

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Contribución del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) a la homeostasis del hueso : efectos sobre la diferenciación y función de las células del tejido óseo

Contribution of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) to Bone Homeostasis : Effects on the Differentiation and Function of Bone Tissue Cells

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Castro Vázquez

DIRIGIDA POR

Mar Carrión Caballo
Rosa María Pérez Gomariz

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

Contribución del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) a la Homeostasis del Hueso:
Efectos sobre la Diferenciación y Función de las Células del Tejido Óseo.

Contribution of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) to Bone Homeostasis: Effects on the
Differentiation and Function of Bone Tissue Cells.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Castro Vázquez

DIRECTORAS

Mar Carrión Caballo y Rosa María Pérez Gomariz

Esta tesis ha sido financiada gracias a los proyectos PI17/00027, PI20/00078, RD16/0012/0008 y RD21/0002/004 y RD24/0007/0014 del Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III), co-financiado por el *European regional development fund* (ERDF). Los proyectos de la Universidad Complutense de Madrid PR12/24-31568 y PR12/24-31572. El doctorando ha disfrutado de un contrato predoctoral en formación CT82/20-CT83/20 financiado por la Universidad Complutense de Madrid y Santander Universidades, además de un fondo para estancias de corta duración en el extranjero *Scientific Exchange Grants* (SEG 1087) financiado por la *European Molecular Biology Conference*.



"Una manera de hacer Europa"



A mi abuela,

Pensé que era un buen momento
Por fin, se hacía realidad
Tanto oír hablar de tu silencio
Dicen que te arrastra como el mar

Agradecimientos

No sé cuántas veces he imaginado cómo empezar esta sección. Creo que nunca había sentido tan fuerte el síndrome de la hoja en blanco. Y es que, aunque parecía lo más sencillo, estas líneas son las más difíciles de escribir, la lista de personas sin cuya ayuda todo esto no habría sido posible es inmensa.

Rosa, guardo grabado a fuego el recuerdo de aquella primera clase de histología en la que te presentaste. Quién me iba a decir entonces que esa profesora que recorría la clase y nos sacaba a la pizarra sería la futura directora de mi tesis. No puedo estar más agradecido de que confiaras en aquel “pequeño David” que no buscaba ser elegido por su expediente, sino por su interés y curiosidad por la ciencia. Gracias por anteponer siempre a la persona frente al científico, por enseñarme a amar la histología, por tu dedicación, tu escucha, tus consejos y tu espíritu crítico. Cada día contigo ha sido una lección. En resumen, gracias por abrirme la puerta de la ciencia, acompañarme de la mano y enseñarme que esto es lo que realmente me apasiona.

Mar, el otro pilar fundamental de esta tesis. Con el tiempo, me doy cuenta de lo valioso que fue aquel gesto generoso de cederme tu “cacharreo” de laboratorio para dar mis primeros pasos. Gracias por todo el tiempo compartido, por las discusiones, reflexiones y correcciones, pero también por crear siempre un espacio donde las opiniones se valoran igual, sin importar de dónde vengan. Gracias a los valores que me has transmitido, hoy puedo definirme como lo que siempre soñé ser de mayor.

No puedo seguir sin mencionar a quienes hacen que todo este engranaje funcione. Yasmi, la primera profesora que encontré en mi camino universitario...y míranos ahora. Mil gracias por tu paciencia, tus abrazos en los momentos difíciles y por ayudarme con cada papel, trámite y obstáculo. Carmen, gracias por tu minuciosidad, por estar siempre atenta, dispuesta y con esa actitud tan envidiable. Sin vosotras, este proyecto no habría llegado hasta aquí.

Irene, la sonrisa del departamento. Gracias por buscar alternativas cuando no había opciones, que envidia no ver la vida con ese filtro de positividad que te caracteriza. Selene, mi diva favorita, gracias por “cederme” tu espacio jeje, gracias por enseñarme que esto no es solo ciencia, también es humanidad. Raúl, el chico del grupo, gracias por todos los momentos en el 14, por los Reels y comentarios que han hecho todo este viaje mucho más sencillo.

Alicia, qué suerte es tener a alguien con quien compartir no solo dedal y aguja, sino también confidencias. Gracias por escuchar mis dramas cuando algo se torcía y por

regalarme siempre palabras de ánimo y una sonrisa en la que refugiarme, incluso en los momentos más complicados. Karolina, cuando llegaste eras tan tímida que parece mentira que hoy seas nuestra rubia favorita. Gracias por todas las bromas y pequeñas conspiraciones que han hecho que cada día fuera distinto al anterior, sin duda eres un fichaje estupendo..

Y qué decir de Paula e Iván, mis pequeños “huesitos”. No puedo estar más agradecido. Paula, mi compañera de batallas, mil gracias por tu paciencia infinita, tu perfeccionismo y tu nivel de detalle. Gracias también por tu calidez y amabilidad en cualquier circunstancia. Iván, mi mano derecha, acogerte en el grupo fue de las mejores decisiones. Yo sé que detrás de esa fachada de tipo duro de Móstoles se esconde alguien cariñoso, transparente e ingenuo. Gracias por aportar un poco de caos a mi yo más cuadrulado y por tener siempre un comentario que quita seriedad al asunto. En definitiva, sin vosotros este trabajo no habría llegado hasta aquí. Vuestra ayuda desinteresada y vuestra calidad humana han hecho de este camino una experiencia única. Estoy seguro de que os esperan futuros tan brillantes como los que merecéis.

También tengo que hacer mención a los habitantes más jóvenes del departamento, Esteban, Adrián, Cristina, Úrsula, Javi y Mariano (mi compi-hueso) gracias por todos los momentos de risas en el café, las salidas extra-laboratorio y todos los planes que hacen que cada día aquí sea genial. Sara J., gracias por tus cuidados en la distancia y tus palabras de ánimo cuando más lo necesitaba.

Sarita, Javi, David y Zapata, millones de gracias por todo vuestro apoyo, logístico, técnico y personal. Sois como los buenos amigos, siempre he podido contar con vuestra ayuda cuando todo iba bien, pero sobre todo cuando las cosas se torcían.

Y podría seguir escribiendo líneas y líneas, pero lo bueno, si breve, dos veces bueno. Así que muchas gracias a todas las personas del departamento que me han ayudado de una forma o de otra. Esto es un trabajo bajo mi nombre, pero lleva el sello de toda la gente que en algún momento me echó un cable, mil gracias.

Gracias también a mis compañeras de pasión, mi aquelarre de juezas: Sara, Estela, Laura y Paula. Cuando nos ponemos los cascos y hablamos en nuestro idioma parece que nos somos indiferentes, pero es solo fachada. Gracias por todas las cenas, comentarios e informaciones de última hora que me dan la vida.

Reme, Fiona Elena y Loli muchas gracias por acompañarme en este viaje entre hilos y tijeras, por ayudarme a lograr mi proyecto de tesis número 2. Gracias por escuchar con admiración cada vez que hablo de ciencia, con vosotras los miércoles se hacen más amenos.

