofectamina RNAiMax (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) diluida en medio Optimem<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El agente de transfección se mantuvo en el cultivo durante 6 o 24 horas dependiendo del experimento. Pasado este tiempo se paró la transfección añadiendo más medio de cultivo o lavando con PBS 1X, respectivamente.

Para llevar a cabo el silenciamiento de *Iff88* y de *Pth1r*, 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, tanto del gen *Iff88* como del *Pth1r* de ratón, y generadas por la tecnología Ambion (Thermo Fisher Scientific, referencias 186729; 186730; 186731 para los siRNAs contra *Iff88*; y 151326; 68886; 68980 para los siRNAs contra *Pth1r*). Para el silenciamiento del gen *Cav-1*, 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.

Por otro lado, las células MLO-Y4 se transfectaron de manera transitoria con un plásmido portador de ADN complementario (ADNc) codificante para *PTH1R* humano fusionado con el gen reportero proteína fluorescente verde

(GFP) (*GFPPTH1R*), generosamente suministrado por el Dr. P. Friedman (Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, PA, EEUU) (303,304). Las células se sembraron como se indica en el apartado 1.1 y, al día siguiente, se transfectaron durante 4 horas a 37°C con 1 µg del plásmido *GFPPTH1R*, utilizando Lipofectamina 3000® (Life Technologies) diluida en Optimem® como agente de transfección, siguiendo las instrucciones del fabricante. Pasado este tiempo, se paró la transfección añadiendo más medio de cultivo, se privó a las células de suero durante 6 horas y se realizó el estímulo mecánico con FF o el estímulo con PTHrP (1-37). Finalmente, se fijaron las células y se continuó con el proceso de inmunofluorescencia.

#### **2.4. Inmunofluorescencia (IF)**

Las células se fijaron utilizando paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, pH 7,4, durante 10 minutos y, posteriormente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% en PBS, a pH 7,4 durante 5 minutos. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas, las células se incubaron durante 1 hora con albúmina de suero bovino (BSA) suplementado con un 5% de suero de cabra. A continuación, se incubaron con el anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-tubulina  $\alpha$ -acetilada (Sigma Aldrich), diluido 1:1000 en BSA 1X, durante toda la noche, a 4°C y en agitación. Al día siguiente, se realizaron varios lavados con PBS 1X y se añadió el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugado con Alexa fluor 546 (Invitrogen, Waltham, MA, EEUU), diluido 1/1000 en BSA 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron varios lavados con PBS 1X, y se llevó a cabo el montaje con el reactivo FluorSafe (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU). Las muestras se analizaron con el microscopio confocal Leica DMI8, evaluándose la colocalización entre el cilio primario y el receptor PTH1R en las células que había sido transfectadas con el plásmido *GFPPTH1R*, teniéndose en cuenta si la colocalización se había producido sólo en la base o a lo largo de todo el cilio primario. También se analizó la longitud del cilio primario, gracias al software ImageJ. Los anticuerpos utilizados y las condiciones de incubación se muestran en la Tabla 3.

## 2.5. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La extracción del ARN se realizó mediante un método estándar con Trizol® (Ambion, Foster City, CA, EEUU) 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 µg de ARN) para la obtención del ADNc empleando el ensayo *high capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Grand Island, NY), en un termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. Para la realización de la PCR en tiempo real se utilizó un sistema 7900HT Fast Real-Time PCT System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EEUU), usando una mezcla de reacción *Syber Premix Ex Taq polimerasa* (Takara, Otsu, Japón) y cebadores específicos no marcados para el gen de ratón *Cav-1*, empleando como gen constitutivo  $\beta$ -actina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*). De forma alternativa, se emplearon las sondas *Taqman MGB* para la detección de *Ift88* (Mm01313467; Thermo Fisher Scientific), *Pth1r* (Mm00441046; Thermo Fisher Scientific) y el gen constitutivo o *housekeeping 18S* (4318839; Assay-by-Design<sup>SM</sup>; Applied Biosystems). El protocolo realizado cuando se utilizaron 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 correspondiente control (según las condiciones experimentales), expresado como n-veces o 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 ( $\beta$ -actina, *Gapdh* o *18S*, según los casos). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados en la RT-qPCR

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
$\beta$ -actina	GAACCCTAAGGCCAACCGTG	ACCAGAGGCATACAGGGACAG
<i>Gapdh</i>	ACCATCATCCCTGCCTCTAC	CCTGTTGCTGTAGCCAAAT
<i>Cav-1</i>	CGACGACGTGGTCAAGAT	GTCGAAACTGTGTGCCCTTCTG
<i>Opg</i>	CAGAGCGAAACACAGTTTG	CACACAGGGTGACATCTATTC
<i>Rankl</i>	TGTACTTTTCGAGCGCAGATG	AGGCTTGTTTCATCCTCCTG
<i>Plau</i>	CGAATACTACAGGGAAGAC	GACATTTTCAGGTTCTTTGG
<i>Il-6</i>	ACCGCTATGAAGTTCCTCTCTGCA	AAGCCTCCGACTTGTGAAGTGTT
<i>Dkk3</i>	CGTCCTCTGAGGTGAACCTGGC	GTCTCGGGTGCATAGCATCTG
<i>InhbA</i>	ATCATCACCTTTGCCGAGTC	TCACTGCCTTCCTTGGAAT

## 2.6. Extracción de proteínas y análisis de inmunotransferencia (IT)

Para determinar las proteínas presentes en el MC, se añadió 100  $\mu$ l de TCA (ácido tricloroacético) por cada 500  $\mu$ l de muestra, se dejó 20 minutos en hielo, y posteriormente, se centrifugó a 13.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol frío y se centrifugó a 13.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Este proceso se repitió 4 veces y luego, se resuspendió con el tampón de carga 1X. En el caso del estudio de las proteínas intracelulares, se extrajo de las células MLO-Y4 la proteína total celular utilizando el *buffer* RIPA (Sigma Aldrich), suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail Set I; Calbiochem) y fosfatasas (Phosphatase inhibitor cocktail Set II; Calbiochem). Las células se mantuvieron en este *buffer* durante 30 minutos a 4°C, y posteriormente, se centrifugaron a 12.000 g durante 20 minutos y 4°C, 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 BSA como estándar. Después, se prepararon extractos proteicos (de entre 15 y 20 µg) que fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10-15% en presencia de sulfato de dodecilo sódico (SDS) y en condiciones reductoras. A continuación, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) mediante un sistema húmedo, a 100 V y 4°C durante 30 minutos. Estas membranas fueron bloqueadas empleando leche desnatada al 5% en tampón tris salino (TBS; 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-MCP1, anti-HMGB1 y anti-RANTES (1:1000, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como control de carga, se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\alpha$ -tubulina (1:10000, Abcam). Al día siguiente, se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgGs de ratón o conejo conjugados con peroxidasa (HRP) (1:5000, 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 utilizados y las condiciones de incubación se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Relación de anticuerpos y condiciones experimentales realizadas en la inmunotransferencia (IT) y en la inmunofluorescencia (IF)**

Antígeno	Anticuerpo primario	Incubación	Anticuerpo secundario	Incubación
<b><math>\alpha</math>-tubulina (IT)</b>	Monoclonal de ratón (Abcam) [1:10000]	T/N 4°C	IgG de conejo anti-ratón-HRP (Abcam) [1:5000]	1h, T/A
<b>MCP-1 (IT)</b>	Policlonal de conejo (Abcam) [1:1000]		IgG de cabra anti-conejo-HRP (Abcam) [1:5000]	
<b>HMGB1 (IT)</b>	Policlonal de conejo (Abcam) [1:1000]		IgG de cabra anti-conejo-HRP (Abcam) [1:5000]	
<b>RANTES (IT)</b>	Policlonal de conejo (Abcam) [1:1000]		IgG de cabra anti-conejo-HRP (Abcam) [1:5000]	
<b>Tubulina <math>\alpha</math> acetilada (IF)</b>	Monoclonal de ratón (Sigma Aldrich) [1:1000]	T/N 4°C	IgG de cabra anti-ratón AlexaFluor 546 (Invitrogen) [1:1000]	1h, T/A

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

## 2.7. Análisis proteómico

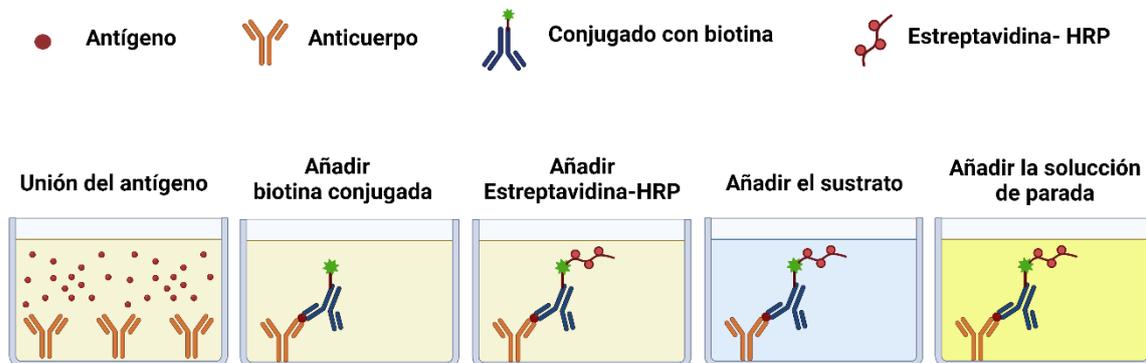
Los MC obtenidos de las células MLO-Y4, en las cuales se llevó a cabo el silenciamiento del receptor PTH1R además de estimularse mecánicamente o mantenerse en condiciones estáticas, se analizó mediante proteómica de etiqueta de masa en tándem (TMT). Las proteínas secretadas por los osteocitos en estas condiciones fueron relativamente cuantificadas y comparadas en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). La digestión en gel se realizó como previamente había descrito la Dra. Moreno (305). El marcaje TMT y el fraccionamiento a elevado pH se llevó a cabo de la siguiente forma: la mezcla de péptidos procedentes de la digestión triptica de proteínas desaladas (50  $\mu$ g) se marcó utilizando productos químicos del *TMT reagent sixplex Isobaric Mass Tagging Kit* (reactivos 126, 127, 128 y 129) (Thermo Fisher Scientific), como se describe en las instrucciones del fabricante. Los péptidos fueron disueltos en 50  $\mu$ l de bicarbonato de trietilamonio 100 mM ajustado a un pH 8. Para el marcaje, cada reactivo TMT se disolvió en 41  $\mu$ l de acetonitrilo y se añadió a la mezcla de

péptidos correspondiente. A continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. El marcaje se paró cuando se añadió 8  $\mu$ l de hidroxilamina al 5%. Los sobrenadantes se secaron y las muestras se mezclaron para obtener la "mezcla marcada con 4plex". La mezcla fue analizada mediante cromatografía líquida en fase reversa y espectrometría de masas en tándem (RPLC-MS/MS) para comprobar la eficiencia del marcaje. Posteriormente, la muestra se fraccionó utilizando el kit de fraccionamiento de péptidos en fase reversa de alto pH (Pierce), tal y como se ha descrito con pequeñas modificaciones. A la muestra se le añadió ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y, más tarde, se cargó en una columna de fraccionamiento de fase reversa, equilibrada y de elevado pH. Luego, se aplicó a las columnas un gradiente escalonado de concentraciones crecientes de acetonitrilo en una solución volátil de pH elevado para eluir los péptidos unidos en nueve fracciones diferentes (5-80% de acetonitrilo) recogidas por centrifugación. Las fracciones obtenidas de la mezcla marcada con 4plex en fase reversa y elevado pH se secaron y almacenaron hasta su análisis por espectrometría de masas para su posterior cuantificación. El análisis cuantitativo se realizó por cromatografía líquida de fase reversa y espectrometría de masas en tándem como previamente describió la Dra. Alonso (306). La identificación de péptidos a partir de los datos brutos se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda PEAKS Studio X (Bioinformatics Solutions Inc.). La búsqueda en la base de datos se realizó a partir de uniprot-Mus musculus.fas

## 2.8. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Las células MLO-Y4 en las que se midió la producción de citoquinas; se cultivaron en su medio habitual y al día siguiente, se añadió medio fresco al 1% de SFB. Tras 24 horas, se sometieron o no (control estático) a estimulación mecánica por FF y se incubaron durante 18 horas más en  $\alpha$ -MEM sin suero y sin rojo fenol. Los MC se recogieron y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. Las citoquinas para analizar en estos MC fueron el ligando 5 de quimioquina con motivo C-X-C (CXCL5) y la IL-6 mediante la utilización de ELISAs específicos (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 12). La absorbancia óptica de

cada pocillo se midió en un lector de ELISAs (Varioskan Lux; Thermo Fisher Scientific) a 450 nm. La sensibilidad del ensayo fue 35 pg/ml para CXCL5 y 6,5 pg/ml para IL-6, y el coeficiente de variación entre ensayos fue menor del 12%.



**Figura 12. Diagrama experimental del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).** HRP: peroxidasa. Figura realizada con el software BioRender.

## 2.9. Ensayos de migración celular

Los ensayos de migración se realizaron utilizando pocillos de tipo *Transwell*<sup>®</sup> (Corning Costar) con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m. Cada *Transwell*<sup>®</sup> es depositado en un pocillo de una placa P-24. Las células de ratón RAW 264.7 y los monocitos humanos obtenidos de la capa leucocitaria, se sembraron en la parte superior a una densidad de 50.000 células con su medio habitual. Mientras que, en el pocillo de la P-24 se añadió un 80% de medio  $\alpha$ -MEM sin rojo fenol al 1,25% de suero más un 20% de los MC de las células MLO-Y4. Además, en algunos experimentos, también se añadió anticuerpos neutralizantes; 2  $\mu$ g/mL de anti-CXCL5 (Thermo Fisher Scientific) y 1  $\mu$ g/ml de anti-IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU). Tras 6 horas de incubación a 37°C se evaluó la capacidad migratoria de las células a través de la membrana; para ello, se eliminó el medio y las células de la cara superior de la membrana, fijando las que habían migrado a la capa inferior con PFA al 4% durante 10 minutos. Tras varios lavados con PBS 1X, las células fueron teñidas con cristal violeta (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos. Posteriormente, se tomaron imágenes y se realizaron contajes de células en 5 campos diferentes con un aumento de X200, usando el

microscopio Leica DM 5500B, y empleando el software ImageJ para los contajes celulares.

## **2.10. Generación de osteoclastos para la evaluación de la osteoclastogénesis**

Los monocitos humanos obtenidos del aislamiento de la capa leucocitaria fueron utilizados para el ensayo de diferenciación hacia osteoclastos. Una vez que alcanzaron el 90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con PBS 1X y se llevó a cabo la tripsinización (en 0,25% v/v de tripsina y 1mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) durante 30 minutos, utilizando un rascador celular. Para el ensayo de diferenciación, se sembraron 20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con el medio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado con un 10% de SFT, 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, además de 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL (ProSpec). Los controles fueron cultivados con el mismo medio de cultivo, pero sin RANKL. Pasados tres días, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco sin rojo fenol, conteniendo M-CSF y RANKL, según correspondiera, y añadiéndose además un 20% de los distintos MC de las células MLO-Y4. A los controles se le añadió un 20% de medio  $\alpha$ -MEM sin SFT. Además, en algunos experimentos, también se añadieron anticuerpos neutralizantes; 2  $\mu$ g/mL de anti-CXCL5 y 1  $\mu$ g/ml de anti-IL-6. Los monocitos humanos estuvieron en contacto con los MC de las MLO-Y4 durante tres días. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X para eliminar las células no adherentes. Las células fueron fijadas con PFA al 4% durante 10 minutos, permeabilizadas con metanol al 100% durante 20 minutos, y teñidas con hematoxilina durante 5 minutos. La diferenciación de los monocitos humanos hacia osteoclastos se determinó por la morfología de las células obtenidas, observándose la formación de células gigantes con tres o más núcleos. Las imágenes fueron realizadas gracias al microscopio Leica DMI1 evaluándose el número de células osteoclásticas con tres o más núcleos empleando el software ImageJ.

### **2.11. Análisis estadístico**

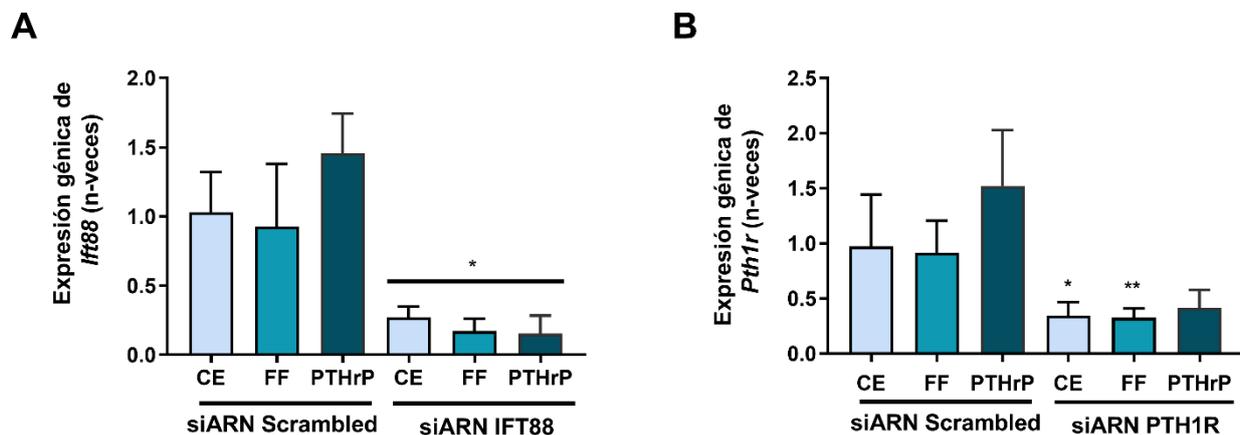
Los resultados de esta Tesis están expresados como las medias  $\pm$  desviaciones estándar (DE). En primer lugar, los datos obtenidos experimentalmente fueron sometidos a una prueba de normalidad y homocedasticidad. Dado que no podía asumirse la distribución normal de los datos, el análisis se llevó a cabo mediante un ANOVA no paramétrico de la varianza (Kruskal-Wallis). La prueba post-hoc realizada para la comparación de los diferentes grupos dos a dos fue el test 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).

# ***Resultados***



## 1. Estudio del efecto del secretoma de células osteocíticas estimuladas mecánicamente sobre la migración y la diferenciación de preosteoclastos

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue determinar los posibles efectos del secretoma de los osteocitos estimulados tanto mecánicamente con flujo de fluido (FF) como con PTHrP (1-37) sobre la migración y diferenciación de precursores monocíticos. Para determinar si el cilio primario y el receptor PTH1R estaban implicados en la regulación de ambos procesos y evaluar su papel, se inhibió la formación del cilio primario en las células osteocíticas antes de la estimulación con FF o PTHrP utilizando dos estrategias; silenciando *Ift88*, el cual es necesario para la ciliogénesis y para la capacidad funcional del cilio primario (307) o preincubando con hidrato de cloral, un inhibidor del cilio primario (308). También se inhibió el receptor PTH1R silenciando su gen, o utilizando el antagonista competitivo del receptor PTH1R, PTHrP (7-34). La eficacia del silenciamiento de *Ift88* y de *Pth1r* se confirmó mediante la evaluación del ARN en osteocitos MLO-Y4. Observamos una disminución de aproximadamente el 60% de la expresión génica de ambos marcadores, en comparación con las células transfectadas con silenciadores

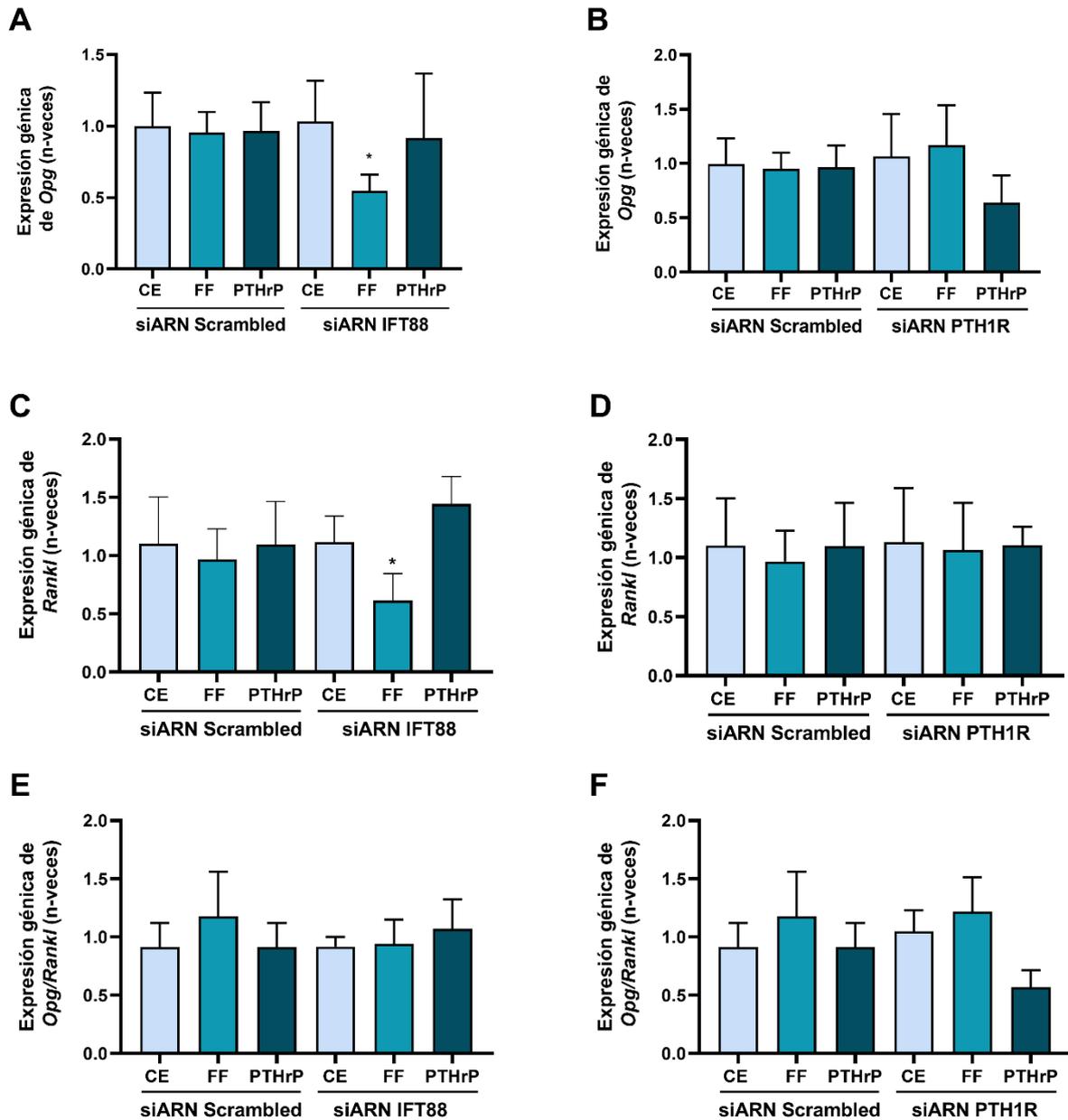


**Figura 13. Comprobación de la eficiencia del silenciamiento de *Ift88* y de *Pth1r* mediante PCR a tiempo real.** Las células osteocíticas MLO-Y4 fueron silenciadas con tres siARNs dirigidos contra *Ift88* (A), contra *Pth1r* (B) y con siARN *Scrambled* para el caso de los controles en ambos silenciamientos, durante 24 horas tal y como se indica en la figura 6A. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs siARN *scrambled* correspondiente; \*\* $p < 0.01$  vs siARN *scrambled* correspondiente. siARN: ARN de interferencia pequeño CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; IFT88: proteína 88 de transporte intraflagelar; DE: desviación estándar.

para la 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) (Figura 13A y B).

Posteriormente, se analizó el papel del cilio primario y del receptor PTH1R en la modulación de genes implicados en la formación y el remodelado óseo. Se analizaron mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión de ARNm de los siguientes genes: *Rankl*, un factor implicado en la inducción de la diferenciación y la activación de los osteoclastos y su receptor señuelo soluble *Opg*, el cual bloquea los efectos de RANKL (309).

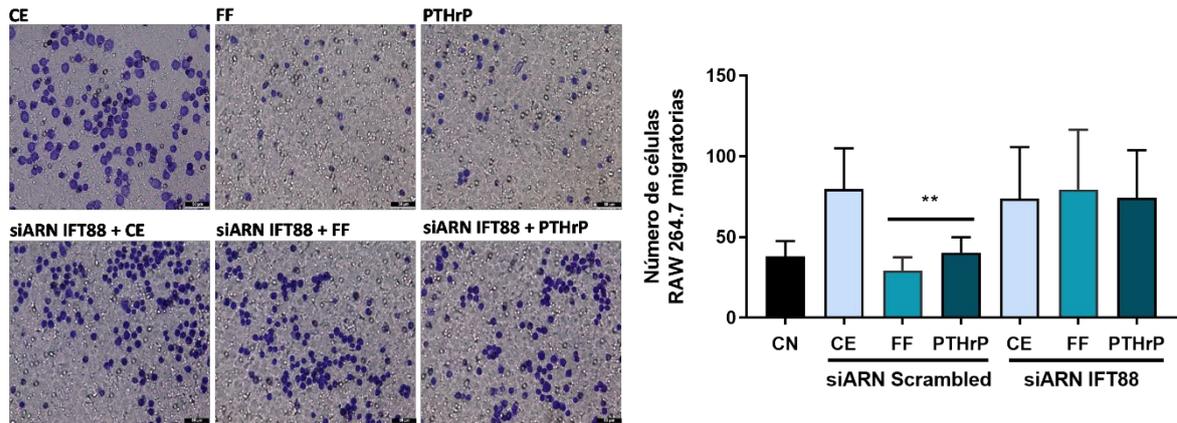
En las células MLO-Y4, la expresión génica de los marcadores mencionados anteriormente no experimentó cambios significativos en ninguna de las condiciones de estímulo estudiadas respecto al control. En cambio, el silenciamiento de *Iff88* disminuyó significativamente la expresión de *Opg* (Figura 14A) y *Rankl* (Figura 14C) cuando las células MLO-Y4 se estimularon con FF.



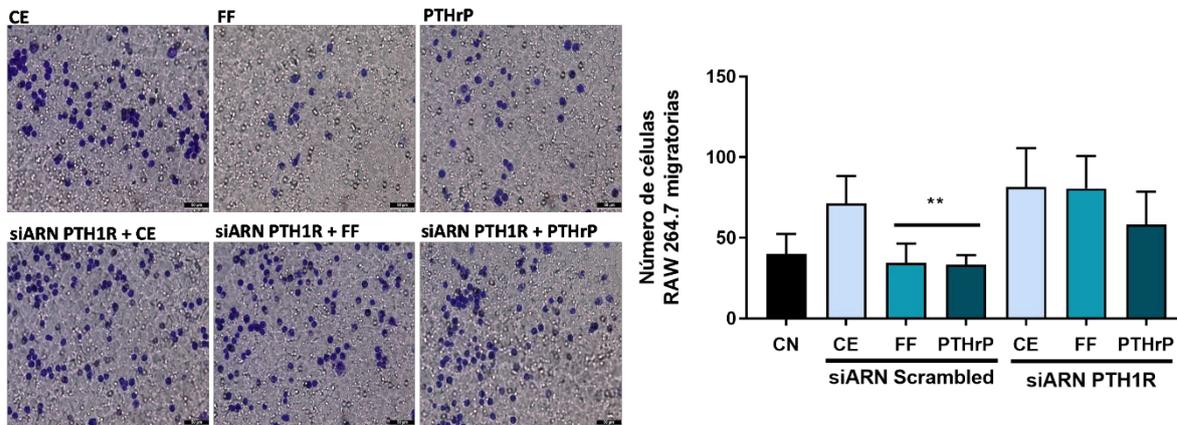
**Figura 14.** Análisis de genes implicados en la formación y el remodelado óseo en presencia y ausencia del cilio primario y del receptor PTH1R. Las células osteocíticas MLO-Y4 fueron transfectadas con una mezcla de tres siARNs dirigidos contra secuencias específicas del gen *Ift88* y contra *Pth1r*, o con siARN *Scrambled* durante 24 horas. Después fueron sometidas a 24 horas de privación de suero, seguidas de estimulación con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. A las 18 horas se recogió el ARN. Los niveles de expresión de ARNm de *Opg* (A-B) y *Rankl* (C-D), así como la relación *Opg/Rankl* (E-F), fueron analizados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs siARN *scrambled* correspondiente. siARN: ARN de interferencia pequeño CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; IFT88: proteína 88 de transporte intraflagelar; DE: desviación estándar.

Una vez llevado a cabo el silenciamiento del cilio y del receptor PTH1R y tras la estimulación por FF o PTHrP, se obtuvo medio condicionado (MC) de las células osteocíticas MLO-Y4 para utilizarlo en ensayos de migración y de diferenciación de osteoclastos. La migración de la línea celular de monocitos murinos RAW 264.7 se vio drásticamente inhibida por el MC de las células MLO-Y4 estimuladas por FF o PTHrP en comparación con la migración inducida por el MC de osteocitos en condiciones estáticas (Figura 15A y B). Por el contrario, los MC de osteocitos silenciados con *Iff88* o *Pth1r* y estimulados con FF o PTHrP no mostraron efectos inhibitorios sobre la migración de los monocitos (Figura 15A y B). Del mismo modo, el MC de osteocitos estimulados por FF o PTHrP no fue capaz de disminuir la migración de células monocíticas murinas (Figura 16A) o humanas (Figura 16B) cuando los osteocitos fueron preincubados con el inhibidor del cilio primario (hidrato de cloral) o con el inhibidor de PTH1R (PTHrP (7-34)).

A

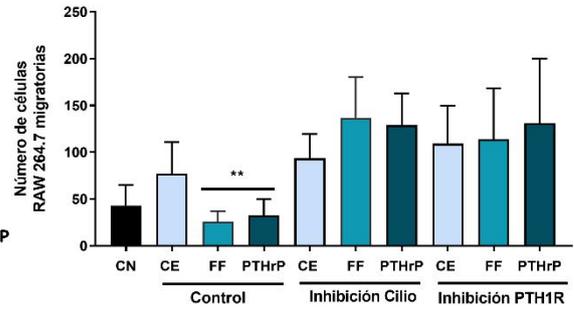
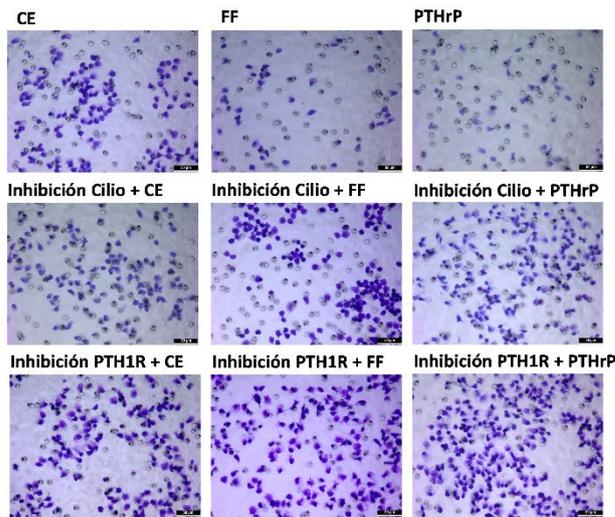


B

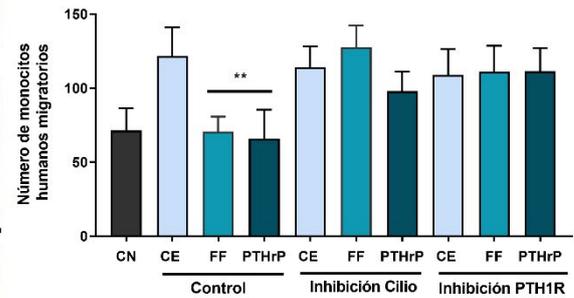
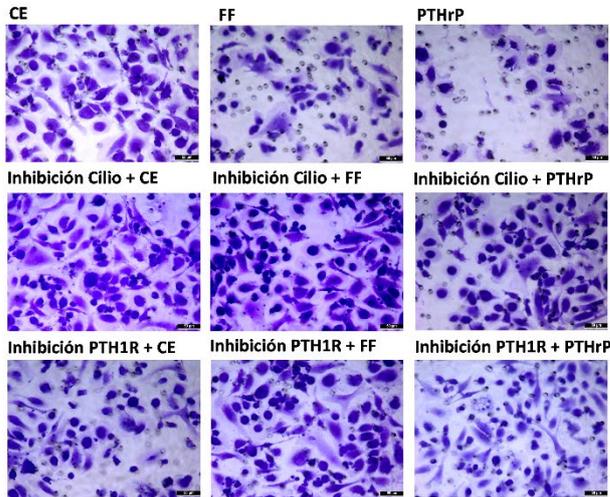


**Figura 15.** El MC de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente inhibe la migración de monocitos murinos por un mecanismo dependiente del cilio primario y de PTH1R. Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con tres siARNs *Ift88* (A), tres siARNs *Pth1r* (B) o con un siARN codificado durante 24 h, seguido de privación de suero durante otras 24 h. Posteriormente, las células se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h. Para evaluar el número de células migratorias, se cultivaron células RAW 264.7 en pocillos de tipo *Transwell* con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m. En el compartimento inferior se añadió un 20% de MC de las condiciones de estudio, extraídos de las células MLO-Y4. Tras 6 h, se fijaron las células, se tiñeron con cristal violeta y se contaron con un microscopio óptico invertido. Se representa el número de células monocíticas evaluadas con el software ImageJ (A-B). Los resultados son la media  $\pm$  DE de 2 experimentos por triplicado. \*\* $p < 0,01$  vs a CE o siARN IFT88/PTH1R correspondiente. MC: medio condicionado; siARN: ARN de interferencia pequeño; CN: control negativo; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH ; IFT88: proteína 88 de transporte intraflagelar; DE: desviación estándar.

