



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

Laboratorio de Cáncer y Comunicación Intercelular

**“RECEPTORES PURINÉRGICOS EN
OSTEOBLASTOS EN CULTIVO”**

Tesis para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

Elías González Rodríguez

Director de tesis:

Dr. Fabián Galindo Ramírez

Revisores:

Dra. María del Rosario Vega y Sáenz de M.

Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán

ABREVIATURAS

ATP - Adenosín Trifosfato: Un nucleótido que desempeña un papel crucial en la transferencia de energía dentro de las células.

ADP - Adenosín difosfato: Un compuesto orgánico que es importante en el metabolismo energético y la señalización celular.

UTP - Uridina Trifosfato: Un nucleótido que, al igual que el ATP, puede actuar como molécula señalizadora en ciertos contextos celulares.

ERK1/2 - Proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2: Una proteína clave en la mediación de la transducción de señales celular.

CREB - Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc: Un factor de transcripción implicado en la transcripción de genes en respuesta a señales hormonales y de crecimiento.

PTH - Hormona paratiroidea: Una hormona importante en la regulación del metabolismo del calcio y el fósforo.

IP3 - Inositol Trifosfato: Un segundo mensajero que moviliza el calcio desde almacenamientos intracelulares.

P2X7 - Un subtipo de receptor purinérgicos que es un canal catiónico activado por ATP.

VNUT - Transportador vesicular nuclear de nucleótidos: Un transportador involucrado en la acumulación y liberación de nucleótidos a través de vesículas.

RANKL - Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B: Un factor clave en la formación y activación de osteoclastos.

ABC - Proteínas transportadoras de casete de unión a ATP: Un grupo de transportadores que utilizan energía de ATP para mover sustancias a través de las membranas P1 y P2 - Receptores Purinérgicos: Receptores celulares que responden al ATP y otros nucleótidos y nucleósidos.

P2X y P2Y - Subtipos de receptores P2.

GABA_R - Receptor GABA: Tipo de receptor que responde al neurotransmisor GABA, involucrado en la inhibición en el sistema nervioso central.

ERK1/2 y CREB - Proteínas de Señalización: ERK1/2 son parte de las rutas de señalización de mitógenos, y CREB es un factor de transcripción que responde a cambios en los niveles celulares de AMP cíclico.

NFATc1 - Factor Nuclear de Células T Activadas c1: Un factor de transcripción crucial en la activación de genes en el sistema inmunitario y en la diferenciación de osteoclastos.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Figura 1	3
Figura 2	4
Desafío Médico de la Regeneración Ósea	5
Regeneración Ósea.....	6
Figura 3	7
Factores Involucrados en la Regeneración Ósea.....	8
Señales moleculares en la regeneración ósea.....	8
1. Factores de crecimiento y citocinas.....	8
2. Hormonas	8
3. Nucleótidos extracelulares	8
Componentes de la matriz extracelular (MEC) en la regeneración ósea.....	9
1. Proteínas de la matriz	9
2. Glicoproteínas de adhesión	9
3. Proteoglicanos y glicosaminoglicanos.....	9
Factores adicionales	9
1. Oxígeno y nutrientes	9
2. Factores mecánicos	10
Métodos Actuales para Acelerar la Regeneración Ósea	10
Línea Multipotencial de Osteoblastos	12
Figura 4	12
Características de los Osteoblastos	13
Origen y Diferenciación	14
• Procedencia.....	14
• Diferenciación.....	14
Funciones Principales.....	14
• Síntesis de la matriz ósea (osteoide):	14
• Mineralización	14
Características Morfológicas	15
• Morfología.....	15
• Expresión de marcadores	15

Actividad y Regulación	15
• Interacciones celulares.....	15
• Regulación por señales.....	15
Diferenciación de la Línea Celular de Osteoblastos	16
Receptores Purinérgicos	18
Figura 5.....	20
Receptores P2X en osteoblastos	21
• P2X ₂ , P2X ₄ , y P2X ₇	21
Receptores P2Y en osteoblastos	21
• P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , y P2Y ₁₂	21
Señalización purinérgica	22
Funciones Generales de la señalización purinérgica	25
• Transmisión Sináptica y Neuromodulación.....	25
• Inmunorregulación.....	25
• Procesos Inflamatorios.....	25
• Regulación de la Función Cardiovascular.....	25
• Función del Sistema Digestivo.....	25
• Metabolismo Óseo	25
Liberación Celular de ATP	26
Mecanismos de liberación de ATP	27
• Exocitosis.....	27
• Canales de aniones conductores de ATP.....	27
• Hemicanal de conexina y pannexina.....	27
• Transportadores ABC (proteínas transportadoras de casete de unión a ATP).....	27
• Lisis celular.....	27
• Mecanismos evolutivos y fisiológicos.....	27
• Mecanismo en astrocitos.....	28
Regulación de la liberación de ATP	28
• Liberación de ATP.....	28
• Implicaciones clínicas.....	28
Señalización Purinérgica en la Regeneración Ósea: Mecanismos Moleculares y Funcionales	29
Figura 6.....	30

1. Proliferación y diferenciación	30
2. Efectos en los osteoclastos	31
3. Rol de los osteocitos.....	31
4. Regeneración y reparación ósea.....	31
5. Interacciones entre la señalización purinérgica y otras vías	31
Implicaciones terapéuticas	32
Señalización de Calcio Mediada por Receptores Purinérgicos	33
Señalización Purinérgica en la Regeneración Ósea: Mecanismos y Aplicaciones Terapéuticas	34
JUSTIFICACION	37
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
1. Evaluar el cambio en la concentración intracelular de Ca ²⁺ debido a la administración de ATP en osteoblastos de rata.	38
2. Evaluar los cambios en la concentración intracelular de Ca ²⁺ inducida por la administración de ATP y su dependencia de Ca ²⁺ extracelular.....	38
3. Identificar mediante inmunofluorescencia, la presencia de receptores P2X y P2Y en osteoblastos murinos.	38
4. Evaluar el cambio en la concentración intracelular de Ca ²⁺ durante la administración de un bloqueador de receptores purinérgicos.	38
METODOLOGÍA.....	39
Cultivo celular	39
Inmunofluorescencia.....	39
Tabla 1.....	40
Determinación del cambio en el nivel intracelular de Ca²⁺ secundario a la activación de receptores purinérgicos.....	41
Tabla 2.....	42
Análisis estadístico.....	43
RESULTADOS	43
Fluorimetría con ATP (Agonista de receptores purinérgicos en osteoblastos murinos).....	43
Figura 7	44
Figura 8	45
Figura 9	46
Fluorimetría en ausencia de calcio extracelular	47

Figura 10.....	48
Figura 11.....	49
Figura 12.....	50
EFFECTO DEL ATP EN PRESENCIA DE SURAMINA	50
Figura 13.....	51
INMUNOFUORESCENCIA	51
RECEPTOR P2Y ₂	52
Figura 14.....	52
RECEPTOR P2Y ₄	53
Figura 15.....	53
RECEPTOR P2Y ₆	53
Figura 16.....	53
Figura 17.....	54
RECEPTOR P2X ₄	54
Figura 18.....	54
RECEPTOR P2X ₅	55
Figura 19.....	55
RECEPTOR P2X ₇	55
Figura 20.....	55
Discusión.....	56
Conclusiones.....	62
Perspectivas	63

RESUMEN

Este estudio investiga la actividad de los receptores purinérgicos en cultivo de osteoblastos de rata, destacando la influencia del ATP y el ion calcio en su funcionamiento. Se determinó que la concentración óptima de ATP para la activación de estos receptores es 1 μ M. Además, se observó que la presencia de iones de calcio en el medio extracelular es crucial para la actividad del receptor. Los receptores purinérgicos se caracterizaron de manera parcial en la línea celular de osteoblasto, identificando su expresión en el citoplasma y en el núcleo. Este hallazgo sugiere roles específicos de estos receptores en diferentes contextos celulares. La relevancia de este estudio radica en su potencial para fundamentar investigaciones futuras orientadas al desarrollo de tratamientos contra patologías como la osteoporosis.

INTRODUCCIÓN

La célula, como unidad funcional en organismos pluricelulares, requiere comunicarse para establecer un estatus de su situación y entorno, así como de su fase en su ciclo de replicación. Esta compleja dinámica implica la recepción y emisión de numerosas señales, necesitando así una especialización de receptores y moléculas mensajeras (Burnstock, 2006; Verkhratsky & Burnstock, 2014). Estos mensajeros, que incluyen una amplia gama de compuestos diversos en su naturaleza, se transmiten tanto directamente a través de uniones comunicantes como difundiéndose en el medio extracelular. Las purinas juegan un papel crucial en el intercambio energético, un proceso vital en el cuerpo humano. Además de su síntesis y uso en las estructuras celulares, su disponibilidad tanto dentro como fuera de las células permite enviar señales importantes al tejido circundante. Estas señales son interpretadas por receptores purinérgicos, proteínas transmembranales activadas por nucleótidos, que son esenciales en la regulación de funciones críticas para el destino de diversas células (Long, 2012; Rubert & De la Piedra, 2020).

Estas señales tienen una fuerza preponderante, ya que provocan cascadas de segundos mensajeros o movilización directa del ion Ca^{2+} , cuyo propósito es la regulación de funciones celulares como transmisión sináptica, contracción muscular, inflamación, y respuesta inmune (Di Virgilio *et al.*, 2018; Chess-Williams *et al.*, 2019). Además, los episodios trombóticos que están directamente relacionados con la regulación de flujo sanguíneo, por mencionar algunos, son evidencia de cómo las purinas y sus receptores juegan un papel crítico en los mecanismos de señalización celular que mantienen la homeostasis fisiológica (Koupenova & Ravid, 2018). Es claro que estos mensajeros y sus

vías de transmisión son de gran importancia en la homeostasis fisiológica y se ven afectados en su función por un multitudinario set de factores que envuelven a los seres vivos.

En el contexto del envejecimiento humano, se observan cambios en las funciones corporales, como la reducción de la masa muscular, los rangos de movimiento y alteraciones en la coordinación y equilibrio (Cujilema-Cujilema *et al.*, 2019). Según el informe de salud de la OMS de 2018, se proyectó que para 2020 la población de adultos mayores superaría al grupo de menores de 5 años, estimando alcanzar los 2000 millones de personas mayores para 2050 (OMS, 2018; Baptista, Mendes, & Soares, 2013). En México Cujilema *et al.* en 2019; destacó la prevalencia de fracturas de cadera en pacientes mayores de 65 años, siendo más frecuentes en mujeres, el estudio de la Secretaría de Salud registró 71,771 egresos hospitalarios por fractura de fémur entre 2002 y 2007, con una incidencia alta en personas mayores de 65 años, y se proyecta un incremento significativo para 2050 concordando con las proyecciones mundiales (OMS, 2018).

La osteoporosis es una enfermedad que debilita los huesos haciéndolos frágiles y propensos a fracturas (Figura 1), es especialmente prevalente en la población de edad avanzada en México, debido a factores como la baja actividad física y una ingesta inadecuada de calcio, incluyendo factores genéticos y epigenéticos (OMS, 2018).

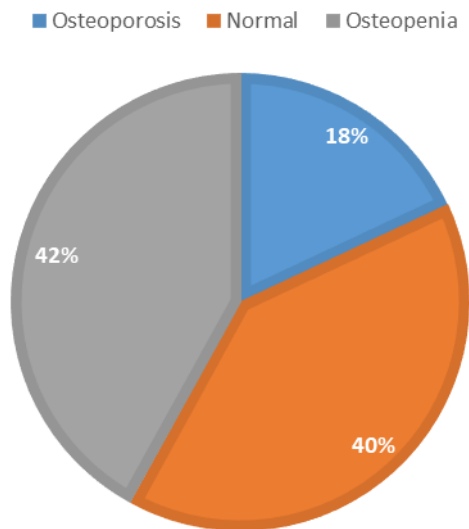


Figura 1. Tomada de Barrios-Moyano y De la Peña-García (2018), que es un estudio que reclutó 1431 pacientes (18% hombre, 82% mujeres) todos en condiciones laborales comprendiendo un rango de edad desde los 30 hasta los 79 años, en México.

Las fracturas de cadera, en particular, representan una carga considerable para los sistemas de salud mexicanos (Baptista, Mendes, & Soares, 2013), y el tratamiento oportuno es crucial para prevenir complicaciones y mejorar la calidad de vida del adulto mayor que poco a poco ocupará el grueso de la pirámide poblacional en el país y que gracias a los avances de la ciencia hoy podemos asentir que las personas mayores a 65 años aún cuentan con la calidad de vida necesaria para poder continuar otros 20 años de manera digna. La alta prevalencia de fracturas de cadera en México, especialmente en mujeres mayores, y la importancia de medidas preventivas efectivas, como la detección y tratamiento temprano de la osteoporosis, son vitales (Baptista, Mendes, & Soares, 2013).

Como mencionábamos, las mujeres tienen un riesgo más alto de fracturas de cadera debido a factores como la estructura ósea pélvica, menor actividad física y la aparición temprana de osteoporosis debido a cambios séricos de hormonas sexuales (Rubert & De la Piedra, 2020; Orriss, Burnstock, & Arnett, 2010). Dato que podemos corroborar en La

prevalencia de estas fracturas en pacientes mayores de 65 años en México por Cujilema-Cujilema (2019) (Figura 2). Es esencial implementar medidas preventivas para reducir el riesgo de osteoporosis y fracturas en la población, promoviendo la actividad física, mejorando la nutrición y realizando detecciones tempranas (Pech-Ciau *et al.*, 2021; OMS, 2018). Estas estrategias no solo contribuyen a la salud ósea, sino también a mejorar la calidad de vida general de la población mayor.

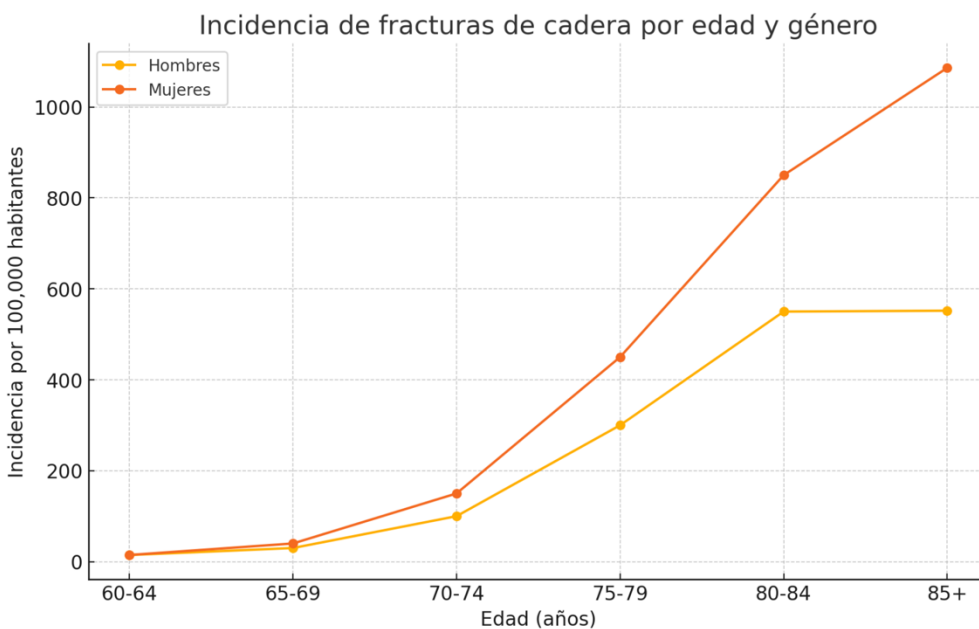


Figura 2. Incidencia de fracturas de cadera por edad y género en México. Tomada de Cujilema-Cujilema *et al.*, (2019).

Las fracturas de cadera son una carga significativa para los sistemas de salud en México, y el tratamiento temprano dentro de las 24 a 48 horas puede ayudar a disminuir la estancia hospitalaria y prevenir complicaciones (Cujilema-Cujilema *et al.*, 2019). Por lo tanto, mejorar el acceso al tratamiento temprano es fundamental. Entre el 20 y el 40% de los pacientes ancianos con fracturas de cadera en México fallecen dentro del primer año tras la lesión, lo que resalta la importancia de la prevención y la intervención temprana

en el manejo de la osteoporosis y las fracturas (Baptista, Mendes, & Soares, 2013). Medidas efectivas pueden reducir el riesgo de osteoporosis y fracturas, mejorar los resultados y así, aliviar la carga sobre los sistemas de salud en México.

Las fracturas intracapsulares, especialmente del cuello femoral, son comunes en México (Cujilema-Cujilema *et al.*, 2019). La alta prevalencia de estas fracturas en México subraya la necesidad de implementar medidas preventivas efectivas, como la detección temprana y el tratamiento adecuado de la osteoporosis (Baptista, Mendes, & Soares, 2013). Aun en el campo de investigación se buscan nuevas formas de tratar fracturas, osteoporosis y osteoartritis, el desarrollo de terapias regenerativas, incluyendo “terapia celular” y “terapia génica”, así como también fortalecer el papel de la nutrición, ejercicio y otros factores del estilo de vida de las personas (Vo, Kasper, & Mikos, n.d.; Alfaro *et al.*, 2011).

Desafío Médico de la Regeneración Ósea

El entendimiento y aprovechamiento de la regeneración ósea representa un desafío médico significativo, especialmente dado que una mala cicatrización y crecimiento de huesos está reportado que afecta a millones de personas en Estados Unidos (Stewart *et al.*, 2015). Los escenarios clínicos más prevalentes de deficiencia en la curación ósea son la pérdida ósea sistémica (osteoporosis y osteopenia) y el trauma local (fracturas). La comprensión detallada de los riesgos clínicos y las patologías biológicas subyacentes es crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas y de regeneración. La osteoporosis, que afecta a aproximadamente 10 millones de estadounidenses, y la osteopenia, que afecta a cerca de 50 millones, tienen como consecuencia más devastadora las fracturas por fragilidad en la población anciana, mientras que en México se calcula que alrededor de 104,000(9.3%) son afectadas por este padecimiento (World

population review, 2024) Aproximadamente la mitad de las mujeres y un cuarto de los hombres mayores de 50 años experimentarán una fractura por fragilidad, con significativas morbilidad y mortalidad subsiguientes (Pech-Ciau *et al.*, 2021). Esto corrobora con los datos mundiales y locales lo que acentúa la preocupación respecto a este fenómeno.

