

**Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Carlos A. Mautalen**

# Osteocitos y la regulación de la formación ósea

*Osteocytes and regulation of bone formation*

*Osteócitos e a regulação da formação óssea*

► Teresita Bellido<sup>1a,b,c</sup>, Gretel Pellegrini<sup>2a</sup>

<sup>1</sup> Dra. en Bioquímica, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

<sup>2</sup> Dra. en Odontología, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

<sup>a</sup> Departamento de Anatomía y Biología Celular.

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Interna, División de Endocrinología, Indiana University School of Medicine.

<sup>c</sup> Centro Médico de la Administración de Veteranos Roudebush, Indianapolis, Indiana.

635 Barnhill Drive, MS5045A; Indianapolis, IN 46202, USA; Tel: 317-274-7410; Fax: 317-278-2040.

## Resumen

Por muchos años los osteocitos han sido las células óseas “olvidadas” y consideradas espectadores inactivos enterrados en la matriz ósea. Hoy en día se sabe que los osteocitos detectan y responden a estímulos mecánicos y hormonales para coordinar tanto la resorción como la formación ósea. Actualmente se considera que los osteocitos proveen la mayoría de las moléculas que regulan la actividad de los osteoclastos y de los osteoblastos, como RANKL y esclerostina, ya que manipulaciones genéticas y farmacológicas de cualquiera de estas dos moléculas afectan marcadamente la homeostasis ósea. Este artículo resume hallazgos recientes que delinear los mecanismos por los cuales los osteocitos regulan el número y actividad de los osteoblastos afectando de esta manera la formación ósea.

**Palabras clave:** osteocitos \* osteoclastos \* osteoblastos \* remodelamiento óseo \* señalización Wnt \* gen SOST

## Summary

For many years, osteocytes have been the forgotten bone cells and considered as inactive spectators buried in the bone matrix. We now know that osteocytes detect and respond to mechanical and hormonal stimuli to coordinate bone resorption and bone formation. Osteocytes are currently considered a major source of molecules that regulate the activity of osteoclasts and osteoblasts, such as RANKL and sclerostin; and genetic and pharmacological manipulations of either molecule markedly affect bone homeostasis. This article summarizes recent findings demonstrating the mechanisms by which osteocytes regulate the number and activity of osteoblasts and thus affect bone formation.

**Key words:** osteocyte \* osteoclast \* osteoblast \* bone remodeling \* Wnt signaling \* SOST gene

## Resumo

Durante muitos anos, os osteócitos têm sido células ósseas “esquecidas” e consideradas como espectadores inativos enterrados na matriz óssea. Hoje sabemos que os osteócitos são capazes de detectar e responder a estímulos mecânicos e hormonais para coordenar tanto a reabsorção quanto a formação óssea. Os osteócitos são considerados atualmente como aqueles que fornece-

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

*ma maioria das moléculas que regulam a atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos, tais como RANKL e a esclerostina, visto que manipulações genéticas e farmacológicas de qualquer uma destas moléculas afetam consideravelmente a homeostase óssea. Este artigo resume as recentes descobertas que demarcam os mecanismos pelos quais os osteócitos regulam o número e atividade dos osteoblastos, afetando assim a formação óssea.*

**Palavras-chave:** osteócitos \* osteoclastos \* osteoblastos \* remodelação óssea \* sinalização Wnt \* gen SOST

## Introducción

*OSTEOCITOS: ¿QUÉ SON, DE DÓNDE VIENEN, QUÉ HACEN?*

Los osteocitos son las células más diferenciadas del linaje mesenquimal/osteoblástico y residen sepultadas en la matriz ósea mineralizada. Los osteocitos son células residentes permanentes del hueso, con una vida media de 25 años, y constituyen más del 95% de las células óseas en la matriz ósea (1). Los osteocitos tienen una morfología característica estrellada o dendrítica. Los cuerpos de los osteocitos están individualmente encasillados en lagunas talladas dentro del mineral y exhiben procesos citoplasmáticos que corren a lo largo de estrechos canalículos cavados en la matriz mineralizada formando el llamado sistema lacuno-canalicular (2). A través de sus proyecciones citoplasmáticas, los osteocitos establecen comunicaciones intercelulares con osteocitos vecinos mediante uniones gap, y también alcanzan las superficies perióstica y endocortical ósea, el lumen de los vasos sanguíneos y los canales haversianos, así como superficies adyacentes a la médula ósea en las superficies endocortical y trabecular (2)(3). Este sistema lacuno-canalicular tiene el potencial de permitir la comunicación "célula-célula" entre los osteocitos y demás células del hueso, distribuyendo, también, las moléculas secretadas por los osteocitos en el microambiente hueso/médula ósea (4)(5). Sin embargo, los mecanismos por los cuales los osteocitos expresan moléculas y secretan factores que alcanzan sus blancos celulares no son del todo conocidos. Evidencia en aumento, demuestra que los osteocitos detectan y responden a estímulos mecánicos y hormonales para coordinar la función de osteoblastos y osteoclastos (6). El descubrimiento de que la esclerostina, un potente inhibidor de la formación ósea, se expresa principalmente en osteocitos y es regulada negativamente por estímulos anabólicos óseos, identifica a esta molécula como uno de los tan buscados mensajeros por el cual los osteocitos afectan la función de las células de la superficie del hueso (7-12).