A



B



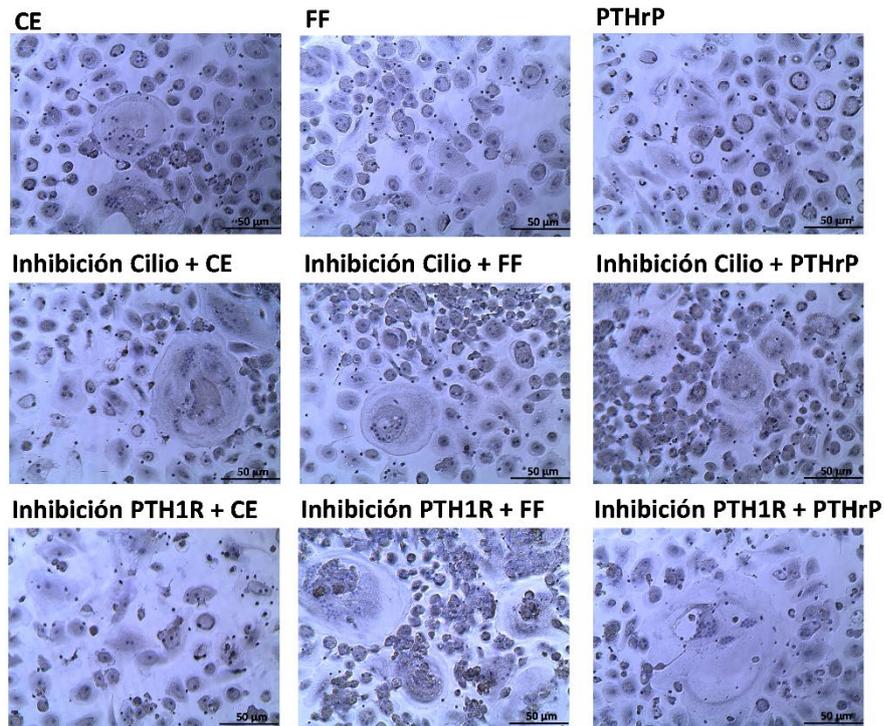
**Figura 16.** El MC de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente inhibe la migración de monocitos por un mecanismo dependiente del cilio primario y de PTH1R. Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 horas y, posteriormente se les trató con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 hora. Luego, las células se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h. Para evaluar el número de células migratorias, se cultivaron células RAW 264.7 (A) o células monocíticas humanas obtenidas de la capa leucocitaria (B) en pocillos de tipo *Transwell* con un tamaño de poro de 8 µm. En el compartimento inferior se añadió un 20% de MC de las condiciones de estudio, extraídos de las células MLO-Y4. Tras 6 h, se fijaron las células, se tiñeron con cristal violeta y se contaron con un microscopio óptico invertido. Se representa el número de células monocíticas evaluadas con el software ImageJ (A-B). Los resultados son la media ± DE de 2 experimentos por triplicado. \*\*p<0,01 vs a CE o inhibición del cilio o PTH1R correspondiente. MC: medio condicionado; CN: control negativo; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; DE: desviación estándar.

Estos datos demuestran que el secretoma de los osteocitos estimulados por FF o PTHrP, mediante un mecanismo dependiente del cilio primario y de PTH1R, inhibe la migración de células monocíticas murinas RAW 264.7 y humanas.

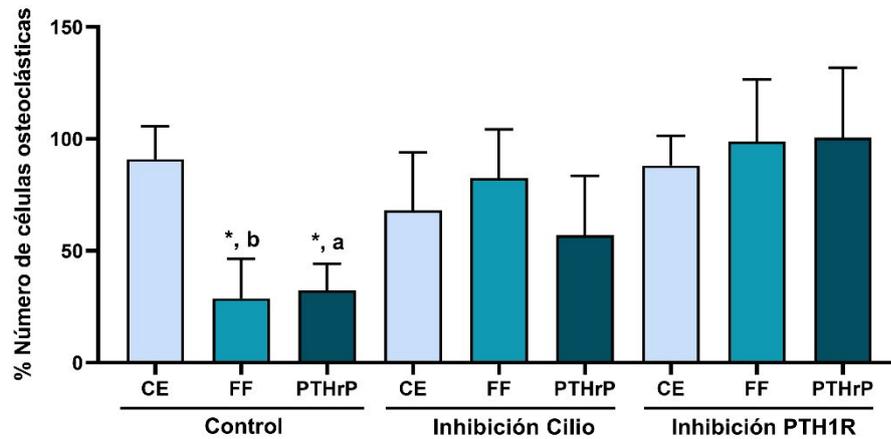
A continuación, se evaluó las acciones del cilio primario y de PTH1R en osteocitos sobre la diferenciación de los osteoclastos. Se observó que el MC obtenido a partir de los osteocitos estimulados por FF o PTHrP, disminuyó el porcentaje de monocitos humanos que en presencia de citoquinas osteoclastogénicas, se diferenciaban a osteoclastos (observados como células gigantes con al menos 3 o más núcleos) en comparación con el MC de control estático (Figura 17A y B). Por otro lado, el MC de los osteocitos MLO-Y4 en los que se inhibió el cilio primario o PTH1R mostró un porcentaje de osteoclastogénesis que se asemejaba al del MC de osteocitos en condiciones estáticas. Estas acciones se observaron incluso si los osteocitos eran estimulados por FF o PTHrP (Figura 17A y B).

Por lo tanto, estos resultados indican que el secretoma de los osteocitos estimulados mecánicamente y con PTHrP inhibe el proceso osteoclastogénico de los monocitos humanos a través de un mecanismo dependiente de PTH1R y del cilio primario.

A



B



**Figura 17.** El secretoma de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente y estimuladas con PTHrP reduce la diferenciación de monocitos humanos hacia osteoclastos mediante un mecanismo dependiente del cilio primario y de PTH1R. Las células MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h, se trataron con 1 mM de hidrato de cloral o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h y se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió tras 18 h. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes medios condicionados de las células MLO-Y4 al 20 %. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. La diferenciación de los monocitos humanos a osteoclastos se determinó mediante la evaluación de la morfología, observando la formación de células gigantes (≥ 50 µm) con al menos 3 o más núcleos. (A) Se

muestran imágenes representativas de cada condición. (B) Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el software ImageJ. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  vs CE; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs inhibición correspondiente de PTH1R; <sup>b</sup> $p < 0,01$  vs inhibición correspondiente del cilio o PTH1R. MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CN: control negativo (-) RANKL y (+) medio  $\alpha$ -MEM; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; DE: desviación estándar.

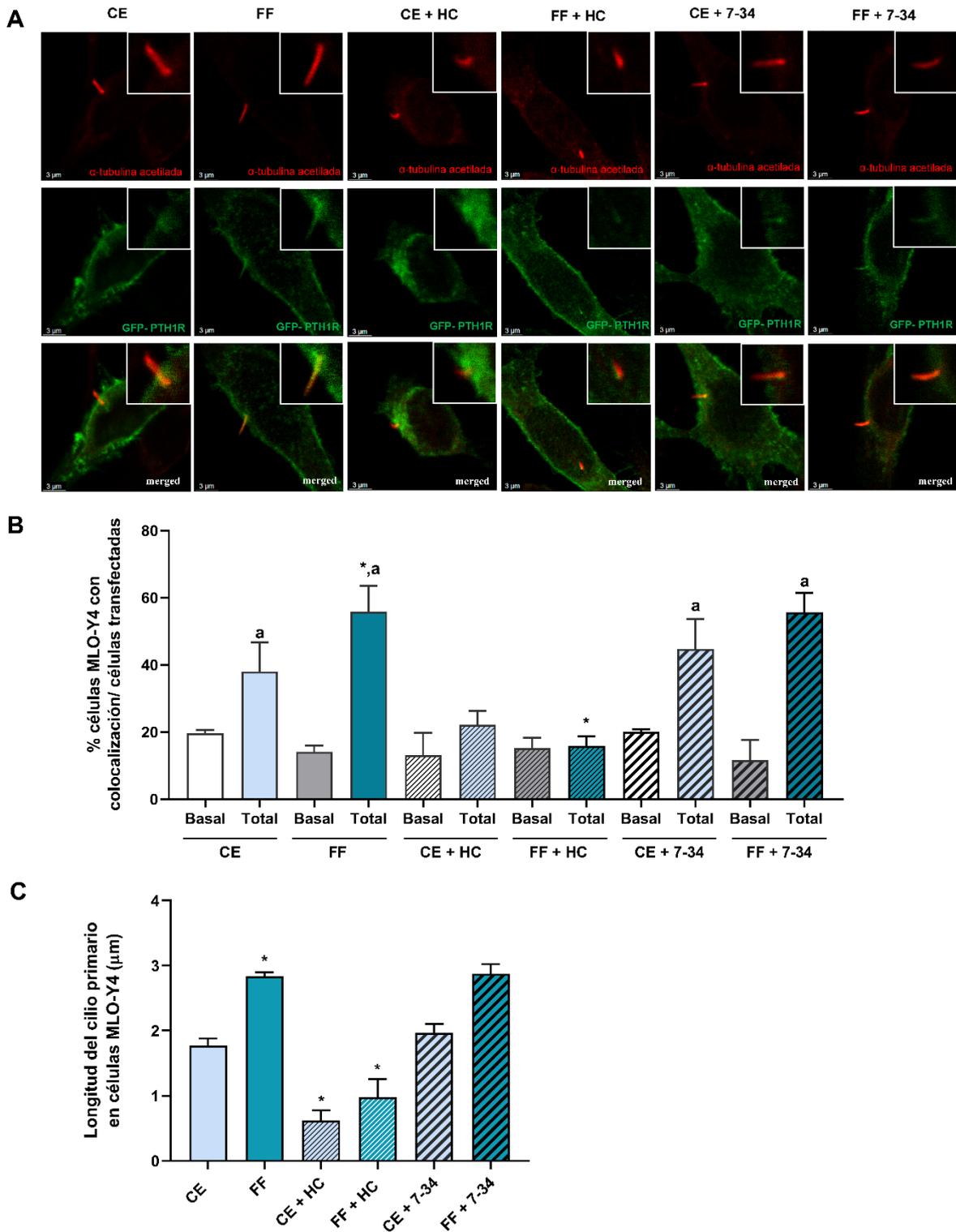
## 2. Localización del receptor PTH1R en el cilio primario de osteocitos estimulados mecánicamente

Otro de los objetivos de la Tesis Doctoral fue comprobar la posible colocalización entre el cilio primario y PTH1R en células osteocíticas MLO-Y4 y si esta pudiera afectar a las funciones de ambos mecanosensores. Las células MLO-Y4 fueron transfectadas con el plásmido *GFPPTH1R* y se mantuvieron en estado quiescente, ya que el cilio primario aparece durante la fase  $G_0$  del ciclo celular (310). Una hora antes de llevar a cabo el estímulo mecánico con FF, se realizó la inhibición del cilio primario con hidrato de cloral o la inhibición del receptor PTH1R, con PTHrP (7-34). Finalmente, se fijaron las células y se continuó con el proceso de inmunofluorescencia para el estudio de la posible colocalización. El marcaje del cilio primario se realizó con el anticuerpo anti-tubulina  $\alpha$  acetilada. La acetilación de esta proteína es esencial para el ensamblaje y la elongación del cilio primario (311).

Así, se observó mediante microscopía confocal que PTH1R colocalizaba con el cilio primario en las células MLO-Y4. En condiciones estáticas, el 58% de las células osteocíticas ciliadas mostraban cierta colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De ésta sólo el 38% de las células mostraban colocalización a lo largo de todo el cilio primario, mientras que el 20% mostraba colocalización sólo en la base del cilio. Sin embargo, tras la estimulación con FF, aumentó de manera significativa la presencia de PTH1R a lo largo de todo el cilio primario (el 70% de las células osteocíticas ciliadas manifestaron colocalización entre PTH1R y el cilio primario; de este porcentaje el 56% de las células ciliadas mostraron localización de PTH1R en toda la extensión del cilio, mientras que el 14% mostraron colocalización sólo en la base del cilio) (Figura 18A y B). El



pretratamiento con HC anuló la formación del cilio primario, así como la movilización de PTH1R hacia él, mientras que PTHrP (7-34) no afectó a la movilización del PTH1R (Figura 18A y B). En condiciones estáticas e inhibición con PTHrP (7-34), el 65% de las células osteocíticas ciliadas mostraban cierta colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De ésta sólo el 45% de las células mostraron colocalización a lo largo de todo el cilio primario, mientras que el 20% presentaron colocalización sólo en la base del cilio. Cuando se estimulaba con FF, el 68% de las células osteocíticas ciliadas manifestaron colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De este porcentaje el 56% de las células ciliadas mostraron localización de PTH1R en toda la extensión del cilio, mientras que el 12% presentaron colocalización sólo en la base del cilio (Figura 18A y B). Además, la estimulación con PTHrP (1-37) también indujo cambios en la colocalización de PTH1R en el cilio primario con respecto al basal: el 79% de las células osteocíticas ciliadas mostraron cierta colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De ésta sólo el 50% de las células mostraban colocalización a lo largo de todo el cilio primario, mientras que el 29% mostraba colocalización sólo en la base del cilio. (Figura 19A y B).

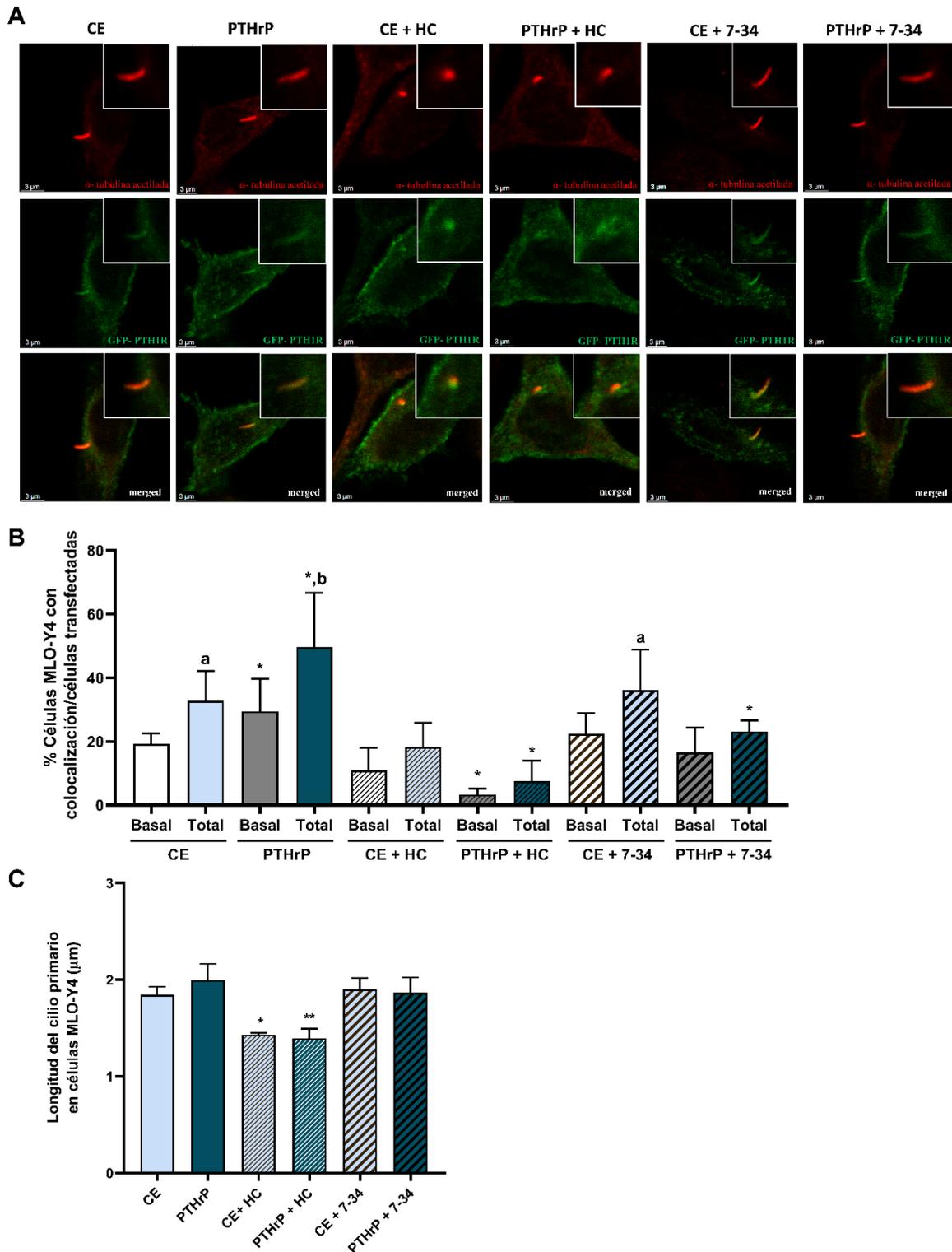


**Figura 18.** PTH1R colocaliza con el cilio primario en células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente, distribuyéndose por todo el cilio. Se transfectaron células MLO-Y4 con 1 µg del plásmido *GFP-PTH1R* utilizando lipofectamina 3000 durante 4 h a 37°C. Posteriormente, las células se privaron de suero durante 6 h, se trataron con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h y se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 min. Para evaluar

la colocalización de PTH1R con el cilio primario, las células se fijaron, permeabilizaron, bloquearon e incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-tubulina  $\alpha$ -acetilada de ratón. A continuación, las células se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con Alexa fluor 546. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). El porcentaje de células con colocalización de PTH1R justo en la base (basal) y en todo el cilio primario (total) se analizó en cada condición en células MLO-Y4 transfectadas con el plásmido *GFP-PTH1R* (B). Se representa la evaluación de la longitud del cilio primario en células MLO-Y4 utilizando el software ImageJ (C). Los resultados son la media  $\pm$  DE de triplicados. \* $p < 0,05$  vs CE o el control correspondiente; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs condición basal correspondiente. CE: control estático; FF: flujo de fluido; HC: hidrato de cloral; 7-34: PTHrP (7-34); *GFP-PTH1R*: proteína verde fluorescente-PTH1R; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; IgG: inmunoglobulina G; DE: desviación estándar.

Además, la longitud del cilio primario aumentó en los osteocitos estimulados mecánicamente en comparación con la longitud de los cilios de los osteocitos en condiciones estáticas (Figura 18C). Hecho que no se vio cuando se estimuló con PTHrP (1-37) (Figura 19C). De nuevo, este efecto fue inhibido por el pretratamiento con HC pero no se vio afectado por el antagonista de PTH1R, la PTHrP (7-34) (Figura 18C y 19C).

Estos resultados demuestran que el estímulo mecánico con FF elonga el cilio primario de los osteocitos. Además, tanto el estímulo mecánico con FF como el estímulo con PTHrP (1-37) desencadenan una movilización significativa de PTH1R a lo largo del cilio primario en estas células.

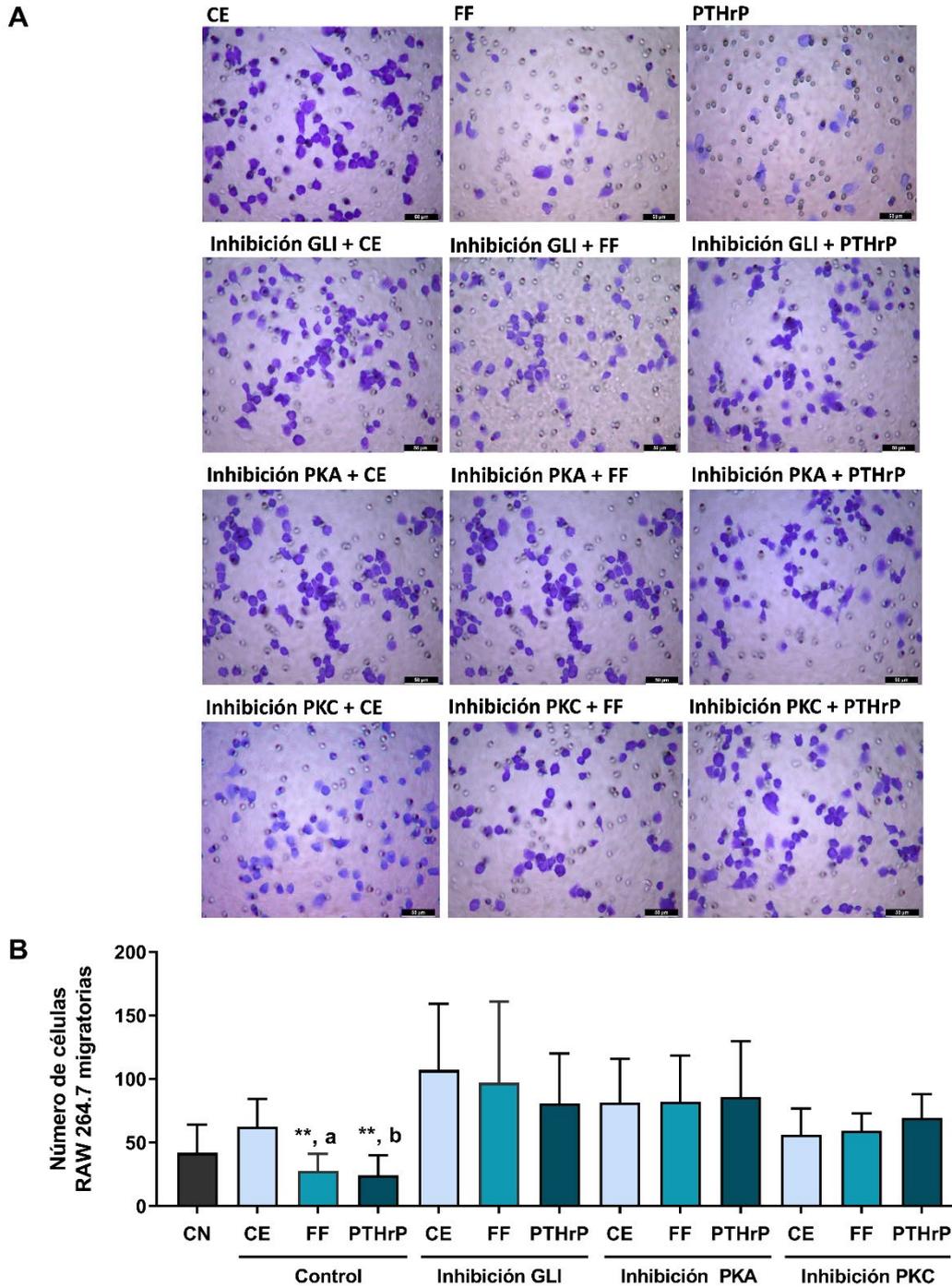


**Figura 19.** PTH1R colocaliza con el cilio primario en células MLO-Y4 estimuladas con PTHrP (1-37). Se transfectaron células MLO-Y4 con 1  $\mu$ g del plásmido *GFP-PTH1R* utilizando lipofectamina 3000 durante 4 h a 37°C. Posteriormente, las células se privaron de suero durante 6 h, se trataron

con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h y se estimularon con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 min. Para evaluar la colocalización de PTH1R con el cilio primario, las células se fijaron, permeabilizaron, bloquearon e incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-tubulina  $\alpha$ -acetilada de ratón. A continuación, las células se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con Alexa fluor 546. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). El porcentaje de células con colocalización de PTH1R justo en la base (basal) y en todo el cilio primario (total) se analizó en cada condición en células MLO-Y4 transfectadas con el plásmido *GFP-PTH1R* (B). Se representa la evaluación de la longitud del cilio primario en células MLO-Y4 utilizando el software ImageJ (C). Los resultados son la media  $\pm$  DE de triplicados. \* $p < 0,05$  vs control correspondiente; \*\* $p < 0,01$  vs control correspondiente; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs condición basal correspondiente; <sup>b</sup> $p < 0,001$  vs condición basal correspondiente. CE: control estático; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; HC: hidrato de cloral; 7-34: PTHrP (7-34); *GFP-PTH1R*: proteína verde fluorescente-PTH1R; PTH1R: receptor de tipo 1 de la PTH; IgG: inmunoglobulina G; DE: desviación estándar.

### **3. Implicación de las vías *Hedgehog*, PKA y PKC en la regulación osteocítica de la migración de monocitos y de la osteoclastogénesis**

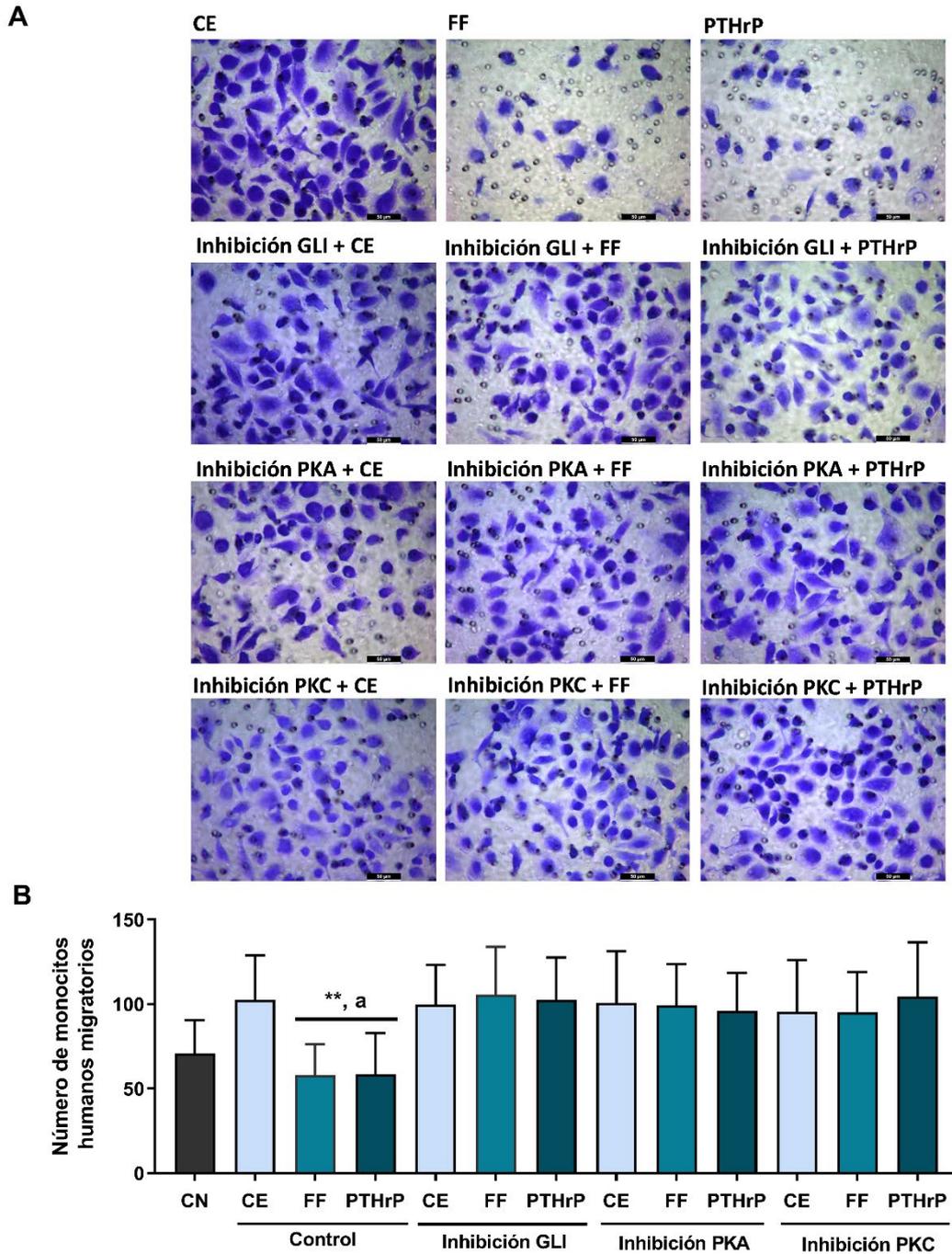
Las acciones del PTH1R sobre las células óseas se han asociado a diferentes vías de señalización, incluyendo la sobreexpresión del factor de transcripción GLI (226), y la activación de la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC) (135). Para estudiar las vías de señalización implicadas en la regulación de la migración y la diferenciación hacia osteoclastos, se llevó a cabo la inhibición de las vías de señalización PKA, PKC o *hedgehog* en osteocitos, además de estimularlos mecánicamente con FF o con PTHrP (1-37), como se describe previamente. A continuación, se procedió a la obtención del MC para determinar cómo afecta a la migración de la línea celular de monocitos murinos RAW 264.7 (Figura 20A y B) y a las células monocíticas humanas (Figura 21A y B). El pretratamiento de los osteocitos con GANT61, SQ22536 y U73122 (inhibidores de GLI, PKA y PKC, respectivamente) revirtió la inhibición de la migración inducida por FF o PTHrP (Figura 20A y B). Se observó un efecto similar sobre la migración de monocitos humanos (Figura 21A y B).



**Figura 20.** Las vías de señalización *hegdehog*, PKA y PKC intervienen en la regulación de la migración de monocitos murinos dependiente del MC obtenido de células MLO-Y4. Las células osteocíticas fueron privadas de suero durante 24 h y tratadas con 10  $\mu$ M de GANT61, 100  $\mu$ M del inhibidor del adenilato ciclasa SQ22536 o con 1  $\mu$ M del inhibidor de la fosfolipasa C U73122 durante 1h. Posteriormente, las células se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 min. El MC se recogió al cabo de 18 h. Para evaluar el número de células migratorias, se cultivaron células RAW 264.7 en pocillos de tipo *Transwell* con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m, y en el compartimento inferior se añadió un 20% de cada medio condicionado obtenido de las células MLO-Y4. Tras 6 h de migración, las células fueron fijadas,



se tiñeron con cristal violeta y se contaron con un microscopio óptico invertido. Se muestran imágenes representativas de la migración de las células RAW 264.7 (A) y, también se representa el número de células monocíticas que han migrado, siendo evaluadas con el software ImageJ (B). Los resultados son la media  $\pm$  DE de 2 experimentos por triplicado. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC; <sup>b</sup> $p < 0,01$  vs correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC. MC: medio condicionado; CN: control negativo (con medio  $\alpha$ -MEM); CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; GANT61: GLI1-Antagonista 61; GLI: factor de transcripción de glioma 1; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; DE: desviación estándar.

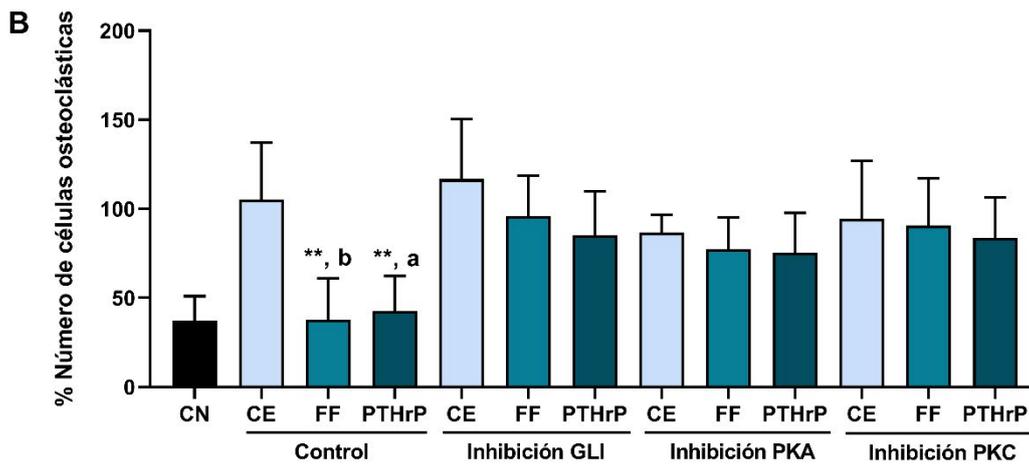
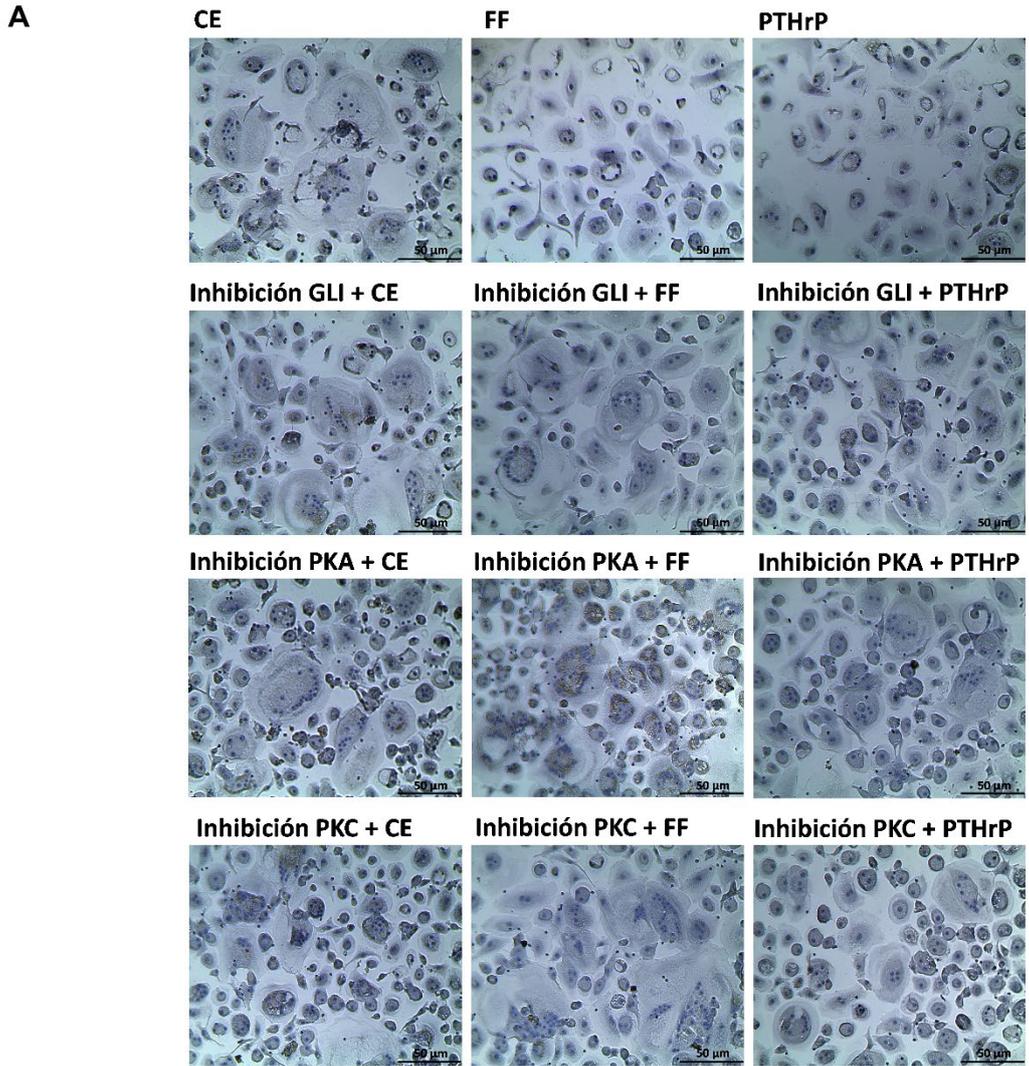


**Figura 21.** Las vías de señalización *hegdehog*, PKA y PKC intervienen en la regulación de la migración de monocitos humanos dependiente del MC obtenido de células MLO-Y4. Las células osteocíticas fueron privadas de suero durante 24 h y tratadas con 10  $\mu$ M de GANT61, 100  $\mu$ M del inhibidor del adenilato ciclasa SQ22536 o con 1  $\mu$ M del inhibidor de la fosfolipasa C U73122 durante 1h. Posteriormente, las células se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 min. El MC se recogió al cabo de 18 h. Para evaluar el número de células migratorias, los monocitos humanos se cultivaron en pocillos de tipo *Transwell* con un

tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ , y en el compartimento inferior se añadió un 20% de cada medio condicionado obtenido de las células MLO-Y4. Tras 6 h de migración, las células fueron fijadas, se tiñeron con cristal violeta y se contaron con un microscopio óptico invertido. Se muestran imágenes representativas de la migración de los monocitos humanos (A) y, también se representa el número de células monocíticas que han migrado, siendo evaluadas con el software ImageJ (B). Los resultados son la media  $\pm$  DE de 2 experimentos por triplicado. \*\* $p < 0,01$  vs CE; <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC. MC: medio condicionado; CN: control negativo (con medio  $\alpha$ -MEM); CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; GANT61: GLI1-Antagonista 61; GLI: factor de transcripción de glioma 1; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; DE: desviación estándar.

