



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

Regulación de la migración, proliferación y diferenciación de
osteoblastos de rata por el trifosfato de adenosina:
Rol de receptores P2 y mecanismos de señalización

Bqco. Juan Andrés Laiuppa

Bahía Blanca

Argentina

2016

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y los resultados que en ella se presentan no han sido utilizados previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. Dichos resultados han sido obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Química Biológica-A, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre abril de 2012 y noviembre de 2016, bajo la dirección de la Dra. Graciela E. Santillán, Profesora de Química Biológica-A del Depto. de Biología Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, e Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Juan Andrés Laiuppa

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR</p> <p>Secretaría General de Postgrado y Educación Continua</p> <p>La presente Tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la clasificación de (.....)</p>
---	--

Resumen

Resumen

Existe una gran cantidad de patologías que afectan al esqueleto, en las que se ve comprometido el balance entre la formación y la resorción ósea. Generalmente, las alternativas terapéuticas apuntan a la modulación de la resorción ósea actuando a nivel del osteoclasto. Sin embargo, estos abordajes terapéuticos no resultan suficientes, generando la necesidad de implementar nuevas estrategias farmacológicas con blanco de acción en la fisiología de la célula formadora de hueso, el osteoblasto. Para ello, un extensivo y detallado conocimiento tanto de la función como de los procesos de proliferación, migración y diferenciación, de la citada célula, son necesarios.

El sistema de señalización purinérgico, donde los nucleótidos son liberados por las células, de manera controlada, y actúan como mensajeros extracelulares activando receptores purinérgicos en la membrana plasmática de la célula blanco es conocido desde hace unos 45 años. Desde entonces, se ha reportado un número creciente de células capaces de liberar nucleótidos, de manera controlada, al medio extracelular, lo que sumado al hecho de que, virtualmente, todas las células del cuerpo poseen algún tipo de receptor purinérgico (purinoceptor), hace de este sistema de señalización uno de los más importantes respecto de la regulación de la homeostasis del cuerpo.

El papel de los nucleótidos y sus receptores en los procesos de proliferación y diferenciación de los osteoblastos ha sido estudiado desde hace unos 25 años. Sin embargo, aún no se ha alcanzado la dilucidación completa de los mecanismos regulatorios de estos procesos.

El objetivo de esta tesis fue determinar los efectos de la activación de receptores purinérgicos, por nucleótidos extracelulares, en los procesos de migración, proliferación y diferenciación celular de cultivos primarios de calvaria de rata neonata. Se investigó también, el efecto de una concentración elevada de calcio extracelular en la proliferación y diferenciación celular y su influencia en la regulación de dichos procesos por la estimulación purinérgica. Además, se evaluó el rol de la enzima GSK3 (por inhibición con Litio), en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Por último, se examinó el efecto de los agonistas mencionados sobre la expresión y localización de β -catenina.

La migración celular fue evaluada mediante "ensayo de la herida". El tratamiento con los nucleótidos mostró estimular la migración de las células calvariales.

Para estudiar el proceso de proliferación se recurrió a citometría de flujo, recuento en cámara de Neubauer y tinción con Cristal Violeta. Los resultados obtenidos le atribuyen efectos positivos a los nucleótidos extracelulares. Por otro lado, el tratamiento con Litio provocó disminuciones en la capacidad proliferativa de las células. Mientras que no se observaron cambios en la proliferación por incubación de las células en un medio con elevada concentración de Calcio extracelular.

El análisis de la diferenciación de las células a un fenotipo osteoblástico se llevó a cabo mediante mediciones de actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina, cuantificación de ARNm de marcadores de maduración/diferenciación osteoblástica por QRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa) y detección de mineralización por tinción con rojo de Alizarina. Al respecto, el tratamiento con ATP γ S exhibió un rol pro-osteogénico, al elevar la actividad enzimática de FAL, la expresión génica de marcadores de diferenciación y la capacidad mineralizante. En cambio, el agonista UTP no indujo cambios en la actividad de la enzima y, en la mayoría de los casos, reprimió la transcripción de genes osteogénicos.

Por su parte, la exposición a Litio incrementó la actividad de FAL pero reprimió la expresión de genes osteogénicos y disminuyó la mineralización de los cultivos.

Una elevada concentración de Calcio extracelular mostró efectos positivos a nivel de diferenciación, al incrementar la actividad FAL y la mineralización de los osteoblastos.

Finalmente, el tratamiento de los cultivos con nucleótidos extracelulares, en un medio conteniendo elevada concentración de Calcio, mostró leves efectos aditivos/sinérgicos en la estimulación de la diferenciación a células formadoras de hueso.

La expresión de β -catenina resultó aumentada bajo tratamiento con nucleótidos extracelulares, Litio o Calcio. Asimismo, la translocación a núcleo se vio incrementada por dichos tratamientos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, puede atribuirse un rol regulatorio sobre la fisiología osteoblástica al sistema de señalización purinérgico y GSK3/ β -catenina.

Abstract

Abstract

There are a great number of pathologies that affect the skeleton, in which the balance between formation and bone resorption is compromised. Generally, the therapeutic alternatives point to the modulation of the bone resorption acting at the level of the osteoclast. However, these therapeutic approaches are not enough, generating the need to implement new pharmacological strategies targeting the physiology of the bone-forming cell, the osteoblast. To this end, an extensive and detailed knowledge of both the function and processes of proliferation, migration and differentiation of the aforementioned cell are necessary.

Purinergic signaling system, wherein nucleotides are released by cells in a controlled manner, and act as extracellular messengers activating purinergic receptors in the plasma membrane of the target cell is known for about 45 years. Since then, it has been reported an increasing number of cells capable of releasing nucleotides, in a controlled manner, to the extracellular medium, which together with the fact that virtually all cells in the body have some type of purinergic receptor (purinoceptor), makes of this signaling system one of the most important regarding the regulation of body homeostasis.

The role of nucleotides and their receptors in the proliferation and differentiation processes of osteoblasts has been studied for about 25 years. However, the complete elucidation of the regulatory mechanisms of these processes has not yet been reached.

The aim of this work was to determine the effects of the activation of purinergic receptors by extracellular nucleotides in the processes of cell migration, proliferation and differentiation in neonatal rat calvaria primary cultures. We also investigated the effect of a high concentration of extracellular calcium on cell proliferation and differentiation and its influence on the regulation of these processes by purinergic stimulation. In addition, the role of the GSK3 enzyme (by inhibition with lithium) was evaluated in the regulation of cell proliferation and differentiation. Finally, the effect of the mentioned agonists on the expression and localization of β -catenin was examined.

Cell migration was assessed by "wound assay". Treatment with nucleotides showed to stimulate the migration of the calvaria cells.

The proliferation process was studied by using flow cytometry, Neubauer chamber count and Crystal Violet staining. The results obtained attribute positive effects to the extracellular nucleotides. On the other hand, treatment with Lithium caused decreases in the proliferative capacity of the cells. While no changes in proliferation were observed by incubation of the cells in medium with high concentration of extracellular calcium.

The analysis of cell differentiation to an osteoblastic phenotype was carried out by measurements of Alkaline Phosphatase (FAL) enzyme activity, quantification of mRNA of osteoblastic maturation / differentiation markers by QRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) and detection of mineralization by Alizarin red staining. In this regard, treatment with ATP γ S exhibited a pro-osteogenic role, by raising the enzymatic activity of FAL, the gene expression of differentiation markers and the mineralizing capacity. In contrast, the UTP agonist did not induce changes in enzyme activity and, in most cases, repressed the transcription of osteogenic genes.

On the other hand, exposure to lithium increased FAL activity but repressed the expression of osteogenic genes and decreased the mineralization of the cultures.

A high concentration of extracellular calcium showed positive effects at the level of differentiation, increasing the FAL activity and mineralization of osteoblasts.

Finally, the treatment of cultures with extracellular nucleotides in medium containing high calcium concentration showed slight additive / synergistic effects in the stimulation of differentiation into bone-forming cells.

Expression of β -catenin was increased under treatment with extracellular nucleotides, Lithium or Calcium. Also nucleus translocation was increased by these treatments.

According to the results obtained in this work, a regulatory role on osteoblastic physiology can be attributed to the purinergic signaling system and GSK3 / β -catenin.

Abreviaturas

Abreviaturas

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

PLC: Fosfolipasa C

AC: Adenilato ciclasa

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

MMP-9: Metaloproteínasa de matriz 9

PTH: Paratiroidea

TM: Transmembrana

UEVCs: Células endoteliales de vena umbilical

MSCs: Células madre mesenquimales

BMP: Proteína morfogenética ósea

Runx2: Factor de transcripción relacionado a runt-2

Col1: Colágeno tipo I

FAL: Fosfatasa Alcalina

BSP: Sialoproteína ósea

OCN: Osteocalcina

RTK: Receptor tirosina quinasa

IL: Interleuquina

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral- β

IGF: Factor de crecimiento insulínico

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

HSC: Células madre hematopoyéticas

HA: Hidroxiapatita

TNFR: Receptor de factor de necrosis tumoral

XTP: Xantosina trifosfato-

ITP: Inosina trifosfato

GTP: Guanosina trifosfato

ATP: Adenosina trifosfato

CTP: Citosina trifosfato

UTP: Uridina trifosfato

ATP γ S: Adenosina 5'-(γ -tiotriofosfato)

ADP β S: Adenosina 5'-O-(2-tiodifosfato)

GTP γ S: Guanosina 5'-(γ -tiotriofosfato)

AMPpcp: Adenililmetilendifosfonato

2- MeSATP: 2-Metiloadenosina trifosfato
PPADS: piridoxal fosfato-6-azofenil-2', 4' ácido disulfónico
CMLV: células musculares lisas vasculares
LPS: Lipopolisacárido
LDH: Lactato deshidrogenasa
AT: Azul de tripano
CV: Violeta cristal
CXCL12 o SDF-1: Factor derivado de célula estromal-1
PTEN: Fosfatidilinositol-3, 4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
IGFR: Receptor del factor de crecimiento insulínico
FGFR: Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
VEGF: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
P2Y2R: Receptor purinérgico P2Y2
P2Y4R: Receptor purinérgico P2Y4
P2Y6R: Receptor purinérgico P2Y6
ERK1/2: Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
JNK: Quinasa c-Jun N-terminal
QRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
GSK3: Glicógeno sintasa quinasa
EGR1: Proteína de respuesta temprana al crecimiento-1
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
PLD: Fosfolipasa D
LPA: Acido lisofosfatídico
PLA2: Fosfolipasa A2
CaSR: Receptor sensor de calcio

Índice

Índice

INTRODUCCIÓN	2
El esqueleto	2
Los huesos	2
Composición del tejido óseo	3
Células óseas	3
Remodelación ósea	5
Patologías óseas	6
Generalidades sobre abordajes terapéuticos de patologías óseas.....	8
Importancia de profundizar en el hallazgo de terapias que estimulen la formación de hueso	8
Importancia del estudio de mecanismos y vías de señalización que modulan la proliferación, migración y diferenciación de osteoblastos	10
Señalización purinérgica.....	11
Receptores purinérgicos	11
Receptores P1	12
Receptores P2Y.....	13
Rol fisiológico de los receptores P2Y.....	15
Fisiopatología y potencial terapéutico de receptores P2Y.....	16
Receptores P2X	17
Fisiología de receptores P2X	19
Fisiopatología y potencial terapéutico de receptores P2X	21
Liberación celular de nucleótidos	22
Rol de receptores purinérgicos en hueso	23
Señalización purinérgica en osteoblastos	25
Regulación de la migración de osteoblastos por receptores purinérgicos	27
Regulación de la proliferación de osteoblastos por receptores purinérgicos	28
Regulación de la diferenciación de osteoblastos por receptores purinérgicos	29
Mecanismos de liberación de nucleótidos en osteoblastos	30
Glicógeno sintasa quinasa.....	32
β -catenina	34
Regulación de la actividad osteoblástica y homeostasis ósea por GSK3 y rol de beta-catenina.....	35
Nucleótidos extracelulares, receptores purinérgicos y GSK3	37
Nucleótidos extracelulares, receptores purinérgicos y β -catenina	39

Regulación purinérgica de β -catenina, mediada por GSK3, en células óseas.....	40
Efecto del Calcio extracelular en la formación y función osteoblásticas.....	41
HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVOS.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
Materiales	47
Obtención de células calvariales de rata neonata	47
Cultivo celular y tratamiento.....	48
Recuento en hemocitómetro	49
Tinción con azul de tripano (AT)	49
Determinación de viabilidad celular	49
Citometría de flujo	49
Actividad Fosfatasa Alcalina (FAL).....	50
Mineralización (Tinción con RA).....	50
Extracción de ARN y transcripción reversa	50
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)	51
Inmunofluorescencia.....	52
Ensayo de la herida (migración).....	52
Tinción con colorante de Giemsa.....	52
Tinción con IP	53
Tinción con Cristal Violeta.....	53
Análisis estadístico	53
RESULTADOS	55
Participación de receptores purinérgicos en la regulación de la migración, de células calvariales de rata	55
Efecto de ATP γ -S sobre la viabilidad de células calvariales de rata, en medio base (MB).....	56
Efecto de ATP γ -S sobre la proliferación de células calvariales de rata, en MB	57
Efecto de ATP γ -S sobre la viabilidad de células calvariales de rata, en medio osteogénico (MO)	58
Efecto de ATP γ -S sobre la proliferación de células calvariales de rata, en MO	59
Efecto de ATP γ -S a nivel del ciclo celular, de células calvariales de rata	60
Rol de la vía PI3K/AKT en la activación del ciclo celular por ATP, en células calvariales de rata	61
Rol del calcio extracelular y efecto del ATP sobre la viabilidad y proliferación de células calvariales de rata, en MB.....	63
Rol del calcio extracelular y efecto del ATP sobre la viabilidad y proliferación de células calvariales de rata, en MO	66

Efecto de LiCl sobre la viabilidad y proliferación, de células calvariales de rata	69
Efecto de nucleótidos extracelulares sobre la diferenciación, de células calvariales de rata	70
Efecto de nucleótidos extracelulares sobre la actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina, de células calvariales de rata	71
Rol del calcio extracelular y efecto de nucleótidos sobre la actividad FAL, de células calvariales de rata	72
Efecto de LiCl sobre la actividad enzimática de FAL, de células calvariales de rata	75
Rol del LiCl y efecto de nucleótidos sobre la actividad FAL, de células calvariales de rata	76
Efecto de nucleótidos extracelulares y LiCl sobre la expresión de genes relacionados con diferenciación osteoblástica, de células calvariales de rata	77
Expresión de Runx2	77
Expresión de Osterix (OSX).....	80
Expresión de Osteocalcina (OCN).....	81
Expresión de Osteopontina (OPN)	83
Expresión de Colágeno tipo I (Col I)	85
Expresión de Osteoprotegerina (OPG).....	88
Expresión de Sialoproteína Ósea (BSP)	89
Expresión de BMP6	91
Expresión de BMP7	92
Rol del calcio extracelular y efecto de nucleótidos sobre la la expresión de Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs), en células calvariales de rata.....	94
Expresión de BMP3	94
Expresión de BMP4	96
Expresión de BMP5	98
Estudio de la expresión y localización de β -catenina.....	100
Efecto de nucleótidos extracelulares sobre la capacidad de mineralización, de células calvariales de rata	104
Rol del calcio extracelular y efecto de nucleótidos sobre la capacidad de mineralización, de células calvariales de rata	105
Efecto de LiCl sobre la capacidad de mineralización, de células calvariales de rata	107
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES	135
TRABAJOS GENERADOS DURANTE ESTA TESIS.....	138
Publicaciones científicas.....	138
Presentaciones a congresos	138
REFERENCIAS.....	141

Introducción

INTRODUCCIÓN

El esqueleto

El esqueleto fue originalmente catalogado como una estructura con funciones restringidas a la locomoción del cuerpo y el sostén y protección de los órganos y cavidades internas. Con el pasar de los años, esta estructura, comienza a ser vista como un sistema mucho más complejo, siendo, además capaz de modificar su masa y morfología a las demandas funcionales, autorrepararse sin dejar cicatriz, regular la homeostasis mineral del cuerpo, e, incluso, cumplir una función endocrina (Sommerfeldt y Rubin, 2011; Titorencu y col., 2014; Lee y Karsenty, 2008). Consta de poco más de 200 elementos óseos, o huesos, los cuales presentan diversas formas, tamaños y ubicaciones (Karsenty y col., 2009)

Los huesos

De acuerdo a su morfología, los huesos han sido clasificados en distintos tipos: cortos, largos, planos o irregulares. Por otro lado, teniendo en cuenta la densidad del tejido óseo, se puede hablar de hueso trabecular y hueso compacto. Respecto de su formación y desarrollo, se evidencian dos tipos de procesos, la osificación endocondral y la osificación intramembranosa (Karsenty y col., 2009; Dirckx y col., 2013). En el primero de éstos, la formación ósea ocurre sobre un sustrato cartilaginosa preexistente. Este modelo de cartílago inicial es generado a partir de la condensación de células madre mesenquimales (MSCs), las cuales se diferencian en condrocitos que comienzan a secretar los componentes de la matriz cartilaginosa extracelular. Luego, ésta es invadida, al principio por el centro y luego en los extremos, por vasos sanguíneos, osteoclastos y osteoblastos, conformándose los centros de osificación primario y secundario. Aquí comienza la síntesis de tejido óseo, hasta abarcar el resto del modelo cartilaginosa, el cual será reemplazado en toda su extensión excepto en la superficie articular (Mackie y col., 2007). La osificación intramembranosa difiere del proceso recién descrito en el hecho de que las MSCs, que predeterminan la forma y localización del futuro elemento esquelético, soslayan la formación del intermediario cartilaginosa y se diferencian directamente en células maduras formadoras de hueso (Karsenty y Wagner, 2002).

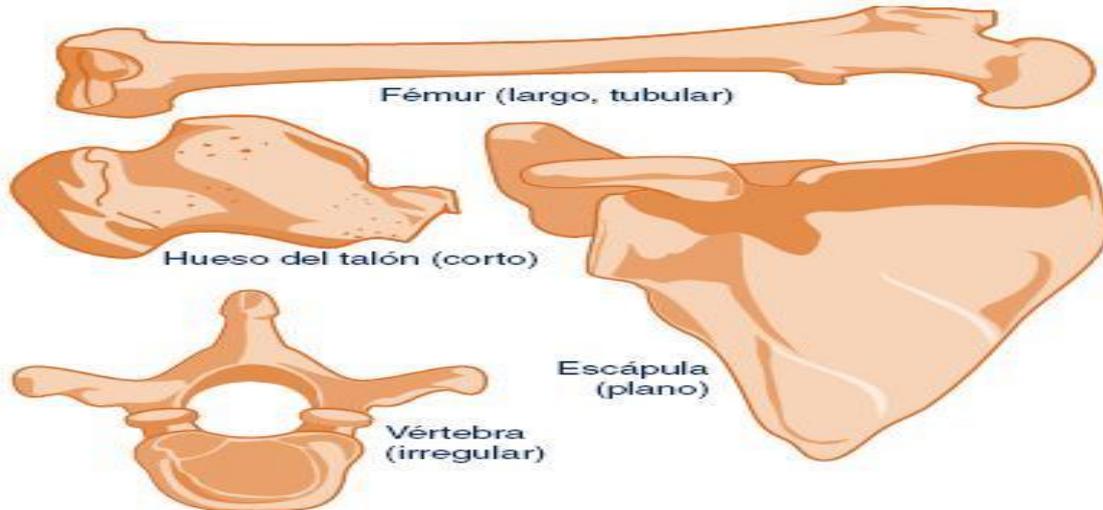


Figura 1. Tomada de: <http://biohumana35.blogspot.com.ar/2011/06/tipos-de-huesos.html>.

Composición del tejido óseo

El tejido óseo está formado por una matriz y diversos tipos celulares, además de agua (5%). Esta matriz, a su vez, tiene un componente orgánico y uno inorgánico. El primero, denominado osteoide, comprende alrededor del 25% del total. Está compuesto por diversas proteínas, entre las que destaca por su cantidad (90% de total) el colágeno tipo 1. El 10% restante está representado por proteoglicanos (condroitin sulfato, heparán sulfato), proteínas de anclaje (Sialoproteína ósea, osteopontina, fibronectina), proteínas gamma-carboxiladas (Osteocalcina) y factores de crecimiento (TGF- β , IGF). Algunas de estas proteínas, dado su gran poder para atraer iones, son importantes para el proceso de mineralización, donde sobre la matriz orgánica, en la estructura tridimensional delimitada por las fibrillas de colágeno y demás proteínas, se depositan cristales inorgánicos de calcio y fosfato, que dan lugar a la hidroxiapatita, que representa alrededor del 75% del material óseo (Sommerfeldt y Rubin, 2001; Titorencu y col., 2014)

Células óseas

Existen 3 tipos celulares principales que integran el tejido óseo. Los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos. Los primeros son células gigantes, multinucleadas, con gran capacidad lítica, cuya función principal es la eliminación de hueso, o resorción ósea. Derivan de las células madre hematopoyéticas (como sus primos, los macrófagos), y tienen alta capacidad migratoria, un arsenal de enzimas lisosomales y muchas mitocondrias (Sommerfeldt y Rubin, 2001).

Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar la matriz extracelular sobre superficies óseas en formación. Representan el 4-6% del total de las células residentes en el hueso (Capulli y col., 2014). Se trata de entidades de forma cuboidal, con núcleo basal, retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi muy desarrollados, y gran cantidad de vesículas de secreción conteniendo estructuras fibrilares. Estas células están preparadas para secretar gran cantidad de proteínas y otros metabolitos (Titorencu y col., 2014).

Además de la función tradicional de producir hueso, los osteoblastos son capaces de regular el desarrollo mieloide y hematopoyético, al secretar diversas citoquinas y factores de crecimiento (Panaroni y col., 2014). Recientemente, se ha encontrado evidencia para un rol de tipo endocrino, donde dos metabolitos sintetizados y secretados por el osteoblasto, el FGF23 y la Osteocalcina, actuarían como hormonas, regulando los niveles séricos de fósforo y 1,25-dihidroxitamina D3, y el metabolismo energético, respectivamente (Fukumoto y Martin, 2009).

Por último, los osteocitos son osteoblastos completamente diferenciados, que han quedado atrapados en lagunas rodeadas de matriz mineralizada. De tamaño más pequeño que sus predecesores y con menor cantidad de organelas, son capaces de emitir prolongaciones citoplasmáticas, a través de canaliculos, adoptando una morfología dendrítica, de manera de comunicarse con el resto y formar así una intrincada red de señalización intercelular, encargada de evaluar el estado de salud/integridad del tejido. Así, cuando es requerido, son capaces de poner en marcha la maquinaria de las unidades multilamelares óseas, representadas por osteoclastos y osteoblastos, las cuales eliminarán hueso viejo o dañado para reemplazarlo por uno nuevo y fresco (Sommerfeldt y Rubin, 2001).

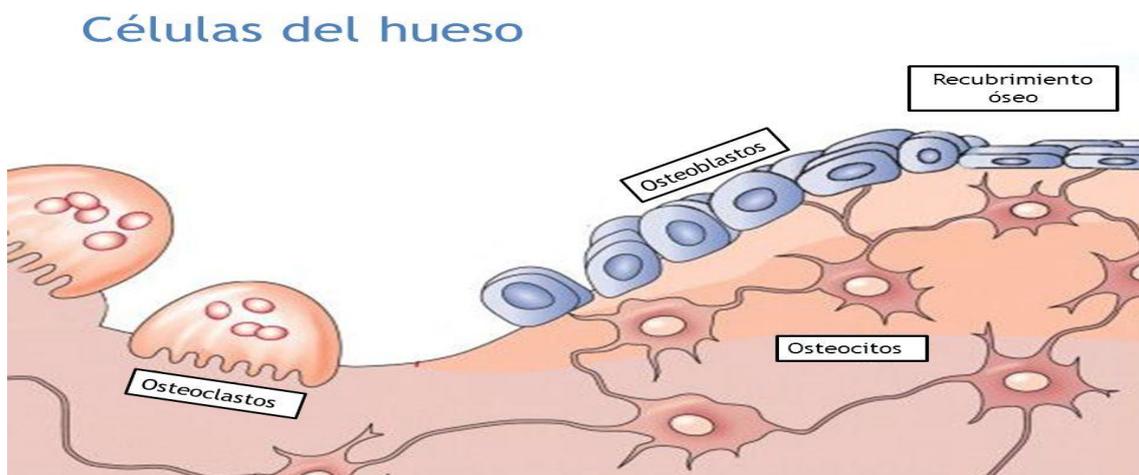


Figura 2: Tomada de: <http://slideplayer.es/slide/5594872/>.

Remodelación ósea

La remodelación consiste en un proceso altamente coordinado de resorción y formación ósea, que ocurre durante toda la vida (Xiao y col., 2016; Schett y col., 2009; Jiao y col., 2015), y cuyo objetivo es mantener la integridad del esqueleto, reemplazando hueso viejo por tejido nuevo (Marie y Kassem, 2011). Esto significa que el tejido óseo existente es removido por los osteoclastos, y luego vuelve a formarse por acción de los osteoblastos, que generan una matriz proteica no mineralizada (osteóide), sobre la cual se depositan, posteriormente, cristales de hidroxapatita. Todo este proceso es llevado a cabo en las denominadas unidades multilamelares óseas. La remodelación es iniciada y regulada por varios factores, entre los que cuentan la inflamación, niveles de hormonas y estimulación mecánica (Xiao y col., 2016).

Además de osteoblastos y osteoclastos, los osteocitos juegan un papel fundamental en el proceso de remodelación ósea, detectando diferentes estímulos y activando las unidades multilamelares óseas. Sumado a los tres tipos celulares que forman el hueso, células del sistema inmune también participan del proceso (neutrófilos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T y B) (Takayanagi 2007; Graves y col., 2011), liberando factores al medio extracelular (prostaglandinas, leucotrienos, quemoquinas, interleuquinas, etc) que regulan la formación de los osteoclastos, entre otros (Schett y col., 2011).

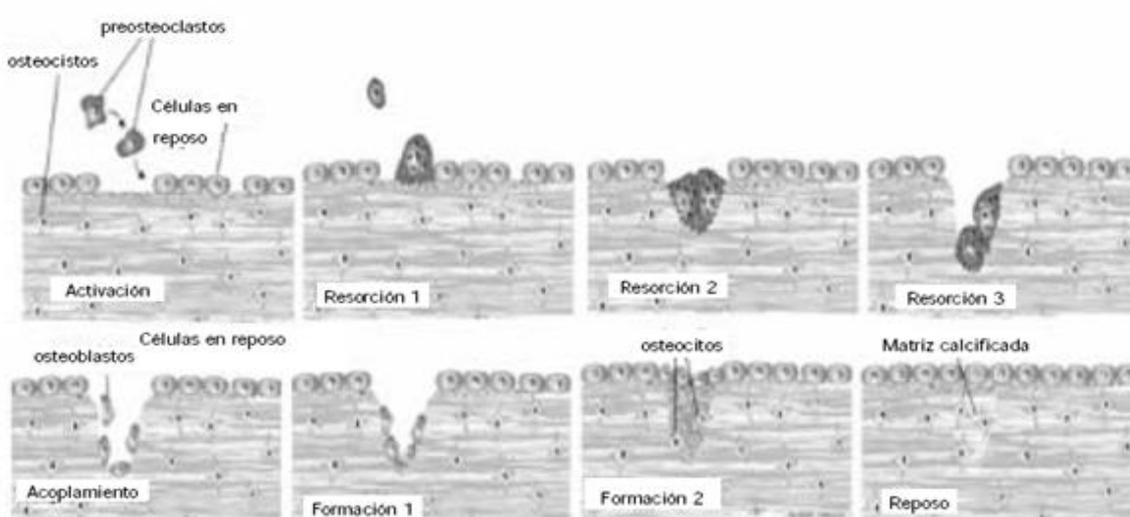


Figura 3. Esquema representativo de una unidad multilamellar durante el remodelado óseo (Reynaga Montecinos y Zeni, 2009).

Patologías óseas

Muchas enfermedades óseas tienen su origen en la pérdida del balance existente entre resorción y formación óseas. Con el paso del tiempo la tasa de recambio óseo aumenta, debido a una disminuída generación ósea, e incrementada eliminación de hueso. Esto es consecuencia de disminuciones en el número y actividad de los osteoblastos (Khosla y Riggs, 2005; Manolagas y Parfitt, 2010; Marie y Kassem, 2011). Con la disfunción osteoblástica, la formación de hueso trabecular y periosteal decrecen. Esto conlleva a reducciones notables en el grosor del tejido.

Dentro de las enfermedades provocadas por el desbalance en la remodelación ósea, la más importante es la osteoporosis, en términos del número de personas afectadas y los costos en salud pública generados. Cientos de millones de personas alrededor del mundo, particularmente mujeres posmenopáusicas y ancianos, son afectadas por esta condición (Baron y Kneissel, 2013), gastándose decenas de miles de millones de dólares al año (Tosteson y Hammond, 2002). En 2014, solo en Estados Unidos (EEUU), 10 millones de personas fueron diagnosticadas con la enfermedad (Asafo-Adjei y col., 2016). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), 75 millones padecen osteoporosis en EEUU, Europa y Japón (Wright y col., 2014; Johnell y Kanis, 2006). Un total de 9 millones de fracturas asociadas a la patología ocurren por año, es decir 1 cada 3 segundos (Blume y Curtis, 2011). Respecto de los costos, se estiman gastos por 25000 millones de dólares para 2025, solo en EEUU (Asafo-Adjei y col., 2016). Por su parte, en Europa el costo derivado de fracturas osteoporóticas alcanzó los 36000 millones de dólares en el año 2000, y se espera un aumento a 77000 millones para 2050 (Kanis y Johnell, 2005; Pietschmann y col., 2009).

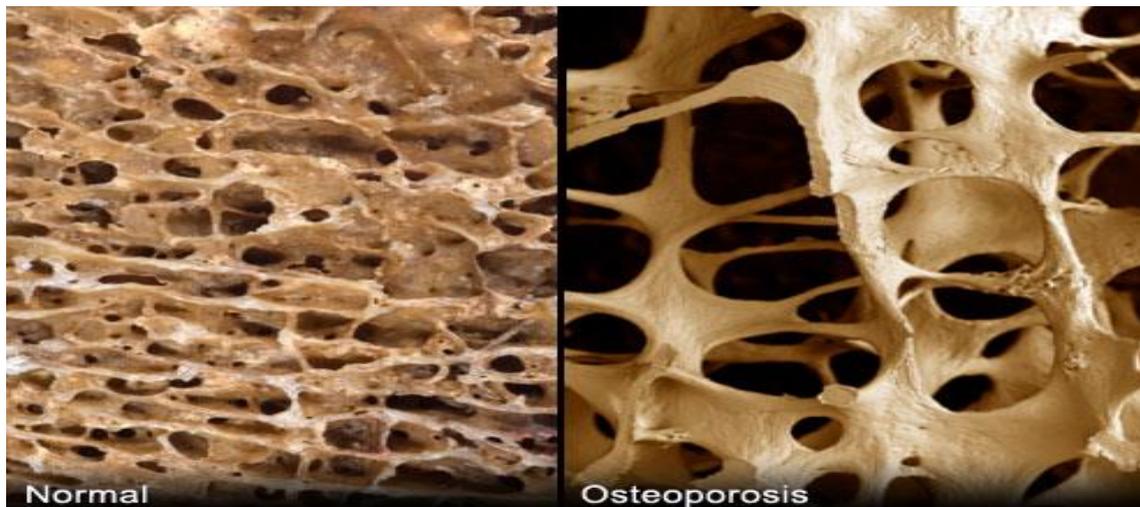
La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por disminuída masa y fuerza ósea, huesos con macrogeometría alterada, microarquitectura deteriorada y aumentada fragilidad (Khosla y Riggs, 2005; Asafo-Adjei y col., 2016). Las reducciones en la cantidad y calidad de hueso, conllevan un incrementado riesgo de fracturas (Asafo-Adjei y col., 2016).

Según datos de la Fundación Internacional de Osteoporosis (IOF) de América Latina, en Argentina, una de cada tres mujeres mayores de 50 años sufre de osteoporosis. Más de 34 mil fracturas de cadera se producen cada año en los habitantes de 50 años o más, con un promedio de 90 fracturas por día. El costo de las fracturas vertebrales y de cadera por osteoporosis se estima en aproximadamente 250 millones de dólares por año. Además, otro dato preocupante: se estima que en 2025, alrededor de 3,3 millones de mujeres sufrirán de osteopenia; y en 2050, cerca de 5,24 millones. Las malas

condiciones alimenticias, el sedentarismo y la falta de información y prevención han permitido que de a poco la afección fuera ganando lugar.

Otras patologías óseas que tienen su causa y/o se caracterizan por defectos en la proliferación, diferenciación y/o función de los osteoblastos son la osteogénesis imperfecta y la osteoartritis (Titorencu y col., 2014). La primera se trata de un síndrome heredable, donde los osteoblastos producen una matriz extracelular de cantidad y calidad alteradas, lo que resulta en aumentada fragilidad y riesgo de fractura (Byers y Steiner, 1992; Kalajzic y col., 2002). Por su parte, en la osteoartritis el proceso de remodelación ósea se ve afectado. Además, el metabolismo de los osteoblastos ubicados en el tejido subcondral esta alterado, mostrando, entre otros, elevados niveles de actividad FAL y secreción de OCN (Hilal y col., 1998; Titorencu y col., 2014).

A)



B)

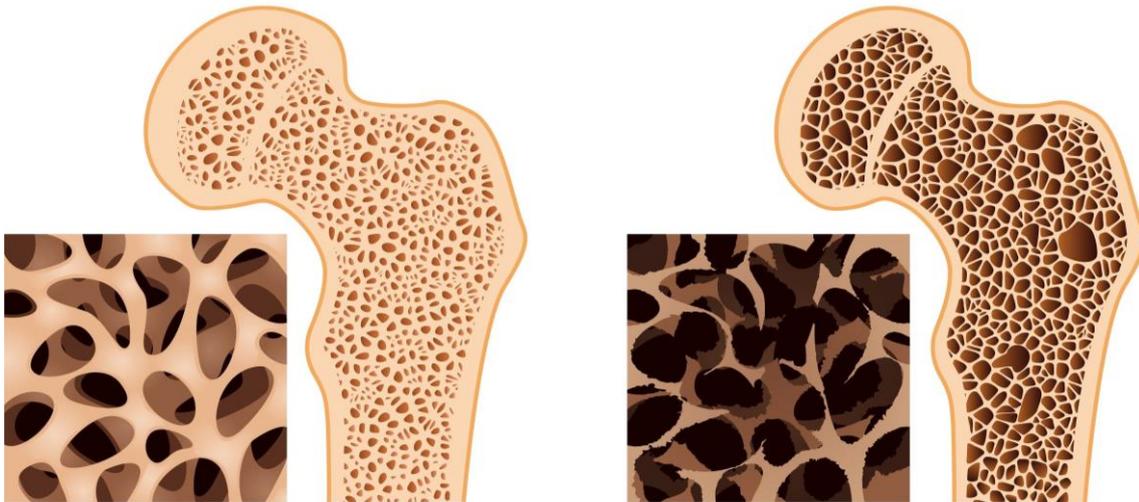


Figura 4. Características del hueso normal (izquierda) y afectado por osteoporosis (derecha). A. Tomada de: <http://www.quedieta.com/dieta-medica/osteoporosis>. B. Adaptada de: <http://www.centroginecologicoescalante.com/osteoporosis/>.

Generalidades sobre abordajes terapéuticos de patologías óseas

La estrategia tradicional para el tratamiento de patologías que cursan con aumentado recambio y disminución de la masa ósea se basa en la inhibición de la resorción, mediante la acción de diversos agentes farmacológicos a nivel del osteoclasto (Estrógenos, moduladores selectivos de receptores de estrógeno, Calcitonina, Bisfosfonatos, Ranelato de Estroncio, etc). Sin embargo, además de frenar la resorción, también se detiene la formación de nuevo hueso (Lyritis y col., 2010). Esto se debe a que los procesos de resorción y formación ósea se encuentran acoplados, y una disminución en la actividad de los osteoclastos impacta negativamente en la formación de hueso nuevo, por parte de los osteoblastos (Sun, 2008).

Importancia de profundizar en el hallazgo de terapias que estimulen la formación de hueso

Como ya se ha explicado, los tratamientos actuales tienen como objetivo detener la actividad resortiva de los osteoclastos, de manera de retrasar la eliminación de más hueso. Sin embargo, el daño provocado no puede ser reparado de esta manera, y el hueso pierde calidad y fuerza (Toulis y col., 2011).

La estrategia alternativa se basa en el fomento de la formación de hueso nuevo. Este tipo de terapias se denominan anabólicas. Una de estas consiste en la administración intermitente de hormona Paratiroidea (PTH), la cual ha mostrado eficacia en aumentar la masa ósea y prevenir fracturas (Trivedi y col., 2010), y mejorar la calidad del hueso

(Borggreffe y col., 2010). Los efectos son ejercidos a varios niveles. La administración de PTH previene la apoptosis de los osteoblastos (Jilka y col., 1999), induce la síntesis de IGF-1 y reprime la expresión de esclerostina (Keller y Kneissel, 2005), activa la vía de Wnt (Canalis, 2010) y promueve la expresión de genes como el del Factor de Transcripción Relacionado a Runt-2 (Runx2) (Martin y col., 2008). Todo esto resulta en aumentos en el número y la actividad de los osteoblastos, en la tasa de remodelación ósea junto con la cantidad de hueso depositado, en la conectividad y grosor trabeculares, en el grosor cortical y en el tamaño del hueso (Hodsman y col., 2005). De esta manera, PTH no solo incrementa la masa ósea, sino también su calidad, mejorando la microarquitectura y geometría (Borggreffe y col., 2010; Trivedi y col., 2010).

Sin embargo, existen algunas desventajas. Se han detectado aumentos en los parámetros de resorción ósea (Gallacher y Dixon, 2010). Existen efectos secundarios a corto plazo, entre los que se cuentan mareos, calambres en las piernas, hipercalcemia e hipercalciuria. Además, se informó riesgo de osteosarcoma en ratas, pero vale la pena aclarar que se administraron dosis mucho más altas que las aprobadas para humanos y durante períodos de tiempo muy prolongados (Vahle y col., 2002; Jolette y col., 2006). Por otro lado, no existe evidencia de aumentado riesgo de osteosarcoma en seres humanos, en la actualidad. Dado esto, se ha establecido una duración máxima del tratamiento de 24 meses, aunque se han publicado experiencias de hasta 3 años (Zanchetta y col., 2010). La terapia no puede ser empleada en pacientes con enfermedad de Paget, irradiados, con elevaciones inexplicables de Fosfatasa Alcalina (FAL) Ósea y adolescentes con epífisis abiertas. Solo es recomendada en mujeres postmenopáusicas mayores de 55-60 años y con intolerancia a la administración oral de Bisfosfonatos y Ranelato de Estroncio. Por último, el tratamiento es costoso y las inyecciones deben aplicarse diariamente (Toulis y col., 2011).

Los bisfosfonatos son los compuestos más ampliamente empleados para tratar la osteoporosis y otras afecciones que cursan con pérdida de masa ósea (Sun, 2008). Sin embargo, se ha informado que su uso provoca efectos secundarios, el porcentaje de pacientes que respeta el tratamiento es bajo, y el recambio óseo está muy suprimido, lo que produce un hueso de baja calidad (Odvina y col., 2005; Maricic, 2007). Por otro lado, Chesnut, 2006, afirmó que el Ibandronato, administrado apropiadamente, reduce el riesgo de fracturas, al aumentar la densidad mineral ósea (BMD) y disminuir el recambio óseo sin comprometer la calidad del hueso, y tiene un perfil de seguridad similar a un placebo. Además, Duque y Rivas, 2007, informaron que el Alendronato ejerce efectos anabólicos al inducir diferenciación osteoblástica en MSC.

El Ranelato de Estroncio es capaz de estimular la proliferación de los osteoblastos, al activar a Receptor Sensor de Calcio, y de aumentar la producción de OPG, al mismo

tiempo que disminuye la de RANKL (Marie, 2006). Choudhary y col., 2007, han mostrado inducción de diferenciación osteogénica y aumentos en la capacidad mineralizante de células estromales de médula ósea. De esta manera, Ranelato de Estroncio presenta un efecto dual, al estimular la formación ósea y reducir la resorción. Por último, se ha demostrado en ensayos clínicos que este agente reduce el riesgo de fractura vertebral en un 38%, en los 3 primeros años, y un 52% durante el primer año, y disminuye el riesgo de fractura no-vertebral un 16% (Roux, 2007). Además, no ha mostrado efectos adversos ni pérdida de eficacia en tratamientos de 5 años de duración (Reginster y Sarlet, 2006). En enero de 2014, el Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia europeo (PRAC) recomendó la suspensión de comercialización de este agente farmacológico por evidenciarse aumentado riesgo de enfermedad cardiovascular.

Por su parte, el tratamiento con Calcitonina ha mostrado reducir las fracturas vertebrales alrededor de un 40% en pacientes osteoporóticos (Uzzan y col., 2007), sin presentar efectos secundarios severos. Sin embargo, no es efectiva a nivel de fracturas no-vertebrales, la administración es parenteral, intramuscular o intranasal (aunque se están investigando formulaciones orales) (Sondergaard y col., 2007) y el uso prolongado reduce la eficacia del tratamiento, por internalización de receptores (Huang y col., 2006).

Importancia del estudio de mecanismos y vías de señalización que modulan la proliferación, migración y diferenciación de osteoblastos

El blanco de las terapias anabólicas es la célula formadora de hueso, el osteoblasto. Para que el desarrollo de estas terapias sea posible, es necesario conocer y entender su bioquímica y fisiología celular. Para esto, es indispensable un exhaustivo y detallado estudio de los mecanismos y vías de señalización que regulan la proliferación, migración y diferenciación de los osteoblastos y sus progenitores (Lyritis y col., 2010).

Actualmente, la información disponible respecto del rol del sistema de señalización purinérgico en la modulación de la formación y función osteoblásticas es contundente, haciendo de las vías de señalización reguladas por ATP y otros nucleótidos un atractivo blanco de investigaciones tendientes al desarrollo y diseño de nuevas terapias anabólicas para el tratamiento de la osteoporosis y enfermedades con déficit en la formación de hueso (Toulis y col., 2011).

Señalización purinérgica

El término “purinérgico” fue acuñado por Burnstock en 1972 (Purinergetic Nerves) para hacer referencia a la, entonces, potencial capacidad del ATP de actuar como una molécula de señalización extracelular, específicamente como un neurotransmisor (Burnstock, 1972).

Desde la publicación de ese artículo, en 1972, hasta la aceptación de la “hipótesis purinérgica” transcurrieron muchos años. Para que el ATP pudiera actuar como una molécula de señalización intercelular, necesitaba de un receptor de membrana al cual pudiera unirse y así desencadenar una respuesta celular.

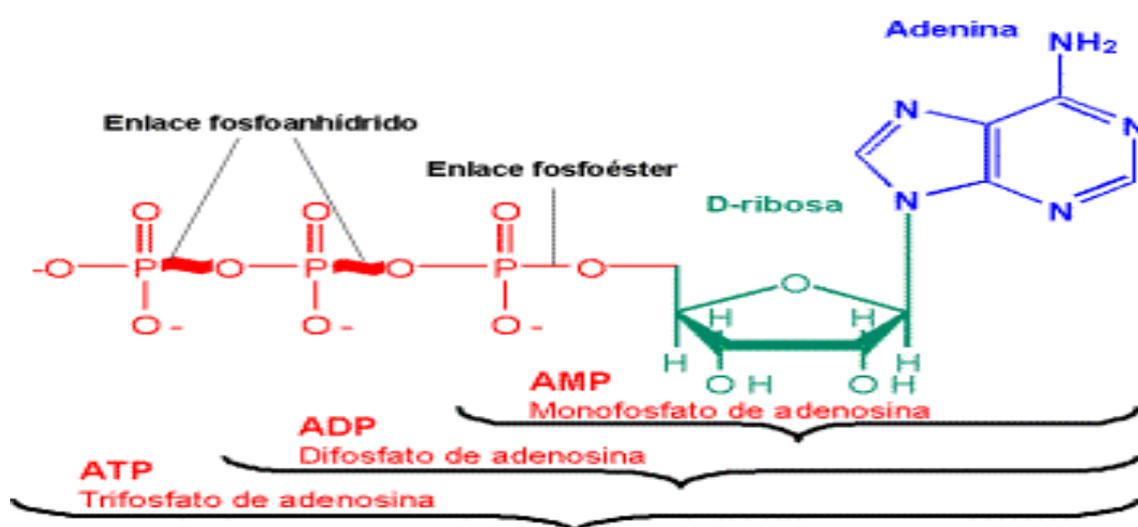


Figura 5. Estructura de ATP, ADP y AMP. Tomada de: <http://gmein.uib.es/moleculas/ATP/ATPjmol.html>.

Receptores purinérgicos

Primeramente, se describió la existencia de dos tipos de receptores, P1 y P2, los cuales respondían a nucleósidos (adenosina) y nucleótidos (ATP, ADP), respectivamente. Luego, se dividirían los receptores P2 en 2 grupos, P2X y P2Y (Burnstock, 2012).

Sin embargo, no fue hasta principios de la década de 1990 que los primeros receptores purinérgicos fueron clonados y caracterizados (Lustig y col., 1993; Webb y col., 1993; Brake y col., 1994; Valera y col., 1994). Al día de hoy, se ha demostrado la existencia de 4 subtipos de receptores P1 (A1, A2A, A2B y A3), y 2 subfamilias de receptores P2, P2X (ionotrópicos) y P2Y (metabotrópicos), los cuales, a su vez, se subdividen en 7 (P2X1,2,3,4,5,6 y 7) y 8 subtipos (P2Y1,2,4,6,11,12,13 y 14), respectivamente.

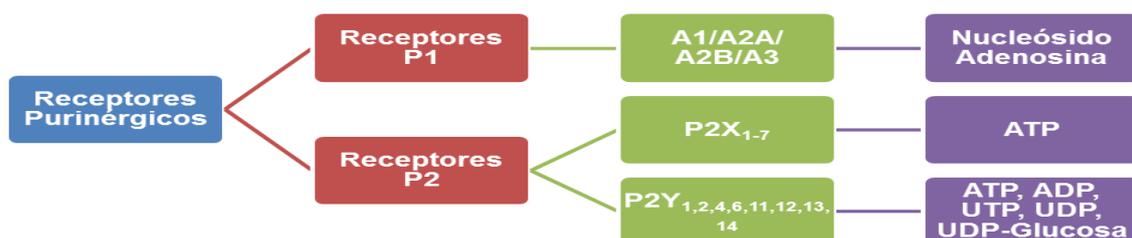


Figura 6. Esquema de los distintos receptores purinérgicos y sus agonistas.

Desde un punto de vista estructural y funcional, los receptores P1 y P2Y son proteínas con siete dominios transmembrana, y se encuentran acoplados a proteína G. En cambio, los receptores P2X son canales iónicos (Burnstock, 2007; 2012).

En lo concerniente a su distribución y localización, la expresión de receptores P ha sido demostrada en la mayoría de las células y tejidos del cuerpo humano (Burnstock y Knight, 2004)

Receptores P1

Se han descrito 4 receptores purinérgicos P1, A1, A2A, A2B y A3 (Rabadi y Lee, 2015). Todos pertenecen a la familia de Receptores Acoplados a Proteína G (GPCR) y son activados exclusivamente por Adenosina. Los receptores A1 y A3 señalizan mediante una subunidad Gi, la cual provoca inhibición de Adenilato Ciclasa (AC). Por otro lado, la activación de los subtipos A2A y A2B resulta en aumento de AMP cíclico por activación de una subunidad Gs que estimula a AC (Hasko y col., 2008; Vallon y Osswald, 2009). Dado que en la presente Tesis se emplearon nucleótidos como agonistas, los purinoceptores P1 no fueron estudiados.

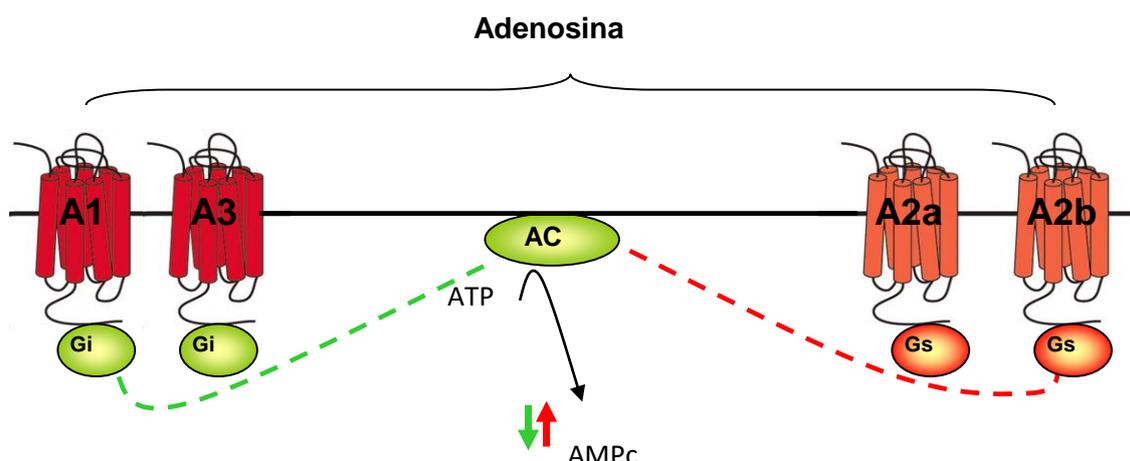


Figura 7: Esquema representativo de receptores P1 y sus principales vías de señalización.

Receptores P2Y

Los receptores P2Y pertenecen a la familia de GPCR (Burnstock y Kennedy, 1985), específicamente a la clase A, rama δ (Fredriksson y col., 2003; Lagerstrom y Schioth, 2008). Como cualquier receptor de esta familia, presentan siete dominios transmembrana, conectados por tres segmentos intracelulares y tres extracelulares (Zhang y col., 2014). Cuatro residuos cisteína forman dos puentes de hidrógeno en la zona extracelular, uno entre el dominio N-terminal y el segmento extracelular 3, y el otro entre los dos segmentos restantes (Hoffmann y col., 1999; Algaier y col., 2008). Las zonas involucradas en el reconocimiento de ligandos se encontrarían en los segmentos transmembrana 3, 6 y 7 (von K ugelgen y Harden, 2011; Coster y col., 2012).

Los receptores P2Y son capaces de formar homo- y heterodímeros (Milligan, 2009; Albizu y col., 2010; Suzuki y col., 2006). Más aun, existe evidencia de que pueden formar grandes agregados oligoméricos con distintos tipos de receptores (GPCRs, canales iónicos, RTK, receptores de hormonas esteroideas), modulando la actividad y/o expresión de éstos (Bilbao y col., 2011).

Existen 8 subtipos en seres humanos, los cuales se expresan en casi todas las células y tejidos (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12,13 y 14), pero además se encuentran en numerosas especies animales (Dranoff y col., 2000). Vale aclarar que el gen del receptor P2Y11 no

se encuentra en roedores (ratones, ratas), y la variante canina tiene un 70% de homología con el receptor humano (Qi y col., 2001; Torres y col., 2002).

Respecto de sus características estructurales, farmacológicas y transductoras, los purinoceptores P2Y se subdividen en 2 grupos (Abbracchio y col., 2006). El primero está formado por P2Y1, 2, 4, 6 y 11. Estos receptores se unen a proteínas Gq, con la consecuente activación de fosfolipasa C (PLC) y aumento en la hidrólisis de inosítoles fosfato y movilización intracelular de Calcio desde reservorios internos (Henderson y col., 1995; Tokuyama y col., 1995; Janssens y col., 1996; Leon y col., 1996; Chhatriwala y col., 2004; Waldo y Harden, 2004; Lustig y col., 1993; Parr y col., 1994; Lazarowski y col., 1995). El receptor P2Y11, además, puede activar Adenilato Ciclasa (AC), vía proteínas Gs (Communi y col., 1997; Qi y col., 2001; Zamboni y col., 2001; Meis y col., 2010). Por su parte, el segundo grupo, conocido como subfamilia del receptor P2Y12 (conformado por P2Y12, 13 y 14), se acopla a proteínas Gi, conduciendo a la inhibición de AC o a la regulación de la actividad de canales iónicos (Foster y col., 2001; Hollopeter y col., 2001; Takasaki y col., 2001; Chhatriwala y col., 2004; Communi y col., 2001; Marteau y col., 2003; Fumagalli y col., 2004; Freeman y col., 2001; Ko y col., 2007; Fricks y col., 2009; Das y col., 2010; Gao y col., 2010).

Los receptores del grupo P2Y son activados de manera selectiva por cinco ligandos naturales (ATP, ADP, UTP, UDP y UDP-Glucosa), regulando la concentración intracelular de distintos segundos mensajeros, como muestra la figura 8.

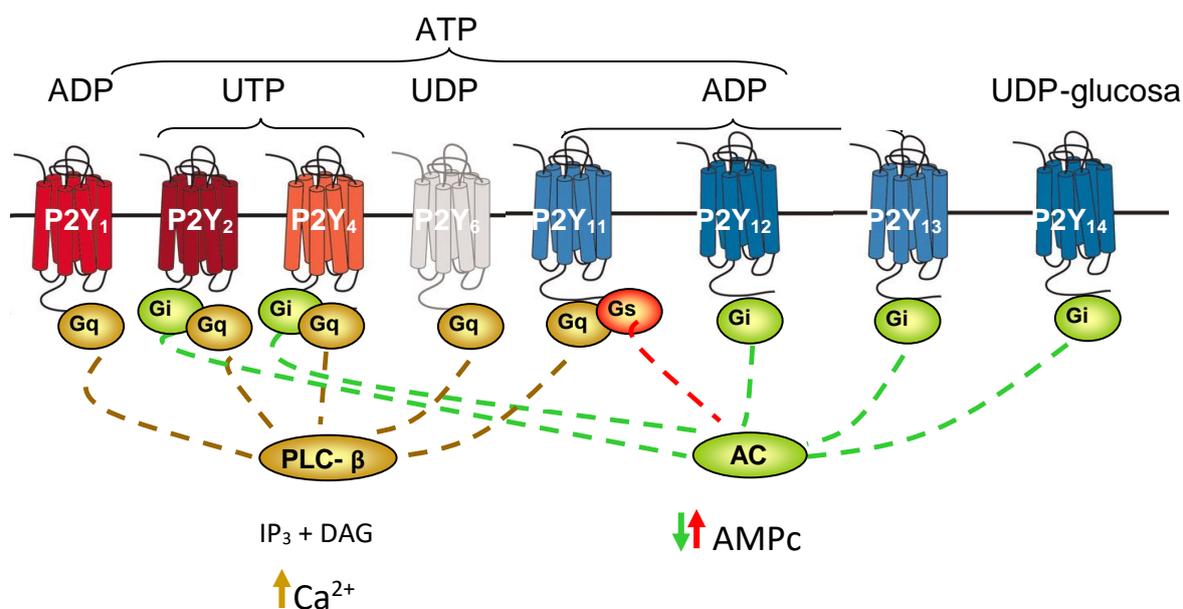


Figura 8: Esquema representativo de receptores P2Y y sus principales vías de señalización.

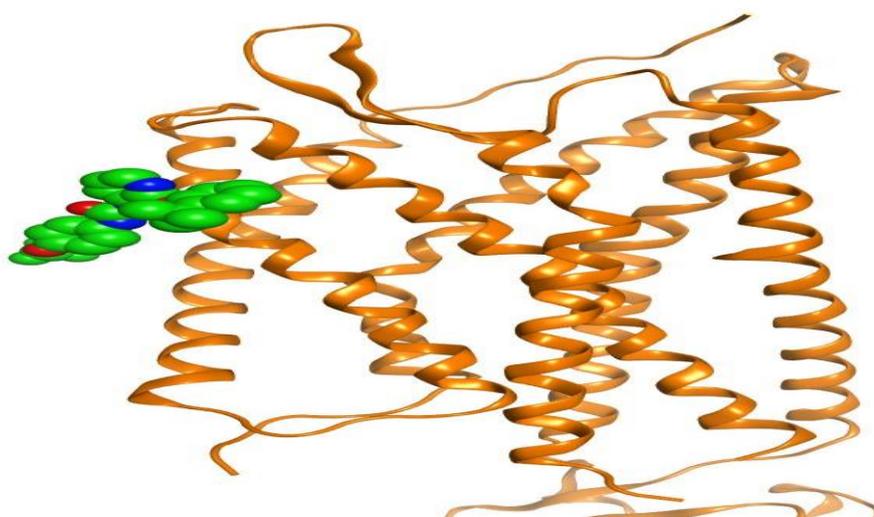


Figura 9: Estructura cristalina de P2Y1 (en complejo con antagonista).

Tomada de: <https://sites.google.com/a/unicam.it/diego-dal-ben/activities-and-collaborations/purinergic-receptor-tour>.

Rol fisiológico de los receptores P2Y

Existe mucha información respecto del rol fisiológico de los receptores P2Y.

El purinoceptor P2Y1 estaría involucrado en el proceso de agregación plaquetaria (Fabre y col., 1999; Leon y col., 1999), la inflamación vascular (Zerr y col., 2011), el control del peso corporal y los niveles sanguíneos de glucosa (Laplante y col., 2010), la sensación de dolor (Malin y Molliver, 2010), la formación ósea (Orriss y col., 2011a), etc. Por su parte, el receptor P2Y2 regularía el transporte iónico en la mayoría de los tejidos epiteliales (Leipzig, 2003), la agregación y auto-organización de células salivares (El-Sayed y col., 2014), la vasodilatación (Rieg y col., 2011), la migración de células dendríticas, eosinófilos y neutrófilos (Cicko y col., 2010; Müller y col., 2010), la fagocitosis por células de la microglía (Kim y col., 2012), etc. Se ha reportado participación de P2Y4 en la función del epitelio intestinal (Robaye y col., 2003; Ghanem y col., 2005), y a nivel endotelial y cardíaco (Horckmans y col., 2012a, 2012b). Al receptor P2Y6 se le adjudica capacidad regulatoria de la contracción vascular (Malmsjö y col., 2003; Mitchell y col., 2012), de la secreción epitelial de Cloruros (Lazarowski y col., 2001; Leipzig, 2003), de la resorción ósea (Orriss y col., 2011a, 2011b), de la absorción de glucosa por adipocitos y miocitos (Balasubramanian y col., 2014), de la fagocitosis y liberación de Óxido Nítrico, la apoptosis de astrocitos (Koizumi y col., 2007, 2013; Quintas y col., 2014), y la activación de células T (Giannattasio y col., 2011), etc.

El receptor P2Y11 tendría un rol en la diferenciación de granulocitos, la maduración de células dendríticas y la quimiotaxis de neutrófilos (Wilkin y col., 2001; Alkayed y col., 2012), así como también en la sensación de dolor (Barragan-Iglesias y col., 2014, 2015). En los procesos de agregación plaquetaria (Foster y col., 2001; Andre y col., 2003), vasoconstricción (Mitchell y col., 2012), concentración urinaria renal (Zhang Y. y col., 2015), polarización, migración y extensión de procesos microgliales (Haynes y col., 2006), actividad osteoblástica (Su y col., 2012), entre otros, se ha informado de participación del receptor P2Y12. Por su parte, el purinoceptor P2Y13 estaría involucrado en la degranulación de mastocitos (Gao y col., 2010), en la regulación de la masa ósea (Blom y col., 2010; Orriss y col., 2011a; Wang y col., 2014), en el metabolismo y transporte de lipoproteínas (Blom y col., 2010; Fabre y col., 2010; Lichtenstein y col., 2015), en mecanismos neuroprotectores (Ortega y col., 2011; Morente y col., 2014; Voss y col., 2014), etc. Finalmente, el receptor P2Y14 ejercería un rol en diversos procesos inflamatorios (Harden y col., 2010; Sesma y col., 2012; Barrett y col., 2013; Azroyan y col., 2015), en la senescencia de células de medula ósea (Cho y col., 2014), en la liberación de TNF α y MMP-9 (Kinoshita y col., 2013), en el metabolismo de la glucosa y la liberación de insulina (Meister y col., 2014).

Fisiopatología y potencial terapéutico de receptores P2Y

Diversas patologías son causadas por mutaciones o alteraciones de la función de los purinoceptores P2Y, y su manipulación terapéutica para el tratamiento de distintas afecciones está tomando relevancia (Burnstock, 2013, 2014).

En condiciones patológicas como cistitis intersticial y vejiga neurogénica, el componente purinérgico representa un 40% (Burnstock, 2011). También existiría participación del ATP en la hipertensión espontánea en ratas (Erlinge y Burnstock, 2008). Además, el corazón de ratas con falla cardíaca congestiva mostró aumentos en la expresión de P2Y2 (Hou y col., 1999). Alteraciones en la señalización purinérgica podrían estar involucradas en situaciones de disfunción eréctil y agrandamiento de próstata (Faria y col., 2010; Wen y Xia, 2012). Existen informes de asociación entre el sistema purinérgico y desórdenes del sistema nervioso, incluyendo la injuria por accidentes, infartos o isquemia, enfermedades neurodegenerativas y trastornos psiquiátricos (Burnstock, 2007; Burnstock y col., 2011). Los receptores P2Y1 y 2 median la proliferación, diferenciación y apoptosis de células tumorales (Shabbir y Burnstock, 2009; White y Burnstock, 2006).

Respecto del potencial terapéutico, la toxina botulínica se emplea en el tratamiento de la incontinencia urinaria y actúa bloqueando la liberación de ATP desde nervios

parasimpáticos y células uroteliales (MacKenzie y col., 1982; Yoshimura y col., 2008). Antagonistas del receptor P2Y₁₂ (Clopidogrel® y análogos) se emplean para tratar trombosis e infartos (Gachet, 2006; Ahmad y Storey, 2012). El tratamiento del esperma con ATP incrementa la tasa de fertilización *in vitro* (Rossato y col., 1999). Un agonista de receptores P2Y₂ se comercializa actualmente para el síndrome de ojo seco, en Japón (Mundasad y col., 2001).

También se evalúan compuestos purinérgicos para el tratamiento de la diabetes (Burnstock y Novak, 2013), osteoporosis (Burnstock, 2002; Agrawal y col., 2010), falla renal (Vonend y col., 2004; Taylor y col., 2009), desórdenes intestinales (Burnstock, 2008), HIV/SIDA (Séror y col., 2011; Wagner, 2011; Narayanan y col., 2012), cáncer, glaucoma, desprendimiento de retina, retinopatía diabética, tinnitus, defectos del sabor (Burnstock, 2006).

Receptores P2X

Todos los miembros de la familia de canales iónicos activados por ligando están formados por proteínas que contienen dos dominios funcionales: uno extracelular, donde se une el ligando, y uno transmembrana (TM), el cual forma el canal propiamente dicho (Coddou y col., 2011). Los purinoceptores P2X se encuentran entre los más simples de la familia. Diversos estudios (electrofisiología, electroforesis, farmacología) han sugerido una naturaleza trimérica para los receptores P2X (Jiang y col., 2003; Ding y Sachs, 1999; Nicke y col., 1998 y 2005; Stoop y col., 1999), los cuales han sido corroborados mediante técnicas más sofisticadas, como microscopía de fuerza atómica (Barrera y col., 2005; Nakazawa y col., 2005) y electrónica (Young y col., 2008). Están conformados por subunidades que contienen un dominio extracelular de gran tamaño (\approx 280 aminoácidos), dos dominios TM y extremos N- y C- terminales intracelulares, de longitud variable (Stojilkovic, 2008).

En mamíferos se han descrito siete subtipos o subunidades de receptores P2X (1-7), así como diversos productos de *splicing* alternativo (North, 2002).

Los receptores P2X pueden organizarse como homo- o heterotrímeros. Al momento, se han descrito seis heterómeros funcionales: P2X_{1/2} (Brown y col., 2002; Aschrafi y col., 2004), P2X_{1/4} (Nicke y col., 2005), P2X_{1/5} (Torres y col., 1998; Haines y col., 1999), P2X_{2/3} (Lewis y col., 1995; Spelta y col., 2002; Jiang y col., 2003), P2X_{2/6} (King y col., 2000; Barrera y col., 2007) y P2X_{4/6} (Le y col., 1998).

El dominio TM 2 parece ejercer un rol fundamental en la función del receptor (Torres y col., 1999; Duckwitz y col., 2006), el ensamblado y apertura del canal y la selectividad y permeabilidad iónicas (Egan y col., 1998; Khakh y Egan, 2005; Samways y Egan, 2007). Estos canales conductores de Ca^{2+} , que también permiten el influjo de Na^+ y el eflujo de K^+ , se han encontrado en muchas especies, desde organismos unicelulares hasta seres humanos (Fountain y Burnstock, 2009), siendo el más simple el alga verde *Ostreococcus tauri* (Fountain y col., 2008).

El agonista nativo de los receptores P2X es el ATP. Otros nucleótidos endógenos, como UTP, UDP y UDP-glucosa no presentan actividad (Jacobson y col., 2006).

Respecto de su expresión, P2X2, 4 y 6 predominan en sistema nervioso central. Los receptores P2X4 y 7 son abundantes en tejidos glandulares y células inmunes. Por su parte, la distribución de P2X3 se limita a ciertos subgrupos de neuronas involucradas en la sensación de sabor, el llenado vesical, barorecepción y dolor (North, 2002; Khakh y col., 2012).