Regeneración Ósea

La capacidad intrínseca del tejido óseo para regenerarse constituye un fenómeno biológico fundamental en la reparación, manutención y crecimiento del sistema óseo (Figura 3) (Burnstock & Di Virgilio, 2013). Este proceso de regeneración ósea implica una serie de eventos biológicos meticulosamente orquestados, que abarcan fases de "inducción" y "conducción" (Vo, Kasper, & Mikos, n.d.). Este fenómeno involucra cierta diversidad de tipos celulares y vías de señalización tanto extra como intracelulares, desplegando secuencias espacio-temporales precisas en un esfuerzo coordinado del organismo por optimizar el uso y canalización de recursos para restaurar la funcionalidad del órgano. A diferencia de otros tejidos, la mayoría de las lesiones óseas, tales como fracturas, sanan sin formación de tejido fibroso, regenerando el hueso con sus características originales (Foreman *et al.*, 2005). Todo esto gracias a los diferentes procesos biológicos como la diferenciación de las células progenitoras mesenquimales en osteoblastos, el papel de los factores de crecimiento, citocinas y hormonas en la regulación de la formación ósea, la interacción entre osteoblastos y osteoclastos en la remodelación del área afectada y el importante papel que tiene la matriz extracelular y

las proteínas de adhesión celular en la mineralización y formación de la matriz ósea (Alfaro *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2015).

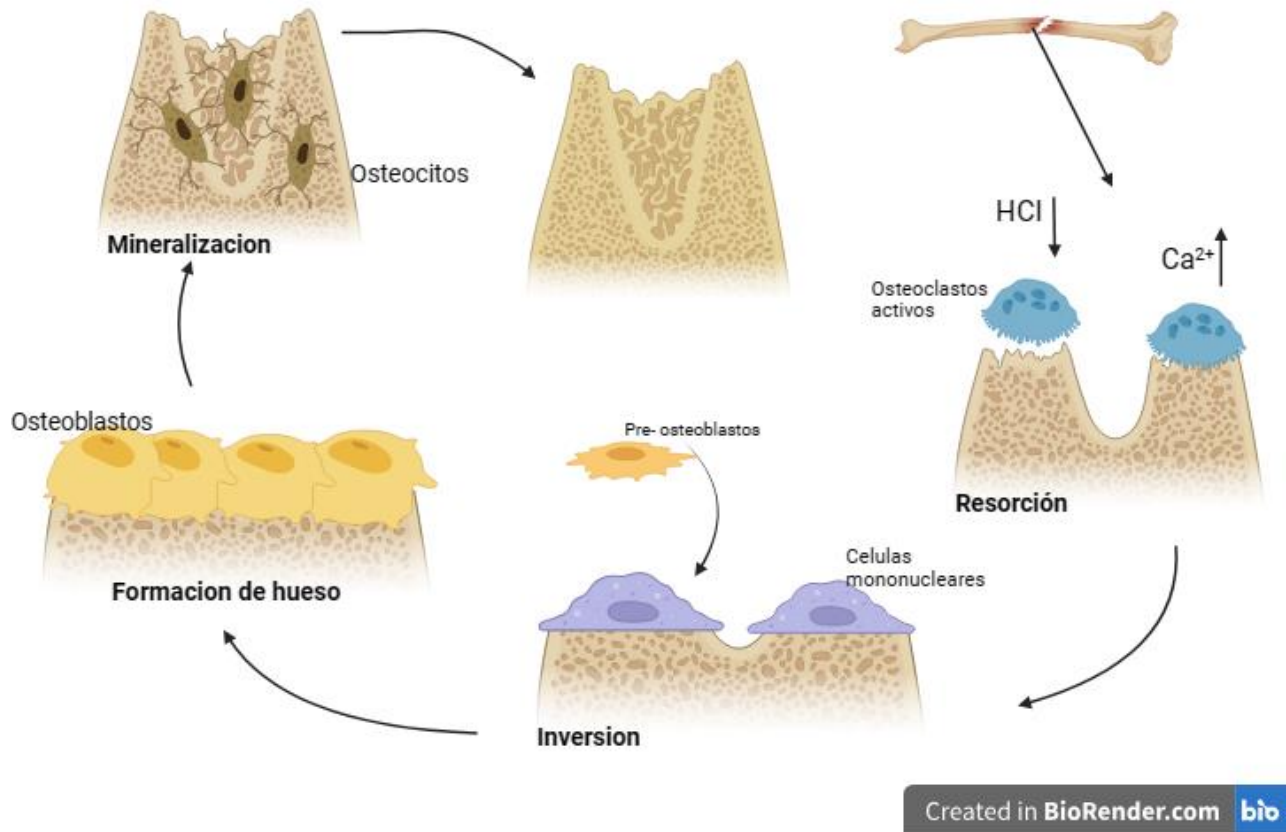


Figura 3. Regeneración ósea a partir de una fractura, después de la lesión se forma el hematoma (resorción), posteriormente el callo blando donde se alojan nuevos condroblastos para ofrecer soporte junto con algunos osteoblastos (inversión), posteriormente, los osteoclastos se disponen a disolver crecimientos anormales y dejar los cimientos adecuados para el andamiaje de células monoclonales (Remodelación y formación de hueso), y la consecuente llegada de nuevos osteoblastos, que posteriormente se convierten en osteocitos que mineralizan y posteriormente osifican por completo la zona de la lesión (mineralización).

Factores Involucrados en la Regeneración Ósea

El proceso de regeneración ósea es complejo, requiriendo una orquestación de múltiples actores en el microambiente óseo para restaurar las propiedades y la estructura ósea preexistentes (Stewart *et al.*, 2015). Este proceso implica una secuencia de eventos que incluyen inducción, conducción y remodelación, cuyo orden puede verse afectado por ciertas condiciones, como las fracturas. A continuación, profundizaremos en este tema.

Señales moleculares en la regeneración ósea

1. **Factores de crecimiento y citocinas:** Sustancias como el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y las interleucinas juegan roles críticos en la promoción de la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis y la formación de la matriz ósea. Estos factores son fundamentales en el proceso de curación y regeneración del tejido óseo, y su estudio continúa revelando nuevas posibilidades para la terapia regenerativa (Alfaro *et al.*, 2011; Vo, Kasper, & Mikos, n.d.).
2. **Hormonas:** La paratiroidea (PTH) y la calcitonina regulan el metabolismo óseo y la homeostasis del calcio, influenciando la actividad osteoblástica y osteoclástica. Estas hormonas son esenciales para mantener el equilibrio entre la formación y resorción ósea, desempeñando un papel crucial en la salud ósea general (Rubert & De la Piedra, 2020; Price *et al.*, 1976).
3. **Nucleótidos extracelulares:** Actúan a través de los receptores purinérgicos para influir en la proliferación, diferenciación y función de los osteoblastos y

osteoclastos, como se mencionará en este estudio, los receptores que están involucrados con estos compuestos extracelulares juegan un papel clave en los procesos que regulan la salud ósea y la respuesta a los estímulos mecánicos y químicos (Burnstock & Di Virgilio, 2013; Jørgensen, 2019).

Componentes de la matriz extracelular (MEC) en la regeneración ósea

1. **Proteínas de la matriz:** Como el colágeno (principalmente tipo I), que proporciona un almacén para la deposición de minerales y la adhesión celular, es fundamental en la arquitectura y la funcionalidad del tejido óseo. Este componente es esencial no solo para la estructura ósea sino también para la dinámica de la reparación y la regeneración ósea (Price *et al.*, 1976).
2. **Glicoproteínas de adhesión:** Tales como las osteopontinas y las sialoproteínas óseas, que regulan la adhesión de las células óseas a la matriz y regulan la mineralización, jugando un rol crucial en los procesos de reparación y remodelación del tejido óseo (Price *et al.*, 1976; Alfaro *et al.*, 2011).
3. **Proteoglicanos y glicosaminoglicanos:** Contribuyen a la estructura de la MEC y regulan la disponibilidad de factores de crecimiento y citocinas, desempeñando funciones críticas en los procesos de señalización celular que promueven la regeneración y reparación ósea (Alfaro *et al.*, 2011; SenGupta *et al.*, 2021).

Factores adicionales

1. **Oxígeno y nutrientes:** suministrados a través de la vascularización, son esenciales para el metabolismo celular y el soporte de la regeneración ósea. Estos componentes juegan un papel crucial en la supervivencia y funcionalidad de las

células óseas durante los procesos de reparación y regeneración (Stewart *et al.*, 2015; SenGupta *et al.*, 2021).

2. **Factores mecánicos:** Factores mecánicos como la carga mecánica y el estrés son importantes para la remodelación ósea y pueden influir en la diferenciación de las células progenitoras mesenquimales (CPM) hacia linajes osteogénicos. Estos estímulos mecánicos son esenciales no solo para el mantenimiento de la estructura ósea sino también para la activación de vías de señalización que promueven la formación ósea y la reparación (SenGupta *et al.*, 2021; Jørgensen, 2019).

Métodos Actuales para Acelerar la Regeneración Ósea

Los métodos actuales de injerto óseo incluyen injertos autólogos, aloinjertos y sustitutos óseos, así como factores de crecimiento, todos fundamentales en las prácticas de regeneración ósea modernas (Bates & Ramachandran, 2007; Vo, Kasper, & Mikos, n.d.). Métodos no invasivos de estimulación biofísica, como el ultrasonido pulsado de baja intensidad (LIPUS) y los campos electromagnéticos de pulso constante (PEMF), se utilizan como adyuvantes para mejorar la regeneración ósea (SenGupta *et al.*, 2021). La ingeniería tisular, un método emergente, se emplea para generar nuevas opciones de tratamiento, como es el uso de andamios, factores de crecimiento y/o células, mejorando la incorporación del injerto, la osteoconductividad, la osteoinductividad y la osteointegración (Verkhatsky & Burnstock, 2014). Estos andamios suelen consistir en estructuras de soporte sólido con una red de poros interconectados, mientras que las matrices a menudo son hidrogeles con células encapsuladas. Las propiedades

fisicoquímicas, tales como resistencia, rigidez, biodegradabilidad y química de superficie, son cruciales para la formación de tejido y puedan gozar de resistencia a las tensiones mecánicas que es lo que caracteriza a este tipo de tejido (Alfaro *et al.*, 2011). Además, la regeneración ósea mediada por células madre (mesenquimales) *invitro* ha demostrado ser prometedora en ensayos clínicos para la regeneración de grandes defectos cráneo-maxilofaciales, en la desaceleración del proceso degenerativo en pacientes con osteonecrosis de la cabeza femoral y en el tratamiento profiláctico de fracturas tibiales distales (Terunuma *et al.*, 2015). A pesar de su potencial, existen limitaciones y desventajas en su uso y disponibilidad, principalmente el costo. Actualmente no hay sustitutos óseos heterólogos o sintéticos que igualen o superen las propiedades biológicas o mecánicas del hueso natural (Stewart *et al.*, 2015). Los análogos de ácidos nucleicos, fármacos como el ácido peptidonucleico (PNA) y el ácido nucleico bloqueado (LNA), pueden persistir y funcionar en las células durante periodos prolongados, y los sistemas portadores de fármacos se utilizan para la entrega eficiente de estos y otros agentes para la regeneración ósea (Di Virgilio *et al.*, 2018). Denosumab, un anticuerpo monoclonal, puede disminuir el recambio óseo y aumentar la densidad mineral ósea, ofreciendo potencialmente una mejora indirecta en la regeneración ósea en condiciones que requieran mejoría (Koupenova & Ravid, 2018). Asimismo, las terapias antirreabsortivas para la osteoporosis pueden incrementar la densidad mineral ósea influyendo directamente en proceso como la regeneración y remodelación ósea. Los agentes anabólicos también son una opción para acompañar el tratamiento de regeneración ósea (Alberto *et al.*, 2019). Además, se investiga en biomateriales y técnicas de ingeniería de tejidos como los andamios biocompatibles, que imitan la estructura de la matriz ósea natural, la liberación controlada de factores de crecimiento y

otras moléculas bioactivas para estimular al microambiente óseo, y el uso de la impresión 3D y la biofabricación para crear estructuras óseas personalizadas (Vo, Kasper, & Mikos, n.d.). En resumen, existe una variedad de métodos para facilitar la regeneración ósea, pero es esencial considerar las limitaciones y desventajas asociadas a cada uno de ellos.

Línea Multipotencial de Osteoblastos

Las células pertenecientes al linaje osteoblástico engloban una historia de desarrollo desde progenitores mesenquimales hasta osteocitos maduros (Rubert & De la Piedra, 2020). Este conjunto celular desempeña un papel crucial en la homeostasis del esqueleto maduro en mamíferos, a través de un equilibrio dinámico entre la osteogénesis y la osteólisis, mineralización ósea mediada por los osteoblastos, y la reabsorción ósea, ejecutada por los osteoclastos.

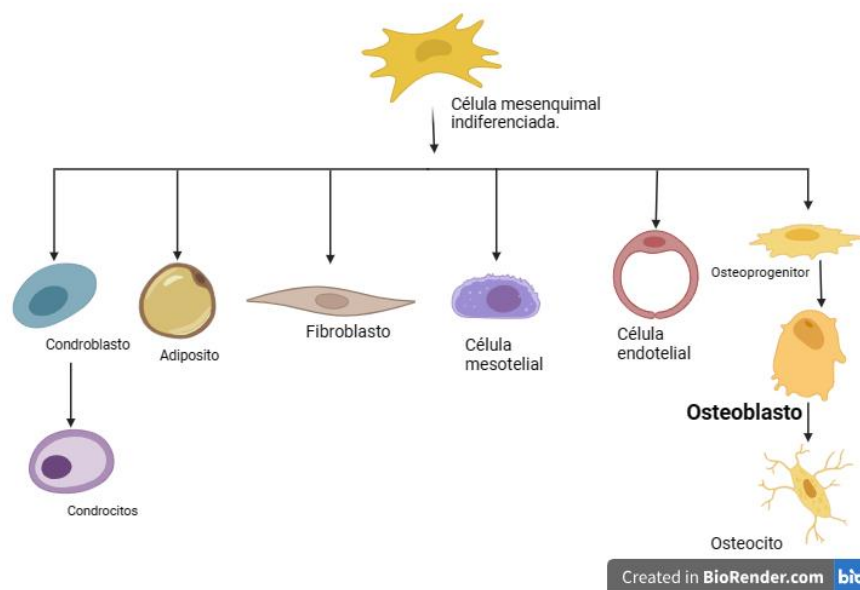


Figura 4. Línea celular donde surgen y se diferencian los osteoblastos, dando como resultado final un osteocito.

Investigaciones recientes han expandido significativamente nuestra comprensión de las funciones de los osteoblastos más allá de su papel tradicional en la formación

esquelética, el soporte mecánico, la fijación muscular y como reservorio de fósforo y calcio (Long *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las células diferenciadas del linaje osteoblástico, específicamente los osteocitos, son productoras del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), regulador clave de los niveles séricos de fosfato mediante la modulación de la función renal. Además, estas células contribuyen significativamente al microambiente de la médula ósea, esencial para la homeostasis de las células madre hematopoyéticas. Recientes estudios en modelos murinos han revelado funciones inéditas de los osteoblastos en la regulación metabólica de la glucosa y en aspectos del sistema reproductor masculino (Jørgensen, 2019).

Características de los Osteoblastos

Los osteoblastos son células especializadas en la síntesis y desarrollo del tejido óseo. Producen una matriz extracelular única compuesta por proteínas específicas como osteocalcina, fosfatasa alcalina, y una predominante cantidad de colágeno tipo I. Esta matriz, conocida como “matriz osteoide” antes de su mineralización, requiere la acumulación de fosfato de calcio en forma de hidroxapatita para su consolidación, dando origen al material compuesto, caracterizado por ser resistente y ligero, que constituye el componente principal del hueso (Price *et al.*, 1976). Los osteoblastos presentan polarización celular, evidenciada por la presencia de numerosos procesos citoplasmáticos en la parte de la membrana en contacto directo con la superficie ósea, extendiéndose hacia el osteoide recién depositado por células mononucleares y los mismos osteoblastos u osteoclastos remodelando o atendiendo una lesión. Citológicamente, estas células se caracterizan por un citoplasma intensamente basófilo, una alta densidad de mitocondrias y un aparato de Golgi prominente, elementos

coherentes con su elevada capacidad de producción y secreción de proteínas extracelulares (Rubert & De la Piedra, 2020; Price *et al.*, 1976).

Origen y Diferenciación

- **Procedencia:** Los osteoblastos se originan de las células progenitoras mesenquimales (CPM) que se encuentran en la medula de huesos largos en el cuerpo, que tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células, incluidos los osteoblastos, para estos últimos por ejemplo son obtenidos bajo la influencia de factores de señalización específicos como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Alfaro *et al.*, 2011).
- **Diferenciación:** La diferenciación de las células progenitoras mesenquimales (CPM) hacia osteoblastos es regulada por factores de transcripción clave, como “Runx2” y “Osterix”, que activan la expresión de genes específicos para osteoblastos (Koupenova & Ravid, 2018).

Funciones Principales

- **Síntesis de la matriz ósea (osteóide):** Los osteoblastos son los principales responsables de producir y secretar los componentes orgánicos de la matriz ósea, incluyendo colágeno tipo I y diversas proteínas no colágenas como la osteocalcina, la osteopontina y las sialoproteínas óseas. Estos componentes son cruciales para la formación e integridad estructural junto con la funcionalidad del hueso (Price *et al.*, 1976; Rubert & De la Piedra, 2020).
- **Mineralización:** La mineralización de la matriz ósea se lleva a cabo mediante la secreción de vesículas de matriz que contienen factores que promueven la

deposición de cristales de hidroxapatita, compuestos principalmente por calcio y fosfato. Este proceso es fundamental para la formación del tejido óseo duro y resistente que caracteriza al esqueleto, regulado por osteocitos (Price *et al.*, 1976; Alfaro *et al.*, 2011).

Características Morfológicas

- **Morfología:** En cultivo, los osteoblastos presentan una morfología geométrica y muestran una gran actividad metabólica. Pueden formar una monocapa densa cuando alcanzan la confluencia de 100%.
- **Expresión de marcadores:** Exhiben la expresión de marcadores específicos, como la fosfatasa alcalina (un marcador temprano de diferenciación osteoblástica) y la osteocalcina (un marcador de maduración osteoblástica), que nos ayudan a indicar en qué fase de la remodelación ósea nos encontramos.

Actividad y Regulación

- **Interacciones celulares:** Los osteoblastos interactúan con otras células del tejido óseo, como los osteoclastos, para regular la remodelación ósea a través del acoplamiento de la formación o resorción ósea. Esta dinámica entre formación y resorción es fundamental para mantener la homeostasis ósea y la integridad estructural del esqueleto (Koupenova & Ravid, 2018; Jørgensen, 2019).
- **Regulación por señales:** La actividad de los osteoblastos es finamente regulada por señales hormonales como la parathormona (PTH) y la calcitonina, factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), citocinas y señales mecánicas también.

