



Revista de Osteoporosis  
y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)  
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

[www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com](http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com)





## Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)  
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

© Copyright 2023. SEIOMM y © ARÁN EDICIONES, S.L.

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.  
Publicación trimestral con 4 números al año

Esta publicación se encuentra incluida en Scopus, Web of Science, Scielo, DOAJ, ERIHPLUS, Redalyc, IBECs, Embase, Open J-Gate, Free Medical Journals, Sociedad Americana de Investigación Científica (SIIC), Google Academic, Medes, ÄZ3, e-revist@s, WorldCat, Latindex, EBSCO, Medic Latina, Dialnet, Safetylit, Mosby's, Emcare, Academic Keys, CRUE, Hinari, REDIB, Emerging Sources Citation Index, British Library y ROAD.

La *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* es una revista *open access*, lo que quiere decir que todo su contenido es accesible libremente sin cargo para el usuario individual y sin fines comerciales. Los usuarios individuales están autorizados a leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar a los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, de acuerdo con la definición BOAI (Budapest Open Access Initiative) de *open access*.

Esta revista se publica bajo licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



La reutilización de los trabajos puede hacerse siempre y cuando el trabajo no se altere en su integridad y sus autores sean adecuadamente referenciados o citados en sucesivos usos, y sin derecho a la producción de obras derivadas.

ISSN (versión papel): 1889-836X. ISSN: (versión electrónica): 2173-2345  
Depósito Legal: M-8158-2023

ARÁN EDICIONES, S.L.

C/ Castelló, 128, 1.º - 28006 Madrid - Tel. 91 782 00 30 - Fax: 91 561 57 87  
e-mail: [osteoporosis@grupoaran.com](mailto:osteoporosis@grupoaran.com)  
[www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com](http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com)  
[www.grupoaran.com](http://www.grupoaran.com)



## Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)  
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

### DIRECTORAS

**Dra. Arancha Rodríguez de Gortázar  
(Co-directora)**

Universidad San Pablo CEU. Facultad de Medicina.  
Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Madrid  
(España)

Correo electrónico: [argortazar@ceu.es](mailto:argortazar@ceu.es)

**Dra. Marta Martín Millán  
(Co-directora)**

Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario  
Marqués de Valdecilla. Departamento de Medicina y  
Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Santander (España)

Correo electrónico: [marta.martinm@scsalud.es](mailto:marta.martinm@scsalud.es)

### COMITÉ EDITORIAL

**Dra. Teresita Bellido**

Directora del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas. Departamento de Medicina. División de Endocrinología y Metabolismo y Departamento de Ortopedia.

Investigadora en el Sistema de Atención Médica de Veteranos de Arkansas Central-John L. McClellan Memorial Hospital. Little Rock, Arkansas (Estados Unidos)

Correo electrónico: [tbellido@iupui.edu](mailto:tbellido@iupui.edu)

**Dr. Ernesto Canalis**

Director, Centro de Investigaciones del Hueso. Profesor de Ortopedia y de Medicina. Centro de Salud de la Universidad de Connecticut. Farmington, Connecticut (Estados Unidos)

Correo electrónico: [canalis@uchc.edu](mailto:canalis@uchc.edu)

**Dra. Patricia Clark Peralta**

Jefa de la Unidad de Epidemiología Clínica. Hospital Infantil Federico Gómez. Facultad de Medicina. UNAM. Ciudad de México (México)

Correo electrónico: [patriciac Clark@prodigy.net.mx](mailto:patriciac Clark@prodigy.net.mx)

**Dr. Oswaldo Daniel Messina**

Jefe de Reumatología. Hospital Argerich de Buenos Aires (Argentina). Profesor Asociado de Reumatología y Director de la carrera de postgrado en Reumatología.

Universidad de Buenos Aires (Argentina). Director Médico de Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas de Buenos Aires (IRO SRL) (Argentina). Miembro del Board y del Comité de Asesores Científicos de la International Osteoporosis Foundation (IOF)

Correo electrónico: [drosvaldodanielmessina@gmail.com](mailto:drosvaldodanielmessina@gmail.com)

**Dra. Lilian I. Plotkin**

Departamento de Anatomía y Biología Celular y Centro de Indiana para la Salud Musculo-esquelética. Facultad de Medicina. Universidad de Indiana. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)

Correo electrónico: [lplotkin@iupui.edu](mailto:lplotkin@iupui.edu)

**Dr. Manuel Naves Díaz**

Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISA). REDinREN del ISCIII. Universidad de Oviedo. Oviedo (España)

Correo electrónico: [mnaves.huca@gmail.com](mailto:mnaves.huca@gmail.com)

**Dr. Adolfo Díez Pérez**

Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica (IMIM) y Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona.

CIBER en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Instituto Carlos III. Barcelona (España)

Correo electrónico: [Adiez@parcdesalutmar.cat](mailto:Adiez@parcdesalutmar.cat)

**Dr. Manuel Díaz Curiel**

Ex-Director de la Cátedra de Enfermedades Metabólicas Óseas. Universidad Autónoma Madrid. Consultor de Enfermedades Metabólicas Óseas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. Presidente Honorífico de la Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (FHOEMO) (España)

Correo electrónico: [mcuriel@fdj.es](mailto:mcuriel@fdj.es)

**Dr. José Antonio Riancho Moral**

Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Santander (España)

Correo electrónico: [rianchoj@unican.es](mailto:rianchoj@unican.es)

**Dr. Manuel Sosa Henríquez**

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Unidad Metabólica ósea. Hospital Universitario Insular. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: [manuel.sosa@ulpgc.es](mailto:manuel.sosa@ulpgc.es)

**Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero**

Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla. Sevilla (España). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: [mjgtr@us.es](mailto:mjgtr@us.es)

**Metodología, estudio de datos y estadística:**

**Pedro Saavedra Santana**

Departamento de Matemáticas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: [pedro.saavedra@ulpgc.es](mailto:pedro.saavedra@ulpgc.es)



Revista de Osteoporosis  
y Metabolismo Mineral

---



**JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y DEL METABOLISMO MINERAL**

---

**Presidente**

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

**Vicepresidente**

Mercedes Giner García

**Secretaría**

Marta Martín Millán

**Tesorero**

Manel Ciria Recasens

**Vocales**

Enric Duaso Magaña  
María Pilar Aguado Acín

---

## Sumario

Vol. 15 ■ Enero-Marzo ■ N.º 1

### Editorial

**Papel de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en el metabolismo óseo: de la investigación básica a la clínica**

*P. Esbrit* ..... 1

### Originales

**Osteoclast generation from RAW 264.7 and PBMC cells. The set up in our lab**

*S. Jurado, A. Parés, P. Peris, A. Combalia, A. Monegal, N. Guañabens* ..... 6

**Implicación de las conexinas, integrinas y cilio primario en la actividad de las células óseas**

*S. Heredero-Jiménez, I. Tirado-Cabrera, E. Martín-Guerrero, J. Pizarro-Gómez, A. R. Gortázar, J. A. Ardura* ..... 12

**El secretoma de los osteocitos estimulados mecánicamente modula la función de las células mesenquimales**

*Á. Tablado Molinera, I. Gutiérrez Rojas, L. Álvarez Carrión, I. Tirado Cabrera, S. Heredero-Jiménez, A. R. Gortázar, J. A. Ardura* ..... 21

### Revisión

**Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS**

*N. Martínez-Gil, J. D. Patiño-Salazar, R. Rabionet, D. Grinberg, S. Balcells* ..... 29

### Imagen en Osteología

**Tibia en sable**

*J. Rubio Úbeda, I. Jiménez Moleón, E. Raya Álvarez* ..... 40

#### Imagen de portada:

Radiografía simple de rodilla derecha en proyección anteroposterior: gran lesión osteolítica en región distal externa de fémur derecho. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander

# Papel de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en el metabolismo óseo: de la investigación básica a la clínica

## INTRODUCCIÓN

El interés por la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) surgió de la hipercalcemia asociada al cáncer, el síndrome paraneoplásico más común que afecta hasta un 20% de pacientes con cáncer avanzado (1). En la década de los 80 del siglo pasado se observó que la mayoría de los pacientes con hipercalcemia tumoral presentan características de pseudohiperparatiroidismo, lo que hizo pensar en la PTH o un factor similar segregado por el tumor como responsable de este síndrome. Fue al final de esta década cuando tres grupos independientes aislaron y caracterizaron el verdadero factor causal, que resultó presentar una homología estructural con la PTH en su extremo N-terminal; de ahí su nombre con el que se conoce, PTHrP (2-4). Niveles plasmáticos elevados de PTHrP se han detectado en una mayoría de pacientes con hipercalcemia tumoral (5,6), en los que la PTHrP induce incrementos de resorción ósea y de reabsorción tubular de calcio como causa de la hipercalcemia.

Sin embargo, su caracterización condujo a un resultado inesperado: la PTHrP ha resultado ser una citoquina presente en una variedad de tejidos normales, donde ejerce acciones auto/paracrinas y/o intracrinas; de hecho, la hipercalcemia tumoral es una de las escasas situaciones en que la PTHrP ejerce acciones endocrinas por la hipersecreción tumoral (7). Así pues, el descubrimiento de la PTHrP es un magnífico ejemplo de investigación traslacional en biomedicina: la investigación clínica de un síndrome paraneoplásico se saldó con el descubrimiento de una nueva citoquina celular. Es más, como veremos a continuación, la PTHrP “ha vuelto a la clínica” de alguna manera, al contemplarse actualmente como un nuevo agente en el *armamentarium* farmacológico de los agentes osteoformadores en la osteoporosis.

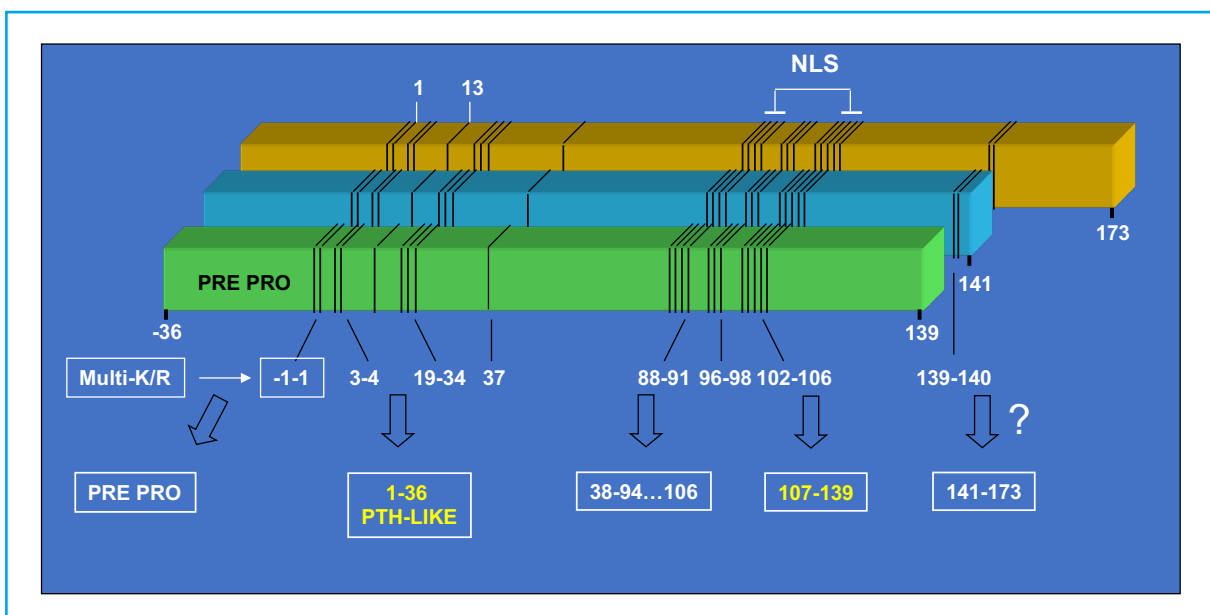
## LA PTHrP: UNA CITOQUINA MULTIFUNCIONAL EN EL METABOLISMO ÓSEO

El gen de la PTHrP contiene múltiples exones y se localiza en el brazo corto del cromosoma 12, en posición análoga a la del gen de la PTH en el cromosoma 11, y ambos tienen un origen ancestral común. Mediante procesamiento alternativo de su ARNm, el gen de la PTHrP en humanos da lugar a tres isoformas proteicas de 139, 141 y 173 aminoácidos. Su rotura proteolítica genera diversos fragmentos con distinta bioactividad (7,8) (Fig. 1). Su fragmento N-terminal contiene homología estructural con la PTH, en las regiones 1-13 y 14-34, que permite su interacción con el mismo receptor de PTH tipo 1 (PTHR1) (9). La región media contiene un dominio de localización nuclear/nucleolar (NLS) con propiedades funcionales singulares en varios tipos celulares incluyendo los osteoblastos (10). El fragmento C-terminal contiene la secuencia (107-111) (conocida como osteostatina), un potente inhibidor de la actividad osteoclastica (11,12), cuyas propiedades osteogénicas se tratarán más adelante en este editorial.

La PTHrP es abundante en el tejido óseo, donde está presente en las células hematopoyéticas de la médula ósea, en condrocitos y en células de estirpe osteoblástica (8). La importancia del papel óseo de la PTHrP se ha puesto de manifiesto en ratones con manipulación genética de su gen. La comparación de ratones con supresión homocigótica para el gen de la PTHrP (-/-) o de la PTH (-/-) conduce a resultados interesantes: mientras estos últimos ratones presentan dismorfismo óseo pero son viables, los primeros presentan una severa condrodisplasia con disminución de desarrollo endocondral y excesiva mineralización causante de la muerte por asfixia de estos neonatos (13). Los ratones mutantes para PTH (-/-) en la etapa post natal muestran un incremento de hueso trabecular asociado a un aumento de PTHrP; de hecho, dicho incremento desaparece al cruzarlos con los heterocigotos de PTHrP (+/-) (14). Estos ratones con haploinsuficiencia de PTHrP son viables pero presentan una osteoporosis prematura a los 3 meses de edad, caracterizada en el esqueleto apendicular por un descenso de volumen óseo y alteración de la estructura trabecular, así como un aumento de apoptosis osteoblástica y un déficit de osteoprogenitores en la médula ósea (15). Además, el efecto anabólico de la PTH (1-34) administrada de modo intermitente se encontró incrementado en estos ratones PTHrP (+/-) (15); planteando la hipótesis de que los distintos niveles óseos de PTHrP podrían explicar la variabilidad observada en la respuesta anabólica a la teriparatida [la PTH (1-34) comercializada] en pacientes osteoporóticos. Estos hallazgos indican

que la PTHrP es un factor esencial para el mantenimiento del hueso trabecular durante el crecimiento. La deficiencia de PTHrP ósea podría contribuir a la baja formación ósea en la osteoporosis involutiva, ya que su expresión está disminuida en los huesos largos de ratones viejos y en los osteoblastos humanos primarios con la edad del donante (16,17). Por otra parte, ratones mutantes que expresan una PTHrP truncada (1-84) presentan un crecimiento retardado, así como apoptosis ósea, senescencia y osteopenia prematuras (18). Más recientemente, transfectando células osteoblásticas con plásmidos que expresan formas mutadas de la PTHrP, demostramos un efecto de su dominio NLS sobre la viabilidad y la diferenciación osteoblástica (10). Además, la región C-terminal de la PTHrP ha demostrado inhibir la senescencia inducida por la IL-1beta en cultivos primarios de osteoblastos humanos de pacientes con artrosis (19). Estudios *in vitro* también han mostrado la capacidad del fragmento C-terminal de la PTHrP -similar a la del fragmento N-terminal homólogo a la PTH- para aumentar la viabilidad osteoblástica en osteoblastos primarios humanos (20). De interés, este efecto del fragmento C-terminal demostró ser estrictamente dependiente de la transactivación del receptor 2 del factor del endotelio vascular (VEGFR2) (20,21). El efecto antiapoptótico de la PTHrP en los osteoblastos es particularmente importante porque constituye un elemento clave en la acción anabólica de la PTH (22).

Utilizando el ratón ovariectomizado como modelo establecido de osteoporosis primaria, nuestro grupo demostró una eficacia similar de ambos péptidos N- y C-terminal de la PTHrP, administrados cada dos días durante 4-8 semanas, para mejorar el deterioro de la estructura trabecular en el fémur por microtomografía computarizada ( $\mu$ CT); un efecto asociado al aumento de osteocalcina, un marcador de formación ósea y a una inhibición de marcadores resorptivos, que incluyen la expresión del gen *Sost* en el tejido óseo y los residuos de piridinolina, producto de degradación del colágeno tipo 1 en plasma (23). El grupo de Andy F Stewart y cols. fue pionero en utilizar la PTHrP (1-36) para estudiar su eficacia en la osteoporosis primaria en humanos. La inyección diaria de este péptido a dosis mayores que la de PTH (40  $\mu$ g) durante 3 meses en mujeres postmenopáusicas produjo un aumento de densidad mineral ósea en la columna lumbar similar con ambos péptidos, pero fue superior en la cadera (un hueso predominantemente cortical) y en el cuello femoral con la PTHrP. Además, la PTH aumentó el propéptido N-terminal y los telopéptidos C-terminales del colágeno tipo 1, marcadores de formación y de resorción ósea, respectivamente; mientras la PTHrP (1-36) solo afectó al primer marcador (24). Más recientemente, se ha sintetizado un péptido derivado de la PTHrP (1-36) con 10 sustituciones aminoacídicas en su extremo C-terminal, la abaloparatida, que ha demostrado eficacia para incrementar la masa ósea con menor riesgo de hipercalcemia que el tratamiento con teriparatida (25). Así, en un ensayo en fase 2 en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis severa se observó la mayor eficacia de la abaloparatida frente a la teriparatida para aumentar la densidad mineral ósea en localizaciones esqueléticas extravertebrales. Además, el ensayo en fase 3 multicéntrico doble ciego y controlado con placebo *Abaloparatide Comparator Trial in Vertebral Endpoints (ACTIVE)* ha demostrado una mayor eficacia de la abaloparatida a los 18 meses de tratamiento para reducir el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales en esta situación. La abaloparatida ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica con elevado riesgo de fracturas. Las diferencias de acción sobre el componente resorptivo entre la PTH y la PTHrP se atribuyen a su interacción con diferentes conformaciones del PTHR1: la PTH predominantemente con una conformación independiente ( $R_0$ ) de proteínas G, que da lugar a una respuesta de AMPc prolongada que favorece el componente resorptivo a



**Figura 1.** Procesamiento de las isoformas proteicas de la PTHrP.



través del RANKL; la PTHrP con una conformación dependiente de proteínas G, que induce una respuesta de más corta duración, favoreciendo su acción anabólica (25).

La regeneración ósea post fractura puede estar comprometida en la osteoporosis y los datos actuales indican que la PTH sistémica resulta eficaz en esta situación (26). Por ello, se ha evaluado la eficacia de la PTHrP en un modelo experimental de regeneración ósea, la ablación medular en la tibia (27). Utilizando ratones osteoporóticos por tratamiento con metilprednisolona, demostramos que la administración secuencial (cada 2 días) de PTHrP (1-36) o PTHrP (107-139) incrementó la regeneración ósea tras la ablación medular (28). Teniendo en cuenta este hallazgo, estudiamos el posible efecto osteorregenerador de la osteostatina, la secuencia responsable de la acción antirresortiva del fragmento C-terminal de la PTHrP (11), cuya simplicidad estructural lo hace especialmente atractivo desde una perspectiva traslacional. La impregnación con osteostatina de una cerámica de sílice mesoporosa (SBA-15, sintetizada y caracterizada por el grupo de la Prof. Vallet-Regí) confiere propiedades osteogénicas al biomaterial en cultivos de osteoblastos murinos de la línea MC3T3-E1 (29). El implante de este mismo material con osteostatina en un defecto cavitario (que no regenera por sí solo) en la epífisis femoral de conejos sanos u osteoporóticos, indujo la neoformación ósea a las 4-8 semanas en los animales sanos (30), y a las 2 semanas en los osteoporóticos (31). Posteriormente, se utilizó un material biodegradable (un polímero de gelatina-glutaraldehído-hidroxiapatita) impregnado con osteostatina o PTHrP (1-37) e implantado en un defecto no cavitario en la tibia de ratas viejas osteopénicas, con o sin diabetes mellitus. La presencia de ambos péptidos de la PTHrP en el implante indujo de manera similar la reparación total del defecto óseo a las 4 semanas (32). Un aspecto particularmente interesante en relación a la osteostatina es que se ha demostrado su acción anabólica *in vivo* en un modelo de ratón diabético (con baja formación ósea). La histomorfometría ósea dinámica demostró que el tratamiento con dosis equivalentes de osteostatina o PTHrP (1-37) durante 3 días consecutivos normalizó a las dos semanas la disminución de superficie mineralizada y la velocidad de aposición mineral, así como la formación ósea, en las vértebras de estos ratones (33).

En definitiva, la PTHrP ha resultado ser un factor esencial para el desarrollo y el mantenimiento del tejido óseo. Además, sus acciones osteogénicas no se circunscriben solo a su región N-terminal con homología estructural con la PTH. Los aspectos tratados en esta Editorial tienen un significado especial al considerar el aumento de la osteoporosis involutiva asociado a nuestra longevidad que determina la demanda creciente de moléculas osteoformadoras y osteorregeneradoras para reparar las fracturas por fragilidad ósea. En este sentido, la investigación básica y traslacional han demostrado ser claves para identificar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la PTHrP: en uso clínico como la abaloparatida, o en desarrollo potencial como la osteostatina –un péptido derivado de la secuencia C-terminal de la PTHrP–, cuyas propiedades lo hacen particularmente atractivo para promover la formación y la regeneración ósea (Fig. 2).

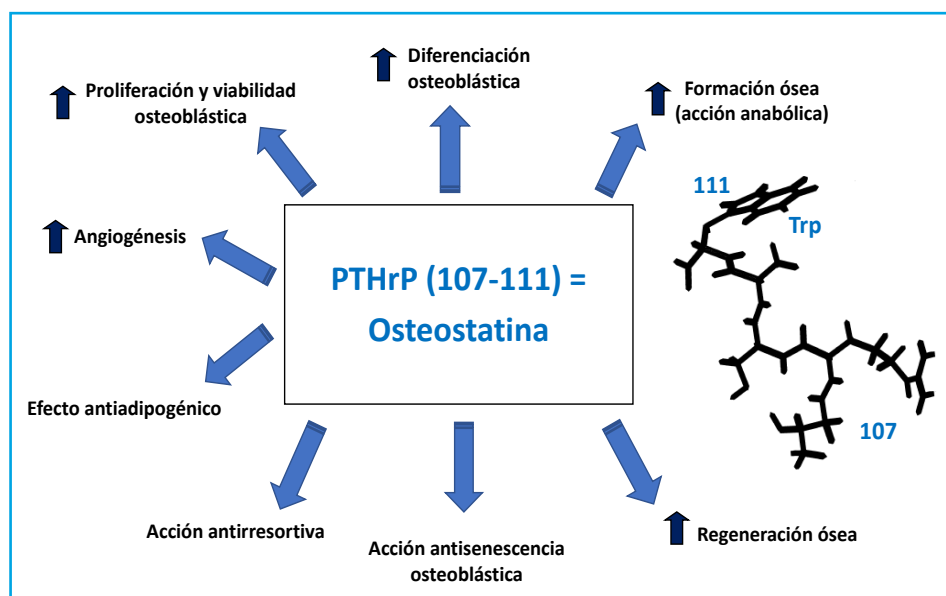


Figura 2. Propiedades osteogénicas de la osteostatina.

Conflicto de intereses: el autor declara no tener conflictos de interés.