No me puedo olvidar mencionar a las personas que son hogar. Y que mejor forma de empezar que con la familia que elegí, mis velilleros favoritos, mis mujeronas, y es que ellos más que amigos ya son hermanos. Arancha, Diana, Dani, Rubio, Ruth y Sandra mil gracias por ser el mejor grupo de amigos que una persona puede imaginar. Aunque a veces nos separe la distancia, siempre sabemos que nos tenemos para todo. Gracias por crear ese espacio seguro donde nada queda sin decirse. Con vosotros la vida tiene más sentido; hasta comer pipas en un banco es un planazo. Me hacéis tan feliz que no existen palabras suficientes en el diccionario para agradecerlo.

Mamá, Papá, gracias por enseñarme que la vida es un camino con muchísimos altibajos y vosotros habéis sido capaces de sortearlos de la mano de dos niños, no puedo sentir más admiración. Gracias por haberme criado en el respeto, la humildad y la igualdad. Gracias por llenarme de valores que hacen que esté orgulloso de lo que soy ahora. Gracias por confiar en todas las decisiones que he tomado, por apoyarme cuando veáis que todo se torcía, por estar siempre ahí si me caigo y celebrar conmigo los logros, sin vuestro esfuerzo esto hubiese sido imposible. Iván, tan diferentes pero a la vez tan iguales, y es que aunque no nos repitamos lo muchísimo que nos queremos yo se siempre estamos ahí para lo que necesite el uno del otro. Gracias por tus consejos mecánicos, por buscar soluciones en la situación más loca posible y, en definitiva, por ser mi hermano. Abuela, eres mi segunda madre y mi ejemplo a seguir. Muchas gracias por tus tardes en el parque, tus cuidados infinitos junto con el abuelo y tu cariño desorbitado. Aunque no lo creas, para mí siempre has sido una fuente de sabiduría y, gracias a ti, hoy estoy aquí.

Gracias también a mi pequeño Axel, que, aunque no pueda leer estas palabras todo su amor desinteresado me llena el corazón. También gracias a Carol, mi bióloga de bota favorita, nuestros viajes de comer, visitar museos raros y subir a miradores son siempre un planazo, muchas gracias por estar ahí siempre. Y a mis chicas del 2 B, mi tía y prima postiza: gracias por hacer que en vuestra casa hasta el Cola-Cao sepa mejor y por vuestro apoyo desde la distancia.

Las últimas líneas no podrían ir para otra persona que no sea mi media mitad. Isaac, que suerte encontrarnos en la carrera y hacer que nuestros caminos se unan. Ahora puedo agradecerte toda la paciencia, nadie como tu sabe cómo he vivido este camino. Gracias por escuchar siempre atento, aconsejar cuando veo todo oscuro, alegrarte más que yo cuando el destino me sonreía y por hacer de nuestra casa un hogar. Eres la persona más bonita que se ha cruzado por mi vida, y no puedo estar más feliz de compartirla contigo.

Gracias, de corazón, a todos los que habéis compartido esta etapa conmigo: los que me habéis ayudado cuando lo necesité, los que me escuchasteis cuando necesitaba hablar, los que me animasteis en los días más duros.

A todos, gracias.

Abreviaturas

-A-

ADAMTS: Desintegrina y metaloproteínasa con motivos trombospondina

ALP: Fosfatasa alcalina

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AR: Artritis reumatoide

-B-

BM-MSC: Célula madre mesenquimal de médula ósea

BMP: Proteínas morfogénicas óseas

BMU: Unidad multicelular básica

-C-

CIA: Artritis inducida por colágeno

CTSK: Catepsina K

-D-

DAG: Diacilglicerol

DC-STAMP: Proteína transmembrana específica de células dendríticas

DMP: Proteína de matriz dentinaria

-E-

EC50: Concentración media efectiva

EV: Vesícula extracelular

-F-

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FLS: Sinoviocitos fibroblásticos

FZD: Receptor *frizzled*

-G-

GDP: Guanosín difosfato

GH: Hormona del crecimiento

GHFR: Factor liberador de hormona del crecimiento

GLP: Péptido relacionado con el glucagón

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos

GMP: Progenitor mieloide común de granulocitos/macrófagos

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

GRD: Epítipo ácido arginil-glicil-aspártico

GRK: Proteína quinasa de GPCR

GTP: Guanosín trifosfato

GWAS: Estudios de asociación del genoma completo a gran escala

-I-

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IL: Interleucinas

ILC: Células linfoides innatas

IP3: Inositol trifosfato

-L-

LGR4: Receptor 4 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina

LIF: Factor inhibidor de leucemia

LPS: Lipopolisacárido

LRP5/6: Proteína 5/6 asociada al receptor de lipoproteínas de baja densidad

-M-

MEPE: Fosfoproteína extracelular de la matriz

MMP: Metaloproteínasa de matriz

MSC: Célula madre mesenquimal

-N-

NFATc1: Factor nuclear de células T activadas 1

NF-κB: factor nuclear κB

NPY: Neuropeptido Y

N-ted: Dominio N-terminal

-O-

OC-STAMP: Proteína transmembrana estimuladora de osteoclastos

OPG: Osteoprotegerina

OSCAR: Receptor coestimulador asociado a osteoclastos

-P-

PACAP: péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PHEX: Endopeptidasa neutra reguladora de fosfato ligada al cromosoma X

PHI: Péptido histidina-isoleucina

PHM: Péptido histidina-metionina

PIP2: Fosfatidil inositol 2-fosfato

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PRP: Péptido relacionado con PACAP

PTH: Hormona paratiroidea

-R-

RAMP: Proteína modificadora de la actividad del receptor

RANK: Receptor activador para el factor nuclear κ B

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B

Runx2: Factor de transcripción relacionado con Runt 2

-S-

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

SOST: Esclerostina

SPI: Esfingosina 1-fosfato

-T-

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

Th: Linfocito T colaborador

TLR: Receptor tipo *toll*

TNBS: Ácido trinitrobenzenosulfónico

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TRAF6: Factor 6 asociado al receptor de TNF

TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato

Treg: Linfocito T regulador

-V-

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

VPAC1: receptor para VIP y PACAP de tipo I

VPAC2: receptor para VIP y PACAP de tipo II

Índice

Resumen/Abstract	1
Introducción	11
Hueso: estructura y composición	11
Estructura celular y tisular ósea.....	11
La matriz ósea	11
Tipos de tejido óseo	13
Formación de hueso: el proceso de osificación.....	14
Tipos celulares del tejido óseo	16
Proceso de diferenciación de las células del tejido óseo.....	19
Osteoclastos.....	19
Osteoblastos	23
Osteocitos	25
Sistemas de regulación intercelular en el tejido óseo	27
Sistema RANK/RANKL/OPG.....	27
Comunicación Osteoclasto-Osteoblasto.....	28
Actividad reguladora de los Osteocitos.....	29
Remodelado óseo	32
Mecanismos moleculares y celulares de la resorción ósea	32
Proceso de mineralización de la matriz ósea	33
Fisiología del remodelado óseo	34
Regulación de la homeostasis ósea	38
Sistema endocrino	38
Sistema inmune (Osteoinmunología)	39
Sistema nervioso	40
Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)	42
Estructura bioquímica de VIP y su familia	43
Receptores de VIP	45