Estos reguladores modulan la formación de hueso y la resorción, manteniendo así la homeostasis del tejido óseo (Rubert & De la Piedra, 2020; Koupenova & Ravid, 2018).

Diferenciación de la Línea Celular de Osteoblastos

El proceso de diferenciación de la línea celular osteoblástica, que comprende la transición de progenitores mesenquimales a pre-osteoblastos y posteriormente a osteoblastos maduros y finalizar su camino diferenciándose en osteocitos, representa una secuencia compleja y aun parcialmente entendida en la biología celular del hueso. A pesar de que la categorización en estas etapas facilita la comprensión del desarrollo osteoblástico, la caracterización molecular precisa de cada etapa sigue siendo un campo de intensa investigación (Jørgensen, 2019). Los osteoblastos maduros se distinguen frecuentemente por la expresión de biomarcadores específicos como la osteocalcina (Rubert & De la Piedra, 2020); Sin embargo, los marcadores definitivos de los progenitores mesenquimales continúan siendo un tema de debate científico. Los pre-osteoblastos, caracterizados como un espectro heterogéneo de células en transición, generalmente expresan el factor de transcripción RUNX2 y, en fases más avanzadas, una combinación de “RUNX2” y “osterix” (OSX o SP7) (Koupenova & Ravid, 2018).

La osteocalcina, sintetizada exclusivamente por los osteoblastos, es una proteína de notable interés, identificada inicialmente a finales de la década de 1970 (Price *et al.*, 1976). Esta proteína sufre un proceso crítico de gamma-carboxilación, que involucra la adición de residuos de ácido gamma-carboxi-glutámico en posiciones específicas, incrementando así su afinidad por el calcio y facilitando su unión a la hidroxapatita en la matriz ósea. Solo un porcentaje minoritario de la osteocalcina sintetizada se encuentra

en la circulación sistémica, con el resto segregado firmemente a la matriz ósea. Interesantemente, durante la resorción ósea, una porción de la osteocalcina unida se libera al torrente sanguíneo. La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante en la matriz extracelular ósea y ocupa un lugar prominente entre las proteínas más abundantes en los vertebrados (Rubert & De la Piedra, 2020). Los osteoblastos se originan de células osteoprogenitoras influenciadas por la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y juegan un papel crucial en la regulación ósea. Estas células son productoras del receptor activador de NF- κ B ligando (RANKL), un factor clave en la diferenciación de pre-osteoclastos a osteoclastos (García *et al.*, 2008), y también poseen receptores para la hormona paratiroidea, los cuales estimulan la producción de ligando de osteoprotegerina (OPGL), catalizando así la diferenciación osteoclástica (O'Neill *et al.*, 2018). Además, los osteoblastos secretan factores estimulantes de osteoclastos, incluyendo interleucina-1 (IL-1) y otras como IL-6 e IL-2, que promueven la actividad osteoclástica.

En el ámbito de la síntesis ósea, los osteoblastos son responsables de la producción de matriz osteoide, proceso estimulado por factores autócrinos como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), prostaglandina E2 (PGE-2) y el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) (Di Virgilio *et al.*, 2018). Las células osteoprogenitoras, al diferenciarse en osteoblastos, contribuyen a la formación del osteoide que posteriormente se deposita en las trabéculas del cartílago calcificado. Tras la calcificación del osteoide, se observa la formación de un complejo integrado de cartílago calcificado y hueso. Microscópicamente, el cartílago calcificado se distingue del hueso recién formado por su

tinción basófila y ausencia de células, mientras que el hueso neoformado presenta tinción eosinofílica y presencia de núcleos en los osteocitos (Koupenova & Ravid, 2018).

La influencia hormonal sobre la estructura ósea es considerable, con hormonas como la paratiroidea y la calcitonina jugando roles directos e indirectos en la regulación del calcio. La liberación de hormona paratiroidea en respuesta a niveles bajos de calcio sanguíneo induce la resorción ósea por los osteoclastos y potencia la absorción intestinal de calcio y fosfato, estimulando la síntesis de metabolitos activos de vitamina D (Di Virgilio *et al.*, 2018). En conjunto, este panorama detallado subraya la complejidad y la importancia de los osteoblastos en la biología ósea, destacando su papel central en el mantenimiento y regulación del tejido óseo, así como su interacción con varios sistemas regulatorios a nivel organismo para mantener niveles séricos adecuado de este vital ion Ca^{2+} (Koupenova & Ravid, 2018).

Receptores Purinérgicos

Los receptores purinérgicos constituyen un sistema de señalización celular complejo y fundamental, clasificado en dos categorías principales: los receptores P1 y P2. Los receptores P1 se caracterizan por su afinidad a la adenosina, mientras que los receptores P2 responden a los fosfatos de adenosina (Figura 5). Los receptores P1 comprenden cuatro subtipos de receptores acoplados a proteína G: A2a (A2aAR) y A2b (A2bAR), que activan la adenilato ciclasa generando AMP cíclico (AMPc), y A1 (A1AR) y A3 (A3AR), que inhiben la adenilato ciclasa, reduciendo así los niveles de AMPc (Burnstock & Di Virgilio, 2013). Los receptores P1 están involucrados en la regulación de numerosos procesos fisiológicos, como el flujo sanguíneo, la función inmunitaria, el sueño y la respuesta al estrés. Por ejemplo, la activación de los receptores A2a puede conducir a la

vasodilatación, mientras que los receptores A1 están más relacionados con efectos cardioprotectores y la reducción de la frecuencia cardíaca (Stam *et al.*, 2018).

Por otro lado, los receptores P2 se dividen en dos familias: los receptores P2Y y P2X (Figura 5). Los P2Y, acoplados a proteína G, abarcan ocho subtipos en mamíferos (Y₁, Y₂, Y₄, Y₆, Y₁₂, Y₁₃, Y₁₄) y se activan principalmente por nucleótidos como el trifosfato, difosfato de adenosina y nucleótidos de uracilo (Burnstock & Di Virgilio, 2013). Estos receptores presentan una estructura característica con siete segmentos transmembranales, un dominio amino-terminal extracelular y un carboxilo-terminal intracelular y tres segmentos conectando los dominios transmembranales (Jørgensen, 2019). Están involucrados en la regulación de procesos como la agregación plaquetaria, la función vascular, la motilidad de las células inmunitarias, la secreción de insulina y la función de los órganos sensoriales. También pueden influir en la proliferación y diferenciación celular, la respuesta inmune, la homeostasis energética y la reparación y regeneración tisular.

Los receptores P2X, por su parte, son canales catiónicos no selectivos activados exclusivamente por ATP extracelular. Se han identificado siete subtipos de subunidades (P2X₁ - P2X₇), las cuales pueden ensamblarse en configuraciones homo y heterotríméricas. Estos canales poseen dos segmentos transmembranales, un asa extracelular para la unión de ligandos, y extremos amino y carboxilo-terminales intracelulares (Burnstock & Di Virgilio, 2013). La mayoría de los canales P2X, cuando se activan, se vuelven permeables a cationes univalentes y divalentes específicamente Ca²⁺ y Na⁺, con la notable excepción del P2X₅, que es permeable a aniones. El receptor P2X₇ presenta una característica única, siendo activado por bajas concentraciones de ATP

extracelular, pero a concentraciones más elevadas ($>100 \mu\text{M}$), se abre permitiendo la entrada de moléculas de hasta 900 Da (Di Virgilio *et al.*, 2018). Los receptores P2X se consideran entre los más antiguos en la evolución, presentes en protozoarios y organismos multicelulares tempranos, aunque en algunas especies como *C. elegans* y *Drosophila* han desaparecido. A pesar de que su estructura y función se han conservado a lo largo de la evolución, existe una baja similitud en la secuencia de aminoácidos entre especies ($\sim 20\text{-}25\%$ entre *D. discoideum* y mamíferos comparados) (Stam *et al.*, 2018).

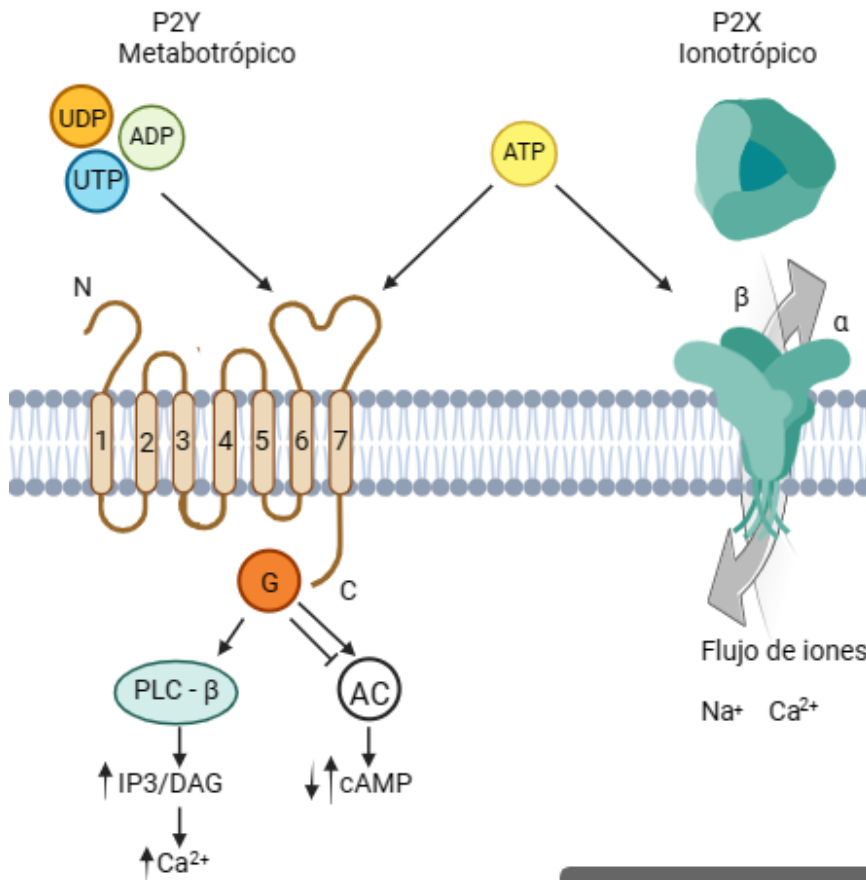


Figura 5. Estructuras de los receptores purinérgicos.

A: Estructura de un receptor P2Y, de características metabotrópicas, sensible a sustratos como UDP, UTP, ADP y ATP, de 7 pases transmembranales, una cola aminoterminal extracelular, en donde se encuentra también el asa de sitio de unión para ligando, una cola carboxiterminal intracelular, en donde está involucrado para formar el sitio de unión a proteína G, y por debajo, se pueden apreciar la vía de la fosfolipasa C donde regulando la presencia de IP₃ y DAG, provoca liberación de Ca²⁺, y a la

derecha se encuentra la vía de la adenilciclase en donde se regulan los niveles de cAMP para provocar otras cascadas de señalización dentro de la célula. **B:** Estructura de un receptor de P2X, de características de canal iónico, se caracteriza por tres dominios transmembranales en forma de "delfín" una de las

subunidades suele ser la que cuenta con sitio de unión a ATP lo cual hace que sufra un cambio en su estado de conformación de cerrado a abierto, y permita el flujo de iones no específicos, aunque se presume que principalmente transitarían gradientes de Ca^{2+} .

También su presencia en los osteoblastos está relacionada en la modulación de la liberación de neurotransmisores y neurohormonas, la regulación de la función de las células inmunitarias, y la mediación de la sensación de dolor y de procesos inflamatorios. Estas actividades destacan el papel de los osteoblastos como mediadores críticos en la intersección entre los sistemas esquelético, nervioso e inmunitario, contribuyendo a la homeostasis corporal general (Koupenova & Ravid, 2018; Burnstock & Di Virgilio, 2013).

Receptores P2X en osteoblastos

- **P2X₂, P2X₄, y P2X₇**: son comúnmente identificados en osteoblastos. El receptor P2X₇, en particular, ha sido ampliamente estudiado debido a su papel en la apoptosis celular y la formación ósea. La activación de P2X₇ en osteoblastos puede promover la liberación de factores de crecimiento como el RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B), que también es crucial para la formación y activación de osteoclastos, y puede influir en la mineralización ósea (Di Virgilio *et al.*, 2018; Jørgensen, 2019).

Receptores P2Y en osteoblastos

- **P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, y P2Y₁₂**: se han identificado en osteoblastos. Estos receptores participan en diversas funciones, incluyendo la proliferación y diferenciación de osteoblastos. Por ejemplo, el receptor P2Y₂ puede mediar en la respuesta de los osteoblastos a los nucleótidos extracelulares, promoviendo la

proliferación y la síntesis de proteínas de la matriz ósea (Burnstock & Di Virgilio, 2013; Jørgensen, 2019).

La expresión de estos receptores puede variar dependiendo del estado de diferenciación de los osteoblastos y las condiciones del entorno celular. La señalización purinérgica, mediada a través de estos receptores, está implicada en la regulación de la formación ósea y la remodelación, y se considera un objetivo potencial para el tratamiento de enfermedades óseas como la osteoporosis (Burnstock & Di Virgilio, 2013; Jørgensen, 2019).

Señalización purinérgica

La noción de las purinas como moléculas señalizadoras extracelulares se originó con Drury y Szent-Gyorygi en 1929, pero no fue hasta 1972 que la teoría de la "neurotransmisión purinérgica" fue formalmente propuesta por Burnstock varias décadas después. Hoy en día, se reconoce ampliamente que los nucleótidos extracelulares inducen respuestas biológicas a través de los receptores P2, desempeñando roles esenciales en una variedad de procesos biológicos en múltiples tejidos del organismo (Burnstock, 2006).

El sistema de señalización purinérgica, implicando las subfamilias de receptores purina y pirimidina P1, P2X y P2Y, es una forma predominante de comunicación intercelular. Este sistema se basa en la liberación de purinas, como el ATP, de las células, activando receptores purinérgicos en células adyacentes y desencadenando cascadas de respuestas en tejidos y órganos (Burnstock, 2006; Di Virgilio *et al.*, 2018). Este mecanismo de señalización es crucial en una variedad de procesos fisiológicos y

patológicos, incluyendo nocicepción, trauma, isquemia, reacciones neuroinmunes y neuroinflamatorias, así como en enfermedades neuropsiquiátricas y adicciones (Jørgensen, 2019). En relación con la biología ósea, la señalización purinérgica en los osteoblastos, es responsable de la formación de nuevo tejido óseo, realizan su función en dos fases: la síntesis y deposición de la matriz orgánica, seguida por la mineralización de esta matriz osteoide con iones de calcio y fosfato para formar tejido óseo calcificado, conocido también como hidroxapatita (Koupenova & Ravid, 2018). Durante este proceso, los osteoblastos maduros sintetizan y secretan colágeno tipo I, que constituye el 85-90% de los componentes de la matriz ósea, junto con otras proteínas no colágenas. Algunos osteoblastos se incorporan en la matriz que secretan, diferenciándose posteriormente en osteocitos, los cuales forman una red interconectada dentro del hueso y se cree que median las respuestas a cargas mecánicas. Por otro lado, los osteoclastos, células multinucleadas, son responsables de la reabsorción ósea. Estas células se polarizan en el tejido óseo, formando un compartimiento sellado que delimita la zona de reabsorción y secretan protones y enzimas, como la catepsina K, para disolver el mineral óseo (Di Virgilio *et al.*, 2018).

La señalización purinérgica en el contexto del tejido óseo aún está siendo explorada, pero las evidencias sugieren que los nucleótidos extracelulares, especialmente el ATP, pueden desempeñar un papel significativo en la regulación de las actividades de los osteoblastos y osteoclastos. Este campo emergente promete aportar nuevas perspectivas sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la fisiología y patología ósea, ampliando nuestra comprensión de los procesos celulares y moleculares en el sistema esquelético (Burnstock, 2006). Es esta misma señalización que juega roles

cruciales en funciones vitales como la transducción sensorial, regulación del ritmo cardíaco, contracción muscular lisa, secreción biliar, regulación endocrina, y respuestas inmunes (Burnstock & Di Virgilio, 2013). Está involucrada en numerosos procesos fisiopatológicos, incluyendo dolor neuropático, diabetes, insuficiencia renal y cáncer (Jørgensen, 2019). Esta señalización implica tanto purinas como pirimidinas y tiene una larga historia evolutiva, vinculada a los orígenes del código genético y la bioenergética. La presencia de fosfatos inorgánicos y purinas es fundamental para la vida, en términos de conversión y almacenamiento de energía (Di Virgilio *et al.*, 2018). Existe un debate sobre cómo aparecieron los fosfatos en la Tierra, con teorías que sugieren su llegada en meteoritos, aunque su origen exacto es incierto. Se postula que los enlaces de pirofosfato y la fosforilación de nucleósidos ocurrieron en una etapa prebiótica, marcando un momento crítico en la evolución orgánica, especialmente en la formación de oligonucleótidos y ARN/ADN (Koupenova & Ravid, 2018). El ATP, uno de los compuestos más reactivos en reacciones bioquímicas después del agua, destaca en este contexto. Un metabolismo basado en fosfatos solo es viable a niveles muy bajos de Ca^{2+} , lo que sugiere que todas las formas de vida mantienen un nivel de Ca^{2+} citosólico excepcionalmente bajo (<100 nM). Esto puede indicar un océano primordial alcalino con baja concentración de Ca^{2+} , un rasgo ambiental prehistórico que podría haber influido en la aparición de una compleja homeostasis iónica celular. Los gradientes transmembranales de Ca^{2+} están íntimamente ligados a la señalización purinérgica (Di Virgilio *et al.*, 2018).

Funciones Generales de la señalización purinérgica

- **Transmisión Sináptica y Neuromodulación:** En el sistema nervioso, los receptores purinérgicos modulan la liberación de neurotransmisores y participan en la transmisión del dolor y las respuestas inflamatorias (Burnstock & Di Virgilio, 2013).
- **Inmunorregulación:** Regulan la función de las células inmunitarias, incluyendo la liberación de citocinas, la quimiotaxis y la fagocitosis (Di Virgilio *et al.*, 2018).
- **Procesos Inflamatorios:** Participan en la señalización inflamatoria, mediando respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias dependiendo del contexto celular y del receptor específico activado (Jørgensen, 2019).
- **Regulación de la Función Cardiovascular:** Influyen en la contracción y relajación de los vasos sanguíneos, la agregación plaquetaria y la protección del tejido cardíaco bajo estrés (Koupenova & Ravid, 2018).
- **Función del Sistema Digestivo:** Modulan la secreción de fluidos y electrolitos, la motilidad gastrointestinal y la liberación de enzimas digestivas (Stam *et al.*, 2018).
- **Metabolismo Óseo:** En el tejido óseo, los receptores purinérgicos regulan el equilibrio entre la formación y resorción ósea, afectando la función de osteoblastos y osteoclastos (Burnstock, 2006).