Pedro Esbrit

Investigador Emérito. Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz. Madrid. Profesor Honorífico. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00004



## BIBLIOGRAFÍA

1. Hurtado J, Esbrit P. Treatment of malignant hypercalcaemia. *Expert Op Pharmacother* 2002;3:521-7. DOI: 10.1517/14656566.3.5.521
2. Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, et al. Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5048-52. DOI: 10.1073/pnas.84.14.5048
3. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, et al. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 1987;262:7151-6.
4. Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, et al. Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells: structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1987;80:1803-7. DOI: 10.1172/JCI113275
5. De Miguel F, Motellón JL, Hurtado J, Jiménez FJ, Esbrit P. Comparison of two immunoradiometric assays for parathyroid hormone-related protein in the evaluation of cancer patients with and without hypercalcemia. *Clin Chim Acta* 1998;277:171-80. DOI: 10.1016/s0009-8981(98)00127-2
6. Motellón JL, Jiménez FJ, de Miguel F, Jaras MJ, Díaz A, Hurtado J, et al. Parathyroid hormone-related protein, parathyroid hormone, and vitamin D in hypercalcemia of malignancy. *Clin Chim Acta* 2000;290:189-97. DOI: 10.1016/s0009-8981(99)00181-3
7. Martin TJ, Moseley JM, Williams ED. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 1997;154:S23-37.
8. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 1996;76:127-73. DOI: 10.1152/physrev.1996.76.1.127
9. Gardella TJ, Vilardaga JP. International union of basic and clinical pharmacology. XCIII. The parathyroid hormone receptors — Family B G protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* 2015;67:310-37. DOI: 10.1124/pr.114.009464
10. García-Martín A, Ardura JA, Maycas M, Lozano D, López-Herradón A, Portal-Núñez S, et al. Functional roles of the nuclear localization signal of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 2014;28:925-34. DOI: 10.1210/me.2013-1225
11. Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Jr., Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ, et al. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP [107–111] *Endocrinology* 1991;129:3424-6. DOI: 10.1210/endo-129-6-3424
12. Ibáñez L, Náchter-Juan J, Terencio MC, Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Osteostatin inhibits M-CSF+RANKL-induced human osteoclast differentiation by modulating NFATc1. *Int J Mol Sci* 2022;23:8551. DOI: 10.3390/ijms23158551
13. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VLJ, Kronenberg HM, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Devel* 1994;8:277-89. DOI: 10.1101/gad.8.3.277
14. Miao D, Jiarong L, Yingben X, Su H, Karaplis AC, Goltzman D. Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology* 2004;145:3554-62. DOI: 10.1210/en.2003-1695
15. 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. DOI: 10.1172/JCI24918
16. Portal-Núñez S, Manassra R, Lozano D, Acitores A, Mulero F, Villanueva-Peñacarrillo ML, et al. Characterization of skeletal alterations in a model of prematurely aging mice. *Age (Dordr)* 2013;35:383-93. DOI: 10.1007/s11357-011-9372-8
17. Martínez P, Esbrit P, Rodrigo A, Alvarez-Arroyo MV, Martínez ME. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporosis Int* 2002;13:874-81. DOI: 10.1007/s001980200120
18. 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;105:20309-14. DOI: 10.1073/pnas.0805690105
19. Platas J, Guillén MI, Gomar F, Castejón MA, Esbrit P, Alcaraz MJ. Anti-senescence and anti-inflammatory effects of the C-terminal moiety of PTHrP peptides in OA osteoblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017;72:624-31. DOI: 10.1093/gerona/glw100
20. Alonso V, de Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol* 2008;217:717-27. DOI: 10.1002/jcp.21547
21. 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. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.03.002
22. 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. DOI: 10.1172/JCI6610
23. De Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, de la Fuente M, Caeiro JR, et al. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol* 2012;227:1752-60. DOI: 10.1002/jcp.22902
24. 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;28:2266-76. DOI: 10.1002/jbmr.1978
25. Ardura JA, Portal-Núñez S, Alonso V, Bravo B, Gortázar AR. Handling parathormone receptor type 1 in skeletal diseases: realities and expectations of abaloparatide. *Trends Endocrinol Metab* 2019;30:756-66. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.014
26. Hong H, Song T, Liu Y, Li J, Jiang Q, Song Q, et al. The effectiveness and safety of parathyroid hormone in fracture healing: A meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2019;74:e800. DOI: 10.6061/clinics/2019/e800
27. Ono N, Nakashima K, Schipani E, Hayata T, Ezura Y, Soma K, et al. Constitutively active PTH/PTHrP receptor specifically expressed in osteoblasts enhances bone formation induced by bone marrow ablation. *J Cell Physiol* 2012;227:408-15. DOI: 10.1002/jcp.22986
28. De Castro LF, Lozano D, Dapia S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E, et al. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1157-68. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0355

29. Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M, Gómez-Barrena E, et al. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater* 2010;6:797-803. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.08.033
30. Trejo CG, Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Dapía S, et al. The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model. *Biomaterials* 2010;31:8564-73. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.103
31. Lozano D, Trejo CG, Gómez-Barrena E, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, et al. Osteostatin-loaded onto mesoporous ceramics improves the early phase of bone regeneration in a rabbit osteopenia model. *Acta Biomater* 2012;8:2317-23. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.03.014
32. Ardura JA, Portal-Núñez S, Lozano D, Gutiérrez-Rojas I, Sánchez-Salcedo S, López-Herradón A, et al. Local delivery of parathyroid hormone-related protein-derived peptides coated onto a hydroxyapatite-based implant enhances bone regeneration in old and diabetic rats. *J Biomed Mater Res A* 2016;104:2060-70. DOI: 10.1002/jbm.a.35742
33. 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;32:486-97. DOI: 10.1002/jbmr.3007

## Original

# Osteoclast generation from RAW 264.7 and PBMC cells. The set up in our lab

Susana Jurado<sup>1,2</sup>, Albert Parés<sup>1,3</sup>, Pilar Peris<sup>2</sup>, Andrés Combalia<sup>4</sup>, Ana Monegal<sup>2</sup>, Nuria Guañabens<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center of Biomedical Research in Liver and Digestive Diseases (CIBERehd). Spain. <sup>2</sup>Metabolic Bone Diseases Unit. Department of Rheumatology; <sup>3</sup>Liver Unit; and <sup>4</sup>Traumatology Unit. Hospital Clínic de Barcelona. IDIBAPS Universitat de Barcelona. Barcelona, Spain

### Abstract

**Introduction and objectives:** osteoclasts are terminally differentiated giant multinucleated cells derived from the fusion of mononuclear progenitors of the monocyte/macrophage hematopoietic lineage. The objective of our group was to achieve the best method for osteoclast differentiation, from both RAW 264.7 cells and peripheral blood monocytes.

**Material and methods:** RAW 264.7 cells and human PBMCs were differentiated into osteoclasts. Success in differentiation was assessed by TRAP staining. Osteoclast activity was detected by the resorption pits in Corning® Osteo Assay Surface Plates.

**Results:** the optimal cell density for RAW 264.7 cell differentiation was 25,000 cells/cm<sup>2</sup> with 30 ng/mL of RANKL for 6 days. Osteoclasts differentiated from PBMCs were observed after 4 weeks with 25 ng/mL M-CSF and 30 ng/mL RANKL. Individual pits or multiple pit clusters were observed on the surface plates.

**Conclusions:** we report optimal conditions for the differentiation of osteoclasts from

#### Keywords:

Osteoclasts.  
Differentiation.  
Bone resorption.

Received: 26/05/2022 • Accepted: 25/09/2022

*Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.*

Jurado S, Parés A, Peris P, Combalia A, Monegal A, Guañabens N. Osteoclast generation from RAW 264.7 and PBMC cells. The set up in our lab. Rev Osteoporos Metab Miner 2023;15(1):6-11

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00005

#### Correspondence:

Susana Jurado. Metabolic Bone Diseases Unit.  
Department of Rheumatology. Hospital Clínic  
de Barcelona. C/ Villarroel, 170. 08036  
Barcelona, Spain  
e-mail: susanajurado80@gmail.com

## INTRODUCTION

---

The bone is a dynamic tissue which is under constant remodeling. Indeed, bone remodeling is a complex cellular process that involves bone resorption induced by osteoclasts and bone formation produced by osteoblasts (1). An imbalance in this equilibrium results in metabolic bone diseases such as osteoporosis or osteopetrosis. This disequilibrium may be produced by an increase in bone resorption due to a rise in the number of osteoclasts or in their activity, or by a decrease in bone formation due to a lower osteoblast activity, or by both combined effects.

The direct cellular interactions between osteoblasts and osteoclasts, mediated in part by the receptor activator of NF- $\kappa$ B, its ligand and osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG) pathway, are essential for the regulation of bone remodeling (2). The interaction between RANKL, either at the osteoblast surface or in its soluble form and its receptor RANK, on the membrane of osteoclast precursors initiates a cascade of signaling events, resulting in their differentiation to form mature osteoclasts. OPG, an osteoblast-secreted glycoprotein of the tumor necrosis factor receptor superfamily, acts as a decoy receptor and blocks the interaction between RANKL and RANK. Moreover, many other cytokines and hormones have been found to regulate either OPG or RANKL, or both, in similar or opposite directions (3).

Osteoclasts represent 1-2 % of the total bone resident cells. They are terminally differentiated giant multinucleated cells, derived from the fusion of mononuclear progenitors of the monocyte/macrophage hematopoietic lineage (1). The importance of osteoclasts in bone homeostasis is evidenced by the diseases in which osteoclast formation or function is unbalanced. However, the role of osteoclasts in health or disease and its biology have remained elusive for years. Initially, it was thought that osteoclasts were cells that undergo apoptosis after a short lifespan of around two weeks, but in the last few years, it has been shown that osteoclasts have a lifespan of around 6 months. A recent study has revealed that mature osteoclasts are capable of fissioning into smaller daughter cells, a new cell type called osteomorphs (4). These osteomorphs are freely motile cells, able to migrate and fuse with other osteomorphs or osteoclasts, creating recycled cells (4).

Osteoclasts can be studied *in vitro* by isolating primary bone marrow or peripheral blood monocytes cells (PBMCs), or by using the murine myeloid cell line RAW 264.7, which can be differentiated into mature osteoclasts (5-7). The use of established cell lines like RAW 264.7 instead of human primary cell cultures is extensive because it is not feasible to cultivate and expand osteoclasts for long periods of time. In addition, available cell numbers from single differentiation experiments are limited and experimental outcome may be

variable depending on the cell donor. Therefore, the use of the RAW 264.7 cell line, which is quite extended, avoids these problems.

In the literature, the differentiation process of osteoclasts from RAW 264.7 cells is well established. However, the differentiation process of osteoclasts from human PBMCs is not clearly described. Thus, in scientific reports there is no defined cell density or time required to achieve the desired osteoclasts. We needed much bibliographic research in the first place, and then we performed different technical approaches to obtain osteoclasts until suitable differentiation results were achieved. All of these tasks required up to a month for the process to be completed.

Therefore, the aim of this study was to optimize osteoclast differentiation techniques, from both RAW 264.7 cells and peripheral blood monocytes. The goal was to obtain differentiated osteoclasts in order to perform experiments with substances that act on the viability and apoptosis of osteoclasts.

## MATERIAL AND METHODS

---

### MATERIALS

Alpha-minimum essential medium (aMEM), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Phosphate Buffered Saline (PBS), L-glutamine and trypsin were purchased from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) (Waltham, MA, USA); accutase and toluidine blue were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); penicillin-streptomycin from LabClinics (Barcelona, Spain); recombinant mouse RANKL, recombinant human RANKL and recombinant human M-CSF from R&D systems (Bio-Techne, UK); RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail and Lymphoprep™ were purchased from Stemcell Technologies (Köln, Germany).

### OSTEOCLASTS FROM RAW 264.7 CELL CULTURE

RAW 264.7 cells, a transformed murine monocytic macrophage cell line from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, England), were cultured at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere in DMEM, supplemented with 10 % heat-inactivated FBS and 100 U/mL penicillin-streptomycin. Cells were plated directly on 96-well plates at a density of 1.5 x 10<sup>4</sup>, 2.5 x 10<sup>4</sup> and 3.5 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. The medium used for osteoclastic differentiation was aMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin and 25, 30 and 50 ng/mL of recombi-

nant mouse RANKL. The medium was removed and replaced with fresh medium every 48 h-72 h. After 6 days, RAW 264.7 cells were differentiated into osteoclasts.

## OSTEOCLASTS FROM PERIPHERAL BLOOD MONOCYTE CULTURE

RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail™ was used to purify human monocytes taken from total PBMCs of buffy coats, supplied by the local reference blood bank (Banc de Sang i Teixits, Barcelona). Cells were separated using Lymphoprep™, following the manufacturer's protocol.

Cells were seeded in two different ways. For the first attempt, they were seeded in a 75 cm<sup>2</sup> flask at a density of 150,000 cells/cm<sup>2</sup>, and then cultured at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere in aMEM, supplemented with 10 % heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin and 25 ng/mL of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) for 2 weeks. The medium was replaced every 48 to 72 hours. Then, cells were treated with accutase and plated on 96-well plates at a density of 80,000 cells/cm<sup>2</sup> for one additional week, adding 30 ng/mL of recombinant human RANKL to the medium. Human monocytes were differentiated into osteoclasts. On the other hand, cells were seeded directly on 96-well plates at a density of 150,000, 250,000 and 400,000 cells/cm<sup>2</sup> and were treated from the beginning with both 25 ng/mL of recombinant human M-CSF and 30 ng/mL of recombinant human RANKL in aMEM supplemented with 10 % heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin for three-four weeks.

## CHARACTERIZATION OF OSTEOCLASTS AND RESORPTION PIT FORMATION ASSAY

To identify the generation of multinucleated osteoclasts, cells were stained for the enzyme tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) using the TRAP-staining kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. TRAP-positive multinucleated (3 or more nuclei) cells were visualized by light microscopy. Each osteoclast characterization assay was performed at least 3 times.

Resorption pits were assessed by seeding RAW 264.7 cells to differentiate into osteoclasts at a density of 25,000 cells/cm<sup>2</sup> on 24-well Corning® Osteo Assay Surface Plates (Corning Cat. No. 3987, Cultek, Life Sciences, NY, USA). Cells were then removed and well surfaces were stained with 1 % toluidine blue for 1 min. Individual resorption pits or multiple pit clusters were visualized on the surfaces by light microscopy.

Images were obtained using a DM IL LED-inverted microscope with a MC190 HD camera and the Application Suit v3.4.0 acquisition software (Leica microsystems SLU, Spain). The area of pits was analyzed using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA).

## RESULTS

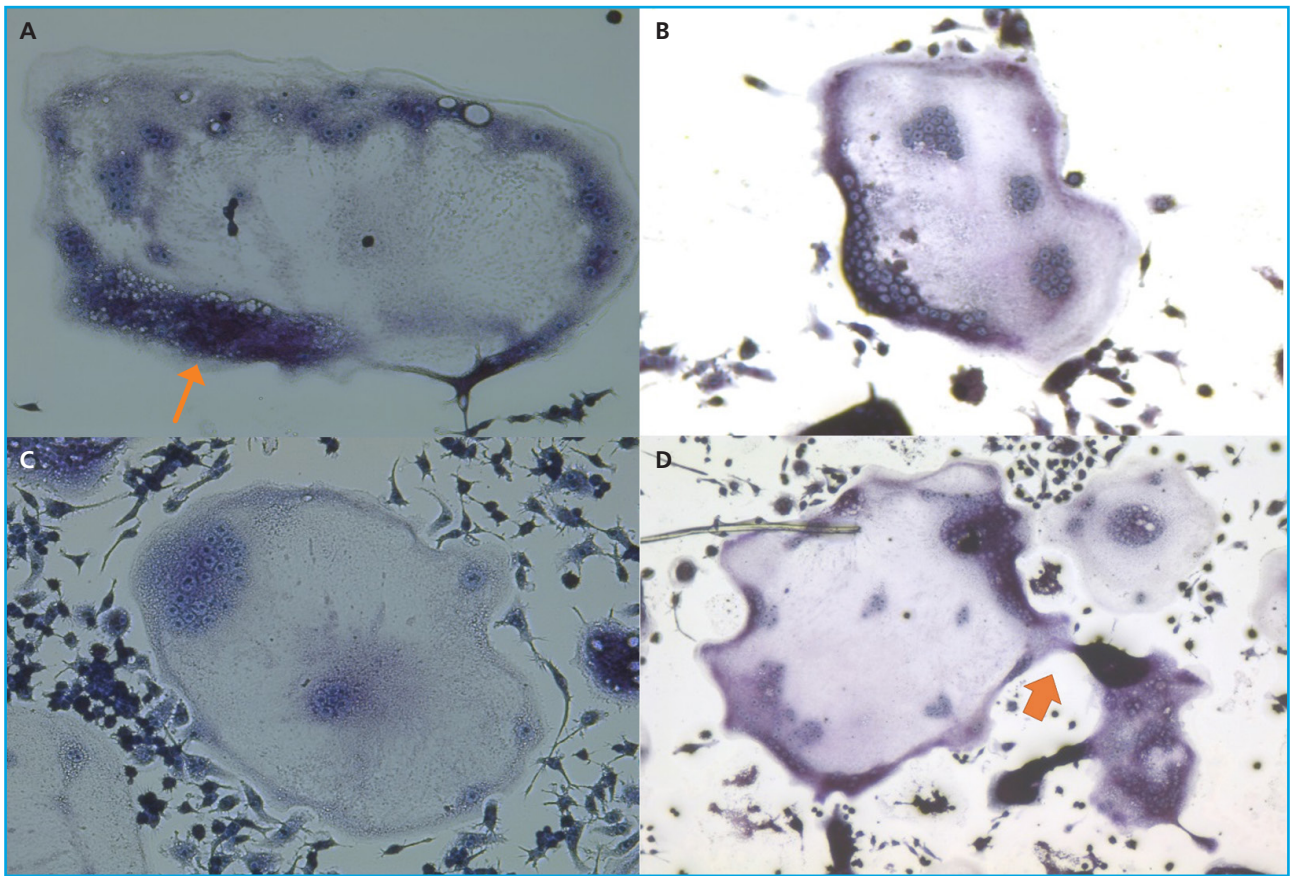
### DIFFERENTIATION AND IDENTIFICATION OF OSTEOCLASTS

The optimal cell density for RAW 264.7 differentiation cells was 25,000 cells/cm<sup>2</sup>. A concentration of 30 ng/mL of RANKL was enough to achieve an optimal differentiation. Under this condition, multinucleated osteoclasts were observed by TRAP staining after 5-7 days (Fig. 1). Osteoclastic ruffled border and connections between multinucleated osteoclasts were observed as well (Fig. 1). However, we obtained no differentiated osteoclasts when monocytes were plated directly on 96-well plates, being the method by which we differentiated RAW into osteoclasts. By contrast, in the case of monocytes from PBMCs, the cells remained monocyte-like after 3-4 weeks on 96-well plates and differences in the doses of RANKL and M-CSF did not change this result. We did not differentiate the cells by putting glass coverslips on the wells, as recommended by some research groups, since from our perspective, this technical approach did not bring advantages and made the methodology more complex. For this reason, we opted to maintain the cells in 75 cm<sup>2</sup> flasks for the time being by administering only M-CSF to keep the cells in a resting and stable state. After 3 weeks, we finally transferred the cells to 96-well plates and started administering RANKL as well. In this manner, we were able to observe differentiated osteoclasts within another week. In the differentiation process into osteoclasts from PBMCs, multinucleated osteoclasts were observed by TRAP staining after 3-4 weeks, as shown in figure 2.

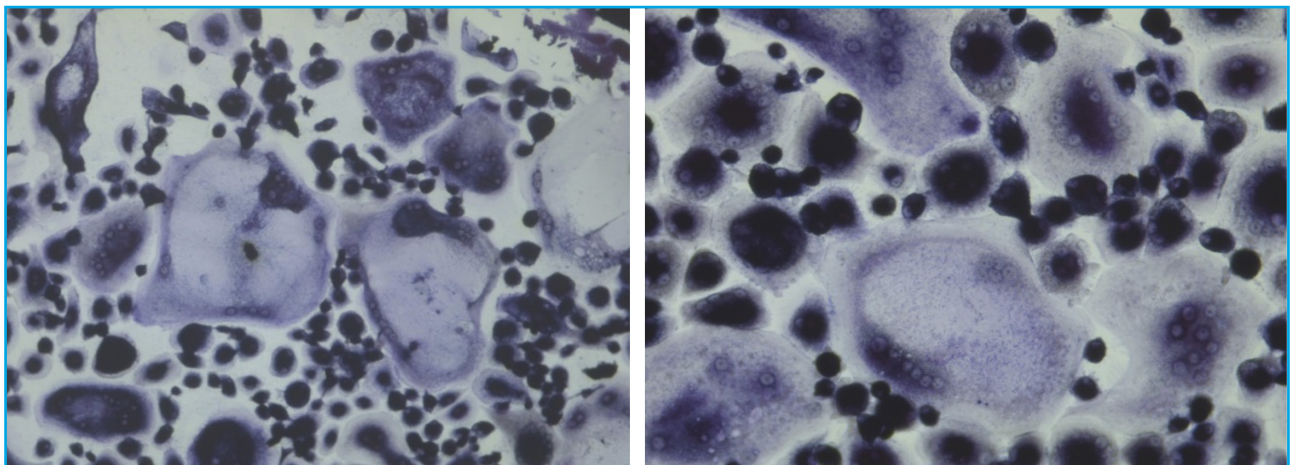
### RESORPTION PITS

Individual pits or multiple pit clusters were observed using a microscope at 10x magnifications in the Corning® Osteo Assay surface plates (Fig. 3). When activators of osteoclast activity such as bilirubin were added, more resorbed areas were observed compared to the non-treated plates (data not shown). Indeed, we found that bilirubin was an activator of osteoclast survival in our viability studies, resulting in an increase in osteoclast number and activity, identified by observing the resorption pits on the Corning® Osteo Assay surface plates.

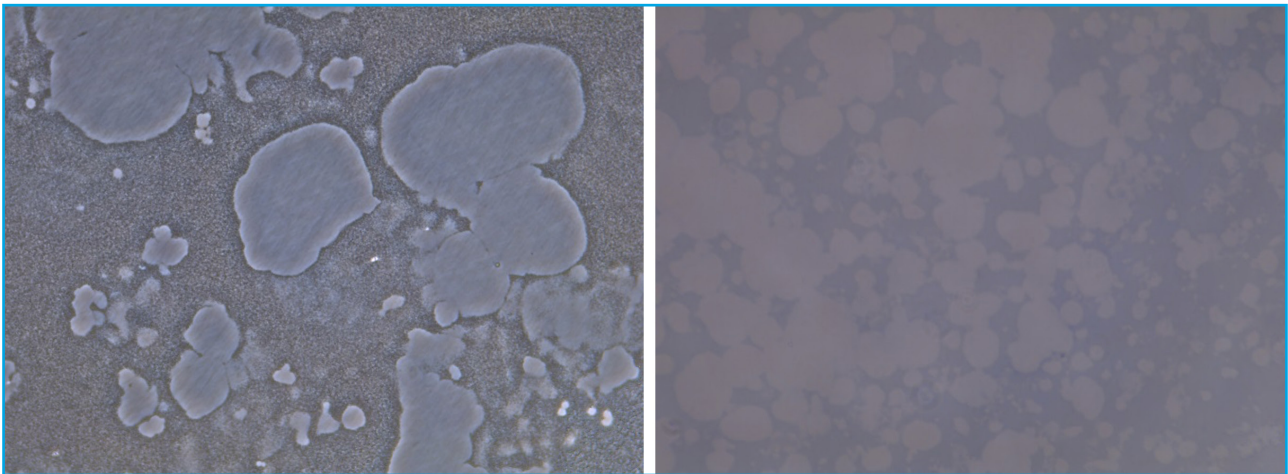




**Figure 1.** Differentiated osteoclasts from RAW 264.7 cells are shown after TRAP staining. Big multinucleated osteoclasts are shown. Ruffled border (1A, thin arrow) and connections between multinucleated osteoclasts (1D, thick arrow) are observed. Experiments were performed more than 10 times.



**Figure 2.** Differentiated osteoclasts from human PBMCs after TRAP staining are represented. Many multinucleated osteoclasts were observed. Experiments were performed more than 10 times.



**Figure 3.** Representative images of the pit resorption areas on Corning® Osteo Assay Surface Plates are shown (clear areas). Differentiated osteoclasts from RAW 264.7 cells were plated. Experiment was performed once.

## DISCUSSION

Osteoclasts are fascinating cells for their abilities and functions. Their tight balance with osteoblasts is regulated by multiple factors that make a very accurate process. With the recent discovery of osteomorphs by McDonald et al. (4), this process has turned out to be even more precise. Osteomorphs will remain waiting until the moment in which mature osteoclasts are required to resorb bone.