*MECANISMOS POR LOS CUALES LOS OSTEOCITOS SE COMUNICAN CON LOS OSTEOCLASTOS Y LOS OSTEOBLASTOS*

Evidencias recientes demuestran que los osteocitos expresan citoquinas que regulan la generación

de osteoclastos y participan en el reclutamiento y la diferenciación de los precursores osteoclásticos, iniciando así la remodelación ósea dirigida (13). Los osteocitos además expresan moléculas que afectan negativamente a la formación ósea, incluyendo el inhibidor de la vía de señalización Wnt (*wntgless-type*), Dickkopf 1 (DKK1) (14), también expresado por los osteoblastos, y el gen SOST, que codifica la proteína esclerostina, se expresa en los osteocitos, pero no en los osteoblastos (12). Ambos, esclerostina y DKK1 bloquean la unión de ligandos de la familia Wnt a los receptores Frizzled y proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) 5 y 6, evitando así la activación de la vía canónica de señalización de Wnt (12)(15).

*OSTEOCITOS Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT/ $\beta$ CATENINA*

Se ha comprobado que la activación de la señalización canónica de Wnt es crítica para la diferenciación, supervivencia y función del osteoblasto, ya que induce el compromiso de progenitores mesenquimales multipotenciales hacia el linaje osteoblástico, estimula la diferenciación de osteoblastos, y regula su actividad (16). Esta vía de señalización es controlada no solo por los ligandos que activan los receptores sino también por variaciones en antagonistas. Por lo tanto, a través de la producción de antagonistas de la señalización de Wnt, los osteocitos son capaces de regular la formación y la actividad de los osteoblastos. Evidencias genéticas y farmacológicas apoyan este mecanismo. La delección de un único alelo del gen DKK1 en ratones conduce a un aumento en la formación y en la masa ósea (17). Del mismo modo, la supresión dirigida del gen SOST aumenta la masa y la resistencia ósea (18). Además, la eliminación genética o la inhibición farmacológica de LRP4, un facilitador de la acción esclerostina, también se traduce en el aumento de la formación y masa ósea (19). Más aún, la neutralización de los inhibidores de DKK1, esclerostina o LRP4 han surgido como blancos terapéuticos prometedores y factibles.

El caso de esclerostina es particularmente atractivo porque también está regulada por varios estímulos con efectos anabólicos en el esqueleto. Por ejemplo, la hormona paratiroidea (PTH), el único agente anabólico para la osteoporosis en los EE.UU. aprobado por

la FDA, disminuye la expresión SOST/esclerostina en osteocitos en modelos de roedores y en humanos (11) (12) (20-22).

Asimismo, numerosos estudios apoyan la noción de que los osteocitos orquestan el incremento en la formación ósea en respuesta a cargas mecánicas mediante la regulación negativa de la esclerostina, desencadenando localmente la señalización de Wnt (13). Áreas de hueso cortical expuestas a alta tensión mecánica exhiben una reducción en osteocitos esclerostina-positivos y concomitantemente alta formación ósea en las superficies adyacentes al periostio (10). Contrariamente, los niveles de expresión de SOST/esclerostina se incrementan en el hueso no cargado mecánicamente (23) y los ratones que sobreexpresan un transgén SOST humano en osteocitos muestran baja masa ósea (7) y carecen de respuesta anabólica a la estimulación mecánica (23). Los osteocitos son considerados los mecano-sensores del hueso, ya que presentan el potencial para detectar las fuerzas mecánicas y traducirlas en las señales bioquímicas (24). La supresión específica de los osteocitos tiene como resultado la pérdida ósea. Asimismo, ese hueso carente de osteocitos no responde normalmente a la ausencia de estimulación mecánica (25).