El receptor VPAC1.....	47
El receptor VPAC2	48
Vías de señalización de los receptores de VIP.....	49
Acciones biológicas de VIP	51
Efectos sobre la inmunidad innata.....	53
Efectos sobre la inmunidad adquirida	54
Efectos sobre la homeostasis ósea	56
Patologías Reumáticas	58
Artritis reumatoide.....	58
Eje VIP receptores en las patologías reumáticas.....	61
Hipótesis y objetivos.....	69
Artículo 1	73
<i>The Neuropeptide VIP Limits Human Osteoclastogenesis: Clinical Associations with Bone Metabolism Markers in Patients with Early Arthritis.</i>	
Artículo 2	93
<i>Vasoactive Intestinal Peptide Exerts an Osteoinductive Effect in Human Mesenchymal Stem Cells.</i>	
Artículo 3	109
<i>Vasoactive Intestinal Peptide Induces an Osteoprotective Phenotype in Human Triple cultures of Osteocytes, Osteoblasts and Osteoclasts.</i>	
Discusión.....	129
Conclusiones/Conclusions	143
Bibliografía	149
Otros artículos publicados	185

Resumen

Contribución del péptido intestinal vasoactivo (VIP) a la homeostasis del hueso: efectos sobre la diferenciación y función de las células del tejido óseo

El mantenimiento de la integridad ósea requiere de un proceso dinámico en el que, gracias a la actividad coordinada de osteoclastos, que degradan el hueso viejo o dañado, y de osteoblastos, responsables de la producción de hueso nuevo, se logra restaurar la integridad y la resistencia ósea. La interacción entre estos tipos celulares es regulada a través de distintos mediadores como citocinas, factores de crecimiento locales, hormonas sistémicas y neuropéptidos. Además, la participación de los osteocitos, encapsulados en la matriz ósea, resulta esencial para la coordinación de la homeostasis ósea, ya que expresan moléculas que regulan tanto la resorción como la formación del hueso. De modo que, en el tejido óseo, existe una compleja red de mecanismos celulares y moleculares que aseguran el equilibrio entre la actividad anabólica de los osteoblastos y la catabólica de los osteoclastos. Una alteración en este balance puede comprometer la homeostasis ósea y favorecer la aparición de diversas patologías asociadas, entre ellas, la artritis reumatoide.

Entre los mediadores implicados en dichos mecanismos reguladores, destacan neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Tanto en estudios *in vivo* con modelos animales, como *in vitro* con células murinas, VIP ha demostrado ejercer efectos osteoprotectores al inhibir la osteoclastogénesis y favorecer la diferenciación osteoblástica. Asimismo, este neuropéptido juega un papel relevante en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, gracias a su capacidad inmunomoduladora y a sus propiedades antiinflamatorias. **Por ello, nos propusimos estudiar si el eje VIP/receptores ejerce una función osteoprotectora en el metabolismo óseo humano y si participa en la comunicación neuro-inmuno-osteogénica mediada por los osteocitos.** Para ello centramos nuestro diseño experimental en el uso de modelos *in vitro* de diferenciación de osteoclastos, osteoblastos y osteocitos humanos, así como de sistemas de triple co-cultivo establecidos a partir de dichos tipos celulares.

En los tres tipos celulares de estudio se abordó, en primer lugar, la caracterización de la expresión de VIP y sus receptores (VPAC1 y VPAC2) durante la diferenciación *in vitro* de osteoclastos, osteoblastos y osteocitos humanos. Los resultados demuestran la presencia de ambos receptores en las tres poblaciones celulares mientras que la expresión del péptido se detecta en osteoblastos y osteocitos. Queda así evidenciada la capacidad de los tres tipos celulares para responder a la señalización de VIP y sugiere

la existencia de un sistema de regulación autocrina en las células del linaje osteoblástico.

Dada la información previa generada en modelos murinos que respalda el potencial anti-osteoclastogénico de VIP, nuestro siguiente objetivo fue el estudio del efecto de este neuropéptido sobre la diferenciación y funcionalidad de las células del tejido óseo. Los resultados indican que VIP presenta un efecto anti-osteoclastogénico directo, limitando tanto la diferenciación como la funcionalidad de los osteoclastos, a través de la regulación negativa del factor NFATc1. En relación con el linaje osteoblástico, comprobamos que VIP promueve la diferenciación de células mesenquimales humanas hacia osteoblastos, así como su capacidad de mineralización. Además, describimos un efecto inductor de VIP en la transición osteoblasto-osteocito, induciendo la expresión de genes específicos del osteocito, y favoreciendo el desarrollo de ramificaciones dendríticas. Además del efecto estimulador de VIP sobre la diferenciación de células del linaje osteoblástico, nuestros resultados indican que también contribuye a reducir la ratio RANKL/OPG en dichos tipos celulares, ejerciendo así un efecto anti-osteoclastogénico indirecto que refuerza su papel como mediador osteoprotector.

Para evaluar de manera integral los efectos moduladores de VIP sobre el remodelado óseo, se analizó el impacto del neuropéptido en un sistema de triple co-cultivo de osteoblastos primarios y precursores de osteocitos y osteoclastos. En conjunto, los hallazgos presentados indican que VIP regula de forma coordinada la actividad de los tres principales linajes celulares implicados en el remodelado óseo. En dicho sistema, VIP induce un fenotipo osteoprotector que podría estar asociado a la reducción de esclerostina en los osteocitos, lo que limitaría la señalización inhibitoria hacia los osteoblastos y disminuiría en ellos la ratio RANKL/OPG. Por tanto, la inhibición de la diferenciación y función osteoclástica, junto con la estimulación de la diferenciación osteoblástica y de la transición hacia osteocitos, así como la regulación negativa de la ratio RANKL/OPG, señalan a VIP como un mediador osteoprotector clave en la homeostasis ósea.

Por último, considerando resultados previos en el modelo murino de artritis inducida por colágeno en el que VIP presenta un papel protector sobre la erosión ósea al reducir la ratio RANKL/OPG, nuestro último objetivo fue determinar si existe una relación entre los niveles séricos de VIP y los mediadores implicados en el remodelado óseo en el contexto de la artritis reumatoide. Nuestros datos revelan que pacientes con artritis reumatoide de reciente comienzo que presentan niveles séricos altos de VIP muestran una disminución significativa en la ratio RANKL/OPG y una menor pérdida de densidad

mineral ósea, lo que respalda el potencial del eje VIP/receptores como biomarcador pronóstico en esta enfermedad.

En conjunto, esta tesis doctoral pone de manifiesto el papel de VIP como un regulador esencial de la homeostasis ósea al ejercer efectos coordinados sobre osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. Su capacidad para inhibir la osteoclastogénesis, promover la diferenciación osteoblástica y favorecer la transición hacia osteocito, junto con la modulación de la ratio RANKL/OPG, lo posicionan como un mediador osteoprotector clave en el remodelado óseo. Además, los datos derivados del estudio en pacientes con artritis reumatoide de reciente comienzo respaldan el papel del eje VIP/receptores no solo como modulador del metabolismo óseo, sino también como potencial biomarcador pronóstico de pérdida ósea asociada a la artritis reumatoide. En consecuencia, VIP irrumpe como un candidato prometedor para futuras estrategias terapéuticas dirigidas a preservar la integridad ósea y atenuar el daño estructural en enfermedades musculoesqueléticas.