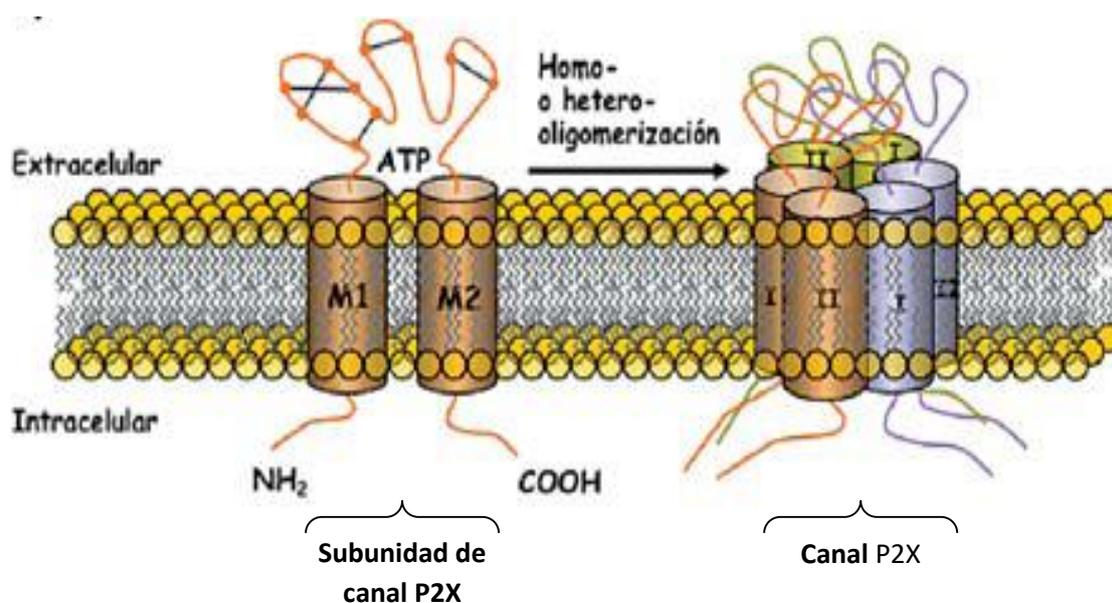


Figura 10. Esquema representativo de receptores P2X. Adaptado de: <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/909/877> (Miras Portugal y Gualix, 2009)

Fisiología de receptores P2X

Se han reportado diversos efectos de receptores P2X en varios tejidos y células del cuerpo, incluyendo sistema nervioso central y periférico, respiratorio, genitourinario, cardiovascular, gastrointestinal e inmune (Surprenant y North, 2009).

El ATP liberado por el hipotálamo lateral, en ratones, provoca descargas postsinápticas (Jo y Role, 2002). Ratones silenciados para P2X4 exhiben respuestas reducidas ante la activación del hipocampo (Sim y col., 2006). La respuesta de astrocitos, ubicados en corteza murina, al ATP estaría mediada por activación de un heterómero P2X1/5 (Lalo y col., 2008).

El ATP promovería la liberación presináptica de glutamato, por activación de P2X2 (Khakh y col., 2003). En cerebelo, se ha informado secreción de GABA mediada por receptores P2X (Donato y col., 2008). Sumado a esto, la liberación de hormona luteinizante sería consecuencia de la activación de receptores P2X2 y/o P2X4 por ATP, a nivel de la pituitaria (Zemkova y col., 2007).

También se han informado roles para los receptores P2X en los procesos de percepción del sabor y el dolor, la audición y la función vesical. El ATP ejerce un rol predominante en la percepción del sabor, activando receptores P2X2, P2X3 y P2X2/3 (Finger y col., 2005; Romanov y col., 2007). Los mismos receptores estarían involucrados en la neurotransmisión o neuromodulación de la audición, por ATP (Housley y col., 2002; 2006).

Células del cuerpo carotídeo liberan ATP, en respuesta a la hipoxia, el cual activa receptores P2X2 y P2X3 en terminaciones nerviosas aferentes (Rong y col., 2003). El receptor P2X3 estaría involucrado en el vaciado vesical (Cockayne y col., 2000; Vlaskovska y col., 2001). Los receptores P2X3 (Jarvis y col., 2002; Honore y col., 2002; Wirkner y col., 2007), P2X4 (Tsuda y col., 2003) y P2X7 (Chessell y col., 2005; Honore y col., 2006) han sido implicados en la percepción del dolor.

Células endoteliales de vena umbilical (UVECs) humana liberan interleuquina $\beta 1$ en respuesta a la activación de P2X7 (Wilson y col., 2007). Yamamoto y col., 2006 emplearon un modelo murino que no expresaba el receptor P2X4, y concluyeron que este receptor es fundamental para un correcto funcionamiento del endotelio vascular. Encontraron que los aumentos en el Calcio y la producción de Óxido Nítrico, inducidos por flujo de fluido, y la vasodilatación inducida por ATP eran dependientes de P2X4. A su vez, estos ratones presentaron incrementada presión sanguínea y disminución en la concentración plasmática de nitritos y nitratos. Cambios en la forma de las plaquetas se producen por activación de P2X1 (Rolf y col., 2001; 2002).

El ATP incrementa el movimiento de las cilias en epitelio respiratorio de nariz, tráquea y demás vías por activación de receptores P2Y y P2X (Leipziger, 2003; Schwiebert y Zsembery, 2003). En el caso del epitelio ciliar del conejo, el involucrado sería un heterómero P2X4/7 (Ma y col., 1999; 2006). Por otro lado, también existe control purinérgico (ATP y P2X), a nivel de sistema nervioso central, del ritmo respiratorio (Spyer y col., 2004; Gourine y col., 2005).

El receptor P2X1 ejercería un rol principal en el proceso de autorregulación renal, mediante el cual el riñón es capaz de mantener tasas constantes de flujo sanguíneo renal y filtración glomerular ante cambios de presión arterial (Schnermann y Levine, 2003).

Resultados obtenidos por distintos grupos de investigación atribuyen un papel al receptor P2X7 en el proceso de fibrosis renal. La activación de éste receptor desencadenaría la apoptosis de células mesangiales (Schulze-Lohoff y col., 1998; Harada y col., 2000), y aumentos en la liberación de TGF β , con el consecuente incremento en el nivel de fibronectina (Solini y col., 2005). Además, un modelo murino que no expresa el receptor P2X7 mostró reducciones significativas en los parámetros indicadores de obstrucción ureteral unilateral (Goncalves y col., 2006).

La estimulación de receptores P2X7, en células ductales de glándula submandibular de rata, estimuló la secreción de calicreína (Alzola y col., 1998). Ratones silenciados para éste último receptor exhibieron disminuciones en el contenido de potasio salivar (Pochet y col., 2007). El peristaltismo de intestino delgado estaría bajo control, al menos en parte, de P2X3, como demostraron experiencias *in vivo* (Bian y col., 2003).

Se han registrado corrientes de cationes e influjo de Calcio en mastocitos, monocitos, macrófagos, microglía y linfocitos T y B, por activación de P2X1, P2X4 y P2X7 (Burnstock y Knight, 2004). De éste último receptor es del que más información se ha recabado respecto de un posible rol en la fisiología del sistema inmune. Experiencias tanto *in vitro* (Ferrari y col., 2006; Di Virgilio, 2007) como *in vivo* (Solle y col., 2001; Chessell y col., 2005; King, 2007) demostraron que P2X7 estaría involucrado en la liberación de IL-1 β , en macrófagos y microglía. La activación del receptor P2X7 podría desencadenar la muerte de bacterias intracelulares, en macrófagos (Placido y col., 2006). Si bien no se ha podido determinar fehacientemente el mecanismo de acción, la participación de enzimas lisosomales es probable (Placido y col., 2006; Saunders y col., 2003; Fairbairn y col., 2001). Estudios realizados en seres humanos, indicaron que ciertos polimorfismos de nucleótido simple en el gen de P2X7 se traducen en proteínas no funcionales, por ejemplo en macrófagos derivados de sangre de un grupo de adultos Caucásicos (Shemon y col., 2006).

Fisiopatología y potencial terapéutico de receptores P2X

La única canalopatía descrita es una mutación con pérdida de función de P2X2, causante de problemas de audición en familias chinas (Yan y col., 2013) e italianas (Faletra y col., 2014). Más allá de ésta, se han encontrado varias asociaciones débiles entre variantes génicas de receptores P2X y enfermedades humanas, fundamentalmente para P2X7 (Bartlett y col., 2014; Faletra y col., 2014).

Aumentos en la expresión de P2X2 fueron reportados en corazón de ratas con falla cardiaca congestiva (Hou y col., 1999). Se ha reportado un incrementado nivel de P2X7 en diabetes, hipertensión, enfermedad poliquística renal y glomerulonefritis (Vonend y col., 2004; Taylor y col., 2009).

La microglía mostró aumentos en la expresión de P2X4, en dolor neuropático (Inoue y col., 2004). Los receptores P2X5 y 7 median la proliferación, diferenciación y apoptosis de células tumorales (Shabbir y Burnstock, 2009; White y Burnstock, 2006).

La posibilidad de terapias basadas en la manipulación de la actividad de los receptores P2X se está volviendo cada vez más probable.

Para inflamaciones intestinales se estudia el uso de antagonistas de P2X3 (Yiangou y col., 2001). Antagonistas de P2X4 redujeron el dolor neuropático en ratones (Trang y Salter, 2012), y los receptores P2X3 y 7 son blancos del tratamiento de la artritis (Al-Shukaili y col., 2008; Varani y col., 2010).

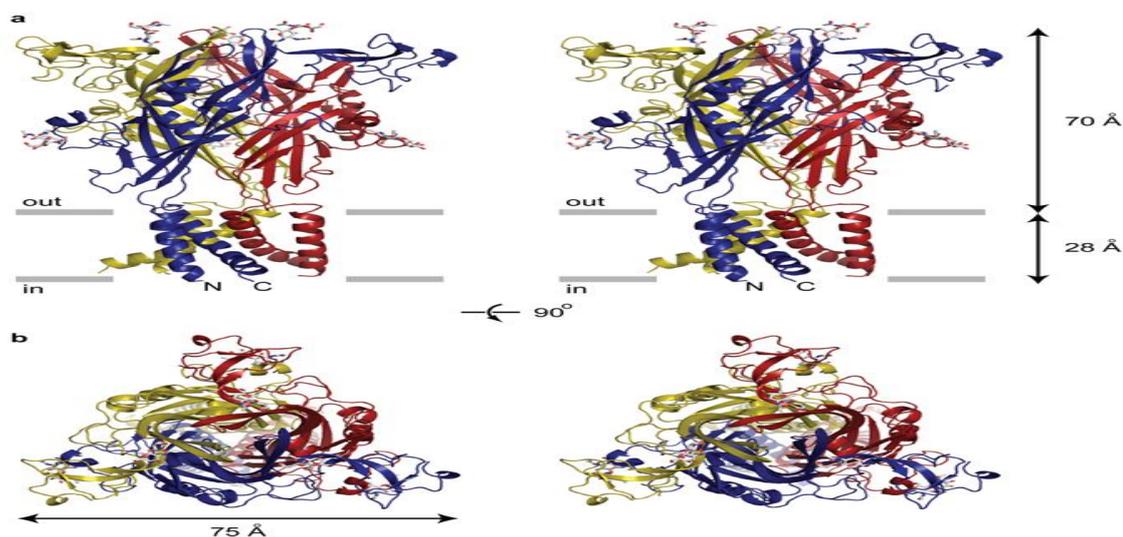


Figura 11. Estructura de P2X4. Adaptada de Kawate y col., 2009.

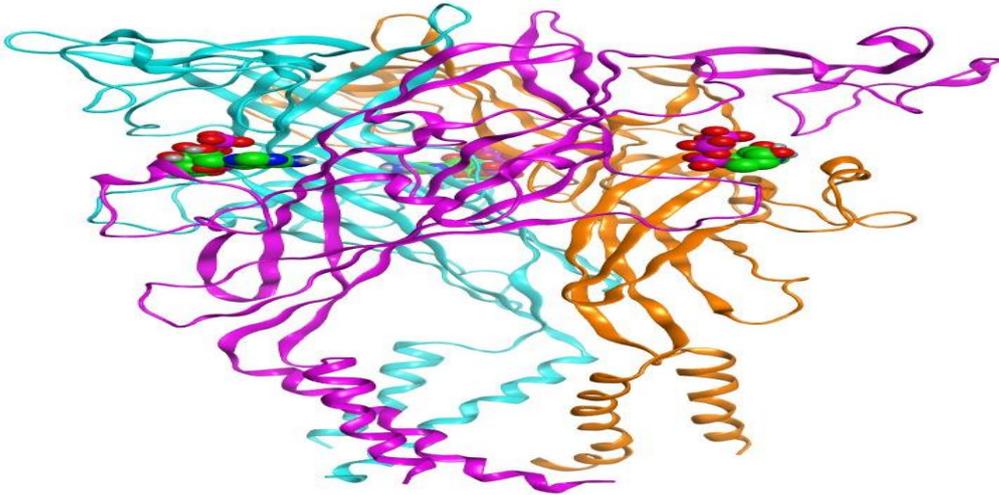


Figura 12. Estructura de P2X4 (en complejo con ATP). Tomada de: <https://sites.google.com/a/unicam.it/diego-dal-ben/activities-and-collaborations/purinergic-receptor-tour>.

Liberación celular de nucleótidos

Como dijimos en un principio, el ATP fue identificado décadas atrás como un potencial neurotransmisor, por lo que debía ser liberado por la célula. Si bien se sabía que el nucleótido podía llegar al espacio extracelular en situaciones de daño o muerte celular, recientemente se han identificado algunos estímulos que provocan su liberación, como la perturbación mecánica, hipoxia y algunos agentes (Burnstock, 2014). Para llevar a cabo una liberación controlada, se han identificado varios mecanismos. Entre estos, pueden mencionarse vesículas de secreción, transportadores ABC, hemicanales de conexinas o panexinas, canales de maxi-ion, receptores P2X7 (Burnstock, 2012). Los mecanismos de liberación de nucleótidos han sido descritos detalladamente (Lazarowski y col., 2011).

De manera de darle un fin a la señal purinérgica, la célula puede recapturar las moléculas liberadas y, además, expresa enzimas de tipo nucleotidasa (CD39, CD73), tanto en su membrana como formas solubles, que hidrolizan el ATP liberado a ADP, AMP, adenosina, inosina e hipoxantina (Burnstock, 2014).

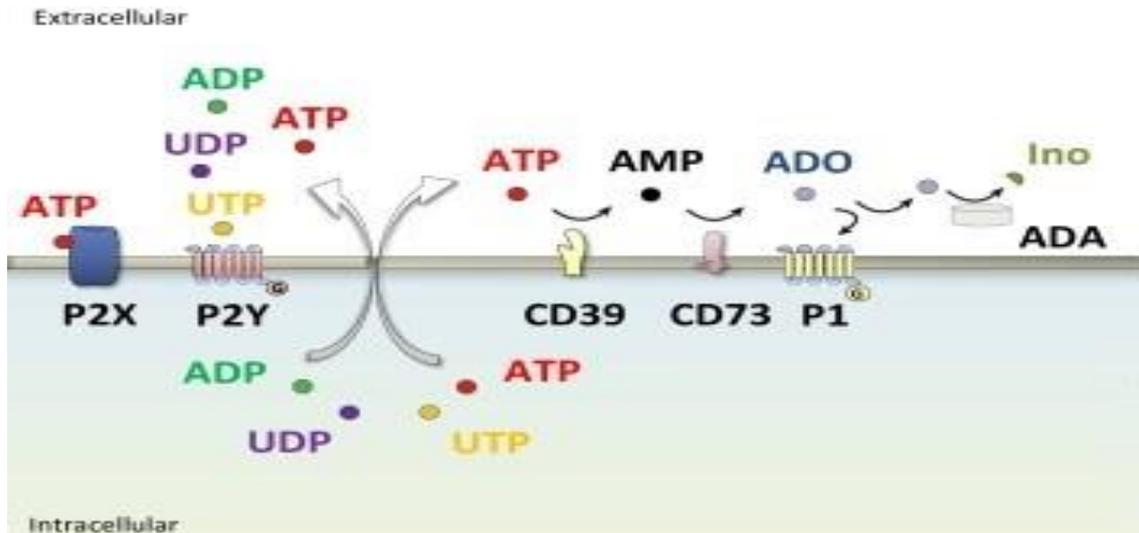


Figura 13. Hidrólisis de nucleótidos por acción de ectoenzimas. Adaptada de: Ferrari y col., 2016.

Las primeras acciones identificadas del ATP actuando como molécula de señalización extracelular resultaron ser a corto plazo, de efecto rápido, como la neurotransmisión, neuromodulación y secreción. Actualmente se sabe que, además, el sistema de señalización purinérgico está involucrado en la regulación de la proliferación, diferenciación, motilidad y muerte celular, en el desarrollo y la regeneración (Burnstock y Knight, 2004; Burnstock y Verkhratsky, 2010)

Por último, vale la pena remarcar lo antiguo y extendido del sistema de señalización purinérgico (Burnstock y Verkhratsky, 2009). Se han encontrado homólogos a los purinoceptores mamíferos en invertebrados primitivos, como *Dictyostelium* y *Schistosoma*, y en el alga verde (Agboh y col., 2004; Fountain y col., 2007, 2008; Fountain y Burnstock, 2009). Por otro lado, existen reportes de acciones purinérgicas en plantas (Demidchik y col., 2003, 2011; Clark y Roux, 2009).

Rol de receptores purinérgicos en hueso

No fue sino hasta finales de los 1980', que surgieron las primeras evidencias de la existencia de señalización purinérgica en el hueso (Lerner y col., 1987). Las primeras experiencias demostraron aumentos en la concentración intracelular de calcio, en células óseas, provocados por acción de nucleótidos extracelulares (Kumagai y col., 1989, 1991; Reimer y Dixon, 1992; Schöfl y col., 1992).

El rol del sistema de señalización purinérgico en la fisiología ósea también ha sido estudiado *in vivo*, empleándose modelos murinos silenciados para distintos receptores

P2 (Orris y col., 2011a). De esta manera, se ha establecido un rol en la regulación de la homeostasis ósea para P2X7, P2Y1, 2, 6 y 13.

Ratones con delección del gen de P2X7 exhibieron reducción de la masa ósea, con disminuciones en el contenido mineral de hueso cortical, en la circunferencia periosteal y en parámetros de formación ósea, como la superficie de mineralización y las tasas de formación ósea y de aposición de mineral. Al mismo tiempo, mostraron aumentos en el número y superficie de osteoclastos (Ke y col., 2003). En otro modelo silenciado para el gen de P2X7, Gartland y col., 2003, no registraron cambios en la densidad mineral o el volumen óseo trabecular. Sin embargo, informaron aumentos en el grosor cortical. Las diferencias pueden ser atribuidas a los métodos para lograr la delección del gen o a la cepa murina empleada en cada caso.

En el caso de la eliminación del gen de P2Y1, los animales mostraron ligeras disminuciones en la densidad y el contenido mineral óseo total, además de reducciones en el volumen y número de las trabéculas. Sin embargo, el grosor trabecular y los parámetros óseos corticales no mostraron cambios (Orris y col., 2008).

Ratones que no expresan P2Y2 mostraron incrementos en el contenido mineral óseo (Orris y col., 2007) y en el volumen trabecular (Mulryan y col., 2000), en fémur y tibia. Otro estudio reportó aumentos en el número y grosor de las trabéculas del fémur, y en el volumen cortical de los huesos largos (Orris y col., 2008).

Los ratones que no expresan el receptor P2Y6, presentaron incrementos en el contenido óseo, y el grosor y volumen cortical de los huesos largos. Además, se registraron aumentos en la longitud de los huesos largos. No se observaron cambios en los parámetros de hueso trabecular. Finalmente, se vieron perjudicadas la formación y función de los osteoclastos, y la proliferación y capacidad de mineralización de osteoblastos de calvaria (Orris y col., 2010).

Los ratones silenciados para P2Y13 exhibieron disminuciones significativas en el número y volumen de las trabéculas, y un aumentado grosor cortical. Por otro lado, el número y la función de osteoblastos y osteoclastos se vieron reducidos (Wang y col., 2010, 2012).

En la actualidad, ha quedado establecido que la señalización vía nucleótidos extracelulares juega un papel importante en la regulación de los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia en células óseas (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos) (Burnstock y col., 2013).

Si bien se ha detectado la expresión de múltiples subtipos de purinoceptores en los osteoblastos, las vías de señalización activadas y sus consecuencias funcionales no se han dilucidado completamente.

Esta Tesis se enfoca en el rol del sistema purinérgico en la biología del osteoblasto.

Señalización purinérgica en osteoblastos

Los primeros estudios en células osteoblásticas datan de fines de los 80. En éstos, se demostró inducción de la formación de AMPc por activación de receptores P1, empleando análogos de adenosina (Lerner y col., 1987). Más tarde, los receptores P2 se verían involucrados en aumentos de la concentración de calcio intracelular y la producción de inositol trifosfato (IP3) (Kumagai y col., 1989, 1991).

Estudios posteriores demostraron la activación de dos subtipos de receptores P2Y (1 y 2) en células humanas y de rata (Reimer y Dixon, 1992; Schofl y col., 1992; Yu y Ferrier, 1993). Y en 1995 se evidenció por primera vez la expresión de P2Y2 en osteoblastos humanos, mediante hibridación in situ y PCR a tiempo real (Bowler y col., 1995).

En la actualidad, se ha detectado, tanto a nivel de ARNm como de proteína, la expresión de todos los subtipos de receptores P2, en osteoblastos primarios de rata, excepto el P2Y11. Por otro lado, en osteoblastos humanos se ha encontrado a P2Y1, 2, 4 y 6, y P2X 2, 4, 5, 6 y 7 (Orriss y Arnett, 2012). Los primeros subtipos encontrados fueron P2X2 y 5, seguidos por P2X1, 3, 4 y 6. El último en ser detectado (P2X7) es aquel del que más información se tiene respecto de su papel a nivel óseo, y, particularmente, en osteoblastos (Gartland, 2012).

Cabe aclarar que la expresión de los distintos subtipos de receptores P2 en células osteoblásticas ha mostrado variaciones con respecto a la especie, tipo de cultivo (primario o línea celular), y estadio de diferenciación celular (Yu y Ferrier, 1993; Dixon y col., 1997; Gartland y col., 2012).

Los mecanismos de señalización modulados por la activación de receptores P2 en células osteoblásticas, han sido estudiados tanto en cultivos primarios como en líneas celulares. En este punto, es mayor la evidencia acumulada acerca de los receptores P2Y que de P2X. Respecto de los primeros, se ha demostrado que P2Y2 promueve la movilización de calcio intracelular, la activación de diversas quinasas, como PKC, MAPK, JNK, p38, PI3K/Akt, favorece el influjo de calcio activado por estrés mecánico, etc (Katz y col., 2006, 2008; 2011; Ayala-Peña y col., 2013; Qi y col., 2009). Factores de transcripción (c-Fos, Runx2, NF- κ B) han mostrado ser incrementados por estimulación de receptores P2Y1 y P2Y2 (Buckley y col., 2001; Bowler y col., 1999; Costessi y col.,

2005; Qi y col., 2009). Además, se ha reportado activación por ATP de PLD, a través de la estimulación del complejo Calcio-Calmodulina (Suzuki y col., 1995), y de EGR1, mediante activación de PKC (Pines y col., 2003).

Es escasa aun la información respecto de los receptores P2X, siendo la excepción el P2X7, el cual ha sido asociado con activación de ERK (Okumura y col., 2008; Liu y col., 2008), y estimulación de PLD y PLA2 conduciendo a la producción de LPA (Panupinthu y col., 2008). Sumado a esto, se ha reportado que la activación de factores de transcripción, como NF- κ B (Genetos y col., 2011) y c-fos (Rumney y col., 2010) resultaron dependientes de P2X7. Henriksen y col., 2006, informaron que este mismo receptor está involucrado en la propagación de ondas de Calcio, en osteoblastos maduros. Respecto del resto de purinoceptores P2X, se ha recabado poca información respecto de su rol en la biología del osteoblasto. Orriss y col, 2006, observaron cambios en la concentración intracelular de Calcio, luego del tratamiento de un cultivo primario de calvaria de rata con agonistas selectivos de los receptores P2X1, 2, 3 y 5, lo que indica presencia de receptores funcionales en el modelo celular mencionado.

Estas vías de señalización, moduladas por los receptores P han mostrado regular la proliferación, diferenciación, función, expresión génica y señalización intracelular de los osteoblastos (Burnstock, 2016).

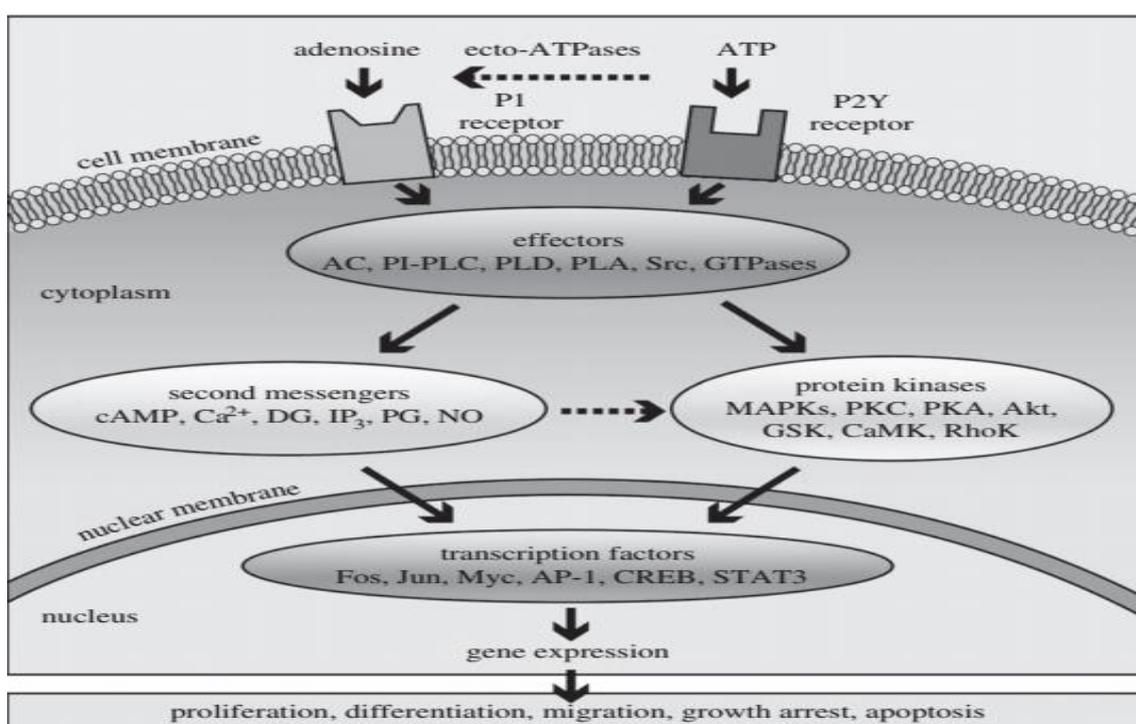


Figura 14. Procesos celulares regulados por el sistema de señalización purinérgico y mecanismos de acción. Tomada de: Burnstock, 2016.

Regulación de la migración de osteoblastos por receptores purinérgicos

Luego de un trauma, las células dañadas liberan su contenido al espacio extracelular. Entre los componentes liberados se encuentran diversos nucleótidos (ATP, UTP), los cuales pueden actuar como moléculas de señalización extracelular (Burnstock, 2014). En una fractura se genera un trauma en el tejido óseo, con lo cual se inicia un proceso de reparación y formación de hueso nuevo. Tres estadios se reconocen en el proceso de sanación de fracturas: inflamación, proliferación y remodelación (Oryan y col., 2015). En la fase inflamatoria, se forma un coágulo, por activación del sistema plaquetario y de la coagulación (Haverstock y Mandracchia, 1998), y aumenta el nivel de mediadores pro-inflamatorios (interleuquina-1 (IL-1), IL-6, IL-11, IL-18, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) (Mountziaris y Mikos, 2008) que actúan como moléculas quimiotácticas, atrayendo células del sistema inmune (linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos) (Claes y col., 2012) las cuales se encargan de la remoción de los restos celulares y reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos y fibroblastos (Hankenson y col., 2015). Las plaquetas y estas células inmunes liberan factores quimiotácticos (SDF-1, PDGF y bFGF; BMP-2, -5 y -7, TGF- β e IGF) (Oryan y col., 2015; Hankenson y col., 2015), responsables del reclutamiento de células osteoprogenitoras que se dividirán y diferenciarán en osteoblastos formadores de hueso (LaStayo y col., 2003), de manera de reemplazar el tejido perdido. En primer lugar, durante la fase proliferativa, los osteoclastos remueven el hueso necrótico (Haverstock y Mandracchia, 1998) y se forma un tejido inmaduro por acción de los osteoblastos (Goldhahn y col., 2012). Finalmente, en la tercera fase, el hueso inmaduro es reemplazado por un tejido mineralizado que es esculpido, por acción de osteoclastos y osteoblastos, hasta recuperar el tamaño, la forma y las características biomecánicas del hueso original (Thompson, 2003).

Los nucleótidos liberados al medio, podrían actuar como moléculas quimiotácticas (Bowler y col., 2001; Hoebertz y col., 2003) promotoras de la reparación de la fractura ósea.

La mayor parte de los estudios tendientes a dilucidar un posible rol de nucleótidos extracelulares en la migración emplearon cultivos primarios o líneas celulares de sistema inmune (Boonen y col., 1991; Elferink y col., 1992; Falzoni y col., 1995; Verghese y col., 1996; McCloskey y col., 1999; Salvestrini y col., 2012). Sin embargo, también existen estudios en espermatozoides (Bomstein y Steberl, 1959; Shen y col., 1993), células de músculo liso (Pillois y col., 2002), preadipocitos (Omatsu-Kanbe y col., 2006), células madre hematopoyéticas (Rossi y col., 2007), carcinoma mamario (Zhou y col., 2015) y MSCs (Ferrari y col., 2011).

Vale aclarar que al hablar de movilidad celular puede hacerse referencia a migración espontánea (quimioquinesis) o a migración dirigida (quimiotaxis) (Devreotes y Zigmond, 1988; McCloskey y col., 1999).

A la fecha, no existen informes respecto de la regulación de la migración de osteoblastos por receptores purinérgicos. Sin embargo, Ferrari y col., 2011, han reportado estimulación de la movilidad de células madre mesenquimales humanas por ATP.

Regulación de la proliferación de osteoblastos por receptores purinérgicos

En un principio, el foco se encontraba en los efectos de nucleótidos extracelulares a corto plazo. Se había establecido un rol regulatorio para el sistema de señalización purinérgica en neurotransmisión, neuromodulación y secreción (Burnstock y Verkhatsky, 2010). Actualmente, existe abundante evidencia respaldatoria de efectos a largo plazo ejercidos por nucleótidos y purinoceptores, en procesos de proliferación, diferenciación, motilidad y muerte celular, durante el desarrollo y la regeneración, y en situaciones patológicas (Burnstock y Verkhatsky, 2010; Burnstock, 2013; 2014).

En muchos tipos celulares los nucleótidos, a través de receptores purinérgicos, han mostrado regular la proliferación (Glaser y col., 2012). Se reportó que ATP y UTP indujeron proliferación de células madre hematopoyéticas (HSC) humanas (Casati y col., 2011; Lemoli y col., 2004; Rossi y col., 2007). Además, antagonistas de receptores P2 suprimieron la proliferación de precursores neuronales (Lin y col., 2007; Milosevic y col., 2006). En el mismo sentido, la activación de P2Y1 y P2Y2 promovió la división de queratinocitos (Inoue y col., 2005). Por otro lado, efectos anti-proliferativos se observaron en células madre mesenquimales (MSC) donde la aplicación de antagonistas de receptores P2 incrementó la división celular (Coppi y col., 2007).

El primer reporte de un efecto mitogénico del ATP en células osteoblásticas data de 1993 (Suzuki y col., 1993). Desde entonces, la mayor parte de la evidencia recopilada ha mostrado que la activación de receptores purinérgicos estimula la proliferación de células de tipo osteoblástico (Shimegi, 1996, 1998; Nakamura y col, 2000; Katz y col., 2008, 2011; Ayala y col., 2013; Syberg y col., 2012; Orriss y col., 2006, 2013; Cutarelli y col., 2016).

Por otro lado, Nakamura y col., 2000, también informaron de disminución de la capacidad proliferativa, en células de osteosarcoma humano MG-63 tratadas con nucleótidos de uridina (UTP y UDP).

Regulación de la diferenciación de osteoblastos por receptores purinérgicos

Los osteoblastos derivan de células progenitoras denominadas células madre mesenquimales (MSCs) (Grigoriadis y col., 1988). De acuerdo a su carácter multipotente, éste tipo celular puede dar origen a diversos linajes celulares, entre los que se cuentan adipocitos, fibroblastos, mioblastos, condrocitos y osteoblastos (Aubin, 2001; Bonab y col., 2006). Las MSCs se ubican en la medula ósea, pero su localización exacta es debatida, aunque la evidencia disponible sugiere que se encuentran en los espacios perivasculares (Sacchetti y col., 2007; Arvidson y col., 2011).

La diferenciación de MSCs en osteoblastos es un proceso complejo y altamente regulado, que puede ser dividido en cuatro estadios consecutivos: 1) compromiso de MSCs a linaje osteogénico; 2) etapa proliferativa; 3) diferenciación a osteoblasto y producción de matriz extracelular; 4) mineralización de la matriz (Taipaleenmäki y col., 2012). En cada una de estas cuatro etapas, actúan y se expresan distintos factores y genes específicos. En primer lugar, bajo la influencia de proteínas morfogenéticas óseas, las MSCs se diferencian en células osteoprogenitoras. En el estadio proliferativo, éstas últimas sintetizan las histonas y demás proteínas necesarias para mantener un alto ritmo de división celular, y expresan Factor de Transcripción Relacionado a Runt-2 (Runx2) y Osterix (Osx) (Komori y col., 1997; Nakashima y col., 2002). En la siguiente etapa, las células osteoprogenitoras comienzan a expresar marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica, como Fosfatasa alcalina (FAL) y Colágeno tipo I (Col1) (Aubin y col., 1995), convirtiéndose en pre-osteoblastos u osteoblastos inmaduros. Por último, para la mineralización de la matriz, osteoblastos completamente maduros expresan Osteocalcina (OCN) (Sims y col., 1997) y Sialoproteína ósea (BSP) (Aubin, 2001), entre otras. En este punto, las células quedan atrapadas en cavidades dentro de la matriz mineralizada y se diferencian en osteocitos (Oreffo y col., 2005).

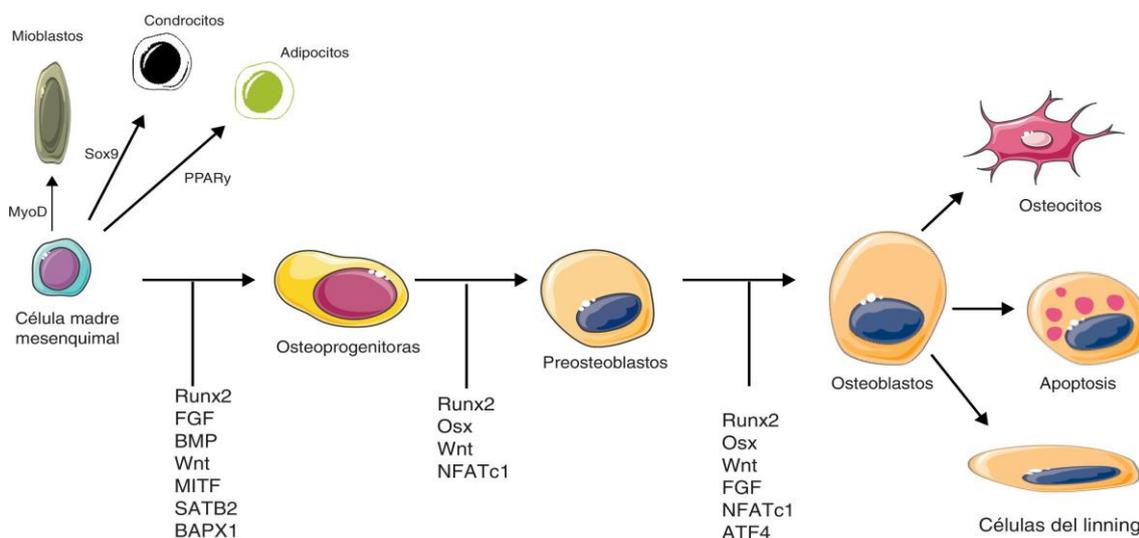


Figura 15: Señales moleculares que desempeñan un papel clave en la diferenciación y activación osteoblástica (Arbolea y Santos Castañeda, 2013).

Respecto del rol de los nucleótidos extracelulares en la función y diferenciación de osteoblastos, los resultados obtenidos *in vitro* resultan contradictorios.

Por un lado, los efectos ejercidos por nucleótidos extracelulares parecen ser anti-osteogénicos, observándose disminución en la expresión de genes marcadores de maduración y diferenciación osteoblástica (Orris y col., 2007; Li y col., 2015), y en la actividad FAL (Orris y col., 2007; Rodrigues-Ribeiro y col., 2015), e inhibición de la mineralización (Jones y col., 1997; Hoebertz y col., 2002; Orris y col., 2006; 2007; 2012; 2014).

Por el contrario, también se han reportado aumentos en parámetros determinantes de función y diferenciación osteoblástica por activación de receptores P2. Estos incrementos se evidenciaron a nivel de la expresión génica (Cutarelli y col., 2016; Rodrigues-Ribeiro y col., 2015; Panupinthu y col., 2008; Biver y col., 2013; Ayala y col., 2013), actividad enzimática de FAL (Noronha-Matos y col., 2012; 2014; Rodrigues-Ribeiro y col., 2015; Cutarelli y col., 2016; Sun y col., 2013; Ayala y col., 2013; Katz y col., 2011; Syberg y col., 2012) y deposición de Calcio (Ayala y col., 2013; Sun y col., 2013; Panupinthu y col., 2008; Nakano y col., 2007).

Mecanismos de liberación de nucleótidos en osteoblastos

Para poder actuar como molécula de señalización extracelular, el ATP (y demás nucleótidos) deben ser liberados al medio. Es sabido desde hace tiempo que el ATP es liberado de terminales nerviosas para actuar como neurotransmisor, pero no se ha

descrito, a la fecha, liberación de ATP por parte de neuronas en las proximidades del hueso. De manera que los nucleótidos que actúen en esa zona deben ser liberados por células residentes en el área, desde reservorios internos, donde la concentración citoplasmática de ATP se encuentra en el rango de 1-5 mmol/L (Gartland y col., 2012). Esta liberación puede deberse a daño celular o ser controlada. Todas las células son capaces de liberar ATP luego de un trauma (Gartland y col., 2012). Por otro lado, en 2001 se demostró, por primera vez, liberación controlada de ATP por parte de osteoblastos humanos, alcanzándose concentraciones en el rango nanomolar (Romanello y col., 2001) (sin embargo, este valor debe ser menor al real, dado que la concentración de ATP en las cercanías de la membrana celular debe ser mayor que en la zona donde se mide, como se demostró en un experimento utilizando plaquetas, donde la concentración de ATP en la superficie de las mismas alcanzó el rango micromolar) (Burnstock y col., 2013). Desde entonces, se han reportado numerosos ejemplos de este fenómeno. Los estudios llevados a cabo han intentado dilucidar los estímulos necesarios para la liberación controlada de nucleótidos y los mecanismos mediante los cuales se llevan a cabo.

Respecto de los estímulos, se ha observado liberación inducida por hipoxia (Orriss y col., 2009), estrés mecánico (Hecht y col., 2013), flujo de fluido (Romanello y col., 2001; Genetos y col., 2005), bisfosfonatos (Romanello y col., 2006) y ultrasonido (Hayton y col., 2005; Alvarenga y col., 2010)

En cuanto a los mecanismos, la evidencia disponible indica que el más importante sería la exocitosis vesicular (Genetos y col., 2005; Romanello y col., 2005; Gartland y col., 2006; Orriss y col., 2009). Empleando osteoblastos humanos, murinos y de rata, se ha logrado bloquear la liberación de ATP, inducida por estímulos mecánicos e hipoxia, con inhibidores de la formación de vesículas como Brefeldin A, Monensin y NEM (N-etilmaleimida) (Gartland y col., 2012).

Además, existen reportes de liberación de ATP mediada por panexinas (Thi y col., 2012), canales de maxi-anión (Sabirov y Okada, 2009), el purinoceptor P2X7 (Brandao-Burch y col., 2012) y la proteína de andamiaje Ahnak (Shao y col., 2008).

También se ha demostrado que la cantidad de ATP liberado por osteoblastos es dependiente del estadio de diferenciación, siendo mayor en el caso de células más maduras (Orriss y col., 2009).

También existiría un límite superior para la liberación de ATP (Gartland y col., 2012).

Glicógeno sintasa quinasa

La glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) es una proteína con actividad quinasa de serina-treonina, identificada originalmente como una enzima capaz de inactivar, por fosforilación, a la glicógeno sintasa (Embi y col., 1980; Woodgett y Cohen, 1984). Luego de varios años, se descubrió que no solo interviene en el metabolismo del glucógeno, sino que cumple un rol regulador en muchas otras vías de señalización. Ahora se sabe que GSK3 participa en la respuesta a la activación de receptores con actividad tirosina-quinasa, como los receptores de insulina, factores de crecimiento, neurotrofinas, y de receptores acoplados a proteínas G, como los receptores de glicoproteínas Wnt (wingless, receptores de la familia Frizzled) (Cheon y col., 2004; Lee y col., 2010; Pai y col., 2008; Playford y col., 2000; Satyamoorthy y col., 2001; Woodgett, 2003). Además, está involucrada en la regulación de la actividad de diversos factores de transcripción, de manera que, en última instancia, controla la expresión génica. Así, la actividad de esta quinasa regula muchas funciones tanto a nivel celular (supervivencia, proliferación) como del organismo (humor, cognición) (Grimes y Jope, 2001).

Existen 2 isoformas de GSK3 en mamíferos, altamente homólogas en el dominio quinasa y codificadas por genes distintos, llamadas GSK3 α , de 51 kDa, y GSK3 β , de 47 kDa (Woodgett, 1990; 1991).

Esta quinasa (y homólogos) es ubicua en el mundo eucariota (Plyte y col., 1992; Doble y Woodgett, 2003), y se expresa en todos los tejidos, siendo particularmente abundante en cerebro (Woodgett, 1990).

Esta enzima presenta características un tanto particulares. A diferencia de muchas otras quinasas, que deben ser fosforiladas para su activación, se encuentra constitutivamente activa, y la fosforilación, en un residuo de Serina (Ser 9, en caso de GSK3 β , o Ser 21, en caso de GSK3 α) por las quinasas Akt, PKA, PKC, entre otras, resulta en su inhibición (Cross y col., 1995; Fang y col., 2000; Stambolic y Woodgett, 1994; Frame y col., 2001). Respecto de sus sustratos, de los cuales existen más de 40 (Jope y Johnson, 2004), muchos de éstos deben ser previamente fosforilados por una quinasa cebadora, antes de que GSK3 pueda actuar sobre ellos (DePaoli-Roach, 1984; Fiol y col., 1988). Esta fosforilación “jerárquica” describe un complejo mecanismo de regulación, donde al menos 2 enzimas son necesarias para fosforilar el sustrato en residuos específicos, en un orden determinado (Grimes y Jope, 2001). Sin embargo, no todos los sustratos necesitan ser cebados o pefosforilados (Fiol y col., 1988).

Como se mencionara anteriormente, GSK3 es blanco de quinasas que, de acuerdo al residuo fosforilado, pueden inhibirla o activarla. La fosforilación en Ser 9/21, ubicada en la región N-terminal, actúa como un pseudo-sustrato que ocupa el sitio catalítico e

impide el ingreso del sustrato, resultando en la inactivación de la enzima (una inhibición de tipo competitivo) (Doble y Woodgett, 2003). Existen numerosas cascadas celulares que inhiben a GSK-3 por fosforilación en Ser 9/21. La más relevante es la vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa/proteína quinasa B, también llamada Akt (PI3K/Akt) (Cohen y Frame, 2001). En cambio, la fosforilación en tirosina (Tyr216, en caso de GSK3 β , o Tyr279, en caso de GSK3 α) conduce a un aumento de su actividad quinasa. Sin embargo, esta fosforilación no es un requisito para la actividad catalítica de GSK3. Se han propuesto diferentes mecanismos para la fosforilación de este residuo, algunos involucran a las quinasas de tirosina zak 1, Fyn o PYK2 (Kim y col., 1999; Hartigan y col., 2001; Lesort y col., 1999). Aunque la hipótesis más fuerte es la de autofosforilación (Cole y col., 2004).

Dado el amplio repertorio de sustratos blanco de GSK3 y, en consecuencia, la gran cantidad de funciones celulares bajo su control, la regulación de su actividad debe ser muy "fina". Para esto, se han descrito cuatro mecanismos. Uno es el estado de fosforilación de la enzima, que puede resultar en activación o inhibición. La pre-fosforilación del sustrato para su reconocimiento representa otro estadio de regulación de la actividad enzimática. Sumado a esto, se ha evidenciado que proteínas de unión impiden que la enzima actúe sobre sustratos indeseados dirigiéndola a los blancos apropiados (Jope y Johnson, 2004). Por último, se ha reportado que la ubicación subcelular de GSK3 puede ser controlada, regulando su acumulación en los sitios donde es requerida (Bijur y Jope, 2001; 2003; Watcharasit y col., 2002). Respecto de esto último, se demostró que la proteína GBP está involucrada en la exportación nuclear de GSK3 (Franca-Koh y col., 2002).

GSK3 participa, entre otras, en la vía de señalización canónica de Wnt o de Wnt/beta-catenina. En ésta, la quinasa cumple un rol inhibitorio. Formando parte de un complejo, junto con Axin, APC y CK1, se encarga de fosforilar a beta-catenina, marcándola para ubiquitinación y posterior degradación en proteosomas. Asimismo, también son blanco de GSK3 sus compañeras Axin (Ikeda y col., 1998; Jho y col., 1999; Yamamoto y col., 1999) y APC (Rubinfeld y col., 1996). Al ser fosforiladas, aumenta su capacidad de unión a beta-catenina. Por su parte, CK1 actúa como quinasa cebadora de beta-catenina (Amit y col., 2002; Hagen y Vidal-Puig, 2002; Yanagawa y col., 2002). Cuando la vía de Wnt se activa, el complejo formado por Axin, APC, GSK3 y CK1 es desarticulado y se evita la fosforilación y posterior ubiquitinación y proteólisis de beta-catenina. Esta última comienza a acumularse en el citoplasma, y se transloca al núcleo, donde, en complejo con TCF/LEF, regula la transcripción de ciertos genes (Aktari y col., 2016).

Independientemente de la vía Wnt, y de relevancia para esta Tesis, se ha reportado inhibición de GSK3 asociada a estabilización de β -catenina, por activación de la vía

PI3K/Akt a través de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Castellone y col., 2005; Haq y col., 2003).

β -catenina

β -catenina es un miembro de la familia de proteínas Armadillo, cuya función está relacionada con su ubicación subcelular. A nivel de membrana plasmática se encuentra formando parte de las uniones adherentes, donde participa en los procesos de adhesión célula-célula. Por otro lado, la forma citoplásmica es capaz, de acuerdo al contexto, de regular la transcripción génica (Larue y Delmas, 2006). La presente Tesis se enfocará en la forma citoplásmica.

La primera vez que se observó activación de β -catenina fue consecuencia de la estimulación de la vía de Wnt (Logan y Nusse, 2004). Desde entonces, se han pensado ambos procesos como sinónimos. Sin embargo, existen otras vías o estímulos para la activación de β -catenina. Entre estos, se puede mencionar a receptores tirosina quinasa (EGFR, IGF1R, FGFR y VEGFR), proteínas que interactúan con β -catenina (PTEN, Caveolina-1, Plakogoblina) (Aktary y col., 2016), PKA (Taurin y col., 2008) y GPCR (Shevtsov y col., 2006).

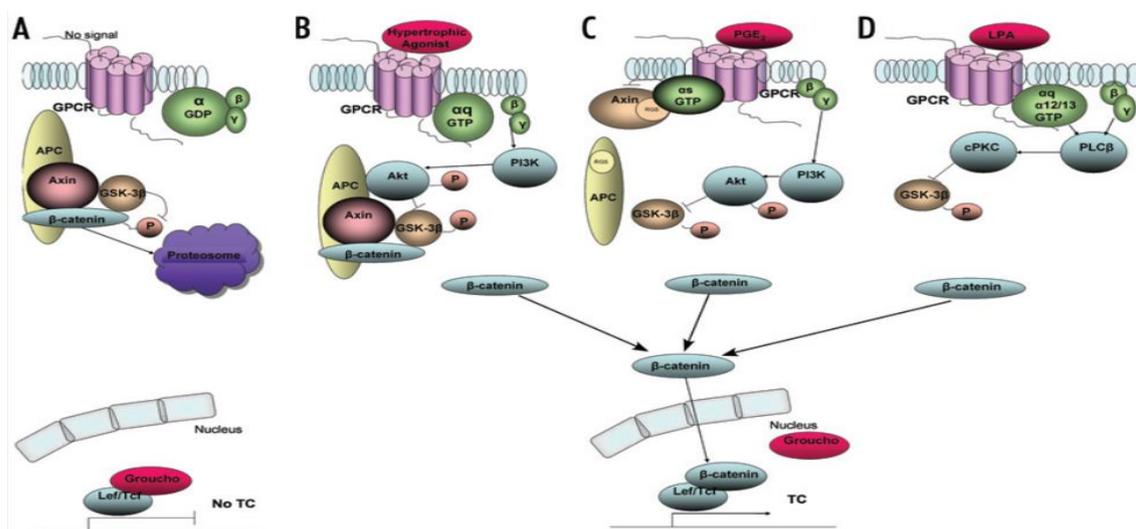


Figura 16. Mecanismos de activación de β -catenina por GPCR. Tomada de: Shevtsov y col., 2006.

Regulación de la actividad osteoblástica y homeostasis ósea por GSK3 y rol de beta-catenina

En la actualidad, a partir del análisis de modelos *in vitro* e *in vivo* y estudios epidemiológicos, se ha acumulado evidencia a favor de un rol de GSK3 en la regulación de la homeostasis ósea.

La manipulación de la actividad y expresión de GSK3, en células osteoblásticas en distintos estadios de maduración y provenientes de distintas especies, ha mostrado consecuencias diversas. Una parte de la evidencia experimental disponible muestra que la inhibición de la quinasa favorecería la proliferación, diferenciación y función de los osteoblastos (Bennett y col., 2005; Kulkarni y col., 2006; Kugimiya y col., 2007; Kumar y col., 2015; Clément-Lacroix y col., 2005; Thouverey y Caverzasio, 2015; Watanabe y col., 2012).

Por otro lado, existen reportes donde la inhibición de GSK3 mostró disminuir la osteogénesis (Li y col., 2011; Kapadia y col., 2005; Yoshida y col., 2012; van der Horst y col., 2005)

Respecto de la evidencia obtenida de experiencias *in vivo*, Clément-Lacroix y col., 2005, observaron, en tres modelos murinos con fenotipo de osteoporosis, que luego de 4 semanas de tratamiento con LiCl (inhibidor de GSK3) vía oral, los animales presentaron incrementos en la masa ósea, con aumento del volumen óseo, el número y grosor de las trabéculas, la cantidad de osteoblastos y el porcentaje de superficie mineralizada.

Otro estudio, donde se evaluó el impacto de drogas psicotrópicas en ratones inmovilizados, también demostró efectos anabólicos a nivel óseo por parte del Litio, el cual fue administrado, durante 4 semanas. Los ratones exhibieron aumentos en la densidad mineral y en la formación ósea, a pesar de no soportar cargas. Es decir que el Litio ejerció un efecto anabólico, aun en ausencia de estimulación mecánica (Warden y col., 2010).

En un modelo de fractura de fémur, Loiselle y col., 2013, demostraron que la inhibición de GSK3 β , por LiCl, provocó aumentos en el volumen óseo y logró restablecer propiedades biomecánicas perdidas. En el mismo sentido, la administración de LiCl logró restaurar el fenotipo de ratones transgénicos para Sfrp4 (antagonista de la vía Wnt), los cuales presentan disminuida masa ósea (Nakanishi y col., 2008).

Un inhibidor selectivo de GSK3, AR28, incrementó el número de osteoblastos y, con esto, la cantidad y el grosor de la trabéculas y el volumen óseo, luego de 14 días de tratamiento. Además, reportaron incrementos en las tasas de formación ósea y de aposición de mineral (Gambardella y col., 2011).

En lo concerniente a los efectos del Litio en el tejido óseo, en seres humanos, se han realizado variados estudios epidemiológicos.

Un estudio llevado a cabo en una población iraní determinó marcadores séricos de recambio óseo y la densidad mineral ósea (BMD) en espina lumbar, cuello femoral, trocánter y triangulo de Ward, en pacientes tratados con Litio, durante por lo menos 1 año. Los valores séricos de FAL, OCN y telopéptido-C fueron significativamente menores en los pacientes que en los individuos control. Al contrario, los valores de BMD en cuello femoral, trocánter y espina lumbar estaban aumentados en el grupo bajo tratamiento (Zamani y col., 2009).

Otro artículo recopiló información de los casos de fracturas asociadas a osteoporosis en personas mayores de 50 años, desde 1996 a 2004, en una provincia de Canadá, teniendo en cuenta la medicación que ingerían. Todos los fármacos resultaron asociados a un riesgo aumentado de fractura, a excepción del Litio, el cual, al contrario, presentó una correlación inversa (Bolton y col., 2008).

Mak y col., 1998, no encontraron cambios en los niveles séricos de FAL, en 55 pacientes chinos tratados durante 2 años con Litio. El mismo resultado arrojó otro estudio realizado en 23 pacientes estadounidenses, divididos en 2 grupos de acuerdo a la duración del tratamiento (Cohen y col., 1998). Además, no hallaron diferencias en la BMD entre ambos grupos ni con la población general. Sin embargo, cuando analizaron la excreción urinaria de hidroxiprolina (marcador de recambio óseo) encontraron incrementos respecto de los valores normales, aunque no hubo diferencias asociadas a la duración del tratamiento.

Tal vez, el estudio más relevante a la fecha sobre la potencial relación entre el uso de Litio y el riesgo de fractura sea el de Wilting y col., 2007. En ese trabajo se analizó la historia clínica de 231778 pacientes, que fueron clasificados en tres grupos de acuerdo al tiempo desde la última prescripción hasta el comienzo del estudio. Encontraron que la ingesta de litio se asocia a un disminuído riesgo de fractura (osteoporótica y de cualquier tipo), y el tiempo de inicio del tratamiento es importante. Los usuarios actuales mostraron un riesgo significativamente menor, mientras que aquellos que han dejado de consumir Litio desde hace un año presentaron un riesgo aumentado, y a mayor tiempo de discontinuidad del tratamiento mayor el riesgo de fractura. Curiosamente, encontraron incrementos en el riesgo de fractura de fémur/cadera en aquellos que alguna vez usaron Litio. Además, reportaron que los pacientes que consumen Litio y, simultáneamente, usan otras drogas psicotrópicas presentan reducciones menores en el riesgo de fractura que aquellos que solo usan Litio.

Vestergaard y col., 2005, también hallaron una asociación entre el uso de Litio y un reducido riesgo de fractura, en un estudio que abarcó a 124655 personas. A dosis acumuladas bajas, encontraron aumento en el riesgo de cualquier tipo de fractura, particularmente a nivel de radio. Sin embargo, una dosis acumulada alta de Litio fue asociada a un disminuído riesgo de fractura en general, y de columna y radio en particular. Además, registraron reducciones no significativas respecto del riesgo en cadera.

Respecto de la importancia de β -catenina en la regulación de la función y diferenciación osteoblástica, Glass y col., 2005, produjeron ratones con mutaciones activadoras e inactivadoras de β -catenina específicamente en los osteoblastos. Los ratones exhibieron fenotipos de aumentada y disminuida masa ósea, respectivamente. Estos fenotipos fueron consecuencia, fundamentalmente, de cambios en la resorción ósea, debidos a alteraciones en la producción de OPG por parte de los osteoblastos, la cual actúa como un regulador negativo de la diferenciación osteoclástica (Simonet y col., 1997). Se ha mostrado que precursores mesenquimales deficientes en β -catenina no logran desarrollarse en células formadoras de hueso, con los consecuentes defectos esqueléticos (Chen y Long, 2013; Hu y col., 2005; Day y col., 2005; Hill y col., 2005). Por otro lado, la ausencia de la proteína en osteoblastos diferenciados perjudicó su maduración y la mineralización (Holmen y col., 2005; Glass y col., 2005)

Por otro lado, se ha reportado que β -catenina reprimiría la actividad de Runx2, inhibiendo la diferenciación osteoblástica (Kahler y Westendorf, 2003). Sin embargo, posteriormente se informaron resultados contrarios (Hamidouche y col., 2008)

Nucleótidos extracelulares, receptores purinérgicos y GSK3

Existen muchos informes respecto de interacciones entre el sistema de señalización purinérgico y la quinasa GSK3. En particular, se ha descrito a la quinasa como blanco de la regulación por receptores P2Y y P2X en células del sistema nervioso, fundamentalmente neuronas, donde este eje de señalización promovería, entre otras cosas, la supervivencia celular (Miras-Portugal y col., 2015). En este contexto, se ha demostrado que la quinasa estaría bajo el control de receptores P2X7 (Díaz-Hernandez y col., 2008; Ortega y col., 2009; Ortega y col., 2010) y P2Y13 (Ortega y col., 2008). Estos efectos inhibitorios de los receptores P2 sobre la actividad de la quinasa estarían mediados por PKC (Neary y Kang, 2006; Ortega y col., 2009) y PI3K/Akt (Ortega y col., 2008).

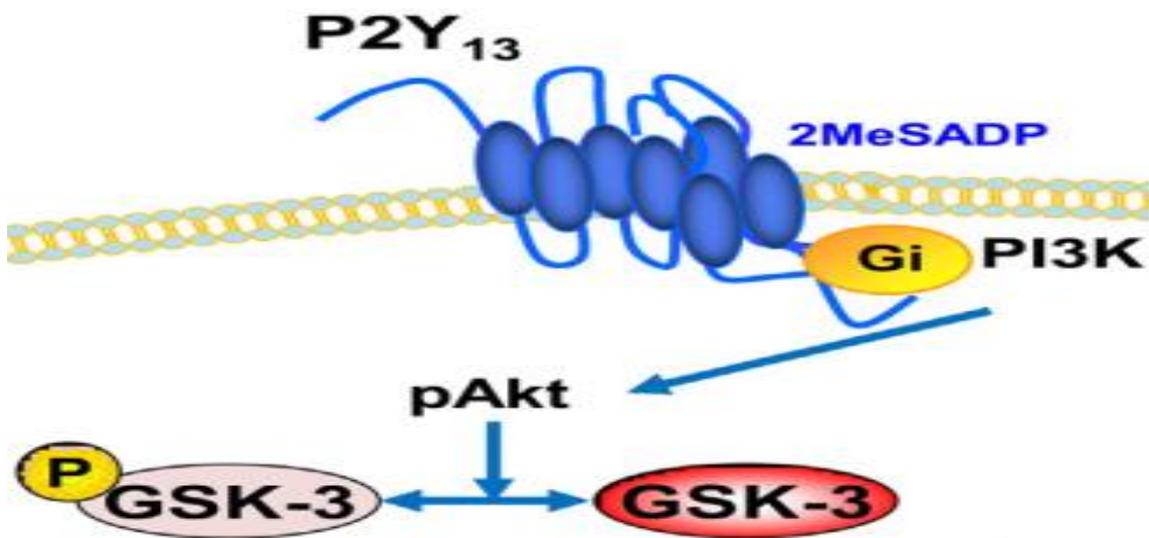


Figura 17. Adaptada de: Miras-Portugal y col., 2015.

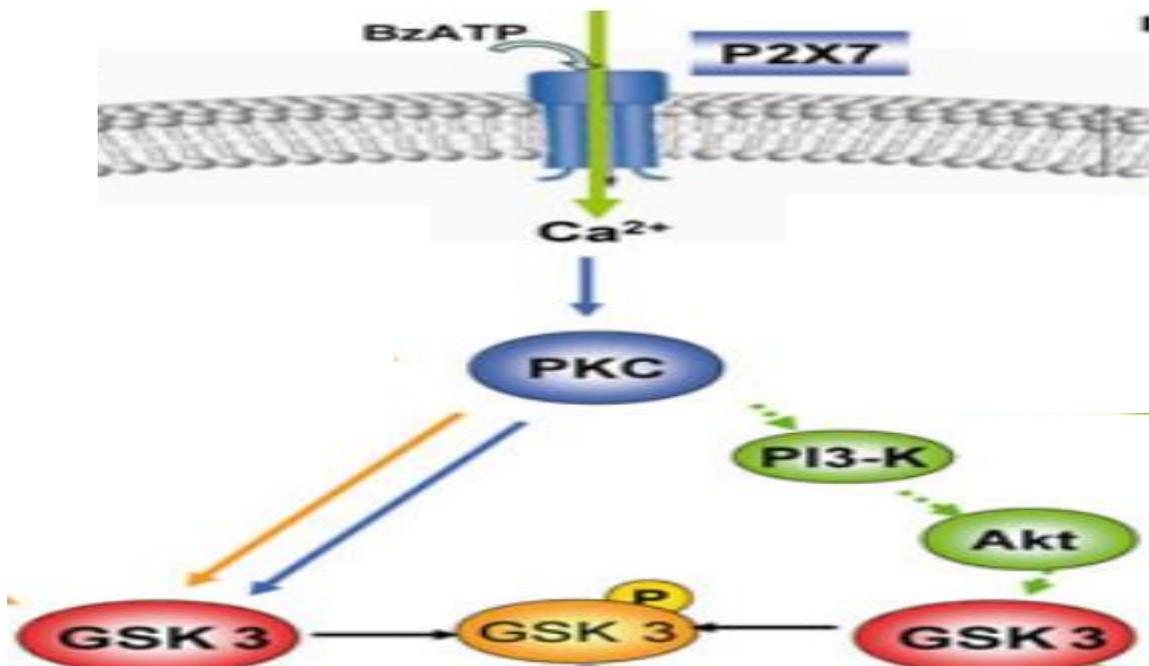


Figura 18. Adaptada de: Ortega y col., 2010.

Más allá de haber sido involucrada en mecanismos de neuroprotección (Miras-Portugal y col., 2015), la regulación purinérgica de GSK3 también participaría en la formación de procesos neuronales. En este caso, los receptores P2Y₁, P2Y₁₃ y P2X₇ mostraron

regular el estado de fosforilación de la quinasa a través de PI3K/Akt, vía PKC y PKA (del Puerto y col., 2011; Diaz-Hernandez y col., 2008).

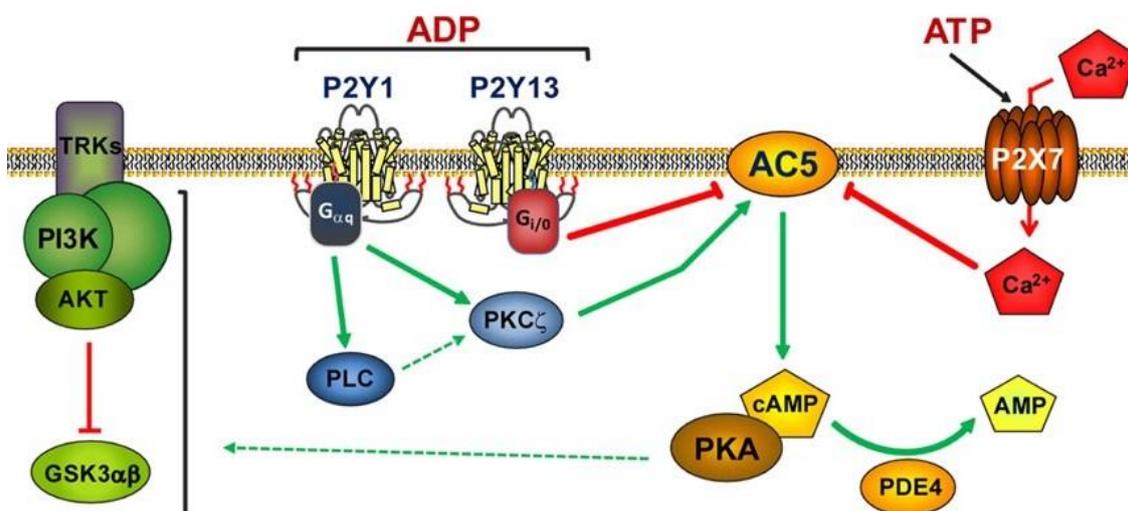


Figura 19. Tomada de: del Puerto y col., 2011.

Otro estudio, también en células nerviosas, reportó inhibición de GSK3 por activación de P2X7 (Amoroso y col., 2015).

También existen reportes que describen a la quinasa como blanco de receptores P2 en otros sistemas y tejidos. Mastrangelo y col., 2012, trataron células madre pluripotentes humanas con ATP y registraron aumentos en la fosforilación de GSK3 β . Además, informaron que el receptor P2Y1 no estuvo involucrado.

Contradiendo los resultados anteriores, donde la activación de purinoceptores condujo a inhibición de GSK3, en células de epitelio alveolar se demostraron aumentos en la expresión de la forma activa de la quinasa, inducidos por activación de P2X7 con BzATP (Guo y col., 2014).

Nucleótidos extracelulares, receptores purinérgicos y β -catenina

Luego de muchos años de investigaciones, la evidencia reunida nos permite concluir que tanto el sistema de señalización purinérgico como el factor de transcripción β -catenina (si bien β -catenina también interviene en las adhesiones focales, esto no se desarrollará en esta Tesis) se encuentran ampliamente distribuidos y cumplen importantes roles en diversos procesos biológicos (Burnstock y Verkhatsky, 2010; Logan y Nusse, 2004).

En la actualidad, existe poca evidencia de regulación de la expresión y actividad transcripcional de β -catenina por nucleótidos extracelulares y receptores purinérgicos. Un reporte indicó que la estimulación purinérgica redujo la expresión y función del factor de transcripción (Guo y col., 2014). Por otro lado, Ortega y col., 2008, y Taurin y col., 2008, observaron el efecto contrario.

Regulación purinérgica de β -catenina, mediada por GSK3, en células óseas

Como se ha detallado previamente, tanto nucleótidos extracelulares y purinoceptores, GSK3, como β -catenina, participan en la regulación de la formación y función óseas (Burnstock y col., 2013; Orriss y col., 2011a, b; Gartland y col., 2012; Baron y Kneissel, 2013; Galli y col., 2012; Glass II y Karsenty, 2007).

Sin embargo, a la fecha, se ha encontrado un único reporte en el que se describe la regulación purinérgica de β -catenina, mediada por GSK3, en células óseas (Grol y col., 2016). En ese trabajo, se emplearon preosteoblastos murinos MC3T3 y se evaluaron los cambios en la localización y actividad transcripcional de β -catenina bajo estimulación de diversos agonistas de receptores P2. La activación de P2X7, por BzATP (300 μ M), indujo aumentos en la fosforilación e inhibición de GSK3, asociados a un incremento en la translocación a núcleo de β -catenina pero sin afectar su actividad transcripcional. Por otro lado, BzATP potenció la translocación de β -catenina provocada por Wnt3a (control positivo), aumentando su rapidez y duración y su actividad transcripcional.

