

Maycas M<sup>1</sup>, Fernández de Castro L<sup>2</sup>, Bravo B<sup>2</sup>, García de Durango C<sup>2</sup>, Forriol F<sup>2</sup>, R. Gortázar A<sup>2</sup>, Esbrit P<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria (IIS)-Fundación Jiménez Díaz - UAM - Madrid (España)

2 IMMA-Facultad de Medicina Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España)

## El receptor 2 de VEGF (VEGFR2) y el receptor 1 de la PTH (PTH1R) actúan como mediadores de la respuesta anti-apoptótica al estímulo mecánico en las células osteocíticas MLO-Y4

Correspondencia: Pedro Esbrit - Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - IIS-Fundación Jiménez Díaz - UAM - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)  
Correo electrónico: pesbrit@fjd.es

Fecha de recepción: 15/09/2015

Fecha de aceptación: 06/11/2015

*Trabajo becado para asistir al 34º Congreso de la ASBMR (Minneapolis, 2012).*

### Resumen

La estimulación mecánica juega un papel fundamental en el mantenimiento de la masa ósea. Dicha estimulación previene la apoptosis de los osteocitos por un mecanismo que implica la acumulación de  $\beta$ -catenina y la translocación nuclear de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) modulan la formación ósea, aunque su interacción con los osteocitos es desconocida. En el presente estudio hemos evaluado el posible papel del receptor 2 del VEGF (VEGFR2) y del receptor tipo 1 de PTH (PTH1R) en la respuesta anti-apoptótica a la estimulación mecánica en células osteocíticas MLO-Y4. Las células se sometieron a estrés mecánico por flujo laminar de fluido (10 min, 10 dinas/cm<sup>2</sup>) o choque hipotónico (240 mOsm, 1h), o estimuladas con VEGF<sub>165</sub> o PTHrP (1-36). Además, comparamos los efectos de sobre-expresar VEGFR2 y el estímulo mecánico en estas células. La estimulación mecánica, el VEGF<sub>165</sub> o la PTHrP (1-36), de manera similar, estimularon la viabilidad celular y la estabilización de  $\beta$ -catenina, relacionada con su localización en la membrana. Además, la estimulación mecánica aumentó la presencia del PTH1R en la membrana. La inhibición del VEGFR2 así como el antagonista PTHrP (7-34) disminuyeron estos efectos. Por otro lado, la sobre-expresión del VEGFR2 en las células MLO-Y4 mimetizó el efecto del estímulo mecánico sobre la  $\beta$ -catenina y la viabilidad celular. Estos hallazgos apoyan un papel funcional de ambos sistemas, VEGF/VEGFR2 y PTHrP/PTH1R, en la respuesta temprana a la estimulación mecánica para promover la viabilidad osteocítica.

**Palabras clave:** PTH1R, VEGFR2, estímulo mecánico,  $\beta$ -catenina, apoptosis.

# 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

## Summary

Mechanical stimulation plays a crucial role in bone mineral maintenance. This stimulation prevents osteocyte apoptosis by a mechanism that involves  $\beta$ -catenin accumulation and nuclear translocation of extracellular-signal-regulated kinases (ERKs). The vascular endothelial growth factor (VEGF) and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) modulate bone formation, although their interaction with osteocytes is unknown. In this paper we have considered the possible role of VEGF (VEGFR2) 2 receptor and PTH (PTH1R) type 1 receptor in the anti-apoptotic response to mechanical stimulation of MLO-Y4 osteocyte-like cells. The cells were subjected to mechanical stress by laminar fluid flow (10 min, 10 dinas/cm<sup>2</sup>) or hypotonic shock (240 mOsm, 1h), or stimulated with VEGF<sub>165</sub> or PTHrP (1-36). We also compared the effects of overexpressed VEGFR2 and mechanical stimulation of these cells. Mechanical stimulation, VEGF<sub>165</sub> or PTHrP (1-36) stimulated cellular viability and  $\beta$ -catenin stabilization in a similar manner, associated with its localization in the membrane. Mechanical stimulation increased PTH1R presence in the membrane. VEGFR2 inhibition as well as the PTHrP (7-34) antagonist reduced these effects. On the other hand, VEGFR2 overexpression in MLO-Y4 cells mimicked the mechanical stimulation effect on  $\beta$ -catenin and cellular viability. Our findings support a functional role for both systems, VEGF/VEGFR2 and PTHrP/PTH1R, in the early response to mechanical stimulation in promoting osteocyte-like viability.