A continuación, estudiamos el efecto de los diferentes MC descritos previamente sobre la osteoclastogénesis. De forma similar, el MC obtenido a partir de los osteocitos estimulados con FF o PTHrP y pretratados con los inhibidores GANT61, SQ22536 y U73122 revirtió completamente la represión de la diferenciación osteoclástica causada por el MC de los osteocitos no inhibidos y estimulados con FF o PTHrP (Figura 22A y B).

Estos datos demuestran que la estimulación de los osteocitos con FF y PTHrP inhibe la migración de las células monocíticas tanto murinas como humanas, así como la diferenciación hacia osteoclastos mediante un efecto dependiente de GLI, PKA y PKC.

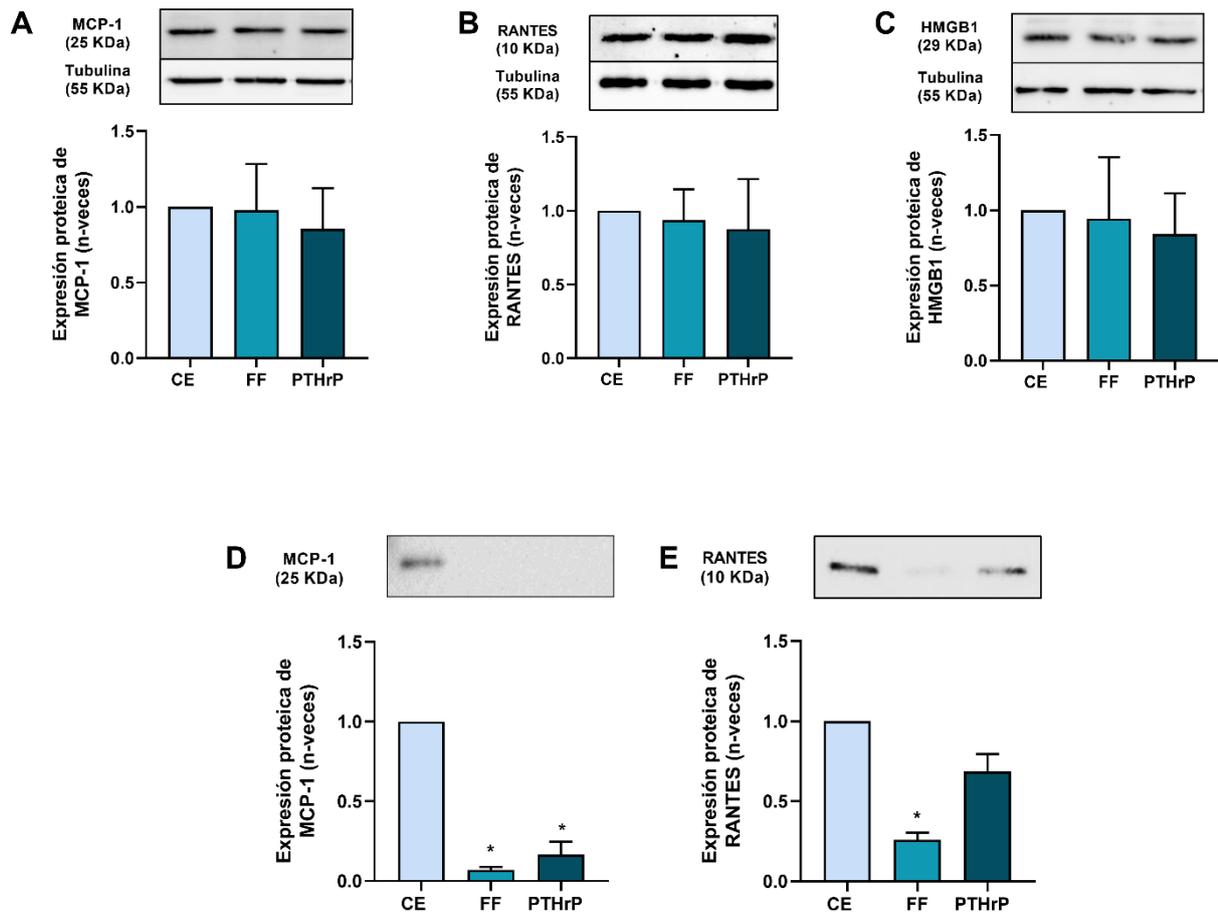


**Figura 22.** Las vías de señalización *hegdehog*, PKA y PKC intervienen en la regulación de la osteoclastogénesis dependiente del MC obtenido de células MLO-Y4. Las células MLO-Y4 fueron privadas de suero durante 24 h y tratadas con 10 µM de GANT61, 100 µM del inhibidor del adenilato ciclasa SQ22536 o con 1 µM del inhibidor de la fosfolipasa C U73122 durante 1h.

Posteriormente, las células se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 min. El MC se recogió al cabo de 18 h. Para evaluar la diferenciación de los monocitos a osteoclastos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL, más el correspondiente 20% de medio condicionado obtenido de las células MLO-Y4. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de la osteoclastogénesis (A) y también se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el programa ImageJ (B). Los resultados son la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \*\*p<0,01 vs CE; <sup>a</sup>p<0,05 vs correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC; <sup>b</sup>p<0,01 vs correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC. MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del activador del receptor del factor nuclear  $\kappa$  B; CN: control negativo (-) RANKL y (+) medio  $\alpha$ -MEM; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; GANT61: GLI1-Antagonista 61; GLI: factor de transcripción de glioma 1; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; DE: desviación estándar.

#### **4. Estudio proteómico del medio condicionado de las células osteocíticas MLO-Y4**

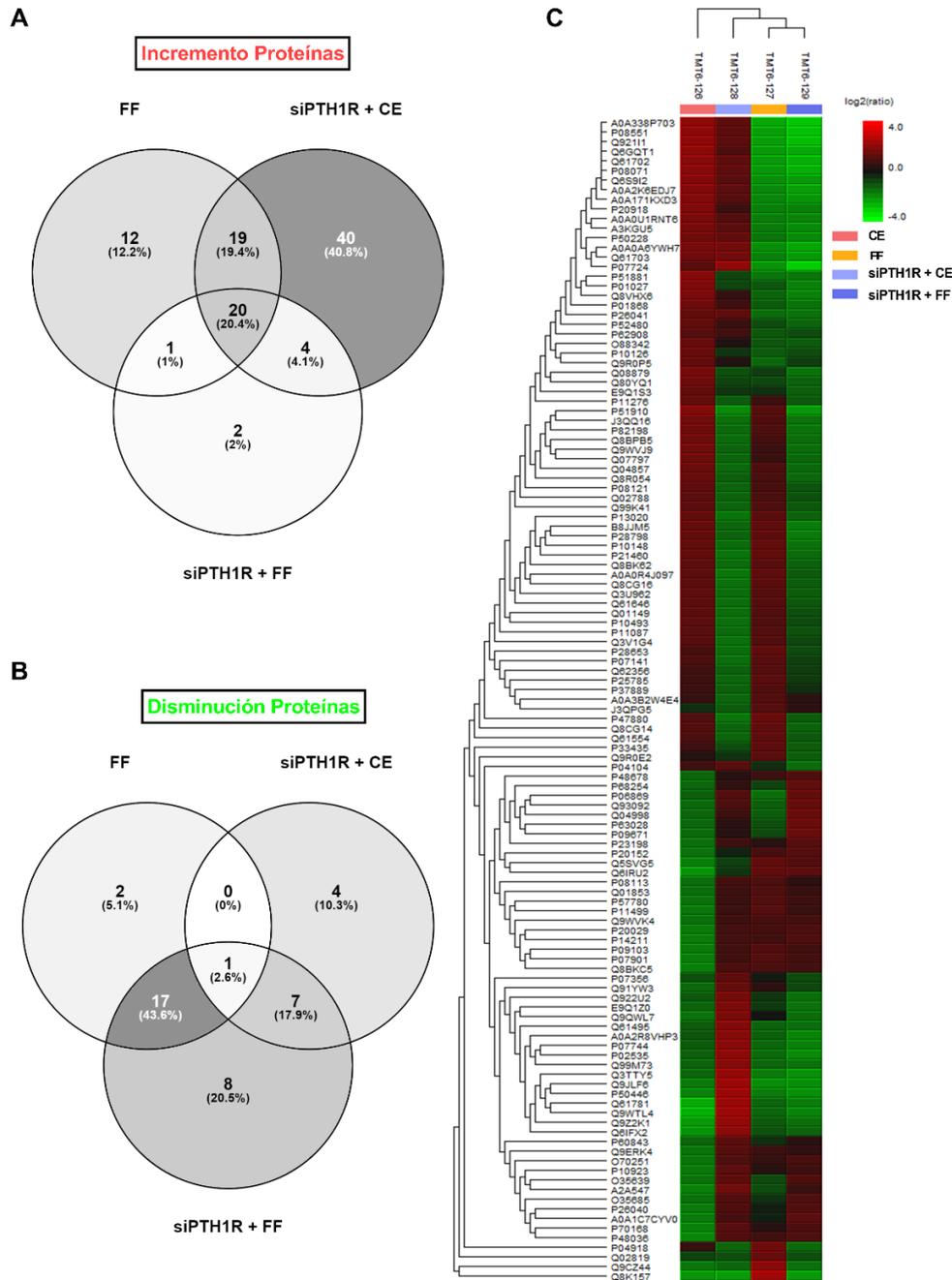
Tras determinar que tanto el estímulo mecánico como el estímulo con PTHrP (1-37) revertían la migración y la diferenciación de los precursores osteoclasticos, quisimos comprobar qué factores podrían producir ese efecto. De modo que estudiamos la expresión proteica de varias quimioquinas reclutadoras de monocitos y macrófagos. Las proteínas analizadas fueron: la quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (RANTES, también conocida como CCL5) (312); la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1, también conocida como CCL2) (313); y la proteína “*High-mobility group box 1*” (HMGB1) (314). Mediante inmunotransferencia se analizó la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente en las células MLO-Y4, las cuales habían sido estimuladas con FF, con PTHrP o mantenidas en condiciones estáticas. El análisis de la expresión proteica mostró que no existían cambios significativos entre el control estático, el estímulo con FF y el estímulo con PTHrP, en ninguna de las tres quimioquinas estudiadas (Figura 23A-C). Sin embargo, el análisis de la presencia de estas proteínas en el medio condicionado mostró una disminución en la secreción de RANTES y MCP-1 tras la estimulación con FF o PTHrP en comparación con el CE (Figura 23D y E).



**Figura 23. Expresión proteica de las quimioquinas MCP-1, RANTES y HMGB1 a nivel intracelular y extracelular.** Las células MLO-Y4 fueron privadas de suero durante 24 h. Posteriormente, se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 min. El MC y el lisado celular se recogieron al cabo de 18 h para determinar la expresión proteica de MCP-1, RANTES y HMGB1 mediante inmunotransferencia, a nivel intracelular (A-C) como a nivel extracelular (D y E). Los resultados son la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  vs CE. MC: medio condicionado; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; RANTES: quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T; HMGB1: “High-mobility group box 1”; DE: desviación estándar.

Tras ver cambios en el análisis de las quimioquinas en el MC, quisimos analizar el secretoma de los osteocitos MLO-Y4 para estudiar el papel de PTH1R en la secreción de los osteocitos estimulados por FF o en condiciones estáticas, y averiguar qué proteínas secretadas por los osteocitos podrían modular la migración de monocitos y la diferenciación de osteoclastos. El análisis proteómico de los MC de los osteocitos reveló la secreción de 1.323 proteínas. El secretoma de los osteocitos

estimulados con FF mostró 52 proteínas que aumentaron y 20 proteínas que disminuyeron sus niveles de secreción en comparación con los osteocitos sometidos a condiciones estáticas (Figura 24A y B). Los diagramas de Venn muestran los cambios proteómicos del secretoma entre osteocitos estimulados con FF, con silenciamiento de *Pth1r* más FF y silenciamiento de *Pth1r* en condiciones estáticas. Las proteínas que muestran un aumento de secreción (veces > 1,5) se muestran en la Figura 24A y Tabla 4. Un total de 20 proteínas son secretadas en todos los grupos estudiados. Además, 19 proteínas son secretadas comúnmente por osteocitos estimulados con FF y osteocitos silenciados con siARN *Pth1r* en condiciones estáticas; una única proteína es común en los osteocitos estimulados con FF con o sin silenciamiento de *Pth1r*; y 4 proteínas en osteocitos con silenciamiento de *Pth1r* en condiciones FF o CE, las cuales están relacionadas con la vía de señalización del TGF- $\beta$ , la cascada activadora del plasminógeno, la vía de señalización del receptor de colecistoquinina (CCKR) y la coagulación sanguínea. Las proteínas que mostraron una secreción disminuida (veces < 1,5) se muestran en la Figura 24B y Tabla 5. Sólo una proteína, la ADP/ATP translocasa 2, disminuyó en todos los grupos. Un total de 17 proteínas diferentes disminuyeron su secreción en osteocitos estimulados con FF frente a osteocitos con silenciamiento de *Pth1r*; y 7 proteínas fueron comunes en los osteocitos silenciados con *Pth1r* en condiciones estáticas frente a osteocitos con silenciamiento de *Pth1r* y estimulados con FF. Las variaciones en la secreción de proteínas entre las diferentes condiciones también se muestran en un mapa de calor donde el color y la intensidad representan los cambios de secreción proteica (Figura 24C).



**Figura 24. Análisis proteómico de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente, +/- silenciamiento del *Pth1r*.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con tres siARN de *Pth1r* o con siARN *Scrambled* durante 24 h. Posteriormente, se privó a las células de suero durante 24 h y se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. Después de 18 h, se recogió el MC, se liofilizó y se analizó mediante espectrometría de masas en tándem. Los diagramas de Venn muestran el perfil de proteínas secretadas que aumentan (A) o disminuyen (B) comparando diferentes condiciones experimentales. (C) Se representa un mapa de calor que muestra las diferencias de secreción proteica tras el análisis proteómico de los osteocitos. El color y la intensidad de los recuadros se utilizan para representar los cambios (no los valores absolutos) de la secreción de proteínas. El rojo representa un aumento de la secreción, el verde una disminución y el negro representa una secreción sin cambios. MC: medio condicionado; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; siPTH1R: silenciamiento de *Pth1r*; CE: control estático; FF: flujo de fluido.

**Tabla 4. Proteínas que incrementan su secreción comparando diferentes condiciones experimentales, en las cuales las células MLO-Y4 son estimuladas mecánicamente +/- silenciamiento de *Pth1r*.**

Condiciones de estudio	Gen	Proteína	Ratio CE	Ratio FF	Ratio siPTH1R CE	Ratio si PTH1R FF	
CE - FF	<i>Galm</i>	Aldosa 1-epimerasa	1	6,32	0,91	0,94	
	<i>Actn1</i>	Actinina alfa 1	1	1,54	1,49	1,65	
	<i>Dkk3</i>	Proteína 3 relacionada con Dickkopf	1	1,52	0,66	0,84	
	<i>Uso1</i>	Factor general de transporte vesicular p115	1	1,52	1,50	1,49	
	<i>Hdgf</i>	Factor de crecimiento derivado del hepatoma	1	1,63	1,36	1,56	
	<i>Nsf11C</i>	NSFL1 cofactor p47	1	3,34	1,17	1,08	
	<i>Nucb1</i>	Nucleobindina-1	1	1,58	0,95	0,95	
	<i>Npm1</i>	Nucleofosmina	1	1,51	1,41	1,51	
	<i>Septin8</i>	Septina-8	1	1,61	1,30	1,52	
	<i>Snx6</i>	Clasificación de nexina-6	1	1,51	1,49	1,40	
	<i>Sptbn1</i>	Cadena beta de la espectrina no eritrocitaria 1 (Fragmento)	1	1,51	1,50	1,74	
	CE - siPTH1R + CE	<i>Ywhab</i>	14-3-3 proteína beta/alfa	1	1,46	1,65	1,98
		<i>Psm1</i>	Subunidad reguladora no ATPasa 1 del proteosoma 26S	1	1,49	1,63	1,28
<i>Psm7</i>		Subunidad reguladora no ATPasa 7 del proteosoma 26S	1	1,34	1,65	1,54	
<i>Psm3</i>		Subunidad reguladora 6A del proteosoma 26S	1	1,44	1,56	1,68	
<i>Rps6</i>		Proteína ribosómica S6 de la subunidad 40S	1	1,32	1,64	1,36	
<i>Rpl15</i>		Proteína ribosómica L15 de la subunidad 60S	1	1,28	1,58	1,32	
<i>Rpl18</i>		Proteína ribosómica L18 de la subunidad 60S	1	1,33	1,56	1,47	
<i>Rpl28</i>		Proteína ribosómica L28 de la subunidad 60S	1	1,24	1,57	1,54	
<i>Pgd</i>		6-fosfogluconato deshidrogenasa descarboxilante	1	1,15	1,57	1,23	
<i>Aldh3A1</i>		Aldehído deshidrogenasa dimérica NADP-preferente	1	1,20	1,73	1,75	
<i>Anxa2</i>		Anexina A2	1	1,19	1,56	1,03	
<i>Bzw1</i>		Cremallera de leucina y proteína 1 que contiene el dominio W2	1	1,23	1,64	1,31	
<i>Calm1</i>		Calmodulina-1	1	1,38	1,71	1,47	
<i>Calm2</i>		Calmodulina-2	1	1,38	1,71	1,47	
<i>Calm3</i>		Calmodulina-3	1	1,38	1,71	1,47	
<i>Cars</i>		Cisteína-ARNt ligasa citoplasmática	1	1,39	1,60	1,42	
<i>Dsg1A</i>		Desmogleína-1-alfa	1	0,94	2,34	0,85	
<i>Dsg1B</i>		Desmogleína-1-beta	1	0,94	2,34	0,85	
<i>Dsp</i>		Desmoplaquina	1	1,18	1,60	1,00	
<i>Dnajc3</i>		Homólogo de DnaJ subfamilia C miembro 3	1	1,48	2,00	1,26	
<i>Lipg</i>		Lipasa endotelial	1	0,89	1,64	0,79	
<i>Eif4A1</i>		Factor de iniciación eucariota 4A-I	1	1,34	1,78	1,42	
<i>Gfpt1</i>		Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa 1	1	1,42	1,65	1,50	
<i>Glrx3</i>		Glutaredoxina-3	1	1,32	1,55	1,56	
<i>Hars</i>		Histidina-ARNt ligasa citoplasmática	1	1,50	1,67	1,59	
<i>Ide</i>		Enzima degradadora de insulina	1	1,32	1,97	1,37	
<i>Il6</i>		Interleuquina-6	1	1,11	1,64	1,94	
<i>Nudc</i>		Proteína de migración nuclear nudC	1	1,46	1,83	1,81	
<i>Nutf2</i>		Factor de transporte nuclear 2	1	1,21	1,52	1,52	
<i>Fkbp4</i>		Peptidil-prolil cis-trans isomerasa FKBP4	1	1,34	1,53	1,52	
<i>Gm5478</i>		Pseudogen pronosticado 5478	1	0,93	2,32	0,66	
<i>Pdia4</i>		Proteína disulfuro-isomerasa A4	1	1,43	1,57	1,36	
<i>Tgm1</i>		Proteína-glutamina gamma-glutamilttransferasa K	1	0,80	4,10	0,80	
<i>Ranbp1</i>		Proteína activadora de GTPasas específica de Ran	1	1,42	1,78	1,92	
<i>Rpl15</i>		Proteína ribosómica L15 (Fragmento)	1	1,28	1,58	1,32	
<i>Ppp2R2A</i>		Isoforma alfa de la subunidad reguladora B de la serina/treonina-proteína fosfatasa 2A de 55 kDa	1	1,38	1,91	1,91	
<i>Smarca5</i>		Regulador de la subfamilia A miembro 5 de la cromatina dependiente de la actina asociada a la matriz SWI/SNF	1	1,49	1,72	1,93	
<i>Cct8</i>		Subunidad theta de la proteína 1 del complejo T	1	1,39	1,55	1,55	
<i>Tubb4B</i>		Cadena de tubulina beta-4B	1	1,15	1,51	1,87	
CE - siPTH1R + FF		<i>Sod2</i>	Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial	1	1,27	1,49	2,09
		<i>Tpt1</i>	Proteína tumoral controlada traslacionalmente	1	1,19	1,46	2,03
FF - siPTH1R + CE		<i>Rpl19</i>	Proteína ribosómica L19 de la subunidad 60S	1	1,54	2,75	1,93
		<i>Rpl32</i>	Proteína ribosómica L32 de la subunidad 60S	1	1,52	1,90	1,88
		<i>Cbx3</i>	Proteína Cbx3	1	1,55	1,65	1,86
		<i>Cbx3</i>	Homólogo 3 de la proteína Chromob	1	1,55	1,65	1,86
		<i>Ehd1</i>	Proteína 1 con dominio EH	1	1,73	1,67	1,71
		<i>Eef1B</i>	Factor de elongación 1-beta	1	1,70	1,91	1,85
	<i>Eif4G1</i>	Factor 4 gamma 1 de iniciación de la traducción eucariota	1	1,60	1,77	1,88	
	<i>Cse1L</i>	Exportina-2	1	1,70	1,96	1,64	
	<i>Ezr</i>	Ezrina	1	1,66	1,99	2,03	
	<i>PrkcsH</i>	Subunidad beta de la glucosidasa 2	1	1,57	1,57	1,73	
	<i>Gbp2</i>	Proteína 2 de unión a guanilato	1	1,55	1,73	1,58	
	<i>Myl12A</i>	Cadena ligera reguladora de miosina 12A	1	1,90	1,81	2,15	
	<i>Myl12B</i>	Cadena ligera reguladora de miosina 12B	1	1,90	1,81	2,15	
	<i>Ptges3</i>	Prostaglandina E sintasa 3	1	1,51	1,75	1,63	
	<i>Pdia6</i>	Proteína disulfuro-isomerasa A6	1	1,56	1,63	1,60	
	<i>Enah</i>	Homólogo de la proteína activada	1	1,59	1,53	1,55	
	<i>Ppp1R7</i>	Subunidad reguladora 7 de la proteína fosfatasa 1	1	1,51	1,66	1,72	
	<i>Sf3B1</i>	Subunidad 1 del factor splicing 3B	1	1,66	1,62	2,04	
	FF - siPTH1R + FF	<i>Lmna</i>	Prelamina-A/C	1	1,53	1,44	1,67
	siPTH1R + CE - siPTH1R + FF	<i>Anxa3</i>	Anexina A3	1	1,33	1,99	1,84
		<i>Inhba</i>	Inhibina beta A	1	1,07	1,52	1,99
		<i>Taldo1</i>	Transaldolasa	1	1,09	1,68	1,97
		<i>Plau</i>	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa	1	0,89	1,59	1,79

FF- siPTH1R + CE - siPTH1R + FF	Actn4	Alfa-actinina-4	1	1,90	1,68	1,70
	Anxa5	Anexina A5	1	2,09	2,29	2,23
	Ap1B1	Subunidad beta-1 del complejo AP-1	1	2,35	1,61	2,12
	Ap2B1	Subunidad beta del complejo AP-2	1	2,35	1,61	2,12
	Calr	Calreticulina	1	1,85	1,87	1,98
	Hspa5	Chaperona de reticulo endoplasmático	1	1,86	1,84	1,94
	Hsp90B1	Endoplasmina	1	1,74	1,68	1,53
	Hsp90Aa1	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa	1	2,07	1,88	1,92
	Hsp90Ab1	Proteína de choque térmico HSP 90-beta	1	2,02	1,76	1,74
	Kpnb1	Subunidad beta-1 de importina	1	1,86	2,30	2,14
	Ipa5	Importina-5	1	2,07	2,06	1,97
	Insr	Proteína relacionada con el receptor de insulina	1	2,36	8,06	1,77
	Spp1	Osteopontina	1	1,67	2,10	1,78
	Pls3	Plastina-3	1	1,68	1,93	2,17
	P4Hb	Proteína disulfuro-isomerasa	1	2,01	1,85	1,85
	Vcp	ATPasa del reticulo endoplasmático de transición	1	1,78	1,63	1,60
	Tpm4	Cadena de tropomiosina alfa-4	1	2,97	2,11	2,87
	Vim	Vimentina	1	1,76	1,53	1,88

Nota: La tabla muestra los cambios para cada proteína y la proporción para cada condición relativizada frente al control estático. El aumento de la secreción se muestra en color rojo. MC: medio condicionado; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; siPTH1R: silenciamiento de Pth1r.

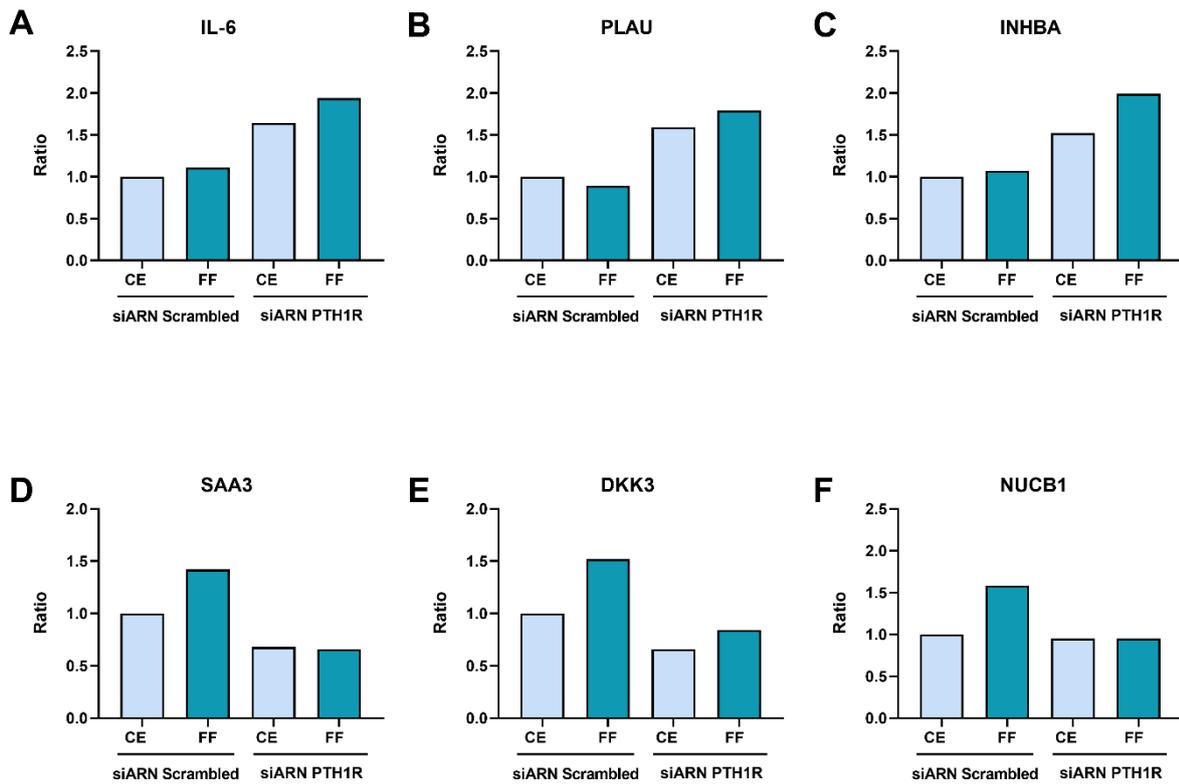
**Tabla 5. Proteínas que disminuyen su secreción comparando diferentes condiciones experimentales, en las cuales las células MLO-Y4 son estimuladas mecánicamente +/- silenciamiento de *Pth1r*.**

Condiciones de estudio	Gen	Proteína	Ratio CE	Ratio FF	Ratio siPTH1R CE	Ratio si PTH1R FF	
CE - FF	<i>Mthfd1</i>	C-1-tetrahidrofolato sintasa citoplasmática	1	<b>0,44</b>	0,81	<b>0,43</b>	
	<i>Plg</i>	Plasminógeno	1	<b>0,32</b>	0,60	<b>0,31</b>	
CE - siPTH1R + CE	<i>Cst3</i>	Cistatina-C	1	0,99	<b>0,47</b>	0,51	
	<i>Gsn</i>	Gelsolina	1	0,94	<b>0,46</b>	0,54	
	<i>Loxl2</i>	Lisil oxidasa homóloga 2	1	0,75	<b>0,49</b>	0,52	
	<i>Tgfb3</i>	Receptor del factor de crecimiento transformante beta tipo 3	1	1,01	<b>0,48</b>	0,61	
CE - siPTH1R + FF	<i>Ccl2</i>	Quimioquina 2 con motivo C-C	1	0,99	0,51	<b>0,48</b>	
	<i>Cfb</i>	Factor B del complemento	1	0,96	0,52	<b>0,42</b>	
	<i>Fbln1</i>	Fibulina-1	1	0,57	0,52	<b>0,40</b>	
	<i>Ighg1</i>	Ig gamma-1 cadena C forma secretada	1	0,52	0,72	<b>0,42</b>	
	<i>Msn</i>	Moesina	1	0,50	0,98	<b>0,48</b>	
	<i>Gm20547</i>	Gen pronosticado 20547	1	0,96	0,52	<b>0,42</b>	
	<i>Grn</i>	Progranulina	1	0,96	0,53	<b>0,44</b>	
	<i>Thbs1</i>	Trombospondina-1	1	0,58	0,59	<b>0,49</b>	
	FF - siPTH1R + FF	<i>Ahsg</i>	Alfa-2-HS-glicoproteína	1	<b>0,16</b>	0,62	<b>0,10</b>
<i>A2M</i>		Alfa-2-macroglobulina-P	1	<b>0,20</b>	0,58	<b>0,16</b>	
<i>Serpinc1</i>		Antitrombina-III	1	<b>0,29</b>	0,95	<b>0,21</b>	
<i>C3</i>		Complemento C3	1	<b>0,46</b>	0,51	<b>0,32</b>	
<i>Cxcl5</i>		Ligando 5 de quimioquina con motivo C-X-C	1	<b>0,41</b>	0,90	<b>0,33</b>	
<i>Fln</i>		Filamina-C	1	<b>0,44</b>	0,62	<b>0,33</b>	
<i>Itih2</i>		Inhibidor inter-alfa de la tripsina de cadena pesada 2	1	<b>0,37</b>	1,03	<b>0,28</b>	
<i>Itih4</i>		Inhibidor inter-alfa de la tripsina de cadena pesada 4	1	<b>0,28</b>	0,70	<b>0,21</b>	
<i>Itih1</i>		Inhibidor inter-alfa-tripsina cadena pesada H1	1	<b>0,21</b>	0,67	<b>0,15</b>	
<i>Itih2</i>		Inhibidor inter-alfa-tripsina cadena pesada H2	1	<b>0,37</b>	1,03	<b>0,28</b>	
<i>Kng2</i>		Quininógeno 2	1	<b>0,25</b>	0,68	<b>0,22</b>	
<i>Ltf</i>		Lactotransferrina	1	<b>0,21</b>	0,68	<b>0,15</b>	
<i>Nefl</i>		Polipéptido ligero de neurofilamentos	1	<b>0,18</b>	0,62	<b>0,11</b>	
<i>Prmt1</i>		Proteína arginina N-metiltransferasa 1	1	<b>0,30</b>	0,69	<b>0,25</b>	
<i>Mat2A</i>		S-adenosilmetionina sintasa	1	<b>0,35</b>	0,73	<b>0,32</b>	
<i>Tf</i>		Serotransferrina	1	<b>0,19</b>	0,62	<b>0,11</b>	
<i>Sptan1</i>		Espectrina de cadena alfa no eritrocítica 1	1	<b>0,36</b>	0,78	<b>0,30</b>	
siPTH1R + CE - siPTH1R + FF		<i>Apod</i>	Apolipoproteína D	1	0,67	<b>0,27</b>	<b>0,23</b>
		<i>Col6A3</i>	Colágeno tipo VI alfa 3	1	0,78	<b>0,43</b>	<b>0,42</b>
		<i>Col6A1</i>	Cadena de colágeno alfa-1(VI)	1	0,82	<b>0,49</b>	<b>0,49</b>
	<i>Efemp1</i>	Proteína de matriz extracelular 1 similar a la fibulina que contiene EGF	1	0,75	<b>0,45</b>	<b>0,45</b>	
	<i>Efemp2</i>	Proteína de matriz extracelular 2 similar a la fibulina que contiene EGF	1	0,71	<b>0,48</b>	<b>0,44</b>	
	<i>Lgals3Bp</i>	Proteína de unión a galectina 3	1	0,71	<b>0,48</b>	<b>0,48</b>	
FF - siPTH1R + CE - siPTH1R + FF	<i>Tgfb1</i>	Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante beta	1	0,79	<b>0,46</b>	<b>0,43</b>	
FF - siPTH1R + CE - siPTH1R + FF	<i>Slc25A5</i>	ADP/ATP translocasa 2	1	<b>0,34</b>	<b>0,48</b>	<b>0,34</b>	

Nota: La tabla muestra los cambios para cada proteína y la proporción para cada condición relativizada frente al control estático. La disminución de la secreción se muestra en color verde. MC: medio condicionado; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; siPTH1R: silenciamiento de *Pth1r*.