Liberación Celular de ATP

El trifosfato de adenosina (ATP), un crucial mensajero bioquímico, es sintetizado a través de la glicólisis oxidativa y la foto-Fosforilación en organismos eucariotas. Dentro de estas células, las mitocondrias son las principales fábricas de ATP, alcanzando concentraciones citosólicas de 1-10mM, facilitando así un eficiente mecanismo de liberación del ATP (Rizzuto *et al.*, 2009). Este proceso de liberación es un fenómeno universal, observado en todo el espectro filogenético, desde bacterias y levaduras hasta plantas, protozoarios y organismos multicelulares (Verkhatsky & Burnstock, 2014).

La liberación celular de ATP (adenosín trifosfato) es un fenómeno importante en la señalización celular y la comunicación intercelular. El ATP, conocido principalmente como la "moneda energética" de la célula debido a su papel en el almacenamiento y transferencia de energía, también actúa como una señal extracelular en muchos sistemas biológicos. La liberación de ATP ocurre a través de múltiples mecanismos, incluyendo la difusión transmembranal a través de canales permeables, el transporte activo y la exocitosis (Sprague & Khalil, 2009). Entre los mecanismos más arcaicos de liberación se encuentra la mediación por canales mecanorreceptores iónicos, cuya presencia y actividad se han registrado en una amplia variedad de organismos y tipos celulares, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Estos canales incluyen los canales aniónicos regulados por volumen, conexinas y inexinas de alta conductancia (operando también como hemicanales), panexinas y receptores purinérgicos P2X₇ (Dahl, 2015).

Mecanismos de liberación de ATP

- **Exocitosis:** El ATP puede ser empaquetado en vesículas dentro de la célula y luego liberado al espacio extracelular a través de un proceso de exocitosis, similar a la liberación de neurotransmisores en las sinapsis neuronales (Pascual, 2005).
- **Canales de aniones conductores de ATP:** Algunos canales transmembrana, como los canales de cloruro, pueden permitir la salida pasiva de ATP al espacio extracelular cuando están abiertos (Dahl, 2015).
- **Hemicanal de conexina y pannexina:** Estas proteínas forman canales en la membrana plasmática que pueden abrirse en respuesta a ciertos estímulos, permitiendo la liberación de ATP al medio extracelular (Sáez *et al.*, 2010).
- **Transportadores ABC (proteínas transportadoras de casete de unión a ATP):** Aunque su función principal es transportar una variedad de moléculas a través de la membrana celular utilizando energía de ATP, algunos transportadores ABC pueden facilitar la liberación de ATP (Dean *et al.*, 2001).
- **Lisis celular:** La lisis o daño celular puede liberar ATP de las células al entorno extracelular como parte de una señal de "peligro" o "lesión" (Zimmermann, 2006).
- **Mecanismos evolutivos y fisiológicos:** En el caso de los protozoarios, se ha identificado la expresión de la "ATP binding cassette" (ABC), lo que sugiere mecanismos evolutivamente conservados de liberación de ATP. La liberación vesicular, similar al proceso utilizado en la comunicación neuronal, se considera una ruta fisiológica significativa, implicando el uso de vesículas especializadas capaces de acumular ATP mediante transporte activo a través del transportador vesicular nuclear de nucleótidos (VNUT o SLC19A9) (Sawada *et al.*, 2008).

- **Mecanismo en astrocitos:** Otro mecanismo interesante es la liberación de ATP mediada por lisosomas, hasta ahora identificada exclusivamente en astrocitos cultivados. Esta ruta de liberación vesicular también incluye la co-liberación de ATP con azúcares-UDP a través de vías secretoras (Cotrina *et al.*, 2000).

Estos mecanismos multifacéticos de liberación de ATP subrayan su papel integral en una variedad de procesos celulares y señalización intercelular, y reflejan la evolución y adaptación del ATP como un mediador bioquímico crítico en la biología celular y sistémica.

Regulación de la liberación de ATP

- **Liberación de ATP:** Es un proceso regulado que puede ser activado por diversos estímulos, incluyendo estrés mecánico, hipoxia, inflamación y activación sináptica. La regulación precisa de esta liberación es esencial para la señalización celular efectiva y la homeostasis tisular (Burnstock, 2006; Verkhratsky & Burnstock, 2014). Estos procesos están mediados por diversos mecanismos previamente mencionados.
- **Implicaciones clínicas:** Las alteraciones en la liberación y señalización de ATP han sido asociadas con varias enfermedades, incluyendo trastornos neurológicos, cardiovasculares, inflamatorios y autoinmunes (Di Virgilio *et al.*, 2018). La comprensión de estos procesos ofrece potencial para el desarrollo de terapias dirigidas a la modulación de la señalización purinérgica, aprovechando agentes que puedan influir en los receptores purinérgicos para corregir disfunciones en la comunicación celular (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

Señalización Purinérgica en la Regeneración Ósea: Mecanismos Moleculares y Funcionales

La comprensión de las vías involucradas en la regeneración ósea es fundamental para identificar potenciales blancos terapéuticos. Dentro de este contexto, la señalización purinérgica, que implica purinas extracelulares como ATP y adenosina, emerge como un sistema de señalización clave. Específicamente, los receptores purinérgicos P2Y₂ han demostrado ser importantes en la mecanosensibilidad de los osteoblastos y en la mediación de respuestas sinérgicas a estímulos mecánicos y a la hormona paratiroidea (PTH), influyendo en procesos como la fosforilación de ERK1/2 y CREB, así como en la proliferación celular (Di Virgilio *et al.*, 2018). La inhibición de los efectos del ATP mediante apirasa o suramina en los osteoblastos reduce dichas respuestas sinérgicas, sugiriendo que la señalización purinérgica podría ser un objetivo terapéutico viable para potenciar la regeneración ósea en casos de fracturas (Di Virgilio *et al.*, 2018).

La señalización purinérgica juega un papel crucial en la regeneración ósea (Figura 6), involucrando una compleja red de señales mediadas por nucleótidos como el ATP, ADP, UTP y la adenosina, que interactúan con una amplia gama de receptores purinérgicos presentes en las células óseas, incluyendo osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Burnstock, 2006; Orriss *et al.*, 2010). Esta señalización regula diversas funciones celulares esenciales para la formación, mantenimiento y reparación del tejido óseo, subrayando su importancia en la fisiología ósea y en el potencial desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

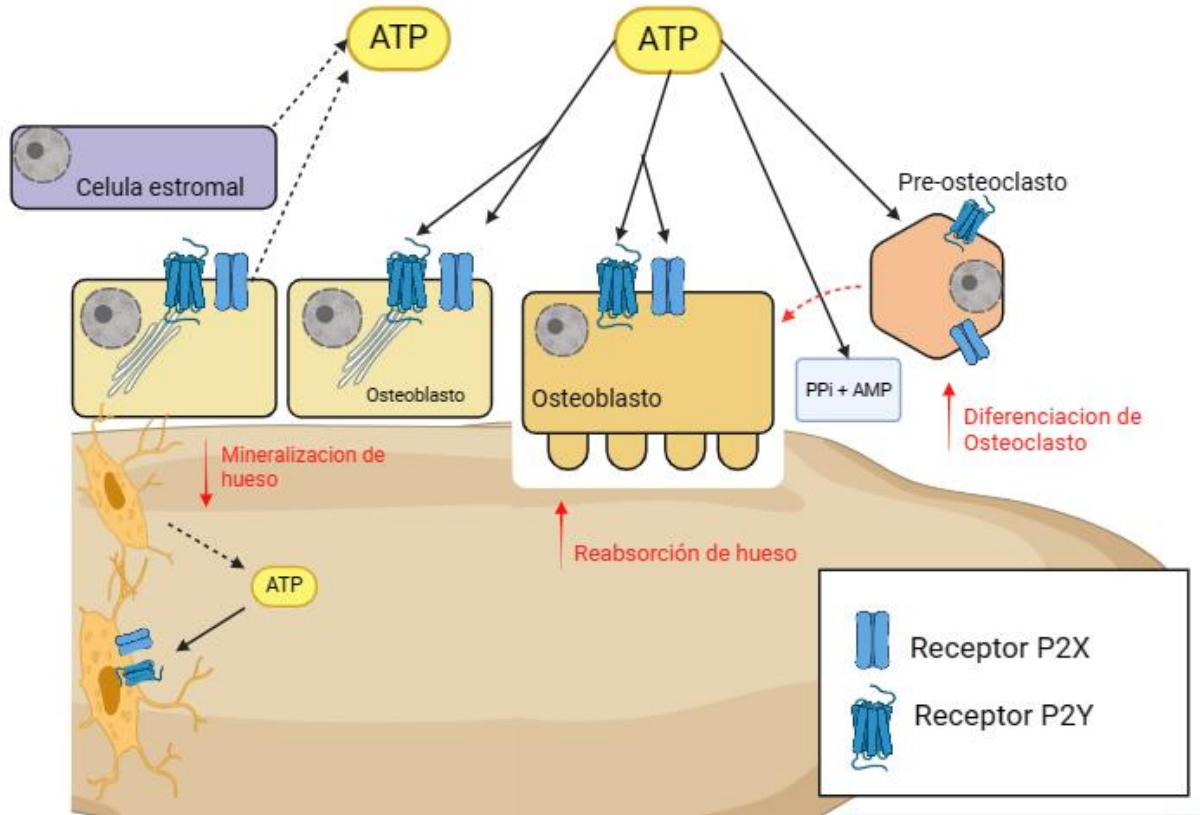


Figura 6. Interacción de ATP con los receptores purinérgicos en el proceso de remodelación ósea. La figura ilustra cómo el ATP extracelular, liberado por células estromales y osteoblastos, entre otros; actúa a través de los receptores P2X y P2Y en osteoblastos y pre-osteoclastos. En los osteoblastos, el ATP promueve la mineralización del hueso y participa en la regulación de la resorción ósea. En los pre-osteoclastos, el ATP influye en la diferenciación a osteoclastos maduros a través de la generación de señales secundarias como PPI y AMP. Este esquema destaca el papel de las purinas como actores cruciales en el mantenimiento y la función del tejido óseo.

1. Proliferación y diferenciación: Los receptores P2X y P2Y en osteoblastos pueden mediar respuestas a nucleótidos extracelulares como el ATP, promoviendo la proliferación y diferenciación de estas células. La señalización a través de estos receptores activa vías de señalización intracelular que conducen a la expresión de genes específicos de osteoblastos, como la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, indicadores clave de maduración y función osteoblástica (Orriss *et al.*, 2010). Formación de la matriz ósea y mineralización: La señalización purinérgica también influye en la capacidad de los

osteoblastos para depositar la matriz ósea y en su mineralización, procesos fundamentales para la formación de hueso nuevo y la reparación ósea (Di Virgilio *et al.*, 2016).

2. Efectos en los osteoclastos: La señalización purinérgica puede afectar la diferenciación y actividad de los osteoclastos. El ATP, por ejemplo, actúa a través de receptores P2X7 en osteoclastos para promover su maduración y actividad de resorción, mientras que la adenosina, que se forma por la degradación del ATP, tiene efectos inhibidores en los osteoclastos a través de receptores específicos de adenosina, equilibrando la resorción y formación ósea (Jørgensen, 2019).

3. Rol de los osteocitos: Los osteocitos, incrustados dentro de la matriz ósea, liberan ATP en respuesta a la deformación mecánica, actuando como mediadores en la mecanotransducción ósea y la regulación de la remodelación ósea en respuesta a cargas mecánicas (Burnstock, 2006).

4. Regeneración y reparación ósea: En situaciones de daño óseo, estrés, o crecimiento regular del individuo, las células óseas pueden liberar mayores cantidades de ATP y otros nucleótidos al espacio extracelular, actuando como señales de "alarma" que promueven la respuesta regenerativa o remodeladora. La señalización purinérgica facilita la activación de células progenitoras óseas y coordina la respuesta inflamatoria crucial en las primeras etapas de la cicatrización ósea (Di Virgilio *et al.*, 2018).

5. Interacciones entre la señalización purinérgica y otras vías: La señalización purinérgica en la regeneración ósea interactúa con otras vías de señalización, incluyendo las mediadas por factores de crecimiento, citocinas y hormonas, teniendo efectos

sinérgicos o antagónicos en la regulación de la formación y resorción ósea (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

Implicaciones terapéuticas: Dada su implicación directa en la regeneración y reparación ósea, la señalización purinérgica es un objetivo potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas para tratar trastornos óseos como la osteoporosis, la osteoartritis y las fracturas óseas. La modulación de la actividad de los receptores purinérgicos podría ofrecer nuevas vías para mejorar la salud ósea (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

La investigación sobre la señalización purinérgica en la regeneración ósea está en constante evolución, y se están descubriendo continuamente nuevos mecanismos y potenciales aplicaciones terapéuticas. La continua exploración de cómo los nucleótidos extracelulares como el ATP y la adenosina interactúan con sus receptores ha revelado implicaciones significativas para la salud ósea. Los receptores P2X y P2Y, por ejemplo, son cruciales para las funciones de proliferación y diferenciación de los osteoblastos, y la regulación de la actividad osteoclástica, mostrando un campo dinámico y prometedor para futuras investigaciones (Di Virgilio *et al.*, 2018; Burnstock, 2006).

Estudiar cómo los nucleótidos extracelulares y sus receptores afectan a las células óseas ofrece perspectivas prometedoras para comprender mejor la fisiología ósea y desarrollar tratamientos para enfermedades óseas. Este enfoque no solo tiene el potencial de mejorar nuestra comprensión de la biología ósea, sino también de abrir nuevas avenidas para terapias dirigidas que podrían tratar o incluso prevenir condiciones como la osteoporosis y otras enfermedades óseas relacionadas (Orriss *et al.*, 2010; Jørgensen, 2019).

Señalización de Calcio Mediada por Receptores Purinérgicos

Los receptores purinérgicos juegan un papel crucial en la señalización del calcio. En células endoteliales, los receptores P2 activan la respuesta de calcio mediada por GABA_{BR}, con estudios que demuestran cómo estas interacciones son esenciales para las funciones vasculares (Scarpellino *et al.*, 2019). Además, los receptores ionotrópicos P2XR facilitan directamente la entrada de calcio. Adenosina y ADP, actuando sobre receptores P1 y algunos P2YR respectivamente, pueden inducir señales de calcio y afectar la migración de células endoteliales, una función crucial en la regulación de la angiogénesis y en respuesta a estímulos mecánicos (Terunuma *et al.*, 2015).

A pesar de que los roles funcionales de la señalización purinérgica en células tumorales y vasculares están en debate, su potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer ha sido evaluado. La investigación sobre cómo estos receptores modulan el microambiente tumoral y la progresión de cáncer sigue ofreciendo perspectivas interesantes para terapias innovadoras.

La uridina 5'-trifosfato (UTP) mejora la liberación de ATP a través de vías intracelulares de calcio, y se ha observado que la señalización purinérgica autocrina en células uroteliales mantiene la homeostasis intracelular de calcio y libera neuromoduladores, desempeñando un papel fundamental en la función y patología del tracto urinario (Chess-Williams *et al.*, 2019). Los receptores P2X1-P2X7 y P2Y1-P2Y14, expresados en estas células, median las acciones extracelulares del ATP a través de vías de señalización ionotrópicas y mediadas por proteínas G. Durante el desarrollo, estas familias de receptores, expresadas en una variedad de tejidos, regulan el tránsito de Ca²⁺. Los receptores P2X, al unirse a su ligando, se vuelven permeables a cationes, generando

picos de Ca^{2+} que pueden desencadenar vías de señalización de calcio en células adyacentes. Los P2Y, por su parte, inducen la liberación de IP3 y la movilización de calcio desde reservorios intracelulares, procesos implicados en la activación de factores de transcripción dependientes de calmodulina o calcineurina, esenciales para la neurogénesis y la determinación fenotípica (Glaser *et al.*, 2013). Los receptores P2X₂ y P2X₇ son cruciales para la diferenciación de la glía, mientras que los P2Y₁ y P2Y₂ están involucrados en la diferenciación neural.

Señalización Purinérgica en la Regeneración Ósea: Mecanismos y Aplicaciones Terapéuticas

La señalización purinérgica, que implica la interacción de purinas extracelulares como ATP y adenosina con sus receptores específicos, juega un papel crucial en la regulación de la actividad osteoblástica y, por extensión, en la regeneración ósea. Estudios recientes han destacado cómo los receptores purinérgicos P2Y₂ en particular, influyen significativamente en la mecanosensibilidad de los osteoblastos y en la modulación de respuestas a estímulos mecánicos y a la hormona paratiroidea (PTH), destacando su rol en la dinámica celular ósea (Di Virgilio *et al.*, 2018). Estos efectos se manifiestan en la activación de vías de señalización como la Fosforilación de ERK1/2 y CREB, además de promover la proliferación celular. La inhibición de ATP mediante apirasa o la suramina en receptores de los osteoblastos ha mostrado disminuir estas respuestas sinérgicas, sugiriendo que la manipulación de la señalización purinérgica podría ser un objetivo terapéutico prometedor para mejorar la regeneración ósea en condiciones clínicas como las fracturas óseas y la osteoporosis (Glaser *et al.*, 2013; Di Virgilio *et al.*, 2018).

En el contexto de la señalización de calcio, los receptores purinérgicos desempeñan un papel crucial en las vías de señalización del calcio, como se observa en células endoteliales y neuronales. Se ha observado que la adenosina extracelular, generada por ectonucleotidasas, regula la formación y homeostasis del tejido óseo, colocando a las purinas como actores principales en condiciones como la osteoporosis y el deterioro en la cicatrización de fracturas (Di Virgilio *et al.*, 2016; Orriss *et al.*, 2010). La adenosina, producida en respuesta a estímulos como la hipoxia y la inflamación, interactúa con los receptores P1 y tiene aplicaciones terapéuticas potenciales en el tratamiento de enfermedades y lesiones óseas. Los receptores P2X7, en particular, median la liberación de prostaglandinas inducida mecánicamente por osteoblastos y osteocitos, y participan en la preservación del linaje de células madre hacia los osteoblastos (Orriss *et al.*, 2010).