Abstract

Contribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) to bone homeostasis: effects on the differentiation and function of bone tissue cells

Maintaining bone integrity relies on a dynamic process driven by the coordinated activity of osteoclasts, which degrade old or damaged bone, and osteoblasts, which generate new one. This balance restores bone integrity and strength. The interaction between these cell types is tightly regulated by different mediators, including cytokines, local growth factors, systemic hormones, and neuropeptides. Additionally, osteocytes which are encapsulated within the bone matrix, play a pivotal role in coordinating bone homeostasis, by expressing molecules that regulate both bone resorption and formation. Altogether, bone tissue maintains a complex network of cellular and molecular mechanisms that ensure the equilibrium between osteoblast and osteoclast activity. Disruption to this balance may compromise bone homeostasis and promote the development of related pathologies, like rheumatoid arthritis.

Neuropeptides, such as vasoactive intestinal peptide (VIP), are among the mediators involved in these regulatory mechanisms. Animal models and *in vitro* studies with murine cells have shown that VIP exerts osteoprotective effects by inhibiting osteoclastogenesis and promoting osteoblast differentiation. Furthermore, this neuropeptide has been associated with inflammatory and autoimmune diseases owing to its immunomodulatory and anti-inflammatory properties. Based on these evidences, we set out to investigate whether the VIP/receptor axis plays an osteoprotective role in human bone metabolism and participates in neuro-immune-osteogenic communication mediated by osteocytes. To this end, our experimental design focused on *in vitro* models of human osteoclast, osteoblast, and osteocyte differentiation, as well as on triple co-culture systems combining these three cell types.

We first characterised the expression of VIP and its receptors (VPAC1 and VPAC2) in each of the three cell types under study during *in vitro* differentiation. Our results demonstrate the presence of both receptors in all three cell populations, while VIP itself was expressed in osteoblasts and osteocytes. These findings confirm the ability of these cell types to respond to VIP signalling and suggest the existence of an autocrine regulatory system in the osteoblastic lineage.

Based on previous evidence from murine models indicating the anti-osteoclastogenic potential of VIP, we aimed to evaluate its impact on the differentiation and functionality of human bone cells. Our data show that VIP directly exerts anti-osteoclastogenic

effects by limiting osteoclast differentiation and activity through negative regulation of NFATc1. Regarding the osteoblastic lineage, we observed that VIP promotes the differentiation of human mesenchymal cells into osteoblasts and enhances their mineralisation capacity. We also describe a VIP-induced effect on the osteoblast-to-osteocyte transition, characterised by the upregulation of osteocyte specific genes and the formation of dendritic processes. In addition to stimulating osteoblastic differentiation, our findings suggest that VIP contributes to lowering the RANKL/OPG ratio in osteoblastic lineage cells, thereby reinforcing its indirect anti-osteoclastogenic and osteoprotective role.

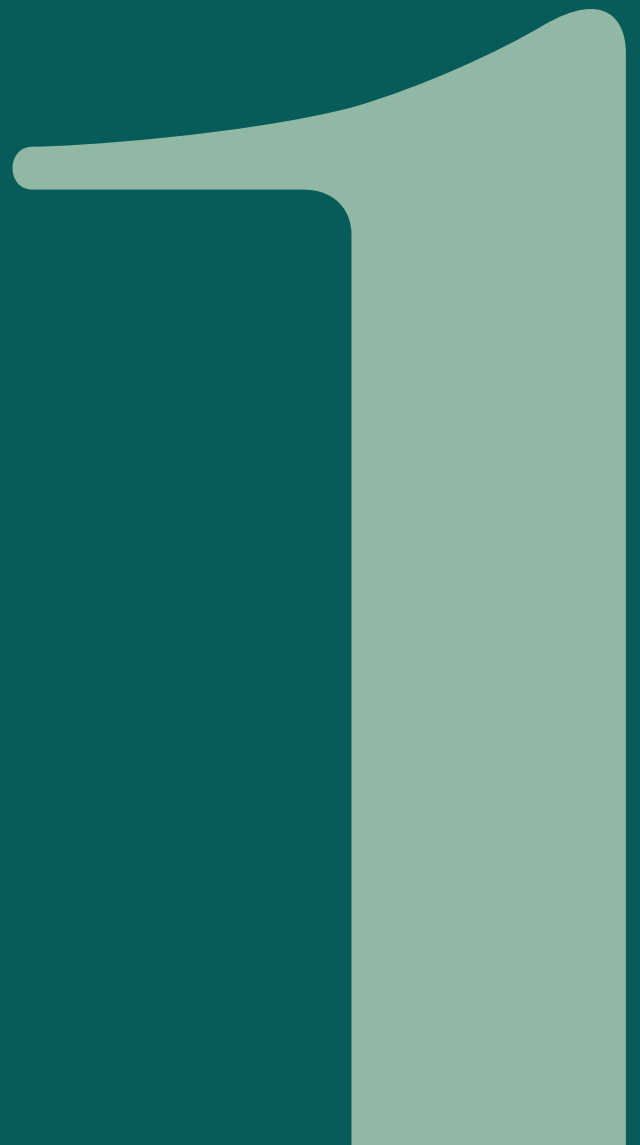
In order to evaluate the modulatory effects of VIP on bone remodelling comprehensively, we analysed its impact in a triple co-culture system comprising primary osteoblasts, as well as osteocyte and osteoclast precursors. Overall, our results indicate that VIP regulates the activity of the three main bone cell lineages in a coordinated manner. Within this system, VIP induces an osteoprotective phenotype that is potentially linked to reduced sclerostin expression in osteocytes. This reduces inhibitory signalling towards osteoblasts and decreases their RANKL/OPG ratio. The inhibition of osteoclast differentiation and activity, together with the stimulation of osteoblast differentiation and the osteoblast-to-osteocyte transition, as well as the downregulation of the RANKL/OPG ratio, highlight VIP as a key osteoprotective mediator in bone homeostasis.

Finally, in light of previous findings from the collagen-induced arthritis mouse model, in which VIP was shown to protect against bone erosion by reducing the RANKL/OPG ratio, our final objective was to establish whether serum VIP levels are associated with bone remodelling mediators in the context of rheumatoid arthritis. Our data reveal that patients with early-stage rheumatoid arthritis who have higher levels of VIP in their serum have a significantly lower RANKL/OPG ratio and experience less bone mineral density loss. This supports the potential of the VIP/receptor axis as a prognostic biomarker in this disease.

Overall, this doctoral thesis emphasises the pivotal role of VIP in regulating bone homeostasis by influencing osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes. Its ability to inhibit osteoclastogenesis, promote osteoblastic differentiation and support the osteoblast-to-osteocyte transition, as well as the modulation of RANKL/OPG ratio, establishes VIP as a pivotal osteoprotective mediator in bone remodelling. Furthermore, data from patients with early-stage rheumatoid arthritis support the role of the VIP/receptor axis as not only a modulator of bone metabolism, but also a potential prognostic biomarker of bone loss associated with the disease. Consequently, VIP emerges as a promising

candidate for future therapeutic strategies aimed at preserving bone integrity and mitigating structural damage in musculoskeletal disorders.