Una vez determinada las proteínas del secretoma que experimentaban cambios en su secreción, quisimos comprobar cuales de ellas podrían estar relacionadas con la capacidad migratoria de los precursores osteoclastos. De modo que analizamos una serie de proteínas que experimentaron cambios significativos y que probablemente podrían estar implicadas en la comunicación osteocito-osteoclasto. Estas proteínas fueron IL-6, un factor esencial en la homeostasis ósea y en la angiogénesis (315), el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (PLAU) implicado en el remodelado tisular y en la migración celular

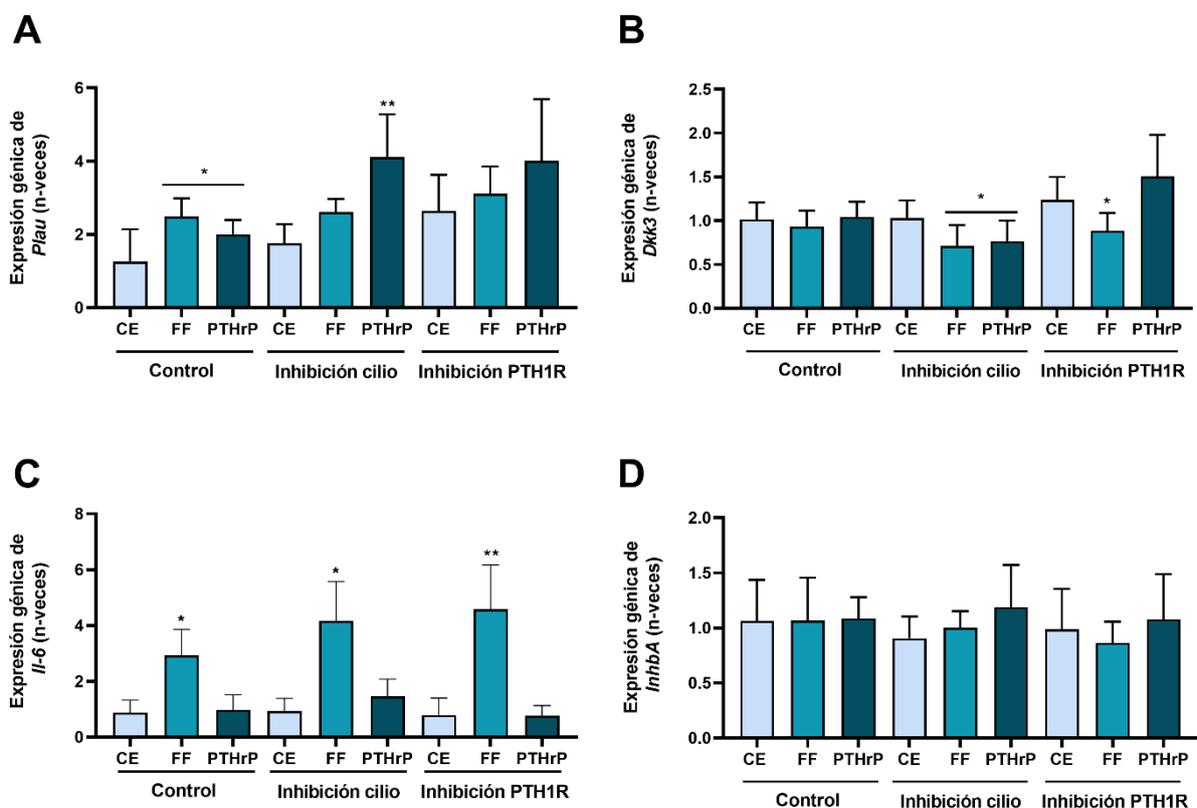
(316) y la inhibina beta A (INHBA), la cual participa en la modulación del recambio óseo (317) (Figura 25A-C). Estas tres proteínas mostraron un incremento en su secreción cuando se llevaba a cabo el silenciamiento de *Pth1r* tanto en condiciones estáticas como cuando se estimulaba con FF. Y las proteínas suero amiloide A3 (SAA3), la cual ejerce una actividad quimiotáctica y mejora la adhesión celular (318), la proteína 3 relacionada con Dickkopf (DKK3), que participa en la regulación de la señalización de  $\beta$ -catenina y la proliferación celular (319), y nucleobindina-1 (NUCB1), un factor pro-osteogénico que incrementa la actividad de la FA y promueve la mineralización ósea (320) (Figura 25D-F). Estas proteínas mostraron una disminución de su secreción cuando se producía el silenciamiento de *Pth1r* tanto con estímulo mecánico como en condiciones estáticas.



**Figura 25. Proteínas del secretoma de células MLO-Y4 con cambios en su secreción.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con tres siARN de *Pth1r* o con siARN *Scrambled* durante 24 h. Posteriormente, se privó a las células de suero durante 24 h y se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. Después de 18 h, se recogió el MC, se liofilizó y se analizó mediante espectrometría de masas en tándem. Se representa la secreción de IL-6 (A), PLAU (B), INHBA(C), SAA3 (D), DKK3 (E) y NUCB1(F) en las distintas condiciones de estudio. MC: medio condicionado; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; siPTH1R: silenciamiento de *Pth1r*; CE: control estático; FF: flujo de fluido; IL-6: interleuquina 6; PLAU: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; INHBA: inhibina beta A; SAA3; suero amiloide A3; DKK3: proteína 3 relacionada con Dickkopf; NUCB1: nucleobindina-1.

También quisimos comprobar si en las células MLO-Y4 en las que se inhibió el cilio y PTH1R, el estímulo con FF o con PTHrP (1-37) inducían cambios en la expresión génica de algunas de las proteínas del secretoma que experimentaban cambios en su secreción. Los datos mostraron que la expresión génica de *Plau* aumentó tras la estimulación con FF o PTHrP en comparación con el CE (Figura 26A). La expresión génica de *Dkk3* mostró una disminución significativa cuando se inhibió el cilio y se estimuló con FF o con PTHrP en comparación con sus respectivos controles. De igual forma, la expresión de este gen disminuyó cuando se inhibió PTH1R y se estimuló con FF en comparación

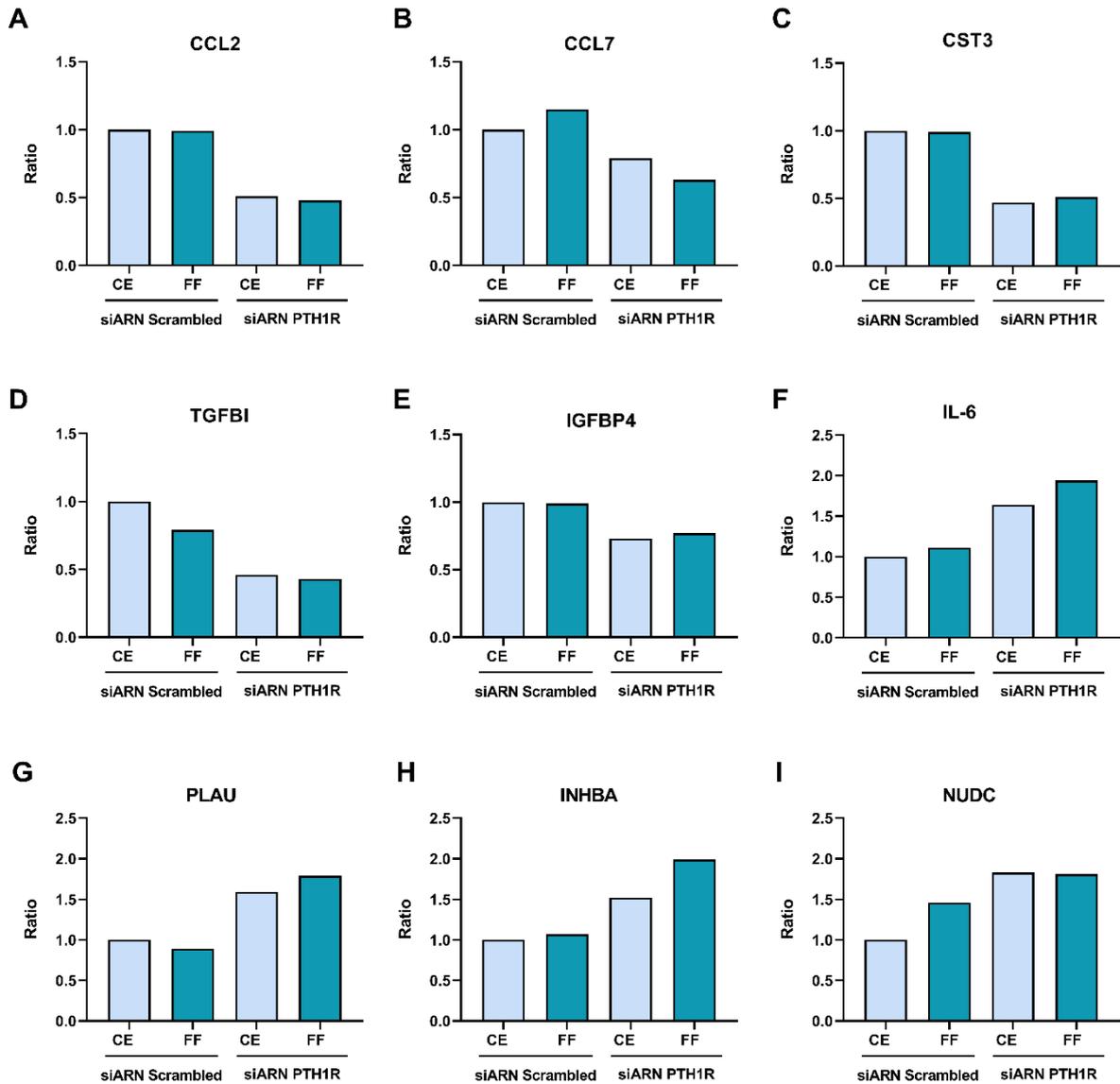
con su control (Figura 26B). En el caso de la expresión génica de *Il-6*, se observó un incremento cuando se estimuló con FF tanto en la condición control como cuando se inhibe el cilio y el receptor, en comparación con sus respectivos controles estáticos (Figura 26C). En cambio, la expresión génica de *InhbA* no sufrió cambios significativos entre las distintas condiciones de estudio (Figura 26D). Además, la expresión de *Plau* experimentó una tendencia al alza cuando se inhibió el cilio y el receptor en las condiciones de estímulo con FF o con PTHrP (Figura 26A).



**Figura 26. Análisis de la expresión génica de proteínas obtenidas en el secretoma de las células MLO-Y4.** Las células osteocíticas se privaron de suero durante 24 h, se trataron con 1 mM de hidrato de cloral o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h y se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. A las 6 h se recogió el ARN. Los niveles de expresión de ARNm de *Plau* (A), *Dkk3* (B), *Il-6* (C) e *InhbA* (D) fueron analizados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs correspondiente control; \*\* $p < 0.01$  vs correspondiente control. CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; *Plau*: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; *Dkk3*: proteína 3 relacionada con Dickkopf; *Il-6*: interleuquina 6; *InhbA*: inhibina beta A; DE: desviación estándar.

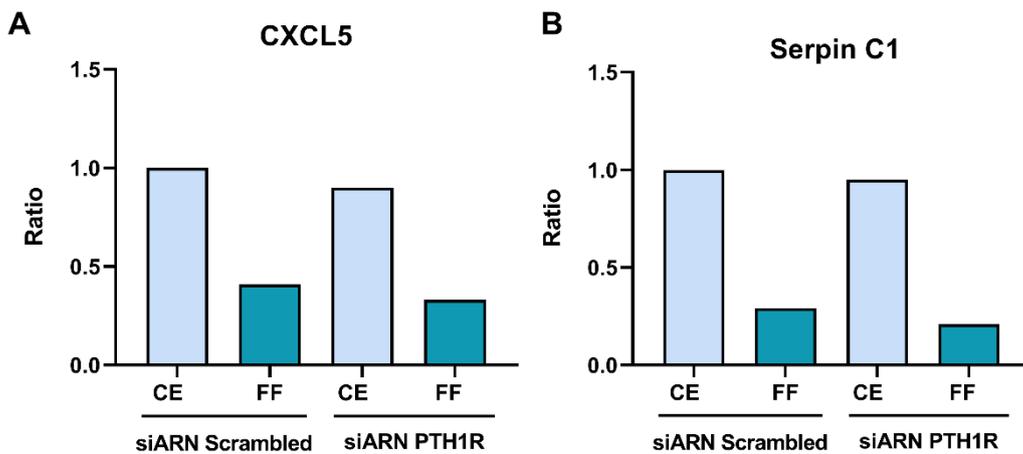
Posteriormente, quisimos analizar qué proteínas de las secretadas por los osteocitos experimentaban cambios dependientes del receptor PTH1R sin que estuvieran influidos por el estímulo con FF (Figura 27), o proteínas que modificaron su secreción inducidas por FF, sin estar afectadas por el receptor (Figura 28).

Entre las proteínas que experimentaban cambios dependientes solo del receptor PTH1R, encontramos la proteína ligando 2 de quimioquina (CCL2), la proteína ligando 7 de quimioquina (CCL7), que presenta una actividad protectora frente a la muerte celular en células MLO-Y4 (321), cistatina 3 (CST3), la cual induce la diferenciación de osteoblastos *in vitro* (322), el factor de crecimiento transformante inducido por beta (TGFB1), el cual participa en la formación ósea y en la adhesión celular (323) y la proteína 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP4), un inhibidor de IGF-1 (una hormona anabólica formadora de hueso) (324). Estas proteínas mostraron una disminución en su secreción tras el silenciamiento de *Pth1r* (Figura 27A-E). En cambio, las proteínas IL-6, PLA2, INHBA y la proteína de migración nuclear nudC (NUDC, que participa en la diferenciación de monocitos/macrófagos (325)), incrementaron su secreción cuando se silenciaba el receptor (Figura 27F-I).



**Figura 27. Proteínas obtenidas del secretoma de las células MLO-Y4 con cambios en la secreción dependientes de PTH1R no afectados por FF.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con tres siARN de *Pth1r* o con siARN *Scrambled* durante 24 h. Posteriormente, se privó a las células de suero durante 24 h y se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. Después de 18 h, se recogió el MC, se liofilizó y se analizó mediante espectrometría de masas en tándem. Se representa las proteínas con cambios dependientes del receptor PTH1R: CCL2 (A), CCL7 (B), CST3 (C), TGFBI (D), IGFBP4 (E), IL-6 (F), PLAU (G), INHBA (H) y NUDC (I). MC: medio condicionado; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; siPTH1R: silenciamiento de *Pth1r*; CE: control estático; FF: flujo de fluido; CCL2: ligando 2 de quimioquina; CCL7: ligando 7 de quimioquina; CST3: cistatina 3; TGFBI: factor de crecimiento transformante inducido por beta; IGFBP4: proteína 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; IL-6: interleuquina 6; PLAU: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; INHBA: inhibina beta A; NUDC: proteína de migración nuclear nudC.

Así mismo, las proteínas que veían su secreción afectada solo por el estímulo por FF fueron la quimioquina 5 del motivo C-X-C (CXCL5), un factor que afecta a la migración y diferenciación de células madre mesenquimales (326) y la antitrombina-III (Serpín C1), la cual regula la cascada de coagulación sanguínea. En ambos casos la secreción de estas proteínas disminuía cuando se estimulaba con FF en comparación con el CE (Figura 28A y B).

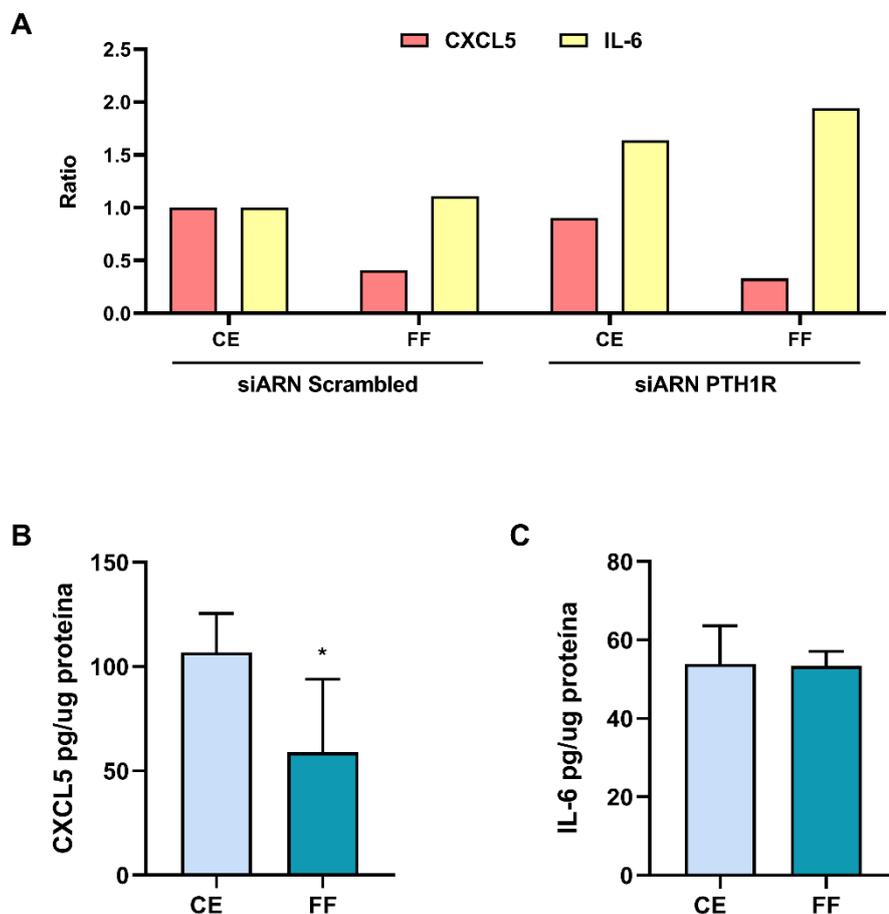


**Figura 28. Proteínas secretadas por las células MLO-Y4 con cambios en su secreción dependientes del estímulo por FF no afectados por PTH1R.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con tres siARN de *Pth1r* o con siARN *Scrambled* durante 24 h. Posteriormente, se privó a las células de suero durante 24 h y se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. Después de 18 h, se recogió el MC, se liofilizó y se analizó mediante espectrometría de masas en tándem. Se representa las proteínas con cambios dependientes del estímulo mecánico por FF: CXCL5 (A) y Serpín C1 (B). MC: medio condicionado; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; siPTH1R: silenciamiento de *Pth1r*; CE: control estático; FF: flujo de fluido; CXCL5: quimioquina 5 del motivo C-X-C; Serpín C1: antitrombina-III.

## 5. Papel de CXCL5 e IL-6 en el reclutamiento y la diferenciación de los osteoclastos

Tras el análisis del secretoma de las células MLO-Y4, se encontraron proteínas que estaban relacionadas con factores quimiotácticos y con el proceso de remodelado óseo. Algunas de las proteínas sobreexpresadas por los osteocitos de este estudio, estaban relacionadas con procesos inflamatorios o con el reclutamiento de precursores osteoclasticos, como CXCL5 e IL-6. A este respecto, los datos proteómicos mostraron que el FF inhibió la secreción de CXCL5, pero no de IL-6. Por el contrario, el silenciamiento de *Pth1r* indujo la

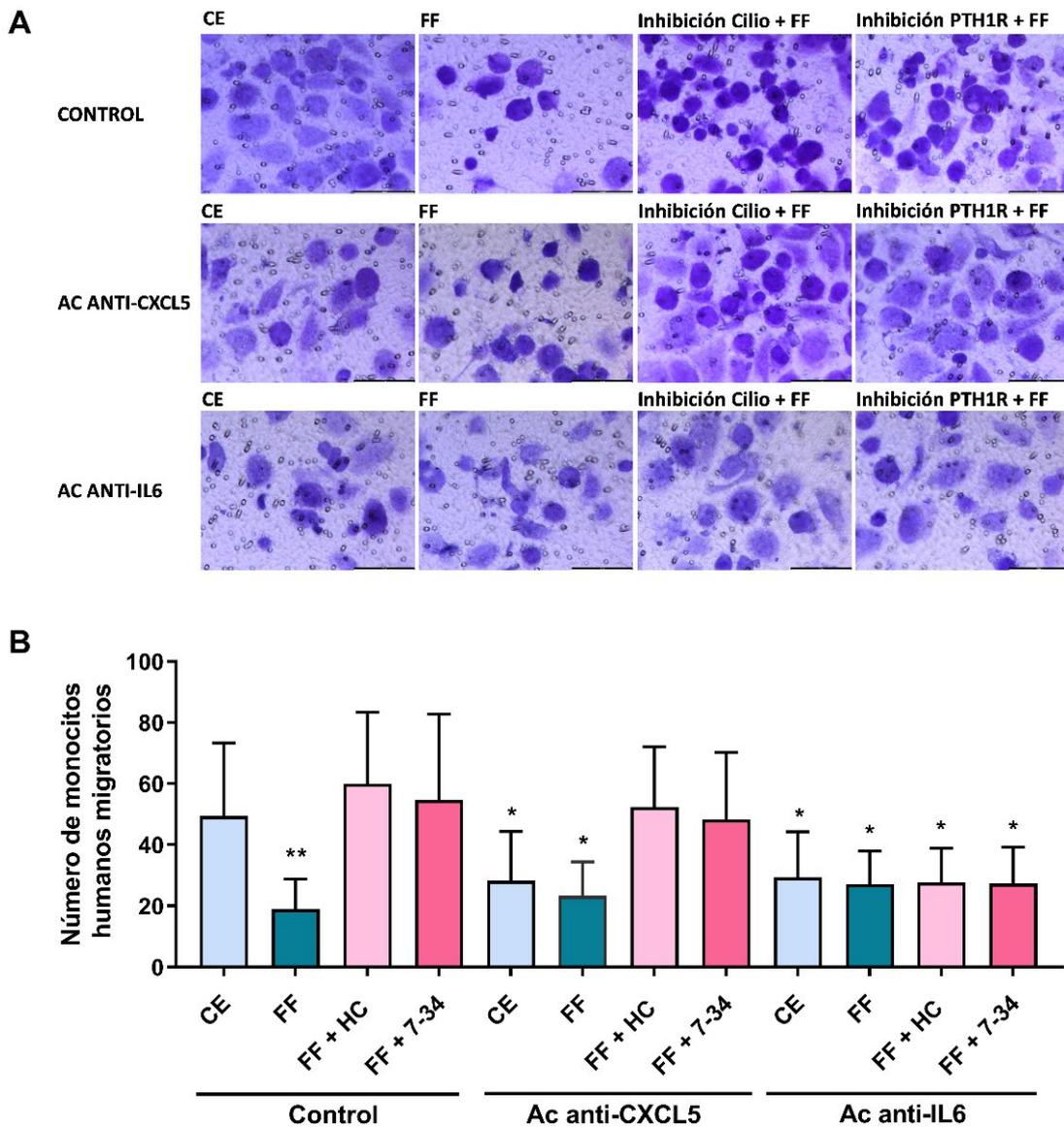
secreción de IL-6 sin afectar a la secreción de CXCL5 (Figura 29A). Para comprobar los datos previos, se llevó a cabo un ensayo ELISA, en el cual se analizó la concentración de CXCL5 e IL-6 que había en el MC obtenido de los osteocitos MLO-Y4 en condiciones estáticas y tras estimular con FF. Los datos mostraron que la concentración de CXCL5 disminuye en los MC de las MLO-Y4 que han sido estimulada mecánicamente con FF en comparación con el control estático (Figura 29B). En cambio, la concentración de IL-6 secretada por las células osteocíticas no se ve modificada por FF (Figura 29C).



**Figura 29. Niveles de expresión de CXCL5 e IL-6.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectoraron con tres siARN de *Pth1r* o con siARN *Scrambled* durante 24 h. Posteriormente, se privó a las células de suero durante 24 h y se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. Después de 18 h, se recogió el MC (A-C). Para llevar a cabo la proteómica el MC se liofilizó y se analizó mediante espectrometría de masas en tándem (A). El MC de las células MLO-Y4 se analizó mediante un ensayo ELISA para determinar la concentración de CXCL5 (B) e IL-6 (C). \* $p < 0.05$  vs CE. MC: medio condicionado; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; siPTH1R: silenciamiento de *Pth1r*; CXCL5: quimiocina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleucina 6.

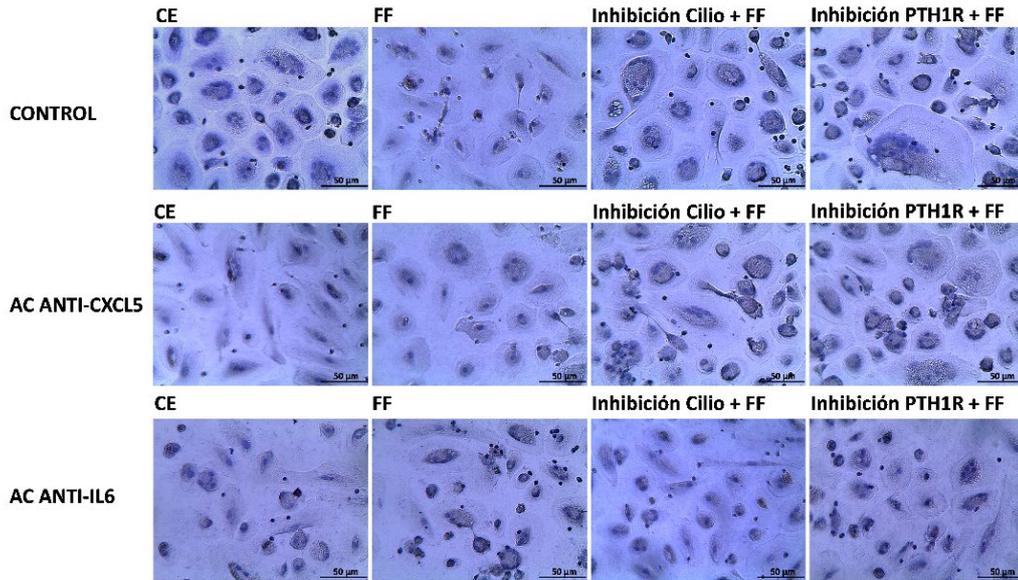
Basándonos en estas observaciones, analizamos si IL-6 y CXCL5 estaban implicadas en la regulación de la migración y la diferenciación de osteoclastos inducida por mecanismos dependientes de PTH1R y del cilio primario en células MLO-Y4 utilizando anticuerpos neutralizantes específicos (Figuras 30-34). Como se demostró anteriormente, los MC de osteocitos en condiciones estáticas provocaron un aumento de la migración de los monocitos humanos y de la diferenciación de osteoclastos; un efecto que fue inhibido por el pretratamiento de los MC de los osteocitos con el anticuerpo neutralizante CXCL5 o el anticuerpo neutralizante IL-6. Además, el estímulo por FF disminuyó la migración de los monocitos con o sin neutralización de CXCL5 o IL-6 (Figura 30A y B). De igual forma, la diferenciación hacia osteoclastos también se vio disminuida cuando se estimuló con FF o con PTHrP con o sin la utilización de los anticuerpos neutralizantes CXCL5 o IL-6 (Figuras 31-34). La neutralización de CXCL5 no causó ningún efecto sobre la migración de los monocitos o la diferenciación de osteoclastos cuando el cilio primario o PTH1R de los osteocitos fueron inhibidos con HC o PTHrP (7-34), respectivamente (Figuras 30-32). Así mismo, la neutralización de CXCL5 tampoco causó ningún efecto en la osteoclastogénesis cuando las vías GLI, PKA y PKC fueron inhibidas con GANT61, SQ22536 y U73122, respectivamente (Figuras 33 y 34). Por el contrario, el anticuerpo anti-IL-6 no sólo revirtió la migración (Figura 30) y la osteoclastogénesis (Figuras 31 y 32) en condiciones estáticas, sino también en presencia de HC o PTHrP (7-34), tanto con el estímulo por FF como con el estímulo con PTHrP (1-37). De igual forma, la inhibición de las vías GLI, PKA y PKC también revierte la osteoclastogénesis (Figuras 33 y 34).

Estos hallazgos indican que la presencia tanto de un cilio primario funcional como del receptor PTH1R en los osteocitos son necesarios para una correcta comunicación con los osteoclastos, y sugieren que la estimulación mecánica inhibe el reclutamiento y la diferenciación de los osteoclastos a través de CXCL5, mientras que la activación de PTH1R y del cilio primario regulan a los osteoclastos a través de IL-6.

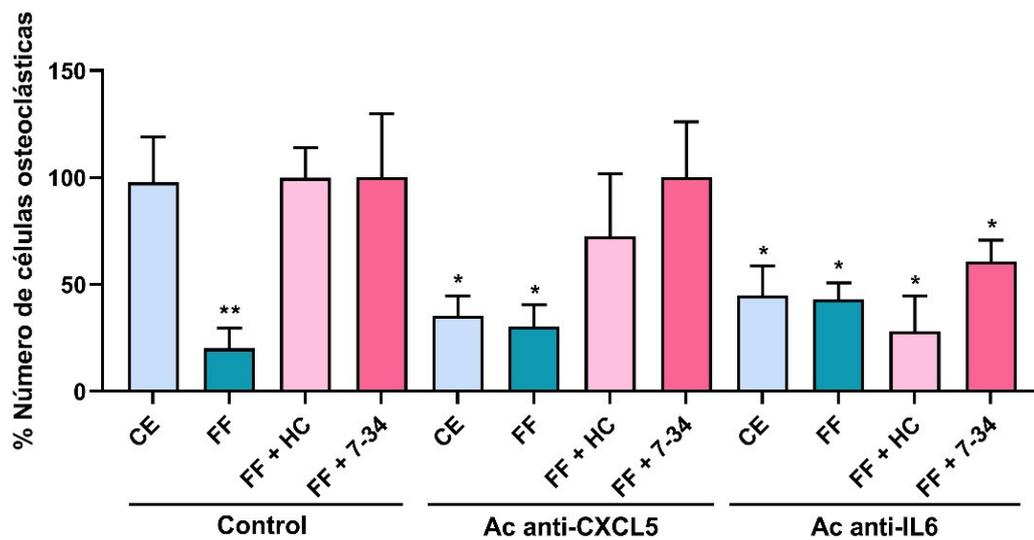


**Figura 30. La estimulación mecánica inhibe el reclutamiento de los osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h y, posteriormente se trataron con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h. Luego, las células se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h y se añadió 2 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1 µg/mL de anti-mIL-6. Para evaluar el número de células migratorias, se cultivaron células monocíticas humanas (A y B) obtenidas de la capa leucocitaria en pocillos de tipo *Transwell* con un tamaño de poro de 8 µm. En el compartimento inferior se añadió un 20% de cada MC de las células MLO-Y4 más el anticuerpo neutralizante correspondiente. Tras 6 h, se fijaron las células, se tiñeron con cristal violeta y se contaron con un microscopio óptico invertido. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el número de células monocíticas evaluadas con el software ImageJ (B). Los resultados son la media ± DE de 2 experimentos por triplicado de cada condición experimental. \* $p < 0,05$  vs CE o vs correspondiente inhibición del cilio o PTH1R; \*\* $p < 0,01$  vs CE. MC: medio condicionado; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; FF: flujo de fluido; HC: hidrato de cloral; 7-34: PTHrP (7-34); DE: desviación estándar.

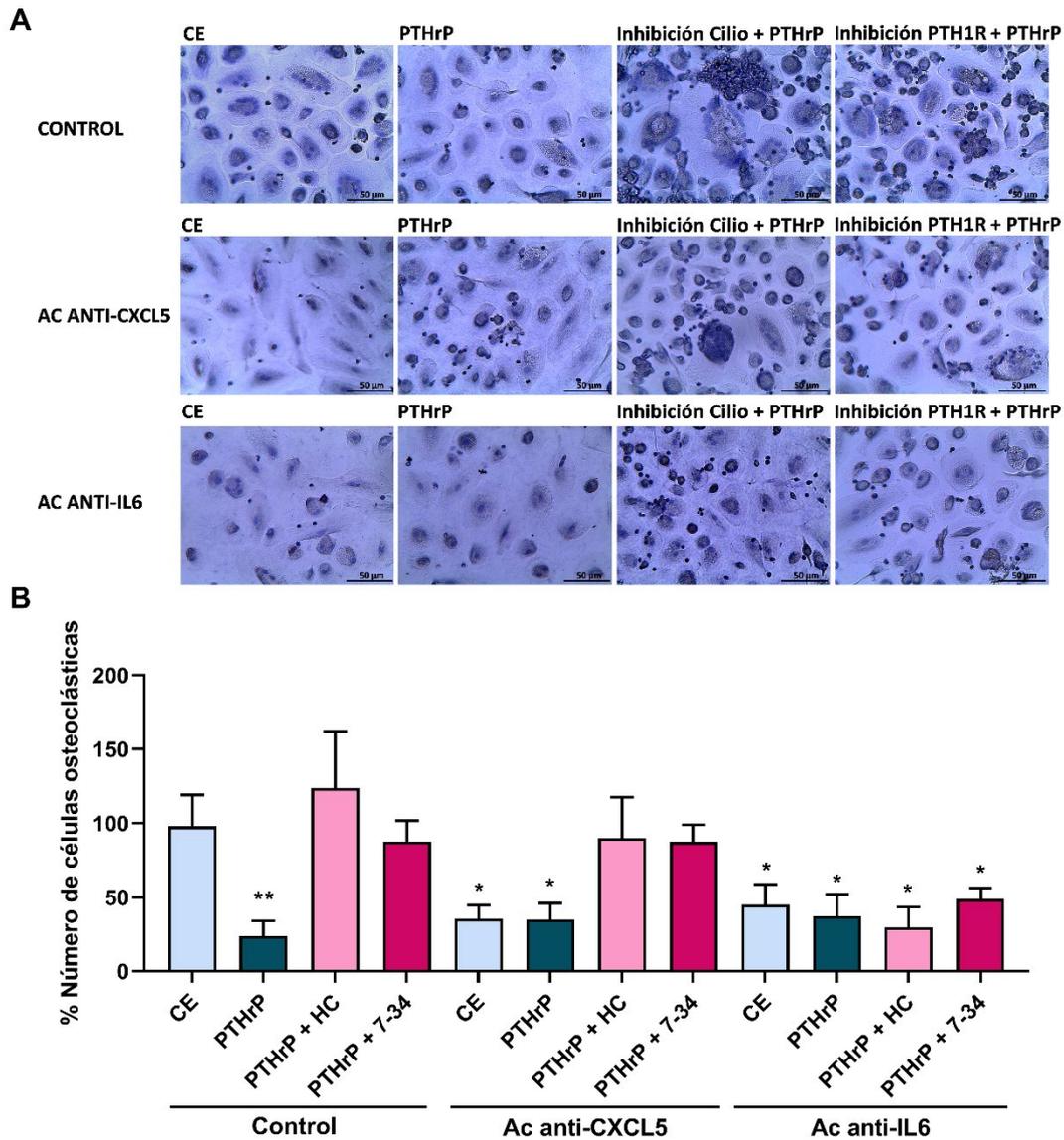
A



B

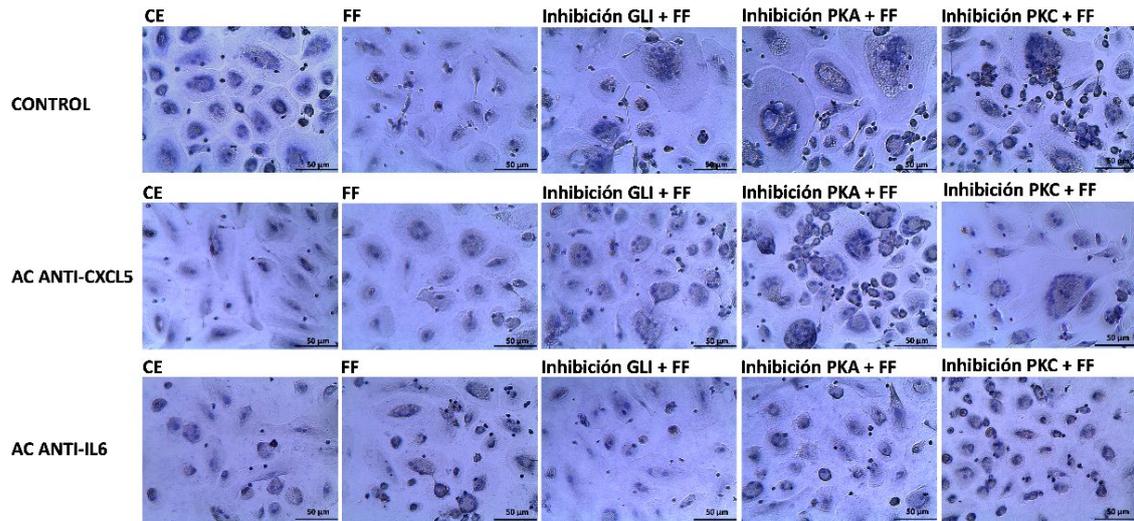


**Figura 31. La estimulación mecánica inhibe la diferenciación de los osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h y, posteriormente se trataron con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h. Luego, las células se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h y se añadió 2 μg/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1 μg/mL de anti-mIL-6. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes MC de las células MLO-Y4 al 20% con el anticuerpo neutralizante correspondiente. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el software ImageJ (B). Los resultados representan la media ± DE de 2 experimentos por triplicado de cada condición experimental. \*p<0,05 vs CE o vs correspondiente inhibición del cilio o PTH1R; \*\*p<0,01 vs CE. MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; FF: flujo de fluido; HC: hidrato de cloral; 7-34: PTHrP (7-34); DE: desviación estándar.