La modulación de la señalización purinérgica emerge como un enfoque prometedor para mejorar la regeneración ósea. Se ha postulado que el uso de agonistas y antagonistas de receptores purinérgicos podría influir en la formación y curación ósea (Bates & Ramachandran, 2017). Además, la señalización purinérgica podría ser clave en la modulación de células madre de la médula ósea para la regeneración ósea, así como en la diferenciación de estas células en osteoblastos. Este estudio presenta un enfoque para mejorar el entendimiento del funcionamiento de esta vía con sus actores y en el futuro, encontrar una realidad en donde se esté ofreciendo un pronóstico más favorable para pacientes con afecciones óseas. Asimismo, se sugiere que la señalización purinérgica podría utilizarse para modular la diferenciación osteoclástica, facilitando así el remodelado óseo. Por tanto, la comprensión de cómo se puede influir en la señalización

purinérgica abre nuevas posibilidades para el desarrollo de estrategias destinadas a optimizar la regeneración ósea y la curación de fracturas (Bates & Ramachandran, 2007).

JUSTIFICACION

Las moléculas de señalización purinérgica han demostrado estar presentes en el microambiente celular óseo, el cual es de suma importancia tratándose de la comunicación que se necesita para decidir qué hacer con el crecimiento del tejido o la administración de los nutrientes del mismo.

En la época moderna la expectativa de vida aumentó, mostrando patologías emergentes ligadas al envejecimiento, es en esta misma época moderna en donde la civilización humana despliega sus peores conductas alimenticias y poco profilácticas, debido a eso, nuestra era muestra una nueva problemática en donde hay desnutrición y desmineralización en medio de una cultura e industria en la sobre nutrición, pero es en esta misma época en donde se cuenta con tecnología y personas dedicadas a la búsqueda de conocimiento entonces; Desde el ámbito de la ciencia básica, considero de suma importancia comprender de mejor forma la dinámica e interacción entre sustrato y receptores, lo que provoca intracelularmente y que tan involucrados están los iones que ejecutan las señales generadas por un receptor purinérgico unido a su ligando purinérgico.

Debido a su amplia distribución y diversidad de funciones, los receptores purinérgicos son objeto de intensa investigación, no solo para comprender mejor los mecanismos fundamentales de la biología celular y la fisiología, sino también por su potencial como dianas terapéuticas en una amplia gama de enfermedades, incluyendo trastornos inflamatorios, cardiovasculares, metabólicos y neurodegenerativos.

HIPÓTESIS

La estimulación de osteoblastos murinos con concentraciones específicas de ATP induce una respuesta diferencial de señalización de calcio, mediada por la activación de receptores P2X y P2Y y esta actividad es dependiente del Ca^{2+} extracelular.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el impacto de la señalización purinérgica en la dinámica del calcio intracelular en osteoblastos murinos

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} debido a la administración de ATP en osteoblastos de rata.
2. Evaluar los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} inducida por la administración de ATP y su dependencia de Ca^{2+} extracelular.
3. Identificar mediante inmunofluorescencia, la presencia de receptores P2X y P2Y en osteoblastos murinos.
4. Evaluar el cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} durante la administración de un bloqueador de receptores purinérgicos.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Para realizar este proyecto se emplearon osteoblastos provenientes de un cultivo primario obtenidos del fémur de una rata. Las células se mantuvieron en un medio DMEM alto en glucosa en frascos T25 suplementado con ácido ascórbico y 10% de suero fetal bovino y antibióticos 1X. La línea celular se mantuvo en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂, se trabajó con una confluencia de las células de entre 75 a 90% y pasajes entre el 10 y el 25 para estar seguros de su identidad.

Inmunofluorescencia

Se evaluó la presencia de los receptores P2X₁, P2X₄, P2X₇, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ en los osteoblastos. Se realizó un lavado a las células y posteriormente se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% a temperatura ambiente por 10 minutos. Las células se permeabilizaron y saturaron los sitios inespecíficos con una solución de PBS adicionada con Tritón al 0.5% y 10% de suero fetal bovino (FBS) a temperatura ambiente por 1 hora. Una vez pasado este tiempo, se adiciono el anticuerpo primario (tabla 1) diluido en PBS+Triton al 5% y se dejó incubando 24 horas a 4°.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados y se inició la incubación con el anticuerpo secundario, el cual está conjugado a una molécula fluorescente (Alexa Fluor 488, ab150077) durante dos horas a temperatura ambiente. El citoesqueleto se marcó con

Faloidina (ab176759) durante 1 hora, y se finaliza con el marcaje de los núcleos con DAPI (ab104139). El montaje se hizo con medio de montaje DAKO, para finalmente sellar la preparación y observarla al microscopio.

Para cada cambio de reactivo los lavados y la permeabilización de las células se utilizó solución de PBS (buffer de fosfatos) con Tritón por 5 minutos, 5 veces.

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en Inmunofluorescencia

Anticuerpo para el receptor.	Número de catalogo
P2X ₁	PA5-77679
P2X ₄	PA5 - 77680
P2X ₇	PA5 - 77668
P2X ₅	ab221705
P2Y ₂	PA5 - 77669
P2Y ₄	PA5 - 51032
P2Y ₆	PA5 - 77670

Determinación del cambio en el nivel intracelular de Ca^{2+} secundario a la activación de receptores purinérgicos.

Se realizó el análisis fluorométrico en células de la línea de osteoblastos las cuales fueron incubadas con una sonda para Ca^{2+} , el Fluo-4FF AM (invitrogen). Las células fueron incubadas con el AM éster de Fluo-4FF 5 μM , el cual es permeable a través de la membrana celular. La incubación con la sonda se realizó a 37°C durante 30 minutos. La fluorescencia fue medida empleando un microscopio Nikon Eclipse Ti- U (Nikon, Japón), y con una cámara CCD IC-200 acoplada. La excitación del fluoróforo se realizó con un haz de luz (480 nm) generado en un monocromador DeltaRAM XTM (USA). La fluorescencia emitida pasó a través de un filtro pasa alto de 510nm y monitorizada en tiempo real empleando el programa ImageMaster versión 1.1.

La solución extracelular empleada para mantener a las células viables desde que son extraídas de la incubadora y durante todo el transcurso de los experimentos tuvo la siguiente composición (en 500ml): NaCl: 3.6525 gr, KCl: 0.186375 gr, $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$: 0.123249 gr, CaCl: 0.11098 gr, NaHCO_3 : 0.25221 gr, HEPES: 2.978 gr, Glucosa: 0.54018 gr.

Tabla 2. Reactivos agonistas y antagonistas.

Reactivo	Peso Molecular	Acotaciones.
ATP	551.14 g/mol	Marca: Sigma Aldrich. Función: Agonista de receptores purinérgicos (P2X y P2Y). Solubilidad: 50mg/mL en H ₂ O Uso: Se agregó por microperfusión en solución extracelular dependiendo de la condición deseada (con o sin calcio) Durante 90 segundos.
Suramina	1429.17 g/mol	Marca: Sigma Aldrich Función: Antagonista de receptores purinérgicos. Solubilidad: 50mg/dL Uso: Se administró mediante perfusión continua durante los experimentos de antagonismo.

El análisis de estos experimentos se realizó en el software ImageJ™, en donde fue posible analizar los campos registrados mediante la designación de áreas de interés (ROI “región of interest”) y medir la intensidad de fluorescencia. Los valores se mostraron en $\Delta F/\Delta 0$, donde $\Delta 0$ representa la intensidad de fluorescencia basal durante los primeros 30 segundos de registro. Se midió el área bajo la curva de la respuesta y la amplitud se calculó mediante la diferencia entre la respuesta al pico menos la respuesta basal justo antes de aplicar el estímulo.

Se obtuvieron las áreas bajo la curva calculando la integral del punto en donde se inició la respuesta hasta el final de la captura de imágenes, se calculó con el programa

SigmaPlot usando una integral definida: $\int_a^b f(x) dx$. Es este dato que se interpreta como el área bajo la curva y que corresponde a la integral de la respuesta de las células ante el estímulo dado por el antagonista o por el agonista en presencia del antagonista frente a un intervalo de tiempo definido. Las gráficas fueron realizadas en Prism 10 (GraphPad, EEUU).

La misma técnica de incubación se realizó para los ensayos con suramina.

Análisis estadístico

Se emplearon pruebas de ANOVA de una vía y pruebas no paramétricas (posterior análisis de normalidad con el test de Shapiro – Wilk), dependiendo del diseño experimental, para evaluar si existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos tratados. Las gráficas presentadas muestran el valor \pm desviación estándar de la media. Los análisis y graficas presentadas fueron realizador en el programa Prism 10 (GraphPad, EEUU) y Sigmaplot.

RESULTADOS

Fluorimetría con ATP (Agonista de receptores purinérgicos en osteoblastos murinos)

Se realizaron experimentos para determinar el cambio en el nivel Ca^{2+} intracelular con la aplicación de ATP mediante microperfusión en concentración de 100nm, 300nm, 1 μ M y 3 μ M con solución extracelular con Ca^{2+} . Los experimentos se realizaron tomando inicialmente un registro durante 30 segundos y posteriormente se aplicó ATP mediante microperfusión por 90 segundos y se continuó el registro durante 120 segundos en promedio o hasta observar la recuperación de fluorescencia basal; En la figura 7 se

pueden apreciar trazos representativos de las respuestas que se obtuvieron en una célula al aplicar ATP 100nM, 300nM, 1 μ M y 3 μ M.

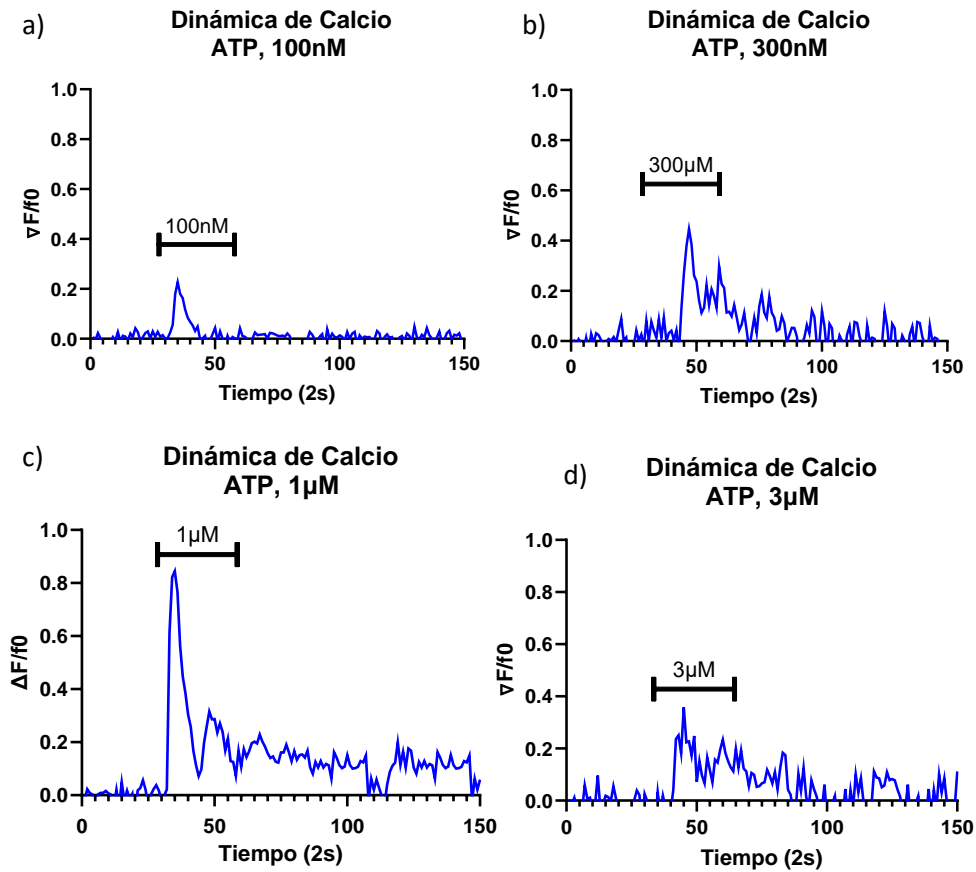


Figura 7. Dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ secundario a la microperfusión de ATP. Gráficas representativas de 1 célula que muestran las razones de cambio de fluorescencia para los niveles de Ca^{2+} con 100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M.

Se compararon los máximos de fluorescencia en cada condición. Se tomó en consideración la intensidad máxima de cada una de las células al ser estimulada por cada concentración de ATP, se obtuvo la media de cada condición y se calculó la desviación estándar. Las medias \pm desviación estándar fueron las siguientes: 1 μ M, 0.82 ± 0.1 ; 3 μ M, 0.35 ± 0.16 ; 100nM, 0.23 ± 0.15 ; 300nM, 0.43 ± 0.18 (figura 8). Para su análisis se realizó una prueba ANOVA, donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para

algunos grupos ($p < 0.005$; $F = 6.475$ con 3 grados de libertad) Este patrón muestra una respuesta dosis-dependiente significativa a mayores concentraciones de ATP, excepto entre las concentraciones de $1\mu\text{M}$ y $3\mu\text{M}$, donde no se observan diferencias significativas.

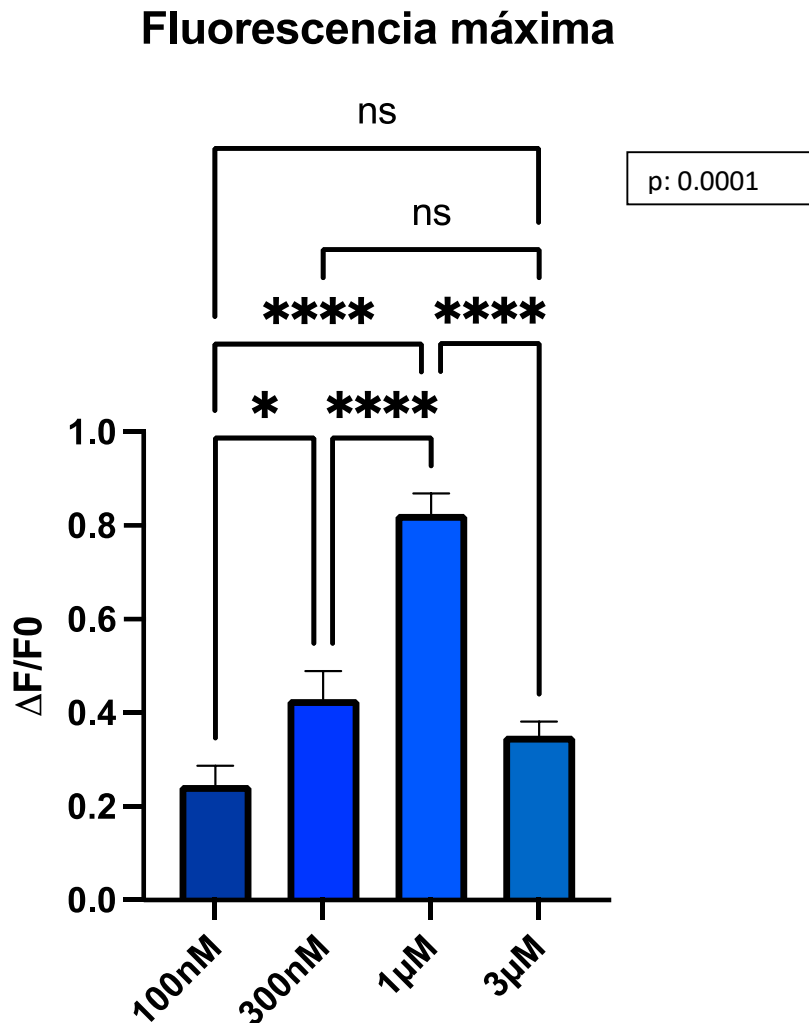


Figura 8. Valores de fluorescencia máxima del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en osteoblastos murinos estimulados con medida en respuesta de los osteoblastos a distintas concentraciones de ATP (100nM , 300nM , $1\mu\text{M}$ y $3\mu\text{M}$), En un ensayo celular de microperfusión y microscopio de epifluorescencia.

Además de la realización del gráfico de los cambios de fluorescencia, se graficaron las áreas bajo la curva de las diversas condiciones (Figura 9).

Estimulación con ATP

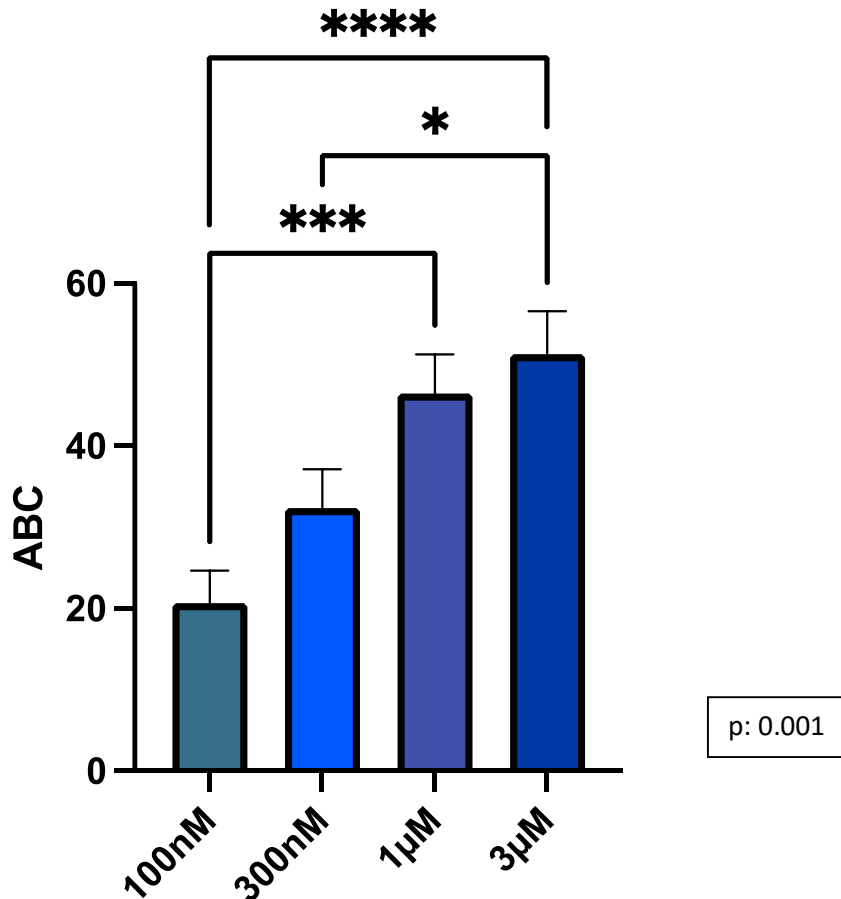


Figura 9. Áreas bajo la curva del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en osteoblastos murinos estimulados por ATP en concentraciones de 100nM, 300nM, 1µM y 3µM. Los datos representan la media \pm error estándar. N=9, n= 108. Se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.001$

Se compararon las áreas bajo la curva obtenidas para cada concentración en el programa graphpad, donde se obtuvieron las medias siguientes con su error estándar para **100nM, 5.310; 300nM, 7.165; 1µM, 8.84; 3µM, 11.97**. Se realizó análisis de ANOVA on ranks mediante SigmaPlot donde se obtuvo un valor crítico $F = 6.165$ con 3 grados de libertad, con una $p = 0.0004$ con un alpha de 0.04, es decir que las medias entre varios de los grupos son estadísticamente significativas.