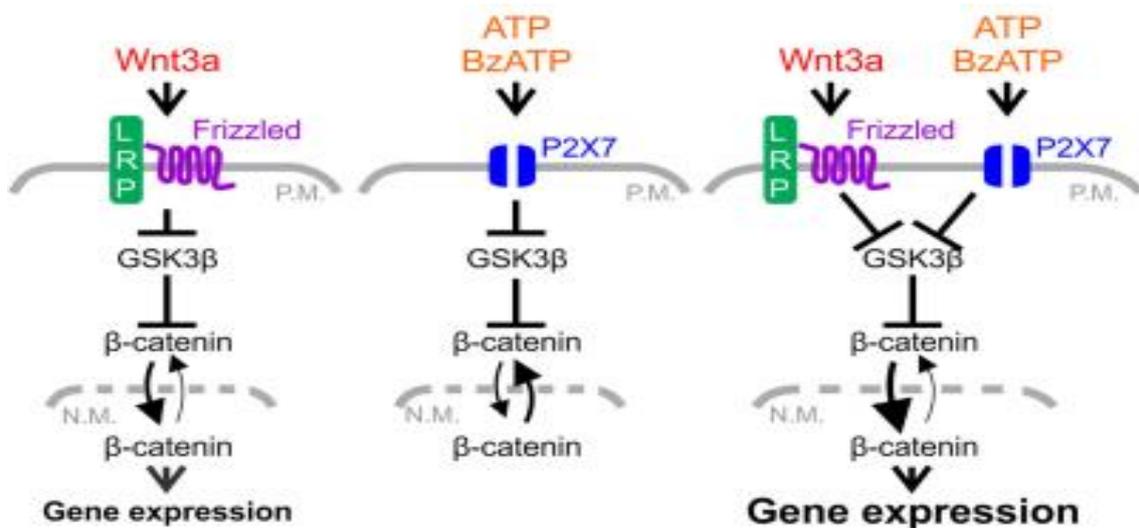


Figura 20. Tomada de: Grol y col., 2016.

Efecto del Calcio extracelular en la formación y función osteoblásticas

Como se mencionara anteriormente, una de las funciones del esqueleto es el mantenimiento de la homeostasis de calcio y fosfato, dado que este tejido es el mayor reservorio de minerales del cuerpo (Cianferotti y col., 2015).

Diversos estudios *in vitro* han mostrado que aumentos en la concentración de calcio extracelular son capaces de estimular la síntesis de ADN y la proliferación de osteoblastos, así como también la diferenciación en linaje osteogénico, aumentando la expresión de marcadores génicos de maduración osteoblástica y la capacidad mineralizante de los cultivos (Yamaguchi y col., 1998a; Godwin y Soltoff, 1997; Nakade y col., 2001; Sugimoto y col., 1993; Khoshniat y col., 2011; Nakamura y col., 2010; Dvorak y col., 2004; González-Vázquez y col., 2014), siendo estos efectos mediados por la activación de un GPCR denominado Receptor Sensor de Calcio (CaSR). La expresión de este receptor ha sido demostrada en células osteoclasticas (Kameda y col., 1998) y en cultivos primarios y líneas celulares de osteoblastos (Yamaguchi y col., 1998a; Yamaguchi y col., 1998b; Yamaguchi y col., 2001). Más aun, la existencia del CaSR ha sido demostrada *in vivo*, en tejido esquelético de humanos y ratas (Dvorak y Riccardi, 2004; Chang y col., 1999). Además de los estudios en cultivos, se han provocado deleciones del gen del CaSR, en modelos murinos, específicamente en células osteoblásticas. En estos ratones se observaron defectos severos en el proceso de mineralización, disminuída formación ósea, reducción del contenido mineral y el volumen de hueso esponjoso y cortical, disminución en la expresión de marcadores de linaje osteogénico y aumentos en marcadores de apoptosis, alterada conectividad trabecular, resultando en un hueso con menor fuerza y provocando múltiples fracturas en estos animales (Chang y col., 2008; Liu y col., 2004; Dvorak-Ewell y col., 2011).

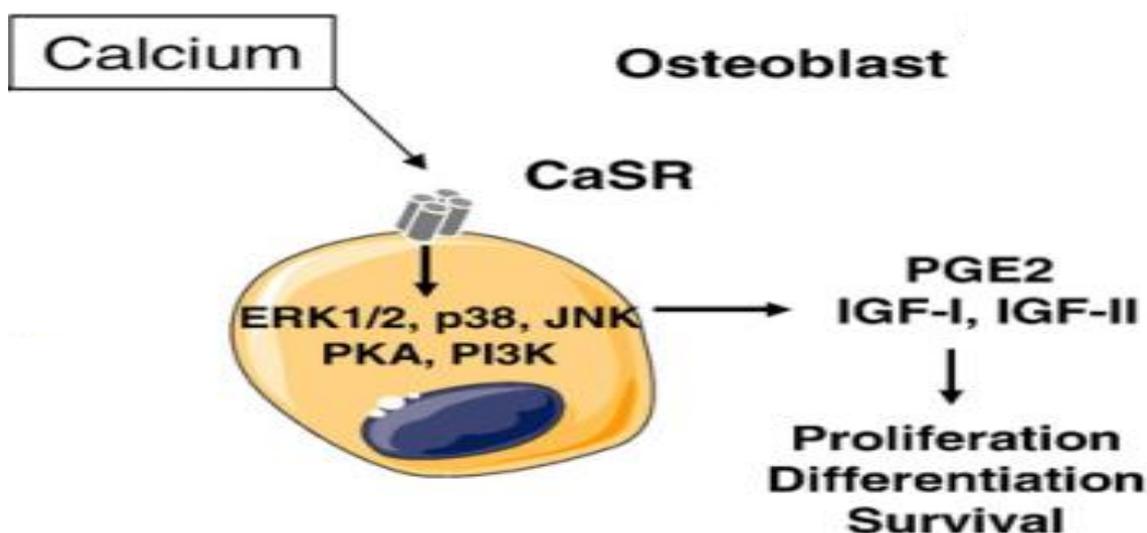


Figura 20. Adaptada de: Marie, 2010.

Por lo expuesto, no resulta descabellado pensar en un posible mecanismo de regulación purinérgico de la expresión/actividad de β -catenina, involucrando a GSK3, en el mantenimiento de la homeostasis del hueso. Por otro lado, no es poco probable que la concentración de calcio extracelular ejerza una influencia en la modulación de la bioquímica osteoblástica por acción de nucleótidos extracelulares.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

Se plantea como hipótesis de trabajo que el ATP extracelular, a través de la activación de diferentes receptores P2, modula la migración, proliferación y diferenciación de osteoblastos de rata, involucrando la vía PI3K/Akt y GSK3/ β -catenina. Además, se postula que los efectos ejercidos por los agonistas purinérgicos sobre los osteoblastos podrían ser alterados en presencia de una elevada concentración de calcio extracelular.

OBJETIVOS

Dado el marco teórico y experimental planteado, en este trabajo de Tesis Doctoral, se propone estudiar la regulación por ATP de la migración, proliferación y diferenciación de células calvariales de rata neonata cultivadas *in vitro*, y evaluar la participación de receptores purinérgicos P2, PI3K/Akt y GSK3- β -catenina. Además, evaluar el efecto de una elevada concentración de calcio extracelular en la respuesta de las células a la estimulación purinérgica.

Para ello los objetivos específicos consistieron en estudiar los efectos del ATP y otros agonistas de receptores P2 sobre:

- la migración celular

- el ciclo celular y la proliferación de osteoblastos

- la diferenciación a osteoblastos maduros, evaluando el grado de mineralización de los cultivos y los cambios en marcadores de diferenciación, como la actividad la enzima fosfatasa alcalina, y expresión de marcadores génicos de maduración/diferenciación osteogénicas (Runx2, Osterix, Osteocalcina, Colágeno tipo I, Osteopontina, Sialoproteína Ósea, Osteoprotegerina, Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs)).

- la participación de la vía PI3K/AKT en la respuesta de los osteoblastos a la estimulación purinérgica

- la participación de la vía GSK3/ β -catenina en la respuesta de los osteoblastos a la estimulación purinérgica

- el rol del calcio extracelular en la respuesta de los osteoblastos a la estimulación purinérgica

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Medio de cultivo (α -MEM) (Sigma-Aldrich), Nucleótidos (ATP γ S, UTP, ADP β S, UDP) (Sigma-Aldrich), Antibióticos (penicilina, estreptomina) (Richet), LiCl (Biopack), CaCl₂(Biopack), NaCl₂(Biopack), KH₂PO₄ (Anedra), KCl (Anedra), NaHCO₃(Anedra), Na₂HPO₄.2H₂O (Cicarelli Laboratorios), Ácido ascórbico (Anedra), β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich), Rojo de Alizarina (RA) (Sigma-Aldrich), Suero Fetal Bovino (SFB) (NATOCOR), NaOH (Biopack), Anticuerpo anti- β catenina (Santa Cruz) y anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (Santa Cruz) (ambos provistos por la Dra. Paula Monje), Azul de tripano (AT) (Anedra), Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Biopack), Colagenasa (Sigma-Aldrich), Tripsina (Sigma-Aldrich), Primers (Invitrogen), Inhibidor de PI3K (Ly294002) (Calbiochem), Ioduro de propidio (IP) (BD Biosciences), Kit para determinación de actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina (Weiner), Kit para extracción de ARN (Biosystems S.A.), Kit para transcripción reversa de ARN a ADN_c (Invitrogen), mezcla de PCR(Biosystems S.A.). Los demás reactivos (agua destilada, alcohol, agua miliq, Violeta cristal, Giemsa, Glutaraldehído, Metanol, Tritón, Hidróxido de amonio, HCl) son todos de calidad analítica.

Obtención de células calvariales de rata neonata

Las células de calvaria fueron obtenidas de ratas neonatas, de 1-5 días de vida, por decapitación de acuerdo a protocolos descriptos previamente (Ayala y col., 2013). Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las normativas de la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio, publicada por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH Publication No. 85-23, revisión 1996), bajo el protocolo número 012/2014 del Comité Institucional para el Uso y Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional del Sur, Argentina (CICUAE-UNS).

Brevemente, los huesitos calvariales se incubaron en PBS 1X conteniendo EDTA 4 mM, durante dos periodos de 10 minutos, a 37 °C, y los sobrenadantes fueron descartados. Luego, se recurrió a la digestión del tejido, con PBS-Colagenasa (200 U/ml) por cuatro periodos de 15 minutos cada uno. Las células liberadas en la primera digestión fueron descartadas, y las procedentes de las siguientes digestiones se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en α -MEM. La totalidad de células obtenidas, se colectó nuevamente por centrifugación, durante 10 minutos a 1500 rpm. A continuación, se incubaron en α -MEM suplementado con 15 % suero fetal bovino (SFB), 1 % penicilina

y estreptomycin, a 37 °C en atmósfera humidificada, con 5,5 % de CO₂. Luego de 24 horas, el medio fue reemplazado por α -MEM suplementado con 10 % SFB, 1 % penicilina y estreptomycin, hasta alcanzar \approx 80 % de confluencia (2-3 días). Finalmente, las células fueron alicuotadas en criotubos y congeladas en N₂ líquido (Morelli y col., 2011)

Las células seleccionadas para su expansión y utilización en los distintos procedimientos experimentales corresponden a los periodos posteriores del proceso de digestión enzimática (2-4), dado que son aquellas las que presentan un fenotipo osteoblástico, mientras que las pertenecientes a la primera digestión exhiben respuestas típicas de osteoclastos (Bellows y col., 1986; Cortina Ramírez y Calderón Salinas, 2004; Kawaguchi y col., 1995)

Cultivo celular y tratamiento

Las células fueron descongeladas y sembradas en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, dejándolas crecer hasta \approx 80 % de confluencia. Luego, se sembraron a una densidad de 10⁴ células/cm² y se cultivaron durante 2-3 días en α -MEM suplementado con 10 % SFB, 1 % penicilina y estreptomycin, a 37 °C en atmósfera humidificada, con 5,5 % de CO₂. Las células utilizadas para los experimentos tienen dos pasajes, siendo el primero aquel realizado cuando se congelan, inmediatamente después de su obtención, y el segundo una vez descongeladas, cuando son desprendidas y sembradas para realizar las determinaciones correspondientes. Debido a que las células derivan de un pasaje reciente (segundo), no se encuentran inmortalizadas ni transformadas (Towler y Arnaud, 2002)

Al alcanzar un \approx 80 % de confluencia, las células son privadas de suero, sustituyendo el medio por α -MEM suplementado con 1 % SFB, 1 % penicilina y estreptomycin (medio base, MB), a 37 °C en atmósfera humidificada, con 5,5 % de CO₂, durante 7-18 horas. Los tratamientos se llevaron a cabo reemplazando el medio de cultivo por α -MEM suplementado con 1 % SFB o medio osteogénico (α -MEM 1 % SFB, Acido Ascorbico 50 μ g/ml y β -glicerofosfato 10 mM), conteniendo los agonistas ATP γ -S, UTP, UDP, ADP β S, CaCl₂ o el inhibidor de GSK3 LiCl, a las concentraciones y durante los tiempos indicados en las figuras. El medio fue renovado cada 2-3 días.

En los tratamientos realizados en presencia de Ca²⁺ extracelular, las concentraciones indicadas son las agregadas al medio de cultivo, el cual contiene una determinada concentración de Calcio (1,35 mM). Por esto, la concentración final de Ca²⁺ en cada condición resulta de la suma de lo agregado (4 mM) y la contenida en el medio (1,35 mM). Las concentraciones elegidas para realizar los estudios en medio conteniendo

Calcio extracelular elevado surgieron de una búsqueda bibliográfica. Además, se ha determinado que durante el proceso de resorción ósea las concentraciones locales de Ca^{2+} alcanzan los 40 mmoles/litro (Silver y col., 1988).

Recuento en hemocitómetro

Finalizado el tratamiento, las células se desprendieron con tripsina y resuspendieron en α -MEM 10 % SFB. A continuación, se cargó la cámara de Neubauer con la suspensión celular y se llevó cabo el conteo en los cuatro cuadrantes externos, de manera de obtener el número total de células/ml (T). Para obtener T, se realizó el siguiente cálculo:
 $T = \text{sumatoria de células ubicadas en los cuatro cuadrantes} \times 10^4 / 4.$

Tinción con azul de tripano (AT)

Al final del tratamiento, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS 1X. Se desprendieron las células con Tripsina, y se resuspendieron con α -MEM 10 %SFB para evitar la proteólisis. Finalmente, se mezclaron, en partes iguales, suspensión celular y AT 0,4%.

Determinación de viabilidad celular

Finalizado el procedimiento, se llevó a cabo el recuento en cámara de Neubauer, previa tinción con AT, como se describe arriba. De manera de obtener T, el número de células viables/ml (V) y el número de células muertas/ml (M). Siendo, M = células que incorporaron el colorante, V = células que excluyeron el colorante, y $T = M + V$. Se determinó el porcentaje de supervivencia como el resultado de $T/V \times 100$. Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado.

Citometría de flujo

Las células fueron sembradas en cajas de Petri de 10 cm de diámetro y se las cultivó hasta 80-90 % de confluencia. Luego, se realizó el tratamiento con los agonistas e inhibidores (LY492002 10 μM , inhibidor de PI3K) indicados, en α -MEM suplementado con 1 % de SFB. Después, las células fueron desprendidas con tripsina (0,25 % PBS 1X) y recolectadas por centrifugación. Seguido a esto, las células se resuspendieron y se permeabilizaron con etanol 70 %. Finalmente, se recolectaron por centrifugación, y fueron resuspendidas para la tinción nuclear con Ioduro de Propidio (IP), a una concentración de 2×10^6 células/ml. Las células teñidas se procesaron en un citómetro de flujo. Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado.

Actividad Fosfatasa Alcalina (FAL)

La actividad enzimática de FAL fue determinada por método colorimétrico, empleando un kit disponible comercialmente (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). FAL, en un medio con pH alcalino (≈ 10), generado por Amino Metil Propanol, libera fenol al hidrolizar el sustrato Fenil-fosfato de Sodio. El fenol se combina con una solución de reactivo de color (4-Amino-Antipirina y Ferricianuro) y se cuantifica a 520 nm.

Finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 50 μ l/pocillo de Tritón al 0,2% en PBS 1X, durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se agregaron 250 μ l/pocillo del sustrato mencionado anteriormente, seguido de incubación durante 10 minutos a 37 °C. Para frenar la reacción, se adicionaron 1250 μ l/pocillo de reactivo de color. Simultáneamente, se procesaron un testigo (200 UI/L de Fenol) y un blanco. Se midió la absorbancia a 520 nm, y se obtuvo el valor de actividad (en unidades internacionales/litro) empleando la siguiente ecuación: $FAL (IU/L) = 200 UI/L \times (M - B)/(S - B)$. Siendo M = muestra, S = testigo, B = blanco. Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado.

Mineralización (Tinción con RA)

Finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X y se fijaron con Glutaraldehído 1%, durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT). Luego, las células se lavaron con H₂O destilada y se incubaron con Rojo de Alizarina (RA) al 2% (pH = 4,1-4,3), durante 30 minutos, a 37 °C. A continuación, se retiró el exceso de colorante con H₂O destilada y se dejaron secar al aire. En este punto, las células se fotografiaron. Luego, se agregó NaOH 0,1 N para realizar la cuantificación por medición de la absorbancia a 548 nm. Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado.

Extracción de ARN y transcripción reversa

La extracción de ácido ribonucleico y la retrotranscripción de la muestra obtenida, se realizaron con kit disponibles comercialmente.

En el caso de la extracción de ARN, al finalizar el tratamiento se aspira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS 1X. Luego, se agrega buffer de lisis y se remueve el lisado con espátula. La muestra se recoge en una columna de extracción y se centrifuga (12000 g, 1 minuto). El eluido se descarta y se agrega buffer de prelavado. Nuevamente se centrifuga (12000 g, 1 minuto) y se elimina el eluido. Después, se hacen dos lavados consecutivos con buffer de lavado y sus centrifugaciones correspondientes

(12000 g, 30 segundos). Este nuevo eluido también debe descartarse y se centrifuga la muestra, en seco, durante 2 minutos a 12000 g. La muestra contenida en la columna se eluye con H₂O libre de nucleasas, centrifugando a 12000 g, 30 segundos. El ARN así obtenido se cuantifica por espectrofotometría y se calcula el contenido mediante la ecuación: (DO obtenida x 40 ng/ml)/1 DO (260 nm). La muestra puede conservarse a -70 °C hasta su procesamiento. En la mayoría de los casos se procesó inmediatamente. La muestra de ARN extraída y cuantificada se retrotranscribió a ADNc mediante un kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto, se compone una mezcla con buffer de reacción, desoxinucleótidos, cebadores, agua libre de nucleasas y transcriptasa reversa, que se agrega a la muestra. Luego, la reacción se lleva a cabo en termociclador, siendo el programa el siguiente: 25 °C, 10 minutos; 37 °C, 120 minutos; 85 °C, 5 minutos. A continuación la muestra se utilizó para qRT-PCR o se conservó a -20 °C hasta su procesamiento.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)

El ADNc, obtenido por transcripción reversa del ARN extraído, se amplificó por qRT-PCR, empleándose un kit comercialmente disponible y en termociclador ABI7500 de AB (Applied Biosystems). Se preparó una mezcla de reacción con ADNc, sonda SYBR green, cebador directo, cebador reverso, colorante pasivo Rox_{low} y agua libre de nucleasas.

La reacción se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor, con ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 3 segundos y ciclos de apareamiento y extensión a 60 °C durante 30 segundos.

Para la cuantificación se empleó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El control endógeno utilizado para la normalización de los valores obtenidos fue GAPDH. El valor de cada condición control fue definido arbitrariamente como 1. Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado. Los cebadores diseñados para la reacción de PCR se listan en tabla.

Gen	Cebador(5' - 3')	
	Directo	Reverso
GAPDH	GGCAAGTTCAACGGCACAGT	TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC
Osterix	GCTCCAGCCCTCTGCGAGAC	GCTGGGTAGGCGTCCCCCAT
Runx2	CCACAGAGCTATTAAGTGACAGTG	AACAACTAGGTTTAGAGTCATCAAGC
Osteocalcina	CTGACAAAGCCTTCATGTCCAAGC	TCCAAGTCCATTGTTGAGGTAGCG
Osteopontina	TATCAAGGTCATCCCAGTTGCCCA	ATCCAGCTGACTTGACTCATGGCT
Col 1 α 1	TTCACCTACAGCACGCTTGTG	TTGGTGGTTTTGTATTCGATGACT
Sialoproteína Ósea	TCCCCACCAGCCAGAAAG	TCGTTGCCTATTTGTTTCGTATTCTT
Osteoprotegerina	AGCTGGCACACGAGTGATGAA	CACATTCGCACACTCGGTTGT

BMP3	GGACCCTCCAATCCAACCA	AGGTTTGGCCGTATCTACTGACA
BMP4	CCAAGCGTAGTCCCAAGCAT	CGACGGCAGTTCTTATTCTTCTTC
BMP5	TCCCTTTGATGGCGTTGGT	AATCTGCCGTCAGAAGCAA
BMP6	CGCTCCGCTCTTCATGCT	TGACACCCCATCCTCTTCGT
BMP7	CCGCTCCAAGACTCCAAAGA	GCTGCTGTTTTCTGCCACACT

Inmunofluorescencia

Una vez terminado el tratamiento, se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS 1X. A continuación, se realizó una fijación con metanol puro, durante 20 minutos a -20 °C. Luego, se lavó con PBS 1X, 2-3 veces, y se bloqueó con BSA (5% en PBS 1X), durante 45 minutos a temperatura ambiente (RT). Después de otro lavado, se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti beta-catenina (dilución 1:300), hasta el otro día, a 4 °C. Seguidamente, se lava y recupera el exceso de anticuerpo, y se agrega el anticuerpo secundario (dilución 1:300), incubando 1 hora a RT. Se retiró el exceso de anticuerpo, con PBS 1X, y se tiñeron los núcleos con IP, a RT durante 15 minutos. Finalmente, se lavó el exceso de colorante.

Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado.

Ensayo de la herida (migración)

Una vez que las células alcanzaron confluencia $\approx 90-100\%$, se realizó una estría (con la punta de un tip) en el centro del pocillo y se retiró el medio. Luego se lavó con PBS 1X, para retirar restos celulares. Se observó al microscopio la herida realizada, y una vez que se confirmó una anchura homogénea y una zona limpia, se procedió a realizar el tratamiento correspondiente.

Finalizado el tratamiento, se practicó una tinción con colorante de Giemsa. Luego, se tomaron fotos de cada pocillo en la zona de la herida, con un microscopio invertido.

Finalmente, se emplearon las fotos para realizar un conteo de las células que invadieron la zona de la estría.

Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado.

Tinción con colorante de Giemsa

Finalizado el tratamiento, se fijaron las células con metanol durante 5-7 minutos, en agitación. Se retiró el alcohol, y se dejó secar al aire. Luego, se procedió a teñir con la solución de Giemsa, en agitación, durante 17-20 minutos. Se lavó el exceso de colorante con la mezcla de agua, y se dejó secar al aire.

La solución de Giemsa y la mezcla de agua se prepararon inmediatamente antes de realizado el protocolo. La solución de Giemsa se preparó en una proporción de 1

volumen de colorante y 20 volúmenes de mezcla de agua. La mezcla de agua se preparó con partes iguales de agua corriente y agua destilada.

Tinción con IP

Luego de finalizado el tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X. A continuación, se realizó una fijación con metanol puro, durante 10 minutos a RT. Se lavó el exceso de fijador y se procedió a teñir con IP, durante 15 minutos a RT. Finalmente, las células se lavaron y se recuperó el exceso de colorante.

Tinción con Cristal Violeta

Finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X, y fijadas con metanol puro, durante 10 minutos a 37 °C. Luego se eliminó el alcohol con agua destilada y se comenzó la tinción con el colorante Cristal Violeta, la cual se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el exceso de colorante fue lavado con agua destilada y se tomaron fotos de los cultivos. Finalmente, se realizó una extracción del colorante, durante 30 minutos a temperatura ambiente, con Tritón 0,2%. La cuantificación espectrofotométrica de los extractos fue llevada a cabo en lector de placas, a una longitud de onda de 590 nm.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el test t-Student. Los valores p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Los resultados cuantitativos fueron expresados como promedio \pm desvío estándar.

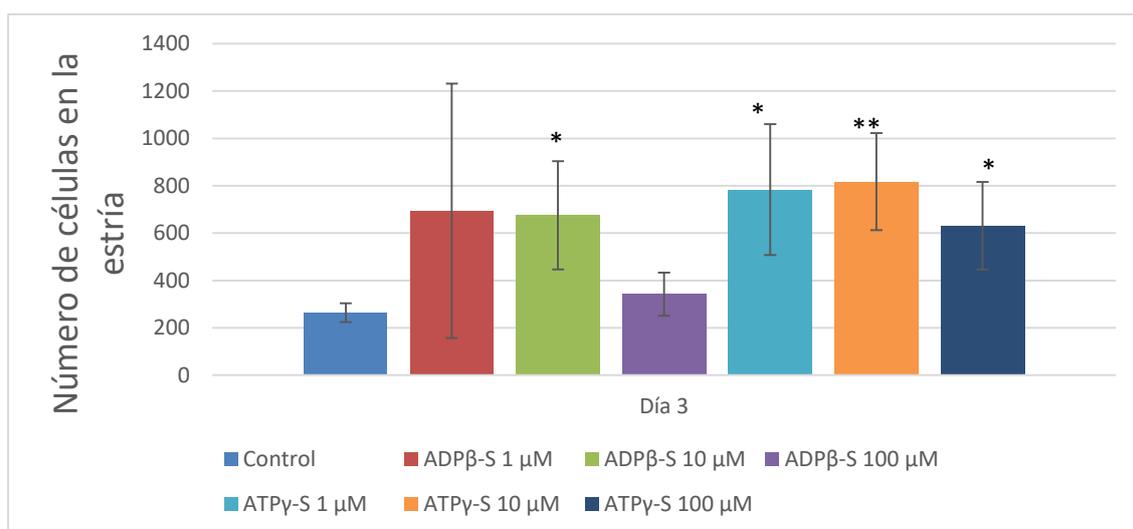
Resultados

RESULTADOS

Participación de receptores purinérgicos en la regulación de la migración, de células calvariales de rata

Existen varios estudios donde se informan efectos tanto positivos como negativos de ATP y otros nucleótidos sobre la migración de diversos tipos celulares (Bomstein y Steberl, 1959; Boonen y col., 1991; Elferink y col., 1992; Shen y col., 1993; Pillois y col., 2002; Vergheze y col., 1996; McCloskey y col., 1999; Omatsu-Kanbe y col., 2006; Rossi y col., 2007; Zhou y col., 2015). Sin embargo, a la fecha se ha encontrado solo un reporte mostrando un rol regulatorio del sistema de señalización purinérgico sobre la migración de células osteoprogenitoras (Ferrari y col., 2011).

Para evaluar el efecto de nucleótidos extracelulares en la migración de células óseas de cultivo primario de calvaria de rata neonata, se empleó el ensayo de la herida (Liang y col., 2007). Para ello, luego de producir una estría o “herida” sobre las monocapas celulares, se llevó a cabo el tratamiento durante 72 horas con ATP γ S o ADP β S 1, 10 y 100 μ M como se indica en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 1, se observaron aumentos significativos en la migración celular para los tratamientos con ATP γ S 1 (197 %), 10 (210 %) y 100 μ M (139 %) y ADP β S 10 μ M (155 %) con respecto al control. Estos resultados sugieren que receptores purinérgicos responsivos a ATP γ S y en menor magnitud a ADP β S estimulan la migración de las células calvariales de rata.



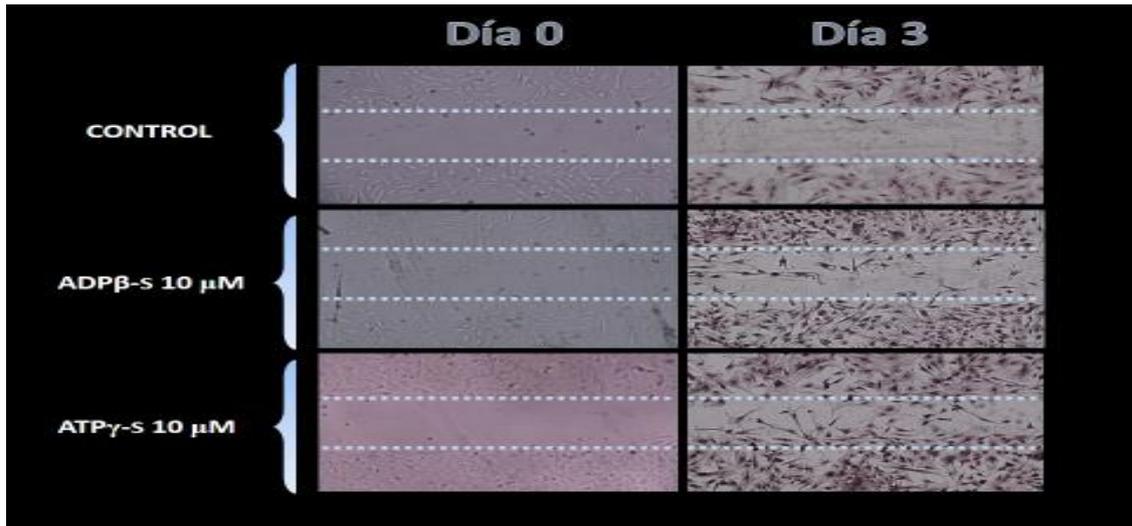


Figura 1: Se realizó una estría sobre las células crecidas en monocapa ($\approx 90\%$ confluentes). A continuación, se incubaron en α MEM 1% SFB (Control) durante 3 días en presencia o ausencia de los agonistas indicados y se determinó la migración según se describe en Materiales y Métodos. **A)** Se muestran valores promedio \pm DE del número de células en la estría al final del experimento. $n = 3$ * $p < 0,025$; ** $p < 0,01$, vs control. **B)** Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

Efecto de ATP γ -S sobre la viabilidad de células calvariales de rata, en medio base (MB)

Para evaluar el efecto del ATP, en la supervivencia de los osteoblastos primarios de rata, se incubaron las células en presencia y ausencia de ATP γ -S 10 y 100 μ M, en medio suplementado con baja concentración de suero (1 %) durante distintos periodos de tiempo. Finalizados los tratamientos la viabilidad celular se determinó empleando el colorante azul de tripano como se indica en Materiales y Métodos. No se observó pérdida de viabilidad en ninguna de las condiciones estudiadas (figura 2).

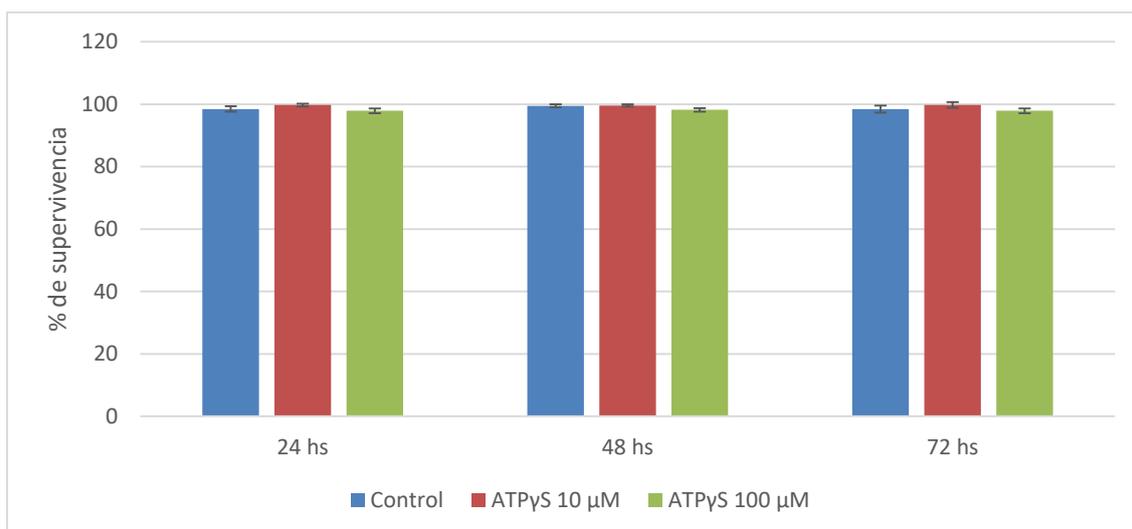


Figura 2: Efecto de ATPγ-S sobre la viabilidad de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en αMEM 1% SFB (Control) en presencia o ausencia de ATPγ-S a las concentraciones indicadas, por 24, 48 y 72 h. Luego, se determinó el porcentaje de células viables como se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran valores promedio \pm DE de tres experimentos independientes

Efecto de ATPγ-S sobre la proliferación de células calvariales de rata, en MB

Estudios recientes, empleando ensayo de MTT, sugieren que ATP y UTP estimulan la proliferación de osteoblastos de rata (Katz y col., 2011). En esta Tesis se estudió el efecto de ATPγ-S sobre la proliferación de células calvariales de rata neonata. Para ello, las células se trataron con el agonista, a distintas concentraciones, durante diferentes periodos de tiempo y a continuación se determinó el número de células mediante recuento en hemocitómetro, como se indica en Materiales y Métodos. No se observaron cambios significativos respecto del control en las distintas condiciones luego de 24 y 48 h de tratamiento. Sorpresivamente, luego de 72 horas de exposición a ATPγS 100 μM, se registró una brusca caída del número celular (fig. 3). Dado que la viabilidad celular no mostró estar afectada bajo estas condiciones, es probable que este resultado sea consecuencia de una disminución en la adherencia celular. Sin embargo, este parámetro no fue evaluado.

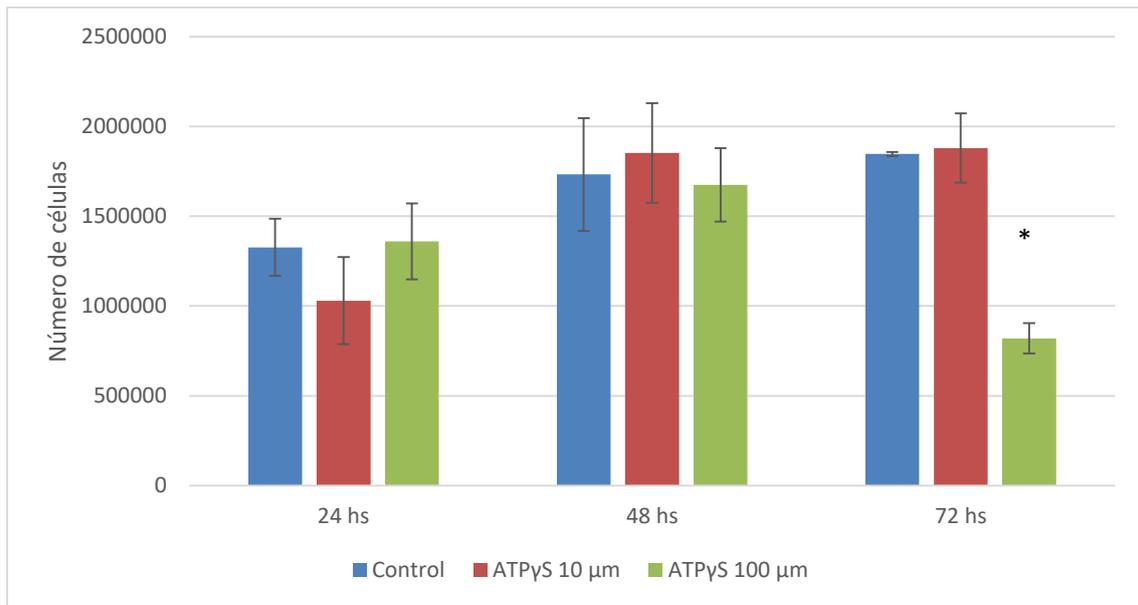


Figura 3: efecto de ATP γ -S sobre la proliferación de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en α MEM 1% SFB (Control) en presencia o ausencia de ATP γ -S a las concentraciones indicadas, por 24, 48 y 72 h. Luego, se determinó el número de células como se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran valores promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,001$ vs. Control.

Efecto de ATP γ -S sobre la viabilidad de células calvariales de rata, en medio osteogénico (MO)

También se llevaron a cabo ensayos de viabilidad, empleando el colorante Azul de Tripiano, en medio osteogénico (α -MEM 1 % SFB, 50 μ g/ml ácido ascórbico, 10 Mm β -glicerofosfato). Las células fueron incubadas en medio osteogénico durante 24, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de ATP γ -S 10 y 100 μ M y durante 7 días en presencia y ausencia de ATP γ -S 10 μ M. Como muestra la figura 4, no se registraron cambios significativos en la viabilidad celular con respecto al control en ninguna de las condiciones estudiadas.

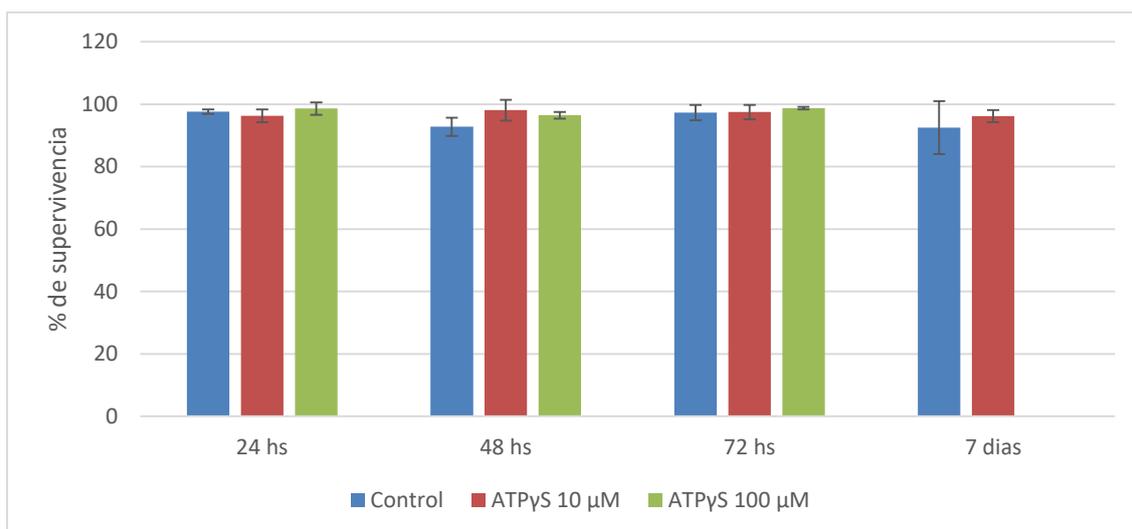


Figura 4: Efecto de ATP γ -S sobre la viabilidad de células calvariales de rata neonata en medio osteogénico. Las células se incubaron en medio osteogénico (α -MEM 1 % SFB, 50 μ g/ml ácido ascórbico, 10 Mm β -glicerofosfato) (Control) en presencia o ausencia de ATP γ -S a las concentraciones indicadas, por 24, 48 y 72 h y 7 días. Luego, se determinó el porcentaje de células viables como se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran valores promedio \pm DE de tres experimentos independientes.

Efecto de ATP γ -S sobre la proliferación de células calvariales de rata, en MO

Se evaluó el efecto del ATP sobre la tasa de crecimiento celular en medio osteogénico. Para ello las células se incubaron en medio osteogénico durante 24, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de ATP γ -S 10 y 100 μ M. Finalizado el tratamiento se realizó el recuento celular como se indica en materiales y métodos. Como muestra la figura 5, el tratamiento con una concentración de agonista 100 μ M produjo una disminución, significativa con respecto al control, en la cantidad celular a todos los tiempos estudiados, mientras que la concentración 10 μ M produjo un efecto similar solo a las 48 h de tratamiento. Dado que la viabilidad celular no se vio afectada, estos datos sugieren que el tratamiento con ATP γ -S en un medio osteogénico disminuye la tasa de crecimiento celular.

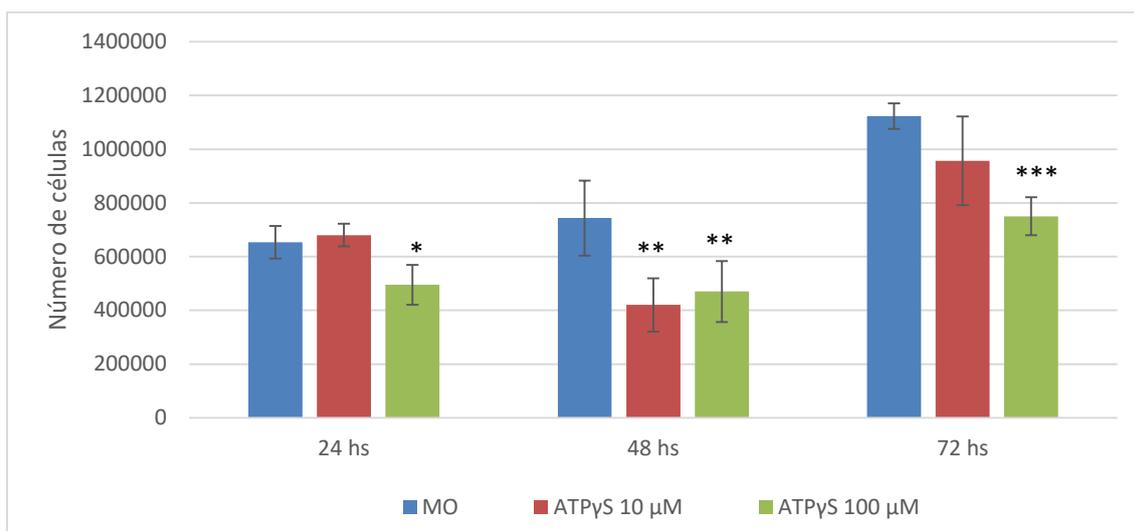


Figura 5: Efecto de la estimulación con ATPγ-S sobre el crecimiento de células calvariales de rata neonata en medio osteogénico. Las células fueron incubadas en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) (Control) en presencia o ausencia de ATPγ-S a las concentraciones indicadas, por 24, 48 y 72 h. A continuación se determinó el número de células según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,025$; *** $p < 0,005$ vs. Control (MO).

Efecto de ATPγ-S a nivel del ciclo celular, de células calvariales de rata

Se ha reportado que ATPγ-S (10 μ M) estimula el progreso del ciclo celular de osteoblastos luego de 16 hs de tratamiento (Ayala y Santillán, 2012). Para corroborar estos datos se evaluó, por citometría de flujo, el ciclo celular de las células calvariales de rata neonata luego de 16 h de tratamiento en presencia y ausencia de ATPγ-S 10 y 100 μ M como se indica en Materiales y Métodos. Se observó un aumento significativo respecto del control, en la cantidad de células que pasaron a fase S del ciclo celular, luego de 16 horas de tratamiento con ATPγS 10 y 100 μ M (Figura 6).

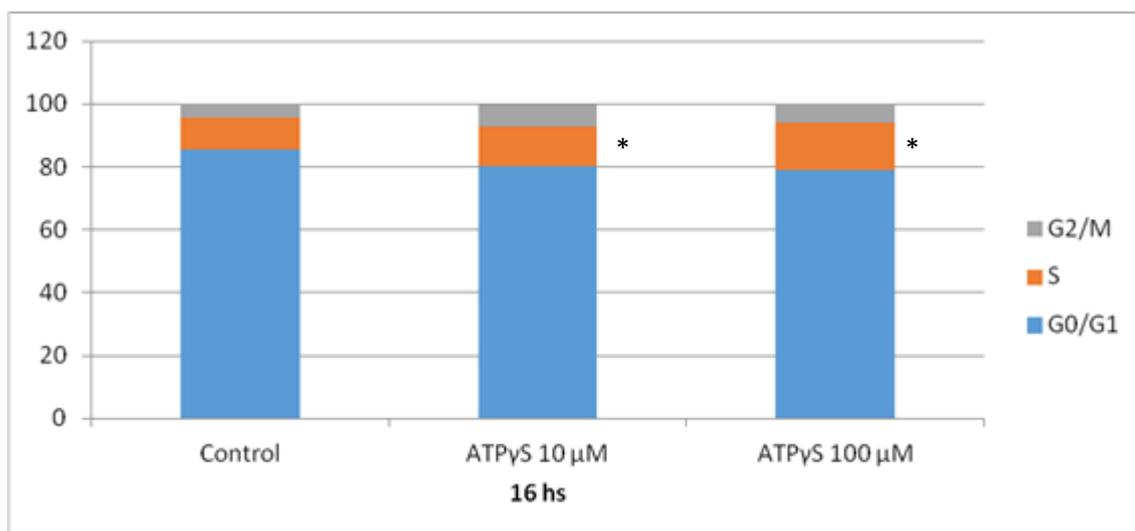


Figura 6: ATPγ-S activa el ciclo celular de células calvariales de rata neonata. Las células incubadas en medio α MEM 1% SFB, se trataron con vehículo (Control) o ATPγ-S (10-100 μ M) por 16 h. Luego se procesaron para citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular (G0/G1, S y G2/ M). El gráfico muestra valores promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

Rol de la vía PI3K/AKT en la activación del ciclo celular por ATP, en células calvariales de rata

Datos recientes han demostrado que los nucleótidos ATP y UTP estimulan la proliferación de células ROS17/2.8 (células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma de rata) y de osteoblastos calvariales de rata neonata a través de la vía PI3K/AKT (Katz y col., 2011). Con el fin de evaluar si la vía PI3K/Akt participa en el efecto del ATP a nivel del ciclo celular, se evaluó el efecto de ATPγ-S en presencia y ausencia del inhibidor de PI3K Ly294002 (10 μ M). Como se observa en la figura 7 el tratamiento de las células con ATPγ-S 10 μ M o 100 μ M por 16 h., incrementó (26% y 53% respectivamente) el número de células que alcanzaron la fase S del ciclo celular. El inhibidor de PI3K Ly294002 (10 μ M) abolió completamente ese efecto del ATPγ-S (Fig. 7, A y B). Esos datos sugieren que el ATP estimula la transición de las células de la fase G₀ a la fase S del ciclo celular y confirma la participación de la vía de señalización de PI3K en la acción mitogénica del ATP sobre células calvariales de rata.

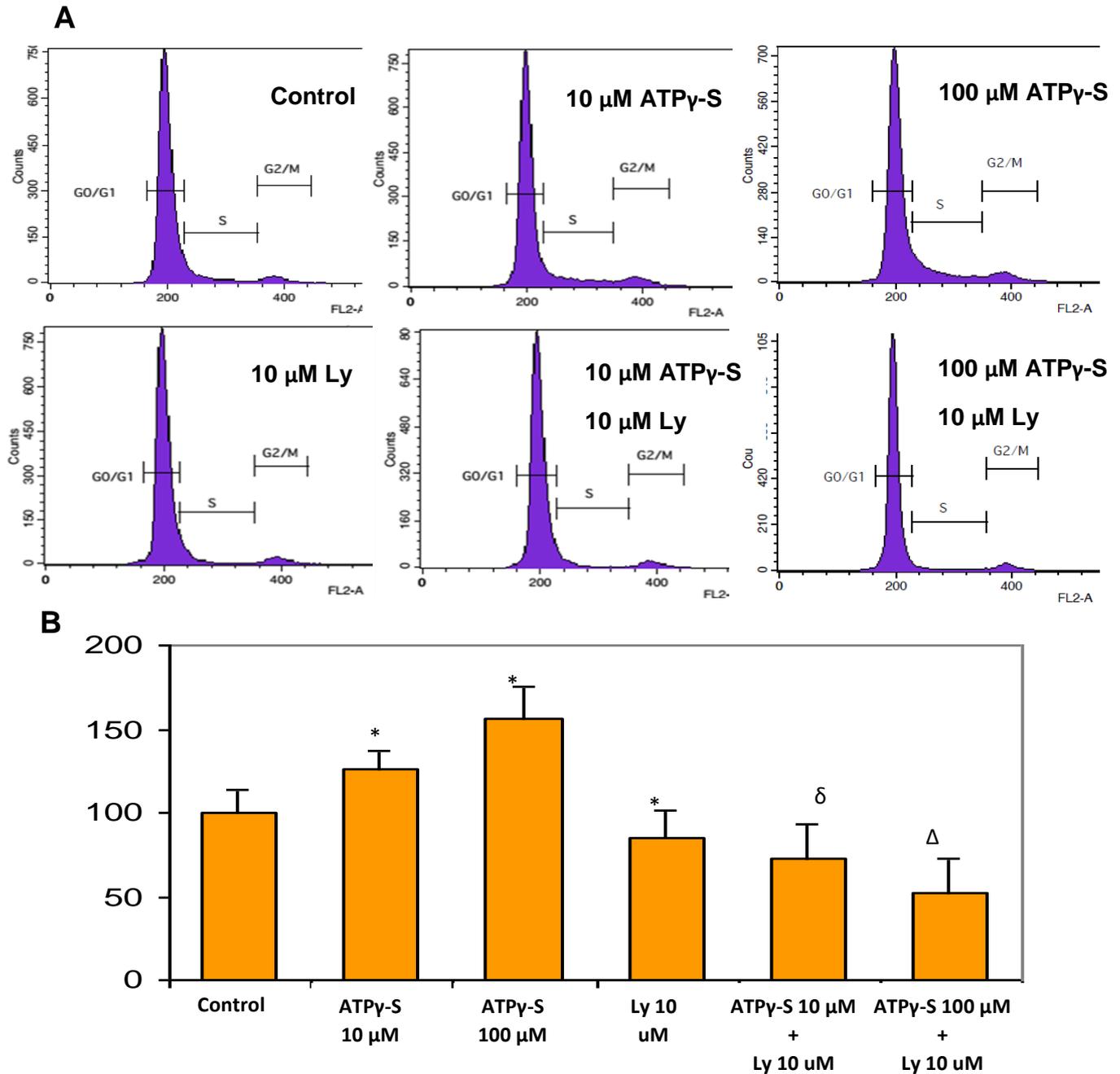


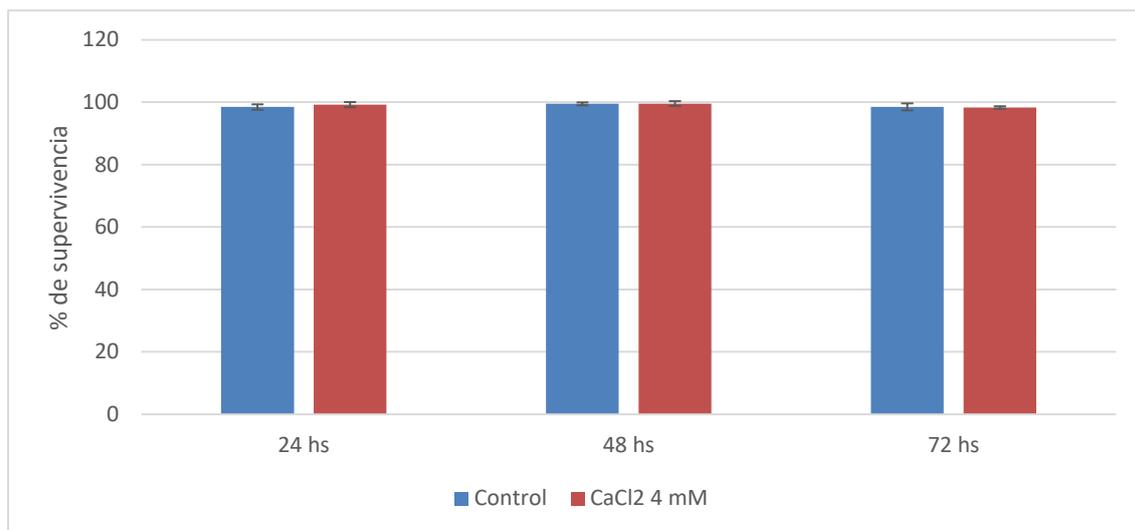
Figura 7: ATP γ -S activa el ciclo celular de células calvariales de rata neonata involucrando a PI3K. Las células incubadas en medio α MEM 1% SFB, se trataron con vehículo (Control) o ATP γ -S (10-100 μ M) en presencia o ausencia de Ly294002 (Ly) 10 μ M por 16 h. Luego se procesaron para citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. **(A)** Los histogramas representan el número de células (*Counts*) vs. Intensidad de fluorescencia (FL2-A). Se muestran gráficos de un experimento representativo de tres experimentos independientes. **(B)** Incremento de células en fase S del ciclo celular con respecto al control (100%). El gráfico muestra valores promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control, δ $p < 0.05$ vs. ATP γ -S 10 μ M, Δ $p < 0.05$ vs. ATP γ -S 100 μ M.

Rol del calcio extracelular y efecto del ATP sobre la viabilidad y proliferación de células calvariales de rata, en MB

Se ha reportado que altas concentraciones de calcio extracelular favorecen la proliferación y diferenciación de osteoblastos (Yamaguchi y col., 1998a; Godwin y Soltoff, 1997; Nakade y col., 2001; Sugimoto y col., 1993; Khoshniat y col., 2011; Nakamura y col., 2010; Dvorak y col., 2004; González-Vázquez y col., 2014). Con el fin de evaluar si una elevada concentración de calcio extracelular afecta la acción del ATP sobre la proliferación de células calvariales de rata, se realizaron recuentos en hemocitómetro luego de varios tratamientos como se indica a continuación.

En primer lugar se evaluó el efecto de una concentración elevada de calcio sobre la viabilidad y proliferación de las células calvariales de rata neonata como se indica en Materiales y Métodos. Para ello, las células se trataron en medio α -MEM 1% FBS (Control) y α -MEM 1% FBS + CaCl_2 4 mM (5,35 mM final). Como muestra la figura 8, esta concentración de calcio no afectó la viabilidad ni la proliferación celular.

A)



B)

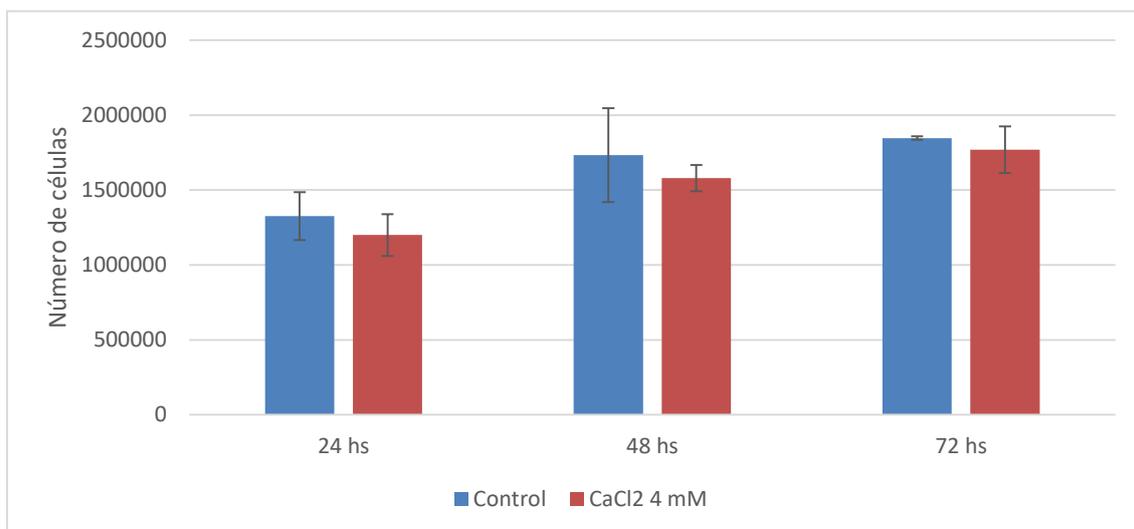


Figura 8: Efecto de Ca²⁺ extracelular elevado sobre la viabilidad y proliferación de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en α MEM 1% SFB (Control) en presencia o ausencia de CaCl₂ 4 mM (5.35 mM final) por 24, 48 y 72 h. Luego, se determinó: **A)** la viabilidad celular empleando el colorante azul de tripano y **B)** la cantidad de células como se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran valores promedio \pm DE de tres experimentos independientes.

A continuación, se evaluó el efecto del tratamiento combinado de ATP y elevado calcio extracelular sobre la proliferación y la viabilidad de las células calvariales de rata.

Las células se trataron con ATP γ -S 10 o 100 μ M en α -MEM 1% SFB, conteniendo una concentración de CaCl₂ elevada, 5.35 mM, durante 24, 48 y 72 h. No se observaron cambios significativos en la viabilidad de las células bajo ninguno de los tratamientos indicados (Fig. 9).

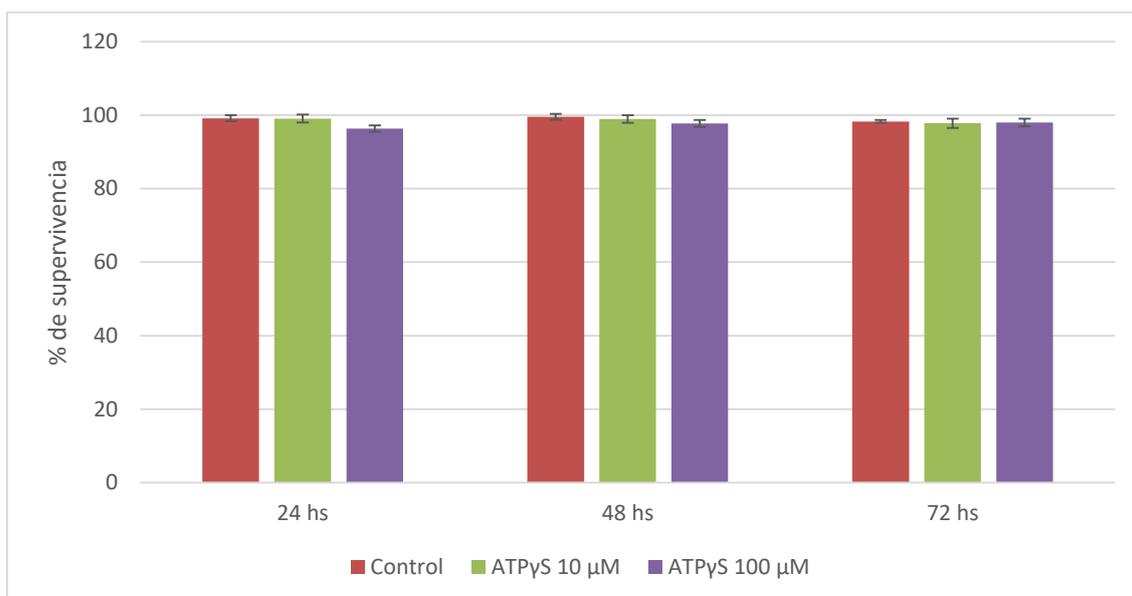


Figura 9: Efecto de la estimulación con ATPγ-S y Ca^{2+} extracelular elevado sobre la viabilidad de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en α MEM 1% SFB conteniendo CaCl_2 4 mM (Control) en presencia o ausencia de ATPγ-S a las concentraciones indicadas por 24, 48 y 72 h. A continuación se determinó la viabilidad celular como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables (promedio \pm DE) (n=3).

Seguidamente, las células se trataron con ATPγ-S 10 o 100 μM en α -MEM 1% FBS, conteniendo una concentración de CaCl_2 elevada, 5.35 mM, durante 24 y 48 h. No se observaron cambios significativos en el número celular luego de los tratamientos con ATPγ-S a las 24 h. En cambio, a las 48 h de tratamiento ambas concentraciones de agonista incrementaron significativamente el número celular respecto del control (Fig. 10).

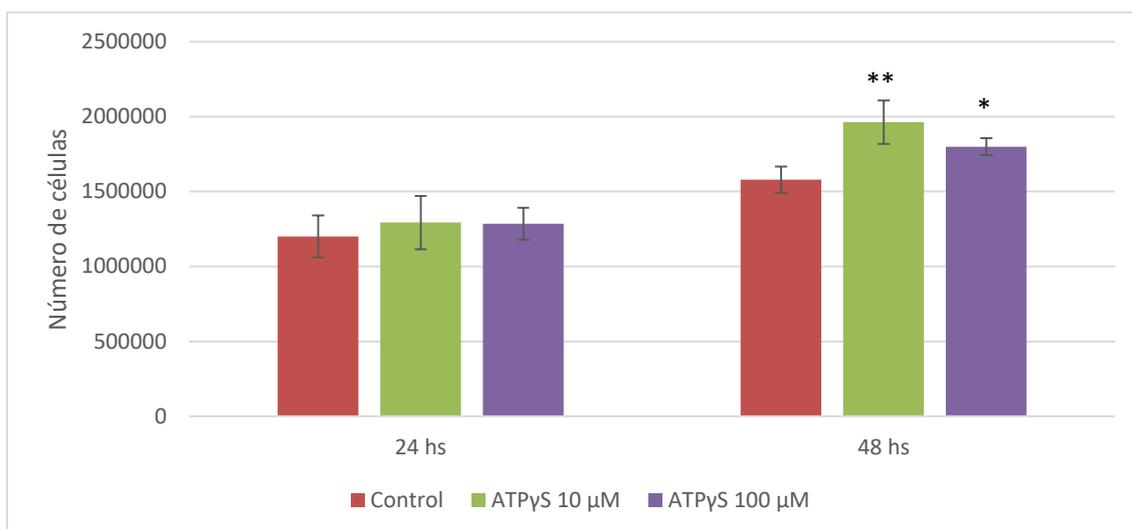


Figura 10: ATPγ-S en presencia de Ca²⁺ extracelular elevado estimula la proliferación de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en αMEM 1% SFB y se trataron con CaCl₂ 4 mM (Control) en presencia o ausencia de ATPγ-S a las concentraciones indicadas, por 24 y 48 h. Luego, se determinó el número de células como se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran valores promedio ± DE de tres experimentos independientes. * p < 0,025; ** p < 0,005, vs. Control

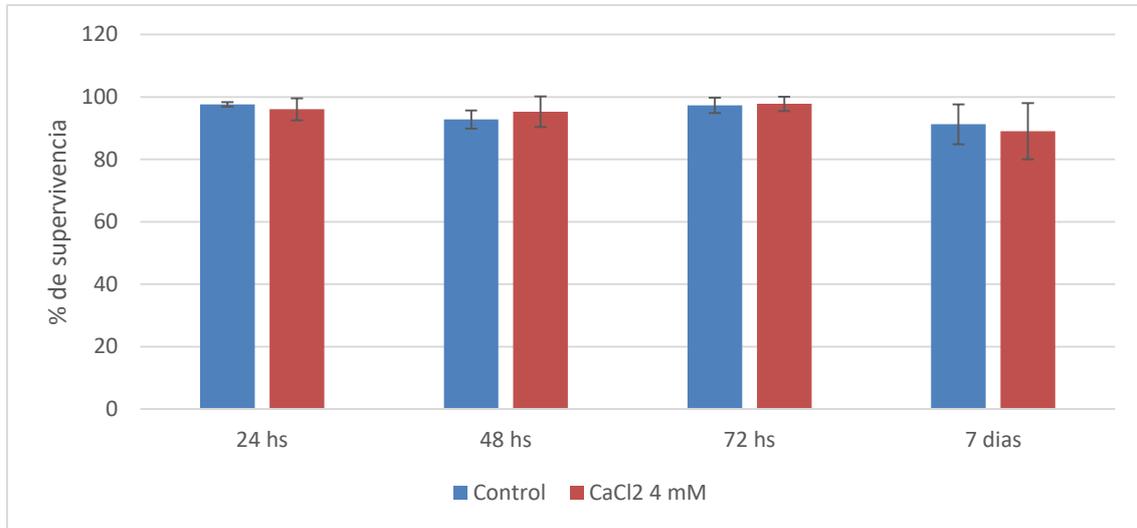
Rol del calcio extracelular y efecto del ATP sobre la viabilidad y proliferación de células calvariales de rata, en MO

Similarmente a lo anterior, las células se incubaron en medio osteogénico en presencia o ausencia de CaCl₂ 4 mM (5.35 mM final) durante 24, 48 y 72 h y 7 días. Seguidamente, se determinó la viabilidad celular empleando azul tripano como se indica en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 11 (A), el medio osteogénico conteniendo una elevada concentración de calcio (5,35 mM) no afectó la viabilidad celular a los tiempos estudiados.

A continuación, se evaluó la tasa de crecimiento celular de los cultivos en el medio osteogénico conteniendo concentración de calcio elevada. Las células se incubaron en medio osteogénico en presencia y ausencia de CaCl₂ 4 mM (5.35 mM final) por 24, 48 y 72 h. Al final de los tratamientos se realizaron los recuentos celulares como se indica en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 11 (B), la presencia de calcio disminuyó los recuentos celulares a las 24 y 48 h de tratamiento. Considerando que la viabilidad no se vio afectada, estos datos sugieren que la concentración de calcio

empleada (5,35 mM) disminuye la tasa de crecimiento celular. Estos resultados fueron similares en magnitud a los mostrados por ATP γ -S en medio osteogénico (figura 5).