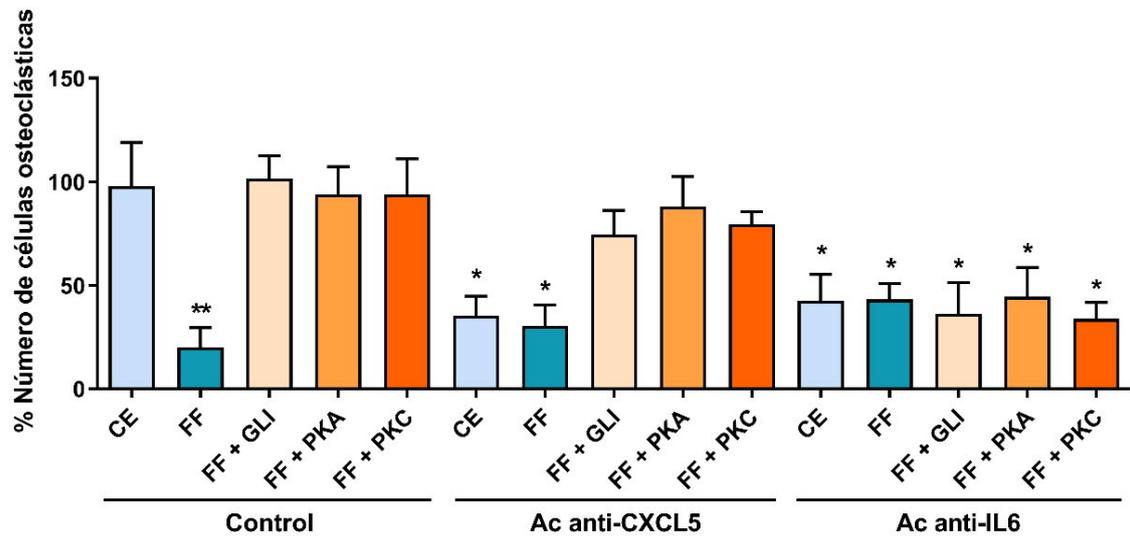


**Figura 32.** El estímulo con PTHrP (1-37) inhibe la diferenciación de los osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6. Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h y, posteriormente se trataron con hidrato de cloral 1 mM o con 100 nM de PTHrP (7-34) durante 1 h. Luego, las células se estimularon con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h y se añadió 2 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1 µg/mL de anti-mIL-6. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes MC de las células MLO-Y4 al 20% con el anticuerpo neutralizante correspondiente. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el software ImageJ (B). Los resultados representan la media ± DE de 2 experimentos por triplicado de cada condición experimental. \* $p < 0,05$  vs CE o vs correspondiente inhibición del cilio o PTH1R; \*\* $p < 0,01$  vs CE. MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; HC: hidrato de cloral; 7-34: PTHrP (7-34); DE: desviación estándar.

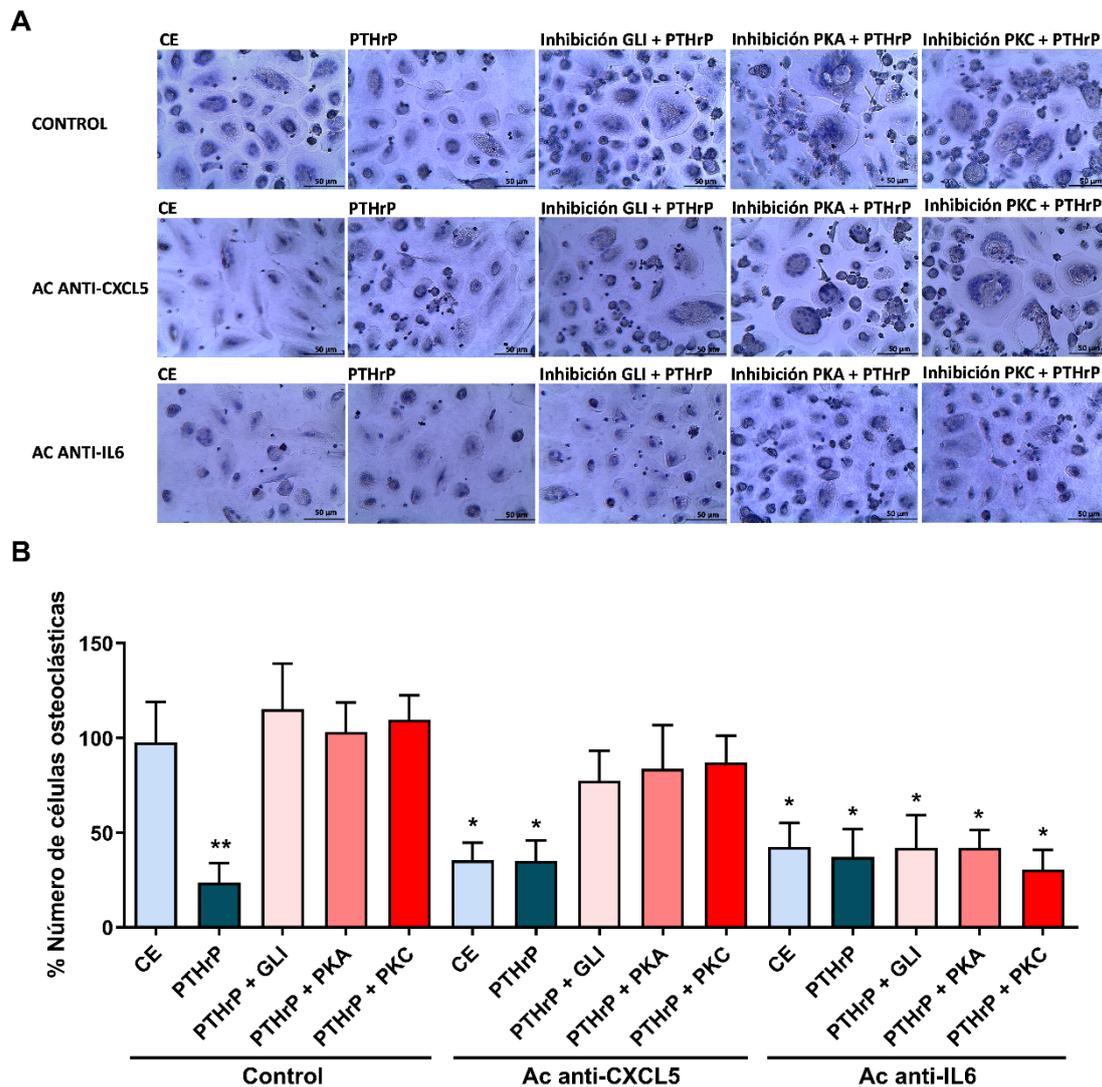
A



B



**Figura 33. La estimulación mecánica inhibe la diferenciación de los osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h y, posteriormente se trataron con 10 µM de GANT61, 100 µM del inhibidor del adenilato ciclasa SQ22536 o con 1 µM del inhibidor de la fosfolipasa C U73122 durante 1h. Luego, las células se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18h y se añadió 2 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1 µg/mL de anti-mIL-6. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes MC de las células MLO-Y4 al 20% con el anticuerpo neutralizante correspondiente. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el software ImageJ (B). Los resultados representan la media ± DE de 2 experimentos por triplicado de cada condición experimental. \**p*<0,05 vs CE o vs correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC; \*\**p*<0,01 vs CE. MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; FF: flujo de fluido; GANT61: GLI1-Antagonista 61; GLI: factor de transcripción de glioma 1; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; DE: desviación estándar.

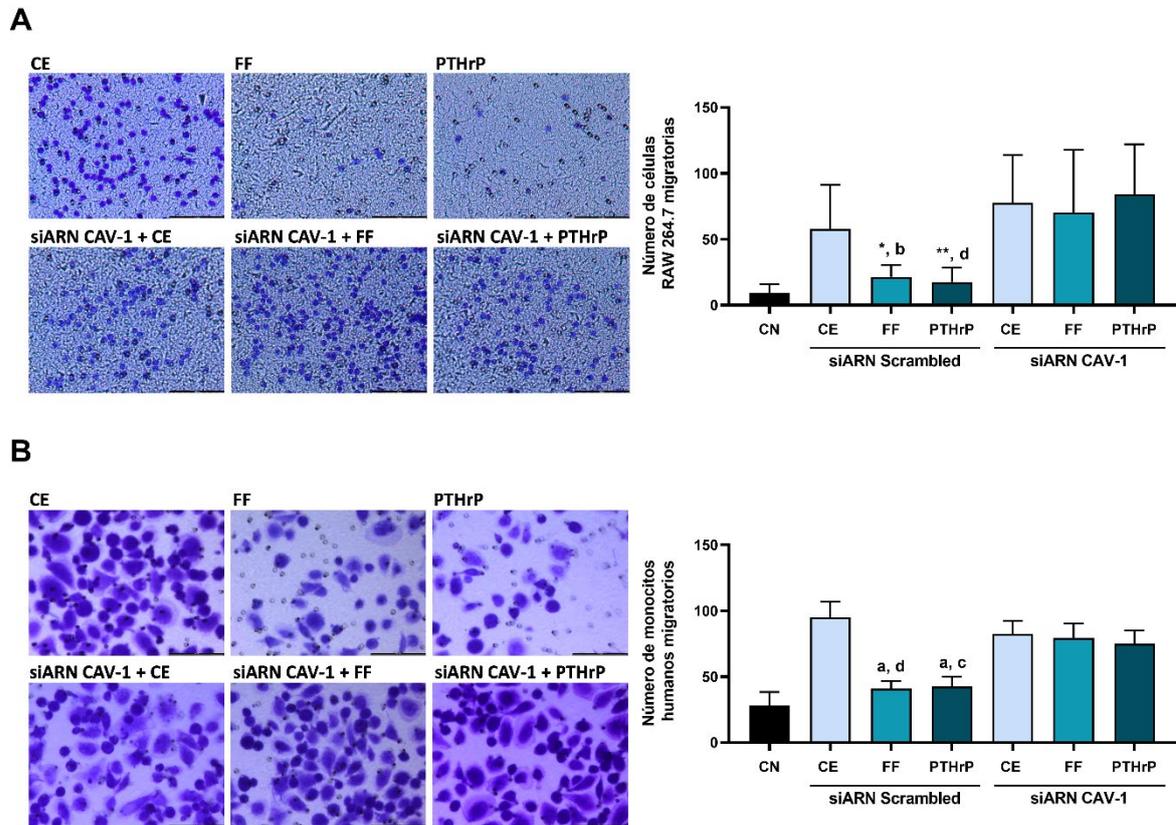


**Figura 34.** El estímulo con PTHrP (1-37) inhibe la diferenciación de los osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6. Las células osteocíticas MLO-Y4 se privaron de suero durante 24 h y, posteriormente se trataron con 10  $\mu$ M de GANT61, 100  $\mu$ M del inhibidor del adenilato ciclasa SQ22536 o con 1  $\mu$ M del inhibidor de la fosfolipasa C U73122 durante 1h. Luego, las células se estimularon con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h y se añadió 2  $\mu$ g/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1  $\mu$ g/mL de anti-mIL-6. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes MC de las células MLO-Y4 al 20% con el anticuerpo neutralizante correspondiente. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el software ImageJ (B). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 2 experimentos por triplicado de cada condición experimental. \* $p < 0,05$  vs CE o vs correspondiente inhibición de GLI, PKA o PKC; \*\* $p < 0,01$  vs CE. MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; GANT61: GLI1-Antagonista 61; GLI: factor de transcripción de glioma 1; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; DE: desviación estándar.

## **6. Implicación de las caveolas en la comunicación entre las células osteocíticas y los precursores osteoclasticos**

Otro de los objetivos de la Tesis Doctoral fue el estudio de la CAV-1, una proteína de membrana que interviene en la formación de las caveolas. Estudios previos indican que muchos GPCRs y subunidades de proteínas G se localizan en los dominios de las caveolas (327,328). Algunos estudios en células vivas han indicado que los componentes implicados en la señalización de las proteínas G residen en complejos de señalización preformados (329,330) y que CAV-1 puede alterar sus interacciones uniéndose específicamente a uno o más componentes (331). Por lo que, los dominios de las caveolas pueden desempeñar un papel necesario y significativo en la señalización de GPCR al mediar en la oligomerización de GPCR, en su asociación con agonistas y en su interacción con proteínas G intracelulares. Estudios anteriores han sugerido que las subunidades  $G\alpha_q$  residen en dominios caveolares mientras que, las subunidades  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_i$  y  $G\beta\gamma$  prefieren dominios no caveolares (328). Diversos receptores acoplados a proteínas G han sido identificados en las caveolas, tales como, el receptor de bradicinina tipo 2 ( $B_2R$ ), el receptor  $\mu$ -opioide ( $\mu OR$ ) (332), el receptor de péptido intestinal vasoactivo 2 ( $VPAC_2$ ) (333) y el receptor del péptido 1 similar al glucagón ( $GLP-1R$ ) (334). De modo que para determinar el efecto de las caveolas en la comunicación entre las células MLO-Y4 y los precursores osteoclasticos, se llevó a cabo ensayos de migración y de diferenciación hacia osteoclastos. Para ello se realizó el silenciamiento de *Cav-1* en las células MLO-Y4, y tras la estimulación por FF o PTHrP, se obtuvo el MC para utilizarlo en los ensayos mencionados anteriormente. Tal y como habíamos observado previamente (Figura 15), la migración de la línea celular de monocitos murinos RAW 264.7 se vio drásticamente inhibida por el MC de las células MLO-Y4 estimuladas por FF o PTHrP en comparación con la migración producida por el MC de osteocitos en condiciones estáticas. Por el contrario, los MC de osteocitos con *Cav-1* silenciada y estimulados por FF o PTHrP no mostraron efectos inhibitorios sobre la migración de los monocitos (Figura 35A). Del mismo modo, el MC de osteocitos estimulados por FF o PTHrP no fue capaz de

disminuir la migración de células monocíticas humanas cuando se silenció la *Cav-1* en los osteocitos (Figura 35B).

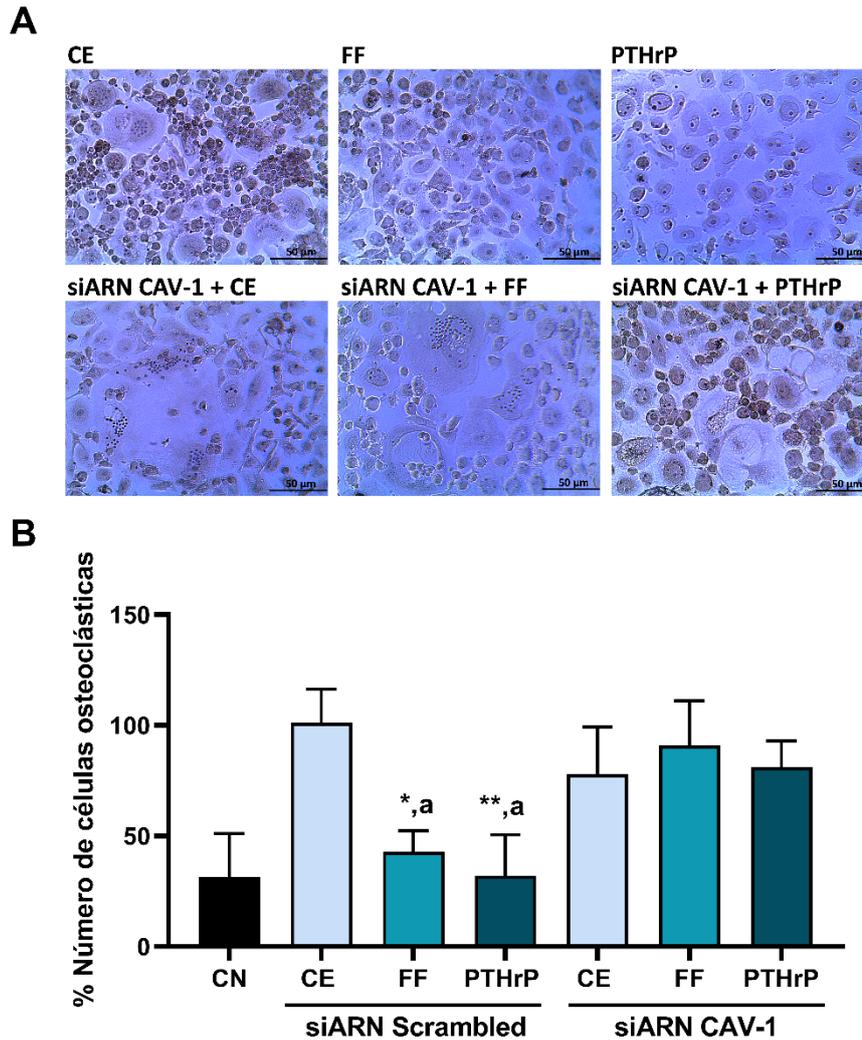


**Figura 35.** El MC de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente inhibe la migración de monocitos murinos y humanos por un mecanismo dependiente de CAV-1. Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con un siARN dirigido contra una secuencia específica del gen de *Cav-1* o con siARN *Scrambled* durante 6 h. Posteriormente, se privaron de suero durante 24 h, y las células se estimularon con flujo de fluido (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h. Para evaluar el número de células migratorias, se cultivaron células RAW 264.7 (A) o células monocíticas humanas obtenidas de la capa leucocitaria (B) en pocillos de tipo *Transwell* con un tamaño de poro de 8 μm. En el compartimento inferior se añadió un 20% de MC de las condiciones de estudio, extraídos de las células MLO-Y4. Tras 6 h, se fijaron las células, se tiñeron con cristal violeta y se contaron con un microscopio óptico invertido. Se representa el número de células monocíticas evaluadas con el software ImageJ (A-B). Los resultados son la media ± DE de 2 experimentos por triplicado. \**p*<0,05 vs CE, \*\**p*<0,01 vs CE, <sup>a</sup>*p*<0,0001 vs CE, <sup>b</sup>*p*<0,05 vs correspondiente silenciamiento, <sup>c</sup>*p*<0,01 vs correspondiente silenciamiento, <sup>d</sup>*p*<0,001 vs correspondiente silenciamiento. MC: medio condicionado; siARN: ARN de interferencia pequeño; CN: control negativo; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; CAV-1: caveolina 1; DE: desviación estándar.



Estos resultados muestran que la CAV-1 es necesaria para que el secretoma de los osteocitos estimulados por FF o PTHrP inhiba la migración de células monocíticas murinas RAW 264.7 y humanas.

A continuación, evaluamos el papel de CAV-1 en la osteoclastogénesis. Observamos que el silenciamiento de *Cav-1* revirtió los efectos inhibitorios del estímulo por FF y PTHrP sobre la diferenciación de osteoclastos (Figura 36A y B).

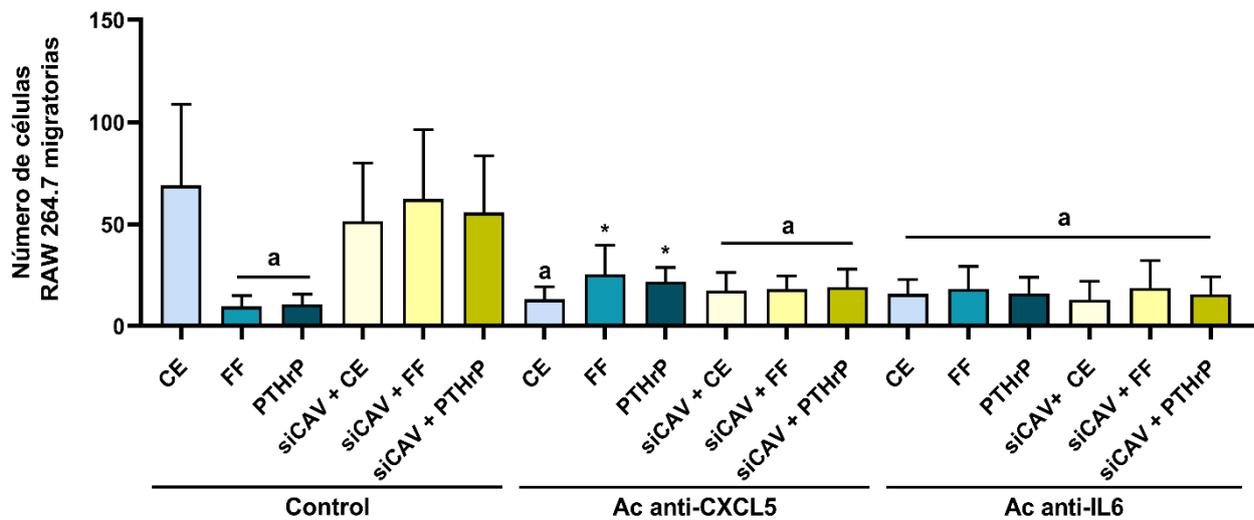


**Figura 36.** El secretoma de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente reduce la diferenciación de monocitos humanos hacia osteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CAV-1. Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con un siARN dirigido contra una secuencia específica del gen de *Cav-1* o con siARN *Scrambled* durante 6 h. Posteriormente, las células se privaron de suero durante 24 h, y se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18h. Para evaluar la diferenciación de las células monocíticas a osteoclastos, los monocitos humanos se trataron con 20 ng/ml de M-CSF y 20 ng/ml de RANKL más los correspondientes medios condicionados de las células MLO-Y4 al 20%. A continuación, se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con hematoxilina. La diferenciación de los monocitos humanos a osteoclastos se determinó mediante la evaluación de la morfología, observando la formación de células gigantes ( $\geq 50 \mu\text{m}$ ) con al menos 3 o más núcleos. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). Se representa el porcentaje de células con tres o más núcleos evaluado con el software ImageJ (B). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  vs CE; \*\* $p < 0,01$  vs CE; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs correspondiente silenciamiento de *Cav-1*. MC: medio condicionado; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B; CN: control negativo (-) RANKL y (+) medio  $\alpha$ -MEM; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; CAV-1: caveolina 1; DE: desviación estándar.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el secretoma de los osteocitos estimulados mecánicamente y con PTHrP inhibe el proceso osteoclastogénico de los monocitos humanos por un mecanismo dependiente de CAV-1.

#### **7. Papel de CXCL5 e IL-6 en el reclutamiento de precursores osteoclásticos en presencia o ausencia de caveolas en las células MLO-Y4**

Teniendo en cuenta el análisis proteómico realizado previamente, quisimos comprobar que efecto tenían las proteínas CXCL5 e IL-6 sobre el ensayo de migración tras el silenciamiento de la *Cav-1*. De modo que al medio condicionado obtenido de las células MLO-Y4 se les añadió los anticuerpos neutralizantes anti-CXCL5 o anti-IL-6, los cuales se utilizaron en el ensayo de migración con los monocitos de ratón RAW 264.7. Como se demostró anteriormente, los MC de osteocitos en condiciones estáticas favorecen la migración de los monocitos de ratón; un efecto que se inhibió mediante el pretratamiento de los medios condicionados de los osteocitos con el anticuerpo anti-CXCL5 o el anticuerpo anti-IL-6. El tratamiento del medio condicionado con el anticuerpo anti-CXCL5 o anti-IL-6 no sólo revirtió la migración en condiciones estáticas, sino también cuando se silenciaba *Cav-1*, tanto con el estímulo por FF como con el estímulo con PTHrP (1-37) (Figura 37).



**Figura 37. La estimulación mecánica y el estímulo con PTHrP (1-37) inhibe el reclutamiento de los monocitos murinos mediante un mecanismo dependiente de CXCL5 e IL-6.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con un siARN dirigido contra una secuencia específica del gen de *Cav-1* o con siARN *Scrambled* durante 6 h. Posteriormente, las células se privaron de suero durante 24 h, y se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 minutos. El MC se recogió al cabo de 18 h y se añadió 2 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-mCXCL5 o 1 µg/mL de anti-mIL-6. Para evaluar el número de células migratorias, se cultivaron células monocíticas RAW 264.7 en pocillos de tipo *Transwell* con un tamaño de poro de 8 µm. En el compartimento inferior se añadió un 20% de cada MC de las células MLO-Y4 más el anticuerpo neutralizante correspondiente. Tras 6 h, se fijaron las células, se tiñeron con cristal violeta y se contaron con un microscopio óptico invertido. Se representa el número de células monocíticas evaluadas con el software ImageJ. Los resultados son la media ± DE de 3 experimentos independientes. \*p<0,05 vs CE; <sup>a</sup>p<0,001 vs CE. MC: medio condicionado; CXCL5: quimioquina 5 con motivo C-X-C; IL-6: interleuquina-6; Ac: anticuerpo; CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; siCAV: silenciamiento de caveolina 1; DE: desviación estándar.

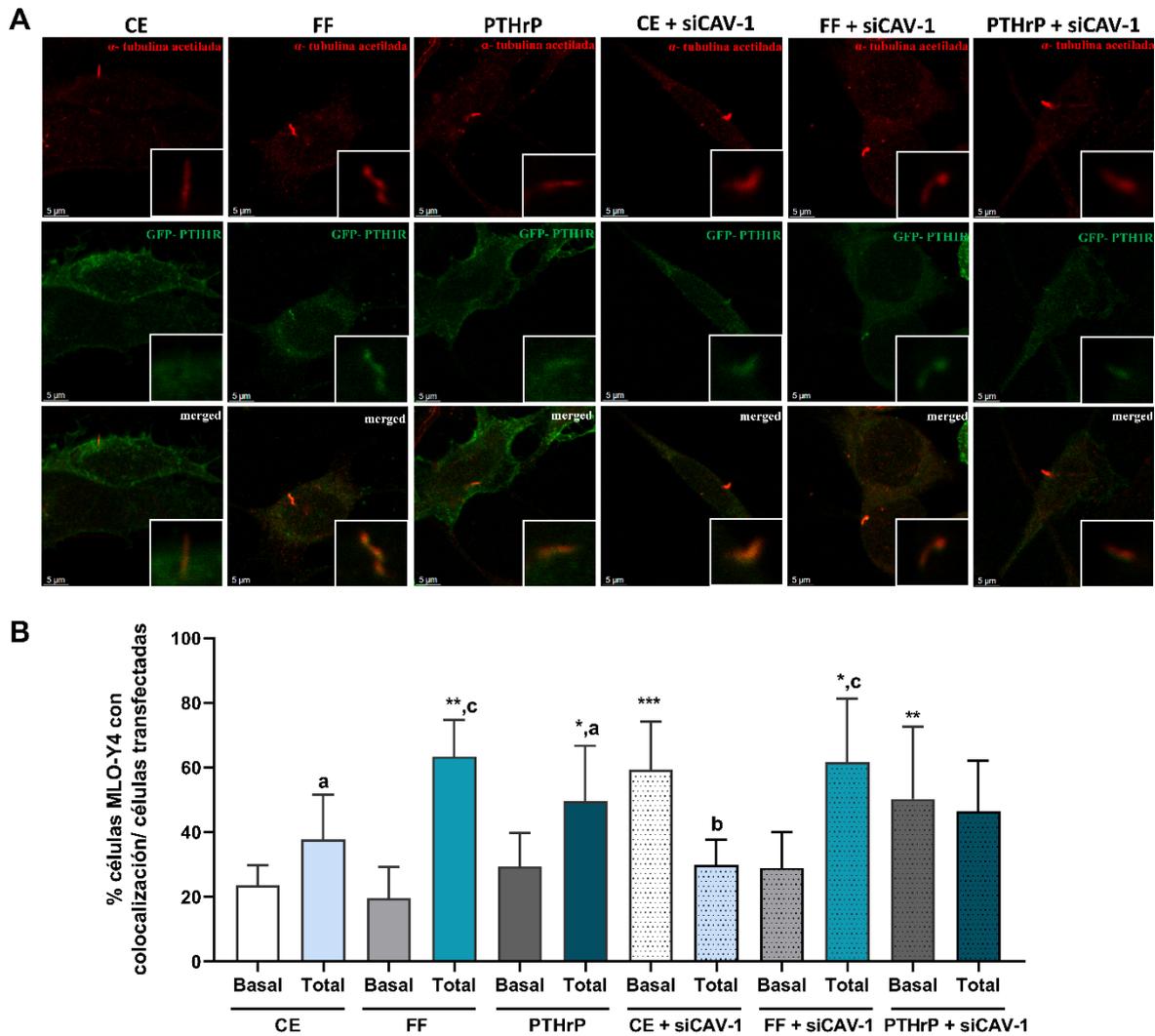
Estos hallazgos indican que, en ausencia de CAV-1, CXCL-5 e IL-6 median el reclutamiento de los precursores osteoclasticos.

## 8. Efectos de las caveolas en el cilio primario de las células osteocíticas MLO-Y4

Posteriormente, quisimos determinar si la ausencia de *Cav-1* en las células osteocíticas tenían algún efecto en el receptor PTH1R y en el cilio primario. Para ello, las células MLO-Y4 con silenciamiento de *Cav-1* se transfectaron con el plásmido *GFP**PTH1R*, y mediante inmunofluorescencia se marcó el cilio primario con el anticuerpo anti-tubulina α acetilada. Tal y como habíamos observado

previamente (Figura 18B y 19B), en condiciones estáticas las células MLO-Y4 ciliadas mostraban cierta colocalización entre PTH1R y el cilio primario. En cambio, tras la estimulación con FF y PTHrP aumentó el porcentaje de células osteocíticas ciliadas con colocalización entre el receptor y el cilio primario, mostrando mayor porcentaje de colocalización en toda la extensión del cilio. Cuando se silenció *Cav-1*, en condiciones estáticas, el 89% de las células osteocíticas ciliadas mostraban cierta colocalización entre PTH1R y el cilio primario. De ésta sólo el 30% fue colocalización a lo largo de todo el cilio primario, mientras que el 59% mostró colocalización sólo en la base. Cuando se estimuló con FF, el 91% de las células osteocíticas ciliadas manifestaron colocalización con PTH1R. De este porcentaje el 62% hizo referencia a localización en toda la extensión del cilio, mientras que el 29% fue colocalización sólo en la base. En el caso de la estimulación con PTHrP (1-37), el 97% de las células MLO-Y4 ciliadas presentaron colocalización entre el receptor y el cilio primario. De ésta el 47% fue colocalización a lo largo de todo el cilio primario, mientras que el 50% mostró colocalización sólo en la base del cilio (Figura 38A y B). Estos datos mostraron que tras el silenciamiento de *Cav-1* seguía produciéndose una alta colocalización entre PTH1R y el cilio primario, pero en CE la mayor colocalización se producía en la base del cilio, en la estimulación con FF la colocalización entre el receptor y el cilio se producía a lo largo de todo el orgánulo al igual que en su respectivo control, mientras que en la estimulación con PTHrP apenas se apreció diferencias entre la localización de PTH1R en la base o a lo largo de toda la extensión del cilio (Figura 38A y B).

Estos resultados muestran que la ausencia de *Cav-1* en las células osteocíticas MLO-Y4 afecta a la movilización basal de PTH1R en condiciones estáticas y con el estímulo con PTHrP (1-37), pero no al incremento de la presencia de PTH1R en el cilio primario tras el estímulo mecánico.



**Figura 38. Efecto de CAV-1 en la colocalización entre PTH1R y el cilio primario.** Las células osteocíticas MLO-Y4 se transfectaron con un siARN dirigido contra una secuencia específica del gen de *Cav-1* durante 6 h. También, se transfectaron con 1  $\mu$ g del plásmido *GFP-PTH1R* utilizando lipofectamina 3000 durante 4 h a 37°C, se privaron de suero durante otras 6 h y se estimularon con FF (10 dinas/cm<sup>2</sup>) o con 100 nM de PTHrP (1-37) durante 10 min. Para evaluar la colocalización de PTH1R con el cilio primario, las células se fijaron, permeabilizaron, bloquearon e incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-tubulina  $\alpha$ -acetilada de ratón. A continuación, las células se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con Alexa fluor 546. Se muestran imágenes representativas de cada condición (A). El porcentaje de células con colocalización de PTH1R justo en la base (basal) y en todo el cilio primario (total) se analizó en cada condición en células MLO-Y4 transfectadas con el plásmido *GFP-PTH1R* (B). Los resultados son la media  $\pm$  DE de triplicados. <sup>a</sup>p<0,05 vs la condición basal correspondiente; <sup>b</sup>p<0,01 vs la condición basal correspondiente, <sup>c</sup>p<0,001 vs la condición basal correspondiente, <sup>\*</sup>p<0,05 vs CE correspondiente, <sup>\*\*</sup>p<0,01 vs CE correspondiente, <sup>\*\*\*</sup>p<0,001 vs CE correspondiente. CE: control estático; FF: flujo de fluido; PTHrP: proteína relacionada con la PTH; siCAV: silenciamiento de caveolina 1; *GFP-PTH1R*: proteína verde fluorescente-PTH1R; PTH1R: receptor de tipo 1 de PTH; IgG: inmunoglobulina G; DE: desviación estándar.



# ***Discusión***



A pesar de la relevancia del remodelado óseo en la fisiopatología del hueso y el impacto en la sociedad que presentan las alteraciones de este proceso, aún no se comprenden en su totalidad los mecanismos que lo regulan. La identificación de factores que regulan la comunicación osteocito-osteoclasto y el estudio de los mecanismos que afectan a esta comunicación son necesarios para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

Diversos estímulos, entre ellos la estimulación mecánica y la activación de PTH1R por PTH o PTHrP controlan las acciones de las células óseas durante el proceso de remodelación ósea. Está ampliamente reconocida la importancia de la estimulación mecánica en la regulación del metabolismo óseo y el papel de los osteocitos como las principales células mecanosensoras del hueso. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* apoyan estos conceptos, y han establecido la preservación de la supervivencia osteocítica como un evento clave en la respuesta mecanotransductora en este escenario (41,121,124,291,335). En esta Tesis Doctoral, los estudios *in vitro* se han realizado utilizando las células osteocíticas MLO-Y4 de ratón. Se trata de una línea celular inmortalizada a partir de osteocitos de huesos largos de ratón generada por el grupo de la Dra. L. Bonewald, una investigadora pionera y experta en este tipo celular (301). Las células MLO-Y4 han sido y siguen siendo ampliamente utilizadas en estudios de osteocitos *in vitro*, ya que presenta una morfología dendrítica y cilio primario, además de un panel de expresión de marcadores génicos idénticos a los osteocitos *in vivo*, expresando altos niveles de osteocalcina, *E11* y *Cx43*, y una baja expresión de *Fa*. Sin embargo, la mayor limitación de dicha línea celular es la ausencia del marcador osteocítico SOST/esclerostina (336), un inhibidor esencial de la diferenciación de osteoprogenitores que actúa sobre la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (337). A pesar de esto, las células MLO-Y4 han demostrado ser adecuadas para llevar a cabo estudios de estimulación mecánica (121,338–340).