En el análisis individual por grupo, con el método de Tukey, se encontraron diferencias entre los grupos con una significancia de 0.004. La prueba mostro que hay diferencia entre el 1 μ M vs 3 μ M, con una p= 0.01 y entre 300nM vs 3 μ M, con una p= 0.0015; entre el grupo de 100nM y 3 μ M donde se obtuvo una p= 0.0023. Las siguientes comparaciones son menos significativas entre 100nM vs 300nM, p= 0.71; también entre 100nM vs 1 μ M con una p= 0.22, Y por último 300nM contra 3 μ M con p= 0.54.

Fluorimetría en ausencia de calcio extracelular

Se llevaron a cabo experimentos en los que se comparó la magnitud del cambio en la concentración intracelular de Ca²⁺ en presencia y ausencia de Ca²⁺ extracelular, ante la administración de ATP 1 μ M (figura 10) en donde se tomó la fluorescencia media de todas las células en cada campo como medida de comparación. Para estos experimentos se inició con la captura de imágenes por 30 segundos para el control, posteriormente se adiciono ATP 1 μ M por microperfusión durante 90 segundos y se registraron los cambios de intensidad de fluorescencia.

Fluorescencia media

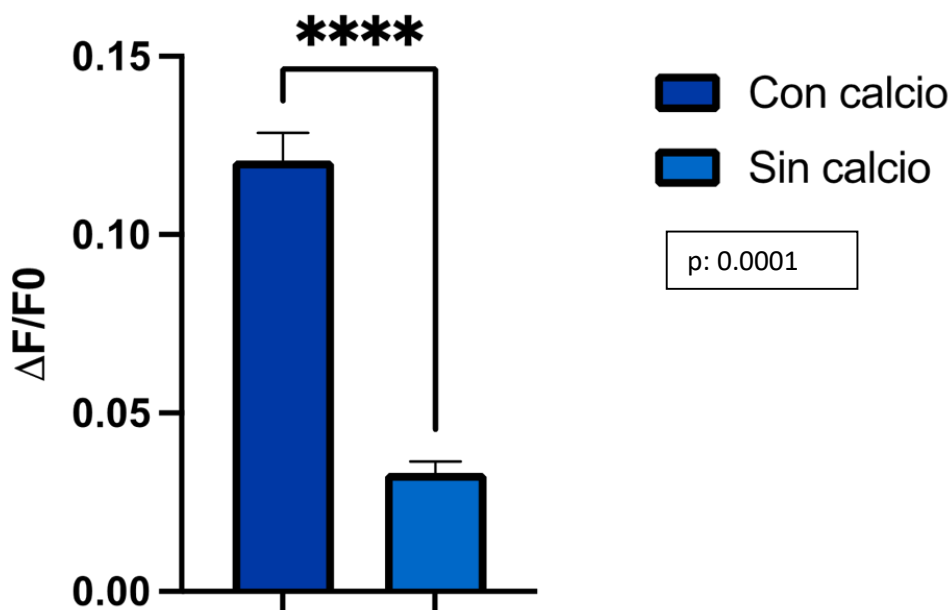


Figura 10. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ secundario a la microperfusión de ATP con Calcio y sin Calcio extracelular. Grafica representativa que muestra la fluorescencia promedio del cambio de fluorescencia para los niveles de Ca^{2+} intracelular durante 90 segundos con microperfusión de ATP $1\mu M$ en ambas condiciones N=5 n= 45.

Para valorar las diferencias en la respuesta de calcio, se realizaron análisis en relación con el área bajo la curva (figura 11). Se aplicó la prueba estadística Mann-Whitney para observar los cambios y si son estadísticamente significativos entre los grupos de estudio. La diferencia entre los valores medios de los dos grupos (ATP $1\mu M$ con Ca^{2+} cuyo promedio fue 18.3 ± 1.15 contra el ATP $1\mu M$ sin Ca^{2+} con valor de 10.12 ± 1.75). Realizándose la prueba Mann-Whitney se obtuvo un valor de $t = 2837$ con 148 grados de libertad para un α de 0.001. Esta prueba demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0.001$) para un α de 0.001

ATP con y sin calcio

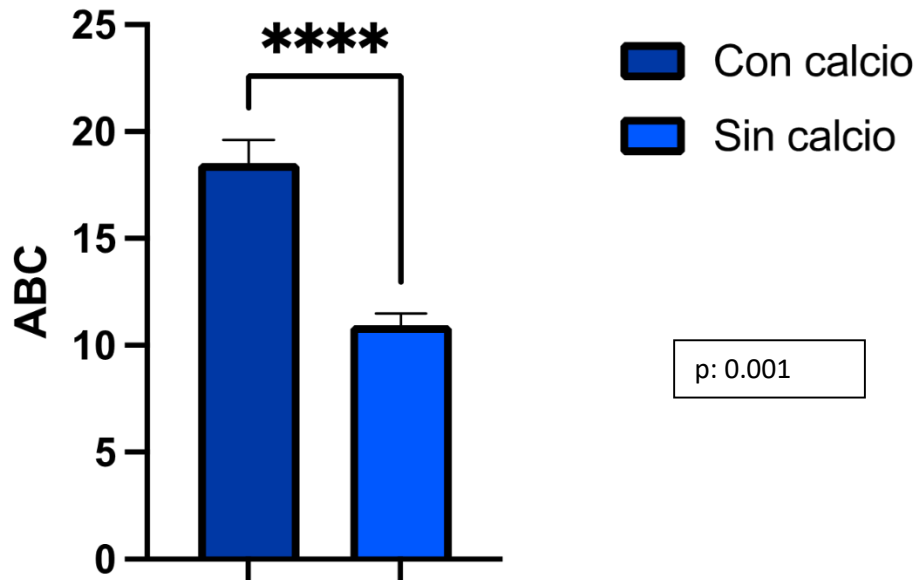


Figura 11. Área bajo la curva del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia y ausencia de Calcio extracelular empleando ATP en una concentración de $1\mu M$. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. N=5 n= 150. Se analizaron mediante la prueba estadística Mann-Whitney.

Se midieron las intensidades máximas entre las células estimuladas con ATP $1\mu M$ con solución extracelular con Ca^{2+} y sin Ca^{2+} (figura 12) los datos se analizaron mediante una prueba Mann-Whitney, obteniéndose un máximo en 0.61 ± 0.15 con Ca^{2+} y un máximo de 0.45 ± 0.15 sin Ca^{2+} con $p=0.0001$ representando un valor estadísticamente relevante.

Fluorescencia máxima

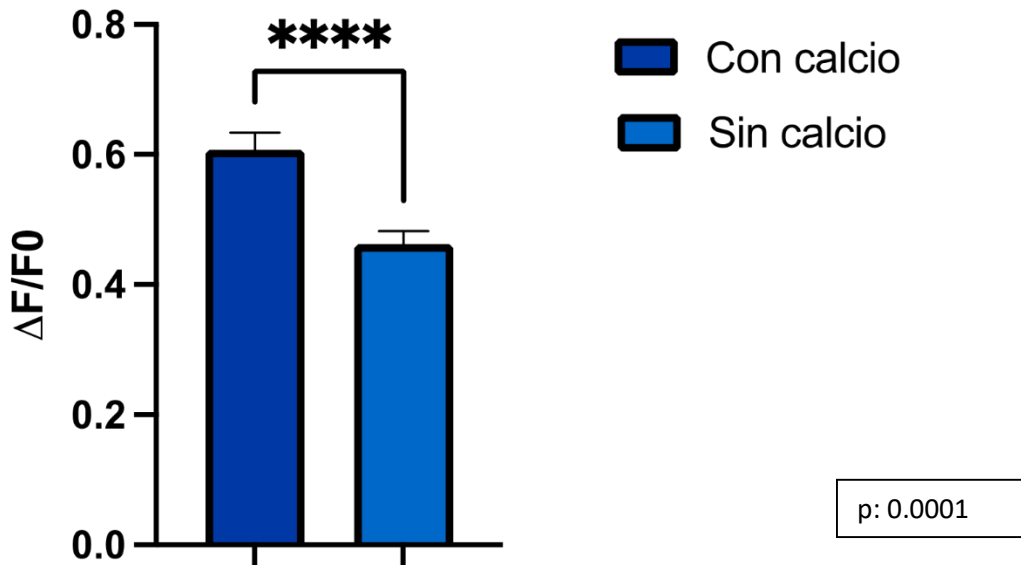


Figura 12. Comparativa de intensidades máximas obtenidas en presencia y ausencia de Calcio extracelular posterior a la microperfusión con ATP en concentración de $1\mu\text{M}$. Los datos representan la media \pm desviación estándar. N= 5, 150. Se analizó mediante Mann – Whitney.

EFFECTO DEL ATP EN PRESENCIA DE SURAMINA

Se realizaron experimentos para evaluar el cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado por la aplicación de ATP en presencia del antagonista Suramina.

Los experimentos consistieron en microperfundir ATP $1\mu\text{M}$ durante 90 segundos, al mismo tiempo en el que las células eran perfundidas con Suramina $100\mu\text{M}$.

ATP 1 μ M vs ATP 1 μ M + Suramina, 100 μ M

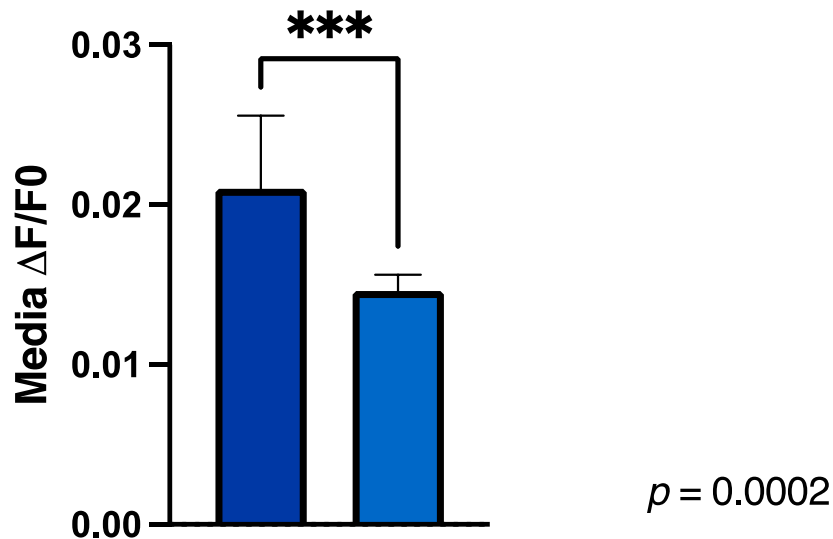


Figura 13. Cambios de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ secundario a la microperfusión de ATP 1 μ M en presencia de Suramina 100 μ M. Se representa las razones de cambio de fluorescencia media para los niveles de Ca^{2+} intracelular durante 90 segundos con microperfusión de ATP 1 μ M.

INMUNOFLUORESCENCIA

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para observar la presencia de receptores purinérgicos del tipo X y Y, es particular dirigimos nuestra búsqueda a los receptores P2X (X_1 , X_4 , X_5 y X_7) y P2Y (Y_2 , Y_4 , Y_6). Las imágenes obtenidas por microscopia confocal de la expresión de P2Y₂ muestra una alta fluorescencia presencia en el núcleo y menor en el citoplasma. Diferente a lo que apreciamos en la expresión de receptores P2Y₄, P2X₄ y P2X₅ en donde se nota tenuemente su presencia en núcleo, en cuanto a P2Y₆ se aprecia ubicuo en toda la célula por último, se observó a P2X₁ el cual presenta marcaje en el

citósol pero no así en el núcleo, mientras que el P2X₇ se expresa solamente en el núcleo. (se ocuparon diluciones de 1:1000 de anticuerpo secundario y 1:500-800 de anticuerpo primario).

RECEPTOR P2Y₂

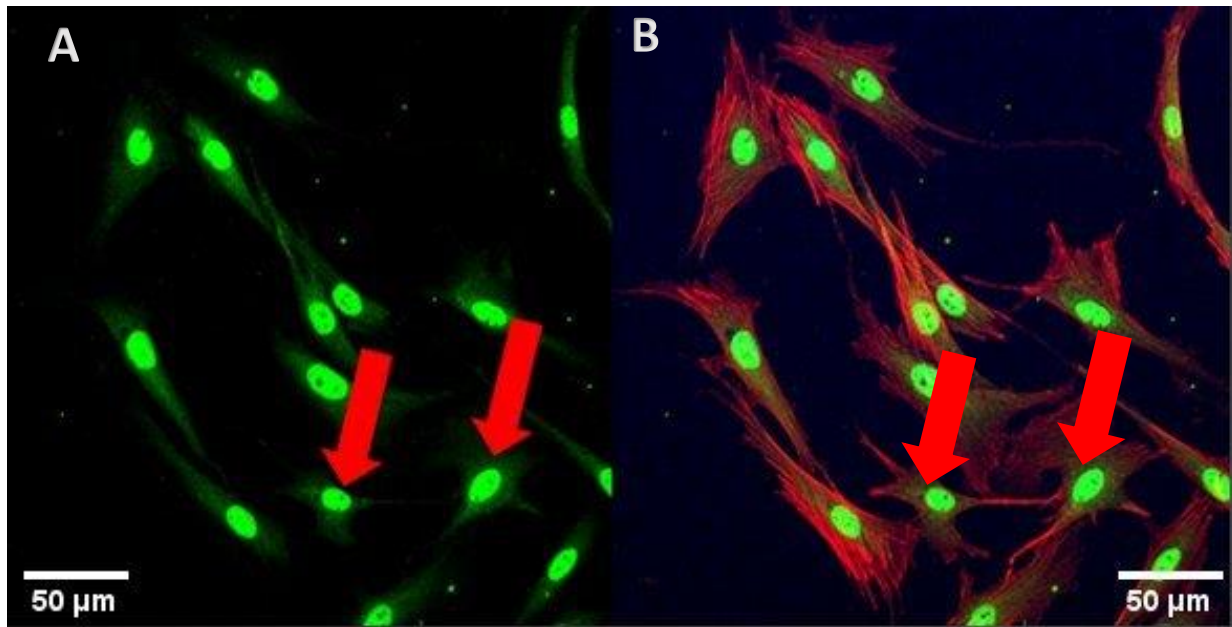


Figura 14. Imagen representativa de la presencia de P2Y₂ en osteoblastos murinos. A: Expresión de receptor P2Y₂ (verde) en solitario **B:** La suma de todos los canales "merge", en donde se tiñe claramente el citoesqueleto con faloidina (rojo).

RECEPTOR P2Y₄

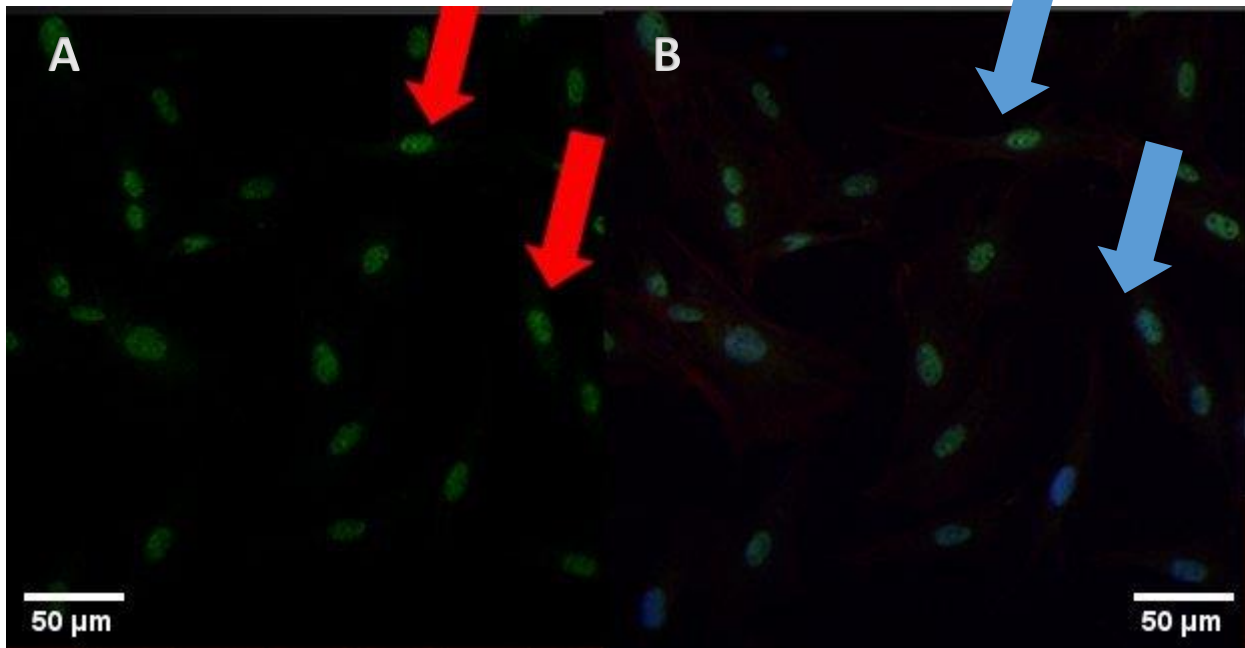


Figura 15. Imagen representativa de la presencia de P2Y₄ en osteoblastos murinos. A: Expresión de receptor P2Y₄ (verde) en solitario B: Suma de todos los canales "merge", en donde se tiñe el citoesqueleto con faloidina (rojo) sin embargo, no es posible apreciar el DAPI (azul) que tiñe los núcleos ya que queda oculto por la fluorescencia del receptor en color verde.