Los osteocitos también parecen afectar a los osteoblastos y a la diferenciación de los osteoclastos mediante interacciones intercelulares directas. Evidencias recientes *in vitro* sugieren que el contacto directo célula-célula con osteocitos induce una regulación positiva de los genes de diferenciación osteoblástica (Col1a, Runx2, fosfatasa alcalina) en osteoblastos en comparación con osteoblastos cultivados solos (26). Adicionalmente, la señalización de Notch, que se activa por interacciones homotípicas o heterotípicas entre los receptores y ligandos de Notch, ha emergido como vía nueva en regulación de la actividad de las células óseas a través de la comunicación de célula-célula (27). La sobreexpresión de dominio intracelular de Notch 1 en osteocitos, disminuye la resorción ósea mediada por osteoclastos y aumenta el volumen de hueso esponjoso y cortical, por mecanismos pocos conocidos (28-30). Por lo tanto, la comunicación de célula a célula entre osteocitos y otras células en el microambiente de la médula ósea y el hueso también regula la homeostasis ósea, aunque los mecanismos específicos implicados no se conocen aún. Nuevos hallazgos demuestran que los osteocitos median las acciones anabólicas de la vía canónica de señalización Wnt/ $\beta$ catenina en el hueso (31), demostrando la importancia de la activación de esta vía de en los propios osteocitos. Estímulos anabólicos óseos activan esta vía y mutaciones humanas de componentes a lo largo de la misma, resaltan su papel crucial en la adquisición de masa ósea y su mantenimiento. Sin embargo, la célula responsable de orquestar las acciones anabólicas de la vía Wnt ha permanecido "escurridiza", ya que la activación genética

de la señalización Wnt/ $\beta$ catenina en preosteoblastos u osteoblastos inhibe la resorción sin aumentar la formación de hueso (32).

Esta nueva evidencia demuestra que, en contraste, la activación de la señalización canónica de Wnt en osteocitos [ratones dominantes activos (da)  $\beta$ cat<sup>Ot</sup>] induce el anabolismo óseo y desencadena la señalización de Notch, sin afectar su supervivencia (31). Estas características contrastan con las de los ratones que expresan  $\Delta\beta$ catenina en osteoblastos, que muestran disminución de la resorción y la muerte perinatal por leucemia (16). Ratones  $\Delta\beta$ cat<sup>Ot</sup> exhiben aumento en la densidad mineral ósea en el esqueleto axial y apendicular, así como un marcado aumento en el volumen de hueso en los compartimentos esponjoso/trabecular y cortical en comparación con los controles. Asimismo, estos ratones muestran un incremento en los marcadores de resorción y formación, alto número de osteoclastos y osteoblastos en hueso esponjoso y cortical, aumento de producción de la matriz ósea, una tasa de formación ósea perióstica marcadamente elevada. Los genes blanco de la señalización Wnt y Notch, marcadores de osteoblastos y osteocitos y citoquinas pro-y anti-osteoclastogénicas, también se encuentran elevados en los huesos de ratones  $\Delta\beta$ cat<sup>Ot</sup>. Además, el aumento de RANKL es dependiente de SOST/esclerostina. De esta manera, la activación de la señalización de  $\beta$ catenina en osteocitos aumenta ambos osteoclastos y osteoblastos llevando al aumento de hueso, y siendo suficiente para activar la vía Notch. Estos hallazgos demuestran resultados dispares de la activación  $\beta$ catenina en osteocitos en comparación con osteoblastos e identifican a los osteocitos como las células diana centrales de las acciones anabólicas de la vía canónica de señalización Wnt/ $\beta$ catenina en el hueso.

#### OSTEOCITOS Y MINERALIZACIÓN DE LA MATRIZ ÓSEA

Los osteocitos también regulan la mineralización y la homeostasis de fosfato (Pi) a través de la liberación de varias moléculas. Los osteocitos son más ricos que los osteoblastos en las moléculas que regulan la homeostasis de Pi como la endopeptidasa neutra (PHEX), proteína de la matriz de dentina 1 (DMP1), fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE) y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) (33). FGF23, secretado principalmente por los osteocitos, es una hormona que juega un papel crucial en la homeostasis del Pi inhibiendo su reabsorción renal. Niveles supra-fisiológicos de FGF23 encontrados en varios trastornos genéticos disminuyen la reabsorción renal Pi e inducen hipofosfatemia, resultando en osteomalacia y raquitismo (34). En consonancia con los hallazgos en enfermedades humanas, ratones transgénicos que sobreexpresan FGF23 son hipofosfatémicos mientras que los ratones *knockout* FGF23 son hiperfosfatémicos (35-36).