Dado que la comunicación osteocito-osteoclasto es un proceso clave en el mantenimiento fisiológico de la homeostasis ósea, en la presente Tesis Doctoral planteamos estudiar la interacción de PTH1R con los mecanorreceptores, cilio



primario y caveolas, en respuesta al estímulo mecánico y a PTHrP, y cómo esta interacción modula la comunicación osteocito-osteoclasto. En la presente Tesis Doctoral demostramos que PTH1R, el cilio primario y las caveolas en los osteocitos forman parte de la maquinaria molecular responsable de transducir la estimulación mecánica para disminuir la migración y la diferenciación osteoclástica, a través de la regulación de la secreción de las citoquinas CXCL5 e IL-6.

El receptor PTH1R se expresa en células del linaje osteoblástico en el hueso y es necesario para la formación y la remodelación ósea normal (341). La señalización de PTH1R ejerce efectos directos en los osteocitos, promoviendo tanto la formación ósea a través de la supresión de la esclerostina como la resorción osteoclástica a través de la inducción de RANKL (342). Los dos agonistas de PTH1R son la PTH, secretada por las glándulas paratiroides, y la PTHrP, secretada por una amplia variedad de tejidos, incluido el hueso, donde actúa localmente (135). La activación de PTH1R puede inducir el anabolismo óseo, tras una administración intermitente de PTH o PTHrP, o el catabolismo, tras una administración sostenida de PTH o PTHrP (131,135,186,225). En los últimos años, varios estudios han demostrado que PTH1R podría activarse directamente por estimulación mecánica. Zhang *et al.* demostraron que la tensión de cizallamiento conduce a cambios conformacionales independientes del ligando de PTH1R en células osteoblásticas MC3T3-E1 (184). Curiosamente, la PTH y la estimulación mecánica ejercen diferentes cambios conformacionales del receptor, lo que sugiere que, aunque ambos estímulos pueden estimular a PTH1R, los mecanismos subyacentes a la activación del receptor y sus respuestas intracelulares también pueden ser diferentes (184). En este sentido, un estudio previo de nuestro grupo demostró que la estimulación mecánica por choque hipotónico o flujo de fluido activa PTH1R de forma independiente del ligando (117). En ese estudio, se describió que el estiramiento mecánico estimulaba rápidamente (<1 min) el tránsito de  $Ca^{2+}$  intracelular en células HEK-293 y MLO-Y4 en las cuales se sobreexpresaba PTH1R. Además, la señalización de calcio no se vio afectada tras el silenciamiento del gen *Pthrp*,

pero sí que se inhibió al eliminar la expresión del gen de *Pth1r* (117). Estudios en roedores indican que el anabolismo óseo inducido por la administración intermitente de PTH se potencia en combinación con la estimulación mecánica (140,343); esta interacción funcional entre la activación de PTH1R por PTH y el estímulo mecánico se ha confirmado *in vitro* en cultivos primarios de osteoblastos y osteocitos utilizando sistemas de estiramiento celular (*stretching*) (344,345). Por otro lado, también se ha descrito que la carga mecánica como el ejercicio físico y los péptidos PTH/PTHrP pueden potenciar sinérgicamente sus acciones entre sí (140,186,346–349). De hecho, la actividad física como correr o nadar induce la secreción transitoria de PTH (346), y la estimulación mecánica aumenta la producción de PTHrP en los osteocitos, lo que podría inducir la activación de PTH1R (117,350). De forma similar, la acción anabólica de PTH o PTHrP se ve potenciada por la carga mecánica (140,186). Todos estos antecedentes en su conjunto apuntan a la capacidad de PTH1R para integrar señales mecánicas y hormonales y así favorecer la formación de hueso.

El cilio primario actúa como mecanosensor, recibiendo señales mecánicas y transduciéndolas a través de su maquinaria específica. El cilio primario es una protuberancia única, no móvil de la membrana celular que se forma durante la fase quiescente del ciclo celular y funciona como una antena. Existe un gran número de receptores y canales iónicos que se unen a la membrana del cilio primario. Además, se ha demostrado que el cilio primario media en la formación ósea inducida por la carga mecánica, (226,238) coordinando la proliferación de osteoblastos y la reposición continua de estos a partir de poblaciones de células madre mesenquimales en respuesta a factores paracrinos secretados por los osteocitos mecanosensibles (223,351). Este orgánulo también se ha visto implicado en el reclutamiento de osteoblastos estimulados mecánicamente y, en su posterior diferenciación a osteocitos maduros (223,352). Recientemente hemos demostrado que PTH1R se localiza en el cilio primario, tanto en condiciones de control estático como estimuladas por PTHrP en células osteocíticas y en osteoblastos (226). Además, un estudio reciente ha demostrado que el estímulo mecánico promueve el transporte de PTH1R al cilio



primario, aumentando la señalización de PTH en células del núcleo pulposo del disco intervertebral (187). En la presente Tesis Doctoral, se ha descrito la redistribución de PTH1R a lo largo de todo el cilio primario tras la estimulación mecánica por FF en células óseas. Los presentes datos sugieren que la estimulación mecánica puede aumentar la eficacia de PTHrP potenciando una distribución más accesible de su receptor, PTH1R, a estímulos mecánicos externos, así como los agonistas naturales de PTH1R. Esto podría explicar, al menos en parte, la eficacia terapéutica del tratamiento combinado de PTH o PTHrP y estimulación mecánica para preservar la masa y la calidad óseas (353,354).

En la presente Tesis Doctoral se ha determinado que la estimulación mecánica por FF incrementa la longitud del cilio primario en células osteocíticas MLO-Y4. Un estudio previo indica que el aumento en el número de células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica podría estar mediado por la expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2, el cual se ha descrito como un inductor de la ciliogénesis y de la activación de la vía de señalización de *Hedgehog* (355). Este factor de transcripción está implicado en las propiedades mecánicas del hueso y en la formación ósea en respuesta a la estimulación mecánica (356). Otro estudio ha demostrado que las interacciones hidrodinámicas tienen la capacidad de incrementar la longitud del cilio primario en células renales (357). Se ha sugerido que este proceso implica una disminución en los niveles de  $Ca^{2+}$ , un aumento en los niveles de AMPc y PKA (227), así como la regulación de la vía de señalización m-TOR (358,359). No obstante, hasta el momento, los resultados sobre la regulación de la longitud del cilio por esta vía han sido contradictorios. Por un lado, se ha observado que el inhibidor de m-TOR, rapamicina, induce la ciliogénesis pero al mismo tiempo acorta la longitud del cilio primario de células epiteliales humanas (360). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de m-TOR incrementa la longitud del cilio primario en células fibroblásticas embrionarias de ratón (361), y que la activación de m-TOR en osteoblastos puede producirse por flujo de fluido pulsante y por IGF-1 (362). En contraste, otros estudios realizados en células

epiteliales renales y endoteliales han indicado que la rapamicina provoca un aumento en la longitud del cilio primario, lo que aumenta la sensibilidad a la estimulación por el flujo de fluido (359). En otros estudios, se utilizó fenoldopam, un agonista de los receptores dopaminérgicos de tipo D1, el cual aumentó la longitud del cilio primario en células osteocíticas, además de rescatar la forma y la función del cilio en células que presentaban este orgánulo deteriorado (363). Además, el fenoldopam es capaz de potenciar la mecanosensibilidad de los osteocitos a través de la elongación del cilio primario, promoviendo la señalización pro-osteogénica entre los osteocitos y los osteoblastos para mejorar la formación ósea en animales con osteoporosis (364). Otro estudio ha determinado que los receptores y enzimas involucrados en la vía de señalización Notch también se pueden encontrar localizados en el cilio primario (365), por lo que la activación de Notch puede modular la formación del cilio (366), aumentar su longitud (367) e inducir la vía de señalización de *Hedgehog* mediante la acumulación de la proteína SMO en el cilio (368,369). Por lo tanto, en respuesta a estímulos mecánicos, Notch podría ser otro candidato para regular las propiedades del cilio primario en las células óseas. Por otro lado, en un estudio donde se producía la alteración de la estructura del cilio primario mediante el tratamiento con hidrato de cloral o con siARN *Polaris* en las líneas celulares MC3T3-E1 y MLO-Y4 se redujo las respuestas celulares al flujo de fluido, como la expresión génica de osteopontina inducida mecánicamente, los niveles extracelulares de PGE<sub>2</sub> y el ratio *Opg/Rankl* (224). Basándonos en estas observaciones y considerando la función del cilio primario como un centro organizador de señalización, es posible que el aumento del porcentaje de células osteocíticas con cilio y el incremento de la longitud del cilio primario observados en esta Tesis Doctoral en respuesta a la estimulación por FF puedan potenciar la señalización inducida por el receptor PTH1R en presencia de su ligando. En este contexto, se ha observado que PTHrP ejerce efectos aditivos a la carga mecánica en el aumento de la formación ósea y la prevención de la apoptosis de los osteocitos a través de la activación de la proteína quinasa ERK1/2 y la translocación nuclear de la proteína  $\beta$ -catenina (186). Sin embargo, diversos estudios en los que se evalúa la combinación entre PTH (administrada de forma



intermitente) y la estimulación mecánica muestran resultados distintos en cuanto a los posibles efectos aditivos o sinérgicos de ambos estímulos. Sugiyama *et al.* señalaron específicamente que no observaron un efecto sinérgico entre PTH y la carga mecánica en el hueso trabecular (140). En cambio, los estudios de Chow *et al.* y Kim *et al.* si observaron un efecto sinérgico entre ambos estímulos (370,371). Un estudio más reciente, ha demostrado que los efectos aditivos o sinérgicos de PTH y la carga mecánica dependen del compartimento óseo específico y del régimen metabólico (348), lo cual puede explicar las discrepancias de los resultados expuestos anteriormente.

La carga mecánica desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la calidad y la cantidad de hueso, y los osteocitos son fundamentales para percibir la estimulación mecánica (353,354). Los osteocitos responden a la estimulación mecánica liberando proteínas que regulan la actividad de osteoclastos y osteoblastos, como la esclerostina, RANKL, OPG y M-CSF. Estos factores paracrinos pueden regular la diferenciación osteoclástica a partir de precursores monocíticos (97,98,372). En este sentido, RANKL y M-CSF promueven la diferenciación y la actividad de los osteoclastos (45). Las células osteocíticas MLO-Y4 promueven la formación de osteoclastos aumentando RANKL unido a la superficie y secretando M-CSF (44,373,374). La producción de RANKL, M-CSF y OPG en los osteocitos es regulada por la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. Los osteoblastos diferenciados también regulan la formación de osteoclastos mediante la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, que inhibe la secreción de la molécula señuelo de RANKL, OPG (375). Otros factores derivados de los osteocitos que contribuyen a la diferenciación y función de los osteoclastos son IL-6, TNF- $\alpha$  (probablemente a través de osteocitos apoptóticos) y HMGB1 (83). Muchas citocinas inflamatorias regulan la osteoclastogénesis, por ejemplo, IL-4 e IL-10 inhiben la formación de osteoclastos, mientras que el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) y MCP-1 la estimulan (376–378). Recientemente se está estudiando que el control que ejerce los osteocitos en la osteoclastogénesis puede ocurrir también por mecanismos independientes de RANKL/OPG (379). En la presente Tesis Doctoral, demostramos que el

secretoma de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente por FF inhibe la migración y diferenciación de los preosteoclastos mediante un mecanismo dependiente de PTH1R y del cilio primario.

El análisis proteómico y los experimentos de neutralización mostrados en la presente Tesis Doctoral apuntan a CXCL5 como una citocina regulada por los osteocitos que, cuando es secretada, controla la migración y diferenciación de los osteoclastos. CXCL5 es una quimioquina implicada en el reclutamiento de leucocitos (380,381). Esta quimioquina se une al receptor CXC1 y al receptor CXC2, ambos expresados en los precursores de osteoclastos (382,383). Además, se ha descrito que CXCL5 modula la expresión de CXC1 y puede tener un papel funcional en el aumento de los niveles de expresión de *RANKL* en las células estromales/preosteoblásticas. Estos resultados indican un papel funcional de CXCL5 en el aumento de los niveles de expresión de *RANKL* asociados a la enfermedad ósea de Paget, la cual presenta zonas muy localizadas de recambio óseo con una mayor actividad de los osteoclastos (384). Otro estudio muestra que la microgravedad promueve la formación de osteoclastos mediante la inducción de la expresión de sincitina-A en células preosteoclásticas RAW 264.7 sin estimulación de *RANKL*. Este estudio determina que la expresión de sincitina-A es regulada por factores osteotrópicos como CXCL5 en condiciones de microgravedad. De modo que CXCL5 favorece la formación de osteoclastos a través de sincitina-A (385). Sin embargo, en la presente Tesis Doctoral, cuando se silenció el gen *Pth1r*, la secreción de CXCL5 no se vio afectada, aunque los efectos de FF sobre la migración y diferenciación de los osteoclastos se invirtieron por completo. Esta observación sugiere que la secreción de CXCL5 depende en gran medida de la estimulación mecánica, pero no cambia si PTH1R está activado o no.

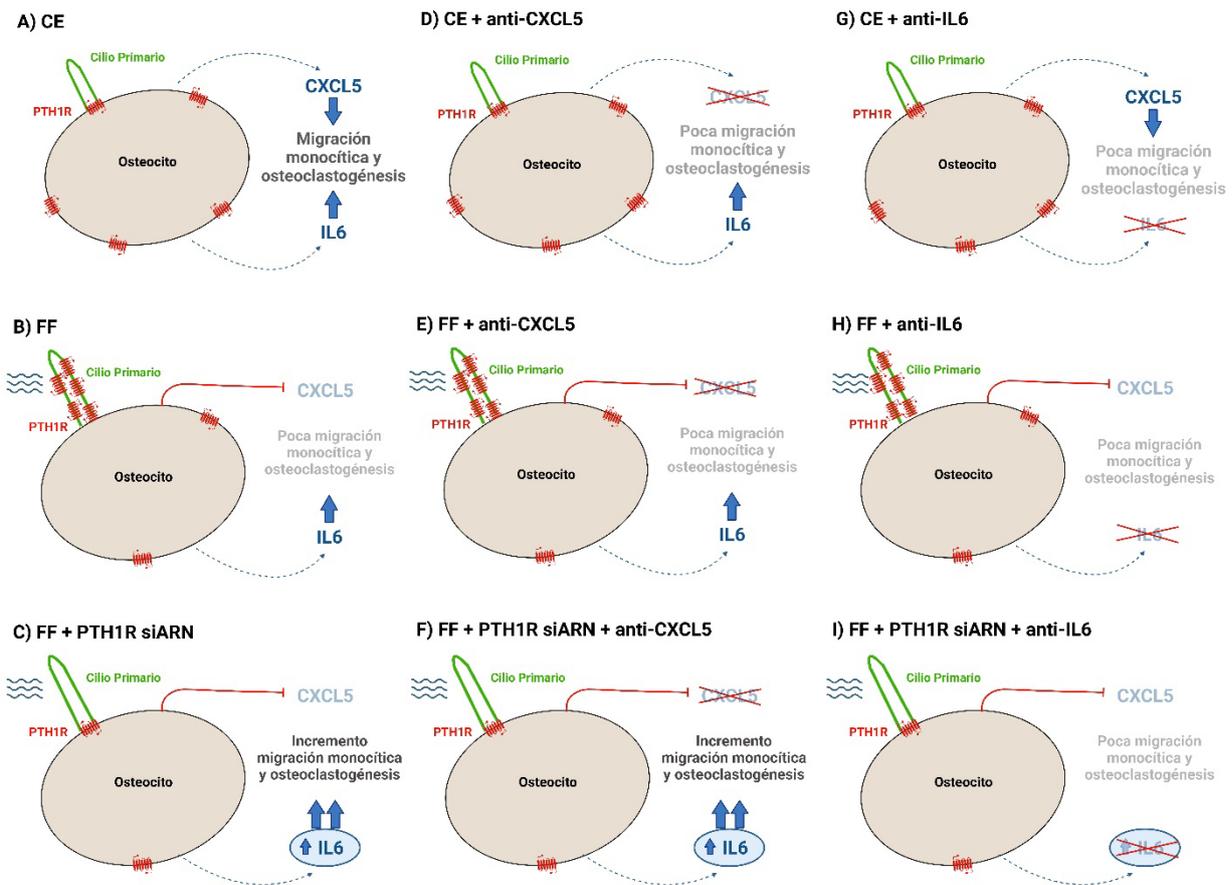
También observamos que la secreción de IL-6 aumentó cuando se silenció *Pth1r*, tanto en condiciones estáticas como tras FF. Es bien conocido el papel de la IL-6 como inductor de la osteoclastogénesis mediada por osteocitos mediante la actividad de JAK2 y *RANKL* (386). Un estudio ha demostrado que el aumento



en la secreción de IL-6 por células osteocíticas apoptóticas promueve el reclutamiento de precursores osteoclasticos. Esto es debido a que la secreción de IL-6 promueve la expresión endotelial de ICAM-1 y la adhesión de los precursores osteoclasticos (387). El estudio de Kazuhiro demostró que la combinación de TNF e IL-6 puede inducir la reabsorción ósea en células similares a los osteoclastos (388). De hecho, IL-6 desempeña un papel importante como regulador durante la osteoclastogénesis y la resorción y regeneración óseas (387). De forma similar a este estudio, la formación de osteoclastos se vio potenciada tras la secreción tanto de IL-6 como del receptor soluble de IL-6 (389). En concordancia, en esta Tesis Doctoral demostramos que el anticuerpo neutralizante de IL-6 disminuyó la migración y diferenciación celular cuando se inhibió PTH1R. Sin embargo, el anticuerpo neutralizante de CXCL5 no tuvo ningún efecto a este respecto.

Por otro lado hemos observado que el silenciamiento de *Pth1r* se asocia a un aumento de la migración de monocitos y de la osteoclastogénesis, así como a un aumento de la secreción de IL-6 por parte de los osteocitos, a pesar de que las células fueron estimuladas por FF. Dado que la neutralización de IL-6 en estas condiciones disminuye tanto la migración como la diferenciación de osteoclastos, estos datos sugieren que la secreción de altos niveles de IL-6 puede superar la baja secreción de CXCL5 dependiente de FF y mantener la migración de monocitos y la osteoclastogénesis. De forma similar, demostramos que la inhibición del cilio primario también se asoció con un aumento de la función osteoclastica, incluso en condiciones de estimulación mecánica, y la neutralización de la IL-6 revirtió este efecto. Colectivamente, estos datos sugieren que la inhibición del cilio primario podría inducir una elevada secreción de IL-6 que supere la baja secreción de CXCL5, como ocurre cuando se silencia *Pth1r*. Sin embargo, también es posible que el cilio primario en condiciones de FF module otras citoquinas alternativas implicadas en la comunicación osteoclastica. Aun así, la neutralización de IL-6 fue suficiente para prevenir la migración y diferenciación de los precursores de osteoclastos.

Nuestros hallazgos apoyan que el cilio primario funcional y PTH1R son necesarios en los osteocitos para regular el secretoma de estas células y su comunicación con los osteoclastos. Así, los osteocitos estimulados mecánicamente inhiben el reclutamiento y la diferenciación de osteoclastos mediante la disminución de la secreción de CXCL5, mientras que la activación de PTH1R y del cilio primario en los osteocitos regulan a los osteoclastos a través de la modulación de la secreción de IL-6 (Figura 39).



**Figura 39. Mecanismo propuesto para la regulación del reclutamiento y de la diferenciación de osteoclastos por el cilio primario y PTH1R en osteocitos.** La presencia tanto de un cilio primario funcional como de PTH1R en los osteocitos es necesaria para una correcta comunicación con los osteoclastos. La estimulación mecánica inhibe el reclutamiento y la diferenciación de los osteoclastos a través de CXCL5, mientras que la activación de PTH1R regula a los osteoclastos a través de IL-6. CE: control estático; FF: flujo de fluido; CXCL5: ligando de quimioquinas con motivo C-X-C 5; IL-6, interleuquina-6; PTH1R siARN: silenciamiento del receptor de tipo I de la hormona paratiroidea.



Otra proteína presente en el secretoma de los osteocitos fue PLAU, una proteasa de serina involucrada en la migración celular y en el remodelado tisular (316). Además, parece ser un regulador clave en la inflamación tisular y en la reparación tras una lesión (390). Un estudio determinó que PLAU derivado de macrófagos desempeña un papel fundamental en la quimiotaxis de estas células hacia el músculo lesionado, además de su función en la invasión de la matriz, favoreciendo una regeneración muscular eficaz (391). Otro estudio muestra que PLAU puede desempeñar un papel significativo en la regulación de las respuestas migratorias de los queratinocitos en un entorno hipóxico (392). Nonaka *et al.* mostraron que la estimulación de una línea de células de osteosarcoma con factores de resorción ósea tales como: PTH, PGE<sub>2</sub> o TNF- $\alpha$  mejoran la secreción y actividad de PLAU en el medio condicionado (393). Las células de osteosarcoma además de secretar PLAU también expresan sitios de unión específicos para esta proteína en su superficie celular, lo cual es modulado por AMPc y PKC (394). Otro estudio determinó que los macrófagos son necesarios para la formación de vasos de tipo H durante la regeneración ósea en ratones, y que este proceso puede estar mediado por la liberación de PLAU y TGF- $\beta$ 1 por parte de los macrófagos (395). En el secretoma analizado de las células osteocíticas MLO-Y4 objeto de esta Tesis Doctoral, encontramos que la proteína PLAU experimentaba un incremento en su secreción cuando se silenciaba *Pth1r* independientemente de la estimulación por flujo de fluido. Más estudios son necesarios para entender la implicación de esta regulación en el metabolismo óseo.

La vía de señalización Hh modula la formación y el remodelado óseo en respuesta a estimulación mecánica, de manera dependiente del cilio primario (396). Diversos miembros de la vía Hh, entre ellos GLI1 ha sido identificado 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 (397). También se han demostrado interacciones entre Hh y la señalización inducida por PTHrP en condrocitos y osteoblastos en un estadio temprano de diferenciación (398,399), 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 (398). Por otro lado, la activación constitutiva del receptor PTH1R inhibe la diferenciación condrogénica inducida por Hh a través de la inhibición de PKA (399). También se ha demostrado que niveles altos de señalización Hh mantenidos en el tiempo en osteoblastos maduros co-cultivados con precursores mononucleares incrementan la osteoclastogénesis (400). 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 predomina la resorción ósea, lo que genera un hueso frágil y poroso (400). En este contexto, otros estudios han demostrado que la administración continua de PTH induce la liberación de diversos factores de crecimiento, como TGF- $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  para inducir la diferenciación de células CD4<sup>+</sup> nativas a células Th17 (54), células que promueven la osteoclastogénesis mediante la secreción de IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (401). Todo ello conlleva la inducción de la expresión de *Rankl* en las células del linaje osteoblástico, incluyendo los osteocitos (402). 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. 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 (403). De forma similar, en esta Tesis Doctoral demostramos que el secretoma de las células MLO-Y4 en las cuales se había producido la inhibición de GLI1 se produjo un incremento tanto en la migración como en la diferenciación de los precursores osteoclasticos.

Las caveolas, y su proteína esencial CAV-1, están implicadas en diferentes procesos de mecanotransducción de señales. Un estudio de Rizzo designó a las caveolas como centros mecanosensores debido al gran número de receptores



dentro de ellas y a la observación de una activación significativa de e-NOS en caveolas aisladas (404). Las caveolas participan en la respuesta a diferentes señales mecánicas provenientes del ambiente extracelular, tales como las fuerzas de cizallamiento ejercidas por el flujo sanguíneo sobre las células endoteliales (405), la pérdida de adhesión al sustrato en fibroblastos (406) y el aumento de la tensión en la membrana plasmática por estiramiento de las células endoteliales de pulmón o por variaciones en el volumen a raíz de cambios en la osmolaridad extracelular (281). La traducción de fuerzas mecánicas en señales intracelulares se lleva a cabo mediante complejos moleculares ensamblados en dominios ricos de caveolina en la membrana plasmática y compuestos de integrinas, proteínas del citoesqueleto y quinasas, incluyendo quinasas de adhesión focal (FAK) y SCR, dando lugar a la activación de la vía ERK y a la supervivencia de los osteocitos (14). Se ha demostrado la interacción entre las vías de señalización de CAV-1/ERK1/2 y la vía canónica de Wnt en relación con el bloqueo de la apoptosis osteocítica tras la estimulación mecánica en estas mismas células; señalando a la estabilización de  $\beta$ -catenina (<15 min) como un importante mediador de la protección osteocítica en estas condiciones (291).

Las caveolinas actúan como proteínas de andamiaje en complejos multiproteicos y están implicadas en la señalización de los GPCRs. Varios estudios han demostrado que las caveolas retienen GPCR, subunidades de proteínas G, sistemas de enzimas efectoras e incluso arrestinas (327,328). Sin embargo, la principal vía de señalización de la proteína G que se cree que está regulada dentro de las caveolas a través de la interacción con CAV-1 es la señalización de  $G\alpha_q$  y  $Ca^{2+}$ , por la que CAV-1 prolonga la activación de  $G\alpha_q$ , e incluso puede dirigir ciertos receptores acoplados a  $G\alpha_q$  a las caveolas (328,331,332). Otro estudio sugiere que la señalización del  $\beta_{3a}$ -adrenoceptor depende de CAV-1, ya que la interacción de este receptor con la caveolina inhibe el acoplamiento a las proteínas  $G\alpha_{i/o}$ , sugiriendo que la señalización está modulada por un complejo enriquecido en balsas que contiene  $\beta_{3a}$ -adrenoceptor, CAV-1,  $G\alpha_s$  y adenilil ciclasa (407). Otros estudios determinan la existencia de múltiples microdominios ricos en caveolinas y su expresión en múltiples

moduladores de la señalización, reforzando la evidencia de que las caveolinas y las caveolas organizan y regulan la transducción de señales GPCR en células eucariotas (408). También se ha determinado que el receptor de endotelina subtipo A (ET<sub>A</sub>) acoplado a proteína G colocaliza con caveolina en microparches en la membrana plasmática o cerca de ella, en ausencia de ligando. Esto demuestra un papel funcional de las caveolas de la membrana plasmática en la transducción de señales por este receptor acoplado a proteína G (409). Otro estudio propone que las caveolas pueden constituir una estructura ideal para evitar la exposición de los receptores de membrana mecanosensibles a la tensión de cizallamiento por fluido en el torrente sanguíneo, permitiendo un control diferencial del flujo y de la activación por ligando del receptor FLK-1 en presencia de ligandos (410). En otro estudio en el que se utilizaron imágenes de superresolución de las caveolas sometidas a presión osmótica para visualizar su deformación indicó que las vías de las proteínas G son sensiblemente diferentes al estrés osmótico. La deformación de las caveolas producida por un estrés osmótico leve elimina la capacidad que tienen las caveolas para estabilizar las señales de calcio mediadas a través de G $\alpha_q$  y el B<sub>2</sub>R, pero esta deformación no afecta a las señales de AMPc mediadas a través de G $\alpha_i$  y el receptor adrenérgico  $\beta_2$  ( $\beta$ AR) (411).

En relación a la migración celular, se ha demostrado que la CAV-1 está implicada en la progresión del cáncer. La ausencia de *Cav-1* frenó la migración e invasión de células de adenoma hipofisario (412). Otro estudio determinó que la ausencia de *Cav-1* también disminuye significativamente la capacidad migratoria y la habilidad de invasión de células de cáncer de mama (413). Pero, en células de cáncer colorrectal humanas la sobreexpresión de *Cav-1* significativamente reduce la proliferación, migración e invasión de estas células (414). También se ha determinado que tras la depleción de CAV-1, se reduce el comportamiento migratorio de las células epiteliales hepáticas cuando se cultivan en monocapas (415). En cambio, en células madre mesenquimales un estudio demostró que la sobreexpresión de *Cav-1* promovió su proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*. El trasplante de células madre mesenquimales que



sobreexpresaban *Cav-1* facilitó la expresión de diversos factores de crecimiento y citoquinas inmunorreguladoras, acelerando la cicatrización de heridas por quemaduras de segundo grado en un modelo de lesión por quemadura en ratas (416). En otro estudio la delección de *Cav-1* indujo alteraciones en el entorno de las células madre hematopoyéticas y aumentó su número, pero alteró la capacidad de estas células para diferenciarse en células sanguíneas maduras (417). Como se ha comentado anteriormente algunos estudios muestran una reducción de la migración tras la pérdida de CAV-1 mientras que otros estudios constatan un aumento de la migración (418). Esta aparente contradicción puede deberse a la falta de discriminación entre la función de la CAV-1 dentro y fuera de las caveolas.

En cuanto a la formación de osteoclastos hay estudios que muestran que la CAV-1 desempeña un papel crucial en la regulación de la osteoclastogénesis, ya que CAV-1 está regulada por RANKL (419,420). Ratones con silenciamiento de *Cav-1* en los macrófagos derivados de la médula ósea presentaron una reducción de la osteoclastogénesis y una inducción de NFATc1. Además, una inyección de siARN de *Cav-1* en las calvarias de ratones mostró una reducción de la resorción ósea y de la formación de osteoclastos inducida por RANKL (420). Otro estudio determinó que el silenciamiento de *Cav-1* en macrófagos derivados de médula ósea inhibió la osteoclastogénesis y también disminuyó la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos y la inducción de NFATc1 por RANKL (421). En cambio, en la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que el secretoma de células MLO-Y4 estimuladas mecánicamente por FF y por PTHrP (1-37) inhibe la migración y diferenciación de los preosteoclastos mediante un mecanismo dependiente de CAV-1.

La mayoría de los estudios sobre CAV-1 asocian sus funciones a las caveolas, aunque cada vez hay más pruebas de que CAV-1 también contribuye a la regulación celular fuera de las caveolas (269). En la membrana plasmática, las caveolinas desempeñan funciones importantes como organizadores moleculares que promueven las interacciones heterotípicas de proteínas y

lípidos para modular la difusión molecular y el recambio de dominios funcionales. Los dominios de CAV-1 regulan el reclutamiento, la dinámica y el intercambio de glicoproteínas y lípidos entre microdominios de membrana (269). Un estudio reveló que CAV-1 estabiliza las invaginaciones no caveolares, siendo capaces de responder a fuerzas mecánicas medias-bajas, influyendo en la mecanotransducción posterior y confiriendo mecanoprotección a las células desprovistas de caveolas (422). Recientemente se ha demostrado que las caveolinas se localizan en la base del cilio primario, y que CAV-1 desempeña un papel importante en la regulación de la composición y la función de la membrana ciliar (271). Un estudio ha determinado que las células mesenquimales C3H10T1/2 sin tricopleína, un regulador clave en la formación del cilio, hace que estas células presenten significativamente cilios más largos que las células control. El hecho de presentar cilios más largos impide que se formen balsas lipídicas positivas para CAV-1 y/o GM3 (un marcador de balsa lipídica) alrededor de la base ciliar, donde se acumulan las proteínas receptoras de insulina, inhibiendo así la señalización insulina-AKT (423,424). Otro estudio demostró que el silenciamiento de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de *Cav-1* en diferentes líneas celulares aumenta la longitud ciliar independientemente de la ruta de ciliogénesis primaria. De modo que CAV-1 $\alpha$  apical no caveolar es un importante regulador de la longitud ciliar, ejerciendo su efecto a través de RhoA y sus efectores, Rock y Dia1 (425). Jeffries *et al.* demostró que la depleción de la expresión de CAV-1 promueve la formación de cilios primarios a través de la degradación proteasomal dependiente de la aurora quinasa A e induce senescencia prematura en fibroblastos humanos (426). En la presente Tesis Doctoral comprobamos que la ausencia de CAV-1 afecta a la movilidad de PTH1R al compartimento ciliar en condiciones basales, ya que observamos un aumento significativo en la presencia del receptor en la base del cilio en estas condiciones (Figura 38), lo que podría indicar que la ausencia de caveolas permitiría una mayor cantidad de PTH1R libre, disponible para moverse hacia el cilio. Sin embargo, tras la estimulación mecánica se reproduce lo observado en presencia de CAV-1, es decir, PTH1R se distribuye a lo largo de todo el cilio primario. A pesar de esto, la estimulación mecánica de los osteocitos en los que se ha



silenciado *Cav-1*, no es suficiente para inhibir la migración y diferenciación de los osteoclastos. Esto podría ser debido a un cambio en la señalización de PTH1R producido por la ausencia de CAV-1 e independiente de la relocalización del receptor al cilio.

# ***Conclusiones***



A partir de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La estimulación mecánica y el estímulo con PTHrP (1-37) en osteocitos inhiben el reclutamiento y la diferenciación de osteoclastos a través de un mecanismo dependiente de PTH1R y del cilio primario.
2. El estímulo mecánico por FF y PTHrP (1-37) desencadena una movilización de PTH1R a lo largo del cilio primario en las células MLO-Y4.
3. El estímulo mecánico por FF produce la elongación del cilio primario en las células osteocíticas MLO-Y4.
4. La inhibición de las vías *Hedgehog*, adenilato ciclasa y fosfolipasa C en células MLO-Y4 da lugar a un aumento en el reclutamiento y en la diferenciación de precursores osteoclasticos.
5. Los osteocitos estimulados mecánicamente inhiben el reclutamiento y la diferenciación de los osteoclastos mediante la disminución de la secreción de CXCL5. Mientras que la activación de PTH1R regula a los osteoclastos mediante la modulación de la secreción de IL-6.
6. Los osteocitos necesitan la expresión de CAV-1 para inhibir la actividad de los osteoclastos tras el estímulo mecánico por FF.
7. La ausencia de CAV-1 en las células osteocíticas MLO-Y4 afecta a la movilización basal de PTH1R en condiciones estáticas y con el estímulo de PTHrP (1-37).

Por todo ello, los datos mostrados sugieren un mecanismo de movilización de PTH1R al cilio primario, que podría explicar la eficacia terapéutica del tratamiento combinado de PTH o PTHrP y la estimulación mecánica para preservar la masa y la calidad ósea.



# ***Conclusions***



Based on the results obtained in this Doctoral Thesis, we can raise the following conclusions:

1. Mechanical stimulation and stimulation with PTHrP (1-37) in osteocytes inhibit osteoclast recruitment and differentiation through a PTH1R- and primary cilium-dependent mechanism.
2. Mechanical stimulation by FF and PTHrP (1-37) trigger PTH1R mobilization along the primary cilium in MLO-Y4 cells.
3. Mechanical stimulation by FF produces elongation of the primary cilium in osteocytic MLO-Y4 cells.
4. Inhibition of the Hedgehog, adenylate cyclase and phospholipase C pathways in MLO-Y4 cells results in increased recruitment and differentiation of osteoclast precursors.
5. Mechanically stimulated osteocytes inhibit osteoclast recruitment and differentiation by decreasing CXCL5 secretion. Whereas PTH1R activation regulates osteoclasts by modulating IL-6 secretion.
6. Osteocytes require CAV-1 expression to inhibit osteoclast activity following mechanical stimulation by FF.
7. Absence of CAV-1 in osteocytic MLO-Y4 cells affects basal PTH1R mobilization under static conditions and with PTHrP (1-37) stimulation.