A)



B)

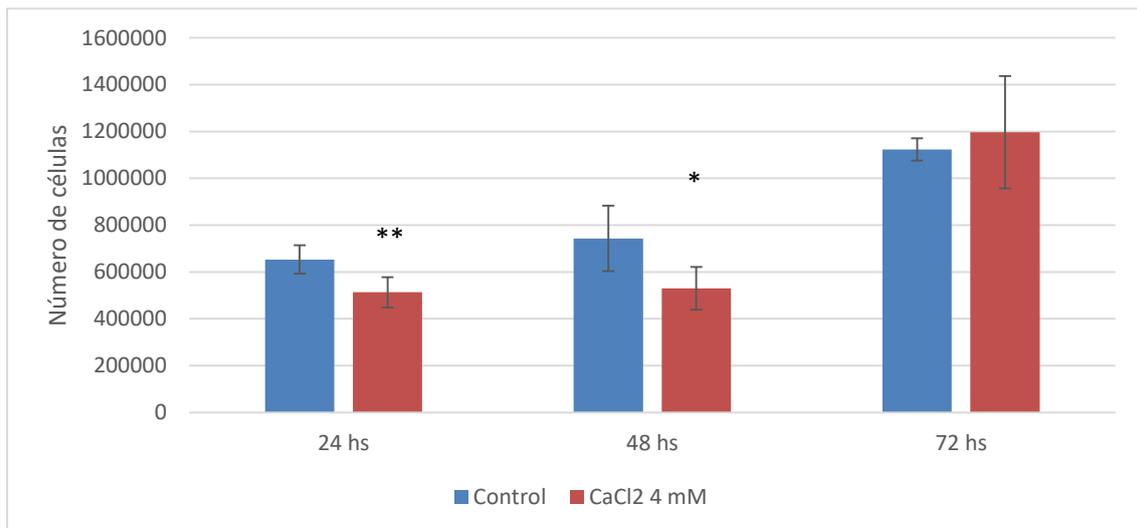
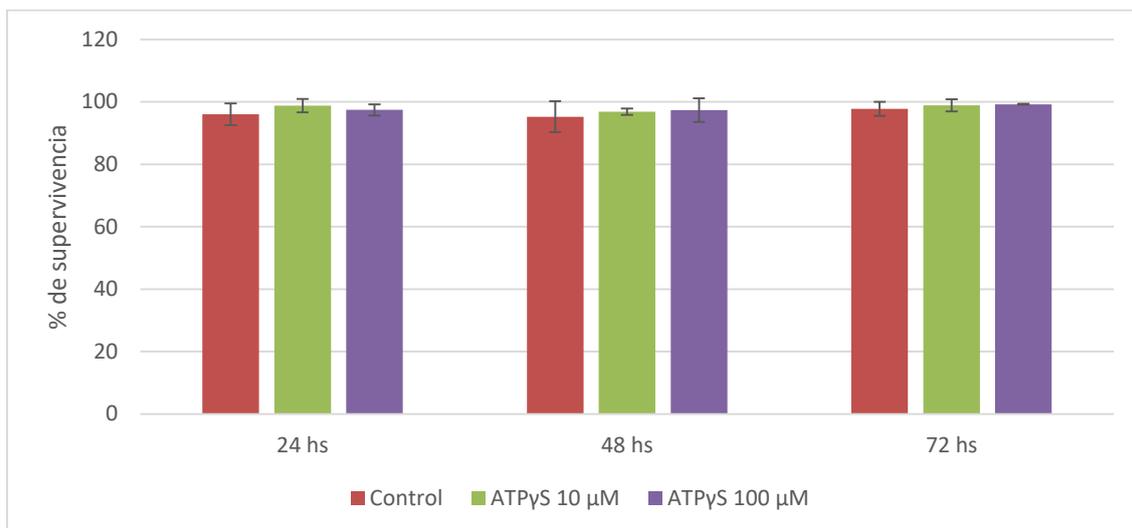


Figura 11: Efecto de Ca²⁺ extracelular elevado sobre la viabilidad y proliferación de células calvariales de rata neonata en medio osteogénico. Las células se incubaron en medio osteogénico (α -MEM 1 % SFB, 50 μ g/ml ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato) (Control) en presencia o ausencia de CaCl₂ 4 mM (5.35 mM final) por los tiempos indicados. Luego, se determinó: **A)** la viabilidad celular empleando el colorante azul de tripano y **B)** la cantidad de células como se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran valores promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,025$; ** $p < 0,001$ vs. Control.

Seguidamente, se estudió el tratamiento combinado de Ca^{2+} y ATP sobre la tasa de crecimiento y viabilidad de las células calvariales de rata neonata. Como muestra la figura 12, no se observaron cambios significativos por el tratamiento con ATP en medio osteogénico conteniendo calcio elevado. Estos resultados sugieren que a pesar de que ambos agonistas por separado mostraron inhibir la tasa de crecimiento (Fig. 5 y 11), el tratamiento combinado no produjo un efecto aditivo.

A)



B)

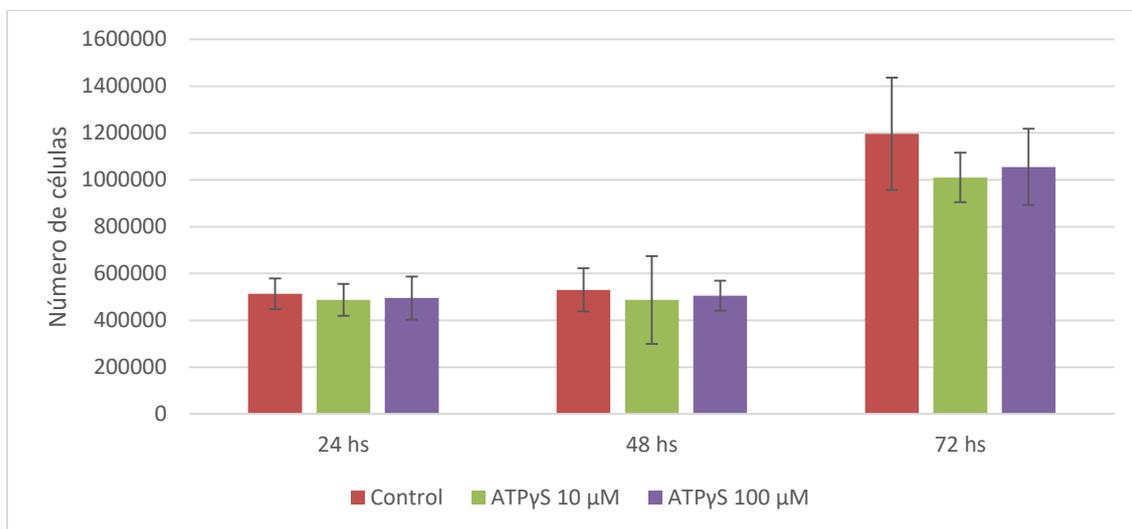


Figura 12: Efecto de la estimulación con ATPγ-S y Ca^{2+} extracelular elevado sobre el crecimiento y viabilidad de células calvariales de rata neonata en medio osteogénico. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) conteniendo CaCl_2 4 mM (Control) en presencia o ausencia de ATPγ-S a las concentraciones indicadas por 24, 48 y 72 h. A continuación se determinó: **A)** la viabilidad celular como se indica en Materiales y

Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables (promedio \pm DE) (n=3). **B).** el número de células según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes.

Efecto de LiCl sobre la viabilidad y proliferación, de células calvariales de rata

Con el fin de evaluar el efecto que tendría la inhibición de GSK3 en la viabilidad celular, se estudió el efecto del LiCl, inhibidor de la enzima (Berridge y col., 1989; Stambolic y col., 1996; Hedgepeth y col., 1997). Para esto, las células fueron incubadas, durante 7 días, en medio osteogénico conteniendo LiCl 10 μ M y se determinó la viabilidad celular, empleando azul tripano, como se indica en materiales y métodos. Como muestra la figura 13, no se observaron cambios significativos respecto al control en la supervivencia celular luego de 7 días de tratamiento con LiCl 10 μ M.

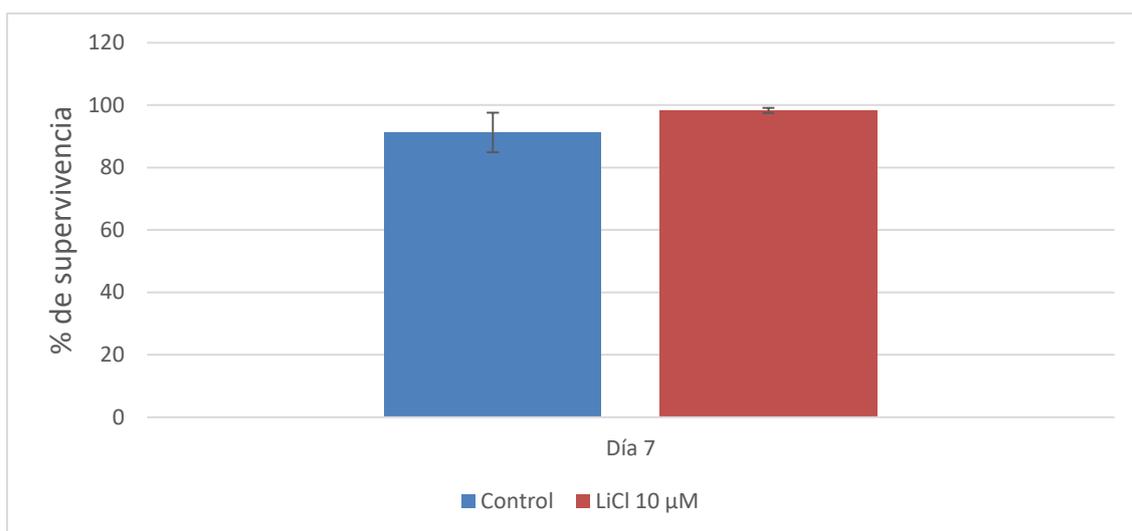


Figura 13: Efecto de LiCl 10 μ M sobre la viabilidad de células calvariales de rata: Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) (Control), en presencia o ausencia de LiCl 10 μ M durante 7 días. A continuación se determinó, la viabilidad celular empleando azul tripano, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables (promedio \pm DE) (n=3).

Dado que en la bibliografía se reporta el empleo de concentraciones mayores del compuesto, se trataron las células en α MEM 1% SFB conteniendo LiCl 10 mM, durante 7 días y se determinó el contenido de ADN por tinción con cristal violeta, como se indica

en Materiales y Métodos. Se observó una disminución del 30% en el contenido de ADN, estadísticamente significativa con respecto al control (Fig. 14).

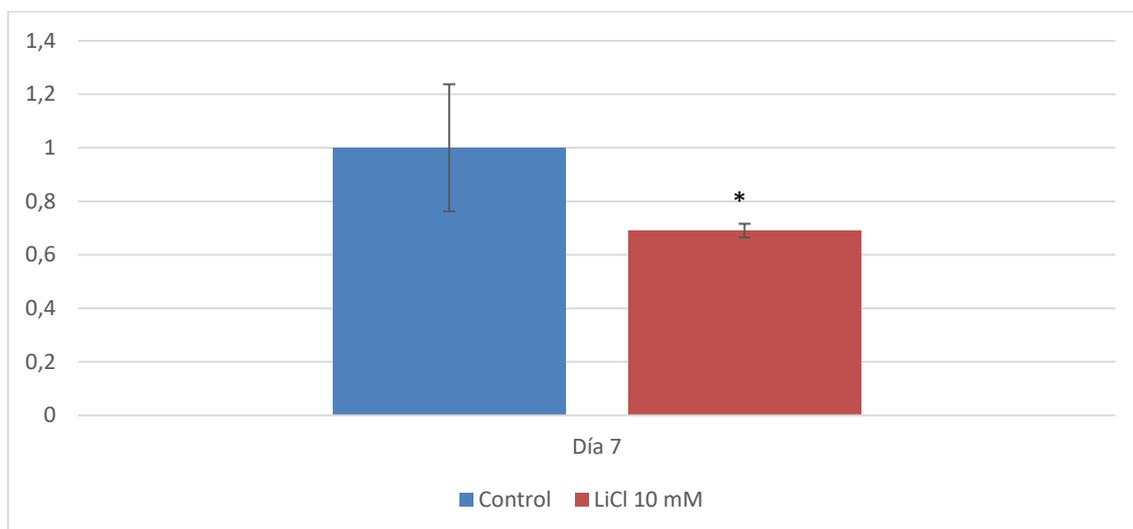


Figura 14: Efecto de LiCl 10 mM sobre el crecimiento de células calvariales de rata:

Las células se incubaron en medio α MEM 1% SFB (Control), en presencia o ausencia de LiCl 10 mM durante 7 días. A continuación se determinó el contenido de ADN empleando cristal violeta, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias otorgando al control el valor 1 (promedio \pm DE) (n=3).

* $p < 0,05$, vs control.

Efecto de nucleótidos extracelulares sobre la diferenciación, de células calvariales de rata

La identificación de una población celular como osteoblástica es compleja, debido a que este tipo celular no presenta una característica exclusiva o distintiva. De esta manera, es necesario el análisis de un grupo de parámetros relacionados con la función osteoblástica para poder definir a una célula como tal (Bellows y col., 1986). Entre estos podemos mencionar, análisis de expresión génica de marcadores osteoblásticos (Runx2, Osterix, Osteocalcina, Colágeno Tipo I, Fosfatasa Alcalina, Osteopontina, Sialoproteína Ósea, Proteínas Morfogénicas Óseas, etc), actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina, producción de proteínas específicas de osteoblastos (Colágeno, Osteocalcina), ensayos de Mineralización de la matriz extracelular, etc. (Rodan y Rodan, 1984; Heersche y col., 1985; Majeska y col., 1985). Dada la influencia del sistema de señalización purinérgico y de GSK3/ β catenina en el proceso de diferenciación

osteoblástica (Orriss y Arnett, 2012; Gartland, 2012; Gartland y col., 2012; Burnstock y col., 2013; Maes y col., 2010; Gambardella y col., 2011; Glass y Karsenty, 2007; Baron y Kneissel, 2013; Kobayashi y col., 2016), en la presente Tesis se evaluó el efecto de la activación de receptores P2, de una concentración de calcio extracelular elevada y de LiCl (inhibidor de GSK3) en la diferenciación osteogénica de células calvariales de rata. A continuación, se estudió el efecto de distintos tratamientos de las células calvariales de rata sobre algunos marcadores de diferenciación osteoblástica.

Efecto de nucleótidos extracelulares sobre la actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina, de células calvariales de rata

Fosfatasa alcalina (FAL) es una enzima cuya actividad es necesaria para la mineralización de la matriz extracelular ósea (Orimo, 2010). Incrementos de su actividad son considerados indicativos de diferenciación osteoblástica, dado que a lo largo del proceso de maduración de células osteoprogenitoras, la actividad y expresión de la enzima van en aumento (Siggelkow y col., 1999).

Recientemente se ha reportado que ATP y UTP aumentan la actividad de FAL en osteoblastos de rata, sugiriendo estimular su diferenciación (Katz y col., 2011; Ayala y col., 2013). Con el fin de confirmar esos datos, en esta Tesis se evaluó el efecto de ATP γ -S 10 μ M y UTP 10 y 100 μ M sobre la actividad FAL en las células calvariales de rata neonata, como se indica en Materiales y Métodos, durante 4-10 días. Como muestra la figura 15, el tratamiento con ATP γ -S 10 μ M produjo un aumento luego de 10 días, estadísticamente significativo con respecto al control en el sistema celular empleado en esta Tesis.

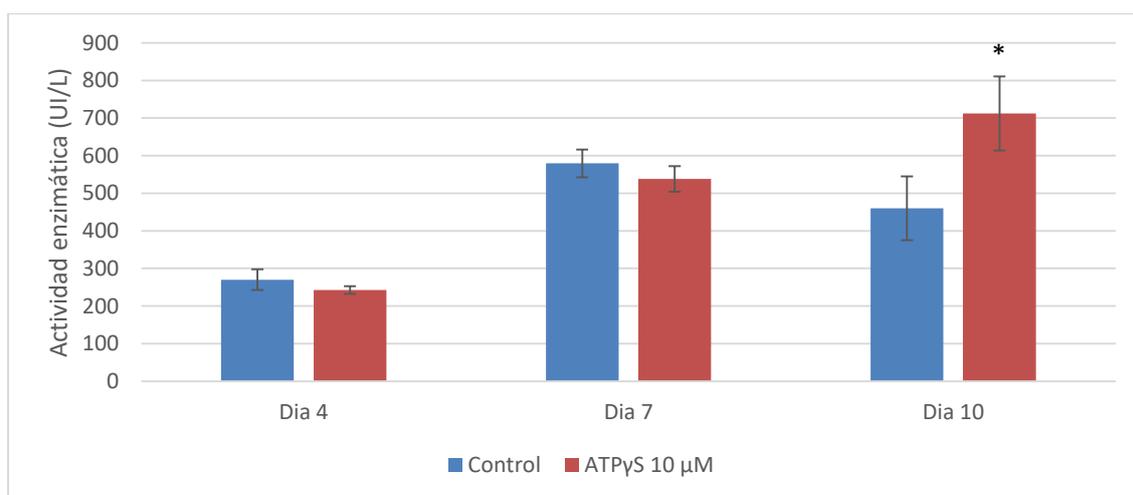


Figura 15: Efecto de la estimulación con ATP γ -S sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata en medio osteogénico. Las células se incubaron en

medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) (Control) en presencia o ausencia de ATP γ -S 10 μ M durante los tiempos indicados. A continuación se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,005$ vs. Control (MO).

Para el caso de UTP, no se detectaron cambios luego de 4 y 7 días con UTP 10 y 100 μ M (Figura 16).

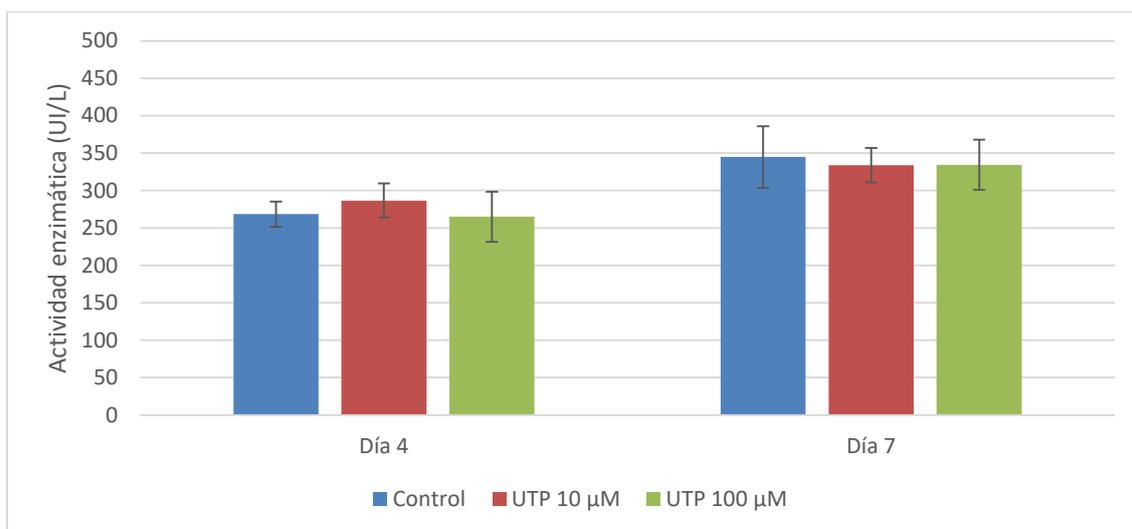


Figura 16: Efecto de la estimulación con UTP sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata en medio osteogénico. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) (Control) en presencia o ausencia de UTP 10 o 100 μ M durante los tiempos indicados. A continuación, se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes.

Rol del calcio extracelular y efecto de nucleótidos sobre la actividad FAL, de células calvariales de rata

En primer lugar se evaluó el efecto de una elevada concentración de calcio extracelular (5,35 mM) sobre la actividad de FAL en los cultivos. Para ello, las células se incubaron en medio osteogénico en presencia o ausencia de CaCl₂ 4 mM (5,35 mM final) durante los tiempos indicados. Finalizados los tratamientos, se determinó la actividad enzimática como se describe en Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 17, las células tratadas con elevada concentración de calcio mostraron un incremento significativo ($p < 0,025$) respecto del control a los 10 días de tratamiento.

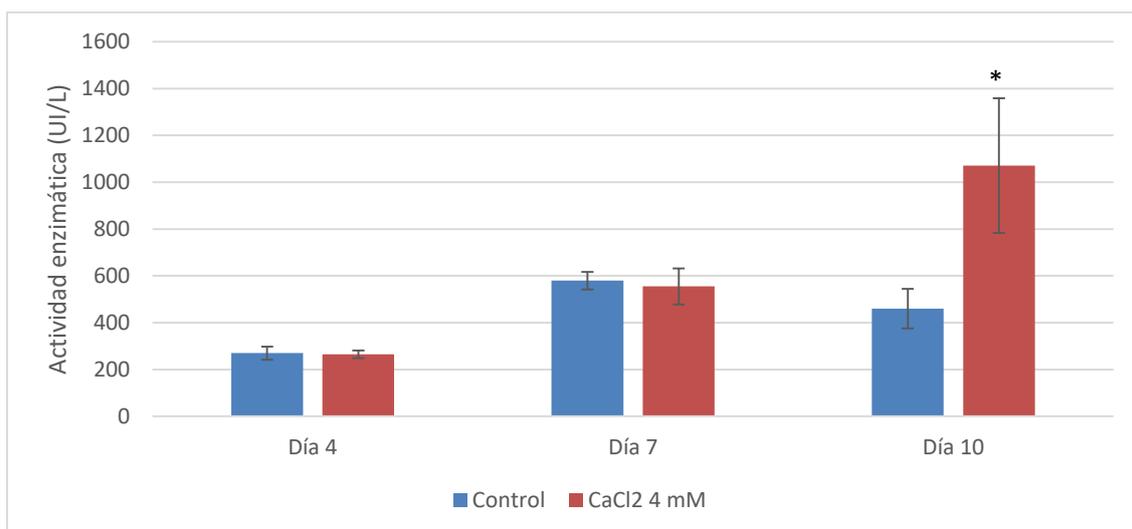


Figura 17: Efecto del Ca^{2+} extracelular elevado sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) (Control), en presencia o ausencia de CaCl_2 4 mM (5,35 mM final) durante los tiempos indicados. A continuación, se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,025$ vs. Control (MO).

Seguidamente, se evaluó el efecto del tratamiento combinado de calcio y nucleótidos sobre la actividad de FAL en las células calvariales de rata neonata. Las células se trataron en medio osteogénico conteniendo elevada concentración de calcio (5,35 mM) en presencia y ausencia de distintos nucleótidos a las concentraciones indicadas. Como muestra la figura 18, el tratamiento con $\text{ATP}\gamma\text{-S}$ 10 μ M indujo una disminución significativa con respecto al control a los 10 días de tratamiento. En cambio el tratamiento con UTP 10 μ M mostró incrementos significativos en la actividad FAL a los 5 y 6 días, y UDP 100 μ M solo a los 5 días (fig. 19).

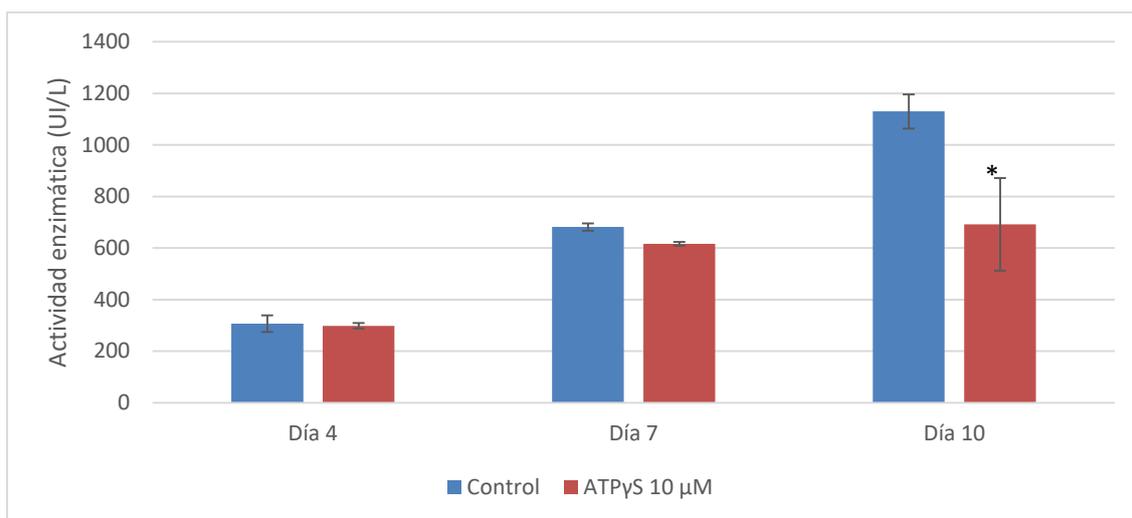


Fig. 18: Efecto del tratamiento combinado de Ca^{2+} extracelular elevado y ATP γ -S sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) conteniendo CaCl_2 4 mM (Control) en presencia o ausencia de ATP γ -S 10 μ M durante los tiempos indicados. A continuación, se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,025$; ** $p < 0,01$; vs. Control.

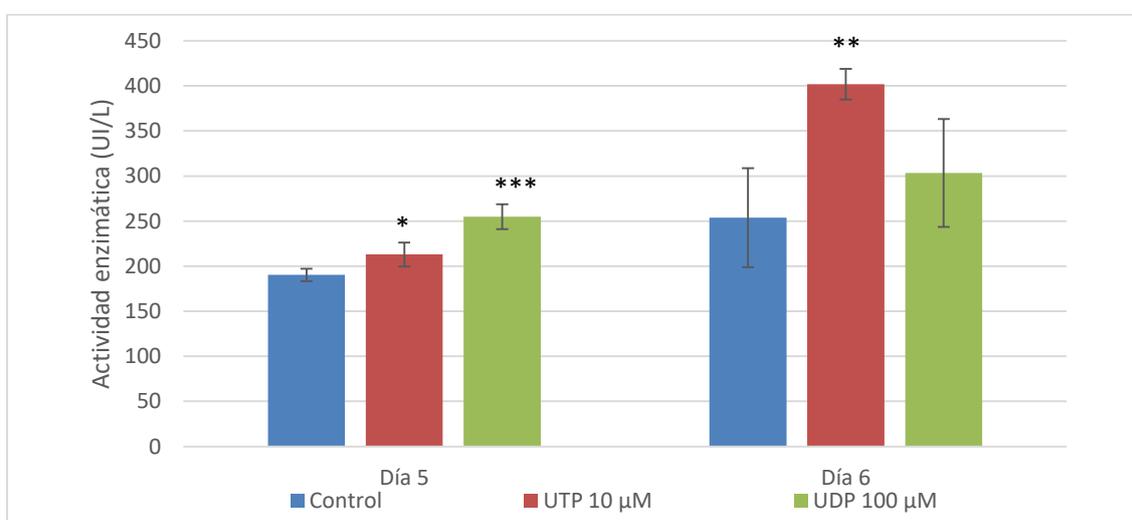


Figura 19: Efecto del tratamiento combinado de Ca^{2+} extracelular elevado y UTP o UDP sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) conteniendo CaCl_2 4 mM (Control) en presencia o ausencia de UTP o UDP a las concentraciones indicadas durante 5 y 6 días. A continuación, se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,025$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Control.

Efecto de LiCl sobre la actividad enzimática de FAL, de células calvariales de rata

Con el fin de evaluar el efecto que tendría la inhibición de GSK3 en la diferenciación celular, se estudió el efecto del LiCl, sobre la actividad FAL de los cultivos. Para esto, las células fueron incubadas en medio osteogénico en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de LiCl durante distintos tiempos y se determinó la actividad FAL, como se indica en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 20, se observaron aumentos significativos respecto al control en la actividad FAL luego de 4 y 7 días de tratamiento con LiCl 4, 6, 8 y 10 mM.

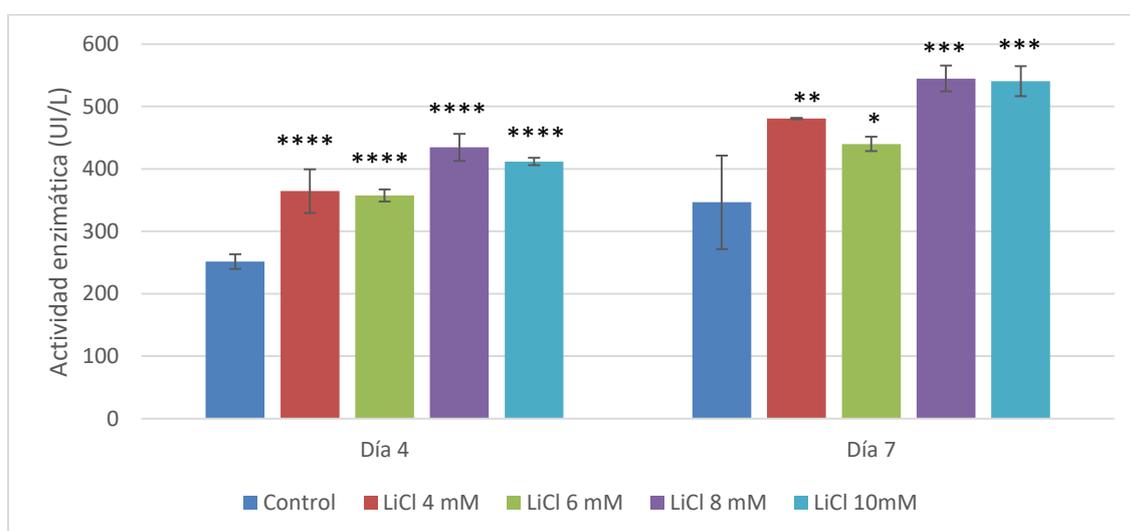


Figura 20: Efecto del tratamiento con LiCl sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) (Control), en presencia o ausencia de LiCl a las concentraciones indicadas durante 4 y 7 días. A continuación se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * p < 0,05; ** p < 0,025; *** p < 0,005; **** p < 0,001 vs. Control (MO).

Por otro lado, una exposición de 10 días a LiCl 10 mM indujo una disminución importante y estadísticamente significativa en la actividad enzimática de FAL respecto del control (fig. 21).

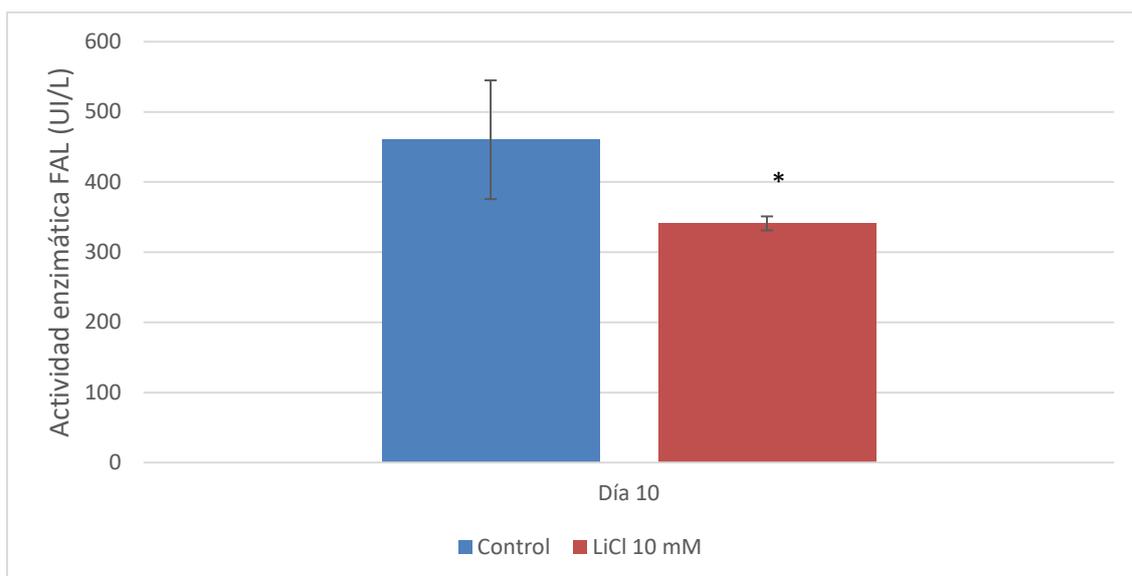


Figura 21: Efecto del tratamiento con LiCl 10 mM durante 10 días sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) (Control), en presencia o ausencia de LiCl 10 mM durante 10 días. A continuación se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. Control (MO).

Rol del LiCl y efecto de nucleótidos sobre la actividad FAL, de células calvariales de rata

Seguidamente, se evaluó el efecto del tratamiento combinado de Litio y nucleótidos sobre la actividad de FAL en las células calvariales de rata neonata. Las células se trataron en medio osteogénico conteniendo Cloruro de Litio (10 mM) en presencia y ausencia de UTP a las concentraciones indicadas. Como muestra la figura 22, el tratamiento con UTP no provocó cambios en el efecto inducido por Litio.

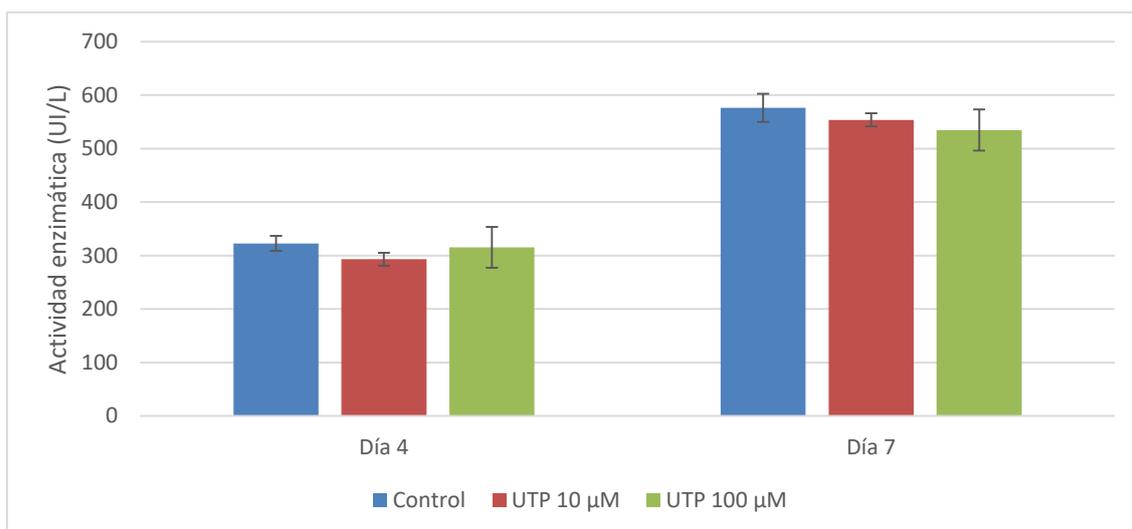


Figura 22: Efecto del tratamiento combinado de Litio y UTP sobre la actividad FAL de células calvariales de rata neonata. Las células se incubaron en medio osteogénico (α MEM 1% SFB, β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml) conteniendo LiCl 10 mM (Control) en presencia o ausencia de UTP a las concentraciones indicadas, durante 4 y 7 días. A continuación, se determinó la actividad FAL según se describe en Materiales y Métodos. Los datos muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes.

Efecto de nucleótidos extracelulares y LiCl sobre la expresión de genes relacionados con diferenciación osteoblástica, de células calvariales de rata

Existen diversos métodos para estudiar el proceso de diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos maduros, formadores de hueso. Uno de ellos como se mencionó anteriormente es la medición de actividad FAL. Además, una herramienta muy utilizada es el análisis de expresión génica de marcadores de maduración/diferenciación osteoblástica. En la presente Tesis, se empleó la reacción en cadena de la polimerasa, a tiempo real (qPCR-real time) para estudiar cambios en la expresión de distintos marcadores de diferenciación osteoblástica como se describe a continuación.

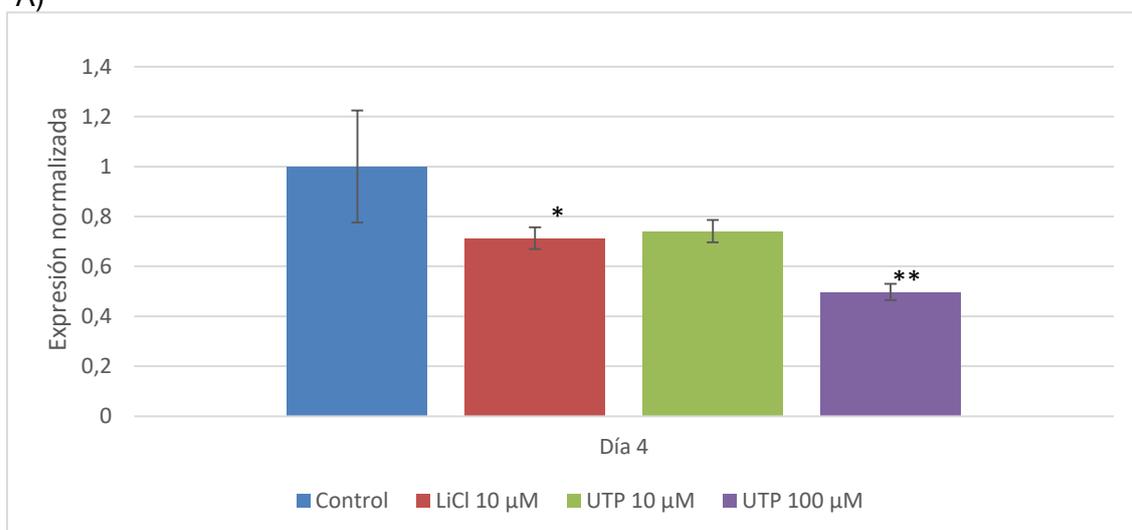
Expresión de Runx2

Runx2 no solo es un factor de transcripción crucial para la diferenciación osteoblástica y el desarrollo óseo (Li y Xiao, 2007), sino que representa el marcador más temprano para la identificación de una célula como propia de este linaje (Karsenty y col., 2009).

Runx2 pertenece a la familia de factores de transcripción que contienen un dominio de unión al ADN, denominado RUNT. Éste, además, es utilizado para la interacción con otras proteínas nucleares (Karsenty y col., 2009).

En la presente Tesis se evaluó el efecto de la activación de receptores P2 y de la inhibición de GSK3 en la expresión del gen de Runx2. Para esto, las células fueron tratadas con UTP 10 y 100 μM ó LiCl 10 μM durante los tiempos indicados. Como se observa en la figura 23, la expresión génica de Runx2 disminuyó, significativamente respecto del control, luego de 4 días de tratamiento con LiCl 10 μM o con UTP 100 μM y luego de 8 días de exposición a UTP 10 μM .

A)



B)

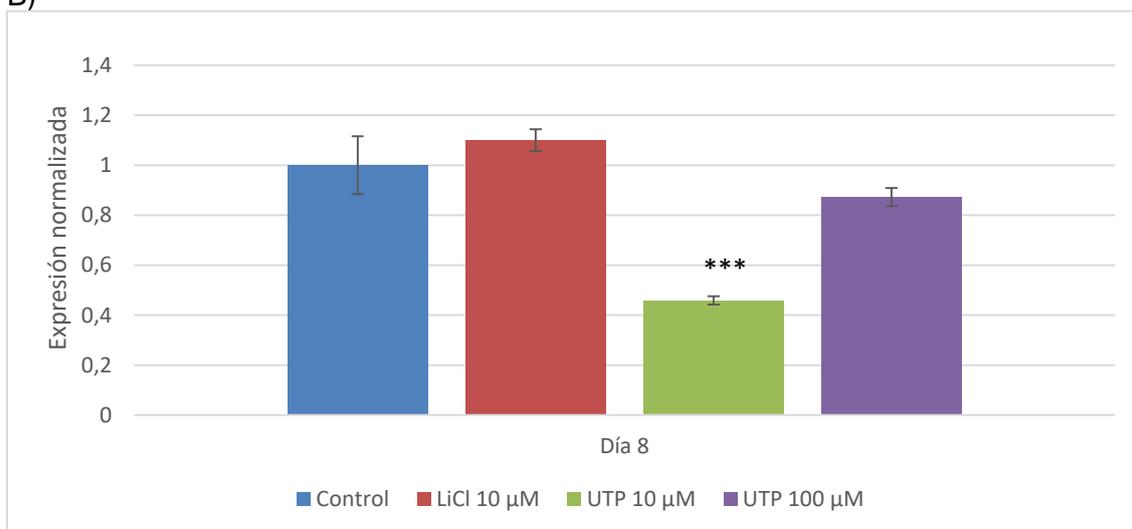


Figura 23: Efecto del tratamiento con LiCl o UTP de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de Runx2. Las células

se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de UTP 10 ó 100 μM o LiCl 10 μM , durante 4 (A) y 8 (B) días. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de Runx2 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,001$, vs control.

Además, se estudió el efecto de una aumentada concentración de Calcio extracelular sobre la expresión génica de Runx2. Para esto, las células fueron tratadas durante 72 horas en medio osteogénico en presencia y ausencia de CaCl_2 4 mM (5,35 mM final). Como muestra la figura 24, no se observaron cambios significativos respecto al control a este tiempo de tratamiento.

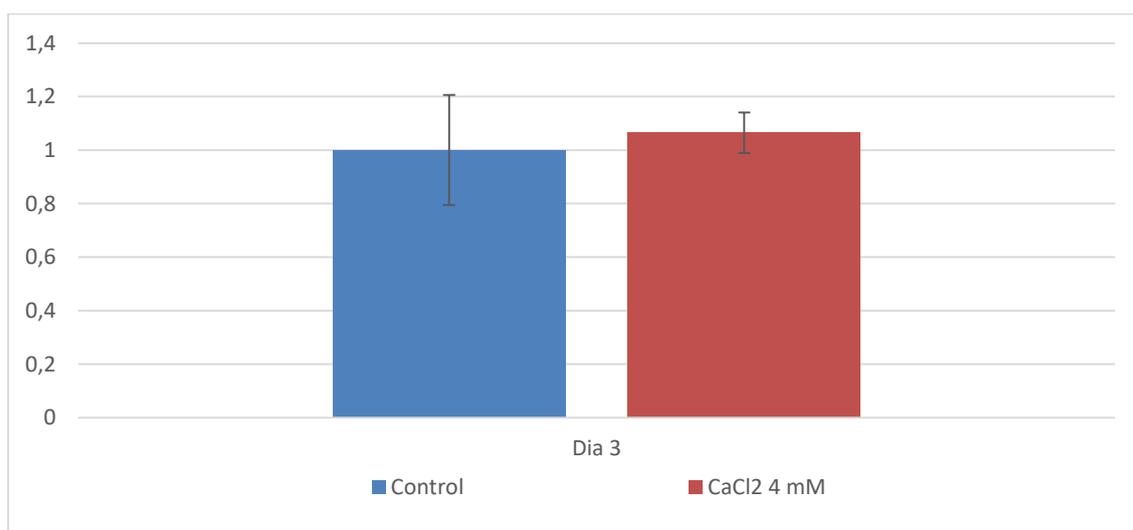


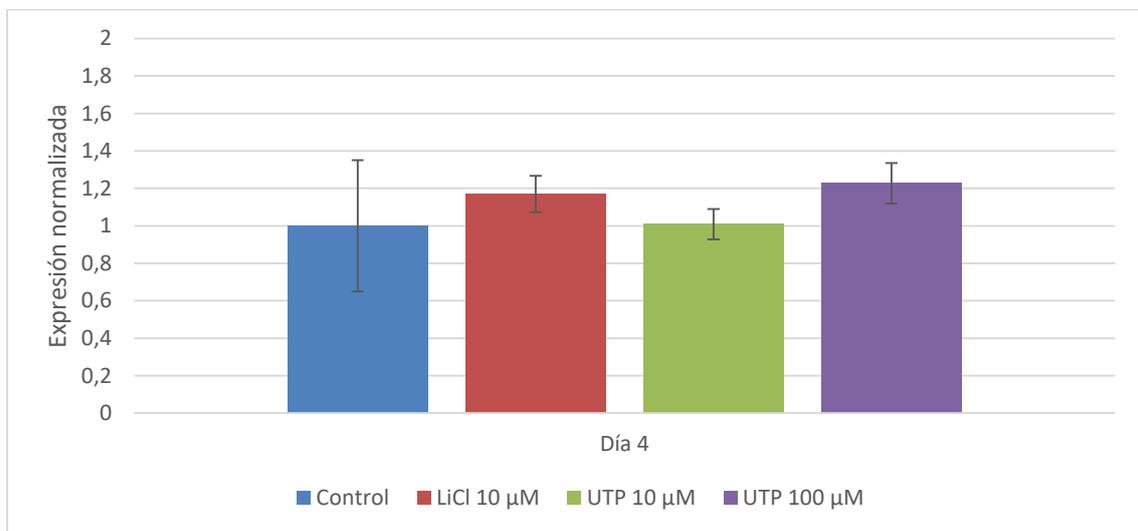
Figura 24: Efecto del tratamiento con Calcio elevado de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de Runx2. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de CaCl_2 4 mM (5,35 mM final) por 72 h. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de Runx2 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado.

Expresión de Osterix (OSX)

Osterix es un factor de transcripción, del tipo proteína dedos de Zinc, necesario para la diferenciación a linaje osteogénico (Karsenty y col., 2009). Ratones en los que se indujo ablación del gen de *Osx* no desarrollaron huesos (Nakashima y col., 2002)

En el presente trabajo, se evaluó la expresión de *Osx* en células de calvaria de rata tratadas con UTP 10 y 100 μM ó LiCl 10 μM durante 4 y 8 días. Como muestra la figura 25, no se observaron cambios significativos con respecto al control en la expresión génica de OSX, en ninguno de los tiempos estudiados.

A)



B)

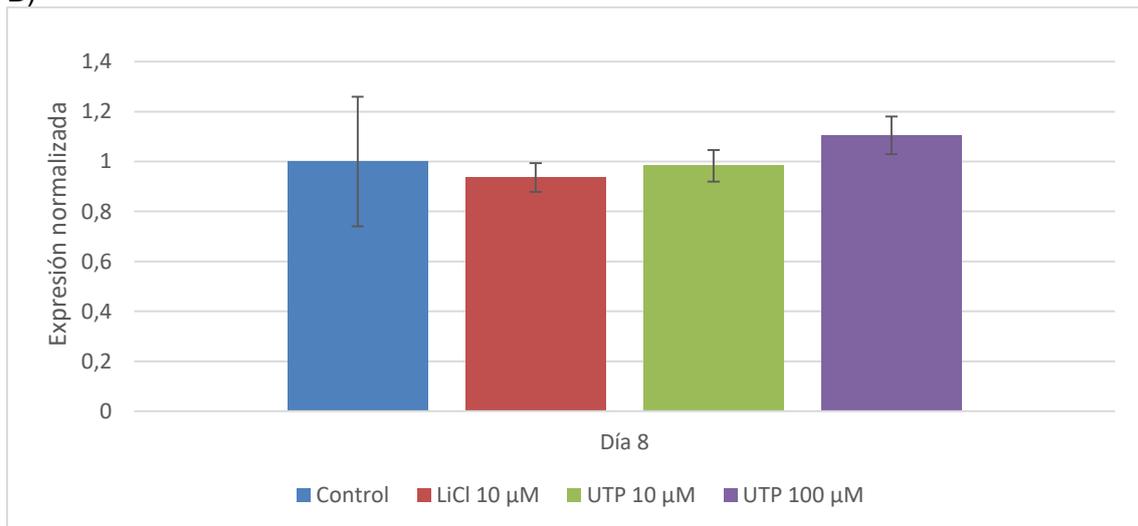


Figura 25: Efecto del tratamiento con LiCl o UTP de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de OSX. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de UTP 10 ó 100

μM o LiCl $10 \mu\text{M}$ por 4 **(A)** y 8 **(B)** días. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de OSX por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado.

También, se evaluó la expresión de *Osx* en células de calvaria de rata tratadas con CaCl_2 $5,35 \text{ m}$, durante 3 días. Como muestra la figura 26, no se observaron cambios significativos con respecto al control en la expresión génica de OSX, luego de 3 días de tratamiento.

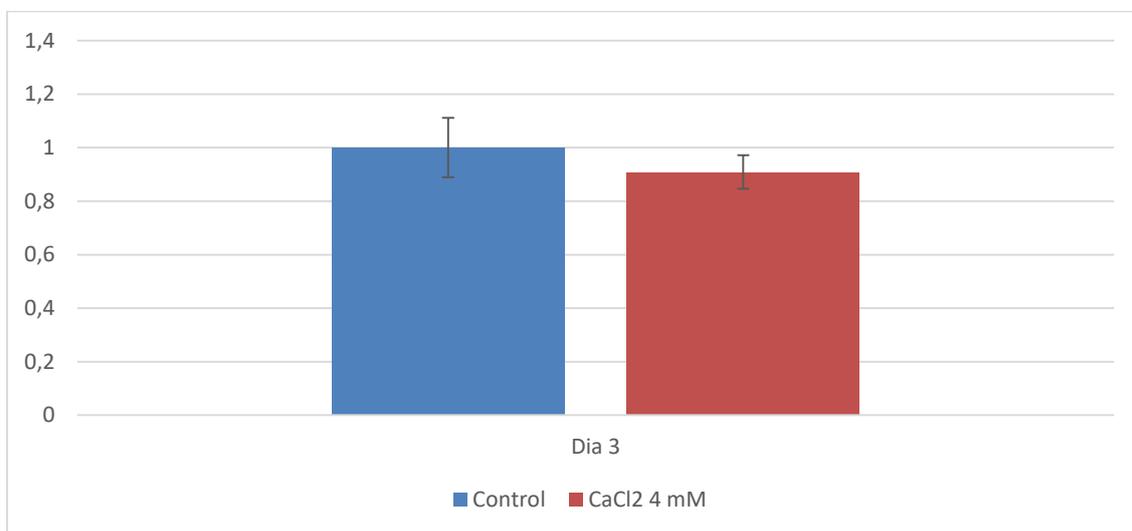


Figura 26: Efecto del tratamiento con Calcio elevado de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de OSX. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de CaCl_2 4 mM ($5,35 \text{ mM}$ final) por 3 días. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de OSX por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado.

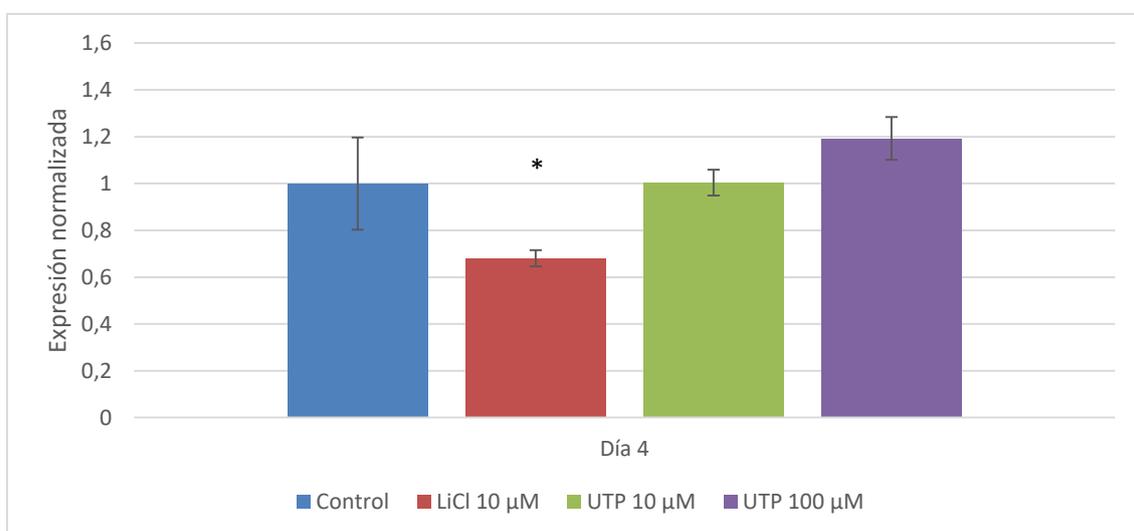
Expresión de Osteocalcina (OCN)

La OCN es la proteína no colagenosa más abundante en la matriz ósea (Li y col., 2015). Respecto de su expresión, ésta parece estar finamente regulada de manera dependiente del estadio durante la diferenciación osteoblástica (Li y col., 2015). El nivel

de expresión es prácticamente indetectable en los estadios tempranos de maduración del osteoblasto, mientras que las células maduras formadoras de hueso son las que ostentan la expresión más elevada (Bellows y col., 1999), coincidiendo con la mineralización de la matriz extracelular (Lian y col., 1989). De esta manera, se considera la OCN como un marcador de formación ósea avanzada en cultivos *in vitro*.

En el presente trabajo, se evaluó la expresión de OCN en células óseas de calvaria de rata tratadas con UTP 10 y 100 μM ó LiCl 10 μM , durante 4 y 8 días. Como muestra la figura 27, se evidenció una disminución del nivel de mensajero luego de 4 días de tratamiento con LiCl 10 μM , mientras que en las demás condiciones estudiadas, no se observaron cambios.

A)



B)

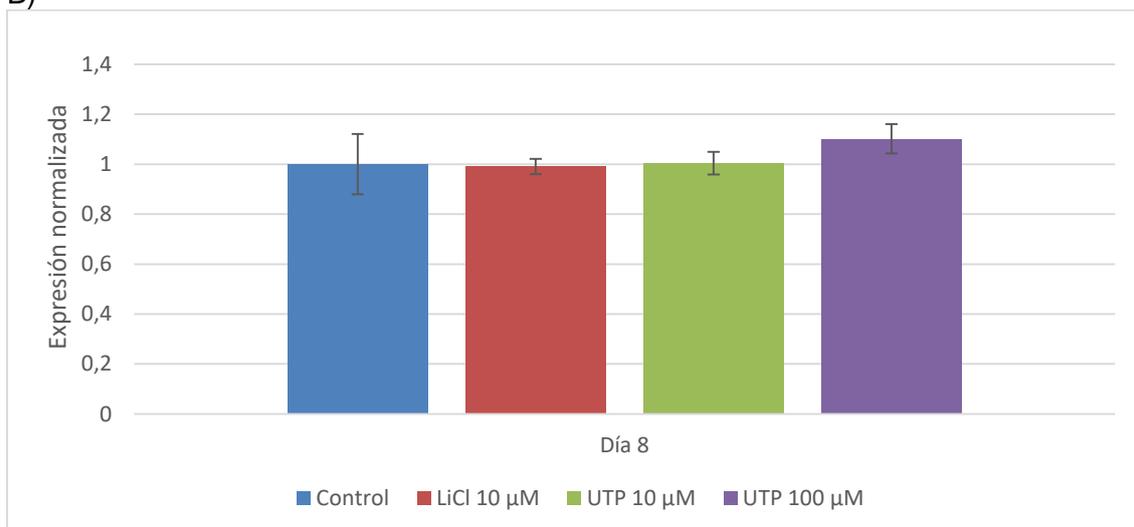


Figura 27: Efecto del tratamiento con LiCl o UTP de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de OCN. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de UTP 10 ó 100

μM o LiCl $10 \mu\text{M}$, durante 4 **(A)** y 8 **(B)**. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de OCN por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,05$

Expresión de Osteopontina (OPN)

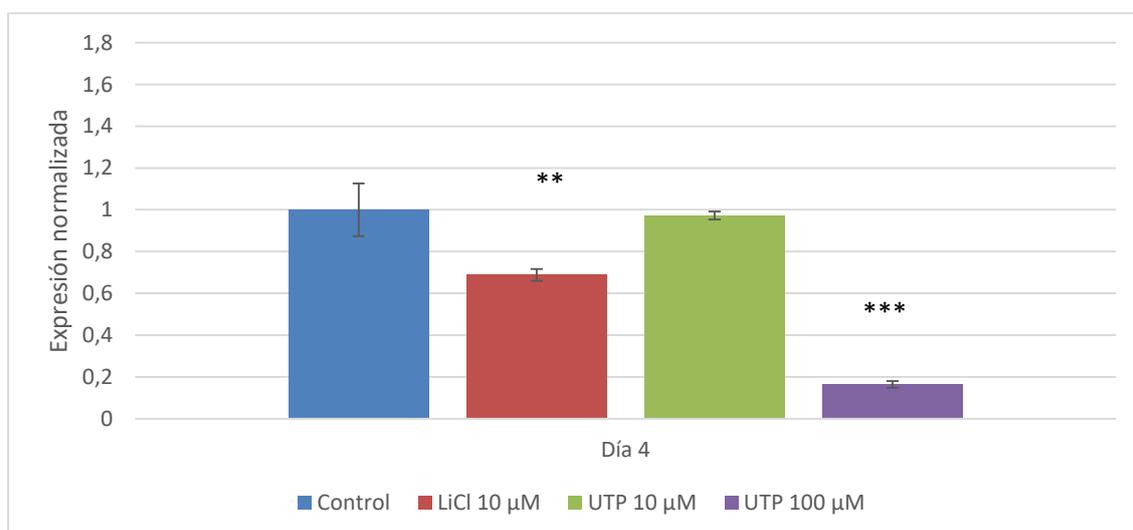
Osteopontina (OPN) es una de las proteínas no-colagenosas que conforman la matriz ósea no mineralizada u osteoide (Hunter, 2013).

La OPN está ampliamente expresada en el cuerpo (Nomura y col., 1988), pero los niveles más elevados se encuentran en hueso (Prince y col., 1987) y sitios de calcificación ectópica (Kohri y col., 1992; Giachelli y col., 1993)

OPN es considerada un marcador temprano de la diferenciación de osteoblastos (Mark y col., 1988), y junto con otras proteínas, como FAL y Sialoproteína ósea, es necesaria para la producción de matriz extracelular ósea. Además, ha mostrado participar en la regeneración y remodelado óseo (Saad y col., 2008, Jahnen-Dechent y col., 2008)

En la presente Tesis, se evaluó la expresión de OPN luego del tratamiento de las células con UTP 10 y $100 \mu\text{M}$ ó LiCl $10 \mu\text{M}$, durante 4 y 8 días. Como muestra la figura 28, luego de 4 días de tratamiento con LiCl $10 \mu\text{M}$ o con UTP $100 \mu\text{M}$ se observó una disminución, estadísticamente significativa, en la expresión génica de OPN con respecto al control. Por otro lado, el tratamiento con UTP $10 \mu\text{M}$ produjo una disminución significativa en la expresión de OPN, con respecto al control luego de 8 días de incubación. En cambio, el tratamiento con LiCl $10 \mu\text{M}$ o con UTP $100 \mu\text{M}$ no produjo cambios.

A)



B)

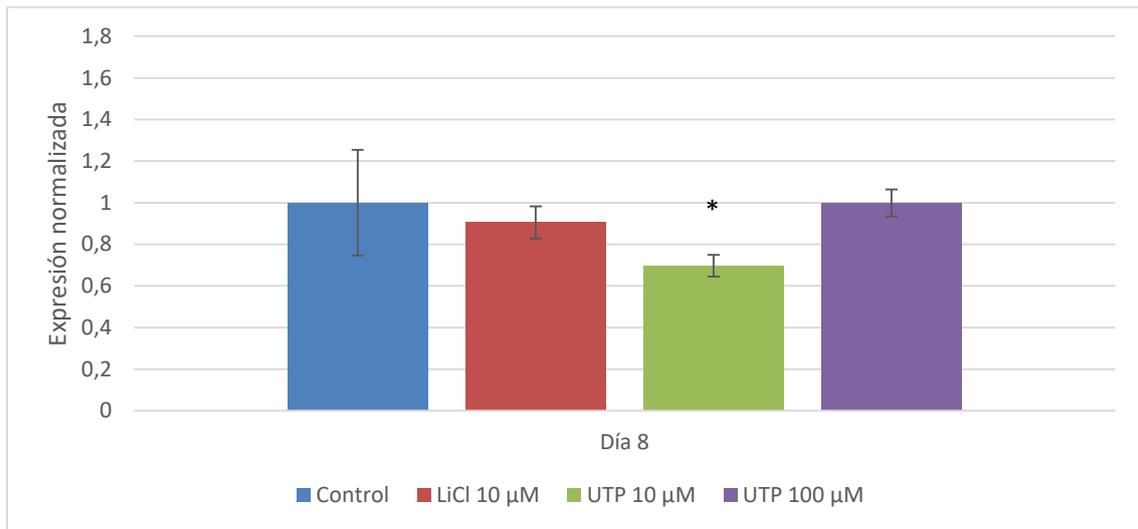


Figura 28: Efecto del tratamiento con LiCl o UTP de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de OPN. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de UTP 10 ó 100 µM o LiCl 10 µM, durante 4 (A) y 8 (B) días. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de OPN por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados son valores representativos, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, vs control.

Seguidamente, se evaluó si el tratamiento de las células calvariales de rata con ATP en el medio osteogénico con una elevada concentración de calcio extracelular afecta la expresión de OPN. Para ello, se cuantificó la expresión génica de OPN luego de tratar las células durante 72 h. en un medio osteogénico conteniendo CaCl_2 5.35 mM en presencia y ausencia de ATPγ-S 10 y 100 µM, mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 29, tanto la estimulación de las células con ATPγ-S 10 µM como con 100 µM aumentaron significativamente la expresión de OPN a las 72 h de tratamiento en el medio osteogénico conteniendo CaCl_2 5.35 mM.

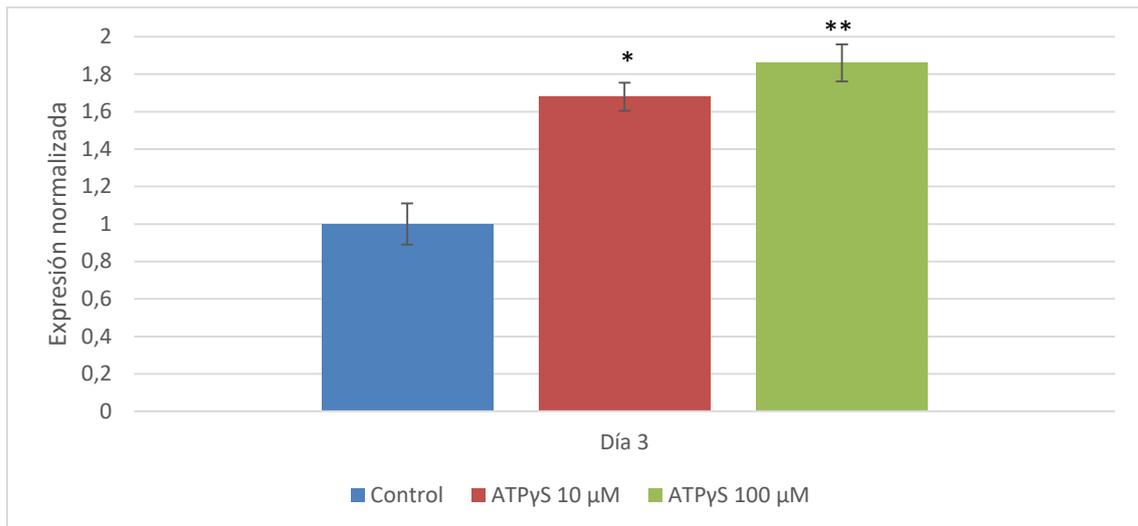


Figura 29: Efecto de la estimulación por ATPγ-S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico conteniendo elevada concentración de calcio extracelular sobre la expresión génica de OPN. Las células se incubaron en medio osteogénico conteniendo CaCl_2 4 mM (Control) en presencia o ausencia de ATPγ-S 10 ó 100 μM por 72 h. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de OPN por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ vs. Control.

Expresión de Colágeno tipo I (Col I)

El colágeno constituye la mayor parte del soporte estructural del cuerpo, ya que es la proteína más abundante en el tejido conectivo. Esta proteína es el origen de las fibras de colágeno, las cuales forman parte de la piel, los huesos, tendones y cartílagos (Hulmes, 1992).

Existen varios tipos de colágeno (1-12, 14, 15,24-27), siendo el más abundante entre estos, y en la matriz ósea (Garnero, 2015), el tipo 1, donde su función es proveer resistencia a la tracción (Deshmukh y col., 2016).

Ha sido reportado que el Colágeno Tipo I (Col I) se expresa en osteoblastos de calvaria de rata en estadios inmaduros, y que su expresión aumenta durante la diferenciación (Bellows y col., 1999).

En este trabajo, células de calvaria de rata fueron tratadas con ATP γ S 10 μ M durante 5 días, y con UTP 10 y 100 μ M, y LiCl 10 μ M, durante 4 y 8 días. Como se observa en la figura 30, el tratamiento con ATP γ S incrementó la expresión de Col1, significativamente respecto del control a los 5 días de incubación.

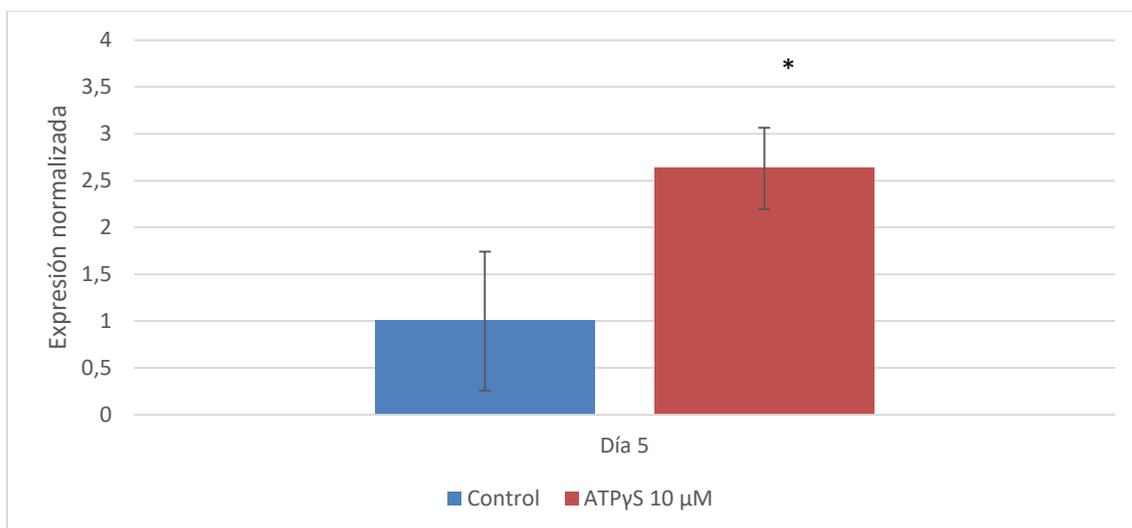
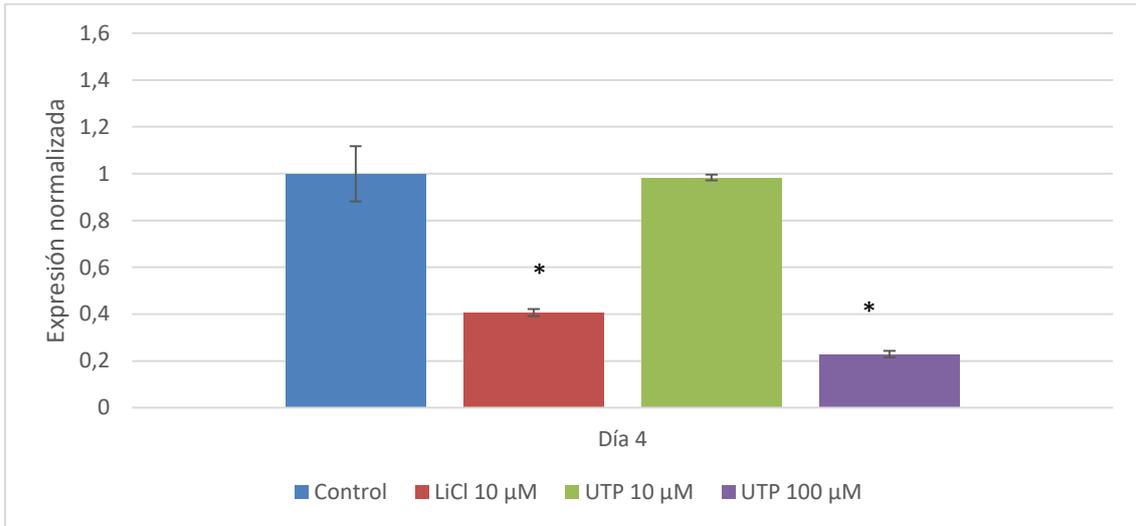


Figura 30: Efecto del tratamiento con ATP γ S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de Col1. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de ATP γ S 10 μ M por el tiempo indicado. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de Col1 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado. * $p < 0,025$, vs. Control.