In our experience, the differentiation process of the cells is not free of technical difficulties. Several factors could act on this process, and osteoclasts may not become active, or simply not correctly differentiated. The differentiation of osteoclasts from RAW 264.7 cells was easier than with primary human cells, because it was a simpler process with more cell availability, and in addition, the time to achieve differentiated cells was shorter than with primary cells. We found several bibliographic references as a guide to begin with and we found our optimal concentrations of both RANKL and RAW 264.7 cells in a short time. However, the differentiation of osteoclasts from monocytes of human PBMCs was complex. First, the heterogeneity that we found in the literature was high, and it was difficult to decide how to start our experiments. Secondly, monocytes take a long time to become osteoclasts. Moreover, the differentiation process was more expensive than using RAW cells because in this case, two differentiating activators were needed: the human M-CSF and RANKL. Despite all these setbacks, after several months, we were able to obtain active differentiated osteoclasts and we performed the experiments shown in our recent publication (8). We don't know the reason why finally we needed to maintain for 2 weeks the monocytes from PBMCs in flasks with M-CSF. Our hy-

pothesis is that cells maybe need a rest time to stabilize in the flask, where there is more place for them. After that period, they are able to differentiate into osteoclasts with the addition of RANKL.

The possibility of observing the activity of osteoclasts on special bone surfaces was described in a few reports (9). The observation of resorbed areas in the Corning® Osteo Assay Surface Plates allows us to check the ability of the mature osteoclasts to resorb mineralized tissue. Although we have not shown these results, we performed a study in which we administered substances that enhance or inhibit osteoclast activity, and the resorbed areas varied to a large extent. We intended to repeat these experiments several more times, but these plates were no longer manufactured.

In summary, we have established optimized conditions for osteoclast differentiation from both cell types: the RAW 264.7 murine cell line and from human monocytes. This experience will enable us and other researchers to carry out future studies with osteoclasts.

## REFERENCES

1. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med* 2014;20(8):449-59. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.06.001
2. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001;142(12):5050-5. DOI: 10.1210/endo.142.12.8536
3. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423(6937):337-42.
4. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P, et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimu-



- lated bone resorption. *Cell* 2021;184(5):1330-1347.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.002
5. Nguyen J, Nohe A. Factors that Affect the Osteoclastogenesis of RAW264.7 Cells. *J Biochem Anal Stud* 2017;2(1):10.16966/2576-5833.109. DOI: 10.16966/2576-5833.109.
  6. Song C, Yang X, Lei Y, Zhang Z, Smith W, Yan J, et al. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW264.7 cells. *J Cell Physiol* 2019;234(7):11969-75. DOI: 10.1002/jcp.27852
  7. Abdallah D, Jourdain M-L, Braux J, Guillaume C, Gangloff SC, Jacquot J, et al. An Optimized Method to Generate Human Active Osteoclasts from Peripheral Blood Monocytes. *Front Immunol* 2018;9:632. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00632
  8. Jurado S, Parés A, Peris P, Combalia A, Monegal A, Guañabens N. Bilirubin increases viability and decreases osteoclast apoptosis contributing to osteoporosis in advanced liver diseases. *Bone* 2022;162:116483. DOI: 10.1016/j.bone.2022.116483
  9. Wright LE, Buijs JT, Kim H-S, Coats LE, Scheidler AM, John SK, et al. Single-Limb Irradiation Induces Local and Systemic Bone Loss in a Murine Model. *J Bone Miner Res* 2015;30(7):1268-79. DOI: 10.1002/jbmr.2458

## Original

# Implicación de las conexinas, integrinas y cilio primario en la actividad de las células óseas

Sara Heredero-Jiménez, Irene Tirado-Cabrera, Eduardo Martín-Guerrero, Joan Pizarro-Gómez, Arancha R. Gortázar, Juan Antonio Ardura

Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU. Madrid. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. Madrid

### Resumen

**Introducción:** los osteocitos son capaces de detectar diferentes señales, transducirlas en respuestas biológicas y transmitir las a los osteoblastos y osteoclastos, permitiendo el mantenimiento de la homeostasis ósea. La mecanotransducción ósea es posible gracias a que los osteocitos presentan diferentes estructuras mecanosensoras como las conexinas (Cx), las integrinas, el cilio primario e incluso receptores acoplados a proteínas G como el receptor de la parathormona tipo 1 (PTH1R).

**Objetivo:** analizar la posible interacción de los diferentes elementos mecanosensores de los osteocitos y ver su influencia en la respuesta biológica.

**Material y métodos:** se trabajó con las líneas celulares osteocíticas MLO-Y4 Cx43+/+ (scrambled (SCR) y ARNi  $\alpha 2$ ) y Cx43-/-.

**Resultados y conclusión:** los resultados obtenidos muestran que la Cx43 y la integrina  $\alpha 2$  se encuentran involucradas en el aumento de la longitud del cilio primario, afectando potencialmente a su funcionalidad como mecanosensor (SCR vs. ARNi  $\alpha 2$ ,  $p < 0,0001$  SCR vs. Cx43-/- y  $p < 0,0001$  ARNi  $\alpha 2$  vs. Cx43-/-). La integrina  $\alpha 2$  también influyó en la localización celular de Cx43 promoviendo que esta se encuentre en la membrana plasmática. También se observó que la activación de PTH1R por agonistas como parathormona (PTH) y proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) inducen la fosforilación de la quinasa ERK 1/2, y estos efectos podrían verse afectados por la deficiencia en Cx43, pero no parecen ser mediados por el silenciamiento de integrina  $\alpha 2$ . Finalmente, se observó que la presencia de la Cx43 y de integrina  $\alpha 2$  en los osteocitos aumenta su capacidad de adhesión (Cx43+/+ SCR y ARNi  $\alpha 2$  vs. Cx43-/-  $p < 0,001$  y  $p = 0,0039$ ) y que la deficiencia en Cx43 provoca un incremento de la mortalidad de estas células (Cx43-/- vs. Cx43+/+  $p = 0,0074$ ).

**Palabras clave:**  
Osteocitos. Conexina 43. Cilio primario. Integrinas. Estimulo mecánico. PTHrP.

Recibido: 18/07/2022 • Aceptado: 13/10/2022

Este artículo se envía en cumplimiento del compromiso que se adquirió al obtener la BECA FEIOMM de Investigación básica 2018.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos: agradecemos el apoyo de la Sociedad Española de Metabolismo Mineral y Óseo (SEIOMM) y de la Fundación Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (FEIOMM) que ha permitido la elaboración del presente manuscrito.

Heredero-Jiménez S, Tirado-Cabrera I, Martín-Guerrero E, Pizarro-Gómez J, Gortázar AR, Ardura JA. Implicación de las conexinas, integrinas y cilio primario en la actividad de las células óseas. Rev Osteoporos Metab Miner 2023;15(1):12-20

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00006

### Correspondencia:

Juan Antonio Ardura. Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. C/ Julián Romea, 23. 28003 Madrid  
e-mail: juanantonio.ardurarodriguez@ceu.es

## INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido dinámico que se remodela constantemente en respuesta a una gran variedad de estímulos, entre los que destacan hormonas, factores de crecimiento y carga mecánica (1). El control preciso y coordinado de la remodelación ósea requiere de la interacción y comunicación entre osteoblastos (células formadoras de hueso), osteocitos (principales células mecanosensoras del hueso) y osteoclastos (células encargadas de la resorción ósea); y tiene lugar, entre otros mecanismos, gracias a la formación de las uniones comunicantes (UC) entre dichas células óseas (2).

Los osteocitos son capaces de detectar los estímulos mecánicos debido a que presentan diferentes estructuras mecanosensoras: integrinas, UC, hemicanales de conexina 43 (Cx43), cilio primario y/o receptores acoplados a proteínas G (GPCR), como PTH1R (3). Posteriormente, estas células transducen los estímulos mecánicos en respuestas biológicas, que desencadenan la activación de diferentes vías de señalización, induciendo cambios en la expresión génica y en el metabolismo celular. Esto provoca la secreción de factores capaces de regular la proliferación y la viabilidad de las células efectoras óseas (osteoblastos y osteoclastos). Debido a la complejidad del entorno extracelular del hueso es muy probable que los diferentes mecanosensores interactúen entre sí, integrando las múltiples señales extracelulares en una señal cohesiva (4).

La comunicación celular juega un papel importante en el tejido óseo, al encontrarse embebidos en el interior de una matriz mineralizada (5). Las conexinas (Cx) son unas proteínas que constituyen algunos de los canales esenciales para que pueda tener lugar la comunicación entre las células óseas.

Los osteocitos también son capaces de promover la formación ósea, gracias a las acciones endocrinas de la PTH y su análogo local en el hueso, la PTHrP, a través de la activación de su receptor común, PTH1R (6). PTH1R es un GPCR que puede desencadenar varias vías de señalización intracelular en los huesos (7).

El cilio primario es una estructura mecanosensora capaz de crear un microdominio distinto del citoplasma celular, que permite la localización y concentración específica de receptores como GPCR, canales iónicos y proteínas efectoras, mejorando así la cinética de las vías de señalización (8).

Diversos estudios han demostrado que defectos en la función o estructura sensorial del cilio primario están asociados con diferentes enfermedades, denominadas generalmente como ciliopatías (9). Asimismo, cuando se interrumpe la formación de los cilios primarios o su longitud disminuye, las células presentan una mecanosensibilidad alterada y una respuesta disminuida a la estimulación mecánica (10).

Las integrinas son complejos de proteínas que permiten que la célula interactúe con el medio extracelular (11). Investigaciones anteriores han constatado que en las células MLO-Y4 las integrinas  $\beta 1$  y  $\alpha 2$  están implicadas en la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), inducida por estímulos mecánicos, lo que desemboca en la activación de vías de señalización que modulan la adhesión de los osteocitos a la matriz mineralizada e inhiben la respuesta apoptótica de estas células (12).

En el presente estudio hipotetizamos la posible relación entre conexinas, cilio primario, PTH1R e integrinas como reguladores de procesos biológicos que serían clave para la función de los osteocitos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO CELULAR

Se utilizaron tres tipos de células MLO-Y4 Cx43+/+ (presentan un vector vacío como control negativo para poder evaluar los efectos del no silenciamiento) y Cx43-/- (células deficientes en conexina 43, transfectadas con un ARNi), que fueron amablemente cedidas por la Dra. L. I. Plotkin, y células Cx43+/+ a la que se silenció la integrina  $\alpha 2$  mediante un ARNi. Dichas células se sembraron a una concentración de 24.000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron con el medio *Modified Eagle's Medium* ( $\alpha$ -MEM) (Gibco, ThermoFisher Scientific, ES) suplementado con 2,5 % de suero de ternero (*Calf Serum*; CS), 2,5 % de suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*; FBS), 1 % de L-glutamina, 1 % de penicilina/estreptomicina y puromicina de *Streptomyces alboniger* (Sigma Aldrich, ES) a una concentración 10  $\mu$ g/ml.

Todas las superficies sobre las que se sembraron estas células debían estar previamente colagenizadas con colágeno tipo I al 0,01 % de ácido acético (13). Las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

### SILENCIAMIENTO DE LA INTEGRINA $\alpha 2$

Las células MLO-Y4 Cx43+/+ se transfectaron con tres silenciadores (ARNi) de  $\alpha 2$  diferentes (5 nM) (ThermoFisher Scientific, ES), que presentaban una diana para la secuencia de la integrina  $\alpha 2$ , usando lipofectamine ARNiMax (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los ARNi se añadieron en medio sin suero durante 24 h. La secuencia *scrambled* (SCR) (control ARNi, Santa Cruz Technology, TX, EE. UU.) se empleó como control negativo para evaluar los efectos no dirigidos de silenciamiento (*ARNi off-targeted*“).

## PCR

La extracción de ARN se realizó con TRIZOL® (Ambion, FosterCity, CA, EE. UU.). Para la retrotranscripción de ARN (RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) se utilizó el *kit* (Applied Biosystems, Grand Island, NY, EE. UU.) y el termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Para analizar la expresión de la integrina  $\alpha 2$  (Fw 5'CCATGATGGGTCGAAGCTGA3'; Rv 5'CTTCGTCGGCCACATTGAAA3') se empleó SYBR Green (Sybr promix ex Taq, Takara, Otsu, Japón). El nivel de expresión integrina  $\alpha 2$  se analizó utilizando como gen control  $\beta$ -actina (Fw 5'GAACCCTAAGGCCAACCGTG3'; Rv 5'ACCAGAGGCATACAGGGACAG3'). Se realizaron triplicados de todas las condiciones (Cx43+/+ y Cx43-/-). El cambio de expresión de los genes se calculó basándose en el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## INMUNOFLUORESCENCIA

Se sembraron 30.000 células/pocillo de las placas multi-pocillo (Falcon, ES). Las células fueron cultivadas hasta que alcanzaron una confluencia del 80 % y posteriormente se añadió medio sin suero durante 24 h para inducir la formación del cilio primario. Después, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % y se permeabilizaron con Tritón X-100b al 0,5 %. A continuación, se añadió la solución de bloqueo compuesta por albúmina de suero bovino (BSA) al 10 %, suplementado con suero *goat* al 5 %, durante 1 h. Posteriormente, se mantuvieron toda la noche a 4 °C en agitación los siguientes anticuerpos primarios: anti-Cx43 policlonal producido en conejo (Sigma, ST. Louis, MO, EE. UU.) (dilución 1:1000 en BSA al 10 % y suero *goat* al 5%); y anti- $\alpha$  tubulina acetilada monoclonal producido en ratón (Sigma) (dilución 1:1000 en BSA al 10 % y suero *goat* al 5 %), para observar así el cilio primario. Posteriormente, se añadieron los anticuerpos secundarios: para cilio primario Alexa fluor® 488 de cabra anti-ratón (Invitrogen Molecular probes, Thermo Fisher Scientific™, ES) (dilución 1:1000 en BSA al 10 % y suero *goat* al 5 %), para Cx43 Alexa fluor® 568 anti-conejo IgG (Live technologies, Thermo Scientific™, ES) (dilución 1:1000 en BSA al 10 % y suero *goat* al 5 %). Tras 1 h de incubación se añadió 4'-6-diamidino2-fenilindol (DAPI) (dilución 1:10,000). Los núcleos, el cilio primario y la Cx43 se visualizaron con el microscopio de epifluorescencia (Leica CTR 6000). Se realizaron imágenes de los triplicados y se analizaron un total de 100 células de cada condición (Cx43+/+ SCR y  $\alpha 2$  y Cx43-/-). La fusión (*merged*) de las imágenes individuales del cilio primario, la Cx43 y núcleos celulares en una sola se realizó con el programa ImageJ, que permite procesar las imágenes digitales, es capaz de calcular el área y las estadísticas del valor del pixel seleccionado por el usuario y de medir distancias.

## ESTIMULACIÓN POR AGONISTAS DE PTH1R (PTH Y PTHrP)

Para realizar la estimulación mediante PTHrP y PTH las células se sembraron en placas a una densidad de 25.000 células/cm<sup>2</sup> y ambos ligandos se añadieron a una concentración de 10<sup>-7</sup> molar (M), durante 10 min.

## ENSAYO DE MUERTE Y ADHESIÓN CELULAR

La viabilidad celular se determinó mediante la exclusión de azul de tripano, método que tiñe las células muertas de azul, permitiendo calcular el porcentaje de células vivas y muertas respecto al total empleando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico de campo claro (Leica DM5500B) para hacer los contajes.

Tras tripsinizar las células y transcurridos 30 minutos tras la resiembra, se realizó el conteo de las células no adherentes con la cámara de Neubauer. A continuación, se tomaron imágenes de diferentes campos de las células adheridas a la placa de Petri, mediante un microscopio invertido de campo claro (Leica DM5500B), para calcular los porcentajes de células adheridas respecto al total. Se analizaron un total de 9 campos de cada condición por triplicado (Cx43+/+ SCR y  $\alpha 2$  y Cx43-/-).

## ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT

Se realizó una extracción de proteínas de cada condición por duplicado (Cx43+/+ SCR y  $\alpha 2$  y Cx43-/-), empleando RIPA Buffer (150 mM NaCl, 1,0 % IGEPAL® CA-630, 0,1 % SDS (dodecilsulfato sódico), 50 mM Tris, pH 8, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), inhibidor de proteasa (IP) (dilución 1:100, Calbiochem®, ES) e inhibidor de fosfatasa (IF) (dilución 1:100, Calbiochem®, ES). Se cuantificaron las proteínas mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, ES). Para realizar la lectura se utilizó el lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, ES) y se hicieron tres lecturas a 562 nm mediante el programa SkanIt Software 2.4.3 RE.

Los extractos de proteína se separaron mediante un gel de poliacrilamida. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). El bloqueo se realizó con leche en polvo al 5 % en tampón Tris salino con Tween20 (TTBS) al 0,05 %, durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron durante 24 horas a 4 °C y en agitación los siguientes anticuerpos primarios: anti-fosfo-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Cell Signaling, Beverly, MA, EE. UU.), anti-p44/42 MAPK (Erk 1/2), y anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma Aldrich, ES). Posteriormente, se añadieron los anticuerpos secundarios. El revelado mediante quimioluminiscencia se realizó con el sustrato Clarity™ Western ECL (Bio-Rad). La intensidad de las bandas se cuantificó por densitome-

tría, usando Dnr Bio Imaging System MF ChemiBIS3.2 y los programas Gelcapture y QuantityOne™ (Bio-Rad).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El límite de confianza establecido en todos los test estadísticos realizados fue del 95 %. Por tanto, se consideran estadísticamente significativos los resultados que tengan un valor  $p$  ( $p < 0,05$ ).

Para la comparación de medias  $\pm$  desviación estándar (DE) se usó el programa *GraphPad Prism 8*. Para comparar medias de más de dos grupos se empleó el test ANOVA de un solo factor y el test ANOVA Welch. No se consideró igualdad de varianzas. Para los análisis múltiples se utilizó el test de Dunnett, el test de Tukey y el test de Kruskal Wallis no paramétrico, siendo  $t$  el estadístico que analiza si las medidas de las dos condiciones son iguales o no y  $gl$  que serían los grados de libertad que indican el número de valores que pueden ser asignados de forma arbitraria.

## RESULTADOS

### LA EXPRESIÓN GÉNICA DE INTEGRINAS SE ENCUENTRA MODULADA POR CONEXINA 43 EN CÉLULAS OSTEOCÍTICAS

Se analizó la expresión del ARN de las integrinas  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 6$  y la Cx43 mediante PCR cuantitativa, para estudiar la posible relación en la expresión de estas dos familias de proteínas.

En la figura 1 se observa cómo la integrina  $\alpha 2$  disminuye significativamente su nivel de expresión en células de la línea Cx43  $-/-$  frente a las células Cx43  $+/+$  ( $t = 13,93$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0,0002$ ). Por el contrario, las integrinas  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$  aumentan su expresión significativamente, en la línea celular Cx43  $-/-$  en comparación con Cx43  $+/+$  ( $t = 3,646$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0,0219$ ;  $t = 5,501$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0,0053$ ;  $t = 26,18$ ,  $gl = 4$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente). En el caso de la  $\beta 6$  no se observaron diferencias significativas entre las dos líneas celulares ( $t = 0,99$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0,378$ ).

Estos resultados indican que la expresión de conexina 43 condiciona el patrón de expresión de diversas integrinas en células osteocíticas.

### CONEXINA 43 E INTEGRINA $\alpha 2$ REGULAN LA LONGITUD DEL CILIO PRIMARIO EN CÉLULAS OSTEOCÍTICAS

Se realizaron inmunofluorescencia para observar la posible relación e interacción entre el cilio primario, la Cx43 y la integrina  $\alpha 2$ , tres conocidos mecanosensores de los osteocitos, y determinar si el desarrollo y

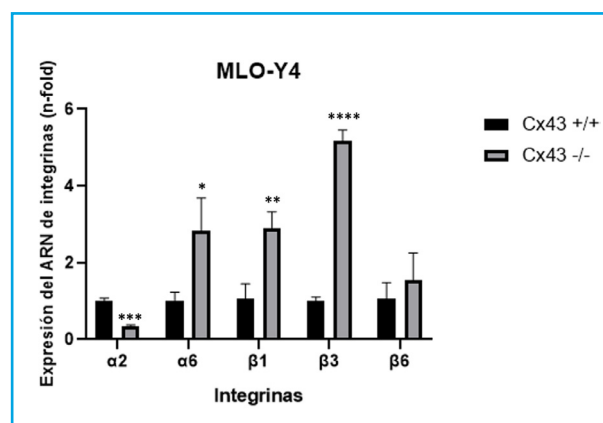
la longitud del cilio primario podría depender de la presencia de Cx43 e integrina  $\alpha 2$  (Fig. 2).

Se compararon las células MLO-Y4 Cx43 $+/+$ , MLO-Y4 Cx43 $+/+$  a las que se silenció la integrina  $\alpha 2$  (ARNi  $\alpha 2$ ) y MLO-Y4 Cx43 $-/-$ . En los resultados mostrados en la figura 3 se observó que todas las líneas celulares son capaces de desarrollar cilio primario y que este orgánulo se origina en la superficie celular. Además, se observó que la Cx43 presenta una distribución diferente en las células Cx43 $+/+$  y ARNi  $\alpha 2$ , ya que en las células en las que no se silenció la integrina  $\alpha 2$  predomina la presencia de Cx43 en la membrana celular, localización esperada, pues es donde forma hemicanales y UC. Mientras que en las condiciones en las que las células no presentan integrina  $\alpha 2$  la Cx43 se encuentra distribuida en el citoplasma celular y no tan focalizada en la membrana plasmática. Las imágenes de la inmunofluorescencia también permitieron observar que la Cx43 y el cilio primario no colocalizan.

Para poder comparar cuantitativamente el desarrollo del cilio primario y su longitud se analizaron imágenes de cada tipo celular (Cx43 $+/+$  SCR, Cx43 $+/+$  ARNi  $\alpha 2$  y Cx43 $-/-$ ). Estas imágenes fueron tomadas a partir de diferentes campos mediante microscopía de fluorescencia (40X).

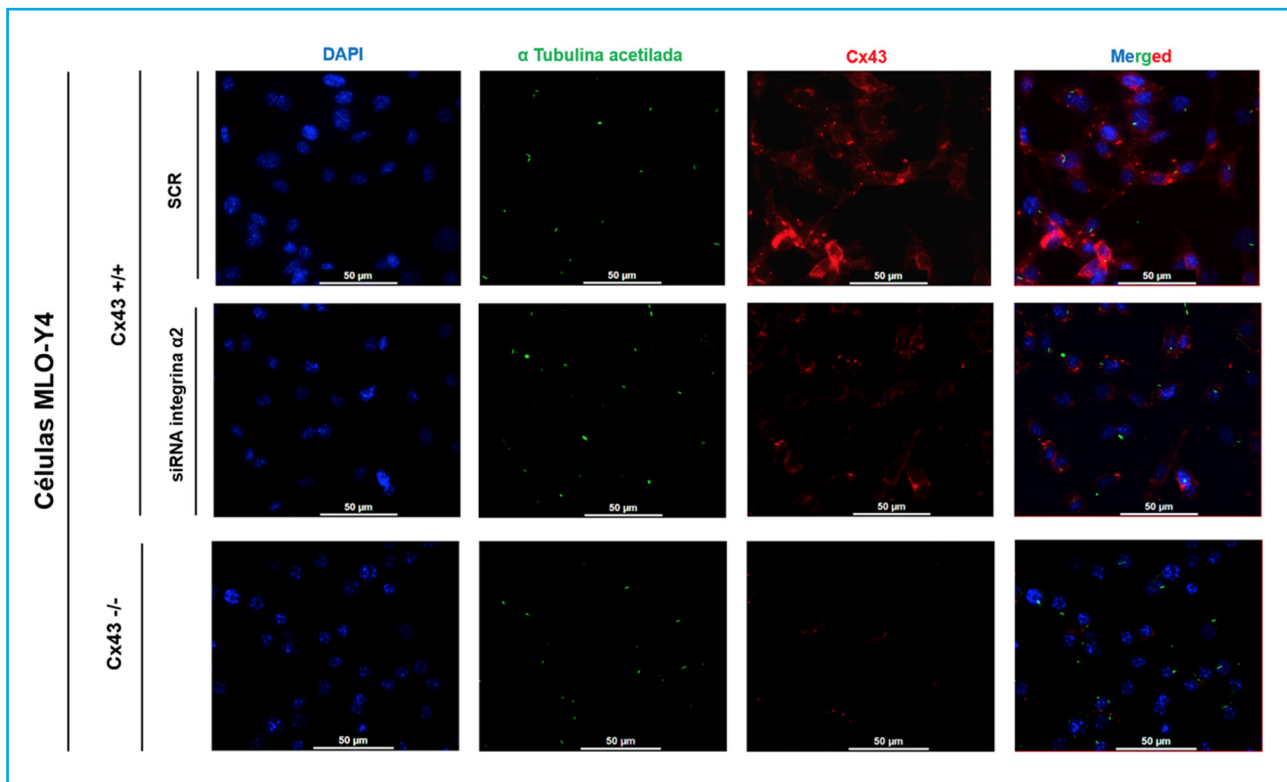
Los análisis estadísticos se realizaron comparando las medias  $\pm$  DE de la longitud en  $\mu m$  de todos los cilios analizados en las células Cx43 $+/+$  SCR (2,37), Cx43 $+/+$  ARNi  $\alpha 2$  (2,08) y Cx43 $-/-$  (1,52). Los resultados obtenidos indican que la longitud del cilio primario en las células en las que se silenció la integrina  $\alpha 2$  y en las células deficientes en Cx43 era significativamente menor que en las células *scrambled*. El valor  $p$  fue:  $p = 0,0017$  para la comparación de SCR vs. ARNi  $\alpha 2$ ,  $p < 0,0001$  SCR vs. Cx43 $-/-$  y  $p < 0,0001$  ARNi  $\alpha 2$  vs. Cx43 $-/-$  (Fig. 3).