Therefore, the data shown suggest a mechanism of PTH1R mobilization to the primary cilium, which could explain the therapeutic efficacy of combined treatment with PTH or PTHrP and mechanical stimulation to preserve bone mass and quality.



# ***Limitaciones del estudio***



En la presente Tesis Doctoral existen diversas limitaciones a tener en cuenta. En primer lugar, los experimentos se han realizado utilizando líneas celulares de ratón establecidas. Por lo 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 experimentos en diversos modelos animales que verifiquen los resultados obtenidos. Con respecto al modelo celular utilizado, las células MLO-Y4 son células osteocíticas que presentan diferencias en los niveles de expresión de ciertos marcadores clásicos de osteocitos, siendo la más destacable la ausencia de expresión de SOST/esclerostina.

En la actualidad, la teoría más respaldada respecto a cómo las células óseas perciben la estimulación mecánica en un entorno *in vivo*, se basa en el incremento del flujo de fluido intersticial en el sistema lacuno-canalicular. Por tanto, la técnica aplicada para la estimulación mecánica de la línea celular MLO-Y4, el FF, es capaz de afectar a la deformación celular a través de la simulación de un flujo sobre una monocapa de células. Todo esto se produce dentro del rango fisiológico estimulado para los osteocitos *in vivo*. Sin embargo, los osteocitos *in vivo* se encuentran embebidos en una matriz ósea mineralizada 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.

En cuanto a los experimentos del silenciamiento de *Cav-1* utilizando un siARN específico que reduce sus niveles de expresión, sería necesario análisis complementarios que permitiesen determinar si esta reducción en la expresión de *Cav-1* se traduce realmente en un menor número de caveolas funcionales, dado que CAV-1 podemos encontrarla tanto en la membrana plasmática como formando parte de las caveolas.



***Perspectivas***

***Futuras***



En cuanto a 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 previamente.

Como se ha descrito en la presente Tesis Doctoral, la estimulación mecánica mediante FF incrementa la longitud del cilio primario en células osteocíticas MLO-Y4. De cara a futuros estudios, sería conveniente analizar la implicación de diversas vías de señalización en la modulación de la longitud del cilio primario.

Con respecto a los datos obtenidos del secretoma de los osteocitos estimulados con FF más silenciamiento del receptor PTH1R, sería necesario seguir analizando las proteínas obtenidas. Puesto que puede haber más proteínas que experimenten cambios y que intervengan en la comunicación osteocito-osteoclasto además de CXCL5 e IL-6.

Por otro lado, en esta Tesis Doctoral se ha descrito la co-localización del cilio primario con PTH1R, y como esto puede verse afectado por la presencia o ausencia de caveolina-1. Sin embargo, no se han realizado análisis para la observación de la integridad estructural y funcional de las caveolas, lo cual sería conveniente para la validación de los resultados obtenidos. Además, sería interesante analizar cómo afecta la presencia o ausencia de caveolina-1 a las vías de señalización desencadenadas por PTH1R tras su activación por estímulo mecánico o por ligando.



# ***Referencias***



1. Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJA, Duarte JA. Bone quality: The determinants of bone strength and fragility. *Sport Med.* 2014;44(1):37–53.
2. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996;45:371–86.
3. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther.* 2006;86(1):77–91.
4. Burr DB. Bone Morphology and Organization. Second Edi. Basic and Applied Bone Biology. Elsevier Inc.; 2019. 3–26 p.
5. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 2006;17(3):319–36.
6. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103–8.
7. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754:144855.
8. 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.
9. Karsenty G, Kousteni S. Bone as an endocrine organ. *Encycl Endocr Dis.* 2018;18(5):47–51.
10. You LD, Weinbaum S, Cowin SC, Schaffler MB. Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;278(2):505–13.
11. Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med.* 2010;224(12):1415–40.
12. Florencio-Silva R, Rodrigues da Silva Sasso G et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;1–17.
13. Fakhry M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells.* 2013;5(4):136.
14. Bellido T, Plotkin LI, Bruzzaniti A. Bone Cells. *Basic Appl Bone Biol.* 2019;37–55.

15. 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.
16. 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. *Bone Res.* 2018;6(1):1–11.
17. 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):1330–47.
18. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis - Current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(3):204–16.
19. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):1–20.
20. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139–46.
21. Longhini R, de Oliveira PA, de Souza Faloni AP, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J Anat.* 2013;222(2):239–47.
22. Miyamoto T. The dendritic cell-specific transmembrane protein DC-STAMP is essential for osteoclast fusion and osteoclast bone-resorbing activity. *Mod Rheumatol.* 2006;16(6):341–2.
23. Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45969–79.
24. Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc Res Tech.* 2003;61(6):496–503.
25. Ljusberg J, Wang Y, Lång P, Norgård M, Dodds R, Hultenby K, et al. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J Biol Chem.*

- 2005;280(31):28370–81.
26. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: More than “bone eaters.” *Trends Mol Med.* 2014;20(8):449–59.
  27. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, et al. E11/gp38 Selective Expression in Osteocytes: Regulation by Mechanical Strain and Role in Dendrite Elongation. *Mol Cell Biol.* 2006;26(12):4539–52.
  28. Manolagas SC. Choreography from the tomb: An emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling. *BoneKEy-Osteovision.* 2006;3(1):5–14.
  29. Civitelli R, Stains JP, Soo Shin C, Jørgensen NR. Intercellular Junctions and Cell-Cell Communication in the Skeletal System. *Princ Bone Biol Two-Volume Set.* 2008;1:425–45.
  30. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: An endocrine cell and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658–90.
  31. Mullender MG, Van Der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone.* 1996;18(2):109–13.
  32. Moriishi T, Komori T. Osteocytes: Their Lacunocanicular Structure and Mechanoresponses. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4373.
  33. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int.* 2010;21(9):1457–69.
  34. Liu C, Zhao Y, Cheung WY, Gandhi R, Wang L, You L. Effects of cyclic hydraulic pressure on osteocytes. *Bone.* 2010;46(5):1449–56.
  35. Vatsa A, Mizuno D, Smit TH, Schmidt CF, MacKintosh FC, Klein-Nulend J. Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation. *J Bone Miner Res.* 2006;21(11):1722–8.
  36. Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH. The production of nitric oxide and prostaglandin E2 by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech.* 2001;34(5):671–7.
  37. Poole KES, Van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 2005;19(13):1842–4.
  38. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229–

- 38.
39. Burger E. H. and Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone - Role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.* 1999;13(8):101–12.
40. Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision.* 2006;3(10):7–15.
41. Kitase Y, Barragan L, Qing H, Kondoh S, Jiang JX, Johnson ML, et al. Mechanical induction of PGE2 in osteocytes blocks glucocorticoid-induced apoptosis through both the  $\beta$ -catenin and PKA pathways. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2657–68.
42. Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Väänänen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res.* 2006;21(4):616–25.
43. Heino TJ, Hentunen TA, Kalervo Vninen H. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor- $\beta$ : Enhancement by estrogen. *J Cell Biochem.* 2002;85(1):185–97.
44. Zhao S, Kato Y, Zhang Y, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(11):2068–79.
45. Takayanagi H. Osteoclast differentiation and activation. *Clin Calcium.* 2007;17(4):484–92.
46. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res.* 2008;23(6):915–27.
47. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335(4):1095–101.
48. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:281–90.
49. Dunstan CR, Somers NM, Evans RA. Osteocyte death and hip fracture. *Calcif Tissue Int.* 1993;53(1):13–7.
50. Kelly NH, Schimenti JC, Ross FP, Van der Meulen MCH. Transcriptional profiling of cortical versus cancellous bone from mechanically-loaded murine tibiae reveals differential gene expression. *Bone.* 2016;86:22–9.

51. Berendsen A.D. and Olsen B.R. Bone development. *Bone*. 2015;80:14–8.
52. Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: A multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*. 2011;211(2):109–21.
53. Franz-Odenaal TA. Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci*. 2011;17(1):3734–46.
54. Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn*. 2013;242(8):909–22.
55. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):a008334.
56. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423(6937):332–6.
57. 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.
58. Hallett SA, Ono W, Ono N. Growth plate chondrocytes: Skeletal development, growth and beyond. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):1–17.
59. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 1999;5(6):623–8.
60. Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068(1):1–13.
61. 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.
62. Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, et al. Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. *Am J Pathol*. 2019;189(8):1495–500.
63. Yamamoto T, Hasegawa T, de Freitas PHL, Hongo H, Zhao S, Yamamoto T, et al. Histochemical characteristics on minimodeling-based bone formation induced by anabolic drugs for osteoporotic treatment. *Biomed Res*. 2021;42(5):161–71.
64. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv*

- Musculoskelet Dis. 2016;8(6):225–35.
65. Parfitt AM, Travers R, Rauch F, Glorieux FH. Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. *Bone*. 2000;27(4):487–94.
  66. Allen MR, Burr DB. Bone Modeling and Remodeling. *Basic Appl Bone Biol*. 2013;75–90.
  67. Reyes García R, Rozas Moreno P, Muñoz-Torres M. Regulación del proceso de remodelado óseo. *Rev Esp Enfermedades Metab Oseas*. 2008;17(1):10–4.
  68. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):201–9.
  69. Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: Mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(3):446–50.
  70. Luxenburg C, Geblinger D, Klein E, Anderson K, Hanein D, Geiger B, et al. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: From podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One*. 2007;2(1):e179.
  71. Chabadel A, Bañon-Rodríguez I, Cluet D, Rudkin BB, Wehrle-Haller B, Genot E et al. CD44 and beta 3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-based Domains in Osteoclasts. *Mol Biol Cell*. 2007;18:4899–910.
  72. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*. 2005;11(2):76–81.
  73. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2009;1790(12):1592–8.
  74. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*. 2003;5(3):222–6.
  75. Glimcher MJ. The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. Woodhead Publishing Limited; 1998. 23–52 p.
  76. 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.
  77. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE,

- et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22(23):6267–76.
78. Honma M, Ikebuchi Y, Suzuki H. Mechanisms of RANKL delivery to the osteoclast precursor cell surface. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):27–33.
79. Ansari N, Sims NA. The Cells of Bone and Their Interactions. *Handb Exp Pharmacol.* 2020;262:1–25.
80. Takayanagi H. RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):13–8.
81. Julian M.W. Quinn, Jan Elliott, Matthew T. Gillespie TJM. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. 1998;139(10):4416–9.
82. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. *PLoS One.* 2015;10(9):1–19.
83. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol.* 2020;82:485–506.
84. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, Noguchi T, Shen WR, Qi J, et al. Osteocyte-related cytokines regulate osteoclast formation and bone resorption. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):5169.
85. Takemura Y, Moriyama Y, Ayukawa Y, Kurata K, Rakhmatia YD, Koyano K. Mechanical loading induced osteocyte apoptosis and connexin 43 expression in three-dimensional cell culture and dental implant model. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2019;107(4):815–27.
86. Chen CH, Chen HA, Liao HT, Liu CH, Tsai CY, Chou CT. Soluble receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in ankylosing spondylitis: OPG is associated with poor physical mobility and reflects systemic inflammation. *Clin Rheumatol.* 2010;29(10):1155–61.
87. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3597–602.

88. Asano T, Okamoto K, Nakai Y, Tsutsumi M, Muro R, Suematsu A, et al. Soluble RANKL is physiologically dispensable but accelerates tumour metastasis to bone. *Nat Metab.* 2019;1(9):868–75.
89. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, et al. RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res.* 2013;28(9):1936–49.
90. Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N, et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2010;25(9):1907–21.
91. Robling AG, Fuchs RK, Burr DB. Mechanical Adaptation. *Basic Appl Bone Biol.* 2013;175–204.
92. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD. Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur Cells Mater.* 2012;24:278–91.
93. Moharrer Y, Boerckel JD. Tunnels in the rock: Dynamics of osteocyte morphogenesis. *Bone.* 2021;153:1–20.
94. Burra S, Nicolella 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.
95. Wang L, Wang Y, Han Y, Henderson SC, Majeska RJ, Weinbaum S, et al. In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(33):11911–6.
96. Delgado-Calle J, Xiaolin J, Pacheco-Costa R, McAndrews K, Edwards R, Pellegrini G, et al. Control of Bone Anabolism in Response to Mechanical Loading and PTH by Distinct Mechanisms Downstream of the PTH Receptor. *J Bone Min Res.* 2017;33(3):522–535.
97. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One.* 2011;6(10):e25900.
98. You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone.* 2008;42(1):172–9.



99. Plotkin LI, Gortazar AR, Davis HM, Condon KW, Gabilondo H, Maycas M, et al. Inhibition of osteocyte apoptosis prevents the increase in osteocytic receptor activator of nuclear factor kb Ligand (RANKL) but does not stop bone resorption or the loss of bone induced by unloading. *J Biol Chem.* 2015;290(31):18934–42.
100. 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.
101. Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res.* 2004;19(3):471–8.
102. Lyons JS, Joca HC, Law RA, Williams KM, Jaclyn P, Shi G, et al. Microtubules tune mechanotransduction through NOX2 and TRPV4 to decrease sclerostin abundance in osteocytes contributed to experimental design and analysis HHS Public Access. *Sci Signal.* 2018;14:42–51.
103. Donahue HJ, Qu RW, Genetos DC. Joint diseases: From connexins to gap junctions. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(1):42–51.
104. Xiao Z, Quarles LD. Physiological mechanisms and therapeutic potential of bone mechanosensing. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(2):115–29.
105. Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene.* 2006;15(367):1–16.
106. Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):25–31.
107. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):495–507.
108. Matthews BD, Thodeti CK, Tytell JD, Mammoto A, Overby DR, Ingber DE. Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface  $\beta$ 1 integrins. *Integr Biol.* 2010;2(9):435–42.
109. Litzenberger JB, Kim JB, Tummala P, Jacobs CR.  $\beta$ 1 Integrins mediate mechanosensitive signaling pathways in Osteocytes. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(4):325–32.
110. Geoghegan IP, Hoey DA, McNamara LM. Integrins in Osteocyte Biology

- and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep.* 2019;17(4):195–206.
111. Batra N, Burra S, Siller-Jackson AJ, Gu S, Xia X, Weber GF, et al. Mechanical stress-activated integrin  $\alpha 5\beta 1$  induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(9):3359–64.
  112. Wu H, Teng PN, Jayaraman T, Onishi S, Li J, Bannon L, et al. Dentin matrix protein 1 (DMP1) signals via cell surface integrin. *J Biol Chem.* 2011;286(34):29462–9.
  113. Litzenberger 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.
  114. Lieben L, Carmeliet G. The involvement of TRP channels in bone homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:1–10.
  115. Sasaki F, Hayashi M, Ono T, Nakashima T. The regulation of RANKL by mechanical force. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):34–44.
  116. Yan Z, Wang P, Wu J, Feng X, Cai J, Zhai M, et al. Fluid shear stress improves morphology, cytoskeleton architecture, viability, and regulates cytokine expression in a time-dependent manner in MLO-Y4 cells. *Cell Biol Int.* 2018;42(10):1410–22.
  117. 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.
  118. Schulte FA, Ruffoni D, Lambers FM, Christen D, Webster DJ, Kuhn G, et al. Local Mechanical Stimuli Regulate Bone Formation and Resorption in Mice at the Tissue Level. *PLoS One.* 2013;8(4):e62172.
  119. Bin G, Bo Z, Jing W, Jin J, Xiaoyi T, Cong C, et al. Fluid shear stress suppresses TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in MC3T3-E1 cells: Involvement of ERK5-AKT-FoxO3a-Bim/FasL signaling pathways. *Exp Cell Res.* 2016;343(2):208–17.
  120. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49–63.
  121. 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):633–43.
122. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The Death of Osteocytes via Apoptosis Accompanies Estrogen Withdrawal in Human Bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(9):3128–35.
123. Weinstein RS, Jilka RL, Michael Parfitt A, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998;102(2):274–82.
124. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, et al. Mechanical loading: Biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2003;284(4):934–43.
125. Dodd JS, Raleigh JA, and Gross TS. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway. *Am J Physiol Physiol.* 1999;277(3):598–602.
126. McCutcheon S, Majeska RJ, Spray DC, Schaffler MB, Vazquez M. Apoptotic Osteocytes Induce RANKL Production in Bystanders via Purinergic Signaling and Activation of Pannexin Channels. *J Bone Miner Res.* 2020;35(5):966–77.
127. Fermor B, Skerry TM. PTH/PTHrP receptor expression on osteoblasts and osteocytes but not resorbing bone surfaces in growing rats. *J Bone Miner Res.* 1995;10(12):1935–43.
128. Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal.* 2009;21(8):1245–54.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
  132. Vilardaga JP, Romero G, Friedman PA, Gardella TJ. Molecular basis of parathyroid hormone receptor signaling and trafficking: A family B GPCR paradigm. Vol. 68, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2011. p. 1–13.
  133. Horwitz MJ, Tedesco MB, Sereika SM, Hollis BW, Garcia-Ocaña A, Stewart AF. Direct comparison of sustained infusion of human parathyroid hormone-related protein-(1-36) [hPTHrP-(1-36)] versus hPTH-(1-34) on serum calcium, plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations, and fractional calcium excretion in healthy human volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(4):1603–9.
  134. Cheloha RW, Gellman SH, Vilardaga JP, Gardella TJ. PTH receptor-1 signalling - Mechanistic insights and therapeutic prospects. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(12):712–24.
  135. Ardura JA, Portal-Núñez S, Alonso V, Bravo B, Gortazar AR. Handling Parathormone Receptor Type 1 in Skeletal Diseases: Realities and Expectations of Abaloparatide. *Trends Endocrinol Metab.* 2019;30(10):756–66.
  136. Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone.* 2013;54(2):250–7.
  137. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: Anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;22:41–50.
  138. Datta NS, Chen C, Berry JE, McCauley LK. PTHrP signaling targets cyclin D1 and induces osteoblastic cell growth arrest. *J Bone Miner Res.* 2005;20(6):1051–64.
  139. Saini V, Marengi DA, Barry KJ, Fulzele KS, Heiden E, Liu X, et al. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide type 1 receptor (PPR) signaling in osteocytes regulates anabolic and catabolic skeletal responses to PTH. *J Biol Chem.* 2013;288(28):20122–34.
  140. Sugiyama T, Saxon LK, Zaman G, Moustafa A, Sunter A, Price JS, et al. Mechanical loading enhances the anabolic effects of intermittent

- parathyroid hormone (1-34) on trabecular and cortical bone in mice. *Bone*. 2008 Aug;43(2):238–48.
141. Chandra A, Lin T, Tribble MB, Zhu J, Altman AR, Tseng WJ, et al. PTH (1-34) alleviates radiotherapy-induced local bone loss by improving osteoblast and osteocyte survival. *Bone*. 2014;67:33–40.
  142. Terauchi M, Li JY, Bedi B, Baek KH, Tawfeek H, Galley S, et al. T Lymphocytes Amplify the Anabolic Activity of Parathyroid Hormone through Wnt10b Signaling. *Cell Metab*. 2009;10(3):229–40.
  143. Pacifici R. Role of T cells in the modulation of PTH action: Physiological and clinical significance. Vol. 44, *Endocrine*. 2013. p. 576–82.
  144. Paci R. T cells: Critical bone regulators in health and disease. 2010;47:461–71.
  145. Gao Y, Wu X, Terauchi M, Li JY, Grassi F, Galley S, et al. T Cells Potentiate PTH-Induced Cortical Bone Loss through CD40L Signaling. *Cell Metab*. 2008;8(2):132–45.
  146. Tawfeek H, Bedi B, Li JY, Adams J, Kobayashi T, Weitzmann MN, et al. Disruption of PTH receptor 1 in t cells protects against PTH-induced bone loss. *PLoS One*. 2010;5(8):e12290.
  147. Bedi B, Li JY, Tawfeek H, Baek KH, Adams J, Vangara SS, et al. Silencing of parathyroid hormone (PTH) receptor 1 in T cells blunts the bone anabolic activity of PTH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(12):725–33.
  148. Li JY, Walker LD, Tyagi AM, Adams J, Neale Weitzmann M, Pacifici R. The sclerostin-independent bone anabolic activity of intermittent PTH treatment is mediated by T-cell-produced Wnt10b. *J Bone Miner Res*. 2014;29(1):43–54.
  149. Ru JY, Wang YF. Osteocyte apoptosis: the roles and key molecular mechanisms in resorption-related bone diseases. *Cell Death Dis*. 2020;11(10):846.
  150. Yavropoulou MP, Michopoulos A, Yovos JG. PTH and PTHR1 in osteocytes. New insights into old partners. *Hormones*. 2017;16(2):150–60.
  151. Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(1):1–5.

152. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracel. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(7):2732–6.
153. 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.
154. Kousteni S, Bilezikian JP. The Cell Biology of Parathyroid Hormone in Osteoblasts. Curr Osteoporos Rep. 2008;6(2):72–6.
155. Potts JT. Parathyroid hormone: Past and present. J Endocrinol. 2005;187(3):311–25.
156. Singh ATK, Gilchrist A, Voyno-Yasenetskaya T, Radeff-Huang JM, Stern PH. G $\alpha$ 12/G $\alpha$ 13 subunits of heterotrimeric G proteins mediate parathyroid hormone activation of phospholipase D in UMR-106 osteoblastic cells. Endocrinology. 2005;146(5):2171–5.
157. 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.
158. Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, et al. Distinct  $\beta$ -arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. J Biol Chem. 2006;281(16):10856–64.
159. Fu Q, Jilka RL, Manolagas SC, O'Brien CA. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NF $\kappa$ B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase a activation of cAMP-response element-binding protein. J Biol Chem. 2002;277(50):48868–75.
160. Kramer I, Keller H, Leupin O, Kneissel M. Does osteocytic SOST suppression mediate PTH bone anabolism? Vol. 21, Trends in Endocrinology and Metabolism. Elsevier Ltd; 2010. p. 237–44.

161. Ogata N, Shinoda Y, Wettschureck N, Offermanns S, Takeda S, Nakamura K, et al. Gαq signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of parathyroid hormone. *J Biol Chem.* 2011;286(15):13733–40.
162. Yang D, Singh R, Divieti P, Guo J, Bouxsein ML, Bringham FR. Contributions of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling pathways to the anabolic effect of PTH on bone. *Bone.* 2007;40(6):1453–61.
163. Vilardaga JP, Frank M, Krasel C, Dees C, Nissenson RA, Lohse MJ. Differential Conformational Requirements for Activation of G Proteins and the Regulatory Proteins Arrestin and G Protein-coupled Receptor Kinase in the G Protein-coupled Receptor for Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-related Protein. *J Biol Chem.* 2001;276(36):33435–43.
164. Gesty-Palmer D, Flannery P, Yuan L, Corsino L, Spurney R, Lefkowitz RJ, et al. A β-arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. *Sci Transl Med.* 2009;1(1):1ra1.
165. Divieti P, Geller AI, Suliman G, Ju H, Bringham FR. Receptors Specific for the Carboxyl-Terminal Region of Parathyroid Hormone on Bone-Derived Cells : Determinants of Ligand Binding and Bioactivity. *Endocrinology.* 2015;146(4):1863–70.
166. Toribio RE, Brown HA, Novince CM, Marlow B, Hernon K, Lanigan LG, et al. The midregion , nuclear localization sequence , and C terminus of PTHrP regulate skeletal development , hematopoiesis , and survival in mice. *FASEB J.* 2010;24(6):1947–57.
167. Miao D, Su H, He B, Gao J, Xia Q, Zhu M, et al. Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(51):20309–14.
168. De Miguel F, Fiaschi-Taesch N, López-Talavera JC, Takane KK, Massfelder T, Helwig JJ, et al. The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 2001;142(9):4096–105.

169. Bergwitz C, Gardella TJ, Flannery MR, Potts JT, Kronenberg HM, Goldring SR, et al. Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin. Evidence for a common pattern of ligand-receptor interaction. *J Biol Chem.* 1996;271(43):26469–72.
170. 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.
171. Luck MD, Carter PH, Gardella TJ. The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors. *Mol Endocrinol.* 1999;13(5):670–80.
172. 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.
173. Shimizu M, Carter PH, Gardella TJ. Autoactivation of type-1 parathyroid hormone receptors containing a tethered ligand. *J Biol Chem.* 2000;275(26):19456–60.
174. Shimizu M, Potts JT, Gardella TJ. Minimization of parathyroid hormone:Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem.* 2000;275(29):21836–43.
175. Doppelt SH, Neer RM, Nussbaum SR, Federico P, Potts JT, Rosenblatt M. Inhibition of the in vivo parathyroid hormone-mediated calcemic response in rats by a synthetic hormone antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(19):7557–60.
176. 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)<sub>2</sub> vitamin D. *J Bone Miner Res.* 2005;20(10):1792–803.
177. Horwitz MJ, Augustine M, Kahn L, Martin E, Oakley CC, Carneiro RM, et al. A Comparison of Parathyroid Hormone-Related Protein (1-36) and Parathyroid Hormone (1-34) on Markers of Bone Turnover and Bone Density in Postmenopausal Women: The PrOP Study. *J Bone Miner Res.*

- 2013;28(11):2266–76.
178. Dean T, Vilardaga JP, Potts JT, Gardella TJ. Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol Endocrinol.* 2008;22(1):156–66.
  179. 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.
  180. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura J, 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.
  181. Gidon A, Al-Bataineh MM, Jean-Alphonse FG, Stevenson HP, Watanabe T, Louet C, et al. Endosomal GPCR signaling turned off by negative feedback actions of PKA and v-ATPase. *Nat Chem Biol.* 2014;10(9):707–9.
  182. O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, et al. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One.* 2008;3(8):e2942.
  183. Sinha P, Aarnisalo P, Chubb R, Poulton IJ, Guo J, Nachtrab G, et al. Loss of Gs $\alpha$  in the postnatal skeleton leads to low bone mass and a blunted response to anabolic parathyroid hormone therapy. *J Biol Chem.* 2016;291(4):1631–42.
  184. 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):1391–9.
  185. Maycas M, Fernández de Castro L, Bravo B, García de Durango C, Forriol F, Gortázar RA, et al. The VEGF (VEGFR2) 2 receptor and PTH (PTH1R) 1 receptor act as mediators in the anti-apoptotic response to mechanical stimulus in MLO-Y4 osteocyte-like cell. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2015;7(4):91–7.
  186. 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.
187. Zheng L, Cao Y, Ni S, Qi H, Ling Z, Xu X, et al. Ciliary parathyroid hormone signaling activates transforming growth factor- $\beta$  to maintain intervertebral disc homeostasis during aging. *Bone Res.* 2018;6(1):21.
  188. 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.
  189. Malicki JJ, Johnson CA. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2017;27(2):126–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.002>
  190. Zaghoul NA, Brugmann SA. The Emerging Face of Primary Cilia. *Genesis.* 2011;49(4):231–46.
  191. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(4):222–34.
  192. Basten SG, Giles RH. Functional aspects of primary cilia in signaling , cell cycle and tumorigenesis. *Cilia.* 2013;2(1):6.
  193. Nguyen AM, Jacobs CR. Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes. *Bone.* 2013;54(2):196–204.
  194. Davenport JR, Yoder BK. An incredible decade for the primary cilium: A look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2005;289(6):1159–69.
  195. 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.
  196. Garcia-gonzalo FR, Reiter JF. Scoring a backstage pass : Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *J Cell Biol.* 2012;197(6):697–709.
  197. Satir P, Christensen ST. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:377–400.
  198. Hoffman HK, Prekeris R. Roles of the actin cytoskeleton in ciliogenesis. *J Cell Sci.* 2022;135(10):259030.
  199. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, et al. The ciliary pocket: An endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci.* 2010;123(10):1785–95.

200. Schwartz EA, Leonard L, Bizios R, Eric A, Leonard L, Bizios R, et al. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 1997;272(1):132–8.
201. Huber C, Cormier-Daire V. Ciliary disorder of the skeleton. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2012;160(3):165–74.
202. Cole DG, Snell WJ. SnapShot: Intraflagellar Transport. *Cell.* 2009;137(4):784–202.
203. Taschner M, Bhogaraju S, Lorentzen E. Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation.* 2012;83(2):12–22.
204. Rix S, Calmont A, Scambler PJ, Beales PL. An *Ift80* mouse model of short rib polydactyly syndromes shows defects in hedgehog signalling without loss or malformation of cilia. *Hum Mol Genet.* 2011;20(7):1306–14.
205. Haycraft CJ, Schafer JC, Zhang Q, Taulman PD, Yoder BK. Identification of CHE-13, a novel intraflagellar transport protein required for cilia formation. *Exp Cell Res.* 2003;284(2):249–61.
206. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson K V. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature.* 2003;426(6962):83–7.
207. Follit JA, Tuft RA, Fogarty KE, Pazour GJ. The Intraflagellar Transport Protein IFT20 Is Associated with the Golgi Complex and Is Required for Cilia Assembly. *Mol Biol Cell.* 2006;17:3781–92.
208. Tsao CC, Gorovsky MA. Tetrahymena IFT122A is not essential for cilia assembly but plays a role in returning IFT proteins from the ciliary tip to the cell body. *J Cell Sci.* 2008;121(4):428–36.
209. Tran P V., Haycraft CJ, Besschetnova TY, Turbe-Doan A, Stottmann RW, Herron BJ, et al. THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet.* 2008;40(4):403–10.
210. Song B, Haycraft CJ, Seo H, Yoder BK, Serra R. Development of the post-natal growth plate requires intraflagellar transport proteins. *Dev Biol.* 2007;305(1):202–16.
211. Lucker BF, Miller MS, Dziedzic SA, Blackmarr PT, Cole DG. Direct interactions of intraflagellar transport complex B proteins IFT88, IFT52, and

- IFT46. *J Biol Chem*. 2010;285(28):21508–18.
212. Wheatley DN, Wang AIMEI, Strugnell GE. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int*. 1996;20(1):73–81.
213. Wang P, Tang C, Wu J, Yang Y, Yan Z, Liu X, et al. Pulsed electromagnetic fields regulate osteocyte apoptosis, RANKL/OPG expression, and its control of osteoclastogenesis depending on the presence of primary cilia. *J Cell Physiol*. 2019;234(7):10588–601.
214. Ding D, Yang X, Luan H qin, Wu X tong, He C, Sun L wen, et al. Pharmacological Regulation of Primary Cilium Formation Affects the Mechanosensitivity of Osteocytes. *Calcif Tissue Int*. 2020;107(6):625–35.
215. Singla V, Reiter JF. The primary cilium as the cell's antenna: Signaling at a sensory organelle. *Science*. 2006;313(5787):629–33.
216. Veland IR, Awan A, Pedersen LB, Yoder BK, Christensen ST. Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol*. 2009;111(3):39–54.
217. Lee KL, Hoey DA, Jacobs CR. Primary cilia-mediated mechanotransduction in bone. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2010;8(4):201–12.
218. Schou KB, Pedersen LB, Christensen ST. Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia . *EMBO Rep*. 2015;16(9):1099–113.
219. Lehti MS, Henriksson H, Rummukainen P, Wang F, Uusitalo-Kylmäälä L, Kiviranta R, et al. Cilia-related protein SPEF2 regulates osteoblast differentiation. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
220. 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.
221. Qin L, Liu W, Cao H, Xiao G. Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Res*. 2020;8(1):1–24.
222. Hoey DA, Chen JC, Jacobs CR. The primary cilium as a novel extracellular sensor in bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:75.
223. 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.

224. Malone, A. M. D., Anderson, C. T., Tummala, P., Kwon, R. Y., Johnston TR, Stearns, T., & Jacobs CR. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13325–13330.
225. Tu X, Delgado-Calle J, Condon KW, Maycas M, Zhang H, Carlesso N, et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(5):478–86.
226. 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;235(10):7356–69.
227. 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.
228. Jin D, Ni TT, Sun J, Wan H, Amack JD, Yu G, et al. Prostaglandin signalling regulates ciliogenesis by modulating intraflagellar transport. *Nat Cell Biol*. 2014;16(9):841–51.
229. Jin D, Zhong TP. Prostaglandin signaling in ciliogenesis and development. *J Cell Physiol*. 2021;237(6):2632–43.
230. Hampshire DJ, Ayub M, Jacoby M, Cox JJ, Schiffmann SN, Blockmans M, et al. INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects , ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nat Genet*. 2009;41(9):1027–102.
231. Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts - correlation with prostaglandin upregulation. Vol. 217, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995. p. 640–8.
232. Jiang JX, Cherian PP. Hemichannels Formed by Connexin 43 Play an Important Role in the Release of Prostaglandin E<sub>2</sub> by Osteocytes in Response to Mechanical Strain. *Cell Commun Adhes*. 2003;10(42100):259–64.
233. Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating

- fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol.* 2007;212(1):207–14.
234. Kwon RY, Temiyasathit S, Tummala P, Quah CC, Jacobs CR. Primary cilium-dependent mechanosensing is mediated by adenylyl cyclase 6 and cyclic AMP in bone cells. *FASEB J.* 2010;24(8):2859–68.
235. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30884–95.
236. Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(4):199–219.
237. 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):e33368.
238. 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.
239. 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.
240. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates Hedgehog signaling at the primary cilium. *Science.* 2007;317(5836):372–6.
241. Angelo AD, Franco B. The dynamic cilium in human diseases. *Pathogenetics.* 2009;2(1):3.
242. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell.* 1993;75(7):1401–16.
243. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 2005;1(4):480–8.
244. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DYR, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature.* 2005;437(7061):1018–21.

245. Wen X, Lai CK, Evangelista M, Hongo J-A, de Sauvage FJ, Scales SJ. Kinetics of Hedgehog-Dependent Full-Length Gli3 Accumulation in Primary Cilia and Subsequent Degradation. *Mol Cell Biol*. 2010;30(8):1910–22.
246. Liu A, Wang B, Niswander LA. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development*. 2005;132(13):3103–11.
247. Eggenschwiler JT, Anderson K V. Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:345–73.
248. Christensen ST, Ott CM. A ciliary signaling switch. *Science*. 2007;317(5836):330–1.
249. 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*. 2000;127(3):543–8.
250. Mak KK, Chen MH, Day TF, Chuang PT, Yang Y. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development*. 2006;133(18):3695–707.
251. Haycraft CJ, Zhang Q, Song B, Jackson WS, Detloff PJ, Serra R, et al. Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation. *Development*. 2007;134(2):307–16.
252. Koyoma E, Young B, Nagayama M, Shibukawa Y, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, et al. Conditional Kif3a ablation causes abnormal hedgehog signaling topography, growth plate dysfunction, and excessive bone and cartilage formation during mouse skeletogenesis. *Development*. 2007;134(11):2159–69.
253. Nowlan NC, Prendergast PJ, Murphy P. Identification of mechanosensitive genes during embryonic bone formation. *PLoS Comput Biol*. 2008;4(12):e1000250.
254. Ng T, Chiu K, Rabie A, Hagg U. Repeated Mechanical Loading Enhances the Expression of Indian Hedgehog in Condylar Cartilage. *Front Biosci*. 2006;11:943–8.
255. Parton RG, Del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):98–112.