Introducción



Hueso: estructura y composición

El sistema musculoesquelético está constituido por huesos, músculos esqueléticos y articulaciones que quedan conectados y sustentados por cartílagos, tendones, ligamentos y otros elementos de tejido conjuntivo. Las principales funciones de este sistema incluyen la locomoción, el soporte y la protección de los tejidos blandos. Los huesos, además, actúan como un almacén de calcio y fosfato para el organismo y, en muchos casos, albergan en su interior a la médula ósea responsable de la hematopoyesis (Steiniche & Hauge, 2003).

En términos generales, el hueso es un órgano compuesto por tejido óseo y otros tipos de tejido conjuntivo, incluyendo cartílago, tejido adiposo y tejido hematopoyético. Vasos sanguíneos y nervios son otros componentes de dicho órgano. Según su morfología, los huesos pueden clasificarse en cuatro grupos (Clarke, 2008):

- **Huesos largos:** poseen una longitud mayor que sus otras dos dimensiones. Están formados por un cuerpo denominado diáfisis y dos extremos expandidos denominados epífisis. Algunos ejemplos incluyen el fémur y la tibia.
- **Huesos cortos:** presentan dimensiones similares en sus tres ejes. Un ejemplo son los huesos carpianos de la mano.
- **Huesos planos:** son delgados y aplanados, como los huesos del cráneo.
- **Huesos irregulares:** poseen formas complejas que impiden su clasificación en los grupos anteriores, como las vértebras.

A excepción de las superficies articulares, los huesos están cubiertos por una cápsula de tejido conjuntivo denominada periostio. Esta estructura está compuesta por una capa fibrosa externa, similar a otros tejidos conjuntivos densos, donde las fibras de colágeno se disponen paralelamente a la superficie ósea, formando una cápsula protectora. Además, cuenta con una capa interna, más celular, en la que se localizan las células esqueléticas y osteoprogenitoras (Alencar *et al.*, 2020).

Estructura celular y tisular ósea

La matriz ósea

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo, compuesto por células dispersas en el interior de una abundante matriz extracelular. La principal característica que lo diferencia del resto de tejidos conjuntivos es la mineralización de la matriz extracelular gracias a la presencia de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxapatita. Esta mineralización origina un tejido de gran consistencia y

resistencia a la compresión capaz de proporcionar sostén y protección (Florencio-Silva *et al.*, 2015; Tzelepi *et al.*, 2009).

La matriz extracelular se compone principalmente de un 90% de colágeno, mientras que el 10% restante se denomina sustancia fundamental y contiene otras proteínas necesarias para el desarrollo, crecimiento, remodelación y reparación ósea (Florencio-Silva *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2020). De este modo, el principal componente de la matriz ósea es el colágeno de tipo I y, en menor medida, el de tipo V. No obstante, en la matriz coexisten otros tipos de colágeno de forma residual como los de tipo III, XI y XIII (Delmas & Malaval, 1993; Lin *et al.*, 2020; Pawlina & Ross, 2024). Tanto el colágeno, como las proteínas que componen la sustancia fundamental se mineralizan para formar la matriz extracelular característica del tejido óseo (Fujisawa & Tamura, 2012; Gorski, 2011).

Las proteínas no colágenas principales presentes en la matriz ósea son las siguientes (Carvalho *et al.*, 2021; Ingram *et al.*, 1993; Vanleeuwen *et al.*, 1993):

- **Proteoglucanos:** son macromoléculas compuestas por una proteína central con cadenas laterales de glucosaminoglucanos unidos de forma covalente. Estas moléculas son responsables de la fijación de los factores de crecimiento y de la inhibición de la mineralización. Algunos de estos proteoglucanos contienen osteoadherina, una proteína específica del tejido óseo que fija cristales de hidroxapatita.
- **Glucoproteínas multiadhesivas:** éstas intervienen en la adhesión de las células óseas y fibras de colágeno a la sustancia fundamental mineralizada. Algunas de estas glucoproteínas son la osteonectina, que media la adhesión entre el colágeno y los cristales de hidroxapatita; la proteína de matriz dentinaria (DMP), cuya función es la mineralización de la matriz ósea, y la osteopontina, una sialoproteína que media la adhesión celular a la matriz ósea.
- **Proteínas dependientes de vitamina K** osteoespecíficas como la osteocalcina, cuya función está relacionada con la correcta alineación de los cristales de hidroxapatita necesarios para la mineralización de la matriz ósea (Moriishi *et al.*, 2020).
- **Factores de crecimiento y citocinas:** son pequeñas proteínas reguladoras, como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) o las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) implicadas en la diferenciación de los tipos celulares presentes en el hueso.

Tipos de tejido óseo

Atendiendo a su organización microscópica se pueden distinguir dos formas de tejido óseo: el hueso plexiforme y el tejido óseo laminar. El esqueleto del embrión y del recién nacido está constituido principalmente por **tejido óseo plexiforme**. Este tipo es el primero que se forma durante la reparación de fracturas o en huesos en crecimiento. Se caracteriza por presentar una desorganización celular, así como fibras de colágeno dispuestas de forma irregular, aportando al tejido una mayor capacidad de deformación y flexibilidad (Quilhac & de Buffrénil, 2021).

A partir de los 4 años, el tejido óseo plexiforme evoluciona a **tejido óseo laminar esponjoso o compacto**. Este último se caracteriza por la presencia de estructuras laminares, ordenadas de una forma concreta y regular denominadas osteonas o sistemas de Havers (Figura 1). Dichas estructuras consisten en laminillas concéntricas de matriz ósea alrededor de un conducto central denominado conducto osteonal (o de Havers), que alberga a los componentes vascular y nervioso de la osteona. También contienen conductos transversales (o de Volkmann) cuya función es la intercomunicación de los diferentes conductos de Havers.