**Key words:** PTH1R, VEGFR2, mechanical stimulation,  $\beta$ -catenin, apoptosis.

## Introducción

El esqueleto se adapta a las fuerzas mecánicas cambiando su masa, macro- y micro-arquitectura<sup>1</sup>. La actividad física incrementa la formación ósea, mientras que la inmovilización aumenta la resorción ósea<sup>2,4</sup>. Los osteocitos, células mayoritarias del hueso, son osteoblastos diferenciados a término que se encuentran embebidos en la matriz mineralizada formando una red mecanosensible. Ratones transgénicos con ablación de los osteocitos presentan una pérdida de hueso trabecular y cortical<sup>5</sup>. Esto es consecuente con la capacidad de los osteocitos para detectar cambios en la carga mecánica y responder coordinando la función de los osteoblastos y los osteoclastos<sup>6,8</sup>.

La evidencia acumulada indica que las fuerzas mecánicas regulan la viabilidad de los osteocitos por mecanismos mal definidos. Estudios *in vivo* en roedores e *in vitro* en cultivos de células osteocíticas demuestran que niveles fisiológicos de carga mecánica reducen la apoptosis osteocítica, mientras que la falta de estímulos mecánicos la promueve<sup>4,9,10</sup>. La activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, un importante regulador de la proliferación y la diferenciación osteoblástica<sup>11</sup>, es esencial para el incremento de la formación ósea en respuesta a la carga mecánica<sup>12,13</sup>. La estimulación mecánica de los osteocitos del cúbito de ratón produce una activación rápida de esta vía<sup>13</sup>, asociada a una reducción de la expresión de Sost/esclerostina, un inhibidor de la misma y de la formación ósea<sup>14</sup>. Se ha sugerido el papel de la prostaglandina E2, así como del NO y de la vía de fosfatidilinositol 3 -kinase/Akt en la estabilización de  $\beta$ -catenina y la supervivencia celular por la estimulación mecánica en los osteo-

citios<sup>15,16</sup>. Recientemente, se ha publicado que la estimulación mecánica promueve la formación de un complejo de señalización formado por integritinas, la quinasa Src, quinasas de adhesión focal y la caveolina -1, lo que resulta en la fosforilación y translocación nuclear de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK)<sup>17,18</sup>.

Se ha demostrado que la acción anabólica de la hormona paratiroidea (PTH) depende en gran medida de su efecto anti-apoptótico a través del receptor tipo de 1 de PTH (PTH1R) en osteoblastos y osteocitos<sup>19,20</sup>. Ratones con eliminación heterocigótica del gen de la proteína relacionada con la PTH (PTHrP), su homólogo local en el hueso, en osteoblastos muestran osteopenia asociada a la disminución de supervivencia de osteoblastos y osteocitos<sup>21</sup>. Además, ratones con supresión condicional de la PTH1R específicamente en osteocitos presentan una homeostasis del calcio alterada y osteopenia<sup>22</sup>. En cambio, ratones con sobre-expresión constitutiva de este receptor en los osteocitos muestran un aumento de la formación ósea perióstica, asociado a activación de la vía Wnt y disminución de la apoptosis osteoblástica<sup>23</sup>. El posible papel del PTH1R como mediador del mantenimiento de la masa ósea por estímulos mecánicos es, no obstante, desconocido. En este sentido, parece existir un efecto sinérgico de la carga mecánica y la acción anabólica de la PTH sobre la formación y la resistencia ósea en huesos largos de rata<sup>24</sup>. *In vitro*, el flujo de fluido se ha demostrado que altera la conformación del PTH1R en células osteoblásticas MC3T3-E1<sup>25</sup>. Es más, también *in vitro*, la estimulación mecánica induce la expresión génica de PTHrP –el ligando local del PTH1R en el hueso– en

células osteoblásticas y en osteocitos<sup>26</sup>. Por otro lado, el factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF) es un importante factor angiogénico, modulador de la formación y la reparación ósea, principalmente a través de su receptor 2 (VEGFR2)<sup>27</sup>. El sistema VEGF/VEGFR2 es un importante mediador de la proliferación, supervivencia y diferenciación de osteoblastos y osteoclastos<sup>28,29</sup>. El VEGFR2 actúa como mediador de las acciones de la PTHrP sobre la diferenciación y la apoptosis en los osteoblastos<sup>29,31</sup>. En células endoteliales, este receptor se activa por estímulos mecánicos de una manera independiente del ligando VEGF<sup>32</sup>.

En el presente estudio, hemos evaluado la posible implicación de los sistemas PTHrP/PTH1R y VEGF/VEGFR2 en la supervivencia de las células osteocíticas MLO-Y4 promovida por la estimulación mecánica.