RECEPTOR P2Y₆

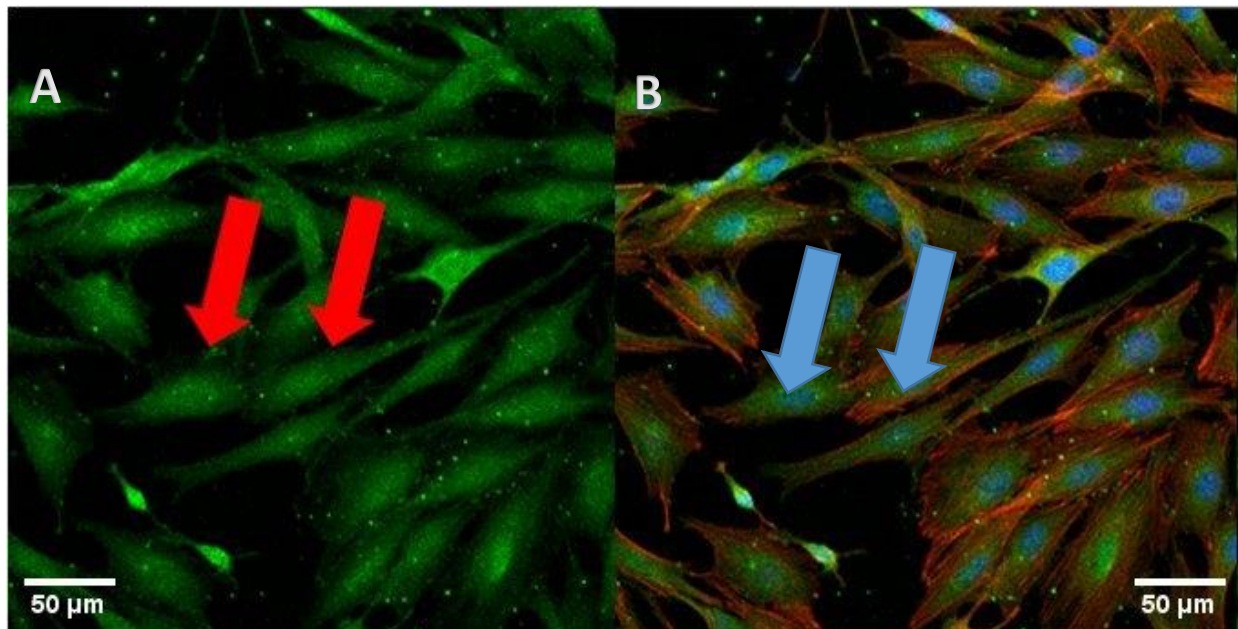


Figura 16. Imagen representativa de la presencia de P2Y₆ en osteoblastos murinos. A: Expresión de receptor P2Y₆ (verde) B: Suma de todos los canales "merge", en donde se tiñe el citoesqueleto con Faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul).

RECEPTOR P2X₁

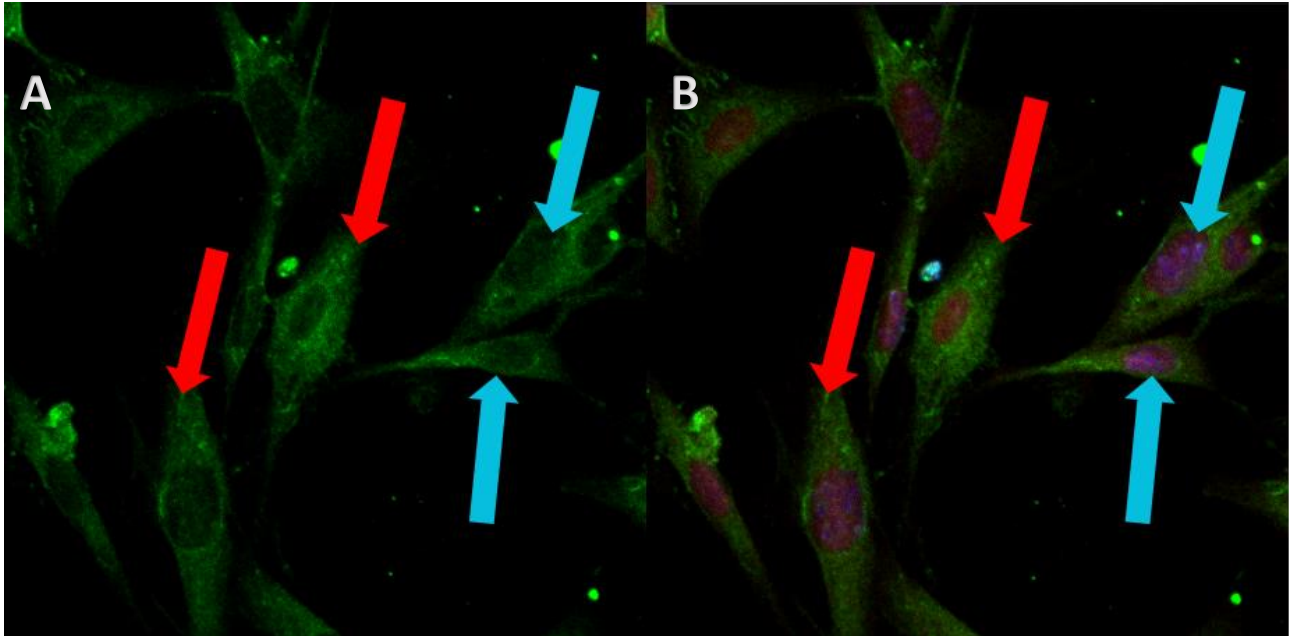


Figura 17. Imagen representativa de la presencia de P2X₁ en osteoblastos murinos. A: Expresión de receptor P2X₁ (verde) **B:** Suma de todos los canales (merge), en donde se tiñe el citoesqueleto con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul) en los núcleos.

RECEPTOR P2X₄

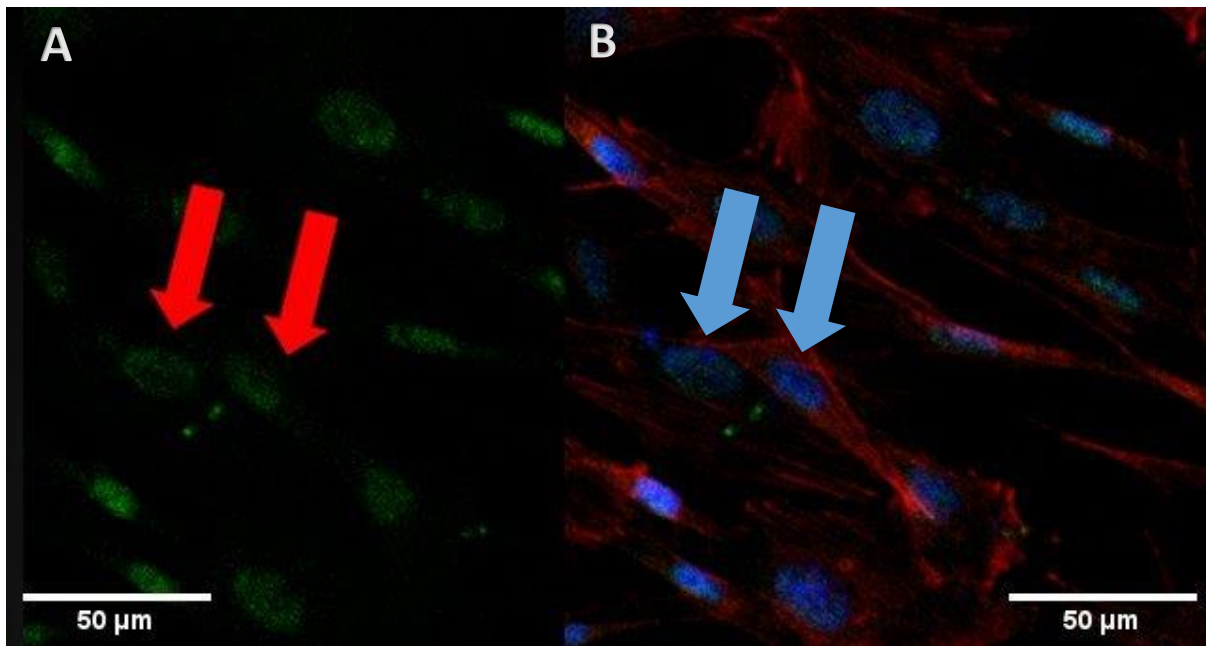


Figura 18. Imagen representativa de la presencia de P2X₄ en osteoblastos murinos. A: Expresión de receptor P2X₄ (verde) **B:** Suma de todos los campos "merge", en donde se tiñe el citoesqueleto con el compuesto de faloidina (rojo) y DAPI (azul) en los núcleos y el marcaje positivo en verde que corrobora la localización del hallazgo de receptor.

RECEPTOR P2X₅

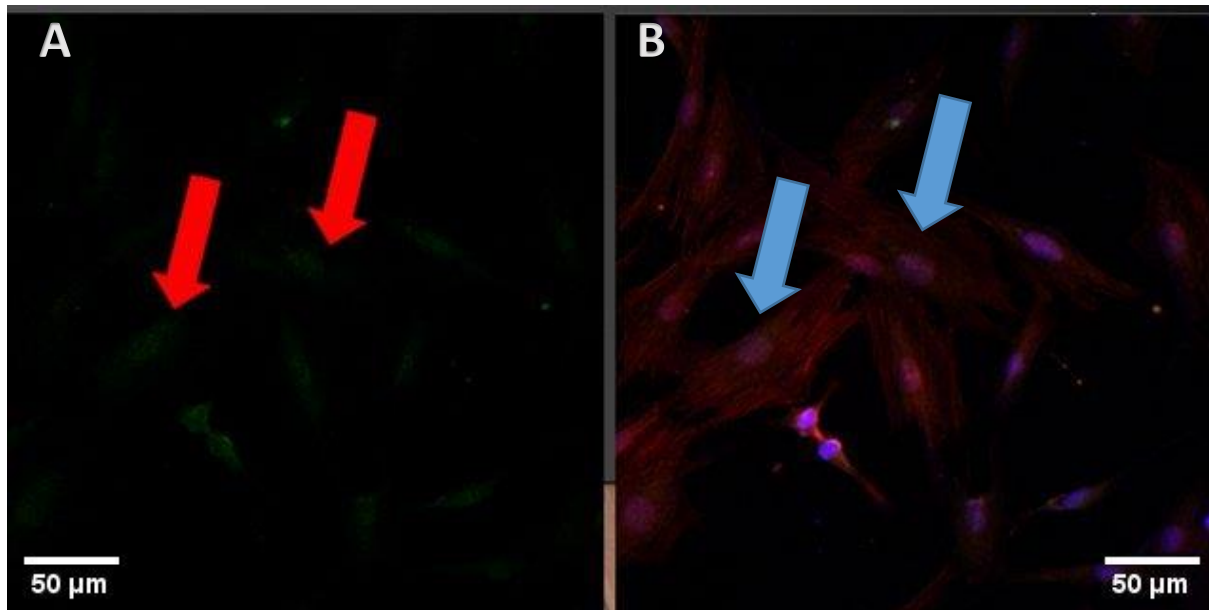


Figura 19. Imagen representativa de la presencia de P2X₅ en osteoblastos murinos. A: Expresión de receptor P2X₅ (verde) **B:** Suma de todos los campos “merge”, en donde se tiñe el citoesqueleto con el compuesto de faloidina (rojo).

RECEPTOR P2X₇

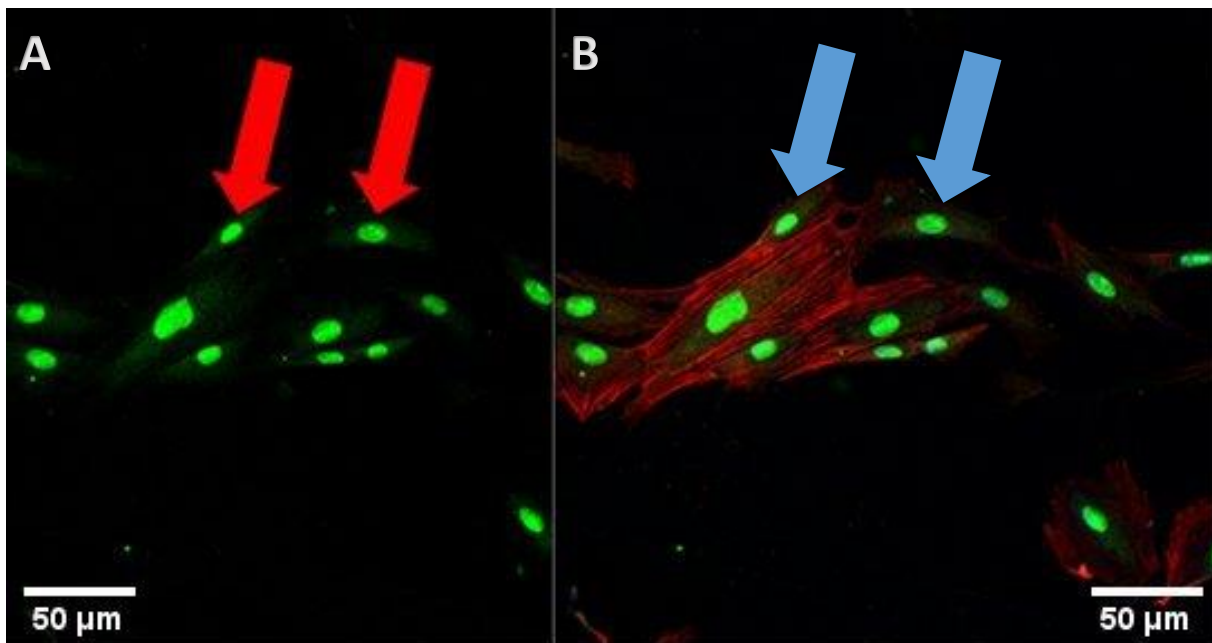


Figura 20. Imagen representativa de la presencia de P2X₇ en osteoblastos murinos. A: Expresión de receptor P2X₇ (verde) **B:** Suma de todos los campos “merge”, en donde se tiñe el citoesqueleto con el compuesto de faloidina (rojo).

Discusión

Los receptores purinérgicos son una familia diversa de receptores celulares que responden al ATP y a otros nucleótidos y nucleósidos. Están ampliamente distribuidos en diferentes tipos de tejidos animales, donde participan en una variedad de funciones fisiológicas y patológicas. Esta familia de receptores se clasifica principalmente en dos tipos: los receptores P1, que son sensibles a los compuestos de adenosina, y los receptores P2, que responden al ATP y a otros nucleótidos de la misma especie.

Los receptores P2 se subdividen en dos familias: los receptores ionotrópicos P2X, que forman canales iónicos permeables al Ca^{2+} , Na^+ y K^+ , y los receptores metabotrópicos P2Y, que están acoplados a proteínas G e influyen en la actividad intracelular mediante segundos mensajeros.

En el sistema nervioso, los receptores P2X y P2Y modulan la liberación de neurotransmisores, la excitabilidad neuronal y la neuroinflamación. Mencionando de nuevo a los receptores P2X7 están implicados en la liberación de citoquinas inflamatorias y pueden jugar un papel en el dolor y en enfermedades neurodegenerativas (Di Virgilio *et al.*, 2016).

En el sistema inmunitario, los receptores P2 en los leucocitos regulan la migración de células inmunitarias, la liberación de citoquinas y la inflamación. Esto es crucial para la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

En el sistema cardiovascular, además de la acción de la adenosina a través de los receptores P1, los receptores P2 participan en la regulación del tono vascular, la agregación plaquetaria y la respuesta a lesiones vasculares (Burnstock, 2006).

La amplia distribución y la diversidad funcional de los receptores purinérgicos en diferentes tejidos subrayan su importancia en la fisiología y la patología de los organismos. Su implicación en procesos tan variados los convierte en objetivos terapéuticos potenciales para una amplia gama de enfermedades, desde trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos hasta enfermedades inflamatorias y óseas.

Implicaciones en la Homeostasis Ósea

La interacción entre el ATP y el Ca^{2+} en el hueso es un componente clave de la homeostasis ósea. Las alteraciones en la señalización purinérgica o en la homeostasis del calcio pueden contribuir a enfermedades óseas como la osteoporosis, en la cual el equilibrio entre la formación y resorción de hueso está perturbado. La disfunción en esta señalización ha sido implicada en la etiología de la osteoporosis y otros trastornos óseos, destacando la importancia de los receptores P2X y P2Y en la regulación del metabolismo óseo (Burnstock, 2006; Jørgensen, 2019).

Este estudio investigó el impacto de la señalización purinérgica en la dinámica del calcio intracelular en osteoblastos murinos en cultivo, utilizando concentraciones variables de ATP y analizando la respuesta celular en condiciones con y sin calcio extracelular, además de los efectos de administrar un antagonista como la suramina.

Respuesta de los Osteoblastos al ATP:

Los resultados de este estudio muestran que la inducción de la máxima fluorescencia es a 1 μM de ATP sugiriendo una afinidad significativa por el ATP en este rango de concentración. Esto está en concordancia con estudios previos que han identificado la señalización purinérgica como un regulador crítico de la actividad osteoblástica. Por

ejemplo, Carluccio et al. (2020) encontraron que el ATP modula la diferenciación osteogénica de las MSCs a través de diferentes receptores P2Y y P2X, destacando la importancia del receptor P2X7 en varias etapas de la diferenciación y supervivencia de los osteoblastos. Sin embargo, mientras que mis resultados indican una respuesta máxima a concentraciones más bajas de ATP, los estudios de Carluccio et al. sugieren que la respuesta puede variar dependiendo del estado de diferenciación de las células y las condiciones del microambiente. Este fenómeno refleja no solo la afinidad de los osteoblastos por el ATP, sino también su capacidad para responder a variaciones sutiles en las concentraciones de nucleótidos, similar a lo observado por Burnstock (2006) y Di Virgilio et al. (2016), quienes documentan la amplitud de la señalización purinérgica en procesos celulares críticos como la neurotransmisión y la inflamación.

Además, estudios recientes han destacado que la señalización purinérgica a través del ATP puede influir en la expresión de genes relacionados con la diferenciación y la respuesta inflamatoria. Según Abbracchio et al. (2019), la activación de receptores P2X7 no solo promueve la formación de osteoblastos, sino que también regula negativamente la expresión de genes proinflamatorios, sugiriendo un mecanismo dual donde la señalización purinérgica facilita tanto la osteogénesis como la resolución de la inflamación en el microambiente óseo. Mikolajewicz et al. (2021) demostraron que los osteoblastos murinos responden a diferentes concentraciones de ATP con patrones de calcio transitorios, oscilatorios y sostenidos, dependiendo de la concentración de ATP. Identificaron que los receptores P2Y₂ y P2X₇ son los principales responsables de estas respuestas. Estos hallazgos son consistentes con nuestros resultados, que muestran una respuesta integral por ATP que puede modular las respuestas de calcio en osteoblastos.