Podemos sugerir en base a estas observaciones que conexina 43 e integrina  $\alpha 2$  se encuentran implicadas en la elongación de cilio primario en células osteocíticas.

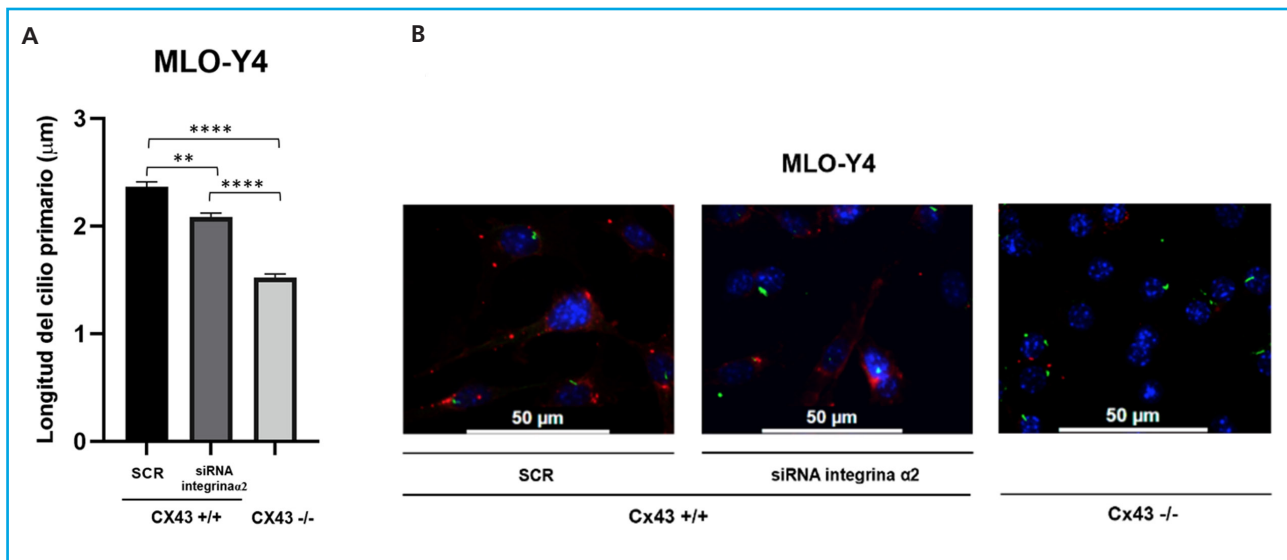


**Figura 1.** Expresión del ARN de las integrinas  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 6$  en células Cx43  $+/+$  y Cx43  $-/-$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE de un experimento realizando triplicados de cada condición experimental \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .





**Figura 2.** Inmunofluorescencia de las células MLO-Y4 Cx43+/+ (SCR y si RNA  $\alpha 2$ ) y Cx43 -/-. El núcleo celular se visualizó con DAPI (azul), el cilio primario con el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina acetilada (verde) y la Cx43 con el anticuerpo anti-Cx43 (rojo). Las imágenes fueron capturadas con un microscopio de fluorescencia confocal (40X). Barra de escala = 50  $\mu$ m.



**Figura 3.** Comparación de la longitud del cilio primario ( $\mu$ m) entre las líneas Cx43+/+ (SCR y ARNi  $\alpha 2$ ) y Cx43 -/-. A. Los resultados muestran el valor medio  $\pm$  DE de la longitud del cilio primario en  $\mu$ m medio a partir de las imágenes realizadas a diferentes campos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . B. Imágenes representativas en las que se puede visualizar el núcleo por DAPI (azul) y el cilio primario por el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina acetilada (verde). Las imágenes se capturaron con microscopio de fluorescencia confocal (40X). Bara de escala = 50  $\mu$ m.

## REGULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE QUINASA ERK 1/2 POR CONEXINA 43 EN CÉLULAS OSTEOCÍTICAS

Para caracterizar la respuesta de las células MLO-Y4 (Cx43+/+ y Cx43-/-) al estímulo por agonistas se añadieron al medio de cultivo los ligandos del receptor PTH1R, PTH y PTHrP (1-37), a una concentración de  $10^{-7}$  M, durante 10 min. Inmediatamente después se realizó la extracción de proteínas para analizar la expresión de P-ERK mediante Western blot. El propósito de este experimento fue determinar si la deficiencia en Cx43 influía en la activación del receptor PTH1R tras estimularlo con sus respectivos ligandos (PTH y PTHrP) y analizar las vías de señalización intracelulares que activa dicho estímulo y la respuesta celular que desencadena, concretamente la fosforilación de ERK 1/2.

Los resultados obtenidos muestran que en las células Cx43+/+ la estimulación con PTH y PTHrP aumenta la fosforilación de ERK 1/2 (media  $\pm$  DE de los duplicados realizados) con respecto a las células que no fueron estimuladas con ningún ligando (CE). En el caso de las células Cx43-/-, la estimulación con PTH disminuye la fosforilación de ERK con respecto a las células Cx43+/+ que fueron estimuladas con PTH y el péptido agonista PTHrP no produjo estímulo en las células Cx43-/. No se obtuvieron variaciones significativas en los niveles de P-ERK entre las diferentes condiciones experimentales (Fig. 4).

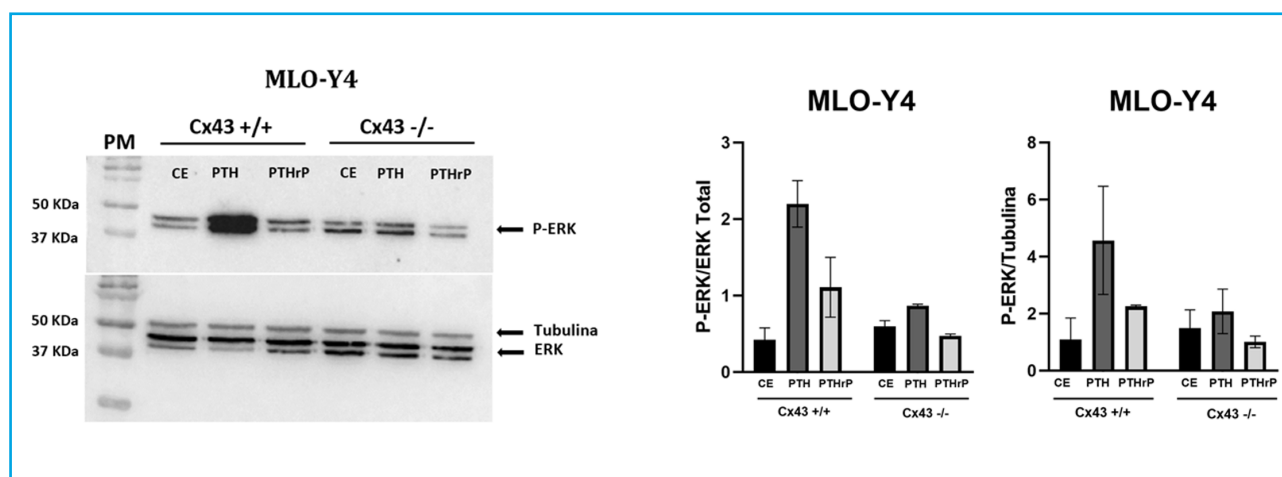
Nuestras observaciones sugieren que conexina 43 regula la fosforilación de ERK 1/2 dependiente de PTH1R activado por ligando.

## LA EXPRESIÓN DE LA Cx43 REGULA LA VIABILIDAD Y LA ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS OSTEOCÍTICAS

Se realizó un ensayo de muerte celular con las células Cx43+/+ SCR, ARNi  $\alpha$ 2 y Cx43-/- para poder determinar si la falta de expresión de la integrina  $\alpha$ 2 y la Cx43 modificaría las rutas de señalización que intervienen en la respuesta de la célula, provocando su apoptosis. En la figura 5A se observa cómo el número de células Cx43-/- vivas disminuye significativamente respecto a las células Cx43+/+ SCR ( $p = 0,0035$ ). En el caso del análisis de las células muertas vemos que aumenta su número significativamente en las células Cx43-/- respecto a Cx43+/+ SCR ( $p = 0,0074$ ).

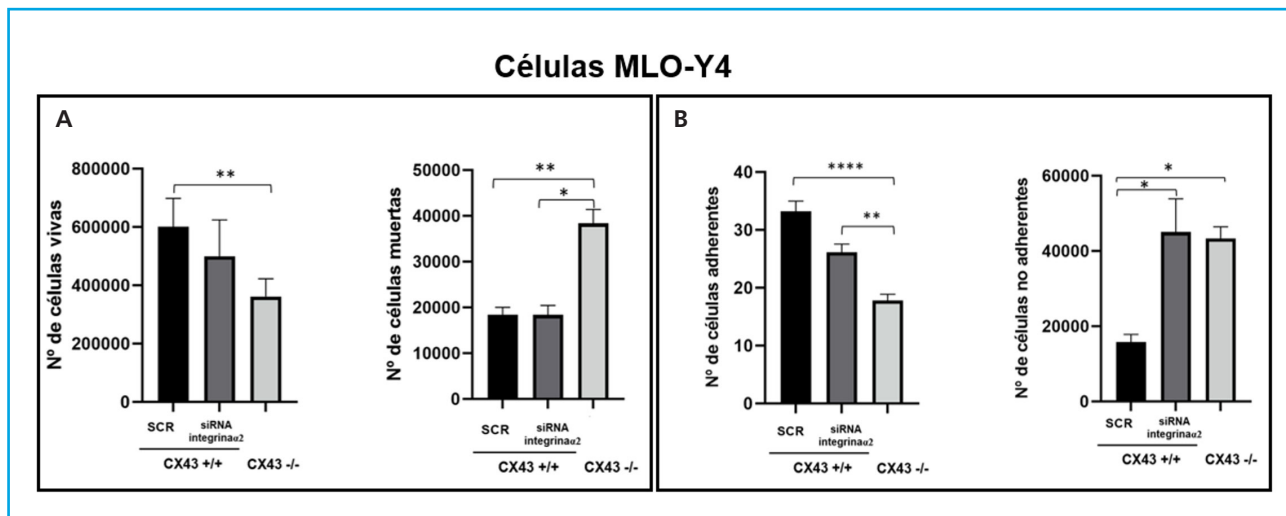
En cuanto a la línea celular Cx43+/+ ARNi  $\alpha$ 2 al no haber diferencias significativas en el número de células vivas (aunque si una ligera tendencia a una disminución en el número de estas) y presentar un número muy similar de células muertas respecto a las células Cx43+/+ SCR, se sugiere que el silenciamiento de la integrina  $\alpha$ 2 influye en la proliferación de los osteocitos y no en la muerte de estos.

Por otro lado, también se realizó un ensayo de adhesión en las células Cx43+/+ SCR, ARNi  $\alpha$ 2 y Cx43-/. En la figura 5B se muestra que el número de células Cx43-/- adheridas a la placa de colágeno disminuye significativamente con respecto a las células Cx43+/+ SCR y ARNi  $\alpha$ 2 ( $p < 0,001$  y  $p = 0,0039$ , respectivamente). En el caso del conteo de las células no adherentes el número de estas aumenta significativamente tanto en las células Cx43+/+ ARNi  $\alpha$ 2 como en Cx43-/- respecto a Cx43+/+ SCR ( $p = 0,0146$  y  $p = 0,0134$ , respectivamente).



**Figura 4.** Análisis de P-ERK tras estimular con PTH y PTHrP células MLO-Y4 Cx43+/+ y Cx43-/. En las células Cx43+/+ la estimulación con PTH y PTHrP aumenta la fosforilación de ERK 1/2 vs. células que no fueron estimuladas con ningún ligando (CE) ( $2,200 \pm 0,696$  frente a  $0,4240 \pm 0,150$  y  $1,11 \pm 0,554$  frente a  $0,4240 \pm 0,150$ , respectivamente). En las células Cx43-/-, la estimulación con PTH disminuye la fosforilación de ERK con respecto a las células Cx43+/+ que fueron estimuladas con PTH ( $0,865 \pm 0,003$  frente a  $2,20 \pm 0,696$ ). Se utilizaron los valores de ERK total y tubulina para normalizar los valores de P-ERK. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE de un experimento por duplicado de cada condición experimental vs. CE.





**Figura 5.** Análisis de la muerte (A) y adhesión (B) celular en células Cx43+/+ (SCR y ARNi  $\alpha$ 2) y Cx43-/- . Los resultados muestran el valor medio  $\pm$  DE de los contajes del número de células vivas y muertas de un único experimento con seis réplicas para cada condición y los contajes del número de células adheridas y no adheridas en la placa \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

La adhesión celular se cuantificó mediante imágenes realizadas en campo claro, también permitieron analizar la morfología de los diferentes tipos celulares, y se observó que las células Cx43+/+ SCR presentaban una forma más alargada y un mayor número de prolongaciones dendríticas lo que les permitiría potencialmente tener una mayor capacidad de adhesión. Por el contrario, las células Cx43+/+ ARNi  $\alpha$ 2 y Cx43-/- mostraron una estructura más redondeada debido probablemente a la ausencia tanto de integrinas como de conexinas, ambas proteínas transmembrana que favorecen la adhesión celular (4).

Estos resultados están relacionados con los obtenidos en el ensayo de muerte celular, pues observábamos un mayor número de células muertas en las Cx43-/-, debido a que al carecer de Cx43 se dificultaría la adhesión a la superficie de cultivo, lo que podría provocar que las células se despeguen y mueran por falta de unión a sustrato.

## DISCUSIÓN

Las integrinas y las conexinas presentan un papel esencial en las funciones celulares (14). Sin embargo, no se ha esclarecido si es necesaria la interacción de ambas familias de proteínas para el correcto funcionamiento de los osteocitos. La disminución de la expresión de la integrina  $\alpha$ 2 en las células Cx43-/-, nos llevó a plantearnos si esta integrina pudiese ejercer como mediador en los procesos dependientes de Cx43 en los osteocitos.

Además de las Cx y las integrinas, el cilio primario también es considerado un mecanosensor de los osteocitos (4).

En las imágenes de inmunofluorescencia se pudo observar cómo la deficiencia en Cx43 y el silenciamiento de la integrina  $\alpha$ 2 influyen en la longitud del cilio primario. Diversos estudios indican que la longitud del cilio primario es un factor determinante para su correcta actuación como mecanosensor (4), dado que si la longitud del cilio es muy pequeña disminuiría el espacio de la membrana ciliar donde podrían localizarse canales iónicos y receptores como el PTH1R que median la respuesta extracelular detectada por el cilio y permiten la transducción de diferentes señales intracelulares (15). Además, el cilio primario genera un compartimento intracelular específico en el que es necesario el transporte intraflagelar de diferentes proteínas, tanto para el desarrollo de este orgánulo como para la transducción de las señales (16). Por tanto, si este espacio se ve disminuido estos procesos podrían verse alterados, provocando que los osteocitos no generen las respuestas adecuadas a los estímulos extracelulares (10).

En las imágenes de la inmunofluorescencia también parece observarse una distribución diferente de la Cx43 entre las células Cx43+/+ SCR y Cx43+/+ ARNi  $\alpha$ 2. Aunque en ambas condiciones los niveles de expresión de Cx43 son similares, es decir, el silenciamiento de la integrina  $\alpha$ 2 no influyó en la expresión de Cx43, sí podría influir en la localización celular de esta proteína, pues en las células Cx43+/+ la Cx43 se encontraba principalmente en la membrana celular. Estos resultados podrían indicar que la integrina  $\alpha$ 2 y la Cx43 interactúan en la membrana de la célula y que su expresión desencadena una retroalimentación positiva favoreciendo el transporte de estas proteínas desde el retículo endoplasmático hacia la membrana celular.

Los osteocitos, embebidos en la matriz mineralizada, son capaces de detectar diferentes señales, traducirlas en respuestas biológicas y transmitir las al resto de células óseas, fundamentalmente, osteoblastos y osteoclastos, para permitir el mantenimiento de la homeostasis ósea (17). Una de estas señales es el estímulo mediante agonistas del PTH1R (PTHrP y PTH) (18).

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa que en las células Cx43+/+ aumenta la fosforilación de ERK 1/2 cuando son estimuladas con PTH y PTHrP. En el caso de las células Cx43-/-, la estimulación con PTH y PTHrP parece inhibirse pues los niveles de fosfo-ERK 1/2 disminuyen con respecto a las células Cx43+/+. Esto puede ser debido a que los osteocitos Cx43-/- sean menos sensibles a los estímulos, dado que son deficientes en la proteína Cx43 que actúa como mecanosensor y además presentan un cilio primario de menor longitud. Todo ello provocaría que el PTH1R tenga menos espacio para localizarse en la membrana ciliar y generase respuestas intracelulares como la fosforilación de ERK 1/2. Otro de los resultados observados en este experimento es que parece que el aumento de la fosforilación de ERK 1/2 es mayor cuando estimulamos con PTH que con PTHrP, al tiempo estudiado (10 min), lo que indicaría que ambos agonistas activan a PTH1R de forma diferente y que es probable que en dicho mecanismo de activación medie la Cx43. No obstante, serían necesarios más experimentos para confirmar que dicha estimulación es capaz de generar una modificación en la fosforilación de ERK y por tanto una respuesta biológica en la célula.

Otras de las características analizadas en estas células fueron su morfología, capacidad de adhesión y muerte celular. Se observó que las células Cx43+/+ SCR presentaban una forma más alargada y un mayor número de prolongaciones dendríticas lo que aumentaba su capacidad de adhesión. Por el contrario, las células Cx43+/+ ARNi $\alpha$ 2 y Cx43-/- presentan una morfología más redondeada y una menor capacidad de adhesión en comparación con las células Cx43+/+ SCR. También se observó que las células Cx43-/- presentan una mayor mortalidad respecto a los otros dos tipos celulares. En función de estos resultados se sugiere que la ausencia de Cx43 e integrina  $\alpha$ 2 impiden la correcta adhesión de las células a la placa colagenizada lo que comprometería a su vez el desarrollo de prolongaciones dendríticas (19). La reducción en el número de prolongaciones dendríticas provocaría que la comunicación entre células se vea alterada, y como dicha comunicación es imprescindible para la supervivencia celular podría ser una de las razones por las que se observa una mayor mortalidad en las células Cx43-/-. Los resultados obtenidos concuerdan con investigaciones anteriores en las que se demuestra que las conexinas y las integrinas son proteínas que intervienen en la adhesión celular (20). Además, también se ha determinado que la Cx43 regula diferentes vías de señalización que desembocan en la expresión de genes pro-supervivencia (21) lo

que es congruente con los resultados observados. En el caso de las células Cx43+/+ ARNi  $\alpha$ 2 las alteraciones en la adhesividad celular podrían ocasionar efectos celulares menos acusados, ya que no se observaron alteraciones en la supervivencia celular en estas condiciones. No obstante, la disminución en la adhesividad podría explicar la tendencia de estas células a proliferar menos que las Cx43+/+ SCR.

## CONCLUSIÓN

Nuestro estudio indica que la deficiencia en Cx43 modifica el patrón de expresión de integrinas en los osteocitos MLO-Y4, inhibiendo la expresión de la integrina  $\alpha$ 2 y aumentando la de integrinas  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3, lo que parece modificar su capacidad de adhesión. Además, la ausencia de la integrina  $\alpha$ 2 y de la Cx43 altera la longitud del cilio primario.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Scheuren A, Wehrle E, Flohr F. Bone mechanobiology in mice: toward single-cell in vivo mechanomics. *Biomech Model Mechanobiol* 2017;16(1):2017-34. DOI: 10.1007/s10237-017-0935-1
2. Claude J. Membrane channels formed by gap junction proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2018;1860(1):1-4. DOI: 10.1016/j.bbmem.2017.10.021
3. Rupp M. Osteocytes. *Z Orthop Unfall* 2019;157(02):154-63. DOI: 10.1055/a-0658-5922
4. Geoghegan IP, Hoey DA, McNamara LM. Integrins in Osteocyte Biology and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep* 2019;17(4):195-206. DOI: 10.1007/s11914-019-00520-2
5. Plotkin LI, Davis HM, Cisterna BA, Sáez JC. Connexins and Pan-nexins in Bone and Skeletal Muscle. *Curr Osteoporos Rep* 2017;15(4):326-34. DOI: 10.1007/s11914-017-0374-z
6. Esbrit P, Alcaraz MJ. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol* 2013;85(1):1417-23. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.03.002
7. Ardura JA, Portal-Núñez S, Alonso V, Bravo B, Gortázar AR. Handling parathormone receptor type 1 in skeletal diseases: Realities and expectations of abaloparatide. *Endocrinol Metab* 2019;30(10):756-66. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.014
8. Hoey DA, Downs ME, Jacobs CR. The mechanics of the primary cilium: an intricate structure with complex function. *J Biomech* 2012;45(1):17-26. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2011.08.008
9. Mirvis M, Stearns T, James W. Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *J Biochem* 2018;475(14):2329-53. DOI: 10.1042/BCJ20170453
10. Pala R, Alomari N, Nauli SM. Primary Cilium-Dependent Signaling Mechanisms. *Int J Mol Sci* 2017;18(11):2272-345. DOI: 10.3390/ijms18112272
11. 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. *PNAS* 2012;109(9):3359-64. DOI: 10.1073/pnas.1115967109
12. Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289(3):633-43. DOI: 10.1152/ajpcell.00278.2004
  13. 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. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.12.2014
  14. Plotkin LI, Speacht TL, Donahue HJ. Cx43 and mechanotransduction in bone. *Curr Osteoporos Rep* 2015;13(2):67-72. DOI: 10.1007/s11914-015-0255-2
  15. Martín-Guerrero E, Tirado-Cabrera I, Buendía I, Alonso V, Gortázar AR, Arduara 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. DOI: 10.1002/jcp.29636
  16. Zhang J, Chandrasekaran G, Li W, Kim DY, Jeong IY, Lee SH, et al. Wnt-PLC-IP3-Connexin-Ca<sup>2+</sup> axis maintains ependymal motile cilia in zebrafish spinal cord. *Nat Commun* 2020;11(1):1860. DOI: 10.1038/s41467-020-15248-2
  17. Cresswell EN, Nguyen TM, Horsfield MW, Alepuz AJ, Metzger TA, Niebur GL, et al. Mechanically induced bone formation is not sensitive to local osteocyte density in rat vertebral cancellous bone. *J Orthop Res* 2018;36(2):672-81. DOI: 10.1002/jor.23606
  18. Tirado-Cabrera I, Martín-Guerrero E, Heredero-Jimenez S, Arduara JA, Gortázar AR. PTH1R translocation to primary cilia in mechanically-stimulated osteocytes prevents osteoclast formation via regulation of CXCL5 and IL-6 secretion. *J Cell Physiol* 2022;237(10):3927-43. DOI: 10.1002/jcp.30849
  19. Rolvien T, Amling M. Disuse Osteoporosis: Clinical and Mechanistic Insights. *Calcif Tissue Int* 2022;110(5):592-604. DOI: 10.1007/s00223-021-00836-1
  20. Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Expression of Functional Gap Junctions and Regulation by Fluid Flow in Osteocyte-Like MLO-Y4 Cells. *J Bone Miner Res* 2001;16(2):249-59. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.2.249
  21. 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. DOI: 10.1074/jbc.M112.437921

## Original

# El secretoma de los osteocitos estimulados mecánicamente modula la función de las células mesenquimales

Álvaro Tablado Molinera, Irene Gutiérrez Rojas, Luis Álvarez Carrión, Irene Tirado Cabrera, Sara Heredero-Jiménez, Arancha R. Gortázar, Juan Antonio Ardura

Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU. Madrid. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. CEU Universities. Madrid

## Resumen

El esqueleto es un órgano metabólicamente activo que se remodela continuamente a la largo de nuestra vida. Esta remodelación implica un equilibrio entre la formación de hueso llevada a cabo por los osteoblastos y la resorción por los osteoclastos. Los osteocitos son los encargados de regular estos dos procesos y su estimulación mecánica, es esencial para mantener el buen funcionamiento óseo y prevenir enfermedades como la osteoporosis. La estimulación de los osteocitos provoca una alteración en la producción y secreción de moléculas de señalización que regulan la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos. Las células madre mesenquimales han sido propuestas como posible terapia celular para la regeneración de distintos tejidos, incluido el tejido óseo. Hipotetizamos en el presente estudio que el secretoma de células osteocíticas de ratón estimuladas mecánicamente afecta a la capacidad proliferativa, adhesiva y a la expresión génica de células mesenquimales indiferenciadas y células mesenquimales preosteoblásticas. Para ello, se analizaron los procesos biológicos mencionados en líneas continuas celulares preosteoblásticas y células mesenquimales de ratón en presencia del medio condicionado por células osteocíticas MLO-Y4, después de ser sometidas a estímulo mecánico por flujo de fluido. Se observó que la proliferación aumentó en ambas líneas celulares en presencia del secretoma de osteocitos estimulados mecánicamente frente al control, mientras que osteocitos no mecanoestimulados provocaban su disminución. También se observó un aumento en la capacidad adhesiva de células C3H/10T1/2 tras la estimulación con el secretoma de osteocitos mecanoestimulados. En cuanto a la expresión de genes, solo el factor adipogénico PPAR $\gamma$  sufrió alteraciones en células MC3T3-E1 por el secretoma de osteocitos. Estos estudios indican que los osteocitos pueden modificar el comportamiento biológico de células mesenquimales mediante la secreción de factores solubles.