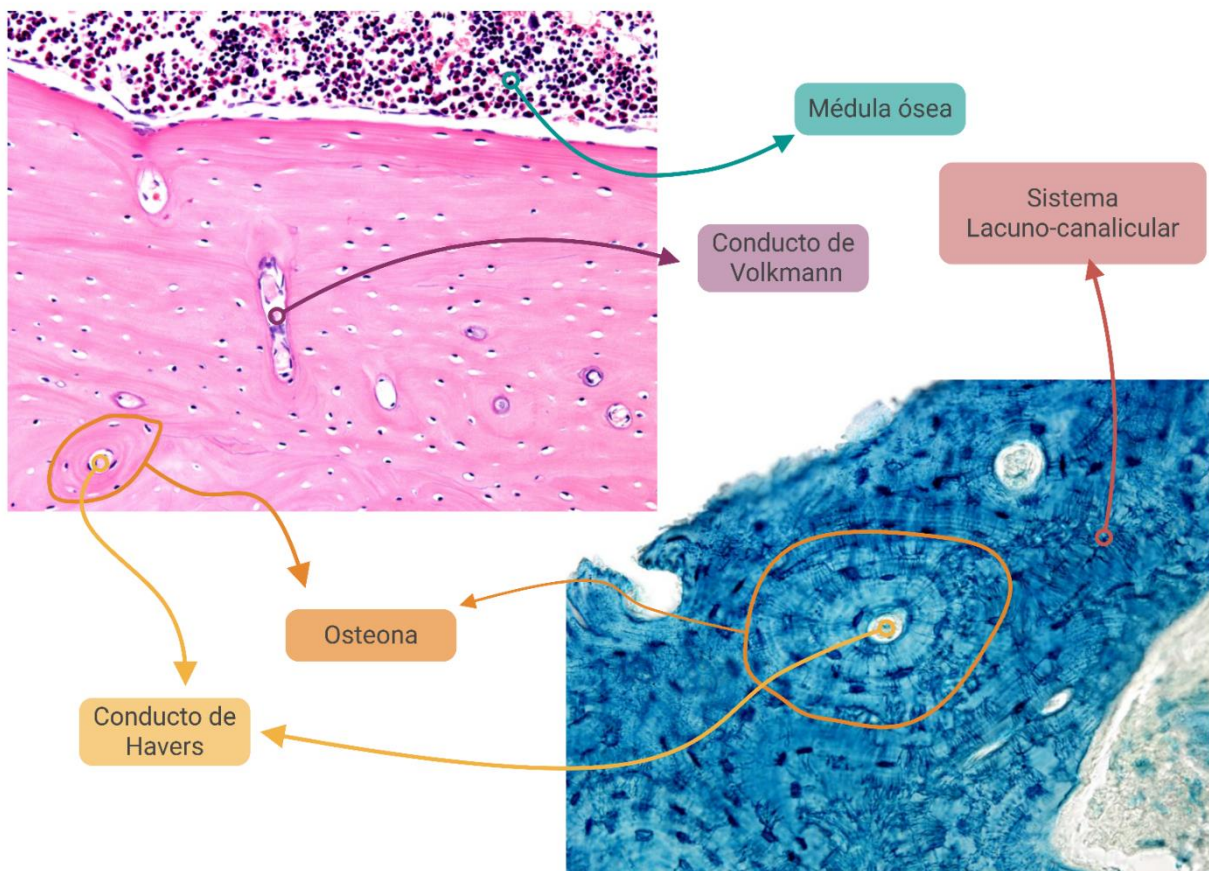


Figura 1. Organización histológica del tejido óseo compacto. Parte superior) Hematoxilina-eosina 20x. Parte inferior) Schmorl 20x. Imágenes cedidas por el atlas de histología de la Facultad de Medicina, UCM.

Los canaliculos que alojan las evaginaciones de los osteocitos se disponen de forma radial en relación con el conducto osteonal, permitiendo crear un **sistema lacuno-canalicular** que permite el intercambio de sustancias entre osteocitos y los vasos sanguíneos. Para conferir mayor resistencia al estrés mecánico, el eje longitudinal de la osteona suele ser paralelo al eje longitudinal del hueso (Bartl, 2013). Además, para aportar mayor resistencia al tejido, las fibras de colágeno que componen cada laminilla son paralelas entre sí, pero con diferente orientación a las laminillas contiguas (Currey *et al.*, 2007).

El tejido óseo compacto se encuentra localizado en las partes externas de los huesos. Forma aproximadamente el 80% del esqueleto de una persona adulta, aportando gran resistencia al estrés mecánico. El 20% restante es tejido óseo esponjoso, cuya organización microscópica es similar a la del compacto con la excepción de que se distribuye formando espículas o trabéculas (Parkinson & Fazzalari, 2013). Los espacios entre dichas trabéculas alojan a la médula ósea junto con tejido adiposo. Por tanto, aunque el hueso compacto presenta una rigidez mucho mayor, la actividad metabólica del hueso esponjoso es ocho veces superior a éste (Wawrzyniak & Balawender, 2022).

Formación de hueso: el proceso de osificación

El desarrollo inicial de un hueso se denomina osificación u osteogénesis. Existen dos tipos de osificación y su diferencia radica en si un modelo de cartílago sirve como precursor del hueso, como ocurre en los huesos largos como el fémur (**osificación endocondral**) o, como en el caso del cráneo o clavícula, si el hueso ha sido formado sin la intervención de cartílago precursor (**osificación intramembranosa**). No obstante, estos dos tipos de osificación solo atienden al mecanismo de formación inicial del hueso ya que, tras el proceso de remodelado óseo que se produce con posterioridad, el tejido será reemplazado en un corto espacio de tiempo. Este tejido óseo de reemplazo crece por aposición sobre el existente y es idéntico en ambos casos (Pawlina & Ross, 2024).

Osificación endocondral

La osificación endocondral comienza con la presencia de un modelo cartilaginoso del futuro hueso, formado gracias a la acumulación y diferenciación de células mesenquimales a condroblastos (células pertenecientes al tejido cartilaginoso) (Figura 2). Cuando el modelo tiene un tamaño suficiente, en el tejido que rodea el cartílago, denominado pericondrio, en lugar de diferenciarse condrocitos comienzan a formarse osteoblastos. Así, tras este cambio en el fenotipo de diferenciación, se forma una delgada capa de tejido óseo alrededor del modelo cartilaginoso que, en el desarrollo de

huesos largos, se denomina collar óseo (Pawlina & Ross, 2024). Con el establecimiento del collar óseo, los condrocitos presentes en la región media del molde cartilaginoso se hipertrofian, aumentando de tamaño y produciendo colágeno de tipo X y fibronectina, lo que altera la composición de la matriz circundante y permite su calcificación. Comienza así a establecerse así un centro de osificación en la zona media de la diáfisis, donde se produce una calcificación de las áreas de matriz circundante, impidiendo la difusión de nutrientes y, por lo tanto, causando la muerte de los condrocitos del modelo cartilaginoso. Esto provoca la aparición de grandes lagunas en el interior del cartílago, generando una cavidad que, posteriormente, será invadida por vasos sanguíneos. Las células mesenquimales residentes en el periostio en desarrollo migran junto con los vasos invasores y se diferencian en células osteoprogenitoras. De igual forma, la médula ósea se desarrolla gracias a la migración de células madre hematopoyéticas a través del nuevo sistema vascular (Bartl, 2013; Nahian & Davis, 2025; Tzelepi et al., 2009). Cuando las células osteoprogenitoras se adhieren a las espículas de cartílago calcificado, se diferencian en osteoblastos que producirán la matriz de colágeno y sustancia fundamental denominada osteoide que será, posteriormente, calcificada.