El modelo matemático desarrollado por Mikolajewicz et al. (2021) proporciona una explicación detallada de cómo la activación de P2Y₂ podría ser útil para entender mejor los mecanismos subyacentes en nuestras observaciones experimentales.

Por último, los hallazgos de Mikolajewicz et al. (2021) también destacan la importancia de los receptores P2Y₂ y P2X₇ en la señalización mecanotransductiva en osteoblastos. La ausencia de P2Y₂ interrumpe la transmisión de la señal de ATP a las células vecinas, mientras que la ausencia de P2X₇ altera significativamente las respuestas primarias y secundarias. En los experimentos, las células deficientes en P2X₇ mostraron respuestas de mayor magnitud y una decaída más rápida de las respuestas de calcio en comparación con las células normales. Aunque se esperaba que la concentración de ATP liberada en estos experimentos fuera insuficiente para activar P2X₇, se observó que las respuestas de calcio en los osteoblastos vecinos también se vieron alteradas en las células deficientes en P2X₇, lo que sugiere un papel indirecto de P2X₇ en la señalización intercelular.

Estos resultados subrayan el papel crítico de la señalización purinérgica en la regulación de la respuesta de los osteoblastos a estímulos mecánicos y en la homeostasis ósea.

Influencia del Calcio Extracelular

La diferencia estadísticamente significativa en los niveles de fluorescencia de la sonda de Ca²⁺ bajo ambas condiciones propuestas subraya la importancia del medio extracelular en la modulación de la señalización intracelular, concordante con lo reportado por Orriss et al. (2010) en la remodelación ósea. Este descubrimiento apunta a la importancia de un entorno extracelular adecuadamente regulado para la optimización

de la señalización purinérgica y su relevancia en la homeostasis del calcio. Aunado a esto, una investigación en odontoblastos también apoya esta conclusión, ya que se demostró que la eliminación del calcio extracelular redujo la amplitud de las respuestas de calcio inducidas por ATP en odontoblastos, pero no las abolió completamente en todos los casos. Esto sugiere que ciertos receptores purinérgicos, posiblemente los acoplados a proteínas Gq/11, pueden mediar la señalización de calcio incluso en ausencia de calcio extracelular (Lee et al., 2017).

En línea con estos hallazgos, otros estudios han demostrado que la señalización de calcio mediada por receptores purinérgicos es esencial para la diferenciación osteoblástica y la mineralización ósea. Por ejemplo, Panupinthu et al. (2008) encontraron que la activación de receptores P2Y₂ en osteoblastos aumenta la liberación de calcio intracelular, lo que a su vez promueve la expresión de genes osteogénicos y la formación de la matriz extracelular. Esto sugiere que la señalización purinérgica no solo es crítica para la respuesta inmediata al ATP, sino también para la regulación a largo plazo de la homeostasis ósea.

Efecto de la Suramina, Inhibición de la Señalización y su Potencial Terapéutico

La inhibición significativa de la fluorescencia por la suramina confirma la participación de los receptores purinérgicos en la mediación de las respuestas de calcio en los osteoblastos. Los estudios de Koupenova y Ravid (2018) destacan que los antagonistas de los receptores P2, como la suramina, podrían tener aplicaciones terapéuticas en la modulación de la actividad inmunológica y ósea, sugerencia que encuentra eco en los resultados presentados aquí. Una investigación publicada por Agrawal y Jørgensen et al. (2021) revisa cómo los derivados de la adenosina y uridina extracelulares regulan la

homeostasis ósea y menciona que la señalización purinérgica, especialmente a través del receptor P2X₇, juega un papel crucial en la activación de los osteoclastos y osteoblastos. La inhibición de la señalización purinérgica puede, por lo tanto, afectar significativamente estos procesos, lo que se alinea con nuestros hallazgos sobre el efecto de la suramina que, al inhibir estos receptores, podría disminuir la actividad osteoclástica y promover la homeostasis ósea.

Además, un estudio de Gartland et al. (2012) demuestra que la suramina no solo inhibe la señalización purinérgica en osteoblastos, sino que también reduce la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), enzimas que juegan un papel crítico en la remodelación ósea. Esto sugiere que la suramina puede tener un doble efecto terapéutico, modulando tanto la señalización celular como la actividad enzimática involucrada en la remodelación del hueso.

Perfil de Expresión de Receptores Purinérgicos

La diversidad funcional de los receptores purinérgicos y el perfil de expresión diferencial de los receptores purinérgicos identificados en este estudio, particularmente la prominencia de los receptores P2X₇ y P2Y₂, podría tener implicaciones significativas en la función osteoblástica y la regulación nuclear. Este enfoque en la diversidad funcional resalta la complejidad de la señalización purinérgica en la regulación de la homeostasis ósea. Por ejemplo, el estudio realizado por Høyer et al. (2023) muestra que los receptores P2X₇ tienen una baja expresión en las células de mieloma MOPC315.BM, mientras que los receptores P2X₃ y P2X₄ presentan una alta expresión. Además, se observó que el tratamiento con BzATP, un agonista del receptor P2X₇, regula negativamente la expresión del P2X₄ y otros genes involucrados en la señalización purinérgica como CD39,

Icam-1 y Nf-kb1, mientras que aumenta la expresión de Casp-1. Estos resultados sugieren que las células de mieloma pueden adaptar su supervivencia mediante la regulación de los receptores purinérgicos, específicamente el P2X₄, en respuesta a altos niveles de ATP extracelular.

Un estudio adicional por Fumagalli et al. (2020) revela que la expresión de receptores purinérgicos en osteoblastos no solo afecta la señalización intracelular, sino también la comunicación con otras células del microambiente óseo, como los osteoclastos y células estromales. Esto subraya la importancia de comprender el perfil de expresión de estos receptores para desarrollar terapias dirigidas que puedan mejorar la regeneración y reparación ósea mediante la modulación precisa de la señalización purinérgica.

Los resultados observados, de acuerdo con los estudios de inmunofluorescencia, muestran que esta línea celular muestra principalmente P2Y₆, P2X₁, en citoplasma, mientras que P2Y₂, y P2X₇ se expresan abundantemente en el núcleo, por el contrario, P2Y₄, P2X₄ es escaso y P2X₅ no se encontró su presencia. Por lo tanto, esto sugiere que la activación dada por ATP se debe principalmente a la activación de P2Y₆ y P2X₁.

Conclusiones

1.- La administración de ATP a los osteoblastos de rata en cultivo, genera incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ que varían dependiendo de la dosis, siendo la más efectiva la de 1 μ M.

2.- El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ generado por la administración de ATP, depende de manera significativa del Ca^{2+} extracelular.

3.- El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ desaparece cuando se administra Suramina 100 μ M en la solución de perfusión.

4.- Los osteoblastos de rata en cultivo expresan a los receptores P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2X₁, P2X₄, P2X₇.

Perspectivas

- 1. Exploración de Mecanismos Moleculares Detallados:** Futuros estudios deberían explorar los mecanismos moleculares específicos mediante los cuales las distintas concentraciones de ATP afectan la señalización del calcio.
- 2. Impacto del Ambiente de Calcio:** Los resultados indican que el calcio extracelular juega un papel crucial en la señalización de ATP. Estudios adicionales que examinen la interacción entre los niveles de calcio extracelular e intracelular podrían revelar detalles sobre cómo estas interacciones afectan la función y la supervivencia de los osteoblastos bajo diversas condiciones patológicas y fisiológicas.
- 3. Rol de los Receptores Purinérgicos Específicos:** La expresión diferencial de receptores purinérgicos como P2Y₂, P2Y₄, P2X₇, P2X₄ y P2Y₆ en los osteoblastos sugiere roles variados y específicos en la biología celular. La caracterización detallada de cada receptor en la regulación de la homeostasis ósea podría identificar nuevos objetivos terapéuticos para trastornos relacionados con el hueso.
- 4. Desarrollo de Estrategias Terapéuticas:** Basado en la inhibición exitosa de la señalización por suramina, el empleo de antagonistas selectivos de los receptores

purinérgicos podría ofrecer nuevas oportunidades para manipular la función osteoblástica en diversas condiciones.

Bibliografía:

1. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2019). Purinergic signalling in the nervous system: An overview. *Trends in Neurosciences*, 42(4), 248-260.
2. Agrawal, A., & Jørgensen, N. R. (2021). Extracellular purines and bone homeostasis. *Biochemical Pharmacology*, 187, 114425.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114425>
3. Alberto, A. V., Santos, L. H., Ferreira, R., Ferreira, D. N., & Alves, L. A. (2019). A brief view of molecular modeling approaches to P2 receptors. In *Receptors P1 and P2 as Targets for Drug Therapy in Humans* (pp. 1-19). IntechOpen.
4. Alfaro, J. J. B., Fernández, J. S., Pesudo, R. G., Bermúdez, J. F. D., & Lanau, J. V. (2011). Regeneración ósea, biomateriales, sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo. ResearchGate. Retrieved from
https://www.researchgate.net/publication/324560123_Regeneracion_osea_biomateriales_sustitutos_oseos_y_sustitutos_del_injerto_oseo
5. Baptista, H., Mendes, D., & Soares, C. (2013). Age-related mobility loss is joint-specific: An analysis from 6,000 Flexitest results. *Age (Dordr)*, 35(6), 2399-2407.
<https://doi.org/10.1007/s11357-012-9449-3>

6. Barrios-Moyano, A., & De la Peña-García, C. (2018). Prevalencia de osteoporosis y osteopenia en pacientes laboralmente activos. *Acta Ortopédica Mexicana*, 32(3), 131-133. <http://www.scielo.org.mx/pdf/aom/v32n3/2306-4102-aom-32-03-131.pdf>
7. Bates, P., & Ramachandran, M. (2007). Bone injury, healing and grafting. In M. Ramachandran (Ed.), *Basic Orthopaedic Sciences: The Stanmore Guide* (pp. 123-134). London: Hodder Arnold.
8. Björkgren, I., & Lishko, P. V. (2016). Purinergic signaling in testes revealed. *Journal of General Physiology*, 148(3), 207-211. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611615>
9. Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(3), 166-176.
10. Burnstock, G., & Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*, 9(4), 491-540. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9362-9>
11. Camici, M., Garcia-Gil, M., & Tozzi, M. G. (2018). The inside story of adenosine. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 784. <https://doi.org/10.3390/ijms19030784>
12. Carluccio, M., Ziberi, S., Zuccarini, M., Giuliani, P., Caciagli, F., Di Iorio, P., & Ciccarelli, R. (2020). Adult mesenchymal stem cells: is there a role for purine receptors in their osteogenic differentiation? *Purinergic Signalling*, 16(3), 263-287. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09703-4>
13. Chess-Williams, R., Sellers, D. J., Brierley, S. M., Grundy, D., & Grundy, L. (2019). Purinergic receptor mediated calcium signalling in urothelial cells. *Scientific Reports*, 9(1), 16101. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52546-8>
14. Cujilema-Cujilema, J. M., Palacio-Villegas, J. C., Stangl-Herrera, W. P., Echeverry-Vélez, A. A., Cantor, E., Ron-Translateur, T., & Correa-Valderrama, A.

(2019). Resultados funcionales de hemiartroplastía bipolar en pacientes mayores de 65 años con fracturas intracapsulares de cadera. *Acta Ortopédica Mexicana*, 33(4), 241-246.

15. Dahl, G. (2015). ATP release through pannexon channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1672), 20140191.

16. Di Virgilio, F., Falzoni, S., Giuliani, A. L., & Adinolfi, E. (2016). P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. *Current Opinion in Pharmacology*, 29, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.04.002>

17. Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., & Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, 18(10), 601-618. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>

18. Dimitriou, R., Jones, E., & McGonagle, D. (n.d.). Bone regeneration: Current concepts and future directions. Retrieved May 4, 2023, from <https://www.researchgate.net/publication/32452028>

19. Foreman, M. A., Gu, Y., Howl, J. D., Jones, S., & Publicover, S. J. (2005). Group III metabotropic glutamate receptor activation inhibits Ca^{2+} influx and nitric oxide synthase activity in bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), 704-713. <https://doi.org/10.1002/jcp.20306>

20. Freshney, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss.

21. Fumagalli, M., Brambilla, R., Ceruti, S., & Abbracchio, M. P. (2020). The purinergic system in neural stem cells: Physiological and pathological implications. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1287.

22. García, R. R., Moreno, P. R., & Muñoz-Torres, M. (2008). Regulación del proceso de remodelado óseo. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 17(1), 10-14.
23. Gartland, A., Hocking, L. J., Parsons, C., Stainthorpe, A., Fraser, W. D., Gallagher, J. A., & Ford, D. (2012). Polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with reduced lumbar spine bone mineral density in post-menopausal women. *European Journal of Human Genetics*, 20(5), 559-564.
24. Glaser, T., Resende, R. R., & Ulrich, H. (2013). Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-1>
25. Høyer, E. R., Demir, M., Bak, L. K., Jørgensen, N. R., & Agrawal, A. (2023). Expression of the Purinergic P2X7 Receptor in Murine MOPC315. BM Myeloma Cells. *Receptors*, 2(3), 191-203.
26. Huang, H., Yu-Mei, H., Lin, M., Wang, Y., Zhang, X., Li, L., & He, X. (2022). P2X7Rs: new therapeutic targets for osteoporosis. *Purinergic Signalling*, 19(1), 207-219. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09836-0>
27. Huang, Z., Xie, N., Illéš, P., Di Virgilio, F., Ulrich, H., Semyanov, A., Verkhatsky, A., Sperlágh, B., Yu, S., Huang, C., & Tang, Y. (2021). From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

28. Koupenova, M., & Ravid, K. (2018). Biology of platelet purinergic receptors and implications for platelet heterogeneity. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 37.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00037>
29. Kumagai, H., Sakamoto, H., Guggino, S., Filburn, C. R., & Sacktor, B. (1989). Neurotransmitter regulation of cytosolic calcium in osteoblast-like bone cells. *Calcified Tissue International*, 45, 251-254.
30. Lee, B., Jo, H., Park, G., Kim, Y., Park, C., Jung, S., Chung, G., & Oh, S. (2016). Extracellular ATP Induces Calcium Signaling in Odontoblasts. *Journal of Dental Research*, 96(2), 200-207. <https://doi.org/10.1177/0022034516671308>
31. Long, F. (2012). Building strong bones: Molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(1), 27-38.
<https://doi.org/10.1038/nrm3254>
32. Ma, Y., Shi, X., Zhao, H., Song, R., Zou, H., Zhu, J., & Liu, Z. (2022). Potential mechanisms of osteoprotegerin-induced damage to osteoclast adhesion structures via P2X7R-mediated MAPK signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 49(5).
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5115>
33. Maniopoulos, C., Sodek, J., & Melcher, A. H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and Tissue Research*, 254(2), 317-330.
34. McCutcheon, S., Majeska, R. J., Spray, D. C., Schaffler, M. B., & Vázquez, M. (2020). Apoptotic Osteocytes Induce RANKL Production in Bystanders via Purinergic Signaling and Activation of Pannexin Channels. *Journal of Bone and Mineral Research*, 35(5), 966-977. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3954>

35. O'Neill, E., Awale, G., Daneshmandi, L., Umerah, O., & Lo, K. W. H. (2018). The roles of ions on bone regeneration. *Drug Discovery Today*, 23(4), 879-890.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.050>
36. Orriss, I. R., Burnstock, G., & Arnett, T. R. (2010). Purinergic signalling and bone remodelling. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(3), 322-330.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.01.007>
37. Panupinthu, N., *et al.* (2020). P2X7 receptors: role in bone cell formation and function. *Journal of Molecular Endocrinology*, 40(5), 103-111.
<https://doi.org/10.1530/JME-20-0051>.
38. Pech-Ciau, B. A., Lima-Martínez, E. A., Espinosa-Cruz, G. A., Pacho-Aguilar, C. R., Huchim-Lara, O. A. G. R., & Alejos-Gómez, R. A. (2021). Fractura de cadera en el adulto mayor: epidemiología y costos de la atención. *Acta Ortopédica Mexicana*, 35(4), 341-347.
39. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
40. Price, P. A., Otsuka, A. A., Poser, J. W., Kristaponis, J., & Raman, N. (1976). Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(5), 1447-1451.
41. 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. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(6), 683-692.

42. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2009). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 566-578.
43. Rubert, M., & De la Piedra, C. (2020). La osteocalcina: de marcador de formación ósea a hormona; y el hueso, un órgano endocrino. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 12(4), 146-151.
44. Salmaso, V., & Jacobson, K. A. (2020). Purinergic Signaling: Impact of GPCR Structures on Rational Drug Design. *ChemMedChem*, 15(21), 1958-1973.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.202000465>
45. Scarpellino, G., Genova, T., Avanzato, D., Bernardini, M., Bianco, S., Petrillo, S., ... Munaron, L. (2019). Purinergic calcium signals in tumor-derived endothelium. *Cancers*, 11(6), 766. <https://doi.org/10.3390/cancers11060766>
46. SenGupta, S., Parent, C. A., & Bear, J. E. (2021). The principles of directed cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(8), 529-547.
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00360-0>
47. Soucie, J., Wang, C., & Forsyth, A. (2011). Range of motion measurements: Reference values and a database for comparison studies. *Haemophilia*, 17(3), 500-507.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02482.x>
48. Sprague, R. S., & Khalil, R. A. (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 78(6), 539-552.
49. Stam, H., Van Der Wouden, J. C., Hugtenburg, J. G., Twisk, J. W., Van Der Horst, H. E., & Maarsingh, O. R. (2018). Effectiveness of a multifactorial intervention for dizziness in older people in primary care: A cluster randomised controlled trial. *PLoS One*, 13(10), e0204876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204876>

50. Stein, G. S., & Lian, J. B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 14(4), 424-442.
51. Stewart, S., Bryant, S. J., Ahn, J., & Hankenson, K. D. (2015). Bone regeneration. In *Translational Regenerative Medicine* (pp. 313-333). Academic Press.
52. Terunuma, M., Haydon, P. G., Pangalos, M. N., & Moss, S. J. (2015). Purinergic receptor activation facilitates astrocytic GABAB receptor calcium signalling. *Neuropharmacology*, 88, 74-81.
53. Tinetti, M. E., Williams, C. S., & Gill, T. M. (2000). Health, functional, and psychological outcomes among older persons with chronic dizziness. *Journal of the American Geriatrics Society*, 48(4), 417-421.
54. Verkhatsky, A., & Burnstock, G. (2014). Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *BioEssays*, 36(7), 697-705.
55. Vo, T., Kasper, F., & Mikos, A. (n.d.). Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. Retrieved May 4, 2023, from <https://www.researchgate.net/publication/32455002>
56. World Health Organization (OMS). (2018). Ageing and health.