**Palabras clave:**  
Estímulo mecánico.  
Osteocitos. Células mesenquimales.  
Mecanotransducción.

Recibido: 22/07/2022 • Aceptado: 27/02/2023

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos: agradecemos el apoyo de la Sociedad Española de Metabolismo Mineral y Óseo (SEIOMM) y de la Fundación Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (FEIOMM) que ha permitido la elaboración del presente manuscrito.

Tablado Molinera A, Gutiérrez Rojas I, Álvarez Carrión L, Tirado Cabrera I, Heredero-Jiménez S, Gortázar AR, Ardura JA. El secretoma de los osteocitos estimulados mecánicamente modula la función de las células mesenquimales. Rev Osteoporos Metab Miner 2023;15(1):21-28

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00007

## Correspondencia:

Juan Antonio Ardura. Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. CEU Universities. C/ Julián Romea, 23. 28003 Madrid  
e-mail: juanantonio.ardurarodriguez@ceu.es

## INTRODUCCIÓN

El esqueleto es un órgano metabólicamente activo que se remodela continuamente a lo largo de nuestra vida. El proceso de remodelado óseo, en el que se acoplan resorción y formación de matriz de hueso, sirve para ajustar la arquitectura ósea a las necesidades mecánicas del hueso. Además, ayuda a reparar daños en la matriz ósea y evitar la acumulación de hueso envejecido que puede haber perdido sus propiedades mecánicas (1).

Muchos son los factores que modulan la formación y el mantenimiento de nuestro esqueleto. Entre estos, la carga mecánica representa el principal factor extrínseco con efectos directos sobre el tejido óseo (2). La carga sobre nuestros huesos se traduce en tensiones mecánicas que son recibidas por las células óseas y transformadas en señales biológicas, lo que se conoce como mecanotransducción (2).

Osteoblastos y osteoclastos son las células que llevan a cabo la formación y la resorción ósea, respectivamente (3). Los osteocitos, las células más abundantes del tejido óseo, son los principales receptores de la estimulación mecánica y son capaces de comunicarse con osteoblastos y osteoclastos modulando su actividad (4).

Las células óseas se encuentran en íntimo contacto con las células presentes en la médula ósea. En ella encontramos una población celular muy heterogénea donde conviven células hematopoyéticas que darán lugar a las diferentes poblaciones sanguíneas, con células no hematopoyéticas del microambiente de la médula, como células perivasculares y mesenquimales (MSC) entre otras (5).

Las MSC presentes en la médula constituyen la fuente de células osteoprogenitoras que hacen posible la reparación de fracturas y la formación de nuevo hueso (5).

La diferenciación de las células madre mesenquimales es un proceso que conforma 2 etapas; compromiso a un linaje celular (de las MSC a un progenitor de linaje específico) y maduración (de los progenitores a un tipo celular específico). Un gran número de vías de señalización se encuentran implicadas en la regulación del compromiso de linaje de las MSC, entre las que se incluyen la familia TGF- $\beta$ , BMP (proteínas morfogénicas de hueso), Wnt, hedgehogs (Hh), Notch y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (6,7).

En el presente trabajo estudiamos la comunicación entre los osteocitos y las células mesenquimales, y cómo la estimulación mecánica modifica la proliferación, adhesión y la expresión génica de las células mesenquimales a través de los osteocitos.

Hipotetizamos que el secretoma de osteocitos estimulados mecánicamente induce procesos biológicos relacionados con la potenciación de las capacidades de

regeneración ósea de células mesenquimales, para lo que se ha estudiado el efecto del medio condicionado por osteocitos MLO-Y4 estimulados mecánicamente (por flujo de fluido) o no (control estático) sobre distintos procesos biológicos de células mesenquimales C3H/10T1/2 y preosteoblásticas MC3T3-E1.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CULTIVOS CELULARES

Para los ensayos del presente trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: células mesenquimales de ratón no comprometidas a linaje osteoblástico (C3H/10T1/2 subclón 8, ATTC, CCL-226). Estas células se cultivaron con medio BME ("basal eagle medium", Thermofisher, 21010046) + 10 % suero fetal bovino (FBS) (Thermofisher, 10500064) + 1 % L-glutamina (Thermofisher, 25030024) + 1 % penicilina/estreptomina (Thermofisher, 15140122) a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Células mesenquimales preosteoblásticas de ratón (MC3T3-E1 subclón 4, ATTC, CRL-2593). Estas células fueron cultivadas con medio MEM alfa ("minimum essential medium", Thermofisher, A1049001) + 10 % FBS + 1 % L-glutamina y 1 % de estreptomina/penicilina a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Células osteocíticas murinas MLO-Y4 (Kerafast, EK002). Estas células se cultivaron con medio MEM alfa sin ácido ascórbico (Thermofisher, 22571038) + 2,5 % FBS + 2,5 % de suero de ternero ("calf serum" [CS], Thermofisher, 16010159) y 1 % de estreptomina/penicilina a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### ESTIMULACIÓN MECÁNICA POR FLUJO DE FLUIDO ("FLUID FLOW")

Se sembraron 250 000 células MLO-Y4 en portaobjetos de cristal delimitados con teflón, en un área de 15 cm<sup>2</sup> previamente recubierto con matriz de colágeno (Sigma Aldrich, 000010C8919). Después de 48 horas, las células fueron sometidas a un estímulo mecánico (FF) mediante el dispositivo FlexcellStreamer de tensión de corte medio que produce una tensión de 10 dinas/cm<sup>2</sup> durante 10 minutos (Flexcell International Corporation, Hillsborough, Carolina del Norte, EE. UU.). Como control (control estático o SC), se usaron células MLO-Y4 sembradas en portaobjetos de cristal delimitados con teflón sin ser sometidas a ningún estímulo mecánico. A continuación, las células se incubaron, durante 18 horas, con medio MEM alfa sin rojo fenol (Gibco) suplementado con 0,5 % de CS, 0,5 % de FBS y 1 % de penicilina-estreptomina para obtener medios condicionados (CM) de los diferentes grupos experimentales: células mecanoestimuladas (FF) y células control.



## ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Para realizar los ensayos de proliferación, ambas líneas celulares MC3T3-E1 y C3H/10T1/2 fueron sembradas a una densidad de 20.000 células/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos (VWR,734-2325). Al día siguiente se cambió el medio por un medio con 250 µl de medio condicionado (control estático o *fluid flow*) y 750 µl de su medio de cultivo correspondiente. Como control se usaron células MC3T3-E1 y C3H/10T1/2 incubadas con 250 µL de MEM alfa sin rojo fenol (Gibco) suplementado con 0,5 % de CS, 0,5 % de FBS y 1 % de penicilina-estreptomicina y 750 µl de su medio de cultivo correspondiente. Pasadas las 24 h de incubación las células se despegaron con Tripsina-EDTA (Thermofisher, 25300062) y se hizo un recuento celular con azul de Tripán (Thermofisher, 15250061) en cámara de Neubauer. Se repitió el mismo proceso a las 48, 72 y 96 horas obteniéndose así una valoración de la proliferación.

## ADHESIÓN CELULAR

La adhesión de las células preosteoblásticas MC3T3-E1 y células mesenquimales C3H/10T1/2 se evaluó mediante la cuantificación de células marcadas con el tinte vital fluorescente *cytopainter* (Abcam, ab176735). Para ello, se sembraron células MC3T3-E1 o C3H/10T1/2 en placas P6 durante 24 horas. Al día siguiente se cambió el medio por un medio con 250 µl de medio condicionado (control estático o *fluid flow*) y 750 µl de su medio de cultivo correspondiente. Como control del experimento se usaron células MC3T3-E1 y C3H/10T1/2 incubadas con 250 µL de MEM alfa sin rojo fenol (Gibco) suplementado con 0,5 % de CS, 0,5 % de FBS y 1 % de penicilina-estreptomicina y 750 µl de su medio de cultivo correspondiente. Finalizadas las 24 horas, se incubaron con *cytopainter* durante 30 minutos y, tras la incubación, se levantaron las células, se contaron y sembraron 20 000 células/cm<sup>2</sup> sobre un nuevo pocillo de P6 durante 30 minutos. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se contaron las células no adheridas en una cámara de Neubauer mediante el método por exclusión con azul tripán. Por otro lado, se obtuvieron imágenes de las células adheridas a la superficie de los pocillos mediante microscopio PAULA ("Personal automated lab assistant, Leica microsystems"). El número de células marcadas con fluorescencia se contó en 3 campos diferentes y aleatorios.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT-PCR)

Se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos 300 000 células por pocillo en el caso de las células preosteoblásticas MC3T3-E1 y 450 000 en el de las células mesenquimales C3H/10T1/2. Pasadas 24 horas de incubación, se lavaron las células con PBS y se sustituyó el PBS por 250 µl de

MEM alfa en los controles y 250 µl del medio condicionado correspondiente en los otros pocillos. Además, a cada pocillo se añadieron 750 µl de su medio correspondiente. Tras 24 horas de incubación se retiró el medio de cultivo, se recogieron cada uno de los pocillos en tubos de 1,5 ml mediante trizol y se almacenaron a -80 °C.

Al día siguiente se descongelaron las muestras, se mantuvieron en hielo para mantener una baja temperatura y se procedió a seguir el protocolo de extracción de ARN. La transcripción reversa para la obtención de cDNA se realizó mediante el uso de el *kit* de transcripción reversa de cDNA ("High capacity RNA to cDNA Kit", Thermofisher, 4387406) siguiendo las instrucciones. Tras la obtención del cDNA se realizó una PCR en una placa P384 mediante el uso de "Sybergreen" (TB Green, Condalab RR420A) para estudiar los siguientes genes: RUNX2, fosfatasa alcalina (ALP), PPARγ y osteocalcina. Además se usó la beta actina (actina citoesquelética) como gen de expresión constitutiva. Para ello, se utilizó un termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se encuentran expresados como medias ± error estándar. Se analizó la distribución de los datos y dado que no se ajustaban a una distribución normal, las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron mediante análisis de la varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis). La determinación de las posibles diferencias entre los grupos experimentales se realizó mediante los test de Dunn o de Mann-Whitney. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism. Se consideró  $p < 0,05$  como valor estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### EFFECTOS DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE LOS OSTEOCITOS ESTIMULADOS O NO MECÁNICAMENTE SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES Y PREOSTEOBLASTOS

Se realizó un estudio de proliferación de células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 y de células mesenquimales (C3H/10T1/2) con 25 % de medios condicionados de células osteocíticas de ratón MLO-Y4 mecánicamente estimuladas (FF) o no (SC) (Fig. 1).

Observamos que en ambas líneas celulares el secretoma de los osteocitos muestra efectos significativos en la proliferación. Mientras que el secretoma de los osteocitos estimulado mecánicamente (FF) promueve

una mayor proliferación, el secretoma de osteocitos no estimulados (SC) induce una menor proliferación frente al control (Figs. 1 A y C). No se observaron diferencias en la viabilidad celular en ninguna de las tres condiciones experimentales durante los 4 días analizados (Figs. 1 B y D).

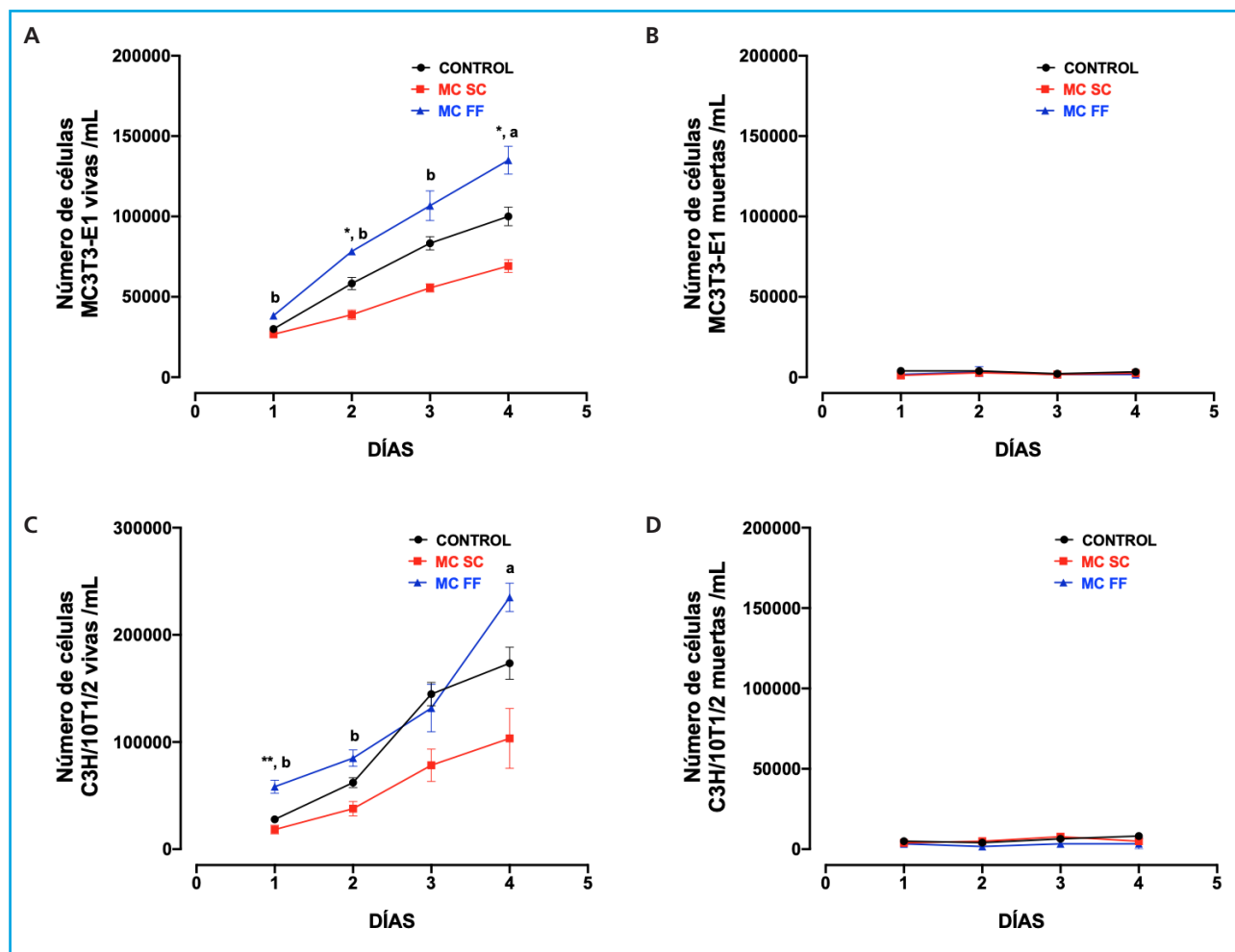
### EFFECTOS DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE LOS OSTEOCITOS ESTIMULADOS O NO MECÁNICAMENTE SOBRE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES Y PREOSTEOBLASTOS

A continuación, se realizó un estudio de adhesión de células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 y de cé-

lulas mesenquimales (C3H/10T1/2) en presencia de secretoma de células osteocíticas de ratón MLO-Y4 tras estimulación (FF) o ausencia (SC) de estímulo mecánico por paso de fluido.

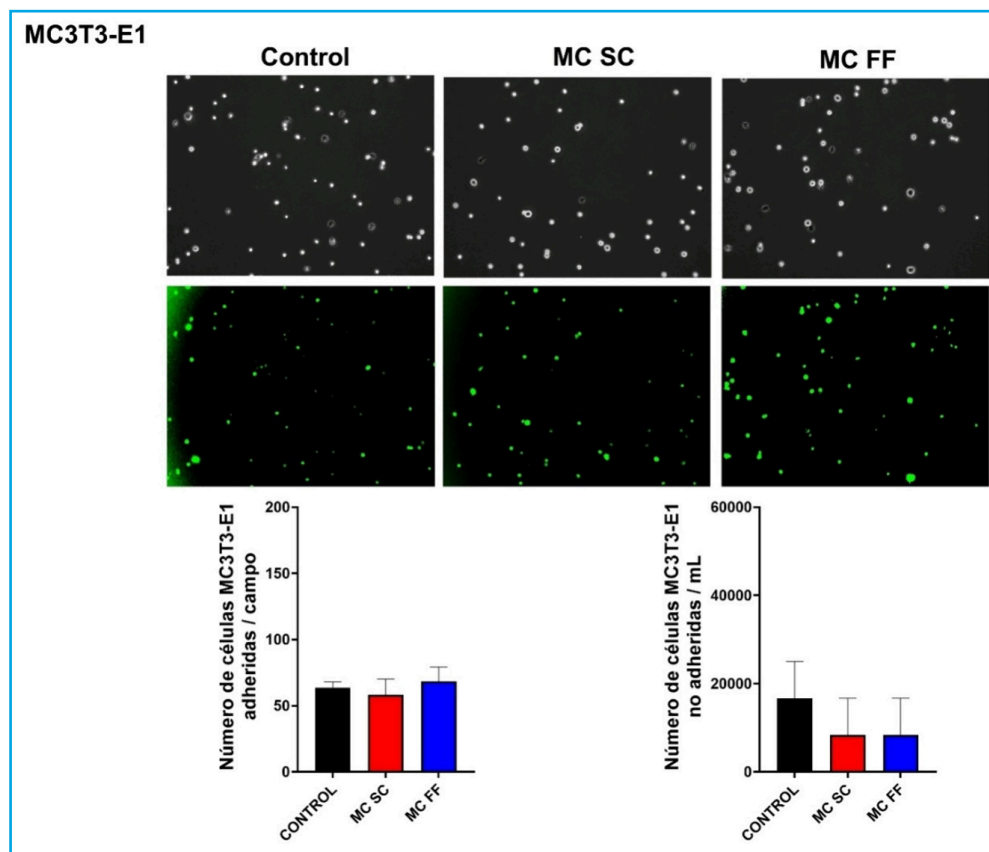
No se apreciaron diferencias significativas en la adhesión de células MC3T3-E1 en las distintas condiciones experimentales (Fig. 2). En cuanto a la cantidad de células no adheridas, observamos que estimulación con medio condicionado (FF y SC) apenas disminuyó la adhesión con respecto al control (Fig. 2).

Sin embargo, sí se observó una diferencia clara entre las diferentes condiciones experimentales en la adhesión de células C3H/10T1/2. El medio condicionado por los osteocitos estimulados mecánicamente aumentó la adhesión de esta línea celular (Fig. 3).

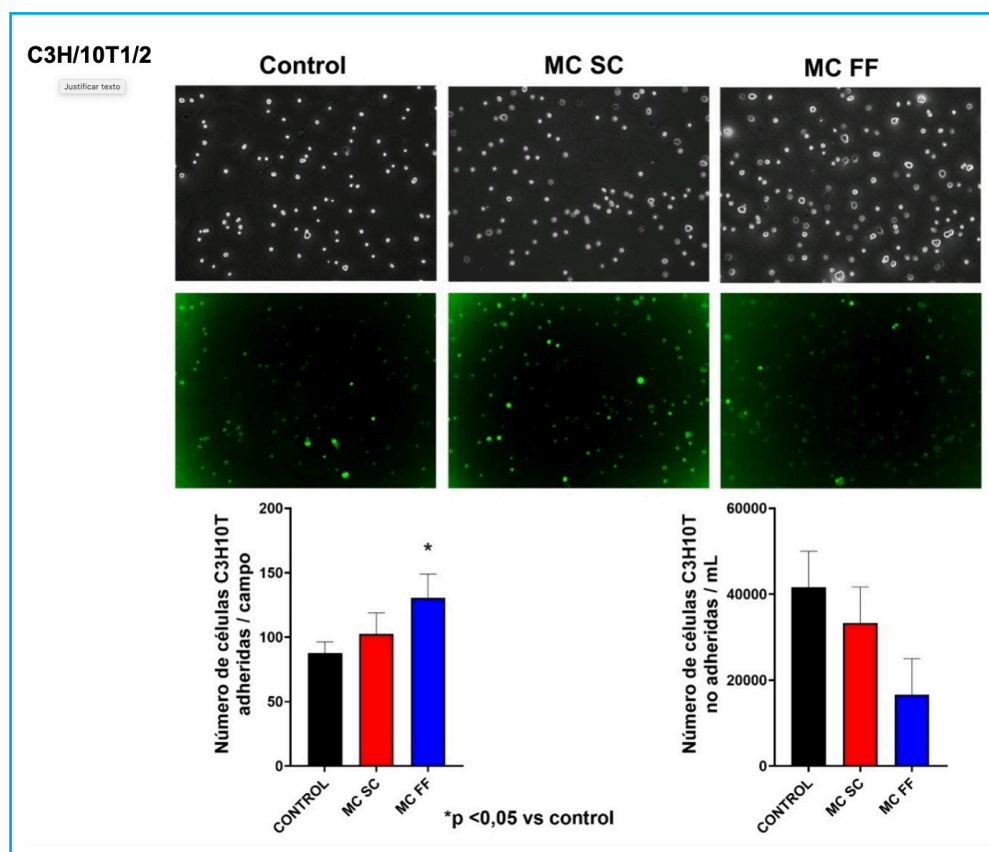


**Figura 1.** Proliferación y muerte celular de células preosteoblásticas MC3T3-E1 (A y B, respectivamente) y células mesenquimales embrionarias C3H/10T1/2 (C y D, respectivamente) en presencia o ausencia de medios condicionados de osteocitos MLO-Y4 tras estímulo mecánico (flujo de fluido: MC FF) o no (control estático: MC SC). Los controles representan células sin estímulo de medios condicionados de osteocitos. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. \* $p < 0,05$  vs. control; \*\* $p < 0,01$  vs. control;  $^{\circ}p < 0,05$  vs. MC SC;  $^{\flat}p < 0,01$  vs. MC SC.