Como muestra la figura 31, el tratamiento con LiCl 10 μ M y UTP 100 μ M produjo importantes reducciones en el nivel de ARNm de Col1, luego de 4 días.

Por otro lado, UTP produjo un efecto dual. En una concentración 10 μ M disminuyó la expresión de Col1, en tanto que a 100 μ M indujo un aumento en la misma, significativamente respecto del control a los 8 días de incubación.

A)



B)

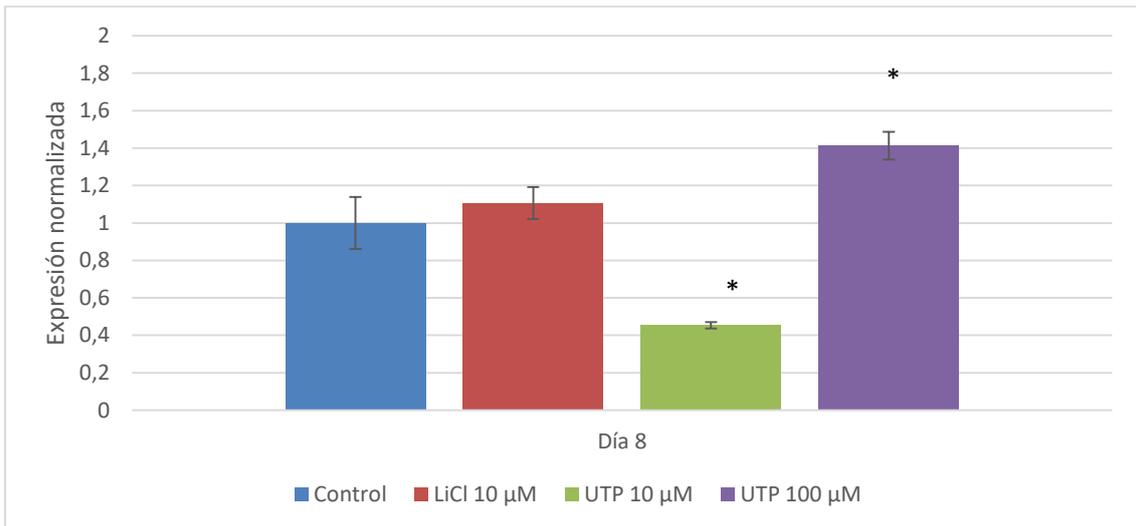


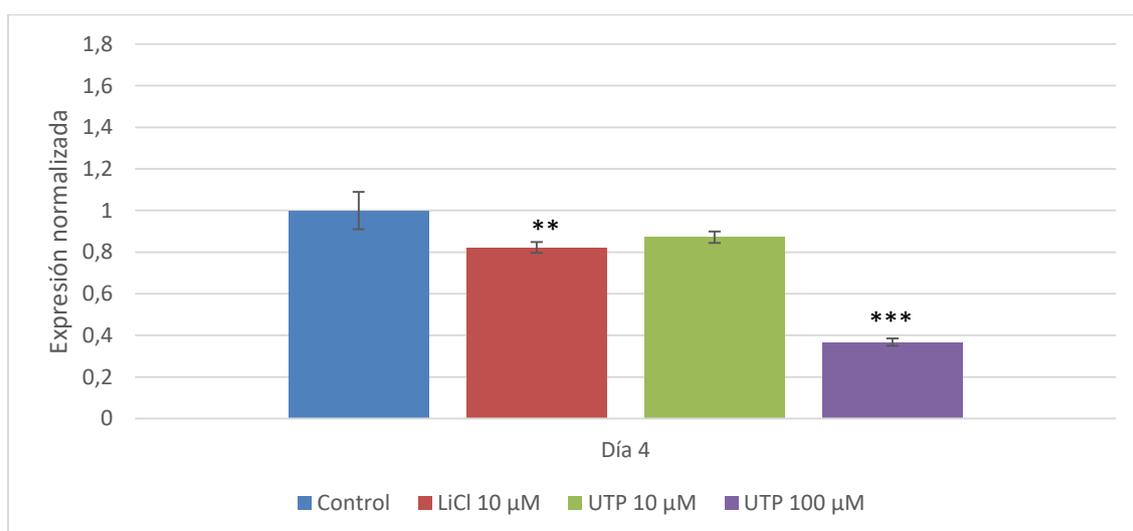
Figura 31: Efecto del tratamiento con LiCl o UTP de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de Col1. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de UTP 10 ó 100 µM o LiCl 10 µM, durante 4 (A) y 8 (B) días. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de Col1 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,001$ vs. Control.

Expresión de Osteoprotegerina (OPG)

OPG es una glicoproteína descubierta en 1997, que pertenece a la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR), y cuya función, como lo indica su nombre, es proteger al hueso de la resorción, lo que logra al inhibir la diferenciación osteoclástica (Simonet y col., 1997). Esta glicoproteína está altamente expresada en pulmón, riñón, medula ósea, corazón, hígado, timo y nódulos linfáticos, y es sintetizada por osteoblastos, fibroblastos, células musculares vasculares, linfocitos B y condrocitos (Holen y Shipman, 2006). OPG actúa como un receptor señuelo que se une a RANKL, de manera de evitar la activación de su receptor (RANK) en la membrana de los precursores de osteoclastos y, así, su fusión y diferenciación (Yasuda y col., 1998). Desde el punto de vista de la regulación de su expresión génica, Thirunavukkarasu y col., 2000, mostraron que está bajo el control de Runx2.

En esta Tesis, se evaluó el nivel de ARNm de OPG luego de 4 y 8 días de tratamiento con UTP 10 y 100 μM ó LiCl 10 μM . Un tratamiento de 4 días, con LiCl 10 μM o UTP 100 μM produjo caídas estadísticamente significativas en el nivel de mensajero de OPG. Por otro lado, las células tratadas con UTP 10 μM durante 8 días exhibieron una disminución estadísticamente significativa respecto del control en la expresión génica de OPG. El resto de las condiciones no mostró cambios significativos en el nivel de mensajero (Fig. 32).

A)



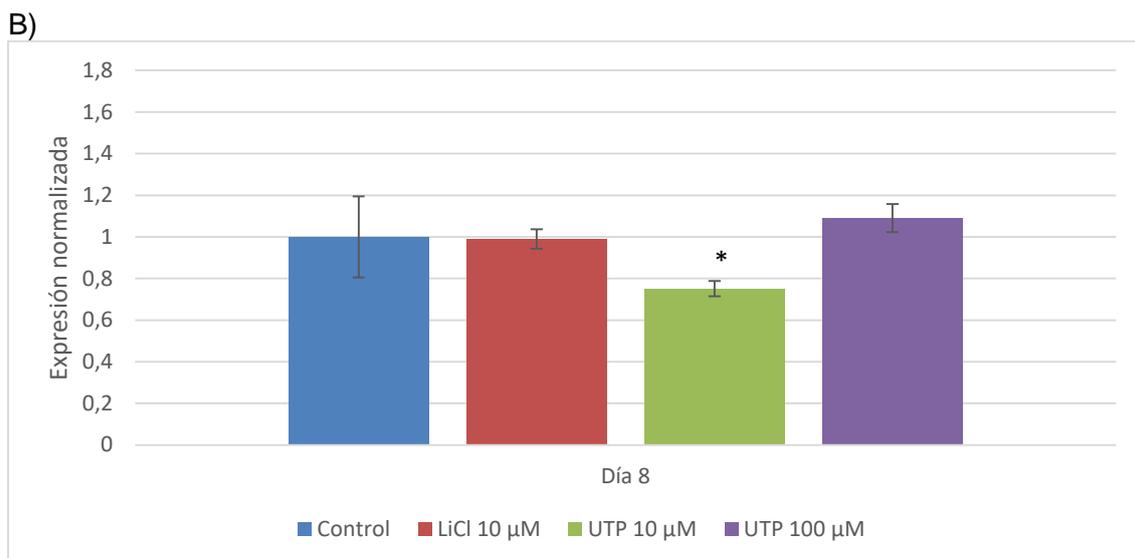


Figura 32: Efecto del tratamiento con LiCl o UTP de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de OPG. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de UTP 10 ó 100 µM o LiCl 10 µM, durante 4 (A) y 8 (B) días. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de OPG por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; *** $p < 0,001$ vs. Control.

Expresión de Sialoproteína Ósea (BSP)

BSP es una de las proteínas no-colágenas más abundantes en los tejidos conectivos mineralizados (Zhang J. y col., 2009). Está involucrada en la regulación de la formación de cristales de hidroxiapatita en huesos y dientes (Fisher y col., 2001), promoviendo la formación inicial de cristales de mineral y es considerada un marcador temprano de diferenciación osteogénica (Chen y col., 1992, 1994; Kasugai y col., 1992). BSP se encuentra expresada en altos niveles en células osteoblásticas, en sitios donde hay activa formación ósea (Midura y col., 2004).

En esta Tesis, se evaluó la expresión génica de BSP luego de 4 y 8 días de tratamiento con UTP 10 y 100 µM, y 5 días con ATPγS 10 µM. Las células tratadas con ATPγS 10 µM durante 5 días exhibieron un aumento respecto del control, estadísticamente significativo (Fig. 33).

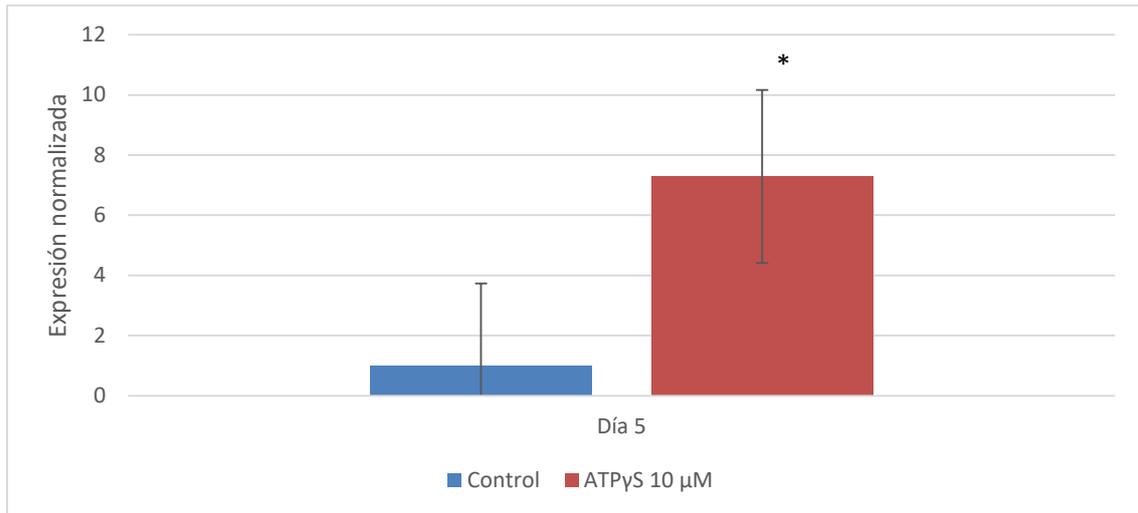


Figura 33: Efecto del tratamiento con ATPγS de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de BSP. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia de ATPγS 10 µM por el tiempo indicado. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BSP por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado. * $p < 0,001$, vs. Control.

Por otro lado, un tratamiento durante 4 días, con UTP (10 ó 100 µM) no indujo cambios en el nivel de mensajero de BSP (Fig. 34). No se obtuvieron resultados concluyentes para los tratamientos de 8 días de duración con UTP 10 y 100 µM.

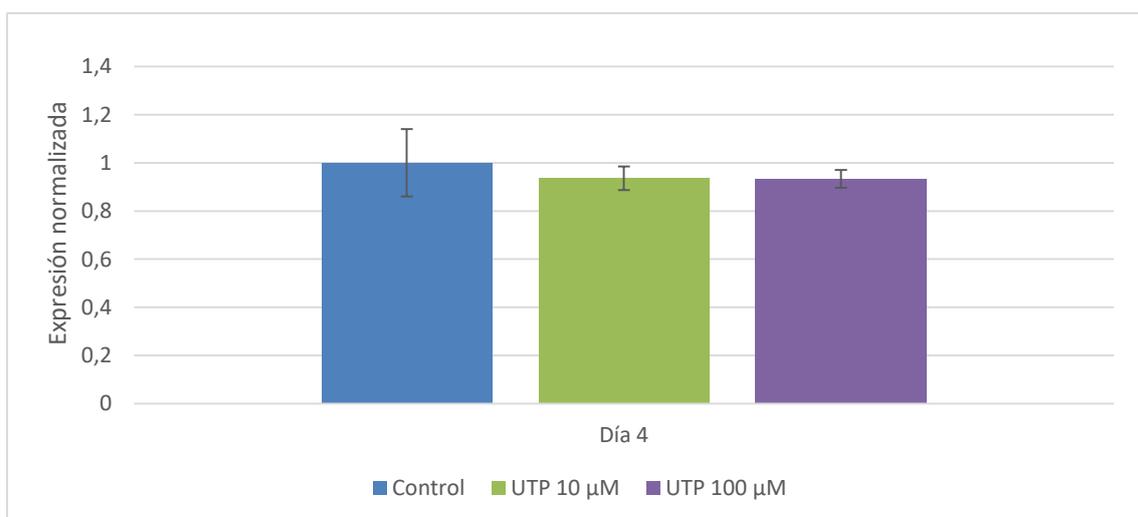


Figura 34: Efecto del tratamiento con UTP de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de BSP. Las células se

incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia de UTP 10 ó 100 μM , durante 4 días. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BSP por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos procesados por triplicado.

Expresión de BMP6

Las BMPs son un grupo filogenéticamente conservado de factores de crecimiento que conforman el subgrupo más numeroso dentro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Lavery y col., 2008; Kawabata y col., 1998). Originalmente, fueron identificadas por su acción inductora de formación ectópica de hueso (Urist, 1965). A la fecha, se han identificado aproximadamente 30 tipos en seres humanos (Lowery y col., 2016). Confirmada está su participación en la regulación de la función de varias poblaciones de células madre, entre ellas las mesenquimales o MSCs (Scarfi, 2016), donde se las reconoce, en general, como potentes activadores de la diferenciación osteocondrogénica (Lowery y col., 2011; Lavery y col., 2008).

Se ha considerado a BMP6 el regulador más potente de la diferenciación de MSCs a osteoblastos (Vukicevic y Grgurevic, 2009). Esto se debe a que se ha mostrado que se necesitan menores cantidades de BMP6 para promover la osteogénesis, que de BMP7 y BMP2 (siendo éstos últimos los dos primeros factores de crecimiento aprobados para regeneración ósea comercializados (Hankenson y col., 2015)), para acelerar la reparación ósea, en conejos. La ausencia de un alelo de BMP2 y ambos alelos de BMP6 resultó en disfunción osteoblástica con reducida formación de hueso (Kugimiya y col., 2005). La administración de BMP6 a ratas osteoporóticas restauró la capacidad de inducción ósea, y la microarquitectura y calidad del hueso, al promover la diferenciación osteoblástica de MSCs e inhibir la osteoclastogénesis (Simic y col., 2006). BMP6 es capaz de inducir la expresión génica de factores de transcripción fundamentales para la diferenciación en linaje osteogénico, como Runx2, Osterix y Dlx5, y de marcadores de maduración ósea, como FAL y OPN (Ryoo y col., 2006; Yung y col., 2015; Vukicevic y Grgurevic, 2009).

En estudios previos, ATP γ -S y UTP 100 μM provocaron incrementos en el nivel de ARNm de BMP6, luego de 7 días de tratamiento.

Se evaluó el efecto del ATP γ -S sobre la expresión de BMP6 en células calvariales de rata. Para ello, se cuantificó la expresión génica de BMP6 luego de 5 días de tratamiento, en medio osteogénico, conteniendo ATP γ -S 10 μ M, mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 35, se registraron aumentos significativos en la expresión de BMP-6 bajo las condiciones estudiadas.

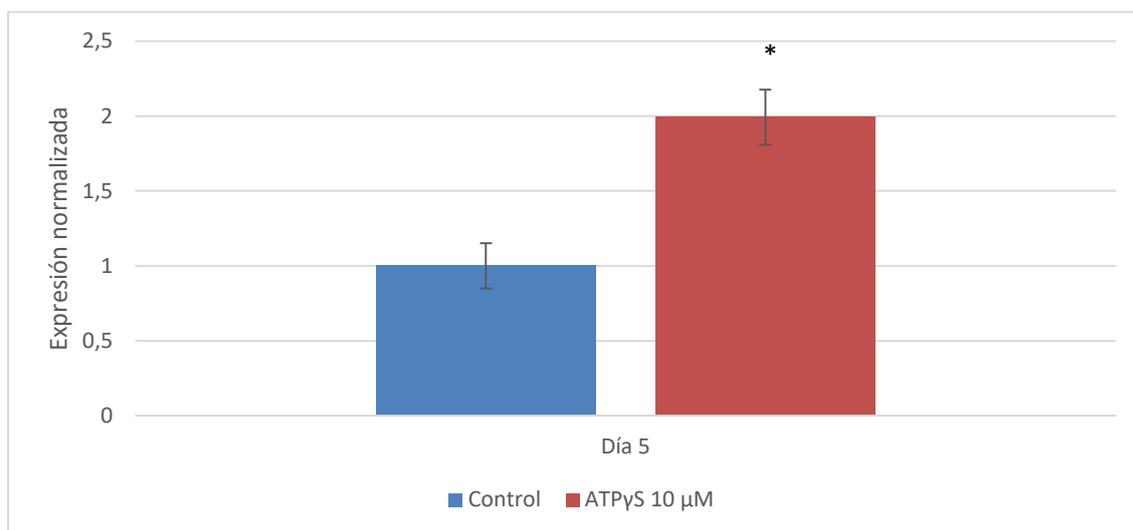


Figura 35: Efecto del tratamiento con ATP γ S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de BMP6. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de ATP γ S 10 μ M por el tiempo indicado. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP6 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado. * $p < 0,001$, vs. Control.

Expresión de BMP7

La importancia del rol empleado por BMP7 en la fisiología ósea ha sido demostrada en ensayos *in vivo*, tanto en animales como en seres humanos.

Ratones con delección del gen de BMP7 no sufrieron fracturas espontáneas ni mostraron defectos del proceso de reparación ósea (Tsuji y col., 2010). Sin embargo, Blokhuis y col., 2001, y den Boer y col., 2002, informaron de aceleración en la consolidación de fracturas, en conejos. La formación ósea se incrementó en zonas defectuosas de las mandíbulas de perros a los que se les administró BMP7 (Zhang Y. y col., 2007). Las

únicas moléculas osteoinductivas, cuya administración directa en humanos está permitida por la FDA son BMP2 y BMP7 (Hankenson y col., 2015). Pacientes tratados con BMP7 humana recombinante exhibieron aumentos en la formación ósea y aceleración en la reparación de fracturas (Geesink y col., 1999; Govender y col., 2002). En la actualidad, sin embargo, la terapia está siendo cuestionada en términos de seguridad y eficacia (Garrison y col., 2010; Aro y col., 2011; Lyon y col., 2013; Fu y col., 2013; Carragee y col., 2013)

Investigaciones anteriores reportaron aumentos en los niveles de mensajero de BMP7, en cultivo primario de calvaria de rata, tratado durante 3 días con ATP γ -S y UTP 100 μ M.

Seguidamente, se determinó la expresión de BMP7 en osteoblastos de calvaria de rata. Para esto, se cuantificó la expresión génica de BMP7 luego de 5 días de tratamiento, en medio osteogénico, conteniendo ATP γ -S 10 μ M, mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 36, un incremento estadísticamente significativo se detectó en la expresión génica de BMP-7 bajo las condiciones descriptas.

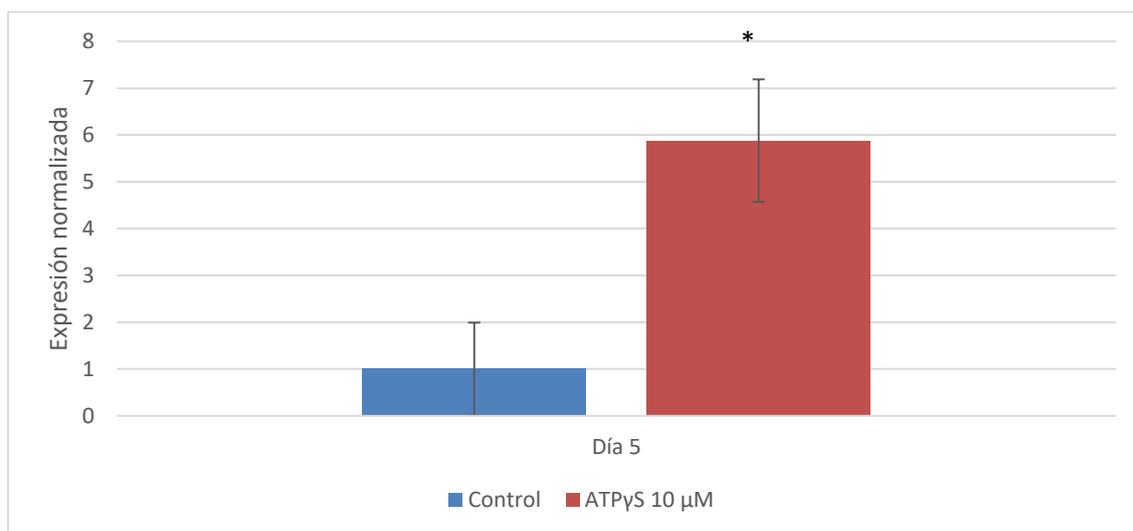


Figura 36: Efecto del tratamiento con ATP γ S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de BMP7. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de ATP γ S 10 μ M por el tiempo indicado. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP7 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores

promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado. * $p < 0,005$, vs. Control.

Rol del calcio extracelular y efecto de nucleótidos sobre la la expresión de Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs), en células calvariales de rata

Expresión de BMP3

Se evaluó el efecto de ATP γ -S 10 μ M, luego de 5 días de tratamiento de las células en medio osteogénico, mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 37, ATP γ -S 10 μ M no indujo cambios en la expresión génica de BMP3 a los 5 días de tratamiento.

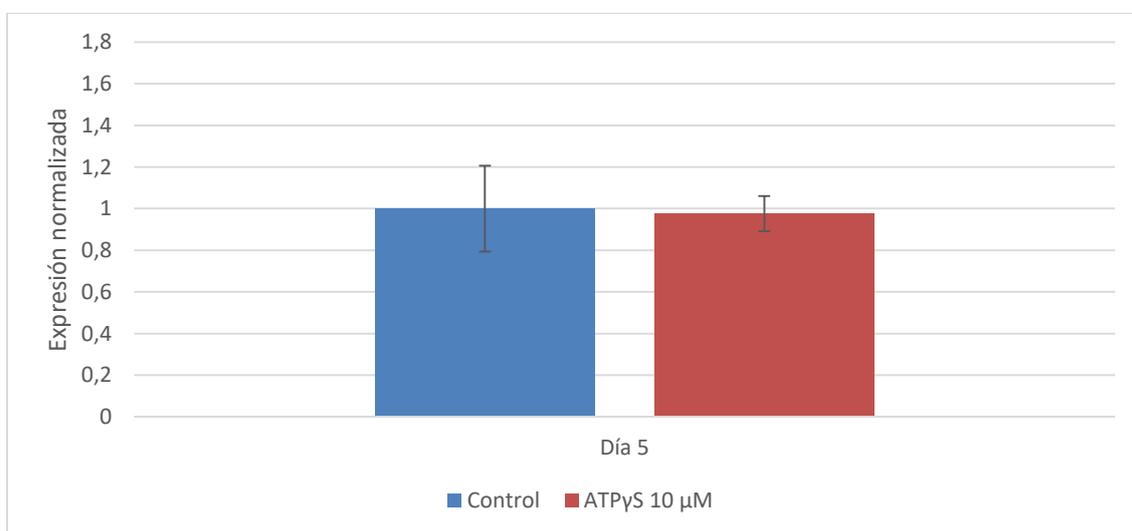
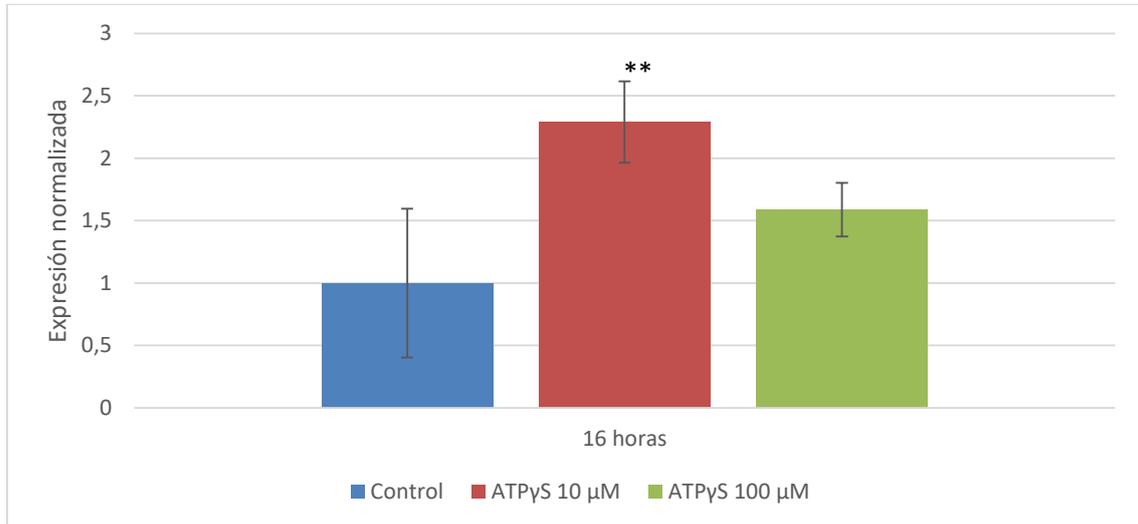


Figura 37: Efecto del tratamiento con ATP γ S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de BMP3. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de ATP γ S 10 μ M por el tiempo indicado. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP3 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado.

A continuación se evaluó si una elevada concentración de calcio extracelular afecta la acción del ATP sobre la expresión de BMP3 en células calvariales de rata. Para ello, se cuantificó la expresión génica de BMP3 luego de tratar las células durante 16 y 48 h en un medio osteogénico conteniendo 5.35 mM CaCl₂ en presencia y ausencia de ATP γ -S

10 y 100 μM , mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como muestra la figura 38 A, el tratamiento con ATP γ -S 10 μM estimuló la expresión de BMP-3 a las 16 h pero la redujo a las 48 h (Fig. 38 B), con respecto al control.

A)



B)

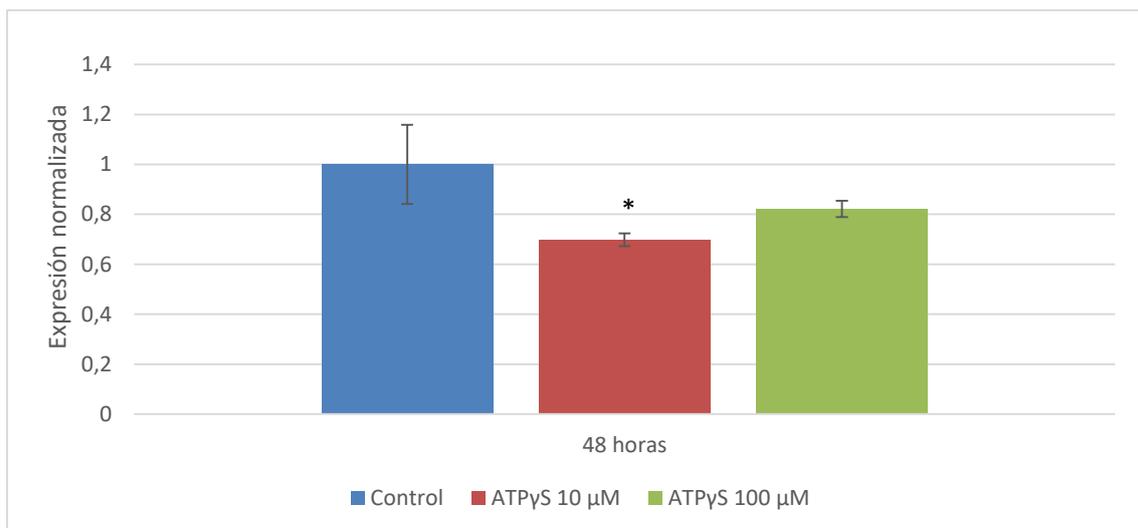


Figura 38: Efecto de la estimulación por ATP γ -S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico conteniendo elevada concentración de calcio extracelular sobre la expresión génica de BMP-3. Las células se incubaron en medio osteogénico conteniendo Ca^{2+} 5.35 mM (Control) en presencia o ausencia de ATP γ -S 10 ó 100 μM por 16 (A) y 48 (B) h. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP-3 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados

muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$ vs. Control.

Expresión de BMP4

Datos recientes muestran que ATP y UTP (100 μ M) estimulan la expresión génica de BMP4 en células calvariales de rata luego de 7 días de incubación en un medio osteogénico como el empleado en esta Tesis.

Se evaluó el efecto de ATP γ -S 10 μ M, luego de 5 días de tratamiento de las células en medio osteogénico, mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 39, ATP γ -S 10 μ M incrementó significativamente la expresión génica de BMP4 a los 5 días de tratamiento.

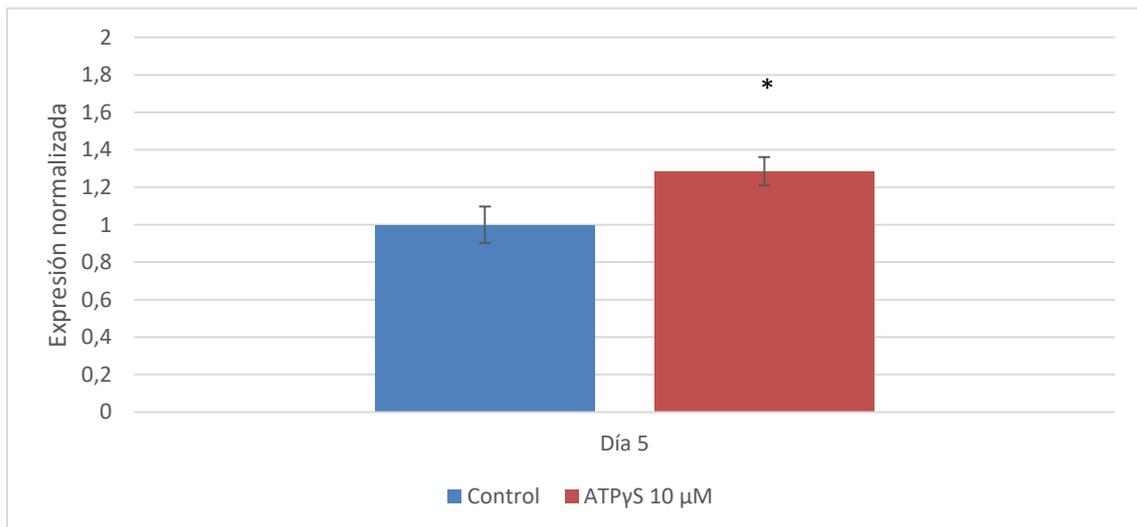
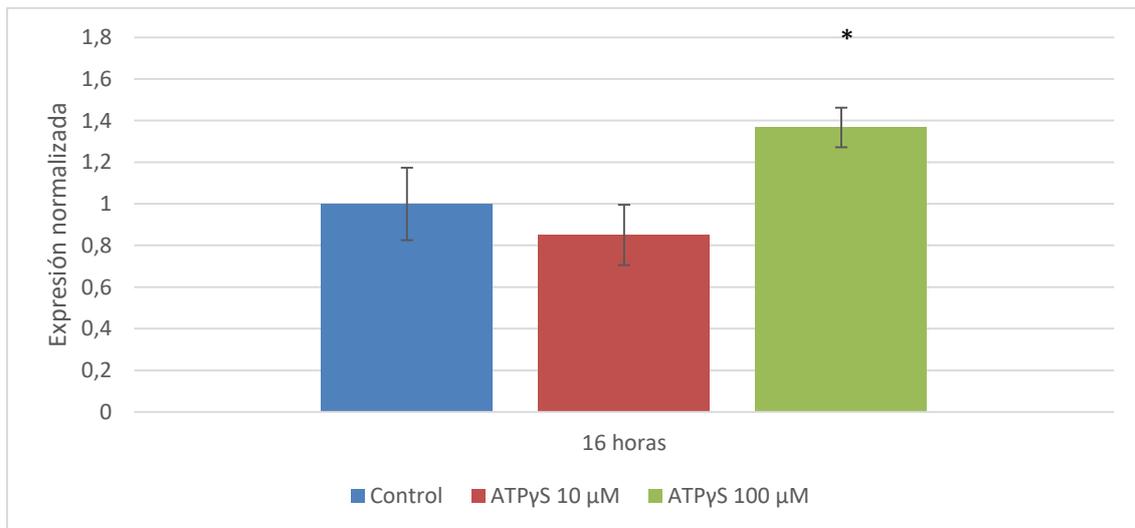


Figura 39: Efecto del tratamiento con ATP γ S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de BMP4. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de ATP γ S 10 μ M por el tiempo indicado. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP4 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado. * $p < 0,005$, vs. Control.

Con el fin de evaluar si una elevada concentración de calcio extracelular afecta la acción del ATP sobre la expresión de BMP4 en células calvariales de rata, se cuantificó la expresión génica de BMP4 luego de tratar las células durante 16 y 48 horas en un medio osteogénico conteniendo 5.35 mM CaCl_2 en presencia y ausencia de ATP γ -S 10 y 100 μM , mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 40 A, ATP γ -S 100 μM incrementó significativamente la expresión génica de BMP4 a las 16 h de tratamiento. Luego de 48 horas (Fig. B), ATP γ -S 10 y 100 μM no provocaron cambios, con respecto al control.

A)



B)

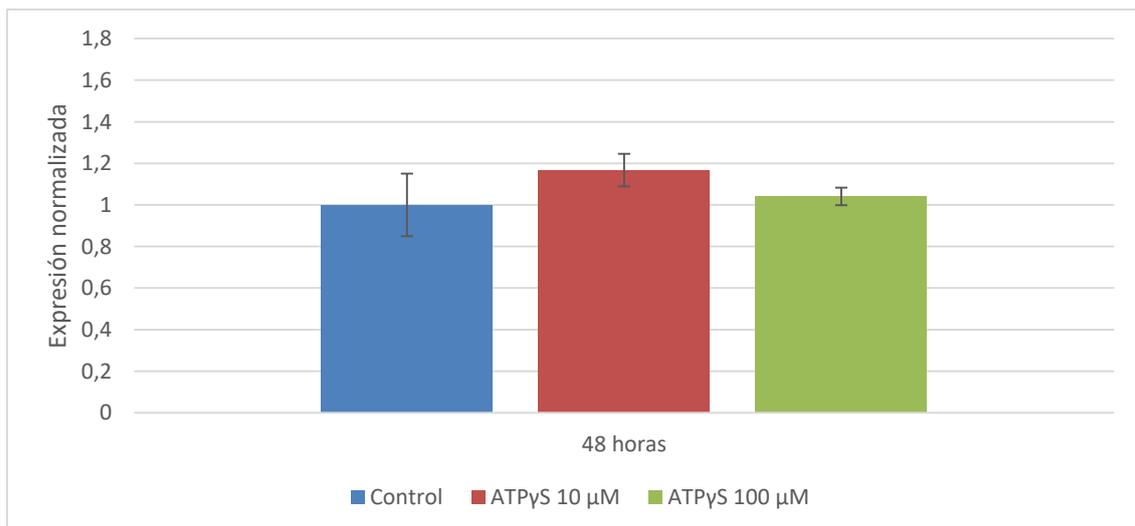


Figura 40: Efecto de la estimulación por ATP γ -S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico conteniendo elevada concentración de calcio extracelular sobre la expresión génica de BMP-4. Las células se incubaron en medio

osteogénico conteniendo Ca^{2+} 5.35 mM (Control) en presencia o ausencia de ATP γ -S 10 ó 100 μM por 16 (A) y 48 (B) h. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP-4 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. ** $p < 0,01$ vs. Control.

Expresión de BMP5

Similarmente a lo anterior, fue reportado que ATP y UTP (100 μM) estimulan la expresión génica de BMP5 en células calvariales de rata luego de tres o más días de incubación en un medio osteogénico como el empleado en esta Tesis.

Se evaluó el efecto de ATP γ -S 10 μM , luego de 5 días de tratamiento de las células en medio osteogénico, mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 41, ATP γ -S 10 μM incrementó significativamente la expresión génica de BMP5 a los 5 días de tratamiento.

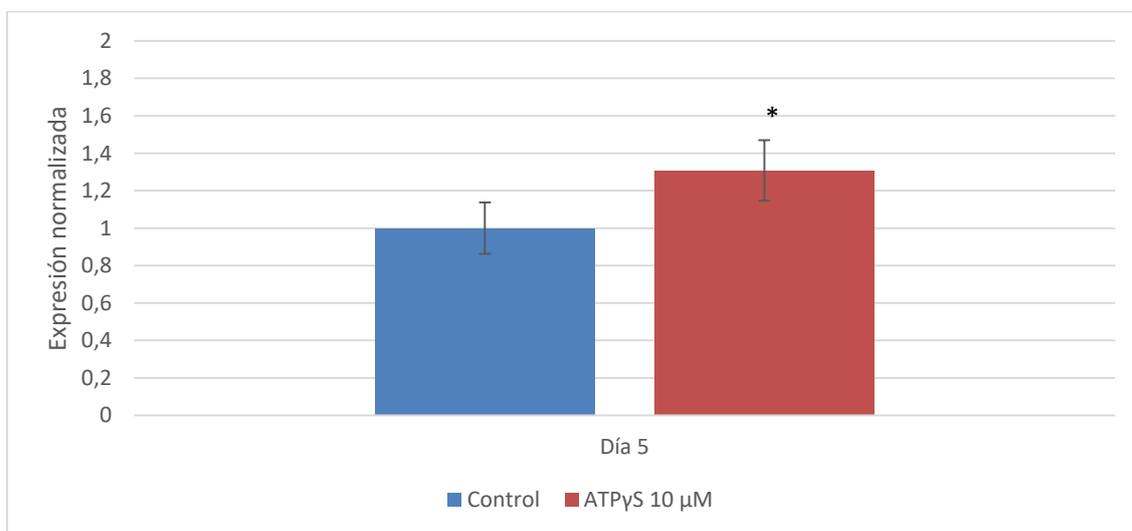
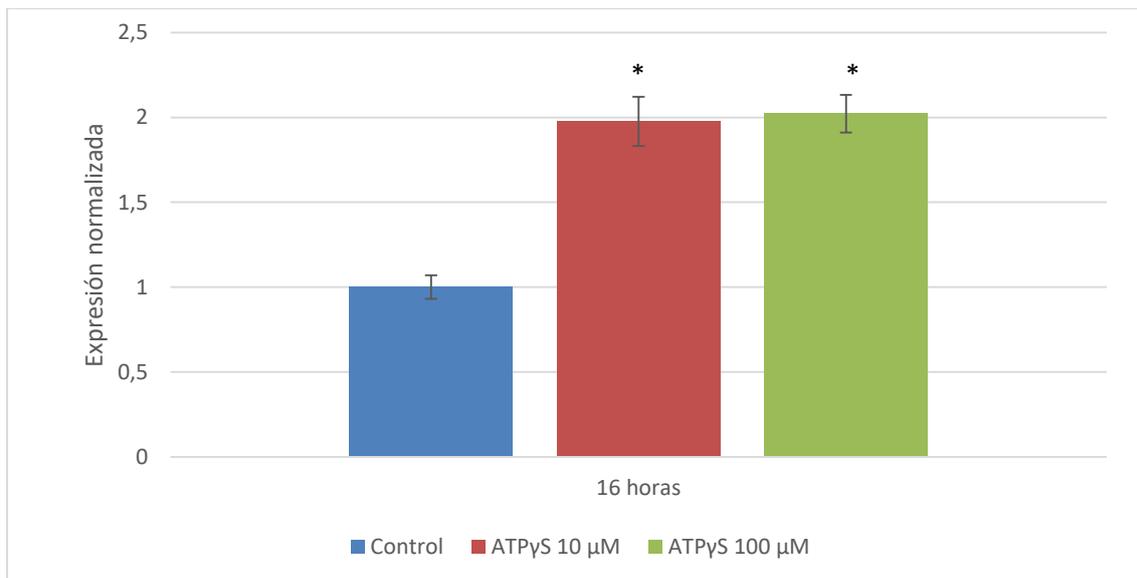


Figura 41: Efecto del tratamiento con ATP γ S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico sobre la expresión génica de BMP5. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia de ATP γ S 10 μM por el tiempo indicado. Seguidamente, se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP5 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada

muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de un experimento procesado por triplicado. * $p < 0,005$, vs. Control.

Con el fin de evaluar si una elevada concentración de calcio extracelular afecta la acción del ATP sobre la expresión de BMP5 en células calvariales de rata, se cuantificó la expresión génica de BMP5 luego de tratar las células durante 16 y 48 horas, en un medio osteogénico conteniendo 5.35 mM CaCl_2 en presencia y ausencia de ATP γ -S 10 y 100 μM , mediante QRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 42, solo ATP γ -S 10 μM incrementó significativamente la expresión génica de BMP5 a las 16 y 48 horas de tratamiento respecto del control. Mientras que una concentración de ATP γ -S de 100 μM solo provocó un aumento luego de 16 horas de tratamiento.

A)



B)

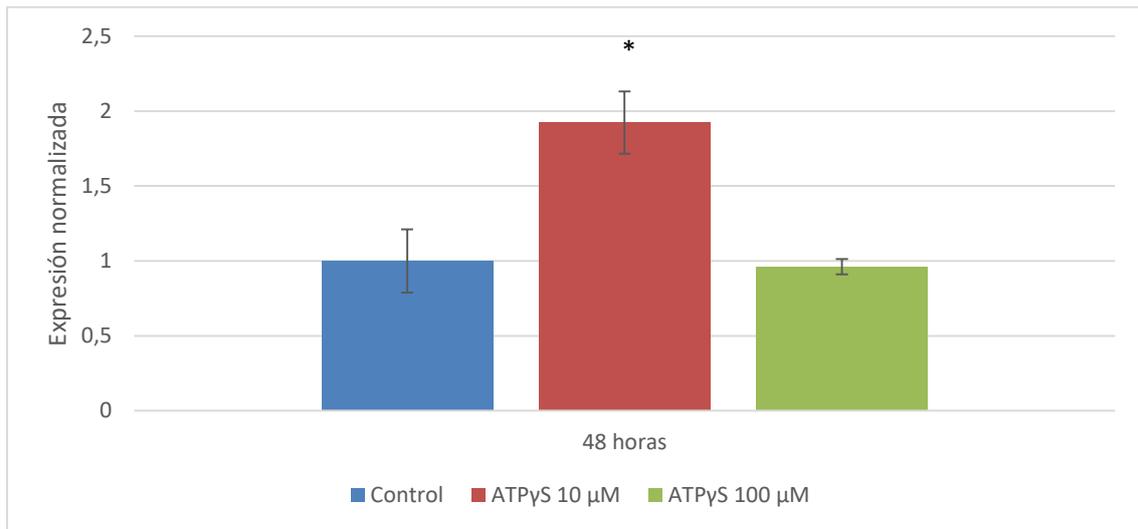


Figura 42: Efecto de la estimulación por ATPγ-S de células calvariales de rata neonata en un medio osteogénico conteniendo elevada concentración de calcio extracelular sobre la expresión génica de BMP-5. Las células se incubaron en medio osteogénico conteniendo Ca^{2+} 5.35 mM (Control) en presencia o ausencia de ATPγ-S 10 ó 100 μM por 16 y 48 h. Seguidamente se extrajo el ARNm y se cuantificaron los niveles de ARNm de BMP-5 por QRT-PCR como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen de interés fueron estandarizados respecto a los niveles de GAPDH en cada muestra y normalizados respecto al control. Los resultados muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes procesados por triplicado. * $p < 0,001$ vs. Control.

Estudio de la expresión y localización de β-catenina

Una de las señales regulatorias más importantes en la diferenciación de células madre mesenquimales al linaje osteoblástico es la vía de Wnt/β-catenina (Baron y Kneissel, 2013). La β-catenina es una proteína que se encuentra presente tanto en membrana como en citoplasma, y ejerce funciones de factor de transcripción. Para ello, debe acumularse en núcleo y regular la transcripción génica (Kim y col., 2013). Como se mencionara en la introducción, independientemente de Wnt, β-catenina puede acumularse en citoplasma y translocar a núcleo luego de la inhibición de GSK3 a través de la vía PI3K/Akt (Dorsam y Gutkind, 2007).

En la presente Tesis, con el fin de evaluar la participación de β -catenina en la acción de nucleótidos extracelulares sobre osteoblastos primarios de rata, se estudió el efecto de ATP sobre la expresión y localización de la proteína. Para ello, las células se trataron durante 4, 24, 48, 72 y 96 h, y 7 días, con ATPyS 10 y 100 μ M y se determinó β -catenina mediante inmunocitoquímica como se indica en Materiales y Métodos. Se observaron ligeros aumentos en la translocación y expresión de β -catenina, luego de 96 h de tratamiento (fig. 43).

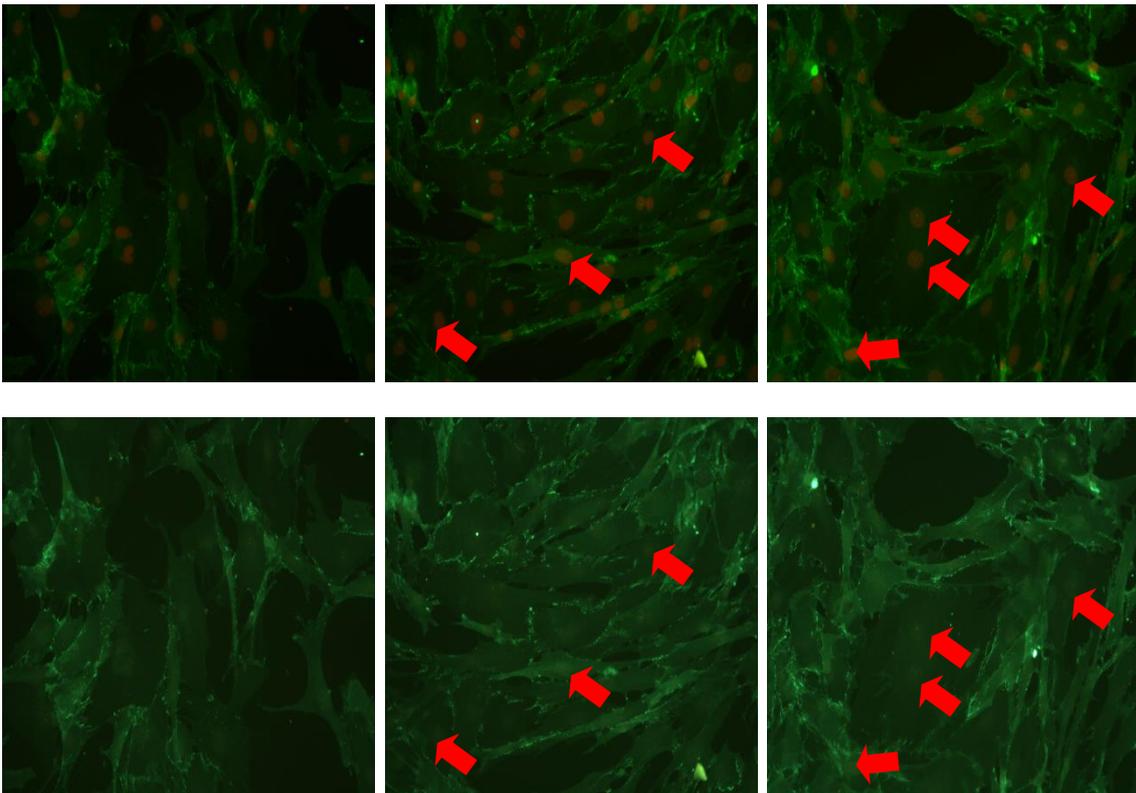


Figura 43: Osteoblastos primarios de rata, incubados en medio osteogénico (izquierda), conteniendo ATPyS 10 (centro) y 100 μ M (derecha), se utilizaron para realizar la inmunocitoquímica como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas señalan localización nuclear de β -catenina. El panel superior corresponde a la superposición de imágenes, luego de tinción con Ioduro de Propidio y anti- β -catenina. Las imágenes inferiores corresponden a la inmunocitoquímica de β -catenina.

Paralelamente, se realizaron experimentos similares mediante incubación de las células con LiCl 10 mM, durante 48, 72, 96 h y 7 días. Al igual que para el caso de los nucleótidos, el tratamiento con LiCl aumentó la expresión y acumulación en núcleo de β -catenina, y los cambios más notables se dieron a las 96 h (fig. 44).

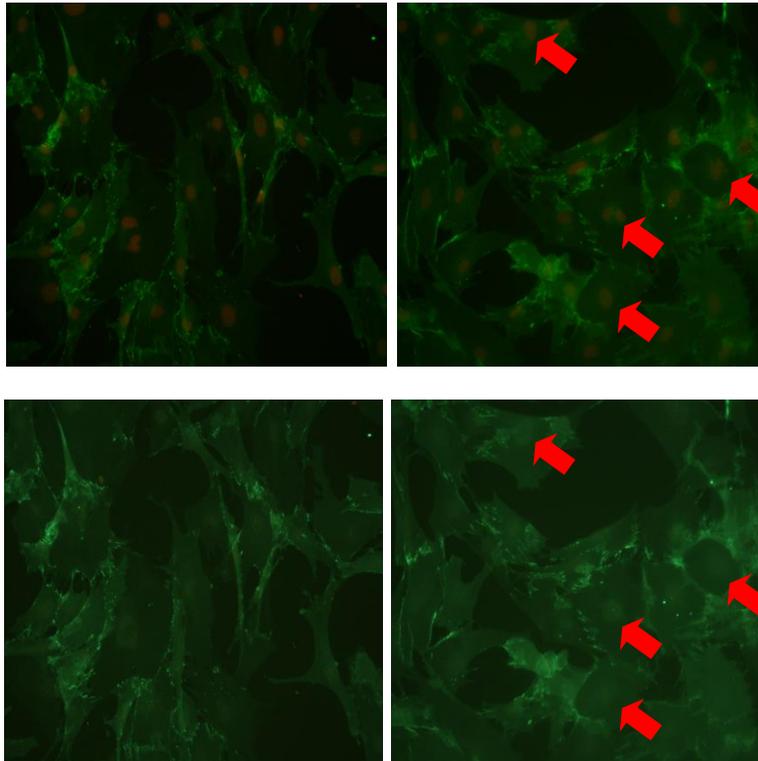


Figura 44: Osteoblastos primarios de rata, incubados en medio osteogénico (izquierda), conteniendo LiCl 10 mM (derecha), se utilizaron para realizar la inmunocitoquímica como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas señalan localización nuclear de β -catenina. El panel superior corresponde a la superposición de imágenes, luego de tinción con Ioduro de Propidio y anti- β -catenina. Las imágenes inferiores corresponden a la inmunocitoquímica de β -catenina.

Seguidamente se evaluó el efecto de una elevada concentración de calcio extracelular sobre la localización y expresión de β -catenina. En la investigación propia, los osteoblastos primarios de rata fueron incubados durante 7 días en medio osteogénico, en ausencia o presencia de CaCl_2 4 mM (5,35 mM final). Se observaron ligeros aumentos en la translocación nuclear de β -catenina por acción del calcio extracelular elevado (Fig. 45).

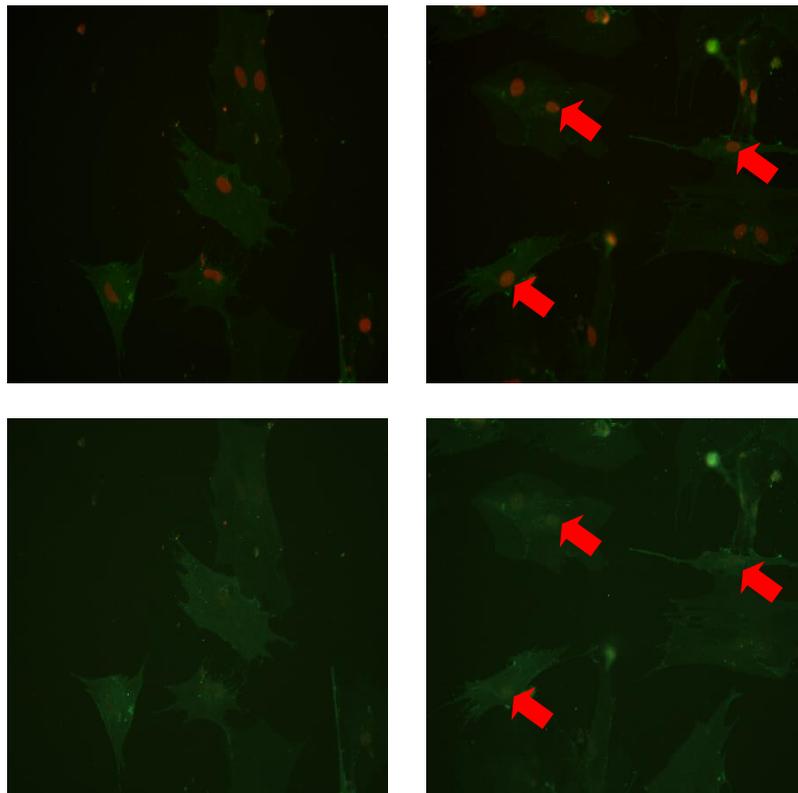


Figura 45: Osteoblastos primarios de rata, incubados en medio osteogénico (izquierda), conteniendo CaCl_2 4 mM (derecha), se utilizaron para realizar la inmunocitoquímica como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas señalan localización nuclear de β -catenina. El panel superior corresponde a la superposición de imágenes, luego de tinción con Ioduro de Propidio y anti- β -catenina. Las imágenes inferiores corresponden a la inmunocitoquímica de β -catenina.

Efecto de nucleótidos extracelulares sobre la capacidad de mineralización, de células calvariales de rata

El mejor parámetro para identificar a una célula como osteoblasto es determinar su capacidad de mineralización (Bellows y col., 1986). Este proceso es apreciable al final de la diferenciación osteoblástica. Una vez que los osteoblastos han secretado suficiente matriz extracelular, comienzan a depositarse cristales de calcio y fosfato en forma de hidroxapatita formando nódulos de mineralización. Estos nódulos, que contienen grandes cantidades de calcio, pueden ser fácilmente detectados mediante tinción con rojo de alizarina (Puchtler y col., 1969).

Para determinar el efecto de la estimulación purinérgica sobre la mineralización de los cultivos, en el presente trabajo, las células se incubaron durante 15, 18 y 22 días, en presencia de ATP γ S 10 μ M, y se evaluó la deposición de calcio por tinción con Rojo de Alizarina como se indica en Materiales y Métodos. Se observó un aumento significativo en la mineralización de los cultivos, inducida por ATP, a los días 15 y 18 (figura 46).

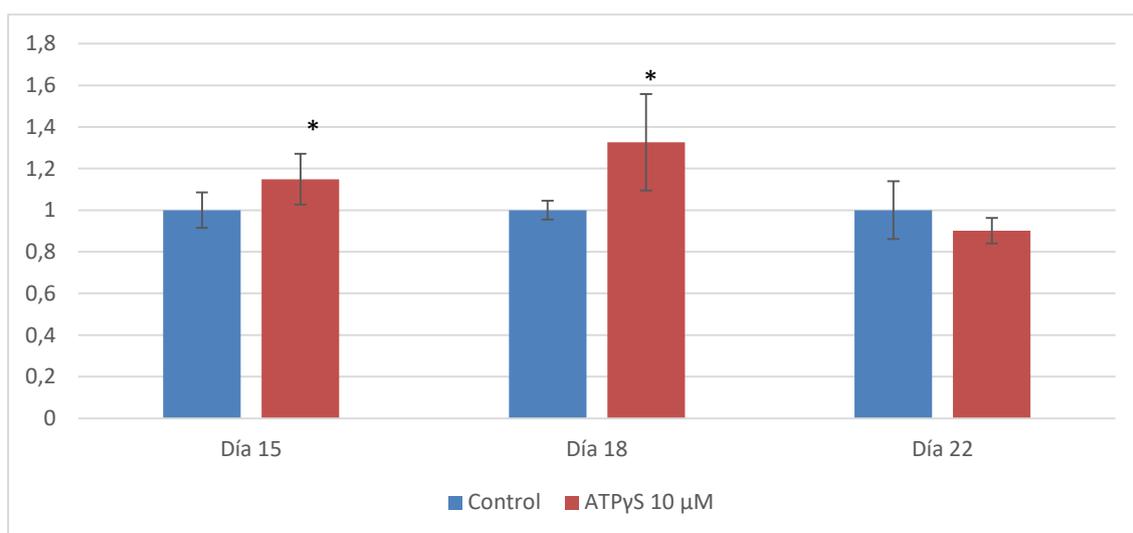


Figura 46: Efecto de ATP γ -S sobre la mineralización del cultivo. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de ATP γ -S 10 μ M durante 15, 18 y 22 días. Seguidamente se determinó la deposición de calcio en las monocapas celulares, mediante tinción con rojo de Alizarina, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias proporcionales con respecto al control, al cual se le asignó el valor 1. Se muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$, vs. Control.

Rol del calcio extracelular y efecto de nucleótidos sobre la capacidad de mineralización, de células calvariales de rata

Para estudiar un posible rol del Ca^{2+} extracelular en el proceso de formación de nódulos mineralizados, en los cultivos de osteoblastos primarios de calvaria de rata, las células se incubaron en medio osteogénico con o sin el agregado de CaCl_2 4 mM (5,35 mM final), durante 15, 18 y 22 días.

Si bien no se detectaron cambios en la mineralización luego de 15 días de incubación, los cultivos mostraron incrementos significativos con respecto al control, luego de 18 y 22 días de tratamiento con elevada concentración de Ca^{2+} extracelular (Figura 47).

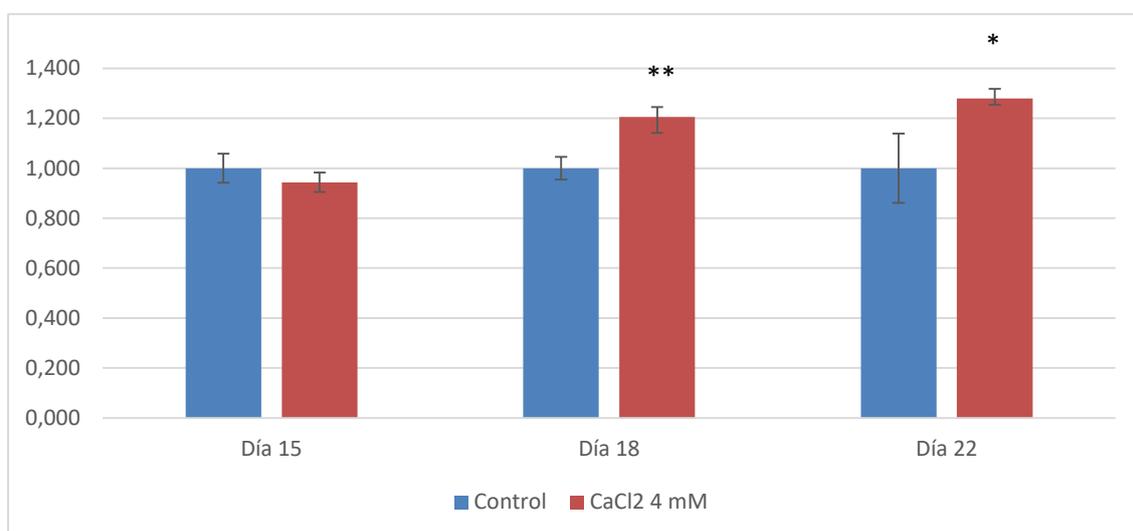


Figura 47: Efecto del Calcio extracelular elevado sobre la mineralización del cultivo. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de CaCl_2 4 mM (5,35 mM final) durante 15, 18 y 22 días. Seguidamente se determinó la deposición de calcio en las monocapas celulares, mediante tinción con rojo de Alizarina, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias proporcionales con respecto al control, al cual se le asignó el valor 1. Se muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,025$; ** $p < 0,001$, vs. Control.

Finalmente, se evaluó el efecto del sistema de señalización purinérgico en un medio con elevada concentración de Calcio extracelular (5,35 mM). Para esto, las células fueron tratadas con ATP γ S 10 μ M, en un medio osteogénico con el agregado de CaCl_2 4 mM, durante 15, 18 y 22 días. El tratamiento combinado con nucleótidos y Calcio mostró un

leve efecto de tipo sinérgico a los 18 días de incubación, dado que en esas condiciones, el tratamiento combinado presentó un estímulo superior en la mineralización, con respecto al de cada agonista por separado. En las demás condiciones no se observó este efecto (Fig. 48).

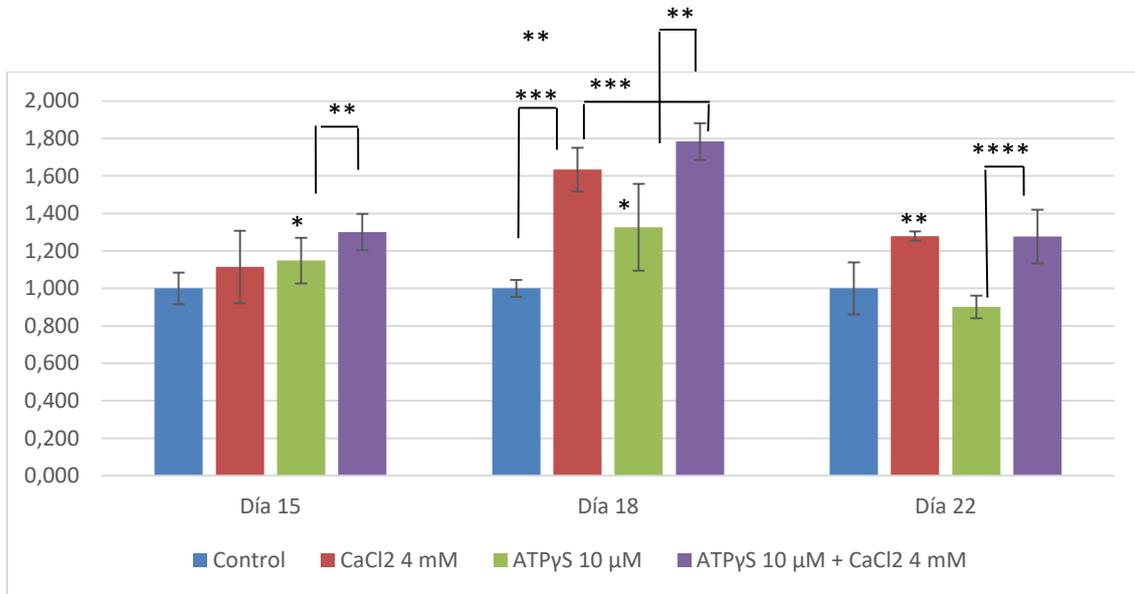


Figura 48: Efecto del Calcio extracelular elevado y estimulación purinérgica sobre la mineralización del cultivo. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) o conteniendo CaCl₂ 4 mM (5,35 mM final) en presencia o ausencia de ATPγ-S 10 μM durante 15, 18 y 22 días. Seguidamente se determinó la deposición de calcio en las monocapas celulares, mediante tinción con rojo de Alizarina, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias proporcionales con respecto al control, al cual se le asignó el valor 1. Se muestran valores promedio ± DE, provenientes de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * p < 0,05; ** p < 0,025; *** p < 0,01; **** p < 0,005; ***** p < 0,001.

Efecto de LiCl sobre la capacidad de mineralización, de células calvariales de rata

Para evaluar la participación de GSK3 en el proceso de mineralización, los osteoblastos primarios de rata fueron tratados durante 15, 18 y 22 días con el inhibidor de la enzima LiCl 10 mM. Como se observa en la figura 49, en todos los periodos de tiempo estudiados, el compuesto disminuyó la cantidad de depósitos de calcio significativamente con respecto al control.

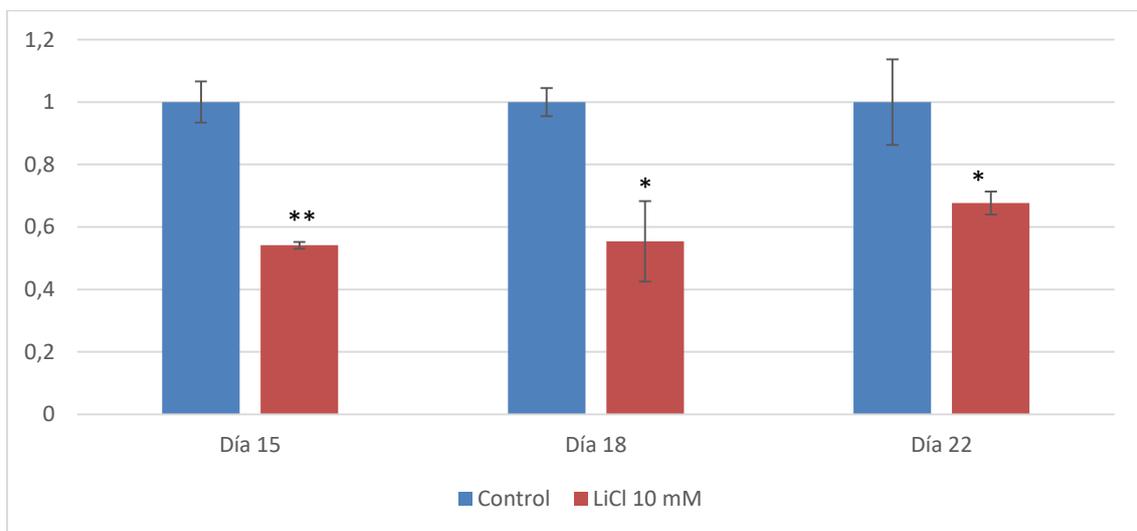


Figura 49: Efecto de LiCl sobre la mineralización del cultivo. Las células se incubaron en medio osteogénico (Control) en presencia o ausencia de LiCl 10 mM durante 15, 18 y 22 días. Seguidamente se determinó la deposición de calcio en las monocapas celulares, mediante tinción con rojo de Alizarina, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias proporcionales con respecto al control, al cual se le asignó el valor 1, se muestran valores promedio \pm DE, provenientes de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$, vs. Control.