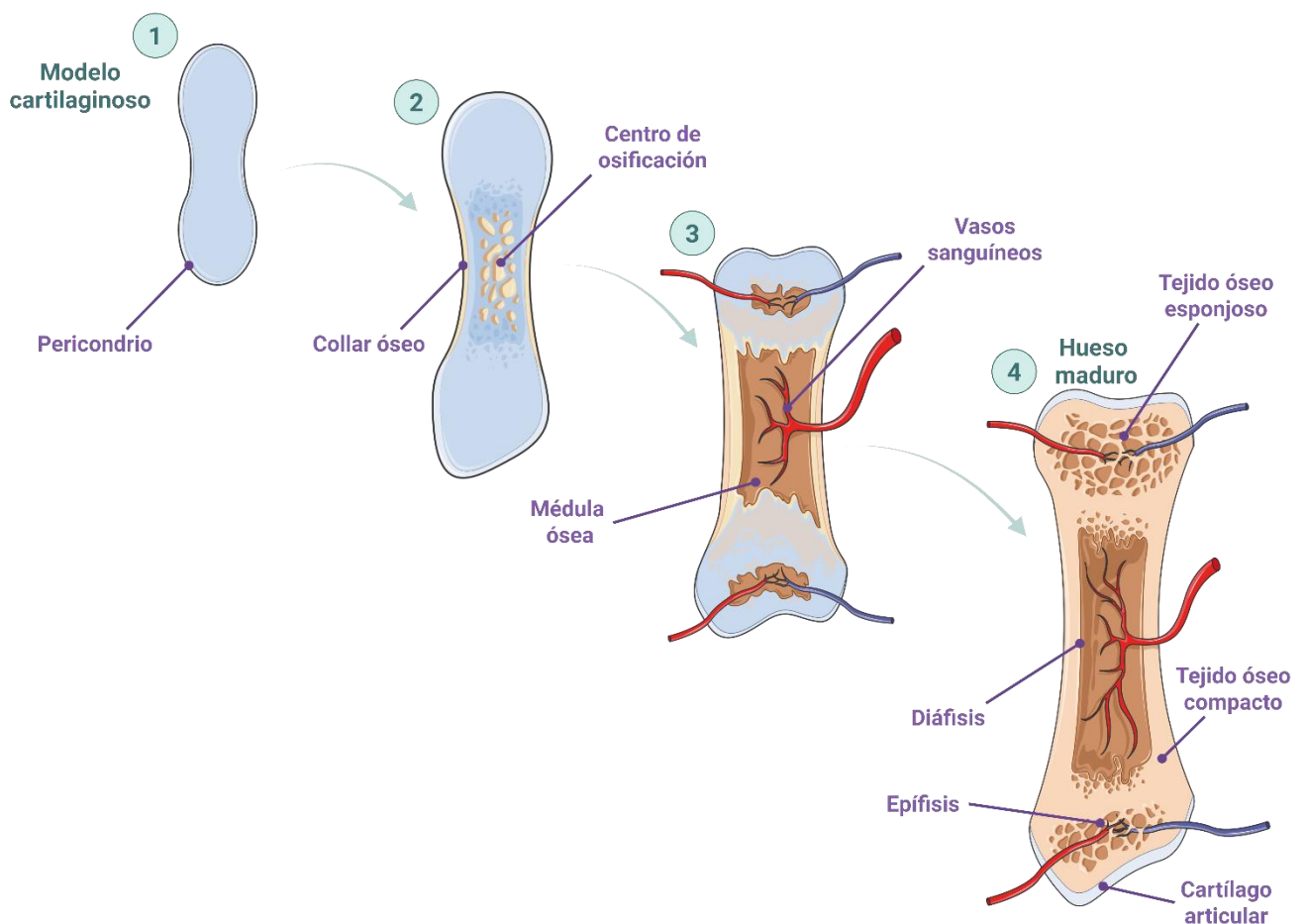


Figura 2. Esquema de las principales fases de la osificación endocondral

Osificación intramembranosa

La primera evidencia de la osificación intramembranosa se observa en la octava semana de gestación en el mesénquima o tejido conjuntivo embrionario. Algunas células de este tejido migran y se acumulan en áreas específicas donde forman los centros de osificación. Estas células se diferencian en primer lugar en células osteoprogenitoras y posteriormente en osteoblastos que producirán espículas óseas pequeñas de forma irregular. Algunas de las células osteoprogenitoras se adhieren a estas espículas, favoreciendo la generación de osteoblastos que producen más matriz, dando lugar a un tejido óseo plexiforme (Bartl, 2013; Clarke, 2008; Pawlina & Ross, 2024; Tzelepi *et al.*, 2009).

Tipos celulares del tejido óseo

Existen cinco tipos celulares principales en el tejido óseo: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y osteoclastos (Figura 3). Cabe señalar, sin embargo, que a excepción de los osteoclastos, dichos tipos celulares se consideran formas diferenciadas desde el mismo tipo de célula básica: las células madre mesenquimales (MSCs). Cada tipo celular derivado de las MSCs experimenta una transformación en relación con su actividad funcional (Pawlina & Ross, 2024).

Los **osteoclastos** son grandes células multinucleadas presentes en las zonas de resorción ósea. Éstos derivan de la fusión de células mononucleares hematopoyéticas que dan origen a los linajes de granulocitos y monocitos (Ono & Nakashima, 2018). En el tejido, además de por su gran tamaño y por su carácter multinuclear, los osteoclastos pueden ser fácilmente identificados, ya que se encuentran localizados sobre una zona denominada laguna de resorción (o de Howship). Una vez diferenciado, el osteoclasto debe sufrir una activación para tener la capacidad de realizar la resorción ósea. En las etapas activas de destrucción de la matriz extracelular, se distinguen tres regiones claramente diferenciadas (Stenbeck, 2002; Takito *et al.*, 2018):

- **Borde festoneado:** es la porción celular en contacto con la matriz ósea. Contiene abundantes pliegues de la membrana plasmática que forman estructuras similares a microvellosidades para incrementar la superficie celular que libera enzimas hidrolíticas.
- **Zona clara:** también denominada zona de sellado. Está formada por un perímetro de citoplasma junto al borde festoneado que delimita la laguna de resorción. Contiene abundantes filamentos de actina dispuestos en una estructura en forma de anillo que sirve como anclaje de numerosas proteínas de adhesión a la matriz extracelular, como la integrina $\alpha\beta3$, responsables de mantener el sellado hermético en la laguna de resorción.

- **Región basolateral:** participa en la exocitosis del material digerido en la laguna de resorción.

Entre las proteínas secretadas por los osteoclastos, debemos destacar todas las enzimas hidrolíticas que median el proceso de resorción ósea, como por ejemplo la catepsina K o las metaloproteinasas de matriz (MMPs), como la MMP-9 (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

Por otro lado, el proceso de formación de nuevo hueso resulta esencial en el mantenimiento de una función ósea normal. Esto requiere que una población de **células osteoprogenitoras** (precuroras de osteoblastos) sea sensible a los estímulos moleculares que inducen su diferenciación a células formadoras del tejido óseo (Nahian & Davis, 2025). Las células osteoprogenitoras derivan de MSCs, principalmente de la médula ósea, con el potencial de diferenciarse en distintos tipos celulares como fibroblastos, condrocitos, adipocitos u osteoblastos (Marie & Fromigue, 2006). Este tipo celular se encuentra en la superficie externa e interna de los huesos, así como en el sistema microvascular del propio tejido. Desde el punto de vista morfológico, las células osteoprogenitoras son aplanadas y con un núcleo ovoide (Nahian & Davis, 2025).