**Figura 2.** Adhesión de células preosteoblásticas MC3T3-E1 en presencia o ausencia de medios condicionados de osteocitos MLO-Y4 tras estímulo mecánico (flujo de fluido: MC FF) o no (control estático: MC SC). Los controles representan células sin estímulo de medios condicionados de osteocitos. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. Se muestran imágenes representativas en obtenidas por microscopía de campo claro (panel superior) o por microscopía de epifluorescencia (panel inferior). Los resultados se expresan como número de células adheridas/campo (inferior izquierda) y como células no adheridas/mL (inferior derecha). Los valores son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.



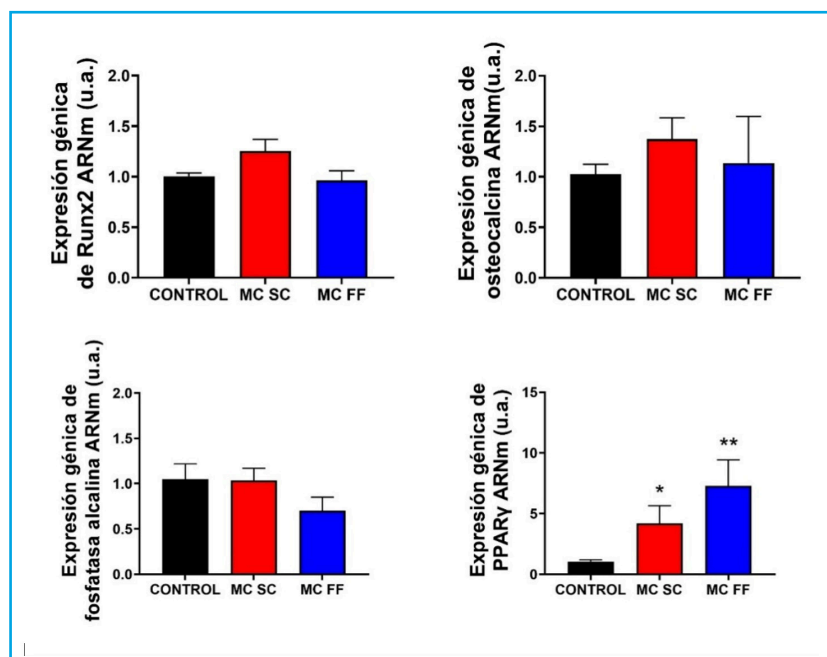
**Figura 3.** Adhesión de células mesenquimales embrionarias C3H/10T1/2 en presencia o ausencia de medios condicionados de osteocitos MLO-Y4 tras estímulo mecánico (flujo de fluido: MC FF) o no (control estático: MC SC). Los controles representan células sin estímulo de medios condicionados de osteocitos. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. Se muestran imágenes representativas en obtenidas por microscopía de campo claro (panel superior) o por microscopía de epifluorescencia (panel inferior). Los resultados se expresan como número de células adheridas/campo (inferior izquierda) y como células no adheridas/mL (inferior derecha). Los valores son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. \* $p < 0,05$  vs. control.

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS MESENQUIMALES Y PREOSTEOBLÁSTICAS TRATADAS CON MEDIOS CONDICIONADOS DE OSTEOCITOS ESTIMULADOS O NO MECÁNICAMENTE

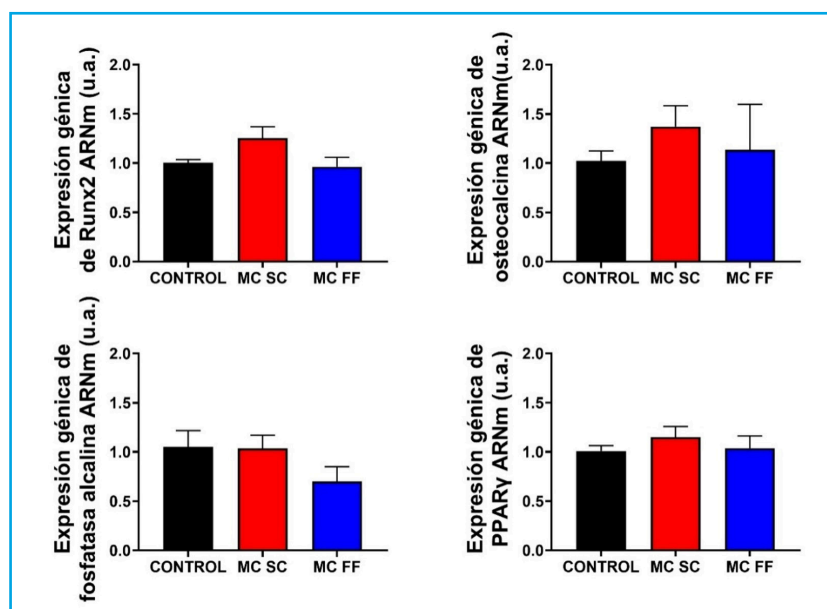
Se realizó un estudio de marcadores de diferenciación y formación ósea (Runx2, osteocalcina y fosfatasa alcalina) y de diferenciación adipogénica (PPAR $\gamma$ ) en células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 y de células mesenquimales (C3H/10T1/2) estimulados con 25 % de medios condicionados de células osteocíticas de ratón

MLO-Y4 en presencia (FF) y ausencia (SC) de estímulo mecánico por paso de fluido. Como podemos observar en las figuras 4 y 5, no se observaron cambios significativos sobre la expresión de Runx2, osteocalcina, ni fosfatasa alcalina en ninguna de las dos líneas estudiadas.

Sin embargo, la expresión de PPAR $\gamma$  aumentó tras la estimulación con medios condicionados de osteocitos SC y FF en las células preosteoblásticas MC3T3-E1 (Fig. 4), mientras que en las células C3H/10T1/2, los niveles de expresión de PPAR $\gamma$ , permanecieron prácticamente inalterados en todas las condiciones experimentales (Fig. 5).



**Figura 4.** Análisis de expresión génica de marcadores de diferenciación y formación ósea (Runx2, osteocalcina y fosfatasa alcalina) y de diferenciación adipogénica (PPAR $\gamma$ ) en células preosteoblásticas MC3T3-E1 en presencia o ausencia de medios condicionados de osteocitos MLO-Y4 tras estímulo mecánico (flujo de fluido: MC FF) o no (control estático: MC SC). Los controles representan células sin estímulo de medios condicionados de osteocitos. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. \* $p < 0,05$  vs. control; \*\* $p < 0,01$  vs. control.



**Figura 5.** Análisis de expresión génica de marcadores de diferenciación y formación ósea (Runx2, osteocalcina y fosfatasa alcalina) y de diferenciación adipogénica (PPAR $\gamma$ ) en células preosteoblásticas C3H/10T1/2 en presencia o ausencia de medios condicionados de osteocitos MLO-Y4 tras estímulo mecánico (flujo de fluido: MC FF) o no (control estático: MC SC). Los controles representan células sin estímulo de medios condicionados de osteocitos. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.

## DISCUSIÓN

El envejecimiento y ciertas enfermedades óseas como la osteoporosis provocan la alteración del remodelado óseo y con ello la pérdida de masa ósea. Esto se debe a la acumulación de osteocitos apoptóticos y al reclutamiento de precursores osteoclasticos que fomentan el proceso de resorción ósea. Esta situación puede ser evitada mediante el estímulo mecánico, que ya se aplica de manera natural a los osteocitos cuando hacemos ejercicio (8).

Estudios anteriores ya evidenciaron que el medio condicionado de los osteocitos estimulados mecánicamente es capaz de reclutar osteoprogenitores (células mesenquimales y osteoblastos) y promover el compromiso del linaje osteogénico de estas células para reponer los osteoblastos agotados, mejorar la formación ósea y fortalecer el tejido (9). Además, la estimulación mecánica tiene un papel fundamental a la hora de modular ciertos procesos celulares. En nuestros resultados, encontramos que la exposición de las células preosteoblásticas MC3T3-E1 y de las mesenquimales C3H/10T1/2 a medios condicionados que contienen secretoma de células osteocíticas MLO-Y4 estimuladas mecánicamente afecta a su proliferación y adhesión, así como a la expresión génica de uno de ellos marcadores estudiados. Algunas discrepancias en los resultados obtenidos entre las dos líneas celulares utilizadas en el presente trabajo pueden ser debidas a la distinta naturaleza de cada tipo celular. La línea celular preosteoblástica MC3T3-E1 se encuentra en un mayor grado de diferenciación y compromiso hacia un fenotipo osteoblástico comparado con las C3H/10T1/2. Estas últimas al ser de origen embrionario, se encuentran más indiferenciadas y posiblemente por ello y por su carácter de célula madre embrionaria, puedan presentar mayor proliferación respecto a líneas más diferenciadas, como las MC3T3-E1 (10).

En cuanto a las diferencias de las células control respecto a las expuestas a medios condicionados, los resultados podrían indicar que los osteocitos estimulados mecánicamente *in vivo* mantienen los niveles de masa ósea al inducir, mediante la secreción de moléculas, la proliferación de células mesenquimales que posteriormente se pueden diferenciar a osteoblastos que formarán la matriz ósea. Sin embargo, los osteocitos no estimulados mecánicamente presentan un secretoma modificado que probablemente implica la disminución de secreción de factores proliferantes que actúan sobre las mesenquimales, o el aumento de la secreción de factores inhibidores de la proliferación. En cualquiera de las dos situaciones, el resultado conllevaría una menor proliferación de células mesenquimales y posiblemente una menor diferenciación osteoblástica para generar matriz ósea.

Las células mesenquimales C3H/10T1/2 al ser células menos diferenciadas podría pensarse que presenten una menor expresión de proteínas que suelen estar presentes en células más especializadas. Por tanto,

sería posible que, al no haberse comprometido a un fenotipo celular concreto, puedan ser modificadas más fácilmente por el secretoma de los osteocitos mecanoestimulados comparadas con células más diferenciadas como las MC3T3-E1 que se encuentran ya comprometidas a la expresión de proteínas de linaje osteoblástico. Sin embargo, los efectos de expresión génica más significativos observados en este trabajo tras estimulación con secretoma de osteocitos, corresponden a un aumento de expresión de PPAR $\gamma$  en células MC3T3-E1. Este cambio se podría asociar a un aumento de la adipogénesis asociado al envejecimiento, pérdida de masa ósea y retraso en la regeneración (11), proceso contrario a la osteoblastogénesis (12) y al resto de resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, algunos trabajos indican que, en algunas fases de la diferenciación a osteoblastos, la expresión de PPAR $\gamma$  puede tener un papel importante (13,14). Por ello, será necesario realizar más experimentos que puedan comprobar de manera más directa el potencial adipogénico y osteogénico del secretoma de osteocitos sobre los distintos tipos de células mesenquimales usados en este trabajo.

Respecto a la adhesión celular, para que se produzca un aumento en la adhesión suele ser necesario un incremento en la expresión de proteínas de unión a matriz, como las integrinas (15). Es posible que, gracias a la sobreexpresión de estas proteínas de unión a matriz, las células mesenquimales se adhieran con mayor facilidad tras ser estimuladas con el secretoma de osteocitos mecanoestimulados. La capacidad adhesiva de las células mesenquimales es un requisito necesario para que se produzca la terapia de regeneración (16) dado que, al ser células dependientes de unión a sustrato, necesitan primero unirse a las zonas dañadas para poder comenzar procesos de proliferación o diferenciación.

Por tanto, en base a nuestros resultados se puede asumir que ciertos factores del secretoma de osteocitos favorecen la adhesión de las células mesenquimales, y puede que indirectamente de este modo potencien los procesos de regeneración a partir de estas células.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:385-96. DOI: 10.1196/annals.1365.035
2. Stewart S, Darwood A, Masouros S, Higgins C, Ramasamy A. Mechanotransduction in osteogenesis. *Bone Joint Res* 2020;9(1):1-14. DOI: 10.1302/2046-3758.91.BJR-2019-0043.R2
3. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)* 2016;31(3):233-45. DOI: 10.1152/physiol.00061.2014
4. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 2014;94(1):5-24. DOI: 10.1007/s00223-013-9790-y

5. Pierce JL, Begun DL, Westendorf JJ, McGee-Lawrence ME. Defining osteoblast and adipocyte lineages in the bone marrow. *Bone* 2019;118:2-7. DOI: 10.1016/j.bone.2018.05.019
6. Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2011;112(12):3491-501. DOI: 10.1002/jcb.23287
7. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016;4:16009. DOI: 10.1038/boneres.2016.9
8. Cadenas Martín M, Tirado I, Martín E, Ardura J, Bravo B, Gortazar AR. Efectos de la estimulación mecánica en la comunicación entre células óseas. *Rev Osteopor Metab Miner* 2019;11(1):12-8. DOI: 10.4321/S1889-836X2019000100003
9. Brady RT, O'Brien FJ, Hoey DA. Mechanically stimulated bone cells secrete paracrine factors that regulate osteoprogenitor recruitment, proliferation, and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;459(1):118-23. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.080
10. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* 2011;20(1),5-14. DOI: 10.3727/096368910X
11. Kawai M, Sousa K, MacDougald O, Rosen C. The many facets of PPAR $\gamma$ : novel insights for the skeleton. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299(1):E3-E9. DOI: 10.1152/ajpendo.00157.2010
12. Lee S, Choi E, Cha MJ, Hwang KC. Cell Adhesion and Long-Term Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cells: A Prerequisite for Cell Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:632902. DOI: 10.1155/2015/632902
13. Jackson SM, Demer LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 preosteoblasts. *FEBS Lett* 2000;471(1):119-24. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)01372-7
14. Yasuda E, Tokuda H, Ishisaki A, Hirade K, Kanno Y, Hanai Y, et al. PPAR-gamma ligands up-regulate basic fibroblast growth factor-induced VEGF release through amplifying SAPK/JNK activation in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(1):137-43. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.12.163
15. Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol* 2019;21(2):122-32. DOI: 10.1038/s41556-018-0223-z
16. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* 2007;25(11):2739-49. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0197

## Revisión

# Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS

Núria Martínez-Gil, Juan David Patiño-Salazar, Raquel Rabionet, Daniel Grinberg, Susanna Balcells

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona. CIBERER, IBUB, IRSJD. Barcelona

### Resumen

En los últimos años se han dedicado muchos esfuerzos a la determinación de variantes y genes que pueden ser importantes en la determinación de la densidad mineral ósea (DMO) y, a su vez, en diversas patologías óseas. Para conseguir esto, la aproximación que ha presentado mayores éxitos ha sido la de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS). En particular, en la investigación sobre la biología ósea, se han publicado más de 50 grandes GWAS o metaanálisis de GWAS identificando más de 500 *loci* genéticos asociados con diferentes parámetros óseos como son la DMO, la resistencia ósea y el riesgo de fractura. Si bien el descubrimiento de las variantes asociadas es un aspecto esencial, es igualmente importante la validación funcional de dichas variantes para dilucidar su efecto y la relación causal que tienen con la enfermedad genética. Al tratarse de un aspecto mucho más lento y tedioso, se ha convertido en el nuevo reto de esta era post-GWAS. Entre los genes que ya se han abordado se incluyen varios de la vía de *WNT* y en especial el gen *SOST*, que juega un papel muy importante tanto en la determinación de la DMO poblacional como en enfermedades monogénicas con elevada masa ósea y que ha dado lugar a un nuevo tratamiento contra la osteoporosis. En esta revisión recogemos los principales estudios GWAS con relación a fenotipos del hueso, así como algunos ejemplos de validaciones funcionales para analizar las asociaciones encontradas en los mismos.

#### Palabras clave:

Estudio de asociación de genoma completo. Validación funcional. Densidad mineral ósea. Patologías óseas.

Recibido: 20/07/2022 • Aceptado: 22/12/2022

Este artículo se somete en cumplimiento del compromiso que se adquirió al obtener la BECA FEIOMM de Investigación 2019 para realizar el proyecto Estudios funcionales de variantes de cambio de sentido del gen *CYP1A1* hallados en pacientes con fractura femoral atípica.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Martínez-Gil N, Patiño-Salazar JD, Rabionet R, Grinberg D, Balcells S. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) versus validación funcional: reto de la era post-GWAS. Rev Osteoporos Metab Miner 2023;15(1):29-39

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.000008

#### Correspondencia:

Susanna Balcells Comas. Departamento de Genética, Microbiología y Estadística. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona  
sbalcells@ub.edu



## ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO (GWAS)

En los últimos años los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han sido una herramienta esencial para la identificación de genes involucrados en enfermedades complejas (1). Estos estudios consisten en establecer una asociación entre la frecuencia génica o alélica de millones de marcadores tipo SNP (polimorfismos de un único nucleótido; del inglés *single nucleotide polymorphism*) distribuidos a lo largo del genoma y un fenotipo o enfermedad de estudio (2). Esta aproximación representa la herramienta más completa e imparcial para el estudio de enfermedades complejas. A diferencia de los estudios de asociación de genes candidatos, los estudios GWAS son una aproximación sin hipótesis previa, permitiendo el descubrimiento de nuevos genes o vías de señalización implicadas en el fenotipo de estudio que hasta el momento eran totalmente desconocidas (3). El establecimiento de los GWAS ha sido posible gracias a los nuevos avances en tecnología genómica de alto rendimiento, diseño de estudio, análisis estadísticos mejorados y la posibilidad de disponer de grandes biobancos (4,5). Debido al gran número de pruebas estadísticas simultáneas realizadas y, por lo tanto, a las correcciones estadísticas (que requieren un umbral del valor  $p$  de  $5 \times 10^{-8}$  para considerarse significativo a nivel de genoma completo y al pequeño efecto que presenta cada variante en las enfermedades complejas, son necesarias cohortes muy grandes. Esto se ha conseguido mediante los metaanálisis de GWAS, donde diferentes estudios se han unido con el objetivo de incrementar el tamaño muestral (6,7).

Aun con el evidente éxito, los estudios GWAS presentan 3 limitaciones cruciales. Primero, las variantes genéticas utilizadas para validar la asociación con el fenotipo concreto son SNP marcadores (en inglés, *tagSNPs*) que se distribuyen homogéneamente por todo el genoma con una frecuencia del alelo minoritario (MAF) mayor o igual al 5 % en la población. Por lo tanto, las variantes raras con posibles efectos fuertes en el fenotipo no están incluidas en estos estudios. Esta limitación se ha intentado solucionar incluyendo variantes de menor frecuencia en los *chips* de genotipado, secuenciando el exoma o genoma completo (*whole exome/genome sequencing*, WES/WGS) y/o utilizando los extremos fenotípicos de las cohortes. Segundo, el éxito de los estudios GWAS depende en gran manera del tamaño de la muestra. Por esta razón, como se ha comentado, la estrategia más común en la actualidad es establecer grandes consorcios que incluyen diferentes cohortes de todo el mundo. Así, se obtienen supercohortes con mayor poder estadístico, pero genéticamente heterogéneas, de manera que es muy difícil el descubrimiento de variantes específicas de población. Tercero, los GWAS reportan el SNP más relevante estadísticamente, llamado SNP centinela. Aunque este SNP puede ser el SNP causal de la asociación, también lo pueden ser otras variantes que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con la variante centinela. Si el SNP aso-

ciado se encuentra en una región codificante e implica un cambio de aminoácido, hay una alta probabilidad de que el SNP sea causal, pero la realidad es que la mayoría de los SNP centinela se encuentran en regiones no codificantes (96 %), tanto intrónicas (41 %), como intergénicas (54 %), dificultando por tanto la demostración de su papel causal. Debido a su naturaleza no-codificante, realizar estudios funcionales de estos SNP centinelas es un verdadero reto (8-10). Es por esta razón que estos estudios funcionales siguen siendo pocos hasta el momento, y establecer las bases funcionales de las asociaciones encontradas en dichos análisis es la asignatura pendiente de esta era post-GWAS.

Para realizar los estudios de funcionalidad, es necesaria una aproximación interdisciplinar, que va desde los análisis *in silico* (consistentes en aproximaciones computacionales) (11,12), como pueden ser las herramientas predictoras de patogenicidad; pasando por los estudios *in vitro*, que incluyen entre otros, los ensayos de gen reportero (p. ej. luciferasa) (13); hasta los estudios *in vivo* usando modelos animales como el pez cebra o el ratón (14,15).

En esta revisión se presenta de forma sumaria los principales trabajos GWAS que se han reportado utilizando fenotipos óseos y a continuación algunos ejemplos de estudios *in vitro* e *in vivo* que se han generado a raíz del primer gran metaanálisis de GWAS (16) que se realizó sobre densidad mineral ósea (DMO) y riesgo de fractura.

## GWAS Y HUESO

Para realizar GWAS de enfermedades óseas y principalmente de la osteoporosis, se pueden tener en cuenta parámetros como la DMO, la geometría y la microarquitectura del hueso. De estas propiedades, la más utilizada y la que mejor predice la fractura osteoporótica es la DMO, que es un rasgo cuantitativo que se mide en una escala continua por métodos como la absorciometría dual de rayos X (DXA por sus siglas en inglés). Se estima que la DMO es un rasgo con una heredabilidad aproximada de 50-80 %. Asimismo, la geometría del hueso muestra una heredabilidad de entre 30-70 %, y la microarquitectura ósea determinada por tomografía computarizada de alta resolución (HR-pQCT) una heredabilidad entre 20-80 % (17).

Hasta el momento, se han realizado más de 50 grandes estudios GWAS utilizando parámetros óseos, junto con una plétora de estudios de asociación en cohortes más pequeñas y homogéneas. Con esto, se han identificado más de 500 *loci* asociados. Aunque el porcentaje de varianza explicado a través de los GWAS ha incrementado sustancialmente en los últimos años al usar cohortes de mayor tamaño, todos estos *loci* solamente explican una pequeña proporción (20 %) de la contribución genética a la DMO (18,19). Esto ha llevado a que exista una diferencia entre la variabilidad explicada por factores

genéticos y la heredabilidad de la DMO, debido, posiblemente, a una sobreestimación de la heredabilidad o a que no se están considerando otros factores genéticos como son las variantes de número de copias (en inglés *copy number variants*, CNV) o la epigenética (20).

Con todo, estos estudios GWAS han dado lugar a hallazgos importantes, como la confirmación de las asociaciones de genes como *SOST* y *LRP5* (que ya habían estado implicados en enfermedades monogénicas esqueléticas) con algunos fenotipos óseos, o la identificación de nuevos genes de los que no se conocía su implicación en hueso (21). En la tabla I se presentan algunos de los estudios GWAS más relevantes relacionados con la DMO, la mayoría de los cuales están reportados en el *GWAS catalog* (<http://ebi.ac.uk/gwas>). Para acotar, solo se han considerado estudios de cohortes de más de 10 000 individuos.

Muchos de los estudios GWAS presentados en la tabla I corresponden a trabajos en los que se han realizado metaanálisis grandes que han dejado como resultado cientos de variantes en diferentes loci asociadas con fenotipos óseos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios carecen de aproximaciones funcionales.

## ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA ERA POST-GWAS

A pesar de la gran cantidad de estudios de asociación realizados hasta ahora, los estudios funcionales no han tenido el mismo desarrollo. De los 1051 artículos que han citado al primer gran metaanálisis de GWAS sobre hueso (16), solo una pequeña fracción incluye estudios funcionales (164, es decir, 15 %), ya sean *in vitro* o *in vivo*.

Un ejemplo de éxito en los estudios funcionales es la caracterización de la regulación de *SOST*. Este gen codifica la proteína esclerostina, un inhibidor de la vía canónica de *WNT* (49-51), que se ha encontrado asociado a multitud de parámetros óseos en diferentes estudios de asociación en distintas poblaciones (17,28,33,38,40,43,52,53) (Fig. 1A). Su función inhibidora sobre la formación ósea ha sido ampliamente estudiada mediante modelos *in vivo* e *in vitro*, y en la actualidad se utilizan anticuerpos antiesclerostina como terapia en enfermedades óseas, como son la osteoporosis o la osteogénesis imperfecta (54-59). Es por esto, que los factores reguladores de la expresión del gen se incluyen entre los nuevos candidatos como diana para el desarrollo de nuevas terapias. En humanos, variantes en el gen *SOST* han sido asociadas a condiciones caracterizadas por un exceso de formación ósea: esclerosteosis, displasia craneodifisaria, y el fenotipo de alta masa ósea (60) (Fig. 1B). Junto con estas, también se encuentra la enfermedad de van Buchem causada por la delección de la región reguladora denominada ECR5 situada a 52 kb cascada abajo del gen, que es neces-

ria para la correcta expresión de *SOST* (61) (Fig. 1A). En realidad, la transcripción de *SOST* está finamente regulada por un gran número de señales, tanto a través de la regulación directa sobre el promotor de *SOST* como a través de la región reguladora distal ECR5 (62,63), cuya interacción física se ha demostrado en un estudio reciente de nuestro grupo realizado en células óseas (64) (Fig. 1A). El factor de transcripción *MEF2C* es el regulador de *SOST* mejor descrito en relación con su expresión en osteocitos (63,65). La importancia de *MEF2C* en el efecto potenciador de ECR5 ha sido confirmada con el modelo de ratón KO (*knockout*) de *MeF2c* en osteoblastos/osteocitos, que presenta alta masa ósea y bajos niveles de esclerostina (66). Precisamente, *MEF2C* es otra de las señales más repetidas en los estudios GWAS con parámetros óseos (16,23,36,37,67-70). Junto con *MEF2C*, también se ha descrito *HDAC5*, un regulador negativo de la expresión de *SOST* que ejerce su función bloqueando la unión de *MEF2C* a ECR5 durante la diferenciación de los osteocitos inmaduros (Fig. 1C). En consonancia con esto, el modelo de ratón KO de *HDAC4/5* muestra una baja DMO y una alta expresión de *SOST* (71-73). De nuevo *HDAC4/5* se encuentra dentro de los loci más repetidos en los estudios de asociación con parámetros óseos (18,23,34,39,74) (Fig. 1B).