Discusión

DISCUSIÓN

El conocimiento acerca de los mecanismos que regulan la migración, proliferación y diferenciación de osteoblastos es de fundamental importancia frente al desafío de implementar nuevas terapias anabólicas de aplicación en fisiología ósea.

Los cultivos primarios de células calvariales de rata neonata son un excelente modelo para estudiar dichos mecanismos. Estos cultivos contienen una población heterogénea de células, integrada mayormente por células madre mesenquimales, células osteoprogenitoras comprometidas, preosteoblastos y osteoblastos. Bajo condiciones de cultivo y estímulos apropiados, estas células proliferan, migran y pueden obtenerse poblaciones celulares diferenciadas de los linajes osteoblásticos, condrocíticos o adipocíticos, de acuerdo a la constitución del medio condicionante (Pirih y col., 2008; Weivoda y Hohl, 2012).

A pesar de la existencia de varias formulaciones osteogénicas conocidas, así como la importancia de cada uno de sus componentes para inducir la diferenciación de osteoblastos *in vitro*, esto aún no ha sido completamente optimizado (Vater y col., 2011). Además, el mecanismo conducente de la osteogénesis no ha sido totalmente dilucidado.

Los resultados presentados en esta Tesis muestran que purinoceptores principalmente de subtipos P2Y estimulan la migración de células calvariales de rata neonata. Ello se infiere por la actividad pro-migratoria de los nucleótidos ATP γ S y ADP β S, agonistas de receptores P2Y, aunque algunos reportes sugieren que ATP γ S también activaría P2X2 y P2X5 (Burnstock y Knight, 2004). Por lo tanto no se puede descartar la participación de estos dos últimos subtipos en la estimulación de la migración celular observada en este trabajo.

De acuerdo a la información recabada, ésta es la primera vez que se evalúa un posible rol del sistema de señalización purinérgico en la migración celular de un cultivo primario de células de calvaria de rata.

El primer estudio sobre un posible rol del sistema purinérgico (en ese entonces no existía el concepto) en la regulación de la migración celular es el de Bernstein y Steberl, 1959, donde se involucró a adenosina en la estimulación de la movilidad de células de esperma bovino. Sin embargo, no se evaluó la participación de receptores purinérgicos. Muchos años más tarde, Boonen y col., 1991, informaron inhibición de la migración de neutrófilos por nucleótidos (ATP, GTP, ATP γ S y GTP γ S). Si bien los autores mencionan la posibilidad de activación de purinoceptores, no evaluaron la hipótesis. Sus resultados

fueron confirmados por Elferink y col., 1992, quienes, además, demostraron inhibición de la migración de neutrófilos por XTP, ITP, CTP y UTP. La primera evidencia de participación de purinoceptores llegó con Shen y col., 1993, quienes demostraron participación de receptores de Adenosina en la regulación de la movilidad espermática, en muestras humanas. Más tarde, Falzoni y col., 1995, reportaron que la inhibición de P2X7 no provocó cambios en la migración, espontánea y dirigida, de monocitos. Finalmente, Pillois y col., 2002, demostraron participación de P2Y2 en la estimulación de la migración por UTP, en células de músculo liso de arteria de rata.

Posteriormente, Verghese y col., 1996, evaluaron la respuesta de neutrófilos humanos a ATP, ATP γ S, UTP y ADP β S (100 μ M). Todos los nucleótidos ejercieron un efecto quimiotáctico, siendo los más importantes los de ATP γ S y UTP. Resultados similares reportaron McCloskey y col., 1999, quienes trataron mastocitos primarios de médula ósea de rata (BMMC) y una línea celular de monocitos de ratón (J774) con UTP, ADP, ADP β S, AMPppc y 2-MeSATP (los últimos dos análogos no hidrolizables de ATP) y encontraron aumentos en la movilidad celular. Más aun, determinaron que los incrementos provocados por ADP tuvieron un componente mayoritariamente quimiotáctico. Ninguno de estos resultados pudo ser replicado en la línea celular RBL-2H3 (mastocitos de rata) ni en cultivo primario de mastocitos de peritoneo de rata (McCloskey y col., 1999).

Omatsu-Kanbe y col., 2006, también informaron aumentos en la quimiotaxis inducidos por los nucleótidos ATP, ADP y UTP, siendo el efecto de ATP dosis-dependiente. Además, la preincubación de los preadipocitos de ratón con Suramina (antagonista de receptores P2) y con U-73122 (inhibidor específico de fosfolipasa C) bloqueó la respuesta inducida por ATP, sugiriendo la participación de receptores purinérgicos metabotrópicos (P2Y).

Por su parte, Ferrari y col., 2011, reportaron que ATP 1 mM no presenta capacidad quimiotáctica en células madre mesenquimales humanas. Aun así, se observó un aumento en la quimioquinesis, y una potenciación en la quimiotaxis inducida por el compuesto CXCL-12 (un agente quimioatrayente).

Los nucleótidos ATP (1 nM) y UTP (10 μ M) no indujeron quimioquinesis ni quimiotaxis en células madre hematopoyéticas humanas. Sin embargo, UTP potenció el efecto quimiotáctico de CXCL-12 (Rossi y col., 2007). Contradiendo estos resultados, Salvestrini y col., 2012, trataron células de leucemia humana con ATP, UTP, INS973 (agonista de P2Y2R/P2Y4R) e INS415 (agonista de P2Y2R/P2Y6R), y encontraron disminución en la migración espontánea en todas las condiciones. Además, evaluaron el efecto de los mismos agonistas sobre la capacidad quimiotáctica de CXCL-12, la cual resultó menguada por UTP e INS973.

En células de carcinoma mamario humano, el agregado de Apirasa (hidrolasa de ATP) estimuló la migración sugiriendo un efecto inhibitor del ATP. En el mismo sentido, la activación de receptores P2X7, con BzATP, disminuyó la migración celular. Además, células de carcinoma mamario murino, tratadas con ATP y ATP γ S, mostraron reducida capacidad migratoria (Zhou y col., 2015).

Resumidamente, los reportes sobre estudios realizados en cultivos primarios, en su mayoría, muestran estimulación de la migración espontánea o quimioquinesis por activación de purinoceptores. Sin embargo, el efecto contrario es reportado en líneas celulares.

Los resultados obtenidos en esta Tesis concuerdan con la mayoría de los estudios reportados en la bibliografía, mostrando a los nucleótidos extracelulares como moduladores positivos de la migración celular, ya sea espontánea o dirigida. En este sentido, se puede mencionar que el tipo celular empleado por Ferrari y col., (2011), células mesenquimales humanas, es el más cercano en características al propio. Si bien las células pertenecen a especies distintas (humano vs rata), en ese trabajo el ATP estimuló la quimioquinesis, concordando con los resultados mostrados en esta Tesis, los cuales fueron obtenidos mediante ensayo de la herida, la cual evalúa ese tipo de movilidad celular. Aun así, debe mencionarse que los estudios realizados no permiten determinar efectos quimiotácticos (atrayerentes) por parte de los nucleótidos.

También, cabe aclarar que la proliferación de las células podría estar contribuyendo en los aumentos de migración observados. De acuerdo con los resultados de citometría de flujo, ATP γ S 10 y 100 μ M estimulan el pasaje de las células a fase S del ciclo celular. Sin embargo, estos aumentos (26 y 53 %, respectivamente) no parecen suficientes para explicar los cambios observados en el ensayo de la herida, por el ATP γ S 10 y 100 μ M (210 y 139 %, respectivamente). Además, los recuentos en hemocitómetro no muestran alteraciones en el ritmo de división celular respecto al control, luego de 72 horas.

Por su parte, no se realizaron ensayos de proliferación celular con ADP β S. Sin embargo, trabajos previos del laboratorio, en los que emplea una línea celular de osteosarcoma de rata (células ROS-A 17/2.8) y células calvariales de rata neonata, muestran que ADP β S 10 μ M presenta una respuesta débil con respecto a ATP y UTP en la activación de las MAPKs ERK1/2, p38 y JNK1, y además no produce cambios en la proliferación celular luego de 24 horas de tratamiento (Katz, 2007; Katz y col., 2008). De acuerdo con esto, se podría inferir que el aporte de una aumentada división celular inducida por

ADP β S al resultado observado en la migración sería escaso. No se encontraron más informes respecto del efecto en la proliferación de osteoblastos por ADP β S.

Respecto de los resultados obtenidos por citometría de flujo, estos demuestran que ATP γ S (10 y 100 μ M) estimula el pasaje de las células de fase G0/G1 a fase S del ciclo celular, involucrando a PI3K. Estos datos concuerdan con investigaciones previas, donde se le atribuye al sistema de señalización purinérgica un rol positivo en la estimulación de la proliferación celular. En referencia a esto, Katz y col., 2008, informaron incrementos en la proliferación de células ROS 17/2.8 inducidos por ATP, UTP, ATP γ S y en menor medida por ADP β S, luego de 24 y 48 horas de tratamiento. Resultado confirmado más tarde, en el mismo modelo y en osteoblastos primarios de rata, donde además se demuestra la participación de la vía PI3K/Akt en la acción proliferativa del ATP en osteoblastos y se sugiere la participación de receptores P2Y2 (Katz y col., 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante recuento celular, en esta Tesis, no muestran cambios en la tasa de crecimiento ni en la viabilidad celular. Si bien esto puede considerarse una discrepancia en comparación con los datos obtenidos por citometría de flujo, es válido mencionar que el recuento en cámara es un método de menor sensibilidad para registrar cambios en la tasa de crecimiento celular respecto del ensayo de MTT o la citometría de flujo (Pozarowski y Darzynkiewicz 2004; Balu y col., 2009).

Otros estudios muestran que osteoblastos primarios de rata, expuestos a un antagonista de P2Y₁₂ (Clopidogrel® (Plavix)) redujeron su capacidad proliferativa luego de 4 (etapa proliferativa) y 7 días (etapa de diferenciación temprana), sin mostrar cambios al día 14 (etapa de diferenciación final), sugiriendo un rol positivo para los receptores P2Y₁₂ en la proliferación de osteoblastos (Syberg y col., 2012). Lemoli y col., 2004, encontraron que ATP y UTP, en concentraciones bajas (ATP 1 nM - 1 μ M; UTP 100 nM - 1 mM), pueden estimular la formación de colonias de células madre hematopoyéticas humanas, en medio con suero (24%) y suplementado con citoquinas. Este efecto fue abolido al emplearse concentraciones mayores de los agonistas. Vale aclarar que no evidenciaron cambios en la capacidad proliferativa, cuando las células fueron tratadas, con ATP y UTP, en medio libre de suero y citoquinas. Al respecto, en el presente trabajo de Tesis se emplearon medios de tratamiento con concentraciones de suero consideradas no mitogénicas (1%). La inhibición de la señalización purinérgica, por inactivación de receptores P2Y por Suramina (Orriss y col., 2006) o por hidrólisis del ATP extracelular por acción de Apirasa (Orriss y col., 2013) redujo el número de osteoblastos de rata en cultivo primario, sugiriendo la participación de receptores P2Y en la estimulación de la proliferación de osteoblastos y concordando con los resultados presentados en esta

Tesis. En otro trabajo, células de osteosarcoma humano MG-63 expuestas a ATP mostraron incrementar su proliferación, siendo este estímulo mayor con los análogos no hidrolizables ATP γ S y AMP-PNP. En cambio, UTP y UDP causaron el efecto contrario y $\alpha\beta$ -mATP no provocó cambios. Además, en el mismo trabajo, mediante el empleo de los antagonistas Suramina y PPADS se bloqueó el efecto estimulador del ATP, mientras que azul reactivo-2 no causó efecto. Sobre esta base los autores sugieren la participación de receptores P2X5 en la estimulación de la proliferación de osteoblastos (Nakamura y col., 2000). Sin embargo Suramina es un conocido antagonista de receptores acoplados a proteína G, incluyendo a P2Y2 y P2Y4 (Chung y Kemode, 2005). Por su parte, Cutarelli y col., 2016, reportaron que ATP 10 μ M incrementó, levemente, la proliferación en la línea celular de osteoblastos humanos SaOS-2, luego de 6 días de incubación, y el mismo nucleótido, en mayor concentración (1 mM), provocó una disminución en 3 días de tratamiento.

Orriss y col., 2012, empleando agonistas y antagonistas selectivos de receptores P2 y análisis de expresión génica, descartaron la participación de los receptores P2X1, 3 y 7 y P2Y4 en la regulación de la proliferación de cultivos primarios de osteoblastos de rata. Por su parte, Noronha-Matos y col., 2012, no encontraron diferencias en la proliferación de células estromales de médula ósea humana entre el grupo control y aquellos tratados con UTP, UTP γ S y UDP 100 μ M, descartando la participación de receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6.

Tomando en cuenta los estudios en diversos modelos celulares reportados en la bibliografía, los datos parecen indicar que los receptores purinérgicos de mayor relevancia en la regulación de la proliferación celular serían P2X2 y/o P2X5. Ambos receptores han mostrado responder a ATP γ S (Burnstock y Knight, 2004) y presentan altos niveles de expresión en cultivos primarios de osteoblastos de rata a tiempos tempranos, disminuyendo a medida que el cultivo se diferencia (Orriss y col., 2006). Sin embargo receptores homoméricos de P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7 muestran, en general, una menor afinidad por el ATP y se desensibilizan rápidamente luego de varios segundos de exposición al agonista, siendo la recuperación extremadamente lenta (North, 2002; Gevertz y col., 2006). Si bien no puede descartarse un rol para el receptor P2Y12, al que se le ha atribuido una acción proliferativa según los datos de Syberg y col (2012), el ATP γ S, empleado en esta Tesis, no es una agonista preferencial de este subtipo. Cultivos primarios de osteoblastos calvariales de rata neonata, como los utilizados en esta Tesis, han mostrado responder a ATP y UTP, sugiriendo la expresión de receptores P2Y2 y/o P2Y4 (Katz y col., 2011). Los receptores P2Y2 y P2Y4 de rata responden en forma equipotente a ATP y UTP. En cambio ATP γ S es un agonista fuerte de receptores P2Y2 y actúa débilmente sobre el subtipo P2Y4 de rata (Wildman y col

2003). También el subtipo P2Y₁₁ son activados por ATP γ S (Burnstock y Knight, 2004; Jacobson y col., 2004), pero los roedores carecen del gen para este receptor (Orriss y col., 2012).

En esta Tesis, ATP γ S 10 y 100 μ M incrementaron el pasaje a fase S del cultivo primario, siendo mayor el aumento provocado por la concentración más alta.

De esta manera, los efectos pro-mitóticos de ATP γ S 10 μ M pueden ser atribuidos a receptores P2X₂ y/o 5, o a heterómeros de ambos (P2X_{2/5}) que responden a bajas concentraciones del nucleótido (Jacobson y col., 2004).

Por su parte, el mayor efecto inducido por ATP γ S 100 μ M podría ser consecuencia de la activación de los mencionados purinoceptores P2X, junto con alguna contribución de receptores P2X₄ y/o 6 y/o P2Y₁, 2, 4 y/o 12, que explicaría la diferencia observada entre ambas concentraciones de nucleótido. Esto podrá ser esclarecido, en investigaciones futuras, mediante el análisis de expresión de los distintos subtipos de receptores purinérgicos en el modelo celular empleado en esta Tesis.

Los reportes que estudian el rol del Calcio extracelular en la proliferación de células óseas o relacionadas, concuerdan en la existencia de un efecto estimulador de la división celular para concentraciones de 1,8-10 mM (Dvorak y col., 2004; Chattopadhyay y col., 2004; Hashimoto y col., 2012; Barradas y col., 2012). En la presente Tesis, no se encontraron cambios significativos en la viabilidad ni en la tasa proliferativa de los osteoblastos primarios de rata, luego de 24, 48 y 72 horas de tratamiento en medio base conteniendo Ca²⁺ 5,35 mM con respecto al control (1,36 mM).

Al respecto, vale la pena mencionar que los aumentos en proliferación encontrados por Dvorak y col., 2004, son leves (17% de aumento en la incorporación de BrdU) y a tiempos de tratamiento mayores (7 y 10 días). Por su parte, Hashimoto y col., 2012 y Barradas y col., 2012, emplearon un tipo celular distinto (células estromales de médula ósea murinas y humanas, respectivamente), diferentes técnicas de determinación de proliferación (incorporación de BrdU y cuantificación de ADN) y una concentración de Calcio mayor (10,8 y 7,8 mM, respectivamente), a la cual el modelo empleado en esta Tesis no es viable. Al respecto y concordando con lo reportado por Chattopadhyay y col., 2004 (quienes emplearon cultivos primarios de calvaria de rata fetal), en esta Tesis, el tratamiento de los cultivos con concentraciones de Ca²⁺ de 6, 8 y 10 mM produjo cambios en los recuentos celulares y en la morfología compatibles con muerte celular (pérdida de adherencia, tamaño y forma redondeada) (datos no mostrados en esta tesis). Además, el tratamiento de las células con una concentración de Ca²⁺ de 5,4 mM, similar a la empleada en la presente Tesis (5,35 mM), no indujo cambios en la proliferación (Hashimoto y col., 2012).

Respecto de la discrepancia con los resultados obtenidos por Chattopadhyay y col (2004) en la proliferación, se debe mencionar que el medio de cultivo empleado por ellos es DMEM, el cual contiene una concentración de Glutamina (4 mM) que duplica la del α -MEM (Glutamina 2 mM). Dato relevante, dado que la Glutamina ha sido considerada el aminoácido más importante para la proliferación celular (Nakajo y col 2004). Se ha reportado que la adición de Glutamina al medio de cultivo estimula la proliferación de linfocitos (Szondy y Newsholme, 1991; Newsholme y Calder, 1997; Yaqoob y Calder, 1997), enterocitos (Wiren y col., 1998; Rhoads y col., 1997; Yamauchi y col., 2002), fibroblastos (Eagle y col., 1956) y células tumorales (Turowski y col., 1994; Eagle y col., 1956), en concentraciones de 1-7 mM.

Además, las ratas utilizadas por Chattopadhyay y col., 2004, son de estadio fetal, las cuales podrían proveer células de calvaria con una mayor capacidad proliferativa constitutiva que las propias, las cuales son neonatas.

Así, la conjunción de ambas situaciones (mayor concentración de Glutamina y ratas fetales) podría resultar en un cultivo con mayor sensibilidad al estímulo de la proliferación por agentes externos.

Por otro lado el estímulo en la proliferación celular demostrado en esta Tesis por acción del ATP γ -S 10 y 100 μ M en medio base conteniendo Ca²⁺ 5,35 mM, sugiere que ambos agonistas en conjunto ejercen un estímulo mitogénico mayor, que pudo ser detectado por recuento celular, con respecto al que presenta cada agonista individualmente (Laiuppa y Santillán, 2016).

Como fue descrito en la sección “Materiales y Métodos”, en los experimentos realizados con el fin de estudiar la diferenciación osteoblástica, las células fueron incubadas en medio osteogénico, el cual está compuesto por α -MEM 1 % suero fetal bovino (SFB), ácido ascórbico 50 μ g/ml (300 μ M) y β -glicerofosfato 10 mM.

Un estudio reciente (Orriss y col., 2012), reportó pérdida de viabilidad en cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata, por concentraciones de β -glicerofosfato en el rango de 5-10 mM. Según consta en el artículo, esas cantidades de β -glicerofosfato provocaron una disminución en la viabilidad (evidenciada por aumentada liberación de lactato deshidrogenasa) debido a una excesiva mineralización de la matriz, que acaba por “fosilizar” los osteoblastos.

Sin embargo, en el presente trabajo de Tesis no se observaron cambios en la viabilidad de los cultivos luego de 7 días de incubación en medio osteogénico conteniendo β -glicerofosfato 10 mM. Estos resultados concuerdan con los antecedentes del grupo de trabajo (Ayala, 2014)

Tampoco se observaron cambios en la viabilidad celular luego de la incubación de los cultivos en medio osteogénico conteniendo ATPγS 10 o 100 μM respecto de los controles. Sin embargo, la estimulación purinérgica mostró una disminución significativa en los recuentos celulares respecto al control, siendo este efecto mayor para ATPγS 100 μM. Un efecto similar se observó para el tratamiento con medio osteogénico conteniendo calcio 5,35 mM. Estos datos sugieren que ambos agonistas en medio osteogénico producen una disminución en la tasa de crecimiento celular, probablemente favoreciendo el pasaje del estadio proliferativo al de diferenciación. Dado que la respuesta celular al tratamiento con ambos agonistas en conjunto es similar a la observada con cada agonista por separado, se sugiere que ambos agonistas podrían estar activando una misma vía de señalización.

Sumado a esto, se han conducido experimentos de mineralización de hasta 22 días de incubación en medio osteogénico conteniendo Ca^{2+} 5,35 mM, y no se han observado alteraciones morfológicas indicativas de pérdida de viabilidad, ni disminuciones en la densidad celular.

El LiCl es un ampliamente reconocido y asequible inhibidor de GSK3 (Berridge y col., 1989; Stambolic y col., 1996; Hedgepeth y col., 1997). Ha mostrado inhibir a la quinasa mediante dos maneras, directa e indirectamente. Por un lado, el Litio reemplaza iones Magnesio en el sitio activo de la enzima (Zhang F y col., 2003). Por otro lado, el LiCl activaría a la vía PI3K/AKT, inhibiendo a GSK3 por fosforilación mediada por AKT (Chalecka-Franaszek y col., 1999)

En esta Tesis, no se observaron cambios en la supervivencia celular, por incubación en presencia de LiCl 10 μM, durante 7 días. En cambio, el tratamiento de las células con LiCl 10 mM provocó una disminución (30%) en el contenido de ADN, estadísticamente significativa, luego de siete días de tratamiento. Por otro lado, los tratamientos que comprendieron incubaciones con esa concentración de Litio de hasta 22 días, no mostraron alteración morfológica indicativa de muerte celular o desprendimiento de la monocapa celular. Estos datos concuerdan con los estudios de Wang y col., 2012, que no reportaron cambios en la viabilidad de células madre de papila apical (SCAP) luego de una incubación con LiCl 10 mM, durante 7 días. Sin embargo, mostraron reducción en los valores de MTT por tratamiento con concentraciones de LiCl 20 y 30 mM.

Durante la diferenciación osteogénica de células mesenquimales *in vitro* se pueden distinguir tres etapas (Huang y col., 2007). Una etapa inicial, de crecimiento celular o proliferación (los primeros 4 o 5 días de cultivo), seguida de un estadio intermedio (entre

los días 5 a 15), caracterizado por aumentos en la actividad de la enzima FAL, que alcanza un pico para luego declinar (Aubin, 2001). En la línea celular de fenotipo osteoblástico (SaOS-2) la actividad de FAL se ve incrementada a partir del día 7 en medio osteogénico (Li y col., 2009). También se encontró en éste estadio la expresión de Colágeno tipo I (Quarles y col., 1992), específicamente alrededor del día 11 (Sila-Asna y col., 2007; Feng y col., 2008) y de la BSP (Sila-Asna y col., 2007; Liu y col., 2008). La etapa tardía (entre 18 y 28 días de cultivo) se presenta con una gran expresión de OC y OP, seguida por deposición de calcio y fosfato (Hoemann y col., 2009; Huang y col., 2007). Se ha encontrado elevada expresión de OPG en células mesenquimales alrededor del día 21 de incubación en medio osteogénico (Yang y col., 2011). Aún se discute acerca de los estadios de diferenciación en los que se expresa la Osteonectina (ON).

Los resultados presentados en esta Tesis muestran que ATP γ -S 10 μ M incrementó la actividad FAL a los diez días de tratamiento. El agonista UTP (10 y 100 μ M) no mostró cambios a los 4 y 7 días de tratamiento. Estos datos concuerdan parcialmente con lo reportado por Katz y col., 2011, que en el mismo modelo celular, detectaron aumentos en la actividad FAL luego del tratamiento con ATP 10 μ M durante 7 y 9 días. Incrementos similares, luego de 7 días de tratamiento con ATP, ATP γ S y UTP 10 y 100 μ M reportaron Ayala y col., 2013, quienes además, evidenciaron una caída en la actividad FAL a los 14 días de tratamiento con UTP 10 μ M. Las diferencias mencionadas podrían ser atribuidas a modificaciones en el protocolo de obtención del cultivo, del protocolo utilizado en la determinación de la actividad enzimática o diferencias inherentes al lote de animales empleado (Czekanska y col., 2012; Garrett, 2003).

Similarmente, preosteoblastos murinos, tratados con ATP, ADP, UTP, UDP, $\alpha\beta$ meATP, $\beta\gamma$ meATP y BzATP 100 nM, mostraron aumentos en la actividad FAL a los 7 días, seguidos de disminución a los 14 días (Rodrigues-Ribeiro y col., 2015). ATP, en concentraciones 10, 100 y 1000 μ M, incrementó la actividad FAL, en osteoblastos humanos Saos-2, luego de tres días de tratamiento (Cutarelli y col., 2016). Por su parte, Sun y col., 2013, informaron que el ATP, en el rango de 0,1 – 100 μ M, aumentó la actividad FAL de células madre mesenquimales humanas, a los 14 días de tratamiento. Empleando el mismo modelo celular, Noronha-Matos y col., 2014, reportaron un resultado similar, por activación de P2X7 con BzATP 100 μ M. El mismo grupo de investigación, valiéndose de células de estroma de médula ósea humana, encontraron que UTP y UDP 100 μ M, también aumentaron los valores de actividad FAL (Noronha-Matos y col., 2012). Clopidogrel (Plavix), un antagonista selectivo de P2Y12, redujo la

actividad FAL a los 14 días de tratamiento, a concentraciones de 10 y 50 μM (Syberg y col., 2012).

Contrariamente a lo demostrado en esta Tesis, Orris y col., 2007, midieron la actividad FAL, en cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata, a los días 4, 7, 10 y 14 y encontraron disminuciones provocadas por ATP y UTP 10 μM . Por otro lado, no reportaron efectos por ADP ni UDP.

Los nucleótidos presentan distinta afinidad por los diversos receptores purinérgicos. Entre estos, ATP γ S (análogo no hidrolizable de ATP) es considerado un agonista fuerte de P2Y2 y débil de P2Y4. UTP activa los dos receptores mencionados anteriormente (en rata pero no en humano) con la misma potencia (Wildman y col., 2003).

Los aumentos provocados por ATP γ S, sugieren la participación de receptores P2Y2 en la regulación de la actividad FAL. Estos resultados son concordantes con los obtenidos anteriormente por el grupo (Ayala y col., 2013; Katz y col., 2011) y con la mayor parte de la evidencia recogida.

Las discrepancias observadas con los estudios de Orris y col., 2007, que reportaron efectos anti-osteogénicos para ATP y UTP podrían tener su explicación en las diferentes condiciones experimentales empleadas por ese grupo. El medio utilizado en ese trabajo fue D-MEM, que presenta una formulación distinta al α -MEM, el cual induce una expresión de 2-3 veces mayor en la actividad FAL que el D-MEM (Orris et al., 2014). Sumado a esto, el medio osteogénico reportado por ellos, además de contener Ácido Ascórbico y β -glicerofosfato, contiene Dexametasona. Un informe le atribuyó al corticoide efectos anti-osteogénicos y pro-adipogénicos (J Li y col., 2013). Tobimatsu y col., 2006, mostraron apoptosis en la línea celular de preosteoblastos murinos MC3T3 inducida por Dexametasona. Sin embargo la concentración empleada en ambos estudios es diez veces mayor que la utilizada por Orris y col., 2007, (10 nM). Por otro lado, se informó inhibición de la actividad FAL por tratamiento con Dexametasona 1 nM - 10 μM durante cuatro días, en calvaria de rata neonata (Canalis, 1983). Al contrario, Tenenbaum y col., 1985, mostraron inducción de actividad FAL por Dexametasona 10 nM - 1 μM en calvaria de embriones de pollo.

Otro factor a tener en cuenta es la distinta cepa de los animales utilizados por Orris y col., 2007 (ratas Sprague-Dawley).

Hashimoto y col., 2012, incubaron células de estroma de medula ósea de ratón, en medio osteogénico conteniendo concentraciones extracelulares de calcio de 5,4 y 10,8 mM, y evidenciaron aumentos en la actividad de FAL a los 14 días. En concordancia con este trabajo, en la presente Tesis se demuestra un incremento en la actividad de la

enzima luego de 10 días de tratamiento en medio de cultivo osteogénico con una concentración de Calcio de 5,35 mM. Sin embargo, en desacuerdo con dicho trabajo, la concentración de CaCl_2 de 10,8 mM, provoca pérdida de viabilidad en el cultivo primario de calvaria propio.

Dvorak y col., 2004, partiendo de un cultivo control con una concentración de Calcio extracelular de 1,2 mM, mostraron que aumentos (concentración final 1,8-3 mM) de la misma incrementan la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica en cultivos primarios de calvaria de rata. Sin embargo, reportaron que la actividad de FAL alcanza valores máximos a concentraciones de Ca^{2+} extracelular de 1,2 - 1,8 mM, disminuyendo su actividad por encima o debajo de este rango de concentración, luego de 7, 10 y 14 días de tratamiento. Esto no concuerda con lo demostrado en esta Tesis, ya que la concentración de calcio 5,35 mM no produjo cambios en la actividad enzimática a los 7 días de tratamiento pero la incrementó a los 10 días respecto del control, el cual presenta una concentración de calcio de 1,36 mM.

Cabe mencionar, sin embargo, que la máxima concentración empleada por Dvorak y col., 2004, es de 3 mM, lo que representa un 56% de la empleada en esta Tesis.

La disminución observada en la actividad de FAL luego del tratamiento con ATP γ S 10 μ M en medio osteogénico conteniendo calcio 5,35 mM, sugiere que ambos compuestos podrían estar modulando vías de señalización que antagonizan entre sí. Sin embargo, la estimulación de la actividad FAL mostrada por UTP 10 μ M en medio osteogénico conteniendo calcio 5,35 mM sugiere un efecto sinérgico entre estos agonistas. Dado que ATP γ S es agonista fuerte de receptores P2Y2 pero débil para P2Y4 y que ambos subtipos de receptores responden de manera equipotente a UTP, surge la hipótesis de un efecto antagónico entre las vías de señalización moduladas por el calcio elevado y la activación del receptor P2Y2, mientras que la estimulación del receptor P2Y4 ejercería un efecto sinérgico con la elevada concentración de calcio.

Además, a pesar de ser más débil, la respuesta observada al UDP, agonista de receptores P2Y6, no permite descartar la participación de este subtipo en la estimulación de la actividad de FAL. La participación de los distintos receptores en esta respuesta, deberá ser abordada en investigaciones futuras mediante el empleo de inhibidores selectivos de subtipos de receptores P2 y/o silenciamiento específico por siRNA.

Los resultados obtenidos en esta Tesis, muestran que luego de 4 y 7 días de tratamiento de las células con LiCl 4-10 mM, aumenta la actividad de FAL. Concordando con estos resultados, Arioca y col., 2014, demostraron un aumento dosis-dependiente de la actividad FAL luego de 9 días de tratamiento con LiCl 10 y 20 mM, en preosteoblastos murinos. A su vez, el tratamiento con LiCl 5 y 10 mM de células madre de papila dental

durante 7 y 14 días, condujo a aumentos de la actividad enzimática (Wang y col., 2012). van der Horst y col., 2005, al tratar una línea celular murina de MSC (C3H10T1/2) durante 1 semana, con LiCl 0.1-20 mM, obtuvieron incrementos dosis-dependiente en la actividad de FAL. Sin embargo, el mismo tratamiento no produjo este efecto en cultivo primario de médula ósea. Galli y col., 2012, trataron células de cultivo primario de medula ósea de ratón con LiCl 1 mM durante 7, 14 y 21 días. No reportaron cambios en la actividad de la enzima a los días 7 y 14, pero sí detectaron aumentos (300%) a la tercera semana de tratamiento. Du y col., 2012, trataron células de folículo dental durante 4, 8 y 12 días con LiCl 10 mM, sin encontrar cambios en la actividad FAL al día 4, mientras que reportaron aumentos leves a los tiempos más prolongados.

Clément-Lacroix y col., 2005, demostraron aumentos en la actividad FAL en células mesenquimales murinas tratadas con LiCl 20 mM. Sin embargo, no observaron efectos en células de calvaria, provenientes de los mismos animales

En dos líneas celulares de osteoblastos humanos (MG63 y SaOS-2), Briolay y col., 2012, reportaron incrementos en la actividad enzimática luego de 7 días de tratamiento con LiCl a concentraciones bajas (0.2, 2 mM), mientras que una concentración elevada (20 mM) redujo los valores.

Dado que el LiCl es un inhibidor de GSK3 (Berridge y col., 1989; Stambolic y col., 1996; Hedgepeth y col., 1997), estos resultados sugieren que la inhibición de esta enzima podría estar implicada en el efecto del LiCl sobre el incremento observado en la actividad de FAL.

En este sentido, Zeadin y col., 2012, transfectaron células musculares lisas vasculares (CMLV) con una forma constitutivamente activa de GSK3 β y observaron disminución en la actividad enzimática de FAL en un período de 8 días. De igual manera, la activación de GSK3 β por un lipopolisacárido (LPS) redujo la actividad FAL (Tang y col., 2013). Células ST2, expuestas a un inhibidor específico de GSK3 (CHIR99021) exhibieron elevada actividad FAL (Bennett y col., 2005). Kulkarni y col., 2006, trataron células mesenquimales murinas con un inhibidor dual de GSK3 (α/β) y observaron aumento de la actividad FAL.

En discrepancia con lo demostrado en esta Tesis, se reportaron disminuciones en la actividad FAL, inducidas por LiCl, en células preosteoblásticas de ratón (Yoshida y col., 2012; Li y col., 2011). Sin embargo, en esos trabajos se emplearon concentraciones de LiCl de 20 mM y 50 mM, equivalentes al doble y al quíntuple de la máxima concentración empleada en esta Tesis (10 mM). Por otro lado, se ha reportado inhibición de la viabilidad celular por concentraciones elevadas de LiCl (20-30 mM) en cultivos primarios de células madre de papila apical (Wang y col., 2012).

Li y col., 2011, demostraron que la inhibición de GSK3, con tres agentes específicos, AKP (2,5 μ M), BIO (2 μ M) y SB 216763 (10 μ M), redujo la actividad FAL en la línea celular MC3T3-E1 (preosteoblastos murinos), mientras que en la línea C2C12, uno de los inhibidores (BIO) incrementó la actividad de la enzima y los otros no surtieron efecto.

La disminución en la actividad de FAL provocada por LiCl 10 mM luego de 10 días de tratamiento coincide con la caída observada en la etapa intermedia de la diferenciación osteoblástica reportada por otros autores (Aubin, 2001; Katz y col., 2011; Ayala y col., 2013). Por otro lado, concuerda con la inhibición de la mineralización observada a los 15, 18 y 22 días.

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran por primera vez que la activación de receptores purinérgicos P2, en células calvariales de rata, estimula la expresión y translocación nuclear de β -catenina, luego de 4 días de tratamiento con ATP γ S 10 y 100 μ M. La correlación temporal y la similitud en magnitud con los aumentos en la expresión y en la acumulación nuclear de β -catenina inducidos por LiCl 10 mM, sugieren la participación de GSK3. Los cambios observados por acción del LiCl, en el modelo celular propio, concuerdan con lo reportado en la bibliografía. Al respecto, se ha reportado que distintos tratamientos con LiCl (1-25 mM) disminuyen los niveles de la forma fosforilada y aumentan la translocación nuclear, la expresión y la actividad transcripcional de β -catenina en distintos tipos celulares (Du y col., 2012; Arioka y col., 2014; Briolay y col., 2012; Li y col., 2015; Chandar y col., 2005; Armstrong y col., 2007; Spencer y col., 2005; McCarthy y Centrella, 2010; van der Horst y col., 2005; Ohnaka y col., 2005; Galli y col., 2012). Adicionalmente, y de acuerdo con los resultados presentados aquí, se ha demostrado que la estimulación de GSK3 β , mediante el empleo de una toxina bacteriana (el lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis*) disminuye el nivel de β -catenina nuclear y su actividad transcripcional (Tang y col., 2013). Por su parte, Gregory y col., 2005 reportaron incrementos en la β -catenina citosólica, en respuesta a LiCl 10 y 15 mM.

Vale la pena destacar que la estimulación de β -catenina, por Litio, ocurrió al cuarto día, coincidiendo con el aumento en la actividad enzimática de FAL, estimulado por igual tratamiento. En concordancia con los resultados presentados en esta Tesis, existen reportes de aumento en la actividad de FAL por activación de β -catenina (Zhang W. y col., 2016; Liu B. y col., 2015). Además, Bein y col., 2003, demostraron que la introducción de una forma de β -catenina resistente a fosforilación por GSK3, y por ende

a degradación proteosómica, en una línea celular murina de MSC, indujo notables incrementos en la actividad FAL.

Concordante con los resultados obtenidos en esta Tesis, Grol y col., 2016 (el único reporte, a la fecha, de una regulación purinérgica de la localización y función de β -catenina, en células osteoblásticas), trabajando con la línea celular de preosteoblastos murinos MC3T3, encontraron que un agonista de P2X7, BzATP (300 μ M), promovió la inhibición de GSK3 y la acumulación nuclear de β -catenina. Además, los datos mostrados en esta Tesis, concuerdan con estudios que reportaron que agonistas purinérgicos incrementaron tanto la expresión como la translocación nuclear de β -catenina, en células neuronales (Ortega y col., 2008) y en células musculares (Taurin y col., 2008)

Por último, y contradiciendo los resultados mencionados, Guo y col., 2014, informaron reducciones en la expresión y función del factor de β -catenina, luego de la activación de P2X7, en células epiteliales pulmonares.

Interesantemente, en esta Tesis se encontró que el tratamiento con ATP γ S 10 μ M indujo la expresión génica de BMP4, 5, 6 y 7, BSP y Colágeno tipo I, al quinto día de incubación. Si bien este dato no fue confirmado en el presente trabajo, concuerda con lo reportado por Ayala y col., 2013. Además, es relevante mencionar que se han reportado aumentos en el nivel de ARNm y proteína de BMP6 provocados por Wnt5a, la cual ha mostrado activar a β -catenina (Dai y col., 2008; Mikels y Nusse, 2006).

Por su parte, Hill y col., 2006, demostraron que la sobreexpresión de β -catenina indujo aumentos en el nivel de transcritos de BMP7. Por otro lado, se ha reportado que la expresión de BSP, que mostró ser incrementada por la estimulación purinérgica, puede ser inducida por la activación de β -catenina (Zeadin y col., 2012).

El Receptor Sensor de Calcio (CaSR), es un receptor acoplado a proteína Gq, capaz de sensor los niveles de Calcio extracelular. El ion, al unirse al dominio extracelular del receptor provoca cambios conformacionales y, con éstos, su activación. De esta manera, el Ca²⁺ puede actuar como primer mensajero extracelular en una vía de señalización (Brown y Macleod., 2001)

Fernandez y col., 2013, encontraron que el Ranelato de Estroncio (RS) provocó la activación de β -catenina, de manera dependiente del CaSR.

Por otro lado, células humanas de adenocarcinoma de colon fueron expuestas a concentraciones de Calcio extracelular de 1 (Chakrabarty y col., 2003) y 5 mM (MacLeod y col., 2007) y exhibieron disminuciones en la formación de complejos β -catenina/TCF4 y en el nivel proteico de β -catenina total, respectivamente, además de reducida actividad

transcripcional. En el mismo tipo celular, Bhagavathula y col., 2007, reportaron disminución de la β -catenina citoplásmica y perinuclear, a expensas de la forma unida a membrana, y en la actividad transcripcional, provocada por aumentos en la concentración de Ca^{2+} extracelular.

Respecto del rol del calcio en la localización de β -catenina, los informes son variables. La quelación de Calcio (por EGTA) no provocó cambios en los niveles de proteína total, en tejido cartilaginoso (Romereim y col., 2014) o en células MCF-7 (Symons y col., 2002), pero indujo internalización, disminuyendo la expresión en membrana (Kartenbeck y col., 1991; Aicher y col., 1997)

Células HEK expuestas a cambios en la concentración de calcio extracelular (de 2 μM a 2 mM), mostraron relocalización de β -catenina, en forma de acúmulos en los complejos de adhesión de la membrana plasmática (Boscher y Mège, 2008). Queratinocitos humanos, incubados durante 5 minutos en presencia de Calcio extracelular (1,2 mM), mostraron aumentada expresión de β -catenina en membrana plasmática (Xie y col., 2009). Sin embargo, Ito y col., 1999, reportaron el efecto contrario. El aumento del influjo de Ca^{2+} (inducido por Ionomicina) provocó una relocalización de la β -catenina de la membrana al citoplasma.

Popp y col., 2014, describieron aumentos en la expresión y actividad transcripcional de β -catenina, en keratinocitos humanos tratados con Ca^{2+} extracelular a una concentración 2 mM. En el mismo sentido, Guan y col., 2015, mostraron aumentos en la expresión de β -catenina, en células madre derivadas de orina incubadas con extractos de Silicato de Calcio. Concordante con esto, en la presente Tesis se observó incremento en la localización nuclear de β -catenina luego de incubación de las células en medio osteogénico conteniendo calcio elevado (5,35 mM). Sin embargo, no se encontró ningún reporte sobre el efecto de elevadas concentraciones de Calcio extracelular en la regulación de la expresión y función de β -catenina, en células óseas.

Ayala y col., 2013, mostraron aumentos en la expresión de los genes de BMP2, 4 y 5 y BSP, en cultivo primario de calvaria de rata tratado durante 1 semana con ATP y UTP. Además, informaron incrementos del ARNm de FAL, después de 4 días de incubación. En osteoblastos humanos se detectaron incrementos de la expresión de Runx2, FAL y Osteocalcina (OCN) luego de tratamiento durante 3, 6 y 9 días con ATP 10, 100 y 1000 μM . Los mayores aumentos se observaron a tiempos tempranos, con todas las concentraciones, siendo la de 100 μM la que indujo los cambios más importantes (Cutarelli y col., 2016). Rodrigues-ribeiro y col., 2014, estudiaron la expresión de Runx2, Dlx5 y Osterix (OSX), en preosteoblastos murinos, transcurridos 7 y 14 días de

tratamiento con ATP 100 nM. Los tres genes exhibieron aumentos de la expresión al séptimo día. La expresión de OSX y Dlx5 disminuyó a tiempos más prolongados, mientras que la de Runx2 resultó inalterada. Fibroblastos pulmonares humanos exhibieron aumentos en la transcripción del gen de colágeno tipo I, luego de tratamiento con ATP (Janssen y col., 2009).

En células de calvaria de ratones knockout para P2X7 la expresión de Runx2 no mostró cambios respecto del control tipo salvaje a los 7, 14 y 28 días de cultivo, mientras que la de OCN se mantuvo por debajo todos los días, excepto al 28. Los genes OSX y BSP solo mostraron reducción en su expresión al séptimo día (Panupinthu y col., 2008).

Biver y col., 2013 demostraron aumentos en la expresión de OSX, FAL y Col1 inducidos por activación de P2Y13, en células madre mesenquimales (MSC) murinas.

Contradiendo los resultados anteriores, Orris y col., 2007, empleando osteoblastos primarios de rata, evaluaron la expresión génica de FAL, COL1, OCN y OPN luego de 4, 7 y 14 días de exposición a agonistas purinérgicos. Encontraron disminuciones en la expresión de FAL, COL1 y OCN, inducidas por ATP y UTP a los 7 y 14 días, sugiriendo un efecto anti-osteogénico para los receptores P2Y2. Estudios posteriores, en el mismo modelo, empleando los agonistas de P2X α , β -meATP, β , γ -meATP y Bz-ATP, no mostraron cambios en los niveles de ARNm de FAL durante 7 y 14 días de tratamiento. También resultó inalterada la expresión de COL1, excepto en la condición Bz-ATP, donde se registró un aumento solo al día 14 (Orris y col., 2012).

Además, Li y col., 2015 mostraron disminución en la expresión génica de Runx2, FAL y OPN en células madre de médula ósea de rata, tratadas durante 7 días con UTP 125 μ M.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis concuerdan con los reportes que muestran efectos anti-osteogénicos por activación de purinoceptores (Orris y col., 2007, 2012). Luego de 4 días, el tratamiento de las células con UTP 100 μ M, y después de 8 días de tratamiento con UTP 10 μ M, el nivel de ARNm de los genes Runx2, Col1, OPG y OPN mostró disminuciones estadísticamente significativas. OPN y Col1 son genes blanco de la acción del factor de transcripción Runx2 (Ducy y col., 1997), así como también OPG (Thirunavukkarasu y col., 2000). Considerando esto, la reducción de la expresión de Runx2, por UTP, concuerda con las disminuciones observadas en la expresión de OPN, Col1 y OPG.

Sin embargo, el aumento en el nivel de ARNm de Col1 observado luego de 8 días de tratamiento con UTP 100 μ M requiere otra fundamentación. Una posible explicación para este resultado podría ser la activación de receptores de distinto subtipo, dado que

una mayor concentración de UTP (100 μ M) permite mayor generación de productos de hidrólisis, entre ellos UDP, agonista de receptores P2Y6. Existe un reporte donde se muestra aumento en la expresión de procolágeno tipo I por activación de P2Y6 por UDP extracelular, en células hepáticas de rata (Dranoff y col., 2004). Además, Orriss y col., 2006, encontraron que luego de 8 días de incubación en medio osteogénico osteoblastos primarios de rata expresaron niveles de ARNm de P2Y6 superiores a los de P2Y2 y P2Y4.

Por otro lado, los aumentos en los niveles de ARNm de BMP4, 5, 6 y 7, BSP y Col1 inducidos por ATPyS 10 μ M, sustentan un rol pro-osteogénico para los receptores P2 evidenciado por otros grupos de investigación (Cutarelli y col., 2016; Rodrigues-ribeiro y col., 2015; Biver y col., 2013) Interesantemente, se ha reportado que la expresión y actividad transcripcional de Runx2 aumentan como consecuencia de la acción de BMP 2,4 y 7 (Ducy y col., 1997; Tsuji y col., 1998; Lee y col., 2000; Banerjee y col 2001; Phimphilai y col., 2006). A su vez, BSP y Col1 son genes blanco del factor de transcripción Runx2 (Ducy y col., 1997; Gersbach y col., 2004). Por otro lado, el tratamiento de células madre mesenquimales humanas con BMP6 provocó incrementos en la expresión, a nivel de ARNm y proteína, de BSP (Zhu F. y col., 2012). A su vez, Yung y col., 2015, demostraron aumentos en la expresión génica de Runx2 y OPN, en células endoteliales bovinas tratadas con BMP6. Más aun, BMP5, en combinación con BMP2 y 6, estimuló la expresión de Runx2, Osx y Col1, en cultivo primario de osteoblastos (Wutzl y col., 2010).

Esto último, permite sugerir que los aumentos de expresión de BMP4, 5, 6 y 7 podrían incrementar el nivel de ARNm de Col1 y BSP, al inducir la expresión de Runx2.

Un aspecto más a tener en cuenta a la hora de analizar las discrepancias con los resultados obtenidos por otros grupos que trabajaron con osteoblastos primarios de calvaria de rata, es la frecuencia de las renovaciones del medio de cultivo. En el caso de Orris y col., 2006, 2007, 2014, se renueva la mitad del medio, cada 3 días. Esto podría cobrar relevancia dado que los nucleótidos son susceptibles de degradación, y sus productos de hidrólisis pueden activar diversos receptores, incluyendo purinoceptores P1. Sumado a esto, se ha reportado que la activación de receptores P2X aumenta la actividad de ecto-nucleotidasas (Orris y col., 2012), lo que promueve la hidrólisis de los agonistas purinérgicos y la generación de productos derivados.

Barradas y col., 2012, observaron aumentos de la expresión de OPN, BSP y OCN luego de incubar células mesenquimales de medula ósea humana en medio conteniendo calcio 7,8 mM. La expresión de FAL solo se situó arriba del control a las 6 horas, para luego descender, mientras que la de Runx2 no mostró cambios. En concordancia con

este trabajo, en la presente Tesis, no se observaron cambios en la expresión de Runx2 y OSX luego de tres días de incubación de las células en presencia de elevada concentración de Ca^{2+} extracelular. En cambio, Koori y col., 2014, utilizando células madre humanas de ligamento periodontal (PDLSCs), demostraron que un medio conteniendo calcio 5 mM indujo aumentos significativos en la expresión de Runx2, BMP2, OPN y OCN, luego de 7 días de tratamiento.

Como se mencionara antes, se ha informado de aumentos en la expresión y actividad transcripcional de Runx2 por acción de BMP 2,4 y 7 (Tsuji y col., 1998; Lee y col., 2000; Banerjee y col., 2001; Phimphilai y col., 2006). Uno de los genes blanco de la acción de Runx2 es OPN (Ducy y col., 1997). Además, tejidos y células de embriones de roedor con el gen Runx2 silenciado exhibieron niveles muy bajos de expresión y actividad Fosfatasa Alcalina (Kobayashi y col., 2000; Komori y col., 1997). Estos datos sustentan el rápido aumento en el nivel de ARNm de BMP4, y en la actividad FAL, inducidos por acción del Ca^{2+} extracelular elevado que se demuestra en esta Tesis.

Galli y col., 2012, encontraron aumentos en la expresión de FAL y OPG inducidos por tratamiento con LiCl 1 mM en la línea celular C2C12. Además, LiCl 1 mM indujo aumentos en el nivel de ARNm de OCN y OPG en preosteoblastos murinos MC3T3, a las 96 horas de tratamiento. Finalmente, células de cultivo primario de médula ósea de ratón mostraron incrementos en la expresión génica de FAL y OCN, luego de diez días de incubación en medio con LiCl 0,1 mM, mientras que se mantuvo inalterada la expresión de Runx2, Colágeno $1\alpha 1$ y OPG. Otro grupo informó aumentos en los niveles de ARNm de FAL y OCN, luego de 14 días de tratamiento con LiCl 5 y 10 mM, empleando células madre de papila dental, no observándose efecto con LiCl 1 mM (Wang y col., 2012). Células MC3T3, tratadas durante 24 horas con LiCl 25 mM, exhibieron aumentos en la expresión génica de Runx2 y OPG (Lopez-Herradón y col., 2013). El tratamiento durante 6 días con LiCl 10 y 25 mM, indujo aumentos en el nivel de mensajero de FAL, en la línea celular de MSC murinas C3H10T1/2. Un efecto similar se observó luego de la transfección celular con una forma resistente a degradación de β -catenina. Y además, no registraron cambios en la expresión de OCN (Bain y col., 2003). LiCl 5 mM provocó aumentos en la expresión de Runx2 y OCN, en MSCs de médula ósea derivadas de ratas con osteonecrosis inducida por drogas (Z Yu y col., 2015).

Los efectos inducidos por tratamiento con Litio podrían ser atribuidos a la inhibición de la enzima GSK3. En este sentido, células de calvaria, de ratones deficientes en GSK3 β , exhibieron aumento en la expresión génica de OCN, OPN, Col1 y FAL. En concordancia con esto, cultivos celulares con expresión aumentada de GSK3 β o que expresan una

forma constitutivamente activa de la quinasa mostraron disminuciones en el nivel de ARNm de OCN. En ambos casos, los efectos fueron contrarrestados por la incubación con inhibidores de GSK3 β , como LiCl 16 mM o SB216763 10 μ M (Kugimiya y col., 2007). Estos resultados fueron confirmados por Kumar y col., 2015, en células HEK293T. BIO (inhibidor dual de GSK3 α/β) promovió la expresión génica de Osterix, Runx2, Col1 y FAL y disminuyó la de OCN y OPN en células MC3T3 (Watanabe y col., 2012). Efectos similares fueron observados por Li y col., 2011, en osteoblastos primarios de ratón tratados con BIO durante 48 horas.

Experiencias *in vivo* también avalan un rol pro-osteogénico para el Litio. Ratas alimentadas con una solución de LiCl mostraron aumentos en el nivel de ARNm de Runx2, OSX, BSP y OCN (Tang y col., 2013).

Contradiendo las evidencias previas, Yoshida y col., 2012, informaron disminuciones en los niveles de ARNm de distintos marcadores de diferenciación osteoblástica (Runx2, OSX, BSP y Col1), en preosteoblastos murinos expuestos a LiCl 50 mM, durante 7 días. No se observaron cambios en la expresión génica de OCN, en MSCs humanas tratadas con LiCl 200 μ M (Briolay y col., 2012).

La disminución en la expresión génica de Runx2, OCN, OPN, OPG y Col1 provocada por LiCl 10 μ M reportada aquí no coincide con la mayoría de los resultados recopilados. Sin embargo, no puede soslayarse el hecho de que la concentración de LiCl empleada en esos estudios es superior, siendo la más cercana a la propia 10 veces mayor (0,1 mM). Además, las concentraciones de LiCl (4-10 mM) que provocaron incrementos en actividad FAL no fueron estudiadas a nivel de expresión génica, en esta Tesis. Sustentando lo demostrado en esta Tesis, ha sido reportado que la actividad FAL no es regulada por Runx2 (Ding y col., 2009).

De los pocos estudios que concuerdan con los resultados propios, Yoshida y col., 2012, emplearon un modelo celular distinto y concentraciones mucho más elevadas (5000 veces), que resultarían inviables en el cultivo primario de calvaria de rata. En discrepancia con los datos presentados en esta Tesis, los reportes de Watanabe y col., 2012, y Li y col., 2011, si bien se llevaron a cabo en modelos celulares muy similares al propio, muestran que un inhibidor específico de GSK3 α y β aumenta la expresión génica de Runx2, Osx y Col1. Sin embargo, con el mismo tratamiento, observaron disminución en la expresión de OCN y OPN. Resultado similar al obtenido en la tesis, luego de incubar los cultivos en presencia de LiCl.

Aun así, los resultados obtenidos aquí concuerdan con el hecho de que OCN, OPG, OPN y Col1 son genes blanco de la acción del factor de transcripción Runx2 (Ducy y col., 1997; Gersbach y col., 2004; Thirunavukkarasu y col., 2000). Por otro lado, se correlacionan con la disminución inducida por el LiCl en la mineralización de los cultivos, sugiriendo ejercer efectos anti-osteogénicos.

Otro aspecto a tener en cuenta en el análisis de la expresión génica de un cultivo primario de calvaria de rata, es lo reportado por Liu y col., 1994. Mediante PCR, estos investigadores determinaron que células sembradas en la misma placa, e incluso las pertenecientes a una misma colonia, mostraban diferencias en la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica, como FAL, Col I, OPN, BSP y OCN. Este hecho agrega complejidad a la interpretación de los resultados obtenidos por PCR, explicando, al menos en parte, ciertos datos que no articulan adecuadamente.

El mejor parámetro para identificar a una célula como osteoblasto es determinar su capacidad de mineralización (Bellows y col., 1986) Para esto, en un principio se empleaban diversas técnicas *in vivo*, como por ejemplo injertos de capas celulares en membranas corioalantoicas (Nijweide y col., 1982), inoculación intramuscular de células aisladas (Groot y col., 1983) o células en cámaras de difusión luego implantadas intraperitonealmente (Moskalewski y col., 1983). Sin embargo, los enfoques *in vivo* no permiten un estudio controlado de las variables que afectan al proceso de formación ósea. Entre estas, se puede mencionar el pH del medio, el cual inhibe el proceso de mineralización a valores ácidos (Brandao-Burch y col., 2005).

Hace 30-40 años, se reportaron los primeros casos de depósitos de mineralización asociados a células óseas *in vitro*, para cultivos de calvaria de rata fetal (Binderman y col., 1974) y adulta (Williams y col., 1980) y células de endostio de conejos fetales (Anderson y col., 1984). Sin embargo, no resultaron reproducibles o histológicamente correctos. Esto se solucionaría con el agregado de fosfato orgánico al medio de cultivo (Tenenbaum, 1981; Tenenbaum y Heersche, 1982). Luego, Ecarot-Charrier B y col., 1983, obtendrían estructuras similares a hueso *in vitro*, con la adición de fosfato orgánico y ácido ascórbico. Experiencia repetida por Whitson y col., 1984, en cultivo de calvaria bovina, y por Bellows y col., 1986, con calvaria de rata fetal, obtenidas por métodos enzimáticos. Posteriormente, se demostraría que el β -glicerofosfato promueve la mineralización actuando como un dador de fosfato inorgánico para la formación de los cristales de hidroxiapatita (Bellows y col., 1991).

En esta tesis se utilizaron el medio osteogénico y las condiciones experimentales que describen Bellows y col., 1986.

Sun y col., 2013, mostraron que ATP (0,1-100 μM) estimuló la formación de nódulos óseos, en células madre mesenquimales humanas, a los 30 días de tratamiento. Este efecto fue mediado por activación de P2X7. Otro grupo que reportó resultados similares fue el de Nakano y col., 2007, quienes demostraron que el ATP puede actuar como donante de fosfato inorgánico, ya que una concentración 5 mM del nucleótido indujo la mineralización en preosteoblastos murinos en niveles similares a β -glicerofosfato 10 mM. En el mismo sentido, Panupinthu y col., 2008, informaron incrementos en la mineralización, de osteoblastos primarios de rata, inducidos por BzATP 100 μM , a partir de la segunda semana de tratamiento. Este efecto no pudo ser replicado por UTP 100 μM .

Efectos anti-osteogénicos fueron reportados por Jones y col., 1997, donde ATP, y dos análogos no hidrolizables, ATP γ S y MeSATP, inhibieron la formación ósea en osteoblastos primarios de rata. Sin embargo, observaron efectos positivos por tratamiento con UTP 2 μM . Asimismo, Hoebertz y col., 2002, también mostraron efectos negativos inducidos por ATP y UTP en la mineralización, y a concentraciones tan bajas como 1 μM e involucrando a receptores P2Y2. Orris y col., 2006 y 2007, obtuvieron resultados similares a Hoebertz y col., 2002, y encontraron además que UDP no provoca cambios. Orris y col., 2012, mostraron que análogos no hidrolizables de ATP (α , β -meATP, β , γ -meATP, Bz-ATP), en concentraciones ≥ 1 μM , de manera dosis-dependiente, inhibieron la mineralización en cultivo primario de osteoblastos primarios de rata, e involucraron en el efecto a los receptores P2X1 y P2X7. Posteriormente, el resultado se repetiría con ATP (1-100 μM) (Orris y col., 2014).

La mayor parte de la evidencia obtenida en cultivos primarios de calvaria de rata reportan efectos inhibidores de los nucleótidos extracelulares (Jones y col., 1997; Hoebertz y col., 2002; Orris y col., 2006, 2007, 2012, 2014), mientras que en la presente Tesis los efectos de ATP γ S resultaron estimulatorios. Entre las diferencias con esos trabajos y el propio, podemos citar la formulación del medio (D-MEM vs α -MEM), la cepa de los animales empleados y el protocolo de tinción. Son numerosas las variaciones en las condiciones de cultivo que pueden afectar el crecimiento y la diferenciación de osteoblastos.

Células cultivadas en α -MEM, mostraron un incremento de 2-3 veces en la formación de nódulos mineralizados que aquellas cultivadas en D-MEM (Orris y col., 2014). Sumado a esto, el medio osteogénico reportado por ellos, además de contener Ácido Ascórbico y β -glicerofosfato, contiene Dexametasona. Un informe le atribuyó al corticoide efectos anti-osteogénicos y pro-adipogénicos (J Li y col., 2013), y Tobimatsu

y col., 2006, mostraron apoptosis en la línea celular de preosteoblastos murinos MC3T3 inducida por Dexametasona, sin embargo la concentración empleada en ambos artículos es diez veces mayor que la utilizada por Orris y col., 2007 (10 nM).

Respecto del protocolo de tinción, las diferencias son numerosas (Experiencias ajenas vs experiencia propia): 1-Reactivo para el lavado de exceso de colorante: Etanol 50-70 % vs H₂O destilada; 2-Concentración de RA = 1 % vs 2 %; 3-Tiempo de tinción = 5 minutos vs 30 minutos; 4-pH de la solución de RA = 4,5-6,9 vs 4,1-4,3; 5-Modo de análisis = empleo de software de análisis de imágenes vs cuantificación espectrofométrica de deposiciones de mineral disueltas en NaOH. Sobre este último punto, se debe resaltar que el software se utiliza para determinar el número y área de superficie de los nódulos mineralizados, mientras que el NaOH actúa disolviéndolos. La opinión propia es que la disolución de las calcificaciones es un mejor método para determinar la capacidad mineralizante del cultivo, dado que el empleo del software no tiene en cuenta el grosor de la formación cálcica, lo que, junto con su superficie, determina el volumen de la misma. Por lo tanto, como la densidad de mineral en cada formación no es la misma, el contenido exacto no puede ser determinado.

Sumado a esto, los resultados son reportados por autores que pertenecen al mismo grupo de investigación, lo que podría llevar a sesgos en la obtención y procesamiento de los datos (Jones y col., 1997; Hoebertz y col., 2002; Orris y col., 2006, 2007, 2012, 2014). Como se mencionara anteriormente, en estos trabajos la frecuencia de las renovaciones del medio de cultivo son diferentes a las empleadas en esta Tesis. Orris y col., 2006, 2007, 2014, renuevan solo la mitad del medio, cada 3 días. Dado que los nucleótidos son susceptibles de degradación, y sus productos de hidrólisis pueden activar diversos receptores, incluyendo purinoceptores P1, esto puede explicar las diferencias observadas. Además, Orris y col., 2012, mostraron que la activación de receptores P2X aumenta la actividad de ecto-nucleotidasas, lo que aumentaría la concentración de productos derivados de hidrólisis.

Por otro lado, los trabajos que reportan efectos pro-mineralizantes de ATP (Ayala y col., 2013; Sun y col., 2013; Nakano y col., 2007; Cutarelli y col., 2016; Ciciarello y col., 2013; Panupinthu y col., 2008) fueron realizados por distintos grupos de investigación, sobre diferentes tipos celulares de diversas especies, en entornos osteogénicos muy variables (concentración y tipo de reactivos inductores de osteogénesis). Sin embargo, deben hacerse algunas salvedades. Entre éstas, está reportado que las células SaOS-2 exhiben alta capacidad mineralizante a partir del pasaje 50. Cutarelli y col., 2012, emplearon este modelo *in vitro* y reportaron aumentos en la mineralización. También cabe aclarar que en el artículo, no se indica el número de pasaje de las células.

En esta Tesis, se demuestra que una concentración de calcio extracelular elevada aumenta la mineralización de los cultivos primarios de calvaria de rata neonata. En concordancia, Dvorak y col., 2004 reportaron aumentos, dosis-dependiente, en la capacidad mineralizante de osteoblastos primarios de calvaria de rata fetal, luego de 21 días de tratamiento con CaCl_2 1,8 - 2,5 mM. Koori y col., 2014, observaron un fuerte aumento en la mineralización de los cultivos (células madre humanas de ligamento periodontal) incubados en presencia de CaCl_2 5 mM. Yamauchi y col., 2004, empleando preosteoblastos murinos MC3T3-E1, observaron aumentos en la capacidad mineralizante del cultivo, luego de 10 días de tratamiento en medio osteogénico conteniendo Calcio elevado (2,8 y 3,8 mM).

También se reportaron aumentos en la deposición de Calcio en cultivos de células musculares vasculares humanas (Yang y col., 2004) y células condrogénicas C5.18 (Chang y col., 2002), en presencia de elevadas concentraciones de Ca^{2+} .

Además, los datos aportados en esta Tesis sugieren que la alta concentración de calcio extracelular en conjunto con la estimulación purinérgica por ATP γ -S favorece la mineralización del cultivo de osteoblastos *in vitro*.

Arioka y col., 2014, empleando la línea celular de células mesenquimales murinas C3H10T1/2 observaron aumentos en la formación de nódulos calcificados luego del tratamiento con LiCl (10 y 20 mM), durante 21 días, sugiriendo que la inhibición de GSK3 favorece la mineralización ósea. También Wang y col., 2012, demostraron un efecto deletéreo de la quinasa en el proceso de formación ósea. Durante 21 días, trataron células madre de papila dental con LiCl 1, 5 y 10 mM. Observaron un aumento dosis-dependiente en la mineralización de los cultivos.

Sustentando estas evidencias, Bennett y col., 2005 trataron células ST2 (línea celular de estroma de medula ósea) con un inhibidor específico de GSK3 (CHIR99021) y reportaron incrementos en la capacidad mineralizante. Sumado a esto, Kugimiya y col., 2007, mostraron que células de calvaria, de ratones deficientes en GSK3 β , exhibieron aumentos en la mineralización, mientras que cultivos celulares con expresión aumentada de GSK3 β o que expresan una forma constitutivamente activa de la quinasa mostraron disminución en la cantidad de deposiciones de Calcio. Resultados similares reportaron Thouverey y Caverzasio, 2015, que mostraron aumentada mineralización de una línea celular mesenquimal murina (C3H10T1/2) tratada con un inhibidor específico de GSK3 (SB216763 10 μM), luego de 10 días de incubación.

Al contrario, Yoshida y col., 2012, trabajando con la línea celular MC3T3, encontraron que el agregado de LiCl provocó una inhibición dosis-dependiente de la mineralización, luego de 25 días de tratamiento. Apoyando estos resultados, van der Horst y col., 2005,

informaron disminuciones en la deposición de Calcio luego del tratamiento con LiCl 10 mM durante 7 y 14 días, para la línea celular de preosteoblastos murinos KS483, y 7, 10 y 17 días, en cultivo primario de células de médula ósea de ratón. En el mismo sentido, preosteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a Litio vieron reducida su capacidad mineralizadora (Li y col., 2011).

Los resultados anti-osteogénicos encontrados para Litio son difíciles de explicar. Si bien concuerdan con algunas evidencias reportadas (Yoshida y col., 2012; van der Horst y col., 2005; Li y col., 2011), la mayoría de los trabajos recopilados le atribuyen un rol positivo a la inhibición de GSK3 sobre la mineralización ósea (Thouverey y Caverzasio, 2015; Arioka y col., 2014; Wang y col., 2012; Gregory y col., 2005; Tang y col., 2013; Bennett y col., 2005; Kugimiya y col., 2007). Aun así, vale la pena remarcar que entre los estudios citados, los resultados concordantes con los propios emplean los modelos celulares más parecidos al utilizado en esta Tesis. Además, en estos últimos las células son tratadas, efectivamente, con Litio y, en la mayoría de los estudios donde se le atribuye un rol anti-osteogénico a GSK3, se emplearon inhibidores específicos de la quinasa.