## Material y métodos

**Cultivos celulares:** Las células MLO-Y4 y MLO-Y4-GFP –amablemente proporcionadas por la Dra. Lynda Bonewald (Universidad de Missouri, Kansas City, Missouri, EE.UU.) y por la Dra. Teresita Bellido (Universidad de Indiana, Indianapolis, Indiana, EE.UU.), respectivamente– se cultivaron en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) 2,5%, suero de ternera (CS) 2,5% y 1% de penicilina-estreptomina en atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> 5%, a 37°C. Las células se cultivaron a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo o portaobjetos de vidrio, ambos revestidos con colágeno (FlexCell, Hillsborough, Carolina del Norte, EE.UU.); al día siguiente se añadió medio fresco durante 24 h. A continuación, las células se sometieron o no (controles) a estímulo mecánico por tensión de cizallamiento, bien mediante flujo de fluido laminar o por exposición a un medio hipotónico durante diferentes tiempos, como se describe a continuación. Las células se pre-incubaron con PTHrP (1-36) (100 nM) –generosamente suministrada por los Dres. A.F. Stewart y A. García Ocaña (Facultad de Medicina, Universidad de Pittsburgh, Pennsylvania, EE.UU.)– o VEGF<sub>165</sub> (6 ng/ml) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) como agonistas, o con los siguientes antagonistas e inhibidores: [Asn<sup>10</sup>, Leu<sup>11</sup>, D-Trp<sup>12</sup>] PTHrP (7-34) amida [PTHrP (7-34)] (1 M) y JB 4250 (1  $\mu$ M)<sup>6</sup>; un anticuerpo neutralizante de VEGF monoclonal (0,1 mg/ml) (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.); o SU5416, un inhibidor de la fosforilación del VEGFR2 (1 M) (Calbiochem). Estos agentes se añadieron 30 min -1 h antes de la estimulación mecánica.

**Estímulos mecánicos:** Las células fueron sometidas o no (control) a flujo de fluido a una velocidad de 10 dinas/cm<sup>2</sup>, 8 Hz, durante 10 min en un dispositivo de estrés Flexcell® Streamer® Shear<sup>7</sup>. El choque osmótico se llevó a cabo mediante la sustitución del medio de cultivo en la placa de cultivo celular por una solución hipotónica (240 mOsm) durante 1 h. La exposición de las células a la solución isotónica (317 mOsm) se utilizó como control. Tras la

estimulación mecánica, se recogieron los extractos proteicos o se incubaron las células con un agente pro-apoptótico (etopósido) durante 6 h.

**Inmunocitoquímica:** Las células se fijaron con p-formaldehído 2% y se permeabilizaron con Tritón 0,1% en solución salina fosfatada (PBS). La unión no específica se bloqueó con albúmina de suero bovino 5%, seguido de incubación durante toda la noche con un anticuerpo primario policlonal de conejo anti- $\beta$ -catenina (Abcam, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) en cámara húmeda y fría. Las células se lavaron con Tritón-PBS 0,1% antes de su incubación durante 1 h con IgG anti-conejo conjugada con Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). Las micrografías se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia.

**Transfección celular:** Las células fueron transfectadas con un plásmido que expresa un dominante negativo de VEGFR2 (dnVEGFR2), un plásmido que sobre-expresa VEGFR2 (amablemente proporcionados por el Dr. Alex Ullrich, Instituto Max-Planck de Bioquímica, Martinsried, Alemania), o el vector vacío (pcDNA, Invitrogen), utilizando lipofectamina LTX Plus (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Ensayos de muerte/apoptosis celular:** Las células MLO-Y4 fueron expuestas a etopósido (50  $\mu$ M) durante 6 h para inducir la apoptosis tras los estímulos mecánicos. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripán y la apoptosis en células MLO-Y4-GFP se evaluó mediante la visualización de condensación de la cromatina y/o la fragmentación nuclear. Se calculó en cada caso el porcentaje de células no viables frente al número total de células. La muerte celular inducida por etopósido en estas células representó: 13,6 $\pm$ 0,8% o 30,3 $\pm$ 0,4%, por exclusión de azul de tripán o morfología nuclear, respectivamente. Estos valores se normalizaron a 100% en las figuras. Los valores correspondientes de las células sin tratar con etopósido fueron: 1 $\pm$ 0,5 o 1,2 $\pm$ 0,5%, respectivamente.