Otro ejemplo de la importancia de realizar estudios funcionales de las regiones asociadas es el locus de *DKK1*. *DKK1* es otro inhibidor de la vía canónica de *WNT*, con un papel muy importante en la morfogénesis de la cabeza (75,76), y en el desarrollo del hueso (77,78). En la actualidad no hay ninguna variante en *DKK1* descrita causante de ninguna patología ósea en la base de datos HGMD. A pesar de esto, nuestro grupo ha identificado dos variantes de cambio de aminoácido (*missense*) en pacientes con el fenotipo de DMO alta, que muestran una pérdida de función de su capacidad inhibitoria (13,79). De manera contraria, una de estas variantes también se ha encontrado en pacientes con fenotipos totalmente opuestos como la osteoporosis o malformaciones anales (80,81). Además, es interesante resaltar que no se han encontrado SNP en *DKK1* asociados con la DMO o con diferentes parámetros óseos entre los diferentes GWAS. En cambio, sí se ha demostrado asociación con la DMO de un conjunto de SNP agrupados en una región a 350 kb cascada abajo de *DKK1* y a 92 kb cascada arriba de *MBL2* (16,18,19,29,33,34,36,37,39,74) (Fig. 2). Para tratar de distinguir cuál de estos dos genes era el responsable de esta asociación, en un trabajo de nuestro grupo (13), se realizó un ensayo de conformación de la cromatina 4C utilizando la región rica en señales GWAS como anzuelo en tres tipos celulares óseos. Con esto se pudo confirmar la interacción física entre esta región y el promotor de *DKK1* y descartar la interacción con el gen *MBL2* (Fig. 2, panel inferior). Precisamente, en esta región se encuentra el gen *LNCAROD* que especifica un ARN largo no codificante (en inglés, *long noncoding RNA*, lncRNA) activador de *DKK1* que, por lo tanto, es el posible responsable de la asociación de los estudios GWAS (82).



Tabla I. Estudios GWAS sobre hueso y genes encontrados con variantes asociadas a fenotipos óseos

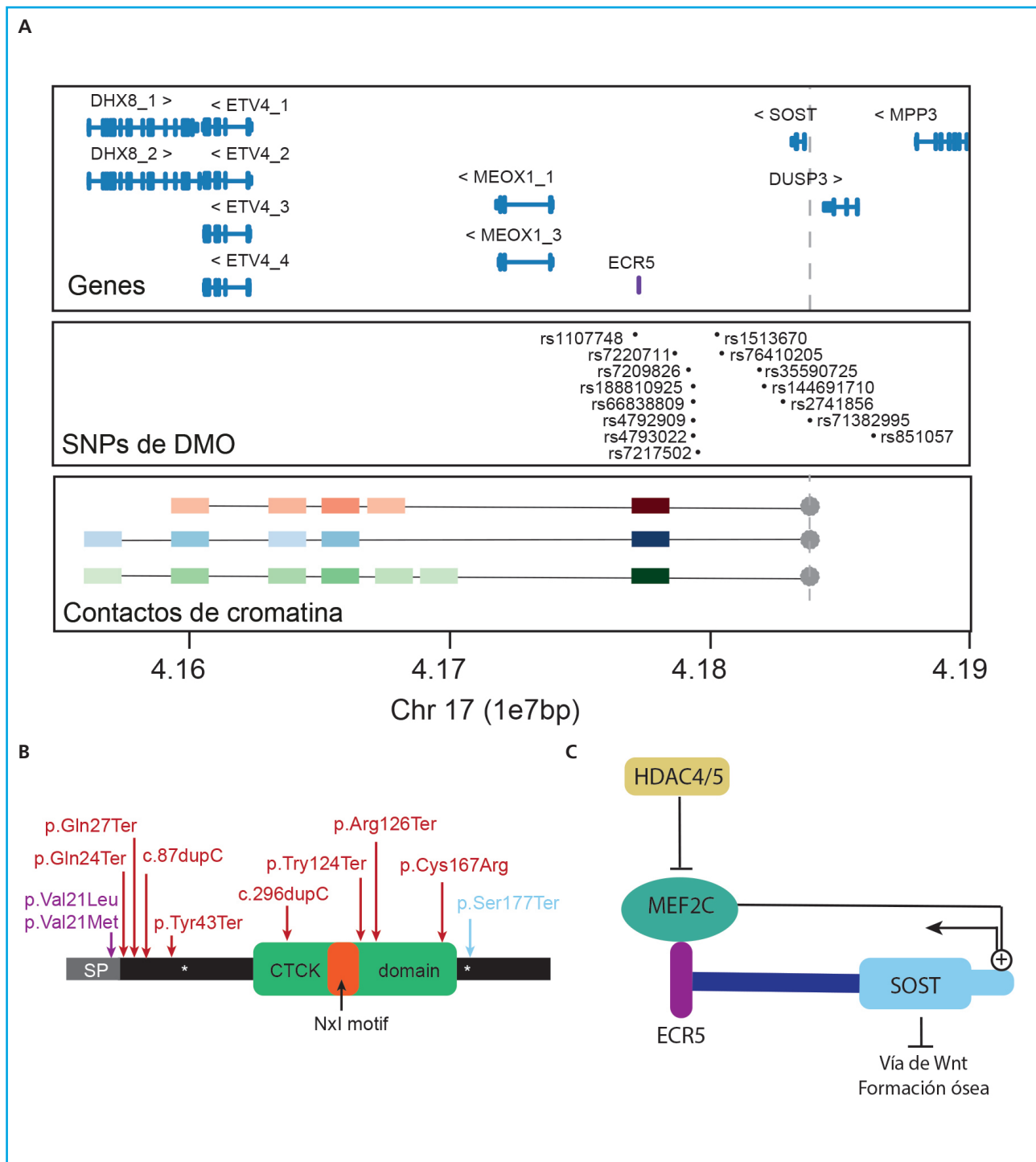
Estudio	Ancestría	Rasgo	Tamaño muestral	Loci/genes más relevantes	Loci nuevos/ loci totales
Strykarsdottir et al., 2009 (22)	Europea	DMO-CL, DMO-CF, FO	15 375	MARK3, SOST, SP7 ( <i>osterix</i> )	4/9
Rivadeneira et al., 2009 (23)	Europea	DMO-CL, DMO-CF	19 195	WLS, CTNMB1, MEPE, STARDB3NL, FL42280, DDC5, SOX6, FOXL1, HDAC5, CRHR1, MEF2C	13/20
Guo et al., 2010 (24)		DMO-CT	11 568	ALDH7A1	1/1
Kung et al., 2010 (25)	Asiática	DMO-CL, DMO-CF, FO	18 898	JAG1	1/1
Hsu et al., 2010 (26)	Europea	DMO-CL, DMO-CF, CF-AE, AEC, LCF	11 290	RAP1A, TBC1D8, OSBPL1A	3/4
Estrada et al., 2012 (16)	Europea y asiática	DMO-CL, DMO-CF, FO	83 894	CDKAL/SOX4, CPED1, WNT16, MBL2/DKK1, AXIN1, RPS6KA5, ERC1/WNT5B, FAM210A, FAM9B/KAL1, SOX9, KLHDC5/PTLH, IDUA, NTAN1, SFRP4, SUPT3H/RUNX2	32/56
Strykarsdottir et al., 2013 (27)	Europea	DMO-CL, DMO-CuT, DMO-C, FO	97 315	LGR4	1/2
Zhang et al., 2014 (28)	Europea, asiática y afroamericana	DMO-CL, DMO-CF, DMO-CT	27 061	SMOC1, CLDN14	2/15
Mosyger et al., 2014 (29)	Europea, asiática y norteamericana	AUBA, VS, DMO-T	59 242	TMEM135	1/7
Zheng et al., 2015 (30)	Europea	DMO-CL, DMO-CF, DMO-A, FO	561 489	EN1	1/36
Strykarsdottir et al., 2016 (31)	Europea y asiática	DMO-CL, DMO-C, FO	30 191	PTCH1	1/14
Nielson et al., 2016 (32)	Europea y norteamericana	DMO-CL, FVC, FVR	42 869	SLC1A3/RANBP3L	1/5
Mullin et al., 2017 (33)	Europea	AUBA, VS, FO	16 627	PPP1R3B, LOC387810, SEPT5/TBX1	3/8
Kemp et al., 2017 (34)	Europea	DMOe-T, FO	142 487	ARID1A, PKN2, TBX15, NGEF, SUSD5, ERC2, BMP2, PLXDC2, BMP5, MEOK2, CREB5, AQP1, CADM1, EMPT1, NFATC1, TMEM92, GPC6, BMP4, SMAD3, BIMPR2, AXIN2	153/203
den Hollander et al., 2017 (35)	Europea y norteamericana	MBSM, OA	12 784	MGP, CCDC91	2/5
Medina-Gomez et al., 2018 (36)	Europea, afroamericana y australiana	DMO-CuT	66 628	SLC8A1, PLCL1, SMAD9, ADAMTS5, TOM1L2, TCF7L1, APC, DUSP5, CD44, CCND1, CYP19A1, MAFB, RUNX1, RAI1, ZSCAN25, GRB10, DRG2, ETS2, PSMD13, CSFI	36/80
Pei et al., 2018 (37)	Europea, asiática, afroamericana e hispana	DMO-CL, DMO-CF	40 449	MACROD2, OSBPL2	2/9
Alonso et al., 2018 (38)	Europea y australiana	FVC	10 683	2q13	1/1
S. K. Kim 2018 (39)	Europea	DMOe-T, FO	394 929	RP1L1, PRSS55, MAPT, GPATCH1, SMG6, WNT1, WNT5B	613/899
Trajanoska et al., 2018 (19)	Europea, norteamericana, asiática y australiana	FO	562 258	GRB10/COBL, ETS2, RSPO3	4/15

(Continúa en página siguiente)

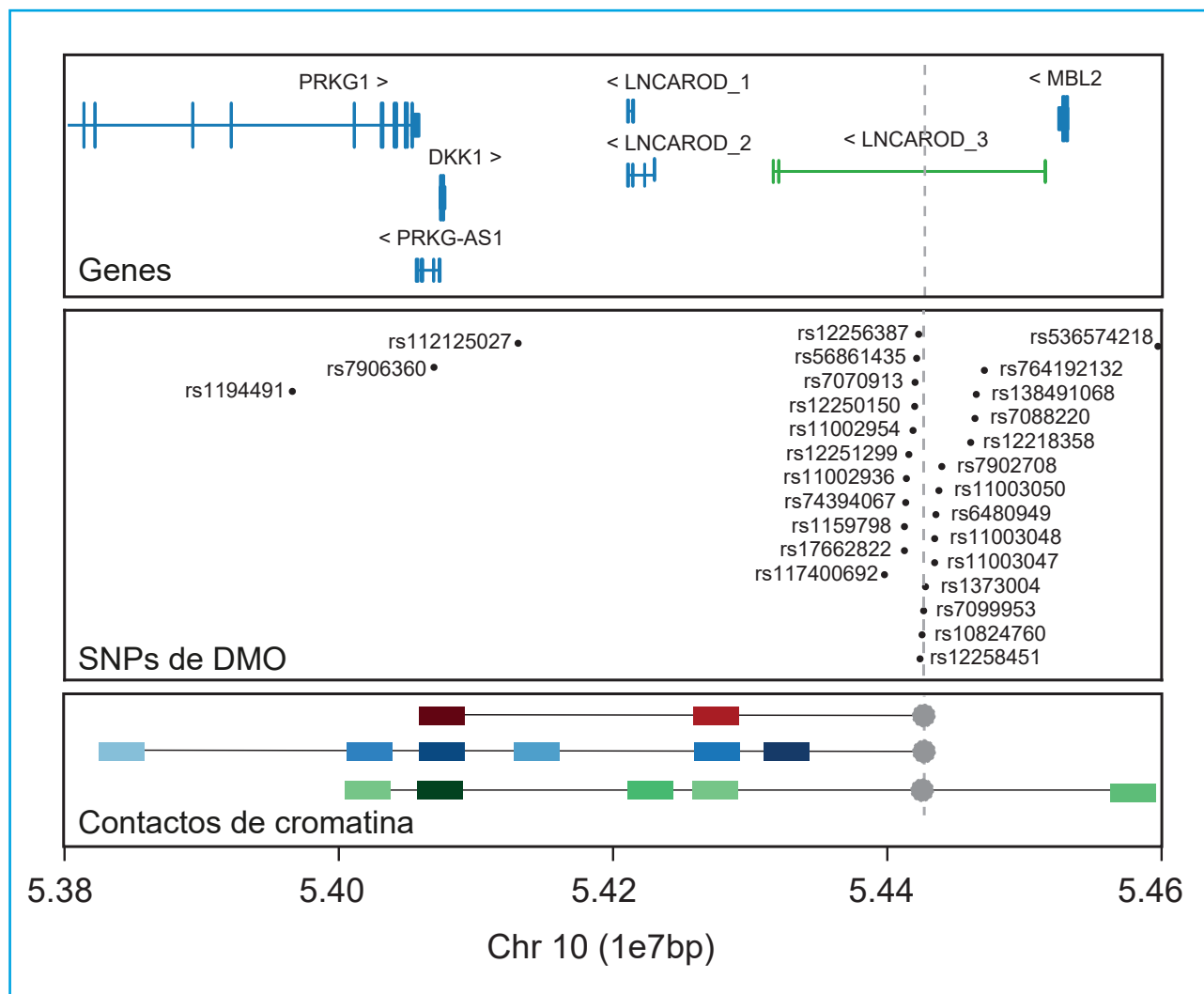
**Tabla 1 (Cont.). Estudios GWAS sobre hueso y genes encontrados con variantes asociadas a fenotipos óseos**

Estudio	Ancestría	Rasgo	Tamaño muestral	Locígenes más relevantes	Locí nuevos/ locí totales
Baird <i>et al.</i> , 2019 (40)	Europea, norteamericana y australiana	ARX-MC	15 934	ASTN2, PTHLH, NKX3-2, FGFR4, GSCD/CICR1, HHIP	6/8
Hsu <i>et al.</i> , 2019 (41)	Europea, norteamericana y asiática	LCF, AE, AEC, SMCF	18 719	IRX1/ADAMTS167	1/4
Morris <i>et al.</i> , 2019 (18)	Europea	DMOe-T, FO	426 824	DAAM2, WNT7B, WNT2B, COL11A1, SERPINC1, PRKCE, HDAC4, HOXD11, BCL11A, SOX5, TGFB3, MMP16, EPHA4, MSH6, SEPT11, LRRC1, ADH1B, CTPS1, DNMT3A, MEIS1	301/518
Pei <i>et al.</i> , 2019 (42)	Europea, norteamericana y australiana	DMO-T, DMO-CuT	209 115	FBN2, DEF6, TNFRSF19, NFE2L1, SCMH1	18/56
Strykarsdottir <i>et al.</i> , 2019 (43)	Europea y asiática	DMO-C, DMO-CL-AH, FO	28 954	GDF5, ADAMTSL3, BCKDHB, CHRDL2, DYM, CTDSP2	6/13
Zheng <i>et al.</i> , 2019 (44)	Europea, norteamericana y australiana	DMO-CF, DMOe-UT	10 584	B4GLANT3, GALNT1	2/3
Feng <i>et al.</i> , 2020 (45)	Europea, norteamericana, afroamericana, asiática e hispana	DMO-C, MMT, DMOe-T	11 335	MC4R	1/2
Zhang <i>et al.</i> , 2020 (46)	Europea, norteamericana, afroamericana, asiática e hispana	DMO-CF, MMCBP	12 445	FTO, PPP1CB, TRMT61B, LSAMP, FAM189A2, LOC101928063	6/26
Surakka <i>et al.</i> , 2020 (47)	Europea	DMO-A	19 705		0/10
Greenbaum <i>et al.</i> , 2022 (48)	Europea, afroamericana, norteamericana y australiana	DMO-CF, DMO-CL	49 487	IGF2, ZNF423, SIPA1, PED4D, PIGN, TRAF3IP2, NFIB, LYSMD4, MAML2	9/30

*El estudio está representado por el primer autor y el año. Los genes son aquellos más relevantes en el estudio por su asociación con fenotipos óseos y por la novedad de su hallazgo. A: antebrazo. AE: ángulo del eje. AEC: ancho del estrecho del cuello. ARX-MC: absorciometría de rayos X-modos derivados de la forma de la cadera. AUBA: atenuación de ultrasonido de banda ancha. C: cadera. CF: cuello femoral. CL: columna lumbar. CL-AH: columna lumbar-área del hueso. CT: cadera total. DMO: densidad mineral ósea. DMOe: densidad mineral ósea estimada. FO: fractura osteoporótica. FVC: fractura vertebral clínica. FVR: fractura vertebral radiográfica. LCF: longitud de cuello femoral. MBSM: medida bilateral semicuantitativa de mano. MMCBP: masa magra corporal de brazos y piernas. MMT: masa magra del tronco. OA: osteoartritis. SMCF: sección modular del cuello femoral. T: talón. TO: tamaño óseo. UT: ultrasonido de talón. VS: velocidad de sonido.*



**Figura 1. SOST.** A. Panel superior: *Locus* que contiene *SOST* y sus genes vecinos (GRC37/hg19). En lila, la región reguladora ECR5. Panel central: SNP asociados con diferentes parámetros óseos en diferentes estudios GWAS, extraídos de *GWAS catalog* (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Panel inferior: Resultados principales del ensayo 4C de Martínez-Gil et al. 2021, donde se representan las principales interacciones entre el promotor de *SOST* (usado como anzuelo e indicado con un punto y una línea discontinua gris). Los cuadrados de colores representan las interacciones con la intensidad de color proporcional a la intensidad de la interacción. Los cuadrados rojos representan las interacciones en células madre mesenquimales, en azul las interacciones de las células hFOB y en verde las interacciones de las células Saos2. Las unidades de la escala genómica utilizada (1e7pb) corresponden a 10 Megabases ( $1 \times 10^7$  pares de bases). B. Representación esquemática de la proteína esclerostina señalando sus dominios funcionales y las variantes descritas causantes de enfermedades esqueléticas humanas. En lila las variantes asociadas a displasia craneodifisaria, en rojo asociadas a esclerosteosis y en azul la variante asociada al fenotipo de alta masa ósea. CTCK: C-terminal cysteine knot-like. C. Esquema de algunos de los reguladores positivos y negativos de la expresión de *SOST*.



**Figura 2. DKK1.** Panel superior: locus que contiene *DKK1* y sus genes vecinos (GRC37/hg19). En verde, el lncRNA *LNCAROD* de GENCODE v32.2 (GRC38/hg18). Panel central: SNP asociados con diferentes parámetros óseos en diferentes estudios GWAS, extraídos del *GWAS catalog* (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Panel inferior: Resultados principales del ensayo 4C de Martínez-Gil et al. 2020, donde se representan las principales interacciones con la región rica en SNP asociados a DMO (usado como anzuelo e indicado con un punto y una línea discontinua gris). Los cuadrados de colores representan las interacciones con la intensidad de color proporcional a la intensidad de la interacción. Los cuadrados rojos representan las interacciones en células madre mesenquimales, en azul las interacciones de las células hFOB y en verde las interacciones de las células Saos2. Las unidades de la escala genómica utilizada (1e7pb) corresponden a 10 megabases ( $1 \times 10^7$  pares de bases).

Uno de los *loci* más consistentes entre distintos GWAS sobre la DMO es la región genómica situada en 7q31.31 que incluye el gen *WNT16*. Se trata de un *locus* muy complejo que incluye, además de *WNT16*, los genes vecinos *ING3*, *FAM3C* y *CPED1*. El papel de *WNT16* sobre la determinación de la DMO ha sido claramente establecido en estudios funcionales de modelos de ratón KO o KO condicional específico de osteoblasto (6,83,84), que a grandes rasgos coinciden en mostrar fracturas espontáneas debidas a una baja DMO, junto con un grosor cortical y la resistencia ósea reducidos.

Sin embargo, también se han encontrado pruebas sobre la importancia de los otros tres genes vecinos en el metabolismo óseo. En el caso de *ING3* (*Inhibitor Of Growth Family Member 3*), que forma parte del complejo NuA4 histona acetiltransferasa (HAT) implicado en funciones de regulación de la cromatina, se ha determinado que se expresa abundantemente en el tejido óseo (85) y los estudios funcionales en un modelo celular *in vitro* de células mesenquimales KO para *ING3* muestran afectación de la osteoblastogénesis y una estimulación de la diferenciación adipogénica (86).

Para *CPED1* (*Cadherin Like And PC-Esterase Domain Containing 1*), no se conoce la función concreta ni en humanos ni en ratón. Sin embargo, en ratón, los estudios funcionales muestran que *Cped1* se encuentra uniformemente expresado en una variedad de tejidos, incluido el óseo y se han descrito diferentes isoformas debidas a empalmes (*splicing*) alternativos, así como tres regiones promotoras activas durante la diferenciación osteogénica (87). Para acabar de definir su posible rol en la homeostasis ósea, faltarían estudios funcionales adicionales, en modelos celulares *in vitro* o en modelos animales. *FAM3C* (*Family of sequence similarity 3c*) es un factor de crecimiento tipo citocina expresado en multitud de tejidos (88), que juega un papel muy importante en la transición epitelio-mesénquima y en la metástasis del cáncer (89). Su relación con el metabolismo óseo se ha confirmado con el modelo de ratón KO que presenta alteraciones en la estructura ósea (88).

Se han realizado algunos estudios funcionales que abordan la regulación de la expresión de los distintos genes de esta región. Por ejemplo, nuestro grupo ha llevado a cabo estudios de eQTL (del inglés *expression Quantitative Trait Locus*) en osteoblastos primarios que demuestran que SNP situados dentro del gen *WNT16* son reguladores de los niveles de expresión de *FAM3C* en esas células (90). También hemos visto, en células del linaje osteoblástico, que se da una interacción física entre varios potenciadores génicos (*enhancers*) situados dentro del gen *CPED1* y el promotor de *WNT16* (91). Todo ello ilustra una compleja relación entre estos cuatro genes y sugiere la posibilidad de que se dé una sinergia entre ellos. Con todo, queda clara la necesidad de estudios funcionales adicionales que acaben de definir el papel de cada uno de ellos y sus interacciones.