El hallazgo de que Litio 10 mM reduce la actividad enzimática de FAL, luego de 10 días de tratamiento, concuerda con la idea de una reducción en la capacidad mineralizante, para la cual se cree que la FAL cumple un rol fundamental, como lo muestran investigaciones *in vitro* e *in vivo* (Orimo, 2010). Sin embargo, un reporte indica que β -catenina induce la expresión de Pit1, un cotransportador de sodio-fosfato tipo III (Yao y col., 2015), el cual se localiza en las vesículas de matriz, fundamentales para el proceso de mineralización (Orimo, 2010)

Vale la pena mencionar, además, que ninguno de los artículos recopilados emplea cultivo primario de calvaria de rata, como modelo de sus investigaciones. Sumado a esto, se encontraron muchas diferencias respecto de las condiciones experimentales (formulación de medio de base, composición de medio osteogénico, concentración de Litio, uso de otros inhibidores de GSK3, protocolos de tinción), que podrían fomentar el surgimiento de discrepancias.

Finalmente, si bien existe correlación en los resultados obtenidos, algunos de estos no concuerdan con lo reportado en la bibliografía. Al respecto, vale la pena aclarar que Yu y Ferrier, 1993, encontraron que osteoblastos de un mismo cultivo expresaron no solo distintos subtipos de receptores P2Y, sino que lo hicieron en proporciones variables. Sumado a esto, el nivel de expresión de ARNm de FAL, OPN y OCN, en calvaria de rata varía de acuerdo a la región en que estén ubicadas las células en el tejido (Weinreb y

col., 1990). Por último, y agregando más complejidad al tema, las distintas colonias de una misma placa presentan heterogeneidad respecto de los tipos celulares que las componen, siendo algunas representativas de células formadoras de hueso, mientras que otras podrían pertenecer a linajes fibroblásticos u osteoprogenitores (Bellows y Aubin, 1989; Aubin y col., 1990), y, sumado a esto, las células dentro de una misma colonia expresan distintos niveles de marcadores de diferenciación osteoblástica (Liu y col., 1994). Otra cuestión que hace complejo el análisis y la reproducibilidad de los resultados es que el fenotipo celular se ve afectado por el sexo y edad de los animales empleados (Czekanska y col., 2012). Más aun, en el caso de cultivos de calvaria de ratón, se han registrado diferencias en la respuesta osteogénica de células derivadas de diferentes camadas, e incluso entre animales pertenecientes a la misma camada (Garrett 2003).

Conclusiones

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en la presente tesis doctoral se enumeran a continuación

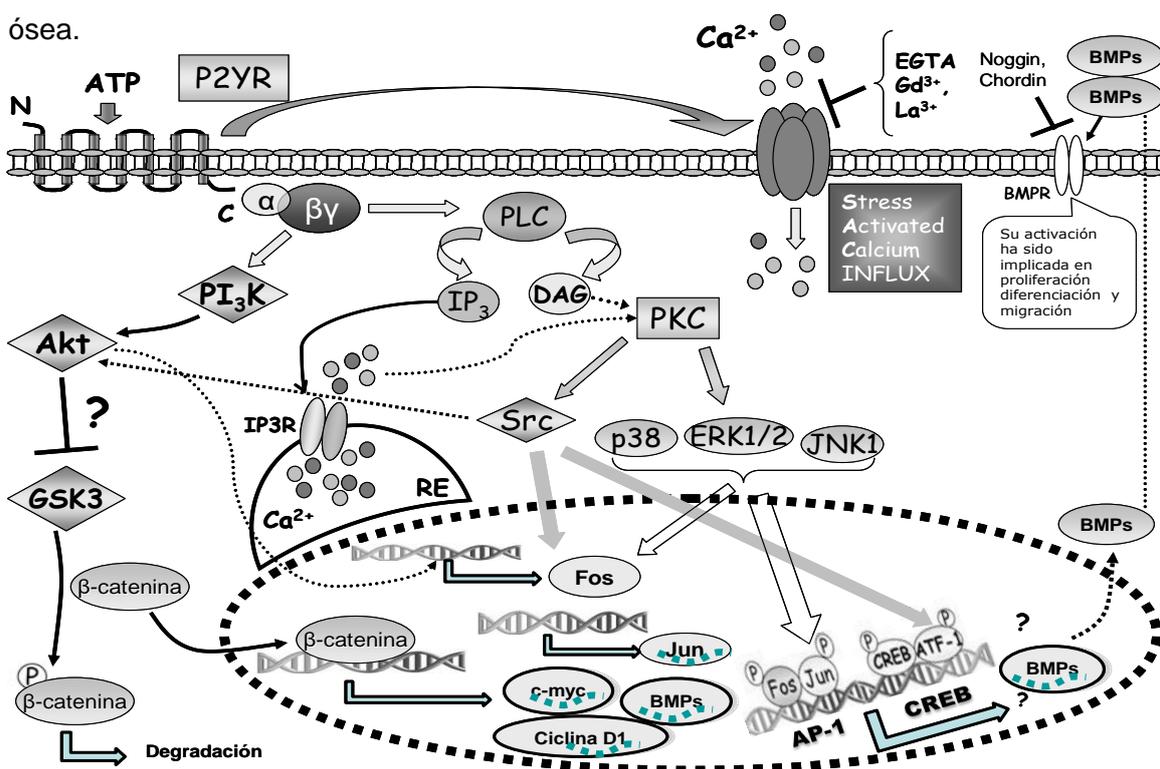
En cultivos primarios de células calvariales de rata neonata:

- ✚ La activación de receptores purinérgicos, responsivos a ATP γ -S (P2Y2, P2X2 y P2X5), estimula la migración celular. Mostrando un estímulo de menor magnitud los receptores sensibles a ADP β -S (P2Y1, P2Y12,13)
- ✚ La estimulación de receptores purinérgicos por ATP γ -S estimula el progreso de la fase G₀ a S del ciclo celular involucrando a PI3K.
- ✚ La estimulación purinérgica por ATP γ -S en un medio conteniendo Calcio elevado (5,35 mM), estimula la proliferación celular.
- ✚ En condiciones osteogénicas la estimulación purinérgica por ATP γ -S inhibe la proliferación celular. Efecto comparativamente similar al que produce una concentración elevada de calcio extracelular en medio osteogénico. Sin embargo, el tratamiento combinado con ambos agonistas no muestra cambios respecto de su acción individual.
- ✚ En condiciones osteogénicas la estimulación purinérgica por ATP γ -S aumenta la actividad FAL, la expresión de algunas proteínas inductoras óseas y la mineralización del cultivo, sugiriendo favorecer la diferenciación osteoblástica. Por otro lado, la activación de receptores purinérgicos por UTP no provocó cambios en la actividad enzimática de FAL e indujo disminución de la expresión génica de marcadores de diferenciación osteoblástica.
- ✚ La concentración elevada de Calcio extracelular indujo aumentos en la actividad FAL y en la mineralización de los cultivos primarios de calvaria. Sin embargo, no indujo aumentos en la expresión génica de marcadores de compromiso osteoblástico.
- ✚ El efecto de ATP γ -S sobre la diferenciación osteoblástica mostró estar incrementado en algunos parámetros por la concentración elevada de calcio extracelular. Las diferencias observadas con los nucleótidos UTP y UDP

(agonista de P2Y2 y de P2Y4, el primero, y agonista de P2Y6, el segundo), podrían explicarse por la participación de receptores P2Y4 y P2Y6 en esa respuesta.

- La estimulación purinérgica por ATP γ -S aumenta la expresión y translocación nuclear de β -catenina. Esta respuesta fue comparativamente similar al efecto ejercido por la concentración de calcio extracelular elevada y por el inhibidor de GSK3 LiCl, sugiriendo que la inhibición de GSK3 estaría involucrada en la respuesta de las células al ATP γ -S y al aumento de calcio extracelular.
- El inhibidor de GSK3 LiCl (en altas concentraciones, 4-10 mM) mostró estimular la diferenciación osteoblástica en etapas tempranas (aumentos en actividad enzimática FAL), mientras que provocó inhibición en fases tardías (disminución en la mineralización). Por otro lado, concentraciones bajas de Litio ejercieron efectos inhibitorios, en fases tempranas del desarrollo osteoblástico, a nivel de la expresión de genes osteogénicos.

Los datos presentados en esta tesis son un aporte al conocimiento fundamental del mecanismo de señalización de receptores purinérgicos. Como se muestra en el esquema receptores purinérgicos principalmente responsivos a ATP γ -S estimulan la proliferación y diferenciación osteoblástica involucrando a PI3K y la vía GSK3/ β -catenina como posible modulador de la transcripción de genes osteogénicos. Estos conocimientos son de potencial aplicación en el diseño de nuevas terapias farmacológicas moduladoras de la formación de hueso para su empleo en fisiología ósea.



Trabajos generados durante esta tesis

TRABAJOS GENERADOS DURANTE ESTA TESIS

Publicaciones científicas

- D'Elía NL, Gravina N, Ruso JM, Laiuppa JA, Santillán GE, Messina PV. Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic. *Biochimica et Biophysica Acta*. ISSN: 0304-4165, 1830:5014-5026 (2013).
- Gravina AN, Ruso JM, Laiuppa JA, Santillán GE, Marco-Brown JL, D'Elia NL, Messina PV. Striped, bioactive Ce-TiO₂ material with peroxynitrite-scavenging activity. *Journal of Materials Chemistry B*. ISSN: 2050-750X, 2:834-845 (2014).
- D'Elía NL, Mathieu C, Hoemann CD, Laiuppa JA, Santillán GE, Messina PV. Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures. *Nanoscale*. Seven (44):18751-62 (2015).
- Laiuppa JA, Santillán GE. Effect of Combined Action of Extracellular ATP and Elevated Calcium on Osteogenic Differentiation of Primary Cultures from Rat Calvaria. *J Cell Biochem*. 2016 Apr 2. doi: 10.1002/jcb.25565.

Presentaciones a congresos

- Victoria B. Ayala P., Juan A Laiuppa, Graciela E. Santillán. "Receptores P2 modulan la migración y diferenciación celular en cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata neonata". XXIX Reunión anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Buenos Aires, Argentina. 23-25 de agosto de 2012. (Co-Autor)
- Juan A. Laiuppa, Victoria B. Ayala P., Graciela E. Santillán. "Regulación de la migración de osteoblastos de rata por nucleótidos extracelulares". LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) en forma conjunta con la Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. 14-17 de noviembre de 2012. (Co-Autor/Expositor)

- D'Elía NL, Gravina AN, Laiuppa JA, Santillán GE, Messina PV. Nano-hidroxiapatita para su aplicación en reparación de tejido óseo. XXX Reunión anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Buenos Aires, Argentina. 29-31 de agosto de 2013. (Co-Autor)
- Cepeda SB, Nielsen BE, Laiuppa JA, Sandoval MJ, Massheimer VL. Impacto del fitoestrógeno Genisteína sobre células de linaje osteogénico. XXXI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Buenos Aires, Argentina. 21-23 de Agosto de 2014. (Co-Autor)
- Laiuppa JA, Santillán GE. Efectos de nucleótidos extracelulares en la proliferación, diferenciación y migración de osteoblastos. LIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) en forma conjunta con la LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. 19-22 de noviembre de 2014. (Co-Autor/Expositor)
- Laiuppa JA, Santillán GE. Modulación de la proliferación y diferenciación de osteoblastos por ATP extracelular. XXXII Reunión anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM). Sierra de la Ventana, Buenos Aires, Argentina. 29-31 de octubre de 2015. (Co-Autor/Expositor)

Referencias

REFERENCIAS

1. Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A., 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281-341.
2. Agboh, K.C., Webb, T.E., Evans, R.J., Ennion, S.J., 2004. Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 279, 41650-41657.
3. Agrawal, A., Buckley, K.A., Bowers, K., Furber, M., Gallagher, J.A., Gartland, A., 2010. The effects of P2X7 receptor antagonists on the formation and function of human osteoclasts in vitro. *Purinergic. Signal.* 6, 307-315.
4. Ahmad, S., Storey, R.F., 2012. Development and clinical use of prasugrel and ticagrelor. *Curr. Pharm. Des* 18, 5240-5260.
5. Aicher, B., Lerch, M.M., Muller, T., Schilling, J., Ullrich, A., 1997. Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTPsigma by inducible proteolytic processing. *J. Cell Biol.* 138, 681-696.
6. Aktary, Z., Bertrand, J.U., Larue, L., 2016. The WNT-less wonder: WNT-independent beta-catenin signaling. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29, 524-540.
7. Al-Shukaili, A., Al-Kaabi, J., Hassan, B., 2008. A comparative study of interleukin-1beta production and p2x7 expression after ATP stimulation by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis patients and normal healthy controls. *Inflammation* 31, 84-90.
8. Albizu, L., Moreno, J.L., Gonzalez-Maeso, J., Sealfon, S.C., 2010. Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics. *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets.* 9, 636-650.
9. Algaier, I., Jakubowski, J.A., Asai, F., von, K., I, 2008. Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y12 receptor. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1908-1914.
10. Alkayed, F., Kashimata, M., Koyama, N., Hayashi, T., Tamura, Y., Azuma, Y., 2012. P2Y11 purinoceptor mediates the ATP-enhanced chemotactic response of rat neutrophils. *J. Pharmacol. Sci.* 120, 288-295.
11. Alvarenga, E.C., Rodrigues, R., Caricati-Neto, A., Silva-Filho, F.C., Paredes-Gamero, E.J., Ferreira, A.T., 2010. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: role of the P2Y1 receptor. *Bone* 46, 355-362.
12. Alzola, E., Perez-Etxebarria, A., Kabre, E., Fogarty, D.J., Metioui, M., Chaib, N., Macarulla, J.M., Matute, C., Dehaye, J.P., Marino, A., 1998. Activation by P2X7 agonists of two phospholipases A2 (PLA2) in ductal cells of rat submandibular gland. Coupling of the calcium-independent PLA2 with kallikrein secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 30208-30217.

13. Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., Alkalay, I., 2002. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16, 1066-1076.
14. Amoroso, F., Capece, M., Rotondo, A., Cangelosi, D., Ferracin, M., Franceschini, A., Raffaghello, L., Pistoia, V., Varesio, L., Adinolfi, E., 2015. The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3beta/VEGF signaling network: evidence in experimental neuroblastoma. *Oncogene* 34, 5240-5251.
15. Anderson, R.E., Kemp, J.W., Jee, W.S., Woodbury, D.M., 1984. Ion-transporting ATPases and matrix mineralization in cultured osteoblastlike cells. *In Vitro* 20, 837-846.
16. Andre, P., Delaney, S.M., LaRocca, T., Vincent, D., DeGuzman, F., Jurek, M., Koller, B., Phillips, D.R., Conley, P.B., 2003. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J. Clin. Invest* 112, 398-406.
17. Arboleya, L., Castaneda, S., 2013. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol. Clin.* 9, 303-315.
18. Arioka, M., Takahashi-Yanaga, F., Sasaki, M., Yoshihara, T., Morimoto, S., Hirata, M., Mori, Y., Sasaguri, T., 2014. Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 90, 397-405.
19. Armstrong, V.J., Muzylak, M., Sunters, A., Zaman, G., Saxon, L.K., Price, J.S., Lanyon, L.E., 2007. Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 282, 20715-20727.
20. Aro, H.T., Govender, S., Patel, A.D., Hernigou, P., Perera de, G.A., Popescu, G.I., Golden, J.D., Christensen, J., Valentin, A., 2011. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *J. Bone Joint Surg. Am.* 93, 801-808.
21. Arvidson, K., Abdallah, B.M., Applegate, L.A., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., Granchi, D., Kassem, M., Konttinen, Y.T., Mustafa, K., Pioletti, D.P., Sillat, T., Finne-Wistrand, A., 2011. Bone regeneration and stem cells. *J. Cell Mol. Med.* 15, 718-746.
22. Asafo-Adjei, T.A., Chen, A.J., Najarzadeh, A., Puleo, D.A., 2016. Advances in Controlled Drug Delivery for Treatment of Osteoporosis. *Curr. Osteoporos. Rep.* 14, 226-238.
23. Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J., Schmalzing, G., 2004. Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J. Mol. Biol.* 342, 333-343.
24. Aubin, J.E., 2001. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2, 81-94.
25. Aubin, J.E., Liu, F., Malaval, L., Gupta, A.K., 1995. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17, 77S-83S.

26. Ayala-Pena, V.B., Scolaro, L.A., Santillan, G.E., 2013. ATP and UTP stimulate bone morphogenetic protein-2,-4 and -5 gene expression and mineralization by rat primary osteoblasts involving PI3K/AKT pathway. *Exp. Cell Res.* 319, 2028-2036.
27. Azroyan, A., Cortez-Retamozo, V., Bouley, R., Liberman, R., Ruan, Y.C., Kiselev, E., Jacobson, K.A., Pittet, M.J., Brown, D., Breton, S., 2015. Renal intercalated cells sense and mediate inflammation via the P2Y14 receptor. *PLoS. One.* 10, e0121419.
28. Bain, G., Muller, T., Wang, X., Papkoff, J., 2003. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 84-91.
29. Balasubramanian, R., Robaye, B., Boeynaems, J.M., Jacobson, K.A., 2014. Enhancement of glucose uptake in mouse skeletal muscle cells and adipocytes by P2Y6 receptor agonists. *PLoS. One.* 9, e116203.
30. Balu, D.T., Hodes, G.E., Hill, T.E., Ho, N., Rahman, Z., Bender, C.N., Ring, R.H., Dwyer, J.M., Rosenzweig-Lipson, S., Hughes, Z.A., Schechter, L.E., Lucki, I., 2009. Flow cytometric analysis of BrdU incorporation as a high-throughput method for measuring adult neurogenesis in the mouse. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 59, 100-107.
31. Banerjee, C., Javed, A., Choi, J.Y., Green, J., Rosen, V., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., Stein, G.S., 2001. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 142, 4026-4039.
32. Baron, R., Kneissel, M., 2013. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* 19, 179-192.
33. Barradas, A.M., Fernandes, H.A., Groen, N., Chai, Y.C., Schrooten, J., van de Peppel, J., van Leeuwen, J.P., van Blitterswijk, C.A., de, B.J., 2012. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* 33, 3205-3215.
34. Barragan-Iglesias, P., Mendoza-Garces, L., Pineda-Farias, J.B., Solano-Olivares, V., Rodriguez-Silverio, J., Flores-Murrieta, F.J., Granados-Soto, V., Rocha-Gonzalez, H.I., 2015. Participation of peripheral P2Y1, P2Y6 and P2Y11 receptors in formalin-induced inflammatory pain in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 128, 23-32.
35. Barragan-Iglesias, P., Pineda-Farias, J.B., Cervantes-Duran, C., Bravo-Hernandez, M., Rocha-Gonzalez, H.I., Murbartian, J., Granados-Soto, V., 2014. Role of spinal P2Y6 and P2Y11 receptors in neuropathic pain in rats: possible involvement of glial cells. *Mol. Pain* 10, 29.
36. Barrera, N.P., Henderson, R.M., Murrell-Lagnado, R.D., Edwardson, J.M., 2007. The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophys. J.* 93, 505-512.
37. Barrera, N.P., Ormond, S.J., Henderson, R.M., Murrell-Lagnado, R.D., Edwardson, J.M., 2005. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J. Biol. Chem.* 280, 10759-10765.

38. Barrett, M.O., Sesma, J.I., Ball, C.B., Jayasekara, P.S., Jacobson, K.A., Lazarowski, E.R., Harden, T.K., 2013. A selective high-affinity antagonist of the P2Y₁₄ receptor inhibits UDP-glucose-stimulated chemotaxis of human neutrophils. *Mol. Pharmacol.* 84, 41-49.
39. Bartlett, R., Stokes, L., Sluyter, R., 2014. The P2X₇ receptor channel: recent developments and the use of P2X₇ antagonists in models of disease. *Pharmacol. Rev.* 66, 638-675.
40. Bellows, C.G., Aubin, J.E., 1989. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.* 133, 8-13.
41. Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N., 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* 14, 27-40.
42. Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N., Antosz, M.E., 1986. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.* 38, 143-154.
43. Bellows, C.G., Reimers, S.M., Heersche, J.N., 1999. Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D₃. *Cell Tissue Res.* 297, 249-259.
44. Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D., MacDougald, O.A., 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 3324-3329.
45. Berridge, M.J., Downes, C.P., Hanley, M.R., 1989. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59, 411-419.
46. Bhagavathula, N., Hanosh, A.W., Nerusu, K.C., Appelman, H., Chakrabarty, S., Varani, J., 2007. Regulation of E-cadherin and beta-catenin by Ca²⁺ in colon carcinoma is dependent on calcium-sensing receptor expression and function. *Int. J. Cancer* 121, 1455-1462.
47. Bian, X., Ren, J., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D.A., Ford, A.P., Galligan, J.J., 2003. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X₃ subunit. *J. Physiol* 551, 309-322.
48. Bijur, G.N., Jope, R.S., 2001. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.* 276, 37436-37442.
49. Bijur, G.N., Jope, R.S., 2003. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14, 2415-2419.
50. Bilbao, P.S., Katz, S., Boland, R., 2012. Interaction of purinergic receptors with GPCRs, ion channels, tyrosine kinase and steroid hormone receptors orchestrates cell function. *Purinergic. Signal.* 8, 91-103.
51. Binderman, I., Duksin, D., Harell, A., Katzir, E., Sachs, L., 1974. Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. *J. Cell Biol.* 61, 427-439.

52. Biver, G., Wang, N., Gartland, A., Orriss, I., Arnett, T.R., Boeynaems, J.M., Robaye, B., 2013. Role of the P2Y₁₃ receptor in the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts and adipocytes. *Stem Cells* 31, 2747-2758.
53. Blokhuis, T.J., den Boer, F.C., Bramer, J.A., Jenner, J.M., Bakker, F.C., Patka, P., Haarman, H.J., 2001. Biomechanical and histological aspects of fracture healing, stimulated with osteogenic protein-1. *Biomaterials* 22, 725-730.
54. Blom, D., Yamin, T.T., Champy, M.F., Selloum, M., Bedu, E., Carballo-Jane, E., Gerckens, L., Luell, S., Meurer, R., Chin, J., Mudgett, J., Puig, O., 2010. Altered lipoprotein metabolism in P2Y₁₃ knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 1349-1360.
55. Blume, S.W., Curtis, J.R., 2011. Medical costs of osteoporosis in the elderly Medicare population. *Osteoporos. Int.* 22, 1835-1844.
56. Bolton, J.M., Metge, C., Lix, L., Prior, H., Sareen, J., Leslie, W.D., 2008. Fracture risk from psychotropic medications: a population-based analysis. *J. Clin. Psychopharmacol.* 28, 384-391.
57. Bomstein, R.A., Steberl, E.A., 1959. The effect of adenosine upon the aerobic metabolism of bovine spermatozoa. *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 43-52.
58. Bonab, M.M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S.H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B., 2006. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC. Cell Biol.* 7, 14.
59. Boonen, G.J., van, S.J., de Koster, B.M., Elferink, J.G., 1991. Inhibition of neutrophil migration by guanine nucleotides. *Agents Actions* 32, 100-102.
60. Borggreffe, J., Graeff, C., Nickelsen, T.N., Marin, F., Gluer, C.C., 2010. Quantitative computed tomographic assessment of the effects of 24 months of teriparatide treatment on 3D femoral neck bone distribution, geometry, and bone strength: results from the EUROFORS study. *J. Bone Miner. Res.* 25, 472-481.
61. Boscher, C., Mege, R.M., 2008. Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling. *Cell Signal.* 20, 1061-1072.
62. Bowler, W.B., Birch, M.A., Gallagher, J.A., Bilbe, G., 1995. Identification and cloning of human P2U purinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1137-1145.
63. Bowler, W.B., Buckley, K.A., Gartland, A., Hipskind, R.A., Bilbe, G., Gallagher, J.A., 2001. Extracellular nucleotide signaling: a mechanism for integrating local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone* 28, 507-512.
64. Bowler, W.B., Dixon, C.J., Halleux, C., Maier, R., Bilbe, G., Fraser, W.D., Gallagher, J.A., Hipskind, R.A., 1999. Signaling in human osteoblasts by extracellular nucleotides. Their weak induction of the c-fos proto-oncogene via Ca²⁺ mobilization is strongly potentiated by a parathyroid hormone/cAMP-dependent protein kinase pathway independently of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 14315-14324.
65. Brake, A.J., Wagenbach, M.J., Julius, D., 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371, 519-523.

66. Brandao-Burch, A., Key, M.L., Patel, J.J., Arnett, T.R., Orriss, I.R., 2012. The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front Endocrinol. (Lausanne)* 3, 41.
67. Brandao-Burch, A., Utting, J.C., Orriss, I.R., Arnett, T.R., 2005. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 77, 167-174.
68. Briolay, A., Lencel, P., Bessueille, L., Caverzasio, J., Buchet, R., Magne, D., 2013. Autocrine stimulation of osteoblast activity by Wnt5a in response to TNF-alpha in human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 1072-1077.
69. Brown, E.M., MacLeod, R.J., 2001. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 81, 239-297.
70. Brown, S.G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K.A., Burnstock, G., King, B.F., 2002. Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 673-680.
71. Buckley, K.A., Wagstaff, S.C., McKay, G., Gaw, A., Hipskind, R.A., Bilbe, G., Gallagher, J.A., Bowler, W.B., 2001. Parathyroid hormone potentiates nucleotide-induced [Ca²⁺]_i release in rat osteoblasts independently of G_q activation or cyclic monophosphate accumulation. A mechanism for localizing systemic responses in bone. *J. Biol. Chem.* 276, 9565-9571.
72. Burnstock, G., 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509-581.
73. Burnstock, G., 2002. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin. Med. (Lond)* 2, 45-53.
74. Burnstock, G., 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol. Rev.* 58, 58-86.
75. Burnstock, G., 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 1471-1483.
76. Burnstock, G., 2008. Purinergic receptors as future targets for treatment of functional GI disorders. *Gut* 57, 1193-1194.
77. Burnstock, G., 2011. Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci. (Elite Ed)* 3, 896-900.
78. Burnstock, G., 2012. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* 34, 218-225.
79. Burnstock, G., 2013. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. *Keio J. Med.* 62, 63-73.
80. Burnstock, G., 2014. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp. Physiol* 99, 16-34.
81. Burnstock, G., Arnett, T.R., Orriss, I.R., 2013. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic. Signal.* 9, 541-572.

82. Burnstock, G., Kennedy, C., 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16, 433-440.
83. Burnstock, G., Knight, G.E., 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240, 31-304.
84. Burnstock, G., Krugel, U., Abbracchio, M.P., Illes, P., 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 95, 229-274.
85. Burnstock, G., Novak, I., 2013. Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic. Signal.* 9, 307-324.
86. Burnstock, G., Verkhatsky, A., 2009. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)* 195, 415-447.
87. Burnstock, G., Verkhatsky, A., 2010. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death. Dis.* 1, e9.
88. Byers, P.H., Steiner, R.D., 1992. Osteogenesis imperfecta. *Annu. Rev. Med.* 43, 269-282.
89. Canalis, E., 1983. Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinology* 112, 931-939.
90. Canalis, E., 2010. New treatment modalities in osteoporosis. *Endocr. Pract.* 16, 855-863.
91. Capulli, M., Paone, R., Rucci, N., 2014. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* 561, 3-12.
92. Carragee, E.J., Chu, G., Rohatgi, R., Hurwitz, E.L., Weiner, B.K., Yoon, S.T., Comer, G., Kopjar, B., 2013. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 95, 1537-1545.
93. Casati, A., Frascoli, M., Traggiai, E., Proietti, M., Schenk, U., Grassi, F., 2011. Cell-autonomous regulation of hematopoietic stem cell cycling activity by ATP. *Cell Death. Differ.* 18, 396-404.
94. Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M., Gutkind, J.S., 2005. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 310, 1504-1510.
95. Chakrabarty, S., Radjendirane, V., Appelman, H., Varani, J., 2003. Extracellular calcium and calcium sensing receptor function in human colon carcinomas: promotion of E-cadherin expression and suppression of beta-catenin/TCF activation. *Cancer Res.* 63, 67-71.
96. Chalecka-Franaszek, E., Chuang, D.M., 1999. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8745-8750.
97. Chandar, N., Saluja, R., Lamar, P.C., Kolman, K., Prozialeck, W.C., 2005. P53 and beta-catenin activity during estrogen treatment of osteoblasts. *Cancer Cell Int.* 5, 24.

98. Chang, W., Tu, C., Pratt, S., Chen, T.H., Shoback, D., 2002. Extracellular Ca(2+)-sensing receptors modulate matrix production and mineralization in chondrogenic RCJ3.1C5.18 cells. *Endocrinology* 143, 1467-1474.
99. Chang, W., Tu, C., Chen, T.H., Bikle, D., Shoback, D., 2008. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci. Signal.* 1, ra1.
100. Chang, W., Tu, C., Chen, T.H., Komuves, L., Oda, Y., Pratt, S.A., Miller, S., Shoback, D., 1999. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology* 140, 5883-5893.
101. Chattopadhyay, N., Yano, S., Tfelt-Hansen, J., Rooney, P., Kanuparthi, D., Bandyopadhyay, S., Ren, X., Terwilliger, E., Brown, E.M., 2004. Mitogenic action of calcium-sensing receptor on rat calvarial osteoblasts. *Endocrinology* 145, 3451-3462.
102. Chen, J., Long, F., 2013. beta-catenin promotes bone formation and suppresses bone resorption in postnatal growing mice. *J. Bone Miner. Res.* 28, 1160-1169.
103. Chen, J., McKee, M.D., Nanci, A., Sodek, J., 1994. Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin. *Histochem. J.* 26, 67-78.
104. Chen, J., Shapiro, H.S., Sodek, J., 1992. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J. Bone Miner. Res.* 7, 987-997.
105. Cheon, S.S., Nadesan, P., Poon, R., Alman, B.A., 2004. Growth factors regulate beta-catenin-mediated TCF-dependent transcriptional activation in fibroblasts during the proliferative phase of wound healing. *Exp. Cell Res.* 293, 267-274.
106. Chesnut, C.H., 2006. Treating osteoporosis with bisphosphonates and addressing adherence: a review of oral ibandronate. *Drugs* 66, 1351-1359.
107. Chessell, I.P., Hatcher, J.P., Bountra, C., Michel, A.D., Hughes, J.P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W.L., Grahames, C.B., Casula, M.A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P., Buell, G.N., 2005. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114, 386-396.
108. Chhatrivala, M., Ravi, R.G., Patel, R.I., Boyer, J.L., Jacobson, K.A., Harden, T.K., 2004. Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y13 receptors by conformational constraint of an ADP analog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 1038-1043.
109. Cho, J., Yusuf, R., Kook, S., Attar, E., Lee, D., Park, B., Cheng, T., Scadden, D.T., Lee, B.C., 2014. Purinergic P2Y(1)(4) receptor modulates stress-induced hematopoietic stem/progenitor cell senescence. *J. Clin. Invest* 124, 3159-3171.
110. Choudhary, S., Halbout, P., Alander, C., Raisz, L., Pilbeam, C., 2007. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1002-1010.

111. Chung, W.C., Kermode, J.C., 2005. Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 191-198.
112. Ciciarello, M., Zini, R., Rossi, L., Salvestrini, V., Ferrari, D., Manfredini, R., Lemoli, R.M., 2013. Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev.* 22, 1097-1111.
113. Cicko, S., Lucattelli, M., Muller, T., Lommatzsch, M., De, C.G., Cardini, S., Sundas, W., Grimm, M., Zeiser, R., Durk, T., Zissel, G., Boeynaems, J.M., Sorichter, S., Ferrari, D., Di, V.F., Virchow, J.C., Lungarella, G., Idzko, M., 2010. Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema. *J. Immunol.* 185, 688-697.
114. Claes, L., Recknagel, S., Ignatius, A., 2012. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 133-143.
115. Clark, G., Torres, J., Finlayson, S., Guan, X., Handley, C., Lee, J., Kays, J.E., Chen, Z.J., Roux, S.J., 2010. Apyrase (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase) and extracellular nucleotides regulate cotton fiber elongation in cultured ovules. *Plant Physiol* 152, 1073-1083.
116. Clement-Lacroix, P., Ai, M., Morvan, F., Roman-Roman, S., Vayssiere, B., Belleville, C., Estrera, K., Warman, M.L., Baron, R., Rawadi, G., 2005. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 17406-17411.
117. Cockayne, D.A., Hamilton, S.G., Zhu, Q.M., Dunn, P.M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A.B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., Hedley, L., Lachnit, W.G., Burnstock, G., McMahon, S.B., Ford, A.P., 2000. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407, 1011-1015.
118. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., Stojilkovic, S.S., 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 63, 641-683.
119. Cohen, O., Rais, T., Lepkifker, E., Vered, I., 1998. Lithium carbonate therapy is not a risk factor for osteoporosis. *Horm. Metab Res.* 30, 594-597.
120. Cohen, P., Frame, S., 2001. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 769-776.
121. Cole, A., Frame, S., Cohen, P., 2004. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem. J.* 377, 249-255.
122. Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M., Boeynaems, J.M., 1997. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 272, 31969-31973.
123. Coppi, E., Pugliese, A.M., Urbani, S., Melani, A., Cerbai, E., Mazzanti, B., Bosi, A., Saccardi, R., Pedata, F., 2007. ATP modulates cell proliferation and elicits two different

- electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25, 1840-1849.
124. Coster, M., Wittkopf, D., Kreuchwig, A., Kleinau, G., Thor, D., Krause, G., Schoneberg, T., 2012. Using ortholog sequence data to predict the functional relevance of mutations in G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 26, 3273-3281.
 125. Costessi, A., Pines, A., D'Andrea, P., Romanello, M., Damante, G., Cesaratto, L., Quadrioglio, F., Moro, L., Tell, G., 2005. Extracellular nucleotides activate Runx2 in the osteoblast-like HOBIT cell line: a possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response. *Bone* 36, 418-432.
 126. Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
 127. Cutarelli, A., Marini, M., Tancredi, V., D'Arcangelo, G., Murdocca, M., Frank, C., Tarantino, U., 2016. Adenosine Triphosphate stimulates differentiation and mineralization in human osteoblast-like Saos-2 cells. *Dev. Growth Differ.* 58, 400-408.
 128. Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Richards, R.G., Hayes, J.S., 2012. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur. Cell Mater.* 24, 1-17.
 129. Dai, J., Hall, C.L., Escara-Wilke, J., Mizokami, A., Keller, J.M., Keller, E.T., 2008. Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res.* 68, 5785-5794.
 130. Das, A., Ko, H., Buriánek, L.E., Barrett, M.O., Harden, T.K., Jacobson, K.A., 2010. Human P2Y₁₄ receptor agonists: truncation of the hexose moiety of uridine-5'-diphosphoglucose and its replacement with alkyl and aryl groups. *J. Med. Chem.* 53, 471-480.
 131. Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., Yang, Y., 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* 8, 739-750.
 132. del, P.A., Diaz-Hernandez, J.I., Tapia, M., Gomez-Villafuertes, R., Benitez, M.J., Zhang, J., Miras-Portugal, M.T., Wandosell, F., Diaz-Hernandez, M., Garrido, J.J., 2012. Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y₁, P2Y₁₃ and ATP-gated P2X₇ receptors on axonal elongation. *J. Cell Sci.* 125, 176-188.
 133. Demidchik, V., Nichols, C., Oliynyk, M., Dark, A., Glover, B.J., Davies, J.M., 2003. Is ATP a signaling agent in plants? *Plant Physiol* 133, 456-461.
 134. Demidchik, V., Shang, Z., Shin, R., Colaco, R., Laohavisit, A., Shabala, S., Davies, J.M., 2011. Receptor-like activity evoked by extracellular ADP in Arabidopsis root epidermal plasma membrane. *Plant Physiol* 156, 1375-1385.
 135. den Boer, F.C., Bramer, J.A., Blokhuis, T.J., Van Soest, E.J., Jenner, J.M., Patka, P., Bakker, F.C., Burger, E.H., Haarman, H.J., 2002. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone* 31, 158-164.

136. DePaoli-Roach, A.A., 1984. Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J. Biol. Chem.* 259, 12144-12152.
137. Deshmukh, S.N., Dive, A.M., Moharil, R., Munde, P., 2016. Enigmatic insight into collagen. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 20, 276-283.
138. Devreotes, P.N., Zigmond, S.H., 1988. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 649-686.
139. Di, V.F., 2007. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465-472.
140. Diaz-Hernandez, M., del, P.A., Diaz-Hernandez, J.I., Diez-Zaera, M., Lucas, J.J., Garrido, J.J., Miras-Portugal, M.T., 2008. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 121, 3717-3728.
141. Ding, J., Ghali, O., Lencel, P., Broux, O., Chauveau, C., Devedjian, J.C., Hardouin, P., Magne, D., 2009. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci.* 84, 499-504.
142. Ding, S., Sachs, F., 1999. Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J. Gen. Physiol* 113, 695-720.
143. Dirckx, N., Van, H.M., Maes, C., 2013. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 99, 170-191.
144. Dixon, C.J., Bowler, W.B., Walsh, C.A., Gallagher, J.A., 1997. Effects of extracellular nucleotides on single cells and populations of human osteoblasts: contribution of cell heterogeneity to relative potencies. *Br. J. Pharmacol.* 120, 777-780.
145. Doble, B.W., Woodgett, J.R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116, 1175-1186.
146. Donato, R., Rodrigues, R.J., Takahashi, M., Tsai, M.C., Soto, D., Miyagi, K., Villafuertes, R.G., Cunha, R.A., Edwards, F.A., 2008. GABA release by basket cells onto Purkinje cells, in rat cerebellar slices, is directly controlled by presynaptic purinergic receptors, modulating Ca²⁺ influx. *Cell Calcium* 44, 521-532.
147. Dorsam, R.T., Gutkind, J.S., 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79-94.
148. Dranoff, J.A., O'Neill, A.F., Franco, A.M., Cai, S.Y., Connolly, G.C., Ballatori, N., Boyer, J.L., Nathanson, M.H., 2000. A primitive ATP receptor from the little skate *Raja erinacea*. *J. Biol. Chem.* 275, 30701-30706.
149. Dranoff, J.A., Ogawa, M., Kruglov, E.A., Gaca, M.D., Sevigny, J., Robson, S.C., Wells, R.G., 2004. Expression of P2Y nucleotide receptors and ectonucleotidases in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 287, G417-G424.

150. Du, Y., Ling, J., Wei, X., Ning, Y., Xie, N., Gu, H., Yang, F., 2012. Wnt/beta-catenin signaling participates in cementoblast/osteoblast differentiation of dental follicle cells. *Connect. Tissue Res.* 53, 390-397.
151. Duckwitz, W., Hausmann, R., Aschrafi, A., Schmalzing, G., 2006. P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate. *J. Biol. Chem.* 281, 39561-39572.
152. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G., 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
153. Duque, G., Rivas, D., 2007. Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1603-1611.
154. Dvorak, M.M., Riccardi, D., 2004. Ca^{2+} as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* 35, 249-255.
155. Dvorak, M.M., Siddiqua, A., Ward, D.T., Carter, D.H., Dallas, S.L., Nemeth, E.F., Riccardi, D., 2004. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 5140-5145.
156. Dvorak-Ewell, M.M., Chen, T.H., Liang, N., Garvey, C., Liu, B., Tu, C., Chang, W., Bikle, D.D., Shoback, D.M., 2011. Osteoblast extracellular Ca^{2+} -sensing receptor regulates bone development, mineralization, and turnover. *J. Bone Miner. Res.* 26, 2935-2947.
157. EAGLE, H., OYAMA, V.I., LEVY, M., HORTON, C.L., FLEISCHMAN, R., 1956. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 218, 607-616.
158. Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F.H., van der Rest, M., Pereira, G., 1983. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J. Cell Biol.* 96, 639-643.
159. Egan, T.M., Haines, W.R., Voigt, M.M., 1998. A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J. Neurosci.* 18, 2350-2359.
160. El-Sayed, F.G., Camden, J.M., Woods, L.T., Khalafalla, M.G., Petris, M.J., Erb, L., Weisman, G.A., 2014. P2Y2 nucleotide receptor activation enhances the aggregation and self-organization of dispersed salivary epithelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 307, C83-C96.
161. Elferink, J.G., de Koster, B.M., Boonen, G.J., de, P.W., 1992. Inhibition of neutrophil chemotaxis by purinoceptor agonists. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 317, 93-106.
162. Embi, N., Rylatt, D.B., Cohen, P., 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* 107, 519-527.
163. Erlinge, D., Burnstock, G., 2008. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic. Signal.* 4, 1-20.

164. Fabre, A.C., Malaval, C., Ben, A.A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., Lichtenstein, L., Combes, G., Huby, T., Briand, F., Collet, X., Nijstad, N., Tietge, U.J., Robaye, B., Perret, B., Boeynaems, J.M., Martinez, L.O., 2010. P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology* 52, 1477-1483.
165. Fabre, J.E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J.A., Audoly, L.P., Coffman, T.M., Koller, B.H., 1999. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat. Med.* 5, 1199-1202.
166. Fairbairn, I.P., Stober, C.B., Kumararatne, D.S., Lammas, D.A., 2001. ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J. Immunol.* 167, 3300-3307.
167. Faletra, F., Giroto, G., D'Adamo, A.P., Vozi, D., Morgan, A., Gasparini, P., 2014. A novel P2RX2 mutation in an Italian family affected by autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Gene* 534, 236-239.
168. Falzoni, S., Munerati, M., Ferrari, D., Spisani, S., Moretti, S., Di, V.F., 1995. The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J. Clin. Invest* 95, 1207-1216.
169. Fang, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast, R.C., Jr., Woodgett, J.R., Mills, G.B., 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 11960-11965.
170. Faria, R.X., Cascabulho, C.M., Reis, R.A., Alves, L.A., 2010. Large-conductance channel formation mediated by P2X7 receptor activation is regulated through distinct intracellular signaling pathways in peritoneal macrophages and 2BH4 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 382, 73-87.
171. Feng, J., Shi, Z., Ye, Z., 2008. Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1067-1070.
172. Fernandez, J.M., Molinuevo, M.S., Sedlinsky, C., Schurman, L., Cortizo, A.M., McCarthy, A.D., 2013. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *Eur. J. Pharmacol.* 706, 41-47.
173. Ferrari, D., Bianchi, N., Eltzschig, H.K., Gambari, R., 2016. MicroRNAs Modulate the Purinergic Signaling Network. *Trends Mol. Med.* 22, 905-918.
174. Ferrari, D., Gulinelli, S., Salvestrini, V., Lucchetti, G., Zini, R., Manfredini, R., Caione, L., Piacibello, W., Ciciarello, M., Rossi, L., Idzko, M., Ferrari, S., Di, V.F., Lemoli, R.M., 2011. Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Exp. Hematol.* 39, 360-74, 374.
175. Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., Di, V.F., 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 176, 3877-3883.

176. Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., Kinnamon, S.C., 2005. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495-1499.
177. Fiol, C.J., Haseman, J.H., Wang, Y.H., Roach, P.J., Roeske, R.W., Kowalczyk, M., DePaoli-Roach, A.A., 1988. Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase-3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 797-802.
178. Fisher, L.W., Torchia, D.A., Fohr, B., Young, M.F., Fedarko, N.S., 2001. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 460-465.
179. Foster, C.J., Prosser, D.M., Agans, J.M., Zhai, Y., Smith, M.D., Lachowicz, J.E., Zhang, F.L., Gustafson, E., Monsma, F.J., Jr., Wiekowski, M.T., Abbondanzo, S.J., Cook, D.N., Bayne, M.L., Lira, S.A., Chintala, M.S., 2001. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J. Clin. Invest* 107, 1591-1598.
180. Fountain, S.J., Burnstock, G., 2009. An evolutionary history of P2X receptors. *Purinergic. Signal.* 5, 269-272.
181. Fountain, S.J., Cao, L., Young, M.T., North, R.A., 2008. Permeation properties of a P2X receptor in the green algae *Ostreococcus tauri*. *J. Biol. Chem.* 283, 15122-15126.
182. Fountain, S.J., Parkinson, K., Young, M.T., Cao, L., Thompson, C.R., North, R.A., 2007. An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 448, 200-203.
183. Frame, S., Cohen, P., Biondi, R.M., 2001. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* 7, 1321-1327.
184. Franca-Koh, J., Yeo, M., Fraser, E., Young, N., Dale, T.C., 2002. The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *J. Biol. Chem.* 277, 43844-43848.
185. Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272.
186. Freeman, K., Tsui, P., Moore, D., Emson, P.C., Vawter, L., Naheed, S., Lane, P., Bawagan, H., Herrity, N., Murphy, K., Sarau, H.M., Ames, R.S., Wilson, S., Livi, G.P., Chambers, J.K., 2001. Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics* 78, 124-128.
187. Fricks, I.P., Carter, R.L., Lazarowski, E.R., Harden, T.K., 2009. Gi-dependent cell signaling responses of the human P2Y14 receptor in model cell systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 162-168.
188. Fu, R., Selph, S., McDonagh, M., Peterson, K., Tiwari, A., Chou, R., Helfand, M., 2013. Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 158, 890-902.

189. Fukumoto, S., Martin, T.J., 2009. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab* 20, 230-236.
190. Fumagalli, M., Trincavelli, L., Lecca, D., Martini, C., Ciana, P., Abbracchio, M.P., 2004. Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor. *Biochem. Pharmacol.* 68, 113-124.
191. Gachet, C., 2006. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 277-300.
192. Gallacher, S.J., Dixon, T., 2010. Impact of treatments for postmenopausal osteoporosis (bisphosphonates, parathyroid hormone, strontium ranelate, and denosumab) on bone quality: a systematic review. *Calcif. Tissue Int.* 87, 469-484.
193. Galli, C., Piemontese, M., Lumetti, S., Manfredi, E., Macaluso, G.M., Passeri, G., 2012. The importance of WNT pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. *Eur. Cell Mater.* 24, 46-59.
194. Gambardella, A., Nagaraju, C.K., O'Shea, P.J., Mohanty, S.T., Kottam, L., Pilling, J., Sullivan, M., Djerbi, M., Koopmann, W., Croucher, P.I., Bellantuono, I., 2011. Glycogen synthase kinase-3alpha/beta inhibition promotes in vivo amplification of endogenous mesenchymal progenitors with osteogenic and adipogenic potential and their differentiation to the osteogenic lineage. *J. Bone Miner. Res.* 26, 811-821.
195. Gao, Z.G., Ding, Y., Jacobson, K.A., 2010. UDP-glucose acting at P2Y14 receptors is a mediator of mast cell degranulation. *Biochem. Pharmacol.* 79, 873-879.
196. Garnero, P., 2015. Erratum to: The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcif. Tissue Int.* 97, 241.
197. Garrett, I.R., 2003. Assessing bone formation using mouse calvarial organ cultures. *Methods Mol. Med.* 80, 183-198.
198. Garrison, K.R., Shemilt, I., Donell, S., Ryder, J.J., Mugford, M., Harvey, I., Song, F., Alt, V., 2010. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database. Syst. Rev.* CD006950.
199. Gartland, A., Buckley, K.A., Hipskind, R.A., Perry, M.J., Tobias, J.H., Buell, G., Chessell, I., Bowler, W.B., Gallagher, J.A., 2003. Multinucleated osteoclast formation in vivo and in vitro by P2X7 receptor-deficient mice. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 13, 243-253.
200. Gartland, A., Hipskind, R.A., Gallagher, J.A., Bowler, W.B., 2001. Expression of a P2X7 receptor by a subpopulation of human osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 16, 846-856.
201. Geesink, R.G., Hoefnagels, N.H., Bulstra, S.K., 1999. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J. Bone Joint Surg. Br.* 81, 710-718.
202. Genetos, D.C., Geist, D.J., Liu, D., Donahue, H.J., Duncan, R.L., 2005. Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 20, 41-49.

203. Genetos, D.C., Karin, N.J., Geist, D.J., Donahue, H.J., Duncan, R.L., 2011. Purinergic signaling is required for fluid shear stress-induced NF-kappaB translocation in osteoblasts. *Exp. Cell Res.* 317, 737-744.
204. Gersbach, C.A., Byers, B.A., Pavlath, G.K., Guldberg, R.E., Garcia, A.J., 2004. Runx2/Cbfa1-genetically engineered skeletal myoblasts mineralize collagen scaffolds in vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 369-378.
205. Gever, J.R., Cockayne, D.A., Dillon, M.P., Burnstock, G., Ford, A.P., 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452, 513-537.
206. Ghanem, E., Robaye, B., Leal, T., Leipziger, J., Van, D.W., Beauwens, R., Boeynaems, J.M., 2005. The role of epithelial P2Y2 and P2Y4 receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *Br. J. Pharmacol.* 146, 364-369.
207. Giachelli, C.M., Bae, N., Almeida, M., Denhardt, D.T., Alpers, C.E., Schwartz, S.M., 1993. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest* 92, 1686-1696.
208. Giannattasio, G., Ohta, S., Boyce, J.R., Xing, W., Balestrieri, B., Boyce, J.A., 2011. The purinergic G protein-coupled receptor 6 inhibits effector T cell activation in allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 187, 1486-1495.
209. Glaser, T., Cappellari, A.R., Pillat, M.M., Iser, I.C., Wink, M.R., Battastini, A.M., Ulrich, H., 2012. Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic. Signal.* 8, 523-537.
210. Glass, D.A., Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A., Karsenty, G., 2005. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell* 8, 751-764.
211. Glass, D.A., Karsenty, G., 2007. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 148, 2630-2634.
212. Godwin, S.L., Soltoff, S.P., 1997. Extracellular calcium and platelet-derived growth factor promote receptor-mediated chemotaxis in osteoblasts through different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272, 11307-11312.
213. Goldhahn, J., Feron, J.M., Kanis, J., Papapoulos, S., Reginster, J.Y., Rizzoli, R., Dere, W., Mitlak, B., Tsouderos, Y., Boonen, S., 2012. Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: an ESCEO consensus paper. *Calcif. Tissue Int.* 90, 343-353.
214. Goncalves, R.G., Gabrich, L., Rosario, A., Jr., Takiya, C.M., Ferreira, M.L., Chiarini, L.B., Persechini, P.M., Coutinho-Silva, R., Leite, M., Jr., 2006. The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney Int.* 70, 1599-1606.
215. Gonzalez-Vazquez, A., Planell, J.A., Engel, E., 2014. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 10, 2824-2833.

216. Gourine, A.V., Llaudet, E., Dale, N., Spyer, K.M., 2005. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J. Neurosci.* 25, 1211-1218.
217. Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M.G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van, d., V, Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R.L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P.M., Rondia, J., Rossouw, W.C., Daneel, P.J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T.A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R.B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A., Wisniewski, T., 2002. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84-A, 2123-2134.
218. Graves, D.T., Oates, T., Garlet, G.P., 2011. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J. Oral Microbiol.* 3.
219. Gregory, C.A., Perry, A.S., Reyes, E., Conley, A., Gunn, W.G., Prockop, D.J., 2005. Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.* 280, 2309-2323.
220. Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N., Aubin, J.E., 1988. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* 106, 2139-2151.
221. Grimes, C.A., Jope, R.S., 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* 65, 391-426.
222. Grol, M.W., Brooks, P.J., Pereverzev, A., Dixon, S.J., 2016. P2X7 nucleotide receptor signaling potentiates the Wnt/beta-catenin pathway in cells of the osteoblast lineage. *Purinergic. Signal.* 12, 509-520.
223. Groot, C.G., Moskalewski, S., Scherft, J.P., Boonekamp, P.M., 1983. Electron microscopy of bone formed by syngeneic transplanted calvarial osteoblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* 7, 577.
224. Guan, J., Zhang, J., Guo, S., Zhu, H., Zhu, Z., Li, H., Wang, Y., Zhang, C., Chang, J., 2015. Human urine-derived stem cells can be induced into osteogenic lineage by silicate bioceramics via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Biomaterials* 55, 1-11.
225. Guo, Y., Mishra, A., Weng, T., Chintagari, N.R., Wang, Y., Zhao, C., Huang, C., Liu, L., 2014. Wnt3a mitigates acute lung injury by reducing P2X7 receptor-mediated alveolar epithelial type I cell death. *Cell Death. Dis.* 5, e1286.
226. Hagen, T., Vidal-Puig, A., 2002. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 324-328.
227. Haines, W.R., Torres, G.E., Voigt, M.M., Egan, T.M., 1999. Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Mol. Pharmacol.* 56, 720-727.

228. Hamidouche, Z., Hay, E., Vaudin, P., Charbord, P., Schule, R., Marie, P.J., Fromiguet, O., 2008. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB J.* 22, 3813-3822.
229. Hankenson, K.D., Gagne, K., Shaughnessy, M., 2015. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 94, 3-12.
230. Haq, S., Michael, A., Andreucci, M., Bhattacharya, K., Dotto, P., Walters, B., Woodgett, J., Kilter, H., Force, T., 2003. Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4610-4615.
231. Harada, H., Chan, C.M., Loesch, A., Unwin, R., Burnstock, G., 2000. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 57, 949-958.
232. Harden, T.K., Sesma, J.I., Fricks, I.P., Lazarowski, E.R., 2010. Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol (Oxf)* 199, 149-160.
233. Hartigan, J.A., Xiong, W.C., Johnson, G.V., 2001. Glycogen synthase kinase 3beta is tyrosine phosphorylated by PYK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 485-489.
234. Hashimoto, R., Katoh, Y., Nakamura, K., Itoh, S., Iesaki, T., Daida, H., Nakazato, Y., Okada, T., 2012. Enhanced accumulation of adipocytes in bone marrow stromal cells in the presence of increased extracellular and intracellular $[Ca^{2+}]$. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 672-678.
235. Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., Pacher, P., 2008. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 759-770.
236. Haverstock, B.D., Mandracchia, V.J., 1998. Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery. *J. Foot Ankle Surg.* 37, 69-74.
237. Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.B., Julius, D., 2006. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512-1519.
238. Hayton, M.J., Dillon, J.P., Glynn, D., Curran, J.M., Gallagher, J.A., Buckley, K.A., 2005. Involvement of adenosine 5'-triphosphate in ultrasound-induced fracture repair. *Ultrasound Med. Biol.* 31, 1131-1138.
239. Hecht, E., Liedert, A., Ignatius, A., Mizaikoff, B., Kranz, C., 2013. Local detection of mechanically induced ATP release from bone cells with ATP microbiosensors. *Biosens. Bioelectron.* 44, 27-33.
240. Hedgepeth, C.M., Conrad, L.J., Zhang, J., Huang, H.C., Lee, V.M., Klein, P.S., 1997. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev. Biol.* 185, 82-91.
241. Henderson, D.J., Elliot, D.G., Smith, G.M., Webb, T.E., Dainty, I.A., 1995. Cloning and characterisation of a bovine P2Y receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 648-656.

242. Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P., Lajeunesse, D., 1998. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum.* 41, 891-899.
243. Hill, T.P., Spater, D., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Hartmann, C., 2005. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev. Cell* 8, 727-738.
244. Hill, T.P., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Hartmann, C., 2006. Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning. *Development* 133, 1219-1229.
245. Hodsman, A.B., Bauer, D.C., Dempster, D.W., Dian, L., Hanley, D.A., Harris, S.T., Kendler, D.L., McClung, M.R., Miller, P.D., Olszynski, W.P., Orwoll, E., Yuen, C.K., 2005. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr. Rev.* 26, 688-703.
246. Hoebertz, A., Arnett, T.R., Burnstock, G., 2003. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 290-297.
247. Hoebertz, A., Mahendran, S., Burnstock, G., Arnett, T.R., 2002. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. *J. Cell Biochem.* 86, 413-419.
248. Hoemann, C.D., El-Gabalawy, H., McKee, M.D., 2009. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 318-323.
249. Hoffmann, C., Moro, S., Nicholas, R.A., Harden, T.K., Jacobson, K.A., 1999. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *J. Biol. Chem.* 274, 14639-14647.
250. Holen, I., Shipman, C.M., 2006. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin. Sci. (Lond)* 110, 279-291.
251. Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., Conley, P.B., 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409, 202-207.
252. Holmen, S.L., Zylstra, C.R., Mukherjee, A., Sigler, R.E., Faugere, M.C., Bouxsein, M.L., Deng, L., Clemens, T.L., Williams, B.O., 2005. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J. Biol. Chem.* 280, 21162-21168.
253. Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M.T., Hsieh, G., Zhu, C.Z., Mikusa, J.P., Hernandez, G., Zhong, C., Gauvin, D.M., Chandran, P., Harris, R., Medrano, A.P., Carroll, W., Marsh, K., Sullivan, J.P., Faltynek, C.R., Jarvis, M.F., 2006. A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1376-1385.

254. Honore, P., Kage, K., Mikusa, J., Watt, A.T., Johnston, J.F., Wyatt, J.R., Faltynek, C.R., Jarvis, M.F., Lynch, K., 2002. Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain* 99, 11-19.
255. Horckmans, M., Leon-Gomez, E., Robaye, B., Balligand, J.L., Boeynaems, J.M., Dessy, C., Communi, D., 2012. Gene deletion of P2Y4 receptor lowers exercise capacity and reduces myocardial hypertrophy with swimming exercise. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 303, H835-H843.
256. Horckmans, M., Robaye, B., Leon-Gomicronmez, E., Lantz, N., Unger, P., Dol-Gleizes, F., Clouet, S., Cammarata, D., Schaeffer, P., Savi, P., Gachet, C., Balligand, J.L., Dessy, C., Boeynaems, J.M., Communi, D., 2012. P2Y(4) nucleotide receptor: a novel actor in post-natal cardiac development. *Angiogenesis*. 15, 349-360.
257. Hou, M., Malmsjo, M., Moller, S., Pantev, E., Bergdahl, A., Zhao, X.H., Sun, X.Y., Hedner, T., Edvinsson, L., Erlinge, D., 1999. Increase in cardiac P2X1-and P2Y2-receptor mRNA levels in congestive heart failure. *Life Sci*. 65, 1195-1206.
258. Housley, G.D., Jagger, D.J., Greenwood, D., Raybould, N.P., Salih, S.G., Jarlebark, L.E., Vlajkovic, S.M., Kanjhan, R., Nikolic, P., Munoz, D.J., Thorne, P.R., 2002. Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission. *Audiol. Neurootol*. 7, 55-61.
259. Housley, G.D., Marcotti, W., Navaratnam, D., Yamoah, E.N., 2006. Hair cells--beyond the transducer. *J. Membr. Biol*. 209, 89-118.
260. Hu, H., Hilton, M.J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D.M., Long, F., 2005. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132, 49-60.
261. Huang, C.L., Sun, L., Moonga, B.S., Zaidi, M., 2006. Molecular physiology and pharmacology of calcitonin. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 52, 33-43.
262. Huang, W., Yang, S., Shao, J., Li, Y.P., 2007. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 12, 3068-3092.
263. Hulmes, D.J., 1992. The collagen superfamily--diverse structures and assemblies. *Essays Biochem*. 27, 49-67.
264. Hunter, G.K., 2013. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcif. Tissue Int*. 93, 348-354.
265. Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A., 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J*. 17, 1371-1384.
266. Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., Koizumi, S., Inoue, K., 2005. Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest Dermatol*. 124, 756-763.

267. Inoue, K., Tsuda, M., Koizumi, S., 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 112-114.
268. Ito, K., Okamoto, I., Araki, N., Kawano, Y., Nakao, M., Fujiyama, S., Tomita, K., Mimori, T., Saya, H., 1999. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* 18, 7080-7090.
269. Jacobson, K.A., Costanzi, S., Joshi, B.V., Besada, P., Shin, D.H., Ko, H., Ivanov, A.A., Mamedova, L., 2006. Agonists and antagonists for P2 receptors. *Novartis. Found. Symp.* 276, 58-68.
270. Jacobson, K.A., Costanzi, S., Ohno, M., Joshi, B.V., Besada, P., Xu, B., Tchilibon, S., 2004. Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 805-819.
271. Jahnen-Dechent, W., Schafer, C., Ketteler, M., McKee, M.D., 2008. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J. Mol. Med. (Berl)* 86, 379-389.
272. Janssen, L.J., Farkas, L., Rahman, T., Kolb, M.R., 2009. ATP stimulates Ca(2+)-waves and gene expression in cultured human pulmonary fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2477-2484.
273. Janssens, R., Communi, D., Pirotton, S., Samson, M., Parmentier, M., Boeynaems, J.M., 1996. Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 588-593.
274. Jarvis, M.F., Burgard, E.C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T.J., Subieta, A., Van, B.T., Cartmell, J., Bianchi, B., Niforatos, W., Kage, K., Yu, H., Mikusa, J., Wismer, C.T., Zhu, C.Z., Chu, K., Lee, C.H., Stewart, A.O., Polakowski, J., Cox, B.F., Kowaluk, E., Williams, M., Sullivan, J., Faltynek, C., 2002. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 17179-17184.
275. Jho, E., Lomvardas, S., Costantini, F., 1999. A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 28-35.
276. Jiang, L.H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A., North, R.A., 2003. Subunit arrangement in P2X receptors. *J. Neurosci.* 23, 8903-8910.
277. Jiao, K., Niu, L.N., Li, Q.H., Ren, G.T., Zhao, C.M., Liu, Y.D., Tay, F.R., Wang, M.Q., 2015. beta2-Adrenergic signal transduction plays a detrimental role in subchondral bone loss of temporomandibular joint in osteoarthritis. *Sci. Rep.* 5, 12593.
278. Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Roberson, P., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C., 1999. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest* 104, 439-446.

279. Jo, Y.H., Role, L.W., 2002. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J. Neurosci.* 22, 4794-4804.
280. Johnell, O., Kanis, J.A., 2006. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int.* 17, 1726-1733.
281. Jollette, J., Wilker, C.E., Smith, S.Y., Doyle, N., Hardisty, J.F., Metcalfe, A.J., Marriott, T.B., Fox, J., Wells, D.S., 2006. Defining a noncarcinogenic dose of recombinant human parathyroid hormone 1-84 in a 2-year study in Fischer 344 rats. *Toxicol. Pathol.* 34, 929-940.
282. Jones, S.J., Gray, C., Boyde, A., Burnstock, G., 1997. Purinergic transmitters inhibit bone formation by cultured osteoblasts. *Bone* 21, 393-399.
283. Jope, R.S., Johnson, G.V., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29, 95-102.
284. Kahler, R.A., Westendorf, J.J., 2003. Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J. Biol. Chem.* 278, 11937-11944.
285. Kalajzic, I., Terzic, J., Rumboldt, Z., Mack, K., Naprta, A., Ledgard, F., Gronowicz, G., Clark, S.H., Rowe, D.W., 2002. Osteoblastic response to the defective matrix in the osteogenesis imperfecta murine (oim) mouse. *Endocrinology* 143, 1594-1601.
286. Kameda, T., Mano, H., Yamada, Y., Takai, H., Amizuka, N., Kobori, M., Izumi, N., Kawashima, H., Ozawa, H., Ikeda, K., Kameda, A., Hakeda, Y., Kumegawa, M., 1998. Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 419-422.
287. Kanis, J.A., Johnell, O., 2005. Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. *Osteoporos. Int.* 16, 229-238.
288. Kapadia, R.M., Guntur, A.R., Reinhold, M.I., Naski, M.C., 2005. Glycogen synthase kinase 3 controls endochondral bone development: contribution of fibroblast growth factor 18. *Dev. Biol.* 285, 496-507.
289. Karsenty, G., Kronenberg, H.M., Settembre, C., 2009. Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 629-648.
290. Karsenty, G., Wagner, E.F., 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2, 389-406.
291. Kartenbeck, J., Schmelz, M., Franke, W.W., Geiger, B., 1991. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca²⁺ ion medium. *J. Cell Biol.* 113, 881-892.
292. Kasugai, S., Nagata, T., Sodek, J., 1992. Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J. Cell Physiol* 152, 467-477.

293. Katz, S., Ayala, V., Santillan, G., Boland, R., 2011. Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y₂ receptors by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. *Arch. Biochem. Biophys.* 513, 144-152.
294. Katz, S., Boland, R., Santillan, G., 2006. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 2082-2091.
295. Katz, S., Boland, R., Santillan, G., 2008. Purinergic (ATP) signaling stimulates JNK1 but not JNK2 MAPK in osteoblast-like cells: contribution of intracellular Ca²⁺ release, stress activated and L-voltage-dependent calcium influx, PKC and Src kinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 244-252.
296. Kawabata, M., Imamura, T., Miyazono, K., 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 49-61.
297. Kawaguchi, H., Pilbeam, C.C., Gronowicz, G., Abreu, C., Fletcher, B.S., Herschman, H.R., Raisz, L.G., Hurley, M.M., 1995. Transcriptional induction of prostaglandin G/H synthase-2 by basic fibroblast growth factor. *J. Clin. Invest* 96, 923-930.
298. Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., Gouaux, E., 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592-598.
299. Ke, H.Z., Qi, H., Weidema, A.F., Zhang, Q., Panupinthu, N., Crawford, D.T., Grasser, W.A., Paralkar, V.M., Li, M., Audoly, L.P., Gabel, C.A., Jee, W.S., Dixon, S.J., Sims, S.M., Thompson, D.D., 2003. Deletion of the P2X₇ nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol. Endocrinol.* 17, 1356-1367.
300. Keller, H., Kneissel, M., 2005. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37, 148-158.
301. Khakh, B.S., Egan, T.M., 2005. Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X₂ channel permeability dynamics. *J. Biol. Chem.* 280, 6118-6129.
302. Khakh, B.S., Gittermann, D., Cockayne, D.A., Jones, A., 2003. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J. Neurosci.* 23, 7426-7437.
303. Khakh, B.S., North, R.A., 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76, 51-69.
304. Khoshniat, S., Bourguine, A., Julien, M., Petit, M., Pilet, P., Rouillon, T., Masson, M., Gatus, M., Weiss, P., Guicheux, J., Beck, L., 2011. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone* 48, 894-902.
305. Khosla, S., Riggs, B.L., 2005. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 34, 1015-30, xi.
306. Kim, H.J., Ajit, D., Peterson, T.S., Wang, Y., Camden, J.M., Gibson, W.W., Sun, G.Y., Erb, L., Petris, M., Weisman, G.A., 2012. Nucleotides released from Abeta(1)-(4)₂-treated microglial cells increase cell migration and Abeta(1)-(4)₂ uptake through P2Y₂ receptor activation. *J. Neurochem.* 121, 228-238.