**Transferencia *western*:** Se utilizó un sistema comercial de fraccionamiento subcelular de proteínas (Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.) para la obtención de extractos de membrana y proteína nuclear. Estos extractos (25-30 g) se separaron a continuación por SDS-PAGE (8-12% de poliacrilamida) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE-Amersham, Pittsburgh, Pennsylvania, EE.UU.). Las membranas se bloquearon con leche desnatada 2,5% en Tween-PBS 0,1% a temperatura ambiente durante 1 h y, posteriormente, se incubaron toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos policlonales de conejo: anti- $\beta$ -catenina (Abcam); anti-PTH1R (Ab-IV, Covance, Berkeley, California, EE.UU.); y anti-ERK1/2 (Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EE.UU.). Como controles de carga se utilizaron los siguientes anticuerpos: policlonal de cabra anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.) o monoclonal de

ratón anti- $\alpha$ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology). A continuación, se añadió el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology). La detección de la señal luminiscente en las membranas se efectuó con el sistema ECL (GE-Amersham) y las intensidades de banda se cuantificaron por densitometría.

**Análisis estadístico:** Los resultados son expresados como medias  $\pm$  EEM. El análisis estadístico entre 2 grupos se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. Una  $p < 0,05$  se consideró significativa.

## Resultados

Encontramos que el tratamiento de las células osteocíticas MLO-Y4 con dos métodos diferentes de estimulación mecánica protegió de la muerte celular inducida por el etopósido (Figura 1). La estimulación mecánica de las células por el flujo de fluido durante 10 min a 10 dinas/cm<sup>2</sup> protegió de la apoptosis inducida por la exposición al etopósido durante 6 h (Figura 1A). Este efecto protector fue bloqueado con el pre-tratamiento de las células con un inhibidor selectivo del VEGFR2, SU5416 (1  $\mu$ M). Esta protección conferida por el estímulo mecánico fue reproducida por el pre-tratamiento de las células con 6 ng/ml de VEGF (Figura 1A). Por otro lado, las células fueron sometidas a estimulación mecánica mediante la exposición a un tampón hipo-osmótico durante 1 h, lo que indujo también protección frente al etopósido; este efecto protector fue bloqueado por el pre-tratamiento con el inhibidor del PTH1R, PTHrP (7-34) (Figura 1B). De manera similar a lo observado anteriormente con VEGF, el pre-tratamiento con la PTHrP (1-36) reprodujo el efecto protector del choque osmótico (Figura 1B).

La translocación de ERK al núcleo es un requisito para la supervivencia inducida por estímulos mecánicos. Así, observamos que la estimulación mediante flujo de fluido (10 min, 10 dinas/cm<sup>2</sup>) indujo un aumento de ERK en el núcleo de las células MLO-Y4 (Figura 1C). Este efecto se bloqueó por el pre-tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF, así como por los inhibidores del VEGFR2 y PTH1R, SU5416 y JB4250, respectivamente (Figura 1C). También se sabe que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina está implicada en la mecanotransducción en los osteocitos. Observamos por inmunocitoquímica y transferencia *western* que la estimulación mecánica de las células MLO-Y4 indujo una rápida translocación de la  $\beta$ -catenina a la membrana celular (Figuras 2A y 2B); un efecto bloqueado por antagonistas del VEGFR2 y del PTH1R, SU5416 y PTHrP (7-34), respectivamente, así como por un anticuerpo anti-VEGF. De manera similar, el choque osmótico indujo la translocación de  $\beta$ -catenina a la membrana (Figura 1C). La implicación del sistema VEGF/VEGFR2 en la movilización de la  $\beta$ -catenina a la membrana por estímulo mecánico fue analizada también mediante transfección de las células MLO-Y4 con un plásmido que sobre-expresa VEGF o con dnVEGFR2. La sobre-expresión de VEGF en estas células

reprodujo la translocación de  $\beta$ -catenina a la membrana; mientras que esta movilidad inducida por el estímulo mecánico no ocurrió en las células con dnVEGFR2 (Figura 3).

Por otro lado, quisimos estudiar si la estimulación mecánica modulaba la localización del PTH1R en la membrana de estas células osteocíticas. Observamos que tanto el choque osmótico como el tratamiento con PTHrP (1-36) exógena aumentaron los niveles proteicos del receptor en la membrana de las MLO-Y4; mientras que los antagonistas del PTH1R, PTHrP (7-34) y el JB 4250, bloquearon este efecto del choque osmótico (Figura 4).