Los trabajos aquí citados evidencian la importancia que tienen los estudios funcionales a partir de los descubrimientos que traen consigo los análisis de GWAS y ponen en el horizonte el reto, en la era post-GWAS, de continuar encontrando correlaciones entre las variantes que se derivan de los estudios de GWAS y los aspectos funcionales de esas variantes, bien sea *in silico*, *in vitro* o *in vivo*, buscando con ello nuevas aproximaciones que puedan dar luces y opciones terapéuticas para las patologías asociadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lichou F, Gosia T. Functional studies of GWAS variants are gaining momentum. *Nat Commun* 2020;11(1):6283. DOI: 10.1038/s41467-020-20188-y
- Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;363(2):166-76. DOI: 10.1056/NEJMr0905980
- Cannon ME, Karen LM. Deciphering the emerging complexities of molecular mechanisms at GWAS loci. *Am J Hum Genet* 2018;103(5):637-53. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.10.001
- Vissecher PV, Wray N, Zhang Q, Sklar P, McCarthy M, Brown M, et al. 10 Years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am J Hum Genet* 2017;101(1):5-22. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005
- Buniello A, MacArthur J, Cerezo M, Harris L, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D1005-12. DOI: 10.1093/nar/gky1120
- Medina-Gomez C, Kemp J, Estrada K, Eriksson J, Liu J, Reppe S, et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the *WNT16* locus. *PLoS Genet* 2012;8(7):e1002718. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002718
- Loic Y, Sidorenko J, Kemper K, Zheng Z, Wood A, Weedon M, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet* 2018;27(20):3641-9. DOI: 10.1093/hmg/ddy271
- Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2019;20(8):467-84. DOI: 10.1038/s41576-019-0127-1
- Hirschhorn JN. Genomewide association studies — illuminating biologic pathways. *N Engl J Med* 2009;360(17):1699-701. DOI: 10.1056/NEJMp0808934
- Klein RJ, Xing X, Mukherjee S, Willis J, Hayes J. Successes of genome-wide association studies. *Cell* 2010;142(3):350-1.
- Schaid DJ, Chen W, Larson NB. From Genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nat Rev Genet* 2018;19(8):491-504.
- Broekema RV, Bakker OB, Jonkers IH. A practical view of fine-mapping and gene prioritization in the post-genome-wide association era. *Open Biol* 2020;10(1):190221. DOI: 10.1098/rsob.190221
- Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Atalay N, Pineda-Moncusí M, García-Giralt N, Van Hul W, et al. Functional assessment of coding and regulatory variants from the *DKK1* locus. *JBM plus* 2020;4(12):e10423. DOI: 10.1002/jbm4.10423
- Schartl M. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Dis Model Mech* 2014;7(2):181-92. DOI: 10.1242/dmm.012245
- Rao S, Yao Y, Bauer DE. Editing GWAS: experimental approaches to dissect and exploit disease-associated genetic variation. *Genome Med* 2021;13(1):41. DOI: 10.1186/s13073-021-00857-3
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012;44(5):491-501. DOI: 10.1038/ng.2249
- Trajanoska K, Rivadeneira F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Bone* 2019;126:2-10.
- Morris JA, Kemp JA, Youlten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet* 2019;51(2):258-66.
- Trajanoska K, Morris JA, Oei L, Zheng H-F, Evans DM, Kiel DP, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ* 2018;362:k3225. DOI: 10.1016/j.bone.2019.04.005
- García-Ibarbía C, Delgado-Calle J, Casafont I, Velasco J, Arozamena J, Pérez-Núñez M, et al. Contribution of genetic and epi-



- genetic mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *Gene* 2013;532(2):165-72. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.080
21. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, et al. LRP4 third  $\beta$ -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014;23(7):1856-68. DOI: 10.1093/hmg/ddt578
  22. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 2009;41(1):15-7. DOI: 10.1038/ng.284
  23. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu Y-H, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2009;41(11):1199-206. DOI: 10.1038/ng.446
  24. Guo Y, Tan L-J, Lei S-F, Yang T-L, Chen X-D, Zhang F, et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis. *PLoS Genet* 2010;6(1):e1000806. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000806
  25. Kung AW, Xiao SM, Cherny S, Li GH, Gao Y, Tso G, et al. Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. *Am J Hum Genet* 2010;86(2):229-39. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.12.014
  26. Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, et al. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet* 2010;6(6):e1000977. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000977
  27. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Sulem P, Gudbjartsson DF, Sigurdsson A, Aslaug J, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature* 2013;497(7450):517-20. DOI: 10.1038/nature12124
  28. Zhang L, Choi HJ, Estrada K, Leo PJ, Li J, Pei Y-F, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet* 2014;23(7):1923-33. DOI: 10.1093/hmg/ddt575
  29. Moayyeri A, Hsu Y-H, Karasik D, Estrada K, Xiao S-M, Nielson C, et al. Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GENOMOS consortium. *Hum Mol Genet* 2014;23(11):3054-68. DOI: 10.1093/hmg/ddt675
  30. Zheng H-F, Forgetta V, Hsu Y-H, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature* 2015;526(7571):112-7. DOI: 10.1038/nature14878
  31. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Center JR, Hun Lee S, et al. Sequence variants in the PTCH1 gene associate with spine bone mineral density and osteoporotic fractures. *Nat Commun* 2016;7:10129. DOI: 10.1038/ncomms10129
  32. Nielson C, Liu C-T, Smith AV, Ackert-Bicknell C, Reppe S, Jakobsdottir J, et al. Novel genetic variants associated with increased vertebral volumetric BMD, reduced vertebral fracture risk, and increased expression of SLC1A3 and EPHB2. *J Bone Miner Res* 2016;31(12):2085-97. DOI: 10.1002/jbmr.2913
  33. Mullin BH, Zhao JH, Brown SJ, Perry J, Luan J, Zheng H-F, et al. Genome-wide association study meta-analysis for quantitative ultrasound parameters of bone identifies five novel loci for broadband ultrasound attenuation. *Hum Mol Genet* 2017;26(14):2791-802. DOI: 10.1093/hmg/ddx174
  34. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youlten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet* 2017;49(10):1468-75. DOI: 10.1038/ng.3949
  35. Hollander W, Boer CG, Hart DJ, Yau MS, Ramos Y, Metrustry S, et al. Genome-wide association and functional studies identify a role for matrix Gla protein in osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis* 2017;76(12):2046-53. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-211214
  36. Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, Chesni A, Ahluwalia TS, et al. Life-course genome-wide association study meta-analysis of total body BMD and assessment of age-specific effects. *Am J Hum Genet* 2018;102(1):88-102. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.12.005
  37. Pei Y-F, Hu W-Z, Yan M-W, Li C-W, Liu L, Yang X-L, et al. Joint study of two genome-wide association meta-analyses identified 20p12.1 and 20q13.33 for bone mineral density. *Bone* 2018;110:378-85. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.027
  38. Alonso N, Estrada K, Albagha OME, Herrera L, Reppe S, Olstad OK, et al. Identification of a novel locus on chromosome 2q13, which predisposes to clinical vertebral fractures independently of bone density. *Ann Rheum Dis* 2018;77(3):378-85. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-212469
  39. Kim SK. Identification of 613 new loci associated with heel bone mineral density and a polygenic risk score for bone mineral density, osteoporosis and fracture. *PLoS One* 2018;13(7):e0200785. DOI: 10.1371/journal.pone.0200785
  40. Baird DA, Evans DS, Kamanu FK, Gregory JS, Saunders FR, Giuraniuc CV, et al. Identification of novel loci associated with hip shape: a meta-analysis of genome wide association studies. *J Bone Miner Res* 2019;34(2):241-51. DOI: 10.1002/jbmr.3605
  41. Hsu Y-H, Estrada K, Evangelou E, Ackert-Bicknell C, Akesson K, Beck T, et al. Meta-analysis of genomewide association studies reveals genetic variants for hip bone geometry. *J Bone Miner Res* 2019;34(7):1284-96. DOI: 10.1002/jbmr.3698
  42. Pei YF, Liu L, Liu TL, Yang XL, Zhang H, Wei XT, et al. Joint association analysis identified 18 new loci for bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2019;34(6):1086-94. DOI: 10.1002/jbmr.3681
  43. Styrkarsdottir U, Stefansson OA, Gunnarsdottir K, Thorleifsson G, Lund SH, Stefansson L, et al. GWAS of bone size yields twelve loci that also affect height, BMD, osteoarthritis or fractures. *Nat Commun* 2019;10(1):2054.
  44. Zheng J, Maerz W, Gergei I, Kleber M, Drechsler C, Wanner C, et al. Mendelian randomization analysis reveals a causal influence of circulating sclerostin levels on bone mineral density and fractures. *J Bone Miner Res* 2019;34(10):1824-36. DOI: 10.1038/s41467-019-09860-0
  45. Feng GJ, Wei XT, Zhang H, Yang XL, Shen H, Tian Q, et al. Identification of pleiotropic loci underlying hip bone mineral density and trunk lean mass. *J Hum Genet* 2020;66(3):251-60. DOI: 10.1038/s10038-020-00835-4
  46. Zhang YX, Zhang SS, Ran S, Liu Y, Zhang H, Yang XL, et al. Three pleiotropic loci associated with bone mineral density and lean body mass. *Mol Genet Genomics* 2020;296(1):55-65. DOI: 10.1007/s00438-020-01724-3



47. Surakka I, Fritsche LG, Zhou W, Backman J, Kosmicki JA, Lu H, et al. MEPE loss-of-function variant associates with decreased bone mineral density and increased fracture risk. *Nat Commun* 2020;11(1):4093. DOI: 10.1038/s41467-020-17315-0
48. Greenbaum J, Su KJ, Zhang X, Liu Y, Liu A, Zhao LJ, et al. A multiethnic whole genome sequencing study to identify novel loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet* 2022;31(7):1067-81. DOI: 10.1093/hmg/ddab305
49. Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, et al. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem* 2011;286(22):19489-500. DOI: 10.1074/jbc.M110.190330
50. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One* 2009;4(11):e7930. DOI: 10.1371/journal.pone.0007930
51. Chang M-K, Kramer I, Huber T, Kinzel B, Guth-Gundel S, Leupin O, et al. Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(48):E5187-195. DOI: 10.1073/pnas.1413828111
52. Wang R, Zhao P, Kong N, Lu R, Pei Y, Huang C, et al. Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes* 2018;22;9(1):54. DOI: 10.3390/genes9010054
53. Velázquez-Cruz R, Jiménez-Ortega RF, Parra-Torres AY, Castillejos-López M, Patiño N, Quiterio M, et al. Analysis of association of MEF2C, SOST and JAG1 genes with bone mineral density in Mexican-Mestizo postmenopausal women. *BMC Musculoskelet Disord* 2014;15:400. DOI: 10.1186/1471-2474-15-400
54. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, et al. Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2016;375(16):1532-43. DOI: 10.1056/NEJMoa1607948
55. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2014;370(5):412-20. DOI: 10.1056/NEJMoa1305224
56. Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, et al. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosuzumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2015;30(2):216-24. DOI: 10.1002/jbmr.2351
57. Langdahl BL, Libanati C, Crittenden DB, Bolognese MA, Brown JP, et al. Romosozumab (sclerostin monoclonal antibody) versus teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis transitioning from oral bisphosphonate therapy: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017;390(10102):1585-94. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31613-6
58. Glorieux FH, Devogelaer JP, Durigova M, Goemaere S, Hemsley S, Jakob F, et al. BPS804 anti-sclerostin antibody in adults with moderate osteogenesis imperfecta: results of a randomized phase 2a trial. *J Bone Miner Res* 2017;32(7):1496-504. DOI: 10.1002/jbmr.3143
59. Lewiecki M, Blicharski T, Goemaere S, Lippuner K, Meisner PD, Miller PD, et al. A phase III randomized placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety of romosozumab in men with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103(9):3183-93. DOI: 10.1210/jc.2017-02163
60. Martínez-Gil N, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. Wnt pathway extracellular components and their essential roles in bone homeostasis. *Genes (Basel)* 2022;13(1):138. DOI: 10.3390/genes13010138
61. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Laczka C, et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 2002;39(2):91-7. DOI: 10.1136/jmg.39.2.91
62. Sebastian A, Loots GG. Genetics of Sost/SOST in sclerosteosis and van Buchem disease animal models. *Metabolism* 2018;80:38-47. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.10.005
63. Collette NM, Genetos DC, Economides AN, Xie L, Shahnazari M, Yao W, et al. Targeted deletion of Sost distal enhancer increases bone formation and bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(35):14092-7. DOI: 10.1073/pnas.1207188109
64. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Cozar M, Garcia-Giralt N, Ovejero D, Nogués X, et al. Genetics and genomics of SOST: functional analysis of variants and genomic regulation in osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2021;22(2):489. DOI: 10.3390/ijms22020489
65. Loots G, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 2005;15(7):928-35. DOI: 10.1101/gr.3437105
66. Kramer I, Baertschi S, Halleux C, Keller H, Kneissel M. Mef2c deletion in osteocytes results in increased bone mass. *J Bone Miner Res* 2012;27(2):360-73. DOI: 10.1002/jbmr.1492
67. Duncan E, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet* 2011;7(4):e1001372. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk
68. Pei YF, Hu WZ, Hai R, Wang XY, Ran S, Lin Y, et al. Genome-wide association meta-analysis identified 1q43 and 2q32.2 for hip Ward's triangle areal bone mineral density. *Bone* 2016;91:1-10. DOI: 10.1016/j.bone.2016.07.004
69. Zheng HF, Duncan EL, Yerges-Armstrong LM, Eriksson J, Bergström U, Leo PJ, et al. Meta-analysis of genome-wide studies identifies MEF2C SNPs associated with bone mineral density at forearm. *J Med Genet* 2013;50(7):473-8. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101287
70. Gregson CL, Newell F, Leo PJ, Clark GR, Paternoster L, Marshall M, et al. Genome-wide association study of extreme high bone mass: contribution of common genetic variation to extreme BMD phenotypes and potential novel BMD-associated genes. *Bone* 2018;114:62-71. DOI: 10.1016/j.bone.2018.06.001
71. Baertschi S, Baur N, Lueders-Lefevre V, Voshol J, Keller H. Class I and IIa histone deacetylases have opposite effects on sclerostin gene regulation. *J Biol Chem* 2014;289(36):24995-5009. DOI: 10.1074/jbc.M114.564997
72. Kobayashi Y, Uehara S, Koide M. Regulations of osteoclast formation and function by Wnt signals. *Clin Calcium* 2019;29(3):309-15. DOI: 10.20837/4201903309
73. Wein M, Fretwurst T, Nahles S, Duttonhoefer F, Tomakidi P, Steinberg T, et al. Pilot investigation of the molecular discrimination of human osteoblasts from different bone entities. *J Craniomaxillofac Surg* 2015;43(8):1487-93. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.07.030
74. Kichaev G, Bhatia G, Loh PR, Gazal S, Burch K, Freund MK, et al. Leveraging polygenic functional enrichment to improve GWAS power. *Am J Hum Genet* 2019;104(1):65-75.

75. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116(13):2627-34. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.07.030
76. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391(6665):357-62. DOI: 10.1038/34848
77. Ai M, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK, Osteoporosis-Pseudoglioma Collaborative Group. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;77(5):741-53. DOI: 10.1086/497706
78. Balemans W, Devogelaer JP, Cleiren E, Piters E, Caussin E, Van Hul W. Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res* 2007;22(5):708-16. DOI: 10.1359/jbmr.070211
79. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Monistrol-Mula A, García-Giralt N, Díez-Pérez A, Nogués X, et al. Common and rare variants of WNT16, DKK1 and SOST and their relationship with bone mineral density. *Sci Rep* 2018;8(1):10951. DOI: 10.1038/s41598-018-29242-8
80. Korvala J, Löjja M, Mäkitie O, Sochett E, Jüppner H, Schnabel D, et al. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med Genet* 2012;55(10):515-9. DOI: 10.1016/j.ejmg.2012.06.011
81. van de Putte R, Wijers CH, de Blaauw I, Feitz WF, Marcelis CL, Hakobjan M, et al. Sequencing of the DKK1 gene in patients with anorectal malformations and hypospadias. *Eur J Pediatr* 2015;174(5):583-7. DOI: 10.1007/s00431-014-2436-x
82. Ntini E, Louloui A, Liz J, Muino JM, Marsico A, Vang-Ørom UA. Long ncRNA A-ROD activates its target gene DKK1 at its release from chromatin. *Nat Commun* 2018;9(1):1636. DOI: 10.1038/s41467-018-04100-3
83. Zheng H-F, Tobias JH, Duncan E, Evans DM, Eriksson J, Pateroster L, et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet* 2012;8(7):e1002745. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002745
84. Movérare-Skrtic S, Henning P, Liu X, Nagano K, Saito H, Börjesson AE, et al. Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. *Nat Med* 2014;20(11):1279-88. DOI: 10.1038/nm.3654
85. Nabbi A, Almami A, Thakur S, Suzuki K, Boland D, Bismar TA, et al. ING3 protein expression profiling in normal human tissues suggest its role in cellular growth and self-renewal. *Eur J Cell Biol* 2015;94(5):214-22. DOI: 10.1016/j.ejcb.2015.03.002
86. Chesi A, Wagley Y, Johnson ME, Manduchi E, Su Ch, Lu S, et al. Genome-scale capture C promoter interactions implicate effector genes at GWAS loci for bone mineral density. *Nat Commun* 2019;10(1):1260. DOI: 10.1038/s41467-019-09302-x
87. Maynard RD, Godfrey DA, Medina-Gomez C, Ackert-Bicknell CL. Characterization of expression and alternative splicing of the gene cadherin-like and PC esterase domain containing 1 (Cped1). *Gene* 2018;674:127-33. DOI: 10.1016/j.gene.2018.06.060
88. Määttä JA, Bendre A, Laanti M, Büki KG, Rantakari P, Tervola P, et al. Fam3c modulates osteogenic cell differentiation and affects bone volume and cortical bone mineral density. *Bonekey Rep* 2016;5:787. DOI: 10.1038/bonekey.2016.14
89. Bendre A, Büki KG, Määttä JA. Fam3c modulates osteogenic differentiation by down-regulating Runx2. *Differentiation* 2017;93:50-7. DOI: 10.1016/j.diff.2016.11.005
90. Martínez-Gil N, Patiño J, Ugartondo N, Grinberg D, Balcells S. WNT16 rs2908004 missense variant acts as eQTL of FAM3C in human primary osteoblasts. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2021;13(4):117-21.
91. Martínez-Gil N, Roca-Ayats N, Herrera C, Gritti N, Ugartondo N, Garcia-Giralt N, et al. Functional evidence of bone regulation of WNT16 through upstream enhancers within CPED1. *J Bone Miner Res* 2020;35S1:179.

## Imagen en Osteología

### Tibia en sable

Jesús Rubio Úbeda, Inmaculada Jiménez Moleón, Enrique Raya Álvarez

Servicio de Reumatología. Hospital Universitario Clínico San Cecilio. Granada

#### CASO CLÍNICO

Mujer de 91 años que presenta un cuadro clínico de 6 meses de evolución de dolor en región tibial derecha, asociando deformidad ósea y dificultad progresiva para la deambulacion. En la exploración física se confirmaron estos hallazgos, destacando además un aumento de la temperatura local en región tibial derecha.

Se realizó estudio analítico básico con bioquímica y hemograma, incluyendo parámetros de metabolismo fosfocálcico y marcadores de remodelado óseo, donde se objetivaron niveles elevados de fosfatasa alcalina (FA) en suero (141 U/L [N = 30-120]), así como elevación de marcadores de osteoformación (propéptido aminoterminal del colágeno tipo I [PINP] 166 ng/mL [N = 20,2-76,3]) y de resorción ósea ( $\beta$ -CrossLaps [ $\beta$ -CTX] 0,042 ng/mL [N = 0,000-0,028] y telopéptido C-terminal [ICTP] 1,28 ng/mL [N = 0,556-1]).

El estudio de imagen incluyó radiografías de huesos largos, pelvis, columna dorsolumbar y cráneo, revelando a nivel de tibia derecha una imagen ca-

racterística de "tibia en sable" (Figs. 1-3), así como gammagrafía ósea con  $^{99m}\text{Tc}$ -HDA (Fig. 4). Con los hallazgos obtenidos en estas pruebas, y tras encontrar únicamente alteraciones (tanto estructurales como metabólicas) a nivel de tibia derecha, la paciente fue finalmente diagnosticada de enfermedad ósea de Paget monostótica.

#### DISCUSIÓN

El caso presentado es paradigmático de una enfermedad ósea de Paget con una deformidad tibial "en sable". En nuestro caso el diagnóstico tardío cobra un significado especial en tanto a que la deformidad observada se ha debido desarrollar a lo largo de décadas sin haberse diagnosticado hasta entonces. Con esto se pretende remarcar la importancia de detectar deformidades del aparato locomotor en cualquier exploración básica ejecutada en una consulta con la finalidad de evitar tanto su progresión, como complicaciones derivadas de la propia enfermedad.

Recibido: 24/06/2022 • Aceptado: 10/10/2022

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Rubio Úbeda J, Jiménez Moleón I, Raya Álvarez E. Tibia en sable. Rev Osteoporos Metab Miner 2023;15(1):40-42

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00009

©Copyright 2023 SEIOMM y ©Arán Ediciones S.L. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

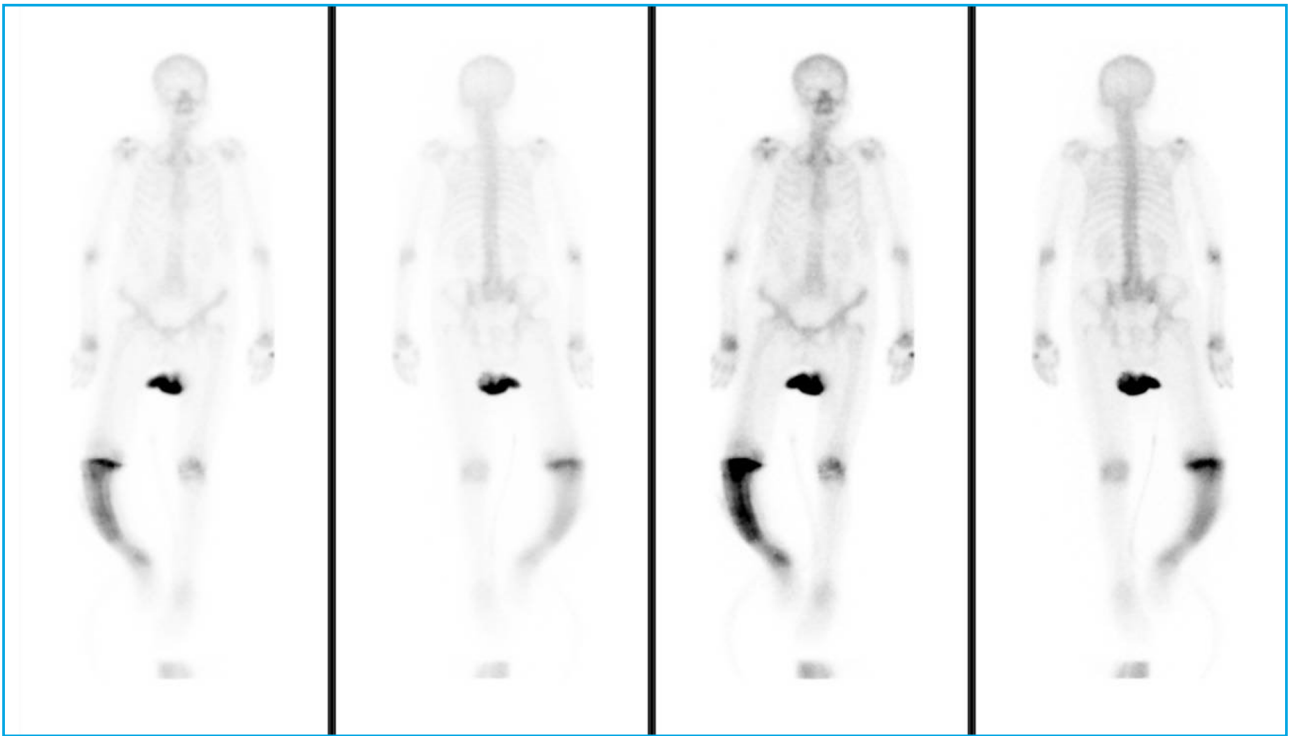
## IMÁGENES CLÍNICAS



**Figura 1. Radiografía de fémur derecho y articulación femorotibial:** destaca el contraste entre el patrón trabecular reticular fino del fémur y la trabeculación gruesa y aberrante que se observa en meseta tibial. Osteoartrosis femorotibial y femoropatelar. Como hallazgo incidental, calcificación de la arteria femoropoplítea.



**Figuras 2 y 3. Radiografías de tibia derecha. Tibia "en sable":** aumento del grosor cortical y perióstico, con patrón trabecular grueso y desordenado, así como la gran deformidad tibial, que se incurva lateralmente dando el aspecto "en sable".



**Figura 4. Gammagrafía ósea de cuerpo entero con  $^{99m}\text{Tc-HDA}$ :** se observa captación de intensidad moderada/severa en tibia derecha. En el resto del esqueleto se aprecia depósito más difuso y de menor intensidad en hombros, codos, muñecas y rodilla izquierda de características degenerativas.