307. Kim, L., Liu, J., Kimmel, A.R., 1999. The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* 99, 399-408.
308. Kim, W., Kim, M., Jho, E.H., 2013. Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.* 450, 9-21.
309. King, B.F., 2007. Novel P2X7 receptor antagonists ease the pain. *Br. J. Pharmacol.* 151, 565-567.
310. King, B.F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S.S., Thomas, T., Spyer, K.M., Burnstock, G., 2000. Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 20, 4871-4877.
311. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K., Koizumi, S., 2013. Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). *Cell Mol. Neurobiol.* 33, 47-58.
312. Ko, H., Fricks, I., Ivanov, A.A., Harden, T.K., Jacobson, K.A., 2007. Structure-activity relationship of uridine 5'-diphosphoglucose analogues as agonists of the human P2Y14 receptor. *J. Med. Chem.* 50, 2030-2039.
313. Kobayashi, H., Gao, Y., Ueta, C., Yamaguchi, A., Komori, T., 2000. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 630-636.
314. Kobayashi, Y., Uehara, S., Udagawa, N., Takahashi, N., 2016. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J. Biochem.* 159, 387-392.
315. Kohri, K., Suzuki, Y., Yoshida, K., Yamamoto, K., Amasaki, N., Yamate, T., Umekawa, T., Iguchi, M., Sinohara, H., Kurita, T., 1992. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 859-864.
316. Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K., Kohsaka, S., 2013. Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61, 47-54.
317. Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., Inoue, K., 2007. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091-1095.
318. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T., 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
319. Koori, K., Maeda, H., Fujii, S., Tomokiyo, A., Kawachi, G., Hasegawa, D., Hamano, S., Sugii, H., Wada, N., Akamine, A., 2014. The roles of calcium-sensing receptor and calcium channel in osteogenic differentiation of undifferentiated periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res.* 357, 707-718.
320. Kugimiya, F., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Chikuda, H., Ohba, S., Yano, F., Ogata, N., Katagiri, T., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., Chung, U.I., 2005. Involvement of

- endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J. Biol. Chem.* 280, 35704-35712.
321. Kugimiya, F., Kawaguchi, H., Ohba, S., Kawamura, N., Hirata, M., Chikuda, H., Azuma, Y., Woodgett, J.R., Nakamura, K., Chung, U.I., 2007. GSK-3beta controls osteogenesis through regulating Runx2 activity. *PLoS. One.* 2, e837.
322. Kulkarni, N.H., Onyia, J.E., Zeng, Q., Tian, X., Liu, M., Halladay, D.L., Frolik, C.A., Engler, T., Wei, T., Kriauciunas, A., Martin, T.J., Sato, M., Bryant, H.U., Ma, Y.L., 2006. Orally bioavailable GSK-3alpha/beta dual inhibitor increases markers of cellular differentiation in vitro and bone mass in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 21, 910-920.
323. Kumagai, H., Sacktor, B., Filburn, C.R., 1991. Purinergic regulation of cytosolic calcium and phosphoinositide metabolism in rat osteoblast-like osteosarcoma cells. *J. Bone Miner. Res.* 6, 697-708.
324. Kumagai, H., Sakamoto, H., Guggino, S., Filburn, C.R., Sacktor, B., 1989. Neurotransmitter regulation of cytosolic calcium in osteoblast-like bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 45, 251-254.
325. Kumar, Y., Kapoor, I., Khan, K., Thacker, G., Khan, M.P., Shukla, N., Kanaujiya, J.K., Sanyal, S., Chattopadhyay, N., Trivedi, A.K., 2015. E3 Ubiquitin Ligase Fbw7 Negatively Regulates Osteoblast Differentiation by Targeting Runx2 for Degradation. *J. Biol. Chem.* 290, 30975-30987.
326. Lagerstrom, M.C., Schioth, H.B., 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 339-357.
327. Laiuppa, J.A., Santillan, G.E., 2016. Effect of Combined Action of Extracellular ATP and Elevated Calcium on Osteogenic Differentiation of Primary Cultures From Rat Calvaria. *J. Cell Biochem.* 117, 2658-2668.
328. Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S.P., Rossner, M.J., North, R.A., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., 2008. P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 28, 5473-5480.
329. Laplante, M.A., Monassier, L., Freund, M., Bousquet, P., Gachet, C., 2010. The purinergic P2Y1 receptor supports leptin secretion in adipose tissue. *Endocrinology* 151, 2060-2070.
330. Larue, L., Delmas, V., 2006. The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci.* 11, 733-742.
331. LaStayo, P.C., Winters, K.M., Hardy, M., 2003. Fracture healing: bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand. *J. Hand Ther.* 16, 81-93.
332. Lavery, K., Swain, P., Falb, D., Alaoui-Ismaili, M.H., 2008. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Biol. Chem.* 283, 20948-20958.
333. Lazarowski, E.R., Rochelle, L.G., O'Neal, W.K., Ribeiro, C.M., Grubb, B.R., Zhang, V., Harden, T.K., Boucher, R.C., 2001. Cloning and functional characterization of two murine

- uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 43-49.
334. Lazarowski, E.R., Sesma, J.I., Seminario-Vidal, L., Kreda, S.M., 2011. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Adv. Pharmacol.* 61, 221-261.
335. Lazarowski, E.R., Watt, W.C., Stutts, M.J., Boucher, R.C., Harden, T.K., 1995. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 116, 1619-1627.
336. Le, K.T., Babinski, K., Seguela, P., 1998. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J. Neurosci.* 18, 7152-7159.
337. Lee, C.H., Hung, H.W., Hung, P.H., Shieh, Y.S., 2010. Epidermal growth factor receptor regulates beta-catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *Mol. Cancer* 9, 64.
338. Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., Bae, S.C., 2000. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol. Cell Biol.* 20, 8783-8792.
339. Lee, N.K., Karsenty, G., 2008. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 8, 351.
340. Leipziger, J., 2003. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 284, F419-F432.
341. Lemoli, R.M., Ferrari, D., Fogli, M., Rossi, L., Pizzirani, C., Forchap, S., Chiozzi, P., Vaselli, D., Bertolini, F., Foutz, T., Aluigi, M., Baccarani, M., Di, V.F., 2004. Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. *Blood* 104, 1662-1670.
342. Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J.P., Gachet, C., 1999. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J. Clin. Invest* 104, 1731-1737.
343. Leon, C., Vial, C., Cazenave, J.P., Gachet, C., 1996. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor. *Gene* 171, 295-297.
344. Lerner, U.H., Sahlberg, K., Fredholm, B.B., 1987. Characterization of adenosine receptors in bone. Studies on the effect of adenosine analogues on cyclic AMP formation and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Acta Physiol Scand.* 131, 287-296.
345. Lesort, M., Jope, R.S., Johnson, G.V., 1999. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *J. Neurochem.* 72, 576-584.

346. Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R.A., Buell, G., Surprenant, A., 1995. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432-435.
347. Li, J., Khavandgar, Z., Lin, S.H., Murshed, M., 2011. Lithium chloride attenuates BMP-2 signaling and inhibits osteogenic differentiation through a novel WNT/. *Bone* 48, 321-331.
348. Li, J., Zhang, N., Huang, X., Xu, J., Fernandes, J.C., Dai, K., Zhang, X., 2013. Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation. *Cell Death. Dis.* 4, e832.
349. Li, W., Wei, S., Liu, C., Song, M., Wu, H., Yang, Y., 2016. Regulation of the osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow-derived stromal cells by extracellular uridine triphosphate: The role of P2Y2 receptor and ERK1/2 signaling. *Int. J. Mol. Med.* 37, 63-73.
350. Li, X., Gao, H., Uo, M., Sato, Y., Akasaka, T., Abe, S., Feng, Q., Cui, F., Watari, F., 2009. Maturation of osteoblast-like Saos2 induced by carbon nanotubes. *Biomed. Mater.* 4, 015005.
351. Li, Y.L., Xiao, Z.S., 2007. Advances in Runx2 regulation and its isoforms. *Med. Hypotheses* 68, 169-175.
352. Lian, J.B., Stein, G.S., Stewart, C., Puchacz, E., Mackowiak, S., Aronow, M., Von, D.M., Shalhoub, V., 1989. Osteocalcin: characterization and regulated expression of the rat gene. *Connect. Tissue Res.* 21, 61-68.
353. Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L., 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2, 329-333.
354. Lichtenstein, L., Serhan, N., Espinosa-Delgado, S., Fabre, A., Annema, W., Tietge, U.J., Robaye, B., Boeynaems, J.M., Laffargue, M., Perret, B., Martinez, L.O., 2015. Increased atherosclerosis in P2Y13/apolipoprotein E double-knockout mice: contribution of P2Y13 to reverse cholesterol transport. *Cardiovasc. Res.* 106, 314-323.
355. Lin, J.H., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2007. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev. Biol.* 302, 356-366.
356. Liu, B., Wu, S., Han, L., Zhang, C., 2015. beta-catenin signaling induces the osteoblastogenic differentiation of human pre-osteoblastic and bone marrow stromal cells mainly through the upregulation of osterix expression. *Int. J. Mol. Med.* 36, 1572-1582.
357. Liu, D., Genetos, D.C., Shao, Y., Geist, D.J., Li, J., Ke, H.Z., Turner, C.H., Duncan, R.L., 2008. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca(2+)- and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone* 42, 644-652.
358. Liu, F., Malaval, L., Gupta, A.K., Aubin, J.E., 1994. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev. Biol.* 166, 220-234.

359. Liu, F., Woitge, H.W., Braut, A., Kronenberg, M.S., Lichtler, A.C., Mina, M., Kream, B.E., 2004. Expression and activity of osteoblast-targeted Cre recombinase transgenes in murine skeletal tissues. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 645-653.
360. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
361. Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
362. Lopez-Herradon, A., Portal-Nunez, S., Garcia-Martin, A., Lozano, D., Perez-Martinez, F.C., Cena, V., Esbrit, P., 2013. Inhibition of the canonical Wnt pathway by high glucose can be reversed by parathyroid hormone-related protein in osteoblastic cells. *J. Cell Biochem.* 114, 1908-1916.
363. Lowery, J.W., Brookshire, B., Rosen, V., 2016. A Survey of Strategies to Modulate the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway: Current and Future Perspectives. *Stem Cells Int.* 2016, 7290686.
364. Lowery, J.W., Pazin, D., Intini, G., Kokabu, S., Chappuis, V., Capelo, L.P., Rosen, V., 2011. The role of BMP2 signaling in the skeleton. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 21, 177-185.
365. Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J., Julius, D., 1993. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 5113-5117.
366. Lyon, T., Scheele, W., Bhandari, M., Koval, K.J., Sanchez, E.G., Christensen, J., Valentin, A., Huard, F., 2013. Efficacy and safety of recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate matrix for closed tibial diaphyseal fracture: a double-blind, randomized, controlled phase-II/III trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 95, 2088-2096.
367. Lyritis, G.P., Georgoulas, T., Zafeiris, C.P., 2010. Bone anabolic versus bone anticatabolic treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1205, 277-283.
368. Ma, W., Korngreen, A., Uzlaner, N., Priel, Z., Silberberg, S.D., 1999. Extracellular sodium regulates airway ciliary motility by inhibiting a P2X receptor. *Nature* 400, 894-897.
369. Ma, W., Korngreen, A., Weil, S., Cohen, E.B., Priel, A., Kuzin, L., Silberberg, S.D., 2006. Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *J. Physiol* 571, 503-517.
370. MacKenzie, I., Burnstock, G., Dolly, J.O., 1982. The effects of purified botulinum neurotoxin type A on cholinergic, adrenergic and non-adrenergic, atropine-resistant autonomic neuromuscular transmission. *Neuroscience* 7, 997-1006.
371. Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.S., Mirams, M., 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 46-62.
372. MacLeod, R.J., Hayes, M., Pacheco, I., 2007. Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 293, G403-G411.

373. Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M.K., Torrekens, S., Roth, S.I., Mackem, S., Carmeliet, G., Kronenberg, H.M., 2010. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev. Cell* 19, 329-344.
374. Majeska, R.J., Nair, B.C., Rodan, G.A., 1985. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *Endocrinology* 116, 170-179.
375. Mak, T.W., Shek, C.C., Chow, C.C., Wing, Y.K., Lee, S., 1998. Effects of lithium therapy on bone mineral metabolism: a two-year prospective longitudinal study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 3857-3859.
376. Malin, S.A., Molliver, D.C., 2010. Gi- and Gq-coupled ADP (P2Y) receptors act in opposition to modulate nociceptive signaling and inflammatory pain behavior. *Mol. Pain* 6, 21.
377. Malmsjo, M., Hou, M., Pendergast, W., Erlinge, D., Edvinsson, L., 2003. Potent P2Y6 receptor mediated contractions in human cerebral arteries. *BMC. Pharmacol.* 3, 4.
378. Manolagas, S.C., Parfitt, A.M., 2010. What old means to bone. *Trends Endocrinol. Metab* 21, 369-374.
379. Maricic, M., 2007. New and emerging treatments for osteoporosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 364-369.
380. Marie, P.J., 2006. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18 Suppl 1, S11-S15.
381. Marie, P.J., Kassem, M., 2011. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 1-10.
382. Mark, M.P., Butler, W.T., Prince, C.W., Finkelman, R.D., Ruch, J.V., 1988. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation* 37, 123-136.
383. Marteau, F., Le, P.E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J.M., Gonzalez, N.S., 2003. Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol. Pharmacol.* 64, 104-112.
384. Marti, N., Villalon, G., Lopez, V., Martin, J.M., Calduch, L., Jorda, E., 2008. Onychodysplasia of the fingers. *Pediatr. Dermatol.* 25, 381-382.
385. Martin, T.J., Sims, N.A., Ng, K.W., 2008. Regulatory pathways revealing new approaches to the development of anabolic drugs for osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 19, 1125-1138.
386. Mastrangelo, L., Kim, J.E., Miyahara, A., Kang, T.H., Friedmann, T., 2012. Purinergic signaling in human pluripotent stem cells is regulated by the housekeeping gene encoding hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 3377-3382.

387. McCarthy, T.L., Centrella, M., 2010. Novel links among Wnt and TGF-beta signaling and Runx2. *Mol. Endocrinol.* 24, 587-597.
388. McCloskey, M.A., Fan, Y., Luther, S., 1999. Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J. Immunol.* 163, 970-977.
389. Meis, S., Hamacher, A., Hongwiset, D., Marzian, C., Wiese, M., Eckstein, N., Royer, H.D., Communi, D., Boeynaems, J.M., Hausmann, R., Schmalzing, G., Kassack, M.U., 2010. NF546 [4,4'-(carbonylbis(imino-3,1-phenylene-carbonylimino-3,1-(4-methylphenylene)-carbonylimino))-bis(1,3-xylene-alpha,alpha'-diphosphonic acid) tetrasodium salt] is a non-nucleotide P2Y11 agonist and stimulates release of interleukin-8 from human monocyte-derived dendritic cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 238-247.
390. Meister, J., Le, D.D., Ricken, A., Burkhardt, R., Thiery, J., Pfannkuche, H., Polte, T., Grosse, J., Schoneberg, T., Schulz, A., 2014. The G protein-coupled receptor P2Y14 influences insulin release and smooth muscle function in mice. *J. Biol. Chem.* 289, 23353-23366.
391. Midura, R.J., Wang, A., Lovitch, D., Law, D., Powell, K., Gorski, J.P., 2004. Bone acidic glycoprotein-75 delineates the extracellular sites of future bone sialoprotein accumulation and apatite nucleation in osteoblastic cultures. *J. Biol. Chem.* 279, 25464-25473.
392. Mikels, A.J., Nusse, R., 2006. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4, e115.
393. Milligan, G., 2009. G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br. J. Pharmacol.* 158, 5-14.
394. Milosevic, J., Brandt, A., Roemuss, U., Arnold, A., Wegner, F., Schwarz, S.C., Storch, A., Zimmermann, H., Schwarz, J., 2006. Uracil nucleotides stimulate human neural precursor cell proliferation and dopaminergic differentiation: involvement of MEK/ERK signalling. *J. Neurochem.* 99, 913-923.
395. Miras-Portugal, M.T., Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J., Diaz-Hernandez, J.I., Artalejo, A.R., Ortega, F., Delicado, E.G., Perez-Sen, R., 2016. Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology* 104, 243-254.
396. Mitchell, C., Syed, N.I., Tengah, A., Gurney, A.M., Kennedy, C., 2012. Identification of contractile P2Y1, P2Y6, and P2Y12 receptors in rat intrapulmonary artery using selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 755-762.
397. Morente, V., Perez-Sen, R., Ortega, F., Huerta-Cepas, J., Delicado, E.G., Miras-Portugal, M.T., 2014. Neuroprotection elicited by P2Y13 receptors against genotoxic stress by inducing DUSP2 expression and MAPK signaling recovery. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1886-1898.
398. Moskalewski, S., Boonekamp, P.M., Scherft, J.P., 1983. Bone formation by isolated calvarial osteoblasts in syngeneic and allogeneic transplants: light microscopic observations. *Am. J. Anat.* 167, 249-263.

399. Mountziaris, P.M., Mikos, A.G., 2008. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 14, 179-186.
400. Muller, T., Robaye, B., Vieira, R.P., Ferrari, D., Grimm, M., Jakob, T., Martin, S.F., Di, V.F., Boeynaems, J.M., Virchow, J.C., Idzko, M., 2010. The purinergic receptor P2Y₂ receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 65, 1545-1553.
401. Mulryan, K., Gitterman, D.P., Lewis, C.J., Vial, C., Leckie, B.J., Cobb, A.L., Brown, J.E., Conley, E.C., Buell, G., Pritchard, C.A., Evans, R.J., 2000. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors. *Nature* 403, 86-89.
402. Mundasad, M.V., Novack, G.D., Allgood, V.E., Evans, R.M., Gorden, J.C., Yerxa, B.R., 2001. Ocular safety of INS365 ophthalmic solution: a P2Y₂ agonist in healthy subjects. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 17, 173-179.
403. Nakade, O., Takahashi, K., Takuma, T., Aoki, T., Kaku, T., 2001. Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic protein-2 and -4 of normal human bone cells. *J. Bone Miner. Metab* 19, 13-19.
404. Nakajo, T., Yamatsuji, T., Ban, H., Shigemitsu, K., Haisa, M., Motoki, T., Noma, K., Nobuhisa, T., Matsuoka, J., Gunduz, M., Yonezawa, K., Tanaka, N., Naomoto, Y., 2005. Glutamine is a key regulator for amino acid-controlled cell growth through the mTOR signaling pathway in rat intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 174-180.
405. Nakamura, E., Uezono, Y., Narusawa, K., Shibuya, I., Oishi, Y., Tanaka, M., Yanagihara, N., Nakamura, T., Izumi, F., 2000. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279, C510-C519.
406. Nakamura, S., Matsumoto, T., Sasaki, J., Egusa, H., Lee, K.Y., Nakano, T., Sohmura, T., Nakahira, A., 2010. Effect of calcium ion concentrations on osteogenic differentiation and hematopoietic stem cell niche-related protein expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A* 16, 2467-2473.
407. Nakanishi, R., Akiyama, H., Kimura, H., Otsuki, B., Shimizu, M., Tsuboyama, T., Nakamura, T., 2008. Osteoblast-targeted expression of Sfrp4 in mice results in low bone mass. *J. Bone Miner. Res.* 23, 271-277.
408. Nakano, Y., Addison, W.N., Kaartinen, M.T., 2007. ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* 41, 549-561.
409. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de, C.B., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29.
410. Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T., Ohno, Y., 2005. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X₂ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 518, 107-110.

411. Narayanan, A., Sampey, G., Van, D.R., Guendel, I., Kehn-Hall, K., Roman, J., Curren, R., Galons, H., Oumata, N., Joseph, B., Meijer, L., Caputi, M., Nekhai, S., Kashanchi, F., 2012. Use of ATP analogs to inhibit HIV-1 transcription. *Virology* 432, 219-231.
412. Neary, J.T., Kang, Y., 2006. P2 purinergic receptors signal to glycogen synthase kinase-3beta in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 84, 515-524.
413. Newsholme, E.A., Calder, P.C., 1997. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. *Nutrition* 13, 728-730.
414. Nicke, A., Baumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., Schmalzing, G., 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17, 3016-3028.
415. Nicke, A., Kerschensteiner, D., Soto, F., 2005. Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J. Neurochem.* 92, 925-933.
416. Nijweide, P.J., van Iperen-van Gent AS, Kawilarang-de Haas, E.W., van der Plas, A., Wassenaar, A.M., 1982. Bone formation and calcification by isolated osteoblastlike cells. *J. Cell Biol.* 93, 318-323.
417. Nomura, S., Wills, A.J., Edwards, D.R., Heath, J.K., Hogan, B.L., 1988. Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J. Cell Biol.* 106, 441-450.
418. Noronha-Matos, J.B., Coimbra, J., Sa-e-Sousa, Rocha, R., Marinhas, J., Freitas, R., Guerra-Gomes, S., Ferreirinha, F., Costa, M.A., Correia-de-Sa, P., 2014. P2X7-induced zeiosis promotes osteogenic differentiation and mineralization of postmenopausal bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FASEB J.* 28, 5208-5222.
419. Noronha-Matos, J.B., Costa, M.A., Magalhaes-Cardoso, M.T., Ferreirinha, F., Pelletier, J., Freitas, R., Neves, J.M., Sevigny, J., Correia-de-Sa, P., 2012. Role of ecto-NTPDases on UDP-sensitive P2Y(6) receptor activation during osteogenic differentiation of primary bone marrow stromal cells from postmenopausal women. *J. Cell Physiol* 227, 2694-2709.
420. North, R.A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82, 1013-1067.
421. Odvina, C.V., Zerwekh, J.E., Rao, D.S., Maalouf, N., Gottschalk, F.A., Pak, C.Y., 2005. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 1294-1301.
422. Ohnaka, K., Tanabe, M., Kawate, H., Nawata, H., Takayanagi, R., 2005. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 177-181.
423. Okumura, H., Shiba, D., Kubo, T., Yokoyama, T., 2008. P2X7 receptor as sensitive flow sensor for ERK activation in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 486-490.
424. Omatsu-Kanbe, M., Inoue, K., Fujii, Y., Yamamoto, T., Isono, T., Fujita, N., Matsuura, H., 2006. Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem. J.* 393, 171-180.

425. Oreffo, R.O., Cooper, C., Mason, C., Clements, M., 2005. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev.* 1, 169-178.
426. Orimo, H., 2010. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch* 77, 4-12.
427. Orriss, I., Syberg, S., Wang, N., Robaye, B., Gartland, A., Jorgensen, N., Arnett, T., Boeynaems, J.M., 2011. Bone phenotypes of P2 receptor knockout mice. *Front Biosci. (Schol. Ed)* 3, 1038-1046.
428. Orriss, I.R., Hajjawi, M.O., Huesa, C., MacRae, V.E., Arnett, T.R., 2014. Optimisation of the differing conditions required for bone formation in vitro by primary osteoblasts from mice and rats. *Int. J. Mol. Med.* 34, 1201-1208.
429. Orriss, I.R., Key, M.L., Brandao-Burch, A., Patel, J.J., Burnstock, G., Arnett, T.R., 2012. The regulation of osteoblast function and bone mineralisation by extracellular nucleotides: The role of p2x receptors. *Bone* 51, 389-400.
430. Orriss, I.R., Key, M.L., Hajjawi, M.O., Arnett, T.R., 2013. Extracellular ATP released by osteoblasts is a key local inhibitor of bone mineralisation. *PLoS. One.* 8, e69057.
431. Orriss, I.R., Knight, G.E., Ranasinghe, S., Burnstock, G., Arnett, T.R., 2006. Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation. *Bone* 39, 300-309.
432. Orriss, I.R., Knight, G.E., Utting, J.C., Taylor, S.E., Burnstock, G., Arnett, T.R., 2009. Hypoxia stimulates vesicular ATP release from rat osteoblasts. *J. Cell Physiol* 220, 155-162.
433. Orriss, I.R., Utting, J.C., Brandao-Burch, A., Colston, K., Grubb, B.R., Burnstock, G., Arnett, T.R., 2007. Extracellular nucleotides block bone mineralization in vitro: evidence for dual inhibitory mechanisms involving both P2Y2 receptors and pyrophosphate. *Endocrinology* 148, 4208-4216.
434. Orriss, I.R., Wang, N., Burnstock, G., Arnett, T.R., Gartland, A., Robaye, B., Boeynaems, J.M., 2011a. The P2Y(6) receptor stimulates bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 152, 3706-3716.
435. Orriss, I.R., Wang, N., Burnstock, G., Arnett, T.R., Gartland, A., Robaye, B., Boeynaems, J.M., 2011b. The P2Y(6) receptor stimulates bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 152, 3706-3716.
436. Ortega, F., Perez-Sen, R., Delicado, E.G., Miras-Portugal, M.T., 2009. P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotox. Res.* 15, 193-204.
437. Ortega, F., Perez-Sen, R., Delicado, E.G., Teresa Miras-Portugal, M., 2011. ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology* 61, 1210-1221.
438. Ortega, F., Perez-Sen, R., Miras-Portugal, M.T., 2008. Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J. Neurochem.* 104, 62-73.

439. Ortega, F., Perez-Sen, R., Morente, V., Delicado, E.G., Miras-Portugal, M.T., 2010. P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol. Life Sci.* 67, 1723-1733.
440. Oryan, A., Monazzah, S., Bigham-Sadegh, A., 2015. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed. Environ. Sci.* 28, 57-71.
441. Pai, R., Dunlap, D., Qing, J., Mohtashemi, I., Hotzel, K., French, D.M., 2008. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res.* 68, 5086-5095.
442. Panaroni, C., Tzeng, Y.S., Saeed, H., Wu, J.Y., 2014. Mesenchymal progenitors and the osteoblast lineage in bone marrow hematopoietic niches. *Curr. Osteoporos. Rep.* 12, 22-32.
443. Panupinthu, N., Rogers, J.T., Zhao, L., Solano-Flores, L.P., Possmayer, F., Sims, S.M., Dixon, S.J., 2008. P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J. Cell Biol.* 181, 859-871.
444. Parr, C.E., Sullivan, D.M., Paradiso, A.M., Lazarowski, E.R., Burch, L.H., Olsen, J.C., Erb, L., Weisman, G.A., Boucher, R.C., Turner, J.T., 1994. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 13067.
445. Phimpilai, M., Zhao, Z., Boules, H., Roca, H., Franceschi, R.T., 2006. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J. Bone Miner. Res.* 21, 637-646.
446. Pietschmann, P., Rauner, M., Sipos, W., Kersch-Schindl, K., 2009. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease--a mini-review. *Gerontology* 55, 3-12.
447. Pillois, X., Chaulet, H., Belloc, I., Dupuch, F., Desgranges, C., Gadeau, A.P., 2002. Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* 90, 678-681.
448. Pines, A., Romanello, M., Cesaratto, L., Damante, G., Moro, L., D'andrea, P., Tell, G., 2003. Extracellular ATP stimulates the early growth response protein 1 (Egr-1) via a protein kinase C-dependent pathway in the human osteoblastic HOBIT cell line. *Biochem. J.* 373, 815-824.
449. Piri, F.Q., Abayahoudian, R., Elashoff, D., Parhami, F., Nervina, J.M., Tetradis, S., 2008. Nuclear receptor profile in calvarial bone cells undergoing osteogenic versus adipogenic differentiation. *J. Cell Biochem.* 105, 1316-1326.
450. Placido, R., Auricchio, G., Falzoni, S., Battistini, L., Colizzi, V., Brunetti, E., Di, V.F., Mancino, G., 2006. P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis reducing the intracellular bacterial viability. *Cell Immunol.* 244, 10-18.
451. Playford, M.P., Bicknell, D., Bodmer, W.F., Macaulay, V.M., 2000. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12103-12108.

452. Plyte, S.E., Hughes, K., Nikolakaki, E., Pulverer, B.J., Woodgett, J.R., 1992. Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim. Biophys. Acta* 1114, 147-162.
453. Pochet, S., Garcia-Marcos, M., Seil, M., Otto, A., Marino, A., Dehaye, J.P., 2007. Contribution of two ionotropic purinergic receptors to ATP responses in submandibular gland ductal cells. *Cell Signal.* 19, 2155-2164.
454. Popp, T., Steinritz, D., Breit, A., Deppe, J., Egea, V., Schmidt, A., Gudermann, T., Weber, C., Ries, C., 2014. Wnt5a/beta-catenin signaling drives calcium-induced differentiation of human primary keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 134, 2183-2191.
455. Pozarowski, P., Darzynkiewicz, Z., 2004. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 281, 301-311.
456. Prince, C.W., Oosawa, T., Butler, W.T., Tomana, M., Bhowm, A.S., Bhowm, M., Schrohenloher, R.E., 1987. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J. Biol. Chem.* 262, 2900-2907.
457. Puchtler, H., Meloan, S.N., Terry, M.S., 1969. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 110-124.
458. Qi, A.D., Zambon, A.C., Insel, P.A., Nicholas, R.A., 2001. An arginine/glutamine difference at the juxtaposition of transmembrane domain 6 and the third extracellular loop contributes to the markedly different nucleotide selectivities of human and canine P2Y₁₁ receptors. *Mol. Pharmacol.* 60, 1375-1382.
459. Qi, J., Chi, L., Wang, J., Sumanasinghe, R., Wall, M., Tsuzaki, M., Banes, A.J., 2009. Modulation of collagen gel compaction by extracellular ATP is MAPK and NF-kappaB pathways dependent. *Exp. Cell Res.* 315, 1990-2000.
460. Quarles, L.D., Yohay, D.A., Lever, L.W., Caton, R., Wenstrup, R.J., 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J. Bone Miner. Res.* 7, 683-692.
461. Quintas, C., Pinho, D., Pereira, C., Saraiva, L., Goncalves, J., Queiroz, G., 2014. Microglia P2Y₆ receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *J. Neuroinflammation.* 11, 141.
462. Rabadi, M.M., Lee, H.T., 2015. Adenosine receptors and renal ischaemia reperfusion injury. *Acta Physiol (Oxf)* 213, 222-231.
463. Reginster, J.Y., Sarlet, N., 2006. The treatment of severe postmenopausal osteoporosis : a review of current and emerging therapeutic options. *Treat. Endocrinol.* 5, 15-23.
464. Reimer, W.J., Dixon, S.J., 1992. Extracellular nucleotides elevate [Ca²⁺]_i in rat osteoblastic cells by interaction with two receptor subtypes. *Am. J. Physiol* 263, C1040-C1048.
465. Rhoads, J.M., Argenzio, R.A., Chen, W., Rippe, R.A., Westwick, J.K., Cox, A.D., Berschneider, H.M., Brenner, D.A., 1997. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am. J. Physiol* 272, G943-G953.

466. Rieg, T., Gerasimova, M., Boyer, J.L., Insel, P.A., Vallon, V., 2011. P2Y(2) receptor activation decreases blood pressure and increases renal Na(+) excretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R510-R518.
467. Robaye, B., Ghanem, E., Wilkin, F., Fokan, D., Van, D.W., Schurmans, S., Boeynaems, J.M., Beauwens, R., 2003. Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y4-null mice. *Mol. Pharmacol.* 63, 777-783.
468. Rodan, G.A., Rodan, S.B., 1984. Hormone-adenylate cyclase coupling in osteosarcoma clonal cell lines. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Protein Phosphorylation. Res.* 17, 127-134.
469. Rodrigues-Ribeiro, R., Alvarenga, E.C., Calio, M.L., Paredes-Gamero, E.J., Ferreira, A.T., 2015. Dual role of P2 receptors during osteoblast differentiation. *Cell Biochem. Biophys.* 71, 1225-1233.
470. Rolf, M.G., Brearley, C.A., Mahaut-Smith, M.P., 2001. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thromb. Haemost.* 85, 303-308.
471. Rolf, M.G., Mahaut-Smith, M.P., 2002. Effects of enhanced P2X1 receptor Ca²⁺ influx on functional responses in human platelets. *Thromb. Haemost.* 88, 495-502.
472. Romanello, M., Bivi, N., Pines, A., Deganuto, M., Quadrioglio, F., Moro, L., Tell, G., 2006. Bisphosphonates activate nucleotide receptors signaling and induce the expression of Hsp90 in osteoblast-like cell lines. *Bone* 39, 739-753.
473. Romanello, M., Codognotto, A., Bicego, M., Pines, A., Tell, G., D'Andrea, P., 2005. Autocrine/paracrine stimulation of purinergic receptors in osteoblasts: contribution of vesicular ATP release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1429-1438.
474. Romanello, M., Pani, B., Bicego, M., D'Andrea, P., 2001. Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1275-1281.
475. Romanov, R.A., Rogachevskaja, O.A., Bystrova, M.F., Jiang, P., Margolskee, R.F., Kolesnikov, S.S., 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* 26, 657-667.
476. Romereim, S.M., Conoan, N.H., Chen, B., Dudley, A.T., 2014. A dynamic cell adhesion surface regulates tissue architecture in growth plate cartilage. *Development* 141, 2085-2095.
477. Rong, W., Gourine, A.V., Cockayne, D.A., Xiang, Z., Ford, A.P., Spyer, K.M., Burnstock, G., 2003. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J. Neurosci.* 23, 11315-11321.
478. Rossato, M., La Sala, G.B., Balasini, M., Taricco, F., Galeazzi, C., Ferlin, A., Foresta, C., 1999. Sperm treatment with extracellular ATP increases fertilization rates in in-vitro fertilization for male factor infertility. *Hum. Reprod.* 14, 694-697.
479. Rossi, L., Manfredini, R., Bertolini, F., Ferrari, D., Fogli, M., Zini, R., Salati, S., Salvestrini, V., Gulinelli, S., Adinolfi, E., Ferrari, S., Di, V.F., Baccarani, M., Lemoli, R.M., 2007. The

- extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood* 109, 533-542.
480. Roux, C., Fechtenbaum, J., Kolta, S., Briot, K., Girard, M., 2007. Mild prevalent and incident vertebral fractures are risk factors for new fractures. *Osteoporos. Int.* 18, 1617-1624.
481. Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Iol, C., Munemitsu, S., Polakis, P., 1996. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023-1026.
482. Ryoo, H.M., Lee, M.H., Kim, Y.J., 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 366, 51-57.
483. Saad, F.A., Salih, E., Glimcher, M.J., 2008. Identification of osteopontin phosphorylation sites involved in bone remodeling and inhibition of pathological calcification. *J. Cell Biochem.* 103, 852-856.
484. Sabirov, R.Z., Okada, Y., 2009. The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *J. Physiol Sci.* 59, 3-21.
485. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di, C.S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., Bianco, P., 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324-336.
486. Salvestrini, V., Zini, R., Rossi, L., Gulinelli, S., Manfredini, R., Bianchi, E., Piacibello, W., Caione, L., Migliardi, G., Ricciardi, M.R., Tafuri, A., Romano, M., Salati, S., Di, V.F., Ferrari, S., Baccarani, M., Ferrari, D., Lemoli, R.M., 2012. Purinergic signaling inhibits human acute myeloblastic leukemia cell proliferation, migration, and engraftment in immunodeficient mice. *Blood* 119, 217-226.
487. Samways, D.S., Egan, T.M., 2007. Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J. Gen. Physiol* 129, 245-256.
488. Satyamoorthy, K., Li, G., Vaidya, B., Patel, D., Herlyn, M., 2001. Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res.* 61, 7318-7324.
489. Saunders, B.M., Fernando, S.L., Sluyter, R., Britton, W.J., Wiley, J.S., 2003. A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of mycobacteria. *J. Immunol.* 171, 5442-5446.
490. Scarfi, S., 2016. Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair. *World J. Stem Cells* 8, 1-12.
491. Schett, G., Coates, L.C., Ash, Z.R., Finzel, S., Conaghan, P.G., 2011. Structural damage in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: traditional views, novel insights gained from TNF blockade, and concepts for the future. *Arthritis Res. Ther.* 13 Suppl 1, S4.

492. Schett, G., Stolina, M., Dwyer, D., Zack, D., Uderhardt, S., Kronke, G., Kostenuik, P., Feige, U., 2009. Tumor necrosis factor alpha and RANKL blockade cannot halt bony spur formation in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 2644-2654.
493. Schnermann, J., Levine, D.Z., 2003. Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu. Rev. Physiol* 65, 501-529.
494. Schofl, C., Cuthbertson, K.S., Walsh, C.A., Mayne, C., Cobbold, P., von zur, M.A., Hesch, R.D., Gallagher, J.A., 1992. Evidence for P2-purinoreceptors on human osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* 7, 485-491.
495. Schulze-Lohoff, E., Hugo, C., Rost, S., Arnold, S., Gruber, A., Brune, B., Sterzel, R.B., 1998. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am. J. Physiol* 275, F962-F971.
496. Schwiebert, E.M., Zsembery, A., 2003. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1615, 7-32.
497. Seror, C., Melki, M.T., Subra, F., Raza, S.Q., Bras, M., Saidi, H., Nardacci, R., Voisin, L., Paoletti, A., Law, F., Martins, I., Amendola, A., Abdul-Sater, A.A., Ciccocanti, F., Delelis, O., Niedergang, F., Thierry, S., Said-Sadier, N., Lamaze, C., Metivier, D., Estaquier, J., Fimia, G.M., Falasca, L., Casetti, R., Modjtahedi, N., Kanellopoulos, J., Mouscadet, J.F., Ojcius, D.M., Piacentini, M., Gougeon, M.L., Kroemer, G., Perfettini, J.L., 2011. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 208, 1823-1834.
498. Sesma, J.I., Kreda, S.M., Steinckwich-Besancon, N., Dang, H., Garcia-Mata, R., Harden, T.K., Lazarowski, E.R., 2012. The UDP-sugar-sensing P2Y(14) receptor promotes Rho-mediated signaling and chemotaxis in human neutrophils. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 303, C490-C498.
499. Shabbir, M., Burnstock, G., 2009. Purinergic receptor-mediated effects of adenosine 5'-triphosphate in urological malignant diseases. *Int. J. Urol.* 16, 143-150.
500. Shemon, A.N., Sluyter, R., Fernando, S.L., Clarke, A.L., Dao-Ung, L.P., Skarratt, K.K., Saunders, B.M., Tan, K.S., Gu, B.J., Fuller, S.J., Britton, W.J., Petrou, S., Wiley, J.S., 2006. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J. Biol. Chem.* 281, 2079-2086.
501. Shen, M.R., Linden, J., Chiang, P.H., Chen, S.S., Wu, S.N., 1993. Adenosine stimulates human sperm motility via A2 receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 650-653.
502. Shevtsov, S.P., Haq, S., Force, T., 2006. Activation of beta-catenin signaling pathways by classical G-protein-coupled receptors: mechanisms and consequences in cycling and non-cycling cells. *Cell Cycle* 5, 2295-2300.
503. Shimegi, S., 1996. ATP and adenosine act as a mitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Calcif. Tissue Int.* 58, 109-113.
504. Shimegi, S., 1998. Mitogenic action of adenosine on osteoblast-like cells, MC3T3-E1. *Calcif. Tissue Int.* 62, 418-425.

505. Siggelkow, H., Rebenstorff, K., Kurre, W., Niedhart, C., Engel, I., Schulz, H., Atkinson, M.J., Hufner, M., 1999. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J. Cell Biochem.* 75, 22-35.
506. Sila-Asna, M., Bunyaratvej, A., Maeda, S., Kitaguchi, H., Bunyaratavej, N., 2007. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J. Med. Sci.* 53, 25-35.
507. Silver, I.A., Murrills, R.J., Etherington, D.J., 1988. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 175, 266-276.
508. Sim, J.A., Chaumont, S., Jo, J., Ulmann, L., Young, M.T., Cho, K., Buell, G., North, R.A., Rassendren, F., 2006. Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J. Neurosci.* 26, 9006-9009.
509. Simic, P., Culej, J.B., Orlic, I., Grgurevic, L., Draca, N., Spaventi, R., Vukicevic, S., 2006. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J. Biol. Chem.* 281, 25509-25521.
510. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Boyle, W.J., 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
511. Sims, N.A., White, C.P., Sunn, K.L., Thomas, G.P., Drummond, M.L., Morrison, N.A., Eisman, J.A., Gardiner, E.M., 1997. Human and murine osteocalcin gene expression: conserved tissue restricted expression and divergent responses to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in vivo. *Mol. Endocrinol.* 11, 1695-1708.
512. Solini, A., Iacobini, C., Ricci, C., Chiozzi, P., Amadio, L., Pricci, F., Di, M.U., Di, V.F., Pugliese, G., 2005. Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: role in diabetic and other glomerular diseases. *Kidney Int.* 67, 875-885.
513. Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C.A., 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125-132.
514. Sommerfeldt, D.W., Rubin, C.T., 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur. Spine J.* 10 Suppl 2, S86-S95.
515. Sondergaard, B.C., Oestergaard, S., Christiansen, C., Tanko, L.B., Karsdal, M.A., 2007. The effect of oral calcitonin on cartilage turnover and surface erosion in an ovariectomized rat model. *Arthritis Rheum.* 56, 2674-2678.
516. Spelta, V., Jiang, L.H., Surprenant, A., North, R.A., 2002. Kinetics of antagonist actions at rat P2X2/3 heteromeric receptors. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1524-1530.

517. Spencer, G.J., Utting, J.C., Etheridge, S.L., Arnett, T.R., Genever, P.G., 2006. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J. Cell Sci.* 119, 1283-1296.
518. Spyer, K.M., Dale, N., Gourine, A.V., 2004. ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Exp. Physiol* 89, 53-59.
519. Stambolic, V., Ruel, L., Woodgett, J.R., 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.* 6, 1664-1668.
520. Stambolic, V., Woodgett, J.R., 1994. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem. J.* 303 (Pt 3), 701-704.
521. Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A., North, R.A., 1999. Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol. Pharmacol.* 56, 973-981.
522. Su, X., Floyd, D.H., Hughes, A., Xiang, J., Schneider, J.G., Uluckan, O., Heller, E., Deng, H., Zou, W., Craft, C.S., Wu, K., Hirbe, A.C., Grabowska, D., Eagleton, M.C., Townsley, S., Collins, L., Piwnica-Worms, D., Steinberg, T.H., Novack, D.V., Conley, P.B., Hurchla, M.A., Rogers, M., Weilbaecher, K.N., 2012. The ADP receptor P2RY12 regulates osteoclast function and pathologic bone remodeling. *J. Clin. Invest* 122, 3579-3592.
523. Sugimoto, T., Kanatani, M., Kano, J., Kaji, H., Tsukamoto, T., Yamaguchi, T., Fukase, M., Chihara, K., 1993. Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* 8, 1445-1452.
524. Sun, D., Junger, W.G., Yuan, C., Zhang, W., Bao, Y., Qin, D., Wang, C., Tan, L., Qi, B., Zhu, D., Zhang, X., Yu, T., 2013. Shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through ATP release and activation of P2X7 receptors. *Stem Cells* 31, 1170-1180.
525. Sun, S., 2008. Bone disease drug discovery: examining the interactions between osteoblast and osteoclast. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 12, 239-251.
526. Surprenant, A., North, R.A., 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu. Rev. Physiol* 71, 333-359.
527. Suzuki, A., Kotoyori, J., Oiso, Y., Kozawa, O., 1993. Prostaglandin E2 is a potential mediator of extracellular ATP action in osteoblast-like cells. *Cell Adhes. Commun.* 1, 113-118.
528. Suzuki, A., Shinoda, J., Oiso, Y., Kozawa, O., 1995. Mechanism of phospholipase D activation induced by extracellular ATP in osteoblast-like cells. *J. Endocrinol.* 145, 81-86.
529. Suzuki, T., Namba, K., Tsuga, H., Nakata, H., 2006. Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 559-565.
530. Syberg, S., Brandao-Burch, A., Patel, J.J., Hajjawi, M., Arnett, T.R., Schwarz, P., Jorgensen, N.R., Orriss, I.R., 2012. Clopidogrel (Plavix), a P2Y12 receptor antagonist,

- inhibits bone cell function in vitro and decreases trabecular bone in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 27, 2373-2386.
531. Symons, J.R., LeVea, C.M., Mooney, R.A., 2002. Expression of the leucocyte common antigen-related (LAR) tyrosine phosphatase is regulated by cell density through functional E-cadherin complexes. *Biochem. J.* 365, 513-519.
532. Szondy, Z., Newsholme, E.A., 1991. The effect of time of addition of glutamine or nucleosides on proliferation of rat cervical lymph-node T-lymphocytes after stimulation by concanavalin A. *Biochem. J.* 278 (Pt 2), 471-474.
533. Taipaleenmaki, H., Bjerre, H.L., Chen, L., Kauppinen, S., Kassem, M., 2012. Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs: targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *Eur. J. Endocrinol.* 166, 359-371.
534. Takasaki, J., Kamohara, M., Saito, T., Matsumoto, M., Matsumoto, S., Ohishi, T., Soga, T., Matsushime, H., Furuichi, K., 2001. Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol. Pharmacol.* 60, 432-439.
535. Takayanagi, H., 2007. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 292-304.
536. Tang, Y., Zhou, X., Gao, B., Xu, X., Sun, J., Cheng, L., Zhou, X., Zheng, L., 2014. Modulation of Wnt/beta-catenin signaling attenuates periapical bone lesions. *J. Dent. Res.* 93, 175-182.
537. Taurin, S., Sandbo, N., Yau, D.M., Sethakorn, N., Dulin, N.O., 2008. Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 294, C1169-C1174.
538. Taylor, S.R., Turner, C.M., Elliott, J.I., McDaid, J., Hewitt, R., Smith, J., Pickering, M.C., Whitehouse, D.L., Cook, H.T., Burnstock, G., Pusey, C.D., Unwin, R.J., Tam, F.W., 2009. P2X7 deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1275-1281.
539. Tenenbaum, H.C., 1981. Role of organic phosphate in mineralization of bone in vitro. *J. Dent. Res.* 60 Spec No C, 1586-1589.
540. Tenenbaum, H.C., Heersche, J.N., 1982. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 34, 76-79.
541. Tenenbaum, H.C., Heersche, J.N., 1985. Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology* 117, 2211-2217.
542. Thi, M.M., Islam, S., Suadicani, S.O., Spray, D.C., 2012. Connexin43 and pannexin1 channels in osteoblasts: who is the "hemichannel"? *J. Membr. Biol.* 245, 401-409.
543. Thirunavukkarasu, K., Halladay, D.L., Miles, R.R., Yang, X., Galvin, R.J., Chandrasekhar, S., Martin, T.J., Onyia, J.E., 2000. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J. Biol. Chem.* 275, 25163-25172.

544. Thouverey, C., Caverzasio, J., 2015. Sclerostin inhibits osteoblast differentiation without affecting BMP2/SMAD1/5 or Wnt3a/beta-catenin signaling but through activation of platelet-derived growth factor receptor signaling in vitro. *Bonekey. Rep.* 4, 757.
545. Titorencu, I., Pruna, V., Jinga, V.V., Simionescu, M., 2014. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res.* 355, 23-33.
546. Tobimatsu, T., Kaji, H., Sowa, H., Naito, J., Canaff, L., Hendy, G.N., Sugimoto, T., Chihara, K., 2006. Parathyroid hormone increases beta-catenin levels through Smad3 in mouse osteoblastic cells. *Endocrinology* 147, 2583-2590.
547. Tokuyama, Y., Hara, M., Jones, E.M., Fan, Z., Bell, G.I., 1995. Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 211-218.
548. Torres, B., Zambon, A.C., Insel, P.A., 2002. P2Y11 receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells. A mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *J. Biol. Chem.* 277, 7761-7765.
549. Torres, G.E., Egan, T.M., Voigt, M.M., 1999. Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J. Biol. Chem.* 274, 22359-22365.
550. Torres, G.E., Haines, W.R., Egan, T.M., Voigt, M.M., 1998. Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol. Pharmacol.* 54, 989-993.
551. Tosteson, A.N., Hammond, C.S., 2002. Quality-of-life assessment in osteoporosis: health-status and preference-based measures. *Pharmacoeconomics.* 20, 289-303.
552. Toulis, K.A., Anastasilakis, A.D., Polyzos, S.A., Makras, P., 2011. Targeting the osteoblast: approved and experimental anabolic agents for the treatment of osteoporosis. *Hormones. (Athens.)* 10, 174-195.
553. Trang, T., Salter, M.W., 2012. P2X4 purinoceptor signaling in chronic pain. *Purinergic. Signal.* 8, 621-628.
554. Trivedi, R., Goswami, R., Chattopadhyay, N., 2010. Investigational anabolic therapies for osteoporosis. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 19, 995-1005.
555. Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., Inoue, K., 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783.
556. Tsuji, K., Cox, K., Gamer, L., Graf, D., Economides, A., Rosen, V., 2010. Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair. *J. Orthop. Res.* 28, 384-389.
557. Tsuji, K., Ito, Y., Noda, M., 1998. Expression of the PEBP2alphaA/AML3/CBFA1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells. *Bone* 22, 87-92.

558. Turowski, G.A., Rashid, Z., Hong, F., Madri, J.A., Basson, M.D., 1994. Glutamine modulates phenotype and stimulates proliferation in human colon cancer cell lines. *Cancer Res.* 54, 5974-5980.
559. Urist, M.R., 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
560. Uzzan, B., Cohen, R., Nicolas, P., Cucherat, M., Perret, G.Y., 2007. Effects of statins on bone mineral density: a meta-analysis of clinical studies. *Bone* 40, 1581-1587.
561. Vahle, J.L., Sato, M., Long, G.G., Young, J.K., Francis, P.C., Engelhardt, J.A., Westmore, M.S., Linda, Y., Nold, J.B., 2002. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol. Pathol.* 30, 312-321.
562. Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., Buell, G., 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-519.
563. Vallon, V., Osswald, H., 2009. Adenosine receptors and the kidney. *Handb. Exp. Pharmacol.* 443-470.
564. van der Horst, G., van der Werf, S.M., Farih-Sips, H., van Bezooijen, R.L., Lowik, C.W., Karperien, M., 2005. Downregulation of Wnt signaling by increased expression of Dickkopf-1 and -2 is a prerequisite for late-stage osteoblast differentiation of KS483 cells. *J. Bone Miner. Res.* 20, 1867-1877.
565. Varani, K., De, M.M., Vincenzi, F., Tosi, A., Targa, M., Masieri, F.F., Pellati, A., Massari, L., Borea, P.A., 2010. P2X(1) and P2X(3) purinergic receptors differentially modulate the inflammatory response in human osteoarthritic synovial fibroblasts. *Cell Physiol Biochem.* 25, 325-336.
566. Vater, C., Kasten, P., Stiehler, M., 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 7, 463-477.
567. Verghese, M.W., Kneisler, T.B., Boucheron, J.A., 1996. P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 15597-15601.
568. Vestergaard, P., Rejnmark, L., Mosekilde, L., 2005. Reduced relative risk of fractures among users of lithium. *Calcif. Tissue Int.* 77, 1-8.
569. Vlaskovska, M., Kasakov, L., Rong, W., Bodin, P., Bardini, M., Cockayne, D.A., Ford, A.P., Burnstock, G., 2001. P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J. Neurosci.* 21, 5670-5677.
570. von, K., I, Harden, T.K., 2011. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv. Pharmacol.* 61, 373-415.
571. Vonend, O., Turner, C.M., Chan, C.M., Loesch, A., Dell'Anna, G.C., Srari, K.S., Burnstock, G., Unwin, R.J., 2004. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int.* 66, 157-166.

572. Voss, U., Turesson, M.F., Robaye, B., Boeynaems, J.M., Olde, B., Erlinge, D., Ekblad, E., 2014. The enteric nervous system of P2Y₁₃ receptor null mice is resistant against high-fat-diet- and palmitic-acid-induced neuronal loss. *Purinergic. Signal.* 10, 455-464.
573. Vukicevic, S., Grgurevic, L., 2009. BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 441-448.
574. Wagner, M.C., 2011. The therapeutic potential of adenosine triphosphate as an immune modulator in the treatment of HIV/AIDS: a combination approach with HAART. *Curr. HIV. Res.* 9, 209-222.
575. Waldo, G.L., Harden, T.K., 2004. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y₁ receptor. *Mol. Pharmacol.* 65, 426-436.
576. Wang, N., Robaye, B., Agrawal, A., Skerry, T.M., Boeynaems, J.M., Gartland, A., 2012. Reduced bone turnover in mice lacking the P2Y₁₃ receptor of ADP. *Mol. Endocrinol.* 26, 142-152.
577. Wang, N., Robaye, B., Gossiel, F., Boeynaems, J.M., Gartland, A., 2014. The P2Y₁₃ receptor regulates phosphate metabolism and FGF-23 secretion with effects on skeletal development. *FASEB J.* 28, 2249-2259.
578. Warden, S.J., Hassett, S.M., Bond, J.L., Rydberg, J., Grogg, J.D., Hilles, E.L., Bogenschutz, E.D., Smith, H.D., Fuchs, R.K., Bliziotis, M.M., Turner, C.H., 2010. Psychotropic drugs have contrasting skeletal effects that are independent of their effects on physical activity levels. *Bone* 46, 985-992.
579. Watanabe, T., Tamamura, Y., Hoshino, A., Makino, Y., Kamioka, H., Amagasa, T., Yamaguchi, A., Iimura, T., 2012. Increasing participation of sclerostin in postnatal bone development, revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry. *Bone* 51, 447-458.
580. Watcharasit, P., Bijur, G.N., Zmijewski, J.W., Song, L., Zmijewska, A., Chen, X., Johnson, G.V., Jope, R.S., 2002. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 7951-7955.
581. Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G., Barnard, E.A., 1993. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 324, 219-225.
582. Weinreb, M., Shinar, D., Rodan, G.A., 1990. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J. Bone Miner. Res.* 5, 831-842.
583. Weivoda, M.M., Hohl, R.J., 2012. Geranylgeranyl pyrophosphate stimulates PPAR γ expression and adipogenesis through the inhibition of osteoblast differentiation. *Bone* 50, 467-476.
584. Wen, J., Xia, Y., 2012. Adenosine signaling: good or bad in erectile function? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 845-850.
585. White, N., Burnstock, G., 2006. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 211-217.

586. Whitson, S.W., Harrison, W., Dunlap, M.K., Bowers, D.E., Jr., Fisher, L.W., Robey, P.G., Termine, J.D., 1984. Fetal bovine bone cells synthesize bone-specific matrix proteins. *J. Cell Biol.* 99, 607-614.
587. Wildman, S.S., Unwin, R.J., King, B.F., 2003. Extended pharmacological profiles of rat P2Y₂ and rat P2Y₄ receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1177-1186.
588. Wilkin, F., Duhant, X., Bruyins, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J.M., Robaye, B., 2001. The P2Y₁₁ receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 7172-7177.
589. Williams, D.C., Boder, G.B., Toomey, R.E., Paul, D.C., Hillman, C.C., Jr., King, K.L., Van Frank, R.M., Johnston, C.C., Jr., 1980. Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 30, 233-246.
590. Wilson, H.L., Varcoe, R.W., Stokes, L., Holland, K.L., Francis, S.E., Dower, S.K., Surprenant, A., Crossman, D.C., 2007. P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 151, 115-127.
591. Wilting, I., de, V.F., Thio, B.M., Cooper, C., Heerdink, E.R., Leufkens, H.G., Nolen, W.A., Egberts, A.C., van Staa, T.P., 2007. Lithium use and the risk of fractures. *Bone* 40, 1252-1258.
592. Wiren, M., Magnusson, K.E., Larsson, J., 1998. The role of glutamine, serum and energy factors in growth of enterocyte-like cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1331-1336.
593. Wirkner, K., Sperlagh, B., Illes, P., 2007. P2X₃ receptor involvement in pain states. *Mol. Neurobiol.* 36, 165-183.
594. Woodgett, J.R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-2438.
595. Woodgett, J.R., 1991. cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods Enzymol.* 200, 564-577.
596. Woodgett, J.R., 2003. Physiological roles of glycogen synthase kinase-3: potential as a therapeutic target for diabetes and other disorders. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 3, 281-290.
597. Woodgett, J.R., Cohen, P., 1984. Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim. Biophys. Acta* 788, 339-347.
598. Wright, L.E., Guise, T.A., 2014. The microenvironment matters: estrogen deficiency fuels cancer bone metastases. *Clin. Cancer Res.* 20, 2817-2819.
599. Wright, N.C., Looker, A.C., Saag, K.G., Curtis, J.R., Delzell, E.S., Randall, S., Dawson-Hughes, B., 2014. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J. Bone Miner. Res.* 29, 2520-2526.

600. Wutzl, A., Rauner, M., Seemann, R., Millesi, W., Krepler, P., Pietschmann, P., Ewers, R., 2010. Bone morphogenetic proteins 2, 5, and 6 in combination stimulate osteoblasts but not osteoclasts in vitro. *J. Orthop. Res.* 28, 1431-1439.
601. Xiao, W., Wang, Y., Pacios, S., Li, S., Graves, D.T., 2016. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol.* 18, 9-16.
602. Xie, Z., Chang, S.M., Pennypacker, S.D., Liao, E.Y., Bikle, D.D., 2009. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1alpha mediates extracellular calcium-induced keratinocyte differentiation. *Mol. Biol. Cell* 20, 1695-1704.
603. Yamaguchi, T., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Butters, R.R., Jr., Sugimoto, T., Brown, E.M., 1998a. Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca²⁺)-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1530-1538.
604. Yamaguchi, T., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Ye, C., Vassilev, P.M., Sanders, J.L., Brown, E.M., 2001. Expression of extracellular calcium-sensing receptor in human osteoblastic MG-63 cell line. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280, C382-C393.
605. Yamaguchi, T., Kifor, O., Chattopadhyay, N., Brown, E.M., 1998b. Expression of extracellular calcium (Ca²⁺ + o)-sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 753-757.
606. Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., Kikuchi, A., 1999. Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J. Biol. Chem.* 274, 10681-10684.
607. Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Kobayashi, M., Kawamura, K., Masuda, H., Kamiya, A., Ando, J., 2006. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat. Med.* 12, 133-137.
608. Yamauchi, K., Komatsu, T., Kulkarni, A.D., Ohmori, Y., Minami, H., Ushiyama, Y., Nakayama, M., Yamamoto, S., 2002. Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition* 18, 329-333.
609. Yamauchi, M., Yamaguchi, T., Kaji, H., Sugimoto, T., Chihara, K., 2005. Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 288, E608-E616.
610. Yan, D., Zhu, Y., Walsh, T., Xie, D., Yuan, H., Sirmaci, A., Fujikawa, T., Wong, A.C., Loh, T.L., Du, L., Grati, M., Vljakovic, S.M., Blanton, S., Ryan, A.F., Chen, Z.Y., Thorne, P.R., Kachar, B., Tekin, M., Zhao, H.B., Housley, G.D., King, M.C., Liu, X.Z., 2013. Mutation of the ATP-gated P2X(2) receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110, 2228-2233.
611. Yanagawa, S., Matsuda, Y., Lee, J.S., Matsubayashi, H., Sese, S., Kadowaki, T., Ishimoto, A., 2002. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J.* 21, 1733-1742.
612. Yang, H., Curinga, G., Giachelli, C.M., 2004. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 66, 2293-2299.

613. Yang, L., Hai, Y., Zhou, J.L., 2011. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand expression during human marrow stromal cell differentiation and their effect on osteoclast formation. *Chin Med. J. (Engl.)* 124, 2033-2037.
614. Yao, L., Sun, Y.T., Sun, W., Xu, T.H., Ren, C., Fan, X., Sun, L., Liu, L.L., Feng, J.M., Ma, J.F., Wang, L.N., 2015. High phosphorus level leads to aortic calcification via beta-catenin in chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* 41, 28-36.
615. Yaqoob, P., Calder, P.C., 1997. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. *Nutrition* 13, 646-651.
616. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T., 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3597-3602.
617. Yiangou, Y., Facer, P., Baecker, P.A., Ford, A.P., Knowles, C.H., Chan, C.L., Williams, N.S., Anand, P., 2001. ATP-gated ion channel P2X(3) is increased in human inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 13, 365-369.
618. Yoshida, K., Okamura, H., Ochiai, K., Hoshino, Y., Haneji, T., Yoshioka, M., Hinode, D., Yoshida, H., 2012. PKR plays a positive role in osteoblast differentiation by regulating GSK-3beta activity through a beta-catenin-independent pathway. *Mol. Cell Endocrinol.* 361, 99-105.
619. Yoshimura, N., Kaiho, Y., Miyazato, M., Yunoki, T., Tai, C., Chancellor, M.B., Tyagi, P., 2008. Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 377, 437-448.
620. Young, M.T., Fisher, J.A., Fountain, S.J., Ford, R.C., North, R.A., Khakh, B.S., 2008. Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 283, 26241-26251.
621. Yu, H., Ferrier, J., 1993. Osteoblast-like cells have a variable mixed population of purino/nucleotide receptors. *FEBS Lett.* 328, 209-214.
622. Yu, Z., Fan, L., Li, J., Ge, Z., Dang, X., Wang, K., 2015. Lithium chloride attenuates the abnormal osteogenic/adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained from rats with steroid-related osteonecrosis by activating the beta-catenin pathway. *Int. J. Mol. Med.* 36, 1264-1272.
623. Yung, L.M., Sanchez-Duffhues, G., Ten, D.P., Yu, P.B., 2015a. Bone morphogenetic protein 6 and oxidized low-density lipoprotein synergistically recruit osteogenic differentiation in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 108, 278-287.
624. Yung, L.M., Sanchez-Duffhues, G., Ten, D.P., Yu, P.B., 2015b. Bone morphogenetic protein 6 and oxidized low-density lipoprotein synergistically recruit osteogenic differentiation in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 108, 278-287.
625. Zamani, A., Omrani, G.R., Nasab, M.M., 2009. Lithium's effect on bone mineral density. *Bone* 44, 331-334.

626. Zambon, A.C., Brunton, L.L., Barrett, K.E., Hughes, R.J., Torres, B., Insel, P.A., 2001. Cloning, expression, signaling mechanisms, and membrane targeting of P2Y(11) receptors in Madin Darby canine kidney cells. *Mol. Pharmacol.* 60, 26-35.
627. Zanchetta, J.R., Bogado, C.E., Cisari, C., Aslanidis, S., Greisen, H., Fox, J., Lems, W., 2010. Treatment of postmenopausal women with osteoporosis with PTH(1-84) for 36 months: treatment extension study. *Curr. Med. Res. Opin.* 26, 2627-2633.
628. Zeadin, M.G., Butcher, M.K., Shaughnessy, S.G., Werstuck, G.H., 2012. Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 924-930.
629. Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M., Stojilkovic, S.S., 2007. Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. *J. Neurochem.* 102, 1139-1150.
630. Zerr, M., Hechler, B., Freund, M., Magnenat, S., Lanois, I., Cazenave, J.P., Leon, C., Gachet, C., 2011. Major contribution of the P2Y(1)receptor in purinergic regulation of TNFalpha-induced vascular inflammation. *Circulation* 123, 2404-2413.
631. Zhang, F., Phiel, C.J., Spece, L., Gurvich, N., Klein, P.S., 2003. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J. Biol. Chem.* 278, 33067-33077.
632. Zhang, J., Tu, Q., Chen, J., 2009. Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein. *J. Cell Physiol* 220, 30-34.
633. Zhang, W., Xue, D., Yin, H., Wang, S., Li, C., Chen, E., Hu, D., Tao, Y., Yu, J., Zheng, Q., Gao, X., Pan, Z., 2016. Overexpression of HSPA1A enhances the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Sci. Rep.* 6, 27622.
634. Zhang, Y., Peti-Peterdi, J., Muller, C.E., Carlson, N.G., Baqi, Y., Strasburg, D.L., Heiney, K.M., Villanueva, K., Kohan, D.E., Kishore, B.K., 2015. P2Y12 Receptor Localizes in the Renal Collecting Duct and Its Blockade Augments Arginine Vasopressin Action and Alleviates Nephrogenic Diabetes Insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 2978-2987.
635. Zhang, Y., Song, J., Shi, B., Wang, Y., Chen, X., Huang, C., Yang, X., Xu, D., Cheng, X., Chen, X., 2007. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects. *Biomaterials* 28, 4635-4642.
636. Zhang, Z., Jin, Z., Zhao, Y., Zhang, Z., Li, R., Xiao, J., Wu, J., 2014. Systematic study on G-protein couple receptor prototypes: did they really evolve from prokaryotic genes? *IET. Syst. Biol.* 8, 154-161.
637. Zhou, J.Z., Riquelme, M.A., Gao, X., Ellies, L.G., Sun, L.Z., Jiang, J.X., 2015. Differential impact of adenosine nucleotides released by osteocytes on breast cancer growth and bone metastasis. *Oncogene* 34, 1831-1842.

638. Zhu, F., Friedman, M.S., Luo, W., Woolf, P., Hankenson, K.D., 2012. The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. *J. Cell Physiol* 227, 2677-2685.

Agradecimientos

Agradecimientos

A mis padres, Mónica y Juan, hermano, tías, tíos, primas, primos, abuelas, abuelos, y toda mi familia.

A mis amigos.

A mi directora, la Dra. Graciela Santillán.

A mis colegas, de Bioquímica Clínica II, Dr. Adrián Campelo, Lic. Sabrina Cepeda, Dr. Cutini Pablo, Dra. Belén Rauschemberger, Lic. Carla Crescitelli, Dra. Virginia Massheimer, Dra. Marisa Sandoval; de Físicoquímica, Dra. Paula Messina, Lic. Noelia D'Elía, Lic. Javier Sartuqui, Dra. Noel Gravina, Dra. Nancy Andrés; del INIBIBB, Bioq. Ignacio Bergé, Dr. Spitzmaul, Lic. Esteban Barila, Lic. Edgardo Buzzi, Bioq. Yanel Volonté, Dr. Diego Rayes, Dra. Carmen Esandi; del laboratorio de Química Biológica, Dr. Pablo de Genaro, Dra. Lucía Pronsato, Dra. Anabella La Colla, Lic. Julia Martin, Dr. Verónica González Pardo, Dra. Lorena Milanesi, Dra. Andrea Vasconsuelo, Dra. Claudia Gentili; de Fisiología Humana, Dra. Gisela Giorgi, Lic. Fernanda, Fernández; de Ecología Acuática, Dra. Rosa Pettigrosso, Dra. Elisa Parodi; de Histología Animal, Dra. Elena Galindez; de Microbiología de los Alimentos, Dra. María Amelia Cubitto y su grupo de trabajo. A la Dra. Paula Monje. A los colegas de la Universidad Nacional de La Plata, del Laboratorio de investigaciones en osteopatías y metabolismo mineral, Dra. Ana Cortizo, Dra. Silvina Molinuevo, Dr. Juan Manuel Fernández, Lic. Lucas Besada. Al bioquímico Diego Iaconis. Al técnico electrónico Luis Fritz. A la bioquímica María Laura Graziosi (Wiener).

A mis docentes, maestros y profesores, de jardín, escuela, universidad y posgrado.

A los empleados administrativos y no docentes del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. A los empleados de vitroplastía y de la planta de destilación de agua. A los muchachos de Copisud.

Al Jardín N° 910, al Colegio Claret, a la Universidad Nacional del Sur (UNS), al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS (DBByF-UNS), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

Y a muchas otras personas que ahora no recuerdo pero que debo agradecerles, porque las he conocido y, de alguna manera, me han ayudado.

Gracias!