## Discusión

La viabilidad del osteocito, esencial para el mantenimiento de la masa y la resistencia ósea, se ve comprometida en situación de osteopenia/osteoporosis<sup>33,34</sup>. En condiciones fisiológicas, la viabilidad de los osteocitos se mantiene por los niveles críticos de la carga mecánica a través de mecanismos mal definidos<sup>33</sup>. Los estudios *in vitro* en células de MLO-Y4 han demostrado que el estiramiento celular induce una respuesta anti-apoptótica por un mecanismo que implica un complejo de señalización relacionado con la translocación nuclear de ERK<sup>4,18</sup>. También se ha demostrado recientemente que la viabilidad de las células MLO-Y4 inducida por estimulación mecánica se modula por la interrelación entre las vías de caveolina-1/ERK y de Wnt/ $\beta$ -catenina<sup>18</sup>. En el presente estudio observamos que ambos sistemas, PTHrP/PTH1R y VEGF/VEGFR2, están implicados en la protección frente a la muerte celular por apoptosis que confieren a las células osteocíticas dos estímulos mecánicos diferentes, el choque osmótico y el flujo de fluido.

Previamente, se ha demostrado que los osteocitos expresan el PTH1R y responden a la estimulación con PTH<sup>35</sup>, una importante hormona calciotropa responsable de la homeostasis del calcio en condiciones fisiológicas. Estudios recientes en ratones genéticamente modificados indican que esta acción de la PTH requiere un PTH1R funcional en osteocitos<sup>22</sup>. Desde una perspectiva farmacológica, la administración intermitente de PTH en ratones atenua rápidamente la apoptosis osteoblástica en las vértebras; este efecto parece no ser solo una consecuencia de la acción directa de la hormona sobre los osteoblastos, sino también indirecta a través de su efecto inhibitorio sobre la expresión de Sost/esclerostina en los osteocitos<sup>20,36,37</sup>. Además, el PTH1R en estas células parece desempeñar un papel clave en la respuesta anabólica ósea a la carga mecánica<sup>38</sup>. A este respecto, se ha descrito en roedores que el anabolismo óseo inducido por la administración intermitente de la PTH se potencia por la estimulación mecánica<sup>25,39</sup>. La interacción funcional entre el estímulo mecánico y la PTH está respaldada por estudios *in vitro* utilizando cultivos primarios de osteocitos<sup>32</sup>. Así pues, los datos actuales sugieren que el PTH1R en osteocitos integra señales mecánicas y hormonales para la regulación coordinada de la formación ósea.

Figura 1. Cambios en la apoptosis (A) y la viabilidad celular (B) provocados por la estimulación mecánica en las células MLO-Y4, pre-incubadas o no con PTHrP (1-36) o VEGF<sub>165</sub>, o bien con los antagonistas, PTHrP (7-34) (PTH1R) o SU5416 (VEGFR2), seguido de incubación con etopósido 50 μM durante 6 h. Los valores son la media ± SEM de 3 experimentos independientes por triplicado. \*p<0,05 vs. basal en condición de control estático; †p<0,05 vs. basal bajo flujo de fluido; ‡p<0,05 vs. basal en medio isotónico; §p<0,05 vs. basal en medio hipotónico. (C) La expresión de ERK nuclear se evaluó mediante transferencia *western* tras flujo de fluido o control estático, después de la pre-incubación con los agonistas o antagonistas indicados durante 30 min. El control de carga fue comprobado por tinción con Ponceau S (no mostrado). Se muestran los resultados de un experimento representativo