256. Pike LJ. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1597–8.
257. Hansen CG, Nichols BJ. Exploring the caves: Cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 2010;20(4):177–86.
258. Aboulaich N, Vainonen JP, Strålfors P, Vener A V. Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem J.* 2004;383(2):237–48.
259. Liu L, Brown D, McKee M, LeBrasseur NK, Yang D, Albrecht KH, et al. Deletion of Cavin/PTRF Causes Global Loss of Caveolae, Dyslipidemia, and Glucose Intolerance. *Cell Metab.* 2008;8(4):310–7.
260. Pelkmans L, Zerial M. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature.* 2005;436(7047):128–33.
261. Parton RG, Tillu VA, Collins BM. Caveolae. *Curr Biol.* 2018;28(8):402–5.
262. Kovtun O, Tillu VA, Ariotti N, Parton RG, Collins BM. Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J Cell Sci.* 2015;128(7):1269–78.
263. Fairn GD, Schieber NL, Ariotti N, Murphy S, Kuerschner L, Webb RI, et al. High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J Cell Biol.* 2011;194(2):257–75.
264. Kovtun O, Tillu VA, Jung WR, Leneva N, Ariotti N, Chaudhary N, et al. Structural insights into the organization of the cavin membrane coat complex. *Dev Cell.* 2014;31(4):405–19.
265. Bastiani M, Liu L, Hill MM, Jedrychowski MP, Nixon SJ, Lo HP, et al. MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol.* 2009;185(7):1259–73.
266. 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;3:1–18.
267. Henley JR, Krueger EWA, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1998;141(1):85–99.
268. Hansen CG, Howard G, Nichols BJ. Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *J Cell Sci.* 2011;124(16):2777–85.
269. Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds:

- domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2009;185(3):381–5.
270. 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;8:1–15.
271. Blouin CM. Caveolae. In: *Methods in Molecular Biology.* 2020. p. 27–41.
272. 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.
273. Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, et al. Cholesterol and Fatty Acids Regulate Dynamic Caveolin Trafficking through the Golgi Complex and between the Cell Surface and Lipid Bodies. *Mol Biol Cell.* 2005;16:2091–105.
274. Krajewska WM, Masłowska I. Caveolins: Structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett.* 2004;9(2):195–220.
275. Patel HH, Murray F, Insel PA. Caveolae as Organizers of Pharmacologically Relevant Signal Transduction Molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:359–91.
276. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6525–33.
277. Boscher C, Nabi IR. Caveolin-1: Role in Cell Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2012;729:29–50.
278. Chaudhary N, Gomez GA, Howes MT, Lo HP, McMahon KA, Rae JA, et al. Endocytic Crosstalk: Cavins, Caveolins, and Caveolae Regulate Clathrin-Independent Endocytosis. *PLoS Biol.* 2014;12(4):e1001832.
279. Nwosu ZC, Ebert MP, Dooley S, Meyer C. Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: A cancer perspective. *Mol Cancer.* 2016;15(1):1–12.
280. Cheng JPX, Nichols BJ. Caveolae: One Function or Many? *Trends Cell Biol.* 2016;26(3):177–89.
281. 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.
282. Echarri A, Muriel O, Pavón DM, Azegrouz H, Escolar F, Terrón MC, et al. Caveolar domain organization and trafficking is regulated by Abl kinases and mDia1. *J Cell Sci*. 2012;125(18):3097–113.
283. Del Pozo MA, Alderson NB, Grande-García A. Phospho-Caveolin-1 Mediates Integrin-Regulated Membrane Domain Internalisation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2005;7(9):901–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
284. Muriel O, Echarri A, Hellriegel C, Pavón DM, Beccari L, del Pozo MA. Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J Cell Sci*. 2011;124(16):2763–76.
285. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, et al. PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function. *Cell*. 2008;132(1):113–24.
286. Lofthouse RA, Davis JR, Frondoza CG, Jinnah RH, Hungerford DS, Hare JM. Identification of caveolae and detection of caveolin in normal human osteoblasts. *J Bone Jt Surg*. 2001;83(1):124–9.
287. Solomon KR, Adolphson LD, Wank DA, McHugh KP, Hauschka P V. Caveolae in human and murine osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2000;15(12):2391–401.
288. Solomon KR, Danciu TE, Adolphson LD, Hecht LE, Hauschka P V. Caveolin-enriched membrane signaling complexes in human and murine osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2000;15(12):2380–90.
289. Galbiati F, Volonte D, Brown AMC, Weinstein DE, Ben-Ze'ev A, Pestell RG, et al. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin/Lef-1 signaling by recruiting  $\beta$ -catenin to caveolae membrane domains. *J Biol Chem*. 2000;275(30):23368–77.
290. Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC, Wysolmerski JJ. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res*. 2005;20(7):1103–13.

291. Gortazar AR, Martin-Millan M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T. Crosstalk between caveolin-1/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and  $\beta$ -catenin survival pathways in osteocyte mechanotransduction. *J Biol Chem*. 2013;288(12):8168–75.
292. 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.
293. Sawada N, Taketani Y, Amizuka N, Ichikawa M, Ogawa C, Nomoto K, et al. Caveolin-1 in extracellular matrix vesicles secreted from osteoblasts. *Bone*. 2007;41(1):52–8.
294. 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):41–50.
295. 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.
296. 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.
297. Boyan BD, Wong KL, Wang L, Yao H, Guldberg RE, Drab M, et al. Regulation of growth plate chondrocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D 3 requires caveolae and caveolin-1. *J Bone Miner Res*. 2006;21(10):1637–47.
298. 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.
299. Baker N, Zhang G, You Y, Tuan RS. Caveolin-1 regulates proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2012;113(12):3773–87.
300. Baker N, Sohn J, Tuan RS. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):1–11.
301. 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.
302. 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.
303. 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.
304. Ardura JA, Wang B, Watkins SC, Vilardaga JP, Friedman PA. Dynamic Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 association and dissociation regulate parathyroid hormone receptor trafficking at membrane microdomains. *J Biol Chem.* 2011;286(40):35020–9.
305. Moreno ML, Escobar J, Izquierdo-Álvarez A, Gil A, Pérez S, Pereda J, et al. Disulfide stress: A novel type of oxidative stress in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med.* 2014;70:265–77.
306. Alonso R, Pisa D, Marina AI, Morato E, Rábano A, Rodal I, et al. Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Biol Sci.* 2015;11(5):546–58.
307. 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):33241.
308. 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):1–10.
309. 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. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4653.
310. 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;8:1–17.
311. Nakakura T, Asano-Hoshino A, Suzuki T, Arisawa K, Tanaka H, Sekino Y, et al. The elongation of primary cilia via the acetylation of  $\alpha$ -tubulin by the

- treatment with lithium chloride in human fibroblast KD cells. *Med Mol Morphol.* 2015;48(1):44–53.
312. Feng SY, Lei J, Li YX, Shi WG, Wang RR, Yap AU, et al. Increased joint loading induces subchondral bone loss of the temporomandibular joint via the RANTES-CCRs-Akt2 axis. *JCI Insight.* 2022;7(21):1–18.
313. Tamasi JA, Vasilov A, Shimizu E, Benton N, Johnson J, Bitel CL, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of the anabolic action of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res.* 2013;28(9):1975–86.
314. Chen G, Ward MF, Sama AE, Wang H. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *J Interf Cytokine Res.* 2004;24(6):329–33.
315. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3551–63.
316. Crippa MP. Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):690–4.
317. Huang M, Cheng YL, Zeng JT, Su XY, Liu H. Inhibin  $\alpha$ -subunit inhibits BMP9-induced osteogenic differentiation through blocking BMP/Smad signal and activating NF- $\kappa$ B signal in mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2018;119(10):8271–81.
318. Thaler R, Sturmlechner I, Spitzer S, Riester SM, Rumpler M, Zwerina J, et al. Acute-phase protein serum amyloid A3 is a novel paracrine coupling factor that controls bone homeostasis. *FASEB J.* 2015;29(4):1344–59.
319. Gondkar K, Patel K, Okaly GVP, Nair B, Pandey A, Gowda H, et al. Dickkopf homolog 3 (Dkk3) acts as a potential tumor suppressor in gallbladder cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1–9.
320. Xue F, Wu Y, Zhao X, Zhao T, Meng Y, Zhao Z, et al. CHIP mediates down-regulation of nucleobindin-1 in preosteoblast cell line models. *Cell Signal.* 2016;28(8):1058–65.
321. Kitase Y, Lee S, Gluhak-Heinrich J, Johnson ML, Harris SE, Bonewald LF. CCL7 is a protective factor secreted by mechanically loaded osteocytes. *J Dent Res.* 2014;93(11):1108–15.
322. Weivoda MM, Chew CK, Monroe DG, Farr JN, Atkinson EJ, Geske JR, et

- al. Identification of osteoclast-osteoblast coupling factors in humans reveals links between bone and energy metabolism. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–13.
323. Corona A, Blobe GC. The role of the extracellular matrix protein TGFBI in cancer. *Cell Signal.* 2021;84:110028.
324. Kawai M, Rosen CJ. The Insulin-Like Growth Factor System in Bone. Basic and Clinical Implications. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012;41(2):323–33.
325. Fu Q, Wang W, Zhou T, Yang Y. Emerging roles of NudC family: from molecular regulation to clinical implications. *Sci China Life Sci.* 2016;59(5):455–62.
326. Nedeau AE, Bauer RJ, Gallagher K, Chen H, Liu ZJ, Velazquez OC. A CXCL5- and bFGF-dependent effect of PDGF-B-activated fibroblasts in promoting trafficking and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2008;314(11–12):2176–86.
327. Chini B, Parenti M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: How, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol.* 2004;32(2):325–38.
328. Oh P, Schnitzer JE. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. Gq binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas Gi and Gs target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell.* 2001;12(3):685–98.
329. Dowal L, Provitera P, Scarlata S. Stable association between Gαq and phospholipase Cβ1 in living cells. *J Biol Chem.* 2006;281(33):23999–4014.
330. Philip F, Sengupta P, Scarlata S. Signaling through a G protein-coupled receptor and its corresponding G protein follows a stoichiometrically limited model. *J Biol Chem.* 2007;282(26):19203–16.
331. Sengupta P, Philip F, Scarlata S. Caveolin-1 alters Ca<sup>2+</sup> signal duration through specific interaction with the Gαq family of G proteins. *J Cell Sci.* 2008;121(9):1363–72.
332. Calizo RC, Scarlata S. A role for G-proteins in directing G-protein-coupled receptor-caveolae localization. *Biochemistry.* 2012;51(47):9513–23.
333. Mahavadi S, Bhattacharya S, Kim J, Fayed S, Al-Shboual A, Grider JR, et al. Caveolae-dependent internalization and homologous desensitization of

- VIP/PACAP receptor, VPAC2, in gastrointestinal smooth muscle. *Peptides*. 2013;43:137–45.
334. 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.
335. Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(4):1163–8.
336. Compton JT, Lee FY. A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *J Bone Jt Surg Am*. 2014;96(19):1659–68.
337. 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.
338. Aguirre JI, Plotkin LI, Gortazar AR, Millan MM, O'Brien CA, Manolagas SC, et al. A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25501–8.
339. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Sumin G, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, et al. Mechanical Strain Opens Connexin 43 Hemichannels in Osteocytes: A Novel Mechanism for the Release of Prostaglandin. *Mol Biol Cell*. 2005;16:3100–3016.
340. Lu XL, Huo B, Chiang V, Guo XE. Osteocytic network is more responsive in calcium signaling than osteoblastic network under fluid flow. *J Bone Miner Res*. 2012;27(3):563–74.
341. Delgado-Calle J, Tu X, Pacheco-Costa R, McAndrews K, Edwards R, Pellegrini GG, et al. Control of Bone Anabolism in Response to Mechanical Loading and PTH by Distinct Mechanisms Downstream of the PTH Receptor. *J Bone Miner Res*. 2017;32(3):522–35.
342. Estell EG, Rosen CJ. Emerging insights into the comparative effectiveness of anabolic therapies for osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(1):31–46.
343. Ma Y, Jee WSS, Yuan Z, Wei W, Chen H, Pun S, et al. Parathyroid hormone and mechanical usage have a synergistic effect in rat tibial

- diaphyseal cortical bone. *J Bone Miner Res.* 1999;14(3):439–48.
344. Carvalho RS, Scott JE, Suga DM, Yen EHK. Stimulation of signal transduction pathways in osteoblasts by mechanical strain potentiated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res.* 1994;9(7):999–1011.
345. Miyauchi A, Notoya K, Mikuni-Takagaki Y, Takagi Y, Goto M, Miki Y, et al. Parathyroid hormone-activated volume-sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3335–42.
346. Gardinier JD, Al-Omaishi S, Morris MD, Kohn DH. PTH signaling mediates perilacunar remodeling during exercise. *Matrix Biol.* 2016 May;52–54:162–75.
347. Gardinier JD, Daly-Seiler C, Rostami N, Kundal S, Zhang C. Loss of the PTH/PTHrP receptor along the osteoblast lineage limits the anabolic response to exercise. Genetos DC, editor. *PLoS One.* 2019 Jan;14(1):e0211076.
348. Robinson ST, Shyu PT, Guo XE. Mechanical loading and parathyroid hormone effects and synergism in bone vary by site and modeling/remodeling regime. *Bone.* 2021;153:116–71.
349. Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB WS. A Model for the Role of Integrins in Flow Induced Mechanotransduction in Osteocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(40):15941–6.
350. Chen X, Macica CM, Ng KW, Broadus AE. Stretch-induced PTH-related protein gene expression in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2005 Aug;20(8):1454–61.
351. 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.
352. Moore ER, Chen JC, Jacobs CR. Prx1-Expressing Progenitor Primary Cilia Mediate Bone Formation in response to Mechanical Loading in Mice. *Stem Cells Int.* 2019;2019:3094154.
353. Choy MHV, Wong RMY, Chow SKH, Li MC, Chim YN, Li TK, et al. How much do we know about the role of osteocytes in different phases of fracture healing? A systematic review. *J Orthop Transl.* 2020;21:111–21.
354. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.*

- 2014;94(1):25–34.
355. 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):1–16.
356. Sun YX, Xu AH, Yang Y, Li J. Role of Nrf2 in bone metabolism. *J Biomed Sci.* 2015;22(1):1–7.
357. Hoey DA, Downs M, Jacobs CR. The Mechanics of the Primary Cilium: An Intricate Structure with Complex Function. *J Biomech.* 2012;45(1):17–26.
358. Lai Y, Jiang Y. Reciprocal regulation between primary cilia and mtorc1. *Genes (Basel).* 2020;11(6):1–15.
359. Sherpa RT, Atkinson KF, Ferreira VP, and Nauli SM. Rapamycin increases length and mechanosensory function of primary cilia in renal epithelial and vascular endothelial cells. *Int J Educ Res.* 2016;2(12):91–7.
360. 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):208769.
361. 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.
362. Bakker AD, Gakes T, Hogervorst JMA, de Wit GMJ, Klein-Nulend J, Jaspers RT. Mechanical Stimulation and IGF-1 Enhance mRNA Translation Rate in Osteoblasts Via Activation of the AKT-mTOR Pathway. *J Cell Physiol.* 2016;231(6):1283–90.
363. Spasic M, Jacobs CR. Lengthening primary cilia enhances cellular mechanosensitivity. *Eur Cells Mater.* 2017;33:158–68.
364. Spasic M, Duffy MP, Jacobs CR. Fenoldopam Sensitizes Primary Cilia-Mediated Mechanosensing to Promote Osteogenic Intercellular Signaling and Whole Bone Adaptation. *J Bone Miner Res.* 2022;37(5):972–82.
365. 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.
366. Marcet B, Chevalier B, Coraux C, Kodjabachian L, Barbry P. MicroRNA-

- based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell Cycle*. 2011;10(17):2858–64.
367. 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.
368. 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.
369. Moore ER, Jacobs CR. The primary cilium as a signaling nexus for growth plate function and subsequent skeletal development. *J Orthop Res*. 2018;36(2):533–45.
370. Chow JWM, Fox S, Jagger CJ, Chambers TJ. Role for parathyroid hormone in mechanical responsiveness of rat bone. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1998;274(1):146–54.
371. Kim CH, Takai E, Zhou H, Von Stechow D, Müller R, Dempster DW, et al. Trabecular Bone Response to Mechanical and Parathyroid Hormone Stimulation: The Role of Mechanical Microenvironment. *J Bone Miner Res*. 2003;18(12):2116–25.
372. Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone*. 2017;96:29–37.
373. Simfia I, Schiavi J, McNamara LM. Alterations in osteocyte mediated osteoclastogenesis during estrogen deficiency and under ROCK-II inhibition: An in vitro study using a novel postmenopausal multicellular niche model. *Exp Cell Res*. 2020;392(1):112005.
374. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*. 2011;17(10):1235–41.
375. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013;19(2):179–92.
376. Kim HR, Kim KW, Kim BM, Jung HG, Cho M La, Lee SH. Reciprocal activation of cd4+ t cells and synovial fibroblasts by stromal cell-derived factor 1 promotes rankl expression and osteoclastogenesis in rheumatoid

- arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(3):538–48.
377. Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SRJ, Morrison NA. MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFκB ligand for bone resorption. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1274–85.
378. Takayanagi H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(12):667–76.
379. O'Brien W, Fissel BM, Maeda Y, Yan J, Ge X, Gravallesse EM, et al. RANK-Independent Osteoclast Formation and Bone Erosion in Inflammatory Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(12):2889–900.
380. Nouailles G, Dorhoi A, Koch M, Zerrahn J, Weiner J, Faé K, et al. CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1268–82.
381. Yoshida K, Korchynskiy O, Tak PP, Isozaki T, Ruth JH, Campbell PL, et al. Citrullination of Epithelial Neutrophil-Activating Peptide 78/CXCL5 Results in Conversion from a Non-Monocyte-Recruiting Chemokine to a Monocyte-Recruiting Chemokine. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(10):2716–27.
382. Grassi F, Piacentini A, Cristino S, Toneguzzi S, Cavallo C, Facchini A, et al. Human osteoclasts express different CXC chemokines depending on cell culture substrate: Molecular and immunocytochemical evidence of high levels of CXCL10 and CXCL12. *Histochem Cell Biol.* 2003;120(5):391–400.
383. Li A, King J, Moro A, Sugi MD, Dawson DW, Kaplan J, et al. Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer. *Am J Pathol.* 2011;178(3):1340–9.
384. Sundaram K, Rao DS, Ries WL, Reddy S V. CXCL5 stimulation of RANK ligand expression in Paget's disease of bone. *Lab Investig.* 2013;93(4):472–9.
385. Ethiraj P, Link JR, Sinkway JM, Brown GD, Parler WA, Reddy S V. Microgravity modulation of syncytin-A expression enhance osteoclast formation. *J Cell Biochem.* 2018;119(7):5696–703.
386. Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 enhances osteocyte-mediated

- osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(4):1360–9.
387. Cheung WY, Simmons CA, You L. Osteocyte apoptosis regulates osteoclast precursor adhesion via osteocytic IL-6 secretion and endothelial ICAM-1 expression. *Bone*. 2012;50(1):104–10.
388. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Kitaura H, Kayama H, Miyoshi F, et al. Combination of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both in vitro and in vivo. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(1):121–9.
389. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol*. 2002;169(6):3353–62.
390. Luikart SD, Levay-Young B, Hinkel T, Shearer J, Mills C, Caldwell MD, et al. Mactinin treatment promotes wound-healing-associated inflammation in urokinase knockout mice. *Wound Repair Regen*. 2006;14(2):123–8.
391. Bryer SC, Fantuzzi G, Van Rooijen N, Koh TJ. Urokinase-Type Plasminogen Activator Plays Essential Roles in Macrophage Chemotaxis and Skeletal Muscle Regeneration. *J Immunol*. 2008;180(2):1179–88.
392. Daniel RJ, Groves RW. Increased migration of murine keratinocytes under hypoxia is mediated by induction of urokinase plasminogen activator. *J Invest Dermatol*. 2002;119(6):1304–9.
393. Nonaka T, Matsumoto H, Shimada W, Okada K, Fukao H, Ueshima S, et al. Effect of bone resorbing factors on u-PA and its specific receptor in osteosarcoma cell line. *Clin Chim Acta*. 1993;223(1–2):129–42.
394. Nonaka T, Okada K, Fukao H, Ueshima S, Kikuchi H, Matsuo O. Regulation of scu-PA secretion and u-PA Receptor Expression in Osteoblast-like Cells. *Cell Struct Funct*. 1993;18:355–62.
395. Kohara Y, Kitazawa R, Haraguchi R, Imai Y, Kitazawa S. Macrophages are requisite for angiogenesis of type H vessels during bone regeneration in mice. *Bone*. 2022;154:116200.
396. 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.
397. 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.
398. 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.
399. 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.
400. 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.
401. Komatsu N, Takayanagi H. Autoimmune Arthritis. The Interface Between the Immune System and Joints. 1st ed. Vol. 115, *Advances in Immunology*. Elsevier Inc.; 2012. 45–71 p.
402. 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.
403. 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):1–12.
404. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem*. 1998;273(52):34724–9.
405. 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):1113–22.

406. Del Pozo MA, Alderson NB, Kiosses WB, Chiang HH, Anderson RGW, Schwartz MA. Integrins Regulate Rac Targeting by Internalization of Membrane Domains. *Science*. 2004;303(5659):839–42.
407. Sato M, Hutchinson DS, Halls ML, Furness SGB, Bengtsson T, Evans BA, et al. Interaction with caveolin-1 modulates G protein coupling of mouse  $\beta$ 3-adrenoceptor. *J Biol Chem*. 2012;287(24):20674–88.
408. Insel PA, Head BP, Patel HH, Roth DM, Bunday RA, Swaney JS. Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(5):1131–4.
409. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(24):11728–32.
410. Shin H, Haga JH, Kosawada T, Kimura K, Li YS, Chien S, et al. Fine control of endothelial VEGFR-2 activation: caveolae as fluid shear stress shelters for membrane receptors. *Biomech Model Mechanobiol*. 2019;18(1):5–16.
411. Yang L, Scarlata S. Super-resolution visualization of caveola deformation in response to osmotic stress. *J Biol Chem*. 2017;292(9):3779–88.
412. Yang W, Xu T, Qiu P, Xu G. Caveolin-1 promotes pituitary adenoma cells migration and invasion by regulating the interaction between EGR1 and KLF5. *Exp Cell Res*. 2018;367(1):7–14.
413. Dong X, Li Y, Li W, Kang W, Tang R, Wu W, et al. The function of Cav-1 in MDA-MB-231 breast cancer cell migration and invasion induced by ectopic ATP5B. *Med Oncol*. 2021;38(6):1–11.
414. Yang J, Zhu T, Zhao R, Gao D, Cui Y, Wang K, et al. Caveolin-1 inhibits proliferation, migration, and invasion of human colorectal cancer cells by suppressing phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Med Sci Monit*. 2018;24:332–41.
415. Katsuno-Kambe H, Parton RG, Yap AS, Teo JL. Caveolin-1 influences epithelial collective cell migration via FMNL2 formin. *Biol Cell*. 2021;113(2):107–17.
416. Wu Z, Zhu M, Mou X xin, Ye L. Overexpressing of caveolin-1 in mesenchymal stem cells promotes deep second-degree burn wound

- healing. *J Biosci Bioeng.* 2021;131(4):341–7.
417. Bai L, Shi G, Zhang L, Zhang L, Guan F, Ma Y, et al. Cav-1 deletion impaired hematopoietic stem cell function. *Cell Death Dis.* 2014;5(3):1–8.
418. Parat MO. The Biology of Caveolae. Achievements and Perspectives. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009;273:117–62.
419. Hada N, Okayasu M, Ito J, Nakayachi M, Hayashida C, Kaneda T, et al. Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-dependent expression of caveolin-1 in osteoclast precursors, and high dependency of osteoclastogenesis on exogenous lipoprotein. *Bone.* 2012;50(1):226–36.
420. 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.
421. Lee YD, Yoon SH, Ji E, Kim HH. Caveolin-1 regulates osteoclast differentiation by suppressing cFms degradation. *Exp Mol Med.* 2015;47(10):192.
422. Lolo FN, Walani N, Seemann E, Zalvidea D, Pavón DM, Cojoc G, et al. Caveolin-1 dolines form a distinct and rapid caveolae-independent mechanoadaptation system. *Nat Cell Biol.* 2023;25(1):120–33.
423. Yamakawa D, Katoh D, Kasahara K, Shiromizu T, Matsuyama M, Matsuda C, et al. Primary cilia-dependent lipid raft/caveolin dynamics regulate adipogenesis. *Cell Rep.* 2021;34(10):108817.
424. Nishimura Y, Yamakawa D, Uchida K, Shiromizu T, Watanabe M, Inagaki M. Primary cilia and lipid raft dynamics. *Open Biol.* 2021;11(8):1–7.
425. Rangel L, Bernabé-Rubio M, Fernández-Barrera J, Casares-Arias J, Millán J, Alonso MA, et al. Caveolin-1 $\alpha$  regulates primary cilium length by controlling RhoA GTPase activity. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–16.
426. Jeffries EP, Di Filippo M, Galbiati F. Failure to reabsorb the primary cilium induces cellular senescence. *FASEB J.* 2019;33(4):4866–82.



***Anexos***



## 1. Publicaciones relacionadas con el trabajo de Tesis

- Tablado-Molinera A., Gutiérrez-Rojas I., Álvarez-Carrión L., **Tirado-Cabrera I.**, Heredero-Jimenez S., Gortázar A., Ardura J.A. *The secretome of mechanically stimulated osteocytes modulates mesenchymal cell function.* Rev Osteoporos Metab Miner. 2023;15(1):21-28.
- Heredero-Jiménez S., **Tirado-Cabrera I.**, Martín-Guerrero E., Pizarro-Gómez J., Gortazar A., Ardura J.A. *Implication of connexins, integrins and primary cilium in bone cell activity.* Rev Osteoporos Metab Miner. 2023;15(1):12-20.
- **Tirado-Cabrera I.**, Martín-Guerrero E., Heredero-Jiménez S., Ardura J.A., Gortazar A. *PTH1R translocation to primary cilia in mechanically-stimulated osteocytes prevents osteoclast formation via regulation of CXCL5 and IL-6 secretion.* J Cell Physiol. 2022;1–17.
- Martín-Guerrero E., **Tirado-Cabrera I.**, Buendía I., Alonso V., Gortazar A., Ardura J.A. *Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation.* J Cell Physiol. 2020;1–14.
- Heredero-Jiménez S., **Tirado-Cabrera I.**, Martín-Guerrero E., Ardura J.A., Gortazar A. *Cx43 and primary cilium involvement in osteocyte activity.* Rev Osteoporos Metab Miner. 2020;12(4):135-140.
- Cadenas M., **Tirado-Cabrera I.**, Martín-Guerrero E., Ardura J.A., Bravo B., Gortazar A. *Effects of mechanical stimulation on communication between bone cells.* Rev Osteoporos Metab Miner. 2019;11(1):12-18.

## 2. Publicaciones no directamente relacionadas con el trabajo de Tesis

- Bravo B., Guisasola M.C., **Tirado-Cabrera I.**, Gortazar A., Forriol F., Vaquero J. *Gene expression, protein profiling and chemotactic activity of infrapatellar fat pad mesenchymal stem cells in pathologies of the knee joint.* J Cell Physiol. 2019;1–11.

## 3. Congresos

- Joan Pizarro-Gómez, **Irene Tirado-Cabrera**, Sara Heredero-Jiménez, Juan Antonio Ardura, Arancha R. Gortázar. *Un entorno con alta glucosa reduce la respuesta de los osteocitos a la estimulación mecánica al afectar a su comunicación con otras células de la médula ósea.* XXVII Congreso SEIOMM. Sevilla, 22 al 24 de noviembre de 2023. **Comunicación oral.**
- Sara Heredero-Jiménez, Eduardo Martín-Guerrero, Joan Pizarro-Gómez, **Irene Tirado-Cabrera**, Arancha R. Gortázar, Juan A. Ardura. *Caveolina-1 se sobreexpresa en el hueso durante el envejecimiento alterando los efectos biológicos del receptor de la parathormona PTH1R en células del linaje osteoblástico.* XXVII Congreso SEIOMM. Sevilla, 22 al 24 de noviembre de 2023. **Póster.**
- Joan Pizarro-Gómez, **Irene Tirado-Cabrera**, Sara Heredero-Jimenez, Juan Antonio Ardura, Arancha R. Gortázar. *High-glucose environment reduces the response to mechanical stimulation by affecting its communication with other cells in the bone marrow.* ASBMR 2023 Annual Meeting (American Society for Bone and Mineral Research). Vancouver, BC, (Canada), 13 al 16 de octubre de 2023. **Póster.**
- Sara Heredero-Jiménez, Eduardo Martín-Guerrero, Joan Pizarro-Gómez, **Irene Tirado-Cabrera**, Arancha R. Gortázar, Juan A. Ardura. *Caveolin-1 microdomains mediate parathyroid hormone receptor type 1 signaling and osteogenic actions in bone cells.* ASBMR 2023 Annual Meeting (American

- Society for Bone and Mineral Research). Vancouver, BC, (Canada), 13 al 16 de octubre de 2023. **Póster.**
- **Irene Tirado Cabrera**, Joan Pizarro Gómez, Sara Heredero Jiménez, Juan A Ardura, Arancha R Gortázar. *Osteocytic caveolin-1 regulates migration and differentiation of osteoclast precursors and mesenchymal cell migration*. 4th Herbert Fleisch Workshop. Brugge, 20 al 22 de noviembre de 2022. **Comunicación oral.**
  - **Irene Tirado Cabrera**. *Investigación básica: la localización de receptores mecanosensibles en la membrana plasmática de osteocitos y osteoblastos modifica su sensibilidad a estímulos y su respuesta (beca FEIOMM 2019)*. XXVI Congreso SEIOMM. Madrid, 5 al 7 de octubre de 2022. **Ponencia.**
  - **Irene Tirado Cabrera**, Joan Pizarro Gómez, Sara Heredero Jiménez, Juan A. Ardura Rodríguez, Arancha R. Gortázar. *La caveolina-1 en osteocitos es clave para la regulación de la migración y diferenciación de precursores osteoclastícos*. XXVI Congreso SEIOMM. Madrid, 5 al 7 de octubre de 2022. **Póster.**
  - Sara Heredero Jiménez, Eduardo Martín Guerrero, **Irene Tirado Cabrera**, Joan Pizarro Gómez, Arancha R. Gortázar, Juan A. Ardura. *Caveolina-1 interviene en la localización de PTH1R a microdominios subcelulares de osteoblastos regulando la señalización intracelular e influyendo en sus respuestas biológicas*. XXVI Congreso SEIOMM. Madrid, 5 al 7 de octubre de 2022. **Póster.**
  - Sara Heredero-Jimenez, **Irene Tirado-Cabrera**, Joan Pizarro, Juan A. Ardura, Arancha R. Gortazar. *Selective mobilization of PTH1R by mechanical stimulation but not by PTHrP in osteocytes*. ASBMR 2022

- Annual Meeting (American Society for Bone and Mineral Research). Austin, Texas, (USA), 9 al 22 de septiembre de 2022. **Póster.**
- **Irene Tirado Cabrera**, Eduardo Martín Guerrero, Sara Heredero Jiménez, Juan A. Ardura, Arancha R. Gortázar. *El cilio primario y el receptor 1 de la parathormona (PTH1R) en osteocitos son necesarios para la comunicación osteocito-osteoclasto.* XXV Congreso SEIOMM. Vitoria-Gasteiz, 27 al 29 de octubre del 2021. **Comunicación oral.**
  - Eduardo Martín Guerrero, Sara Heredero Jiménez, **Irene Tirado Cabrera**, Arancha R Gortázar, Juan A. Ardura. *La caveolina-1 regula la señalización intracelular y la distribución del receptor de parathormona en microdominios subcelulares de osteoblastos: un estudio mediante microscopía confocal en células vivas.* XXV Congreso SEIOMM. Vitoria-Gasteiz, 27 al 29 de octubre del 2021. **Comunicación oral.**
  - **Irene Tirado Cabrera**, Eduardo Martín Guerrero, Sara Heredero Jiménez, Juan A. Ardura, Arancha R. Gortázar. *Role of primary cilia and parathyroid hormone (PTH) receptor type 1 (PTH1R) in osteocyte- osteoclast communication.* ASBMR 2020 Annual Meeting (American Society for Bone and Mineral Research). Online, 11 al 15 de septiembre de 2020. **Póster.**
  - Eduardo Martín Guerrero, **Irene Tirado Cabrera**, Irene Buendía, Verónica Alonso, Arancha R. Gortázar, Juan A. Ardura. *El cilio primario media acciones pro-supervivencia y de remodelado óseodependientes de PTHrP en osteocitos y osteoblastos a través de la vía de señalización hedgehog.* XXIV Congreso SEIOMM. Girona, 16 al 18 de octubre de 2019. **Póster.**
  - Eduardo Martín Guerrero, **Irene Tirado Cabrera**, Irene Buendía, Sara Heredero Jiménez, Arancha R. Gortázar, Juan A. Ardura. *Primary Cilia*

- Mediates PTHrP-dependent Prosurvival Actions on Bone cells via Hedgehog Signaling Pathway.* ASBMR 2019 Annual Meeting (American Society for Bone and Mineral Research). Orlando, Florida, (USA), 20 al 23 de septiembre de 2019. **Póster.**
- **Irene Tirado Cabrera**, Marta Cadenas Martín, Eduardo Martín Guerrero, Irene Buendía, Beatriz Bravo, Juan A. Ardura, Arancha R. Gortázar. *El cilio primario en osteocitos es necesario para la comunicación osteocito-osteoclasto.* XXIII Congreso SEIOMM. Granada, 7 al 9 de noviembre de 2018. **Comunicación oral.**
  - Eduardo Martín Guerrero, **Irene Tirado Cabrera**, Marta Cadenas Martín, Irene Buendía, Beatriz Bravo, Arancha R. Gortázar, Juan A. Ardura. *La activación del receptor de la parathormona (PTH1R) por mecanoestimulación genera diferentes respuestas osteogénicas respecto a estimulación por ligando en osteocitos y osteoblastos; mediación del cilio primario.* XXIII Congreso SEIOMM. Granada, 7 al 9 de noviembre de 2018. **Póster.**
  - Arancha R Gortázar, Irene Buendía, Eduardo Martín-Guerrero, **Irene Tirado-Cabrera**, Juan A Ardura. *Role of Parathyroid Hormone Receptor Type 1 and Primary Cilia in Bone Mechanotransduction on Osteocytes and Osteoblasts.* ASBMR 2018 Annual Meeting (American Society for Bone and Mineral Research). Montreal, Quebec, (Canadá), 28 de septiembre al 1 de octubre de 2018. **Póster.**
  - Beatriz Bravo, **Irene Tirado**, Irene Buendía, Juan A. Ardura, Francisco Forriol, Arancha R. Gortázar. *Estudio del secretoma de células mesenquimales progenitoras de grasa de Hoffa en pacientes con artrosis.* XXII Congreso SEIOMM. Elche, 25 al 27 de octubre de 2017. **Póster.**



#### **4. Divulgación científica**

- *¿Tienen razón los abuelos cuando dicen que el dolor de articulaciones lo causa la humedad?* The Conversation. 2021.