## CORRESPONDENCIA

Dra. TERESITA BELLIDO  
 Departamento de Anatomía y Biología Celular  
 Departamento de Medicina Interna, Endocrinología  
 Indiana University School of Medicine,  
 635 Barnhill Drive, MS5045, INDIANAPOLIS, IN 46202,  
 Estados Unidos.  
 E-mail: tbellido@iupui.edu

## Referencias bibliográficas

1. Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. *Clin Orthop* 1977; 127: 236-47.
2. Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011; 26(2): 229-38.
3. Bellido T. Osteocytes and their role in bone remodeling. *Actualizaciones en Osteología (Spanish)* 2013; 9(1): 56-64.
4. Wang L, Ciani C, Doty SB, Fritton SP. Delineating bone's interstitial fluid pathway *in vivo*. *Bone* 2004; 34(3): 499-509.
5. Fritton SP, Weinbaum S. Fluid and solute transport in bone: flow-induced mechanotransduction. *Annu Rev Fluid Mech* 2009 1; 41: 347-74.
6. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008; 42(4): 606-15.
7. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, *et al*. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003; 22(23): 6267-76.
8. Poole KE, Van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, *et al*. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 2005; 19(13): 1842-4.
9. Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, *et al*. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004; 199(6): 805-14.
10. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MJ, Alam I, *et al*. Mechanical stimulation of bone *in vivo* reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008; 283(9): 5866-75.
11. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 2005 6; 37(2): 148-58.
12. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, *et al*. Chronic elevation of PTH in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 2005; 146(11): 4577-83.
13. Robling AG, Turner CH. Mechanical signaling for bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19(4): 319-38.
14. Paic F, Igwe JC, Nori R, Kronenberg MS, Franceschetti T, Harrington P, *et al*. Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone* 2009; 45(4): 682-92.
15. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a novel receptor for dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover *in vivo*. *PLoS ONE* 2009; 4 (11): e7930.
16. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013; 19(2): 179-92.
17. Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, *et al*. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 2006; 39(4): 754-66.
18. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, *et al*. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008; 23(6): 860-9.
19. Chang MK, Kramer I, Huber T, Kinzel B, Guth-Gundel S, Leupin O, *et al*. Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(48): E5187.
20. van Lierop AH, Witteveen J, Hamdy N, Papapoulos S. Patients with primary hyperparathyroidism have lower circulating sclerostin levels than euparathyroid controls. *Eur J Endocrinol* 2010; 163(5): 833-7.
21. Drake MT, Srinivasan B, Modder UI, Peterson JM, McCready LK, Riggs BL, *et al*. Effects of parathyroid hormone treatment on circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(11): 5056-62.
22. Mirza FS, Padhi ID, Raisz LG, Lorenzo JA. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(4): 1991-7.
23. Tu X, Rhee Y, Lee R, Benson JD, Condon KW, Bivi N, *et al*. Downregulation of Sost/sclerostin expression is required for the osteogenic response to mechanical loading. *J Bone Miner Res*; 25(Suppl1): S87.
24. You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, *et al*. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 2008; 42(1): 172-9.
25. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, *et al*. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 2007; 5(6): 464-75.
26. Fujita K, Xing Q, Khosla S, Monroe DG. Mutual enhancement of differentiation of osteoblasts and osteocytes occurs through direct cell-cell contact. *J Cell Biochem* 2014; 115(11): 2039-44.
27. Zanotti S, Canalis E. Notch signaling in skeletal health and disease. *Eur J Endocrinol* 2013; 168(6): R95-103.
28. Canalis E, Parker K, Feng JQ, Zanotti S. Osteoblast lineage-specific effects of notch activation in the skeleton. *Endocrinology* 2013; 154(2): 623-34.
29. Canalis E, Parker K, Feng J, Zanotti S. Expression of Notch in osteocytes prevents disuse osteoporosis. *J Bone Min Res* 2012; 27(Suppl1): S14.

30. Zanotti S, Canalis E. Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders. *Calcif Tissue Int* 2012; 90(2): 69-75.
31. Tu X, Delgado-Calle J, Condon KW, Maycas M, Zhang H, Carlesso N, *et al.* Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(5): E478-E486.
32. Glass DA, Karsenty G. *In vivo* analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 2007; 148(6): 2630-4.
33. Bellido T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif Tissue Int* 2013; 94(1): 25-34.
34. White KE, Larsson TE, Econs MJ. The roles of specific genes implicated as circulating factors involved in normal and disordered phosphate homeostasis: frizzled related protein-4, matrix extracellular phosphoglycoprotein, and fibroblast growth factor 23. *Endocr Rev* 2006; 27(3): 221-41.
35. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, *et al.* FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(2): 409-14.
36. Rhee Y, Bivi N, Farrow EG, Lezcano V, Plotkin LI, White KE, *et al.* Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 *in vitro* and *in vivo*. *Bone* 2011; 49(4): 636-43.

**Recibido: 16 de octubre de 2015**

**Aceptado: 9 de febrero de 2016**