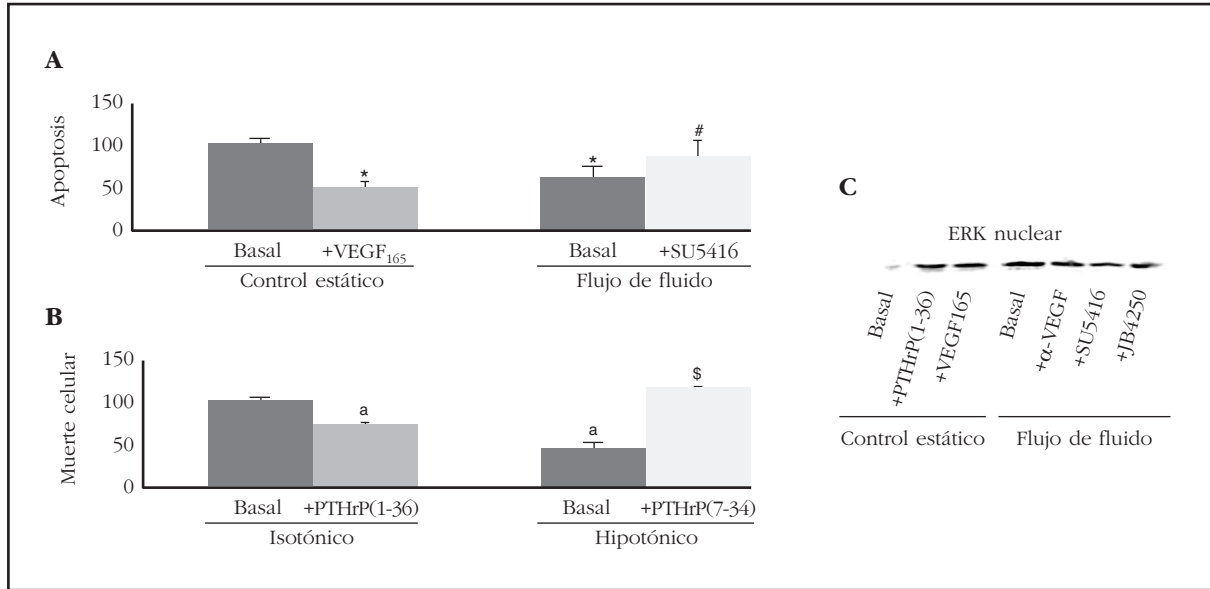
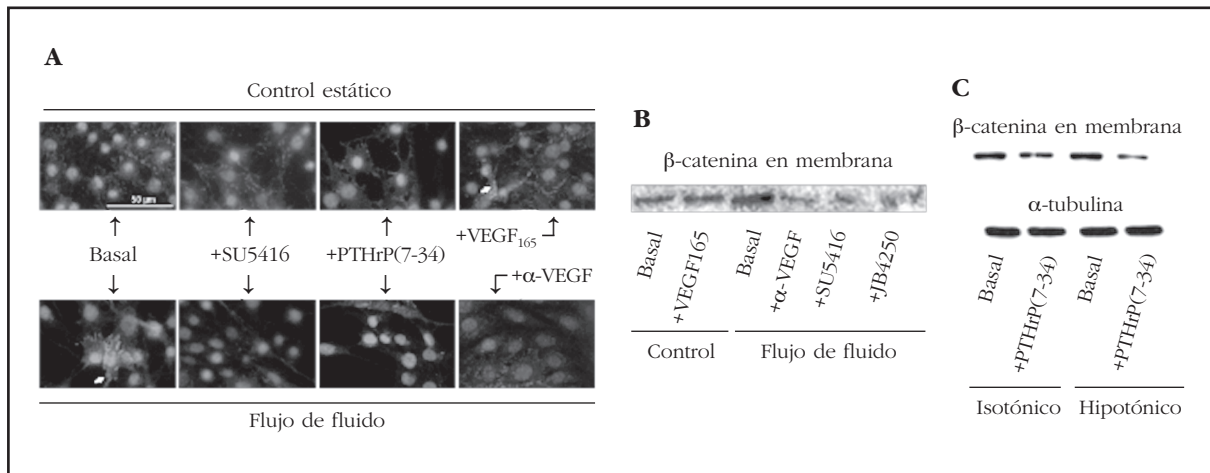


Figura 2. Cambios inducidos en β-catenina tras la estimulación mecánica o la incubación con VEGF<sub>165</sub> en las células MLO-Y4, en presencia o no de los antagonistas SU5416 (VEGFR2), anticuerpo anti-VEGF (α-VEGF) o PTHrP (7-34) (PTH1R) como se cita en el pie de la figura 1. Las alteraciones en la β-catenina fueron evaluadas mediante inmunocitoquímica (A) o transferencia *western* en extractos de membrana celular tras la estimulación mecánica por flujo de fluido [el control de carga fue comprobado por tinción con Ponceau S (no se muestra)] (B) o choque hipotónico (C). Se muestran autorradiogramas representativos en cada caso



Por otra parte, nuestros resultados indican que el VEGFR2 es crítico tanto para la translocación de la β-catenina a la membrana celular como para la de ERK al núcleo. El sistema de VEGF está implicado en los mecanismos de supervivencia en varios tipos celulares, incluyendo los osteoblastos<sup>29,30,40</sup>. Este factor de crecimiento promueve la supervivencia de las células endoteliales mediante la estimulación de la formación de un complejo multi-proteína transmembrana que incluye

VEGFR2, VE-cadherina y β-catenina<sup>40</sup>. Nuestros resultados demuestran que, inmediatamente tras la estimulación por el flujo de fluido, la β-catenina se transloca a la membrana de las células osteocíticas MLO-Y4, asociado a la activación de VEGFR2. La posibilidad de que este mecanismo pueda ocurrir *in vivo* para explicar la supervivencia osteocítica observada en respuesta a la estimulación mecánica requiere estudios complementarios en modelos animales.

Figura 3. Cambios inducidos en  $\beta$ -catenina tras el flujo de fluido en las células MLO-Y4 con alteraciones en la expresión de VEGFR2. Se llevó a cabo inmunocitoquímica de  $\beta$ -catenina tras el flujo de fluido en estas células transfectadas con un plásmido que sobre-expresa VEGFR2, el plásmido dnVEGFR2 o el plásmido vacío

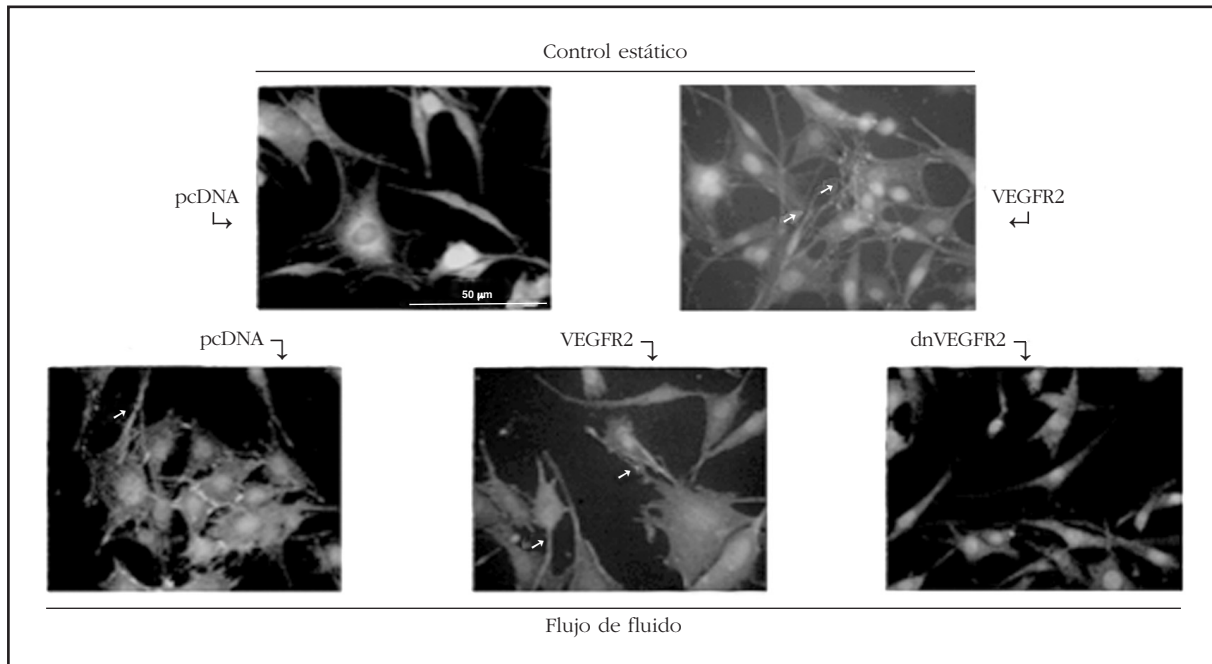
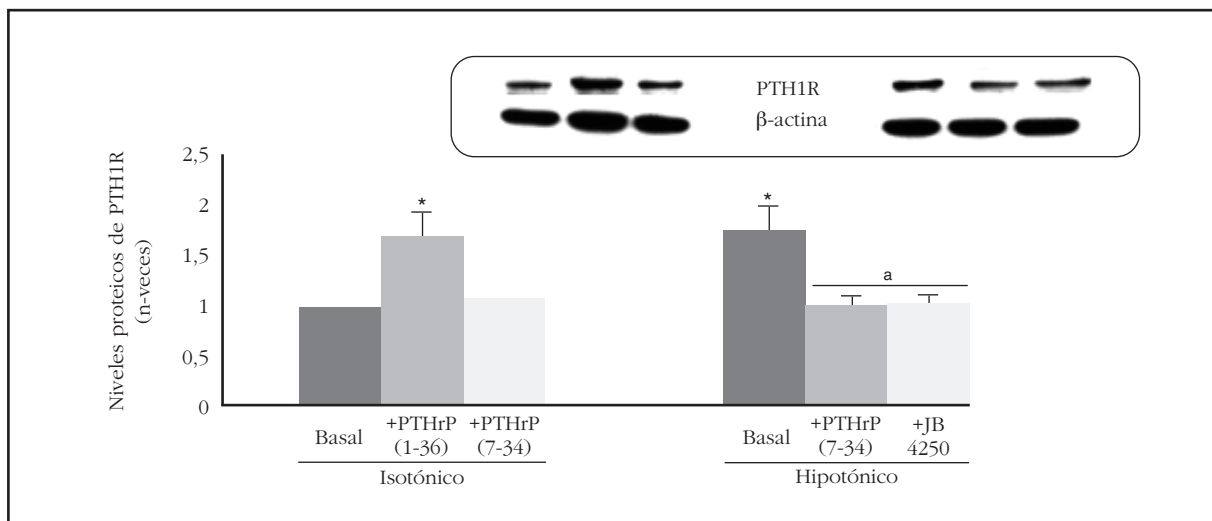


Figura 4. Cambios en el PTH1R en la membrana de las células MLO-Y4 tras estimulación mecánica. Los niveles proteicos de este receptor se evaluaron por transferencia *western* en extractos celulares de membrana de las células MLO-Y4, después de la pre-incubación con PTHrP (1-36), PTHrP (7-34) o JB 4250 durante 1 h seguido por el choque hipotónico (o no, isotónico) en su caso. Se muestra un autorradiograma representativo. Los valores densitométricos relativos son media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes por triplicado. \* $p < 0,01$  vs. basal y PTHrP (7-34) (condición isotónica);  $^{\#}p < 0,05$  vs. correspondiente valor basal



En resumen, nuestros resultados *in vitro* apoyan un papel importante tanto del VEGFR2 como del PTH1R en los mecanismos que promueven la viabilidad de los osteocitos tras los estímulos mecánicos.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado con Ayudas del Instituto de Salud Carlos III (PI050117, PI080922, PI11/00449, RD06/0013/1002 y RD12/0043/0008), del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y de la Universidad San Pablo CEU (Ayuda pre-competitiva Santander-CEU).

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## Bibliografía

- 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:e62172.
- Burr DB, Robling AG, Turner CH. Effects of biomechanical stress on bones in animals. *Bone* 2002;30:781-6.
- Bikle DD, Sakata T, Halloran BP. The impact of skeletal

- unloading on bone formation. *Gravit Space Biol Bull* 2003;16:45-54.
4. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 2006;21:605-15.
  5. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 2007;5:464-75.
  6. Rubin CT, Lanyon LE. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *J Orthop Res* 1987;5:300-10.
  7. Vezeridis PS, Semeins CM, Chen Q, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:1082-8.
  8. 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;42:172-9.
  9. 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:C934-43.
  10. Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1163-8.
  11. Glass DA 2nd, Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 2007;148:2630-4.
  12. Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, et al. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem* 2006;281:23698-711.
  13. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* 2006;281:31720-8.
  14. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008;283:5866-75.
  15. Kitase Y, Barragan L, Quing 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;25:2657-68.
  16. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, Blicke-Hogervorst JMA de, Klein-Nulend J. Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidyl inositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:364-9.
  17. 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:C633-43.
  18. Gortázar AR, Martín-Millán 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;288:8168-75.
  19. Esbrit P, Alcaraz MJ. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol* 2013;85:1417-23.
  20. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999;104:439-46.
  21. Miao D, He B, Jiang Y, Kobayashi T, Sorocéanu MA, Zhao J, et al. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest* 2005;115:2402-11.
  22. Powell WF Jr, Barry KJ, Tulum I, Kobayashi T, Harris SE, Bringham FR, et al. Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses. *J Endocrinol* 2011;209:21-32.
  23. 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:e2942.
  24. Ma Y, Jee WS, Yuan Z, Wei W, Chen H, Pun S, et al. Parathyroid hormone and mechanical usage have a synergistic effect in rat tibialdiaphyseal cortical bone. *J Bone Miner Res* 1999;14:439-48.
  25. 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:C1391-9.
  26. Chen X, Macica CM, Ng KW, Broadus AE. Stretch-induced PTH-related protein gene expression in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2005;20:1454-61.
  27. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000;141:1667-74.
  28. Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, et al. Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002;129:1893-904.
  29. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 2002;111:61-73.
  30. Alonso V, Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol* 2008;217:717-27.
  31. Gortázar AR, Alonso V, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006;79:360-9.
  32. Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2003;93:354-63.
  33. Boyce BF, Xing L, Jilka RL, Bellido T, Weinstein RS, Parfitt AM, et al. Principles of Bone Biology. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds.). San Diego, CA: Academic Press 2002;151-68.
  34. Manolagas. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endoc Rev* 2000;21:115-37.
  35. Bringham FR. PTH receptors and apoptosis in osteocytes. *J Musculoskel Neuronal Interact* 2002;2:245-51.
  36. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, et al. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004;35:828-35.
  37. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 2005;146:4577-83.
  38. Tu X, Pellegrini G, Galli C, Benson JD, Condon KW, Bivi N, et al. PTH receptor 1 expression in osteocytes is indispensable for the anabolic effect of mechanical loading in mice. *J Bone Miner Res* 2011;25:S24.
  39. Sugiyama T, Saxon LK, Zaman G, Moustafa A, Sinters 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;43:238-48.
  40. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 2008;121:2115-22.