El **osteoblasto**, derivado de la diferenciación de las células osteoprogenitoras, es una célula secretora versátil que conserva la capacidad de la división celular (Huang *et al.*, 2007). Secreta tanto el colágeno de tipo I como las proteínas de la matriz ósea que constituyen la matriz no mineralizada u osteoide. Entre las proteínas secretadas por los osteoblastos se encuentran las proteínas fijadoras de calcio, como la osteocalcina o la osteonectina; glucoproteínas como las sialoproteínas óseas; varios proteoglicanos y la fosfatasa alcalina (ALP). Además de la síntesis del osteoide, el osteoblasto también es el responsable de la mineralización de la matriz ósea. Este proceso se inicia por la secreción de vesículas matriciales que acumulan iones de calcio y fosfato, formando estructuras cristalinas de fosfato de calcio amorfo (Blair *et al.*, 2017). Los osteoblastos son células con forma cuboidal y con una distribución monoestratificada en la superficie donde se está formando tejido óseo nuevo.

Una vez que el osteoblasto queda totalmente envuelto por la matriz ósea se denomina **osteocito**. No obstante, tan solo un 10%-20% de los osteoblastos presentes en el tejido óseo completan este proceso de diferenciación. Durante la evolución a osteocito, denominado como osteocitogénesis, el osteoblasto disminuye la expresión de marcadores relacionados con la actividad mineralizadora, como la ALP y la osteocalcina, reduce su volumen en un 70% y desarrolla largas evaginaciones celulares que se irradian de su cuerpo celular (Dallas *et al.*, 2019; Robling & Bonewald, 2020). Tras la mineralización de la matriz, cada osteocito ocupa un espacio que se adapta a la

forma del cuerpo celular y es denominado laguna (Bonewald, 2011; Robling & Bonewald, 2020). Además, los osteocitos extienden sus evaginaciones a través de canaliculos, estableciendo contacto con otros osteocitos cercanos mediante uniones de tipo gap (Dallas et al., 2019). No obstante, los osteocitos también se comunican con osteoblastos, células endoteliales y demás células del microambiente óseo a través de moléculas señalizadoras. La vida media de los osteocitos se estima en 10-20 años (Manolagas, 2000) y, de hecho, se plantea que cuando la vida de un individuo es superior a la vida útil de un osteocito, estas células mueren y sus lagunas y canaliculos asociados se llenan de tejido mineralizado.

En los lugares donde no se está produciendo remodelado óseo, las superficies óseas se encuentran revestidas por una capa de células aplanadas y con poco citoplasma, denominadas **células del revestimiento óseo**. Estas células representan una población celular derivada de los osteoblastos (Mizoguchi & Ono, 2021). Aunque han sido poco estudiadas, actualmente se han relacionado con procesos de mantenimiento y nutrición de los osteocitos, regulando el tránsito de calcio y fosfato en el hueso (Flores-Silva et al., 2015; Kular et al., 2012).

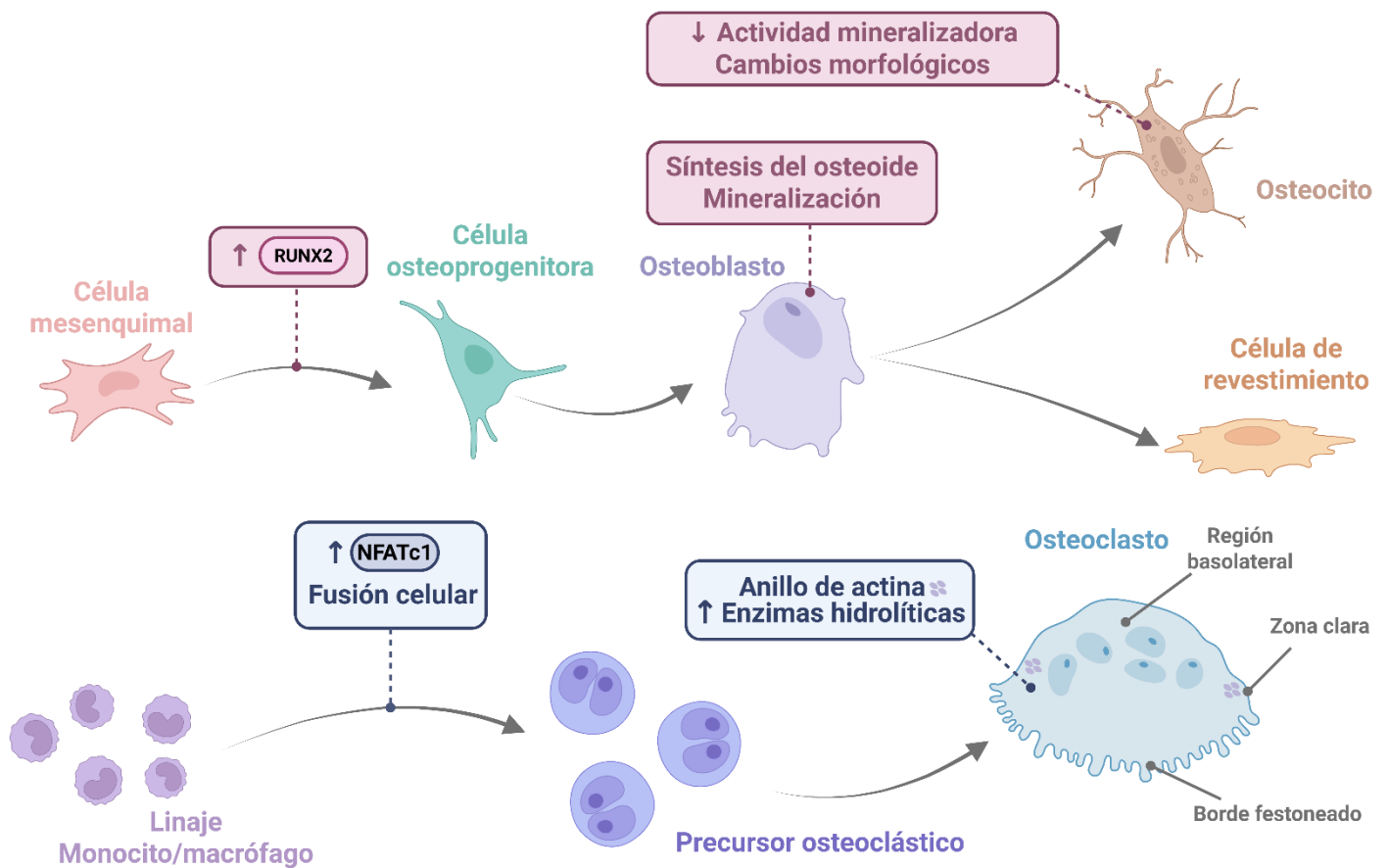


Figura 3. Principales tipos celulares presentes en el tejido óseo

Proceso de diferenciación de las células del tejido óseo

Osteoclastos

La primera evidencia científica del origen hematopoyético de los osteoclastos se remonta a los años 70 del siglo pasado. Mediante la utilización de modelos parabióticos, un procedimiento experimental en el cual dos animales comparten circulación sanguínea, se demostró que los osteoclastos presentes en la fractura de una rata irradiada provenían del torrente sanguíneo de su pareja no irradiada. Se pudo concluir, por tanto, que los osteoclastos presentan un origen hematopoyético y no tienen relación con el linaje osteoblástico (Gothlin & Ericsson, 1976; Walker, 1973).

Posteriormente, ya en los años 90, se obtienen las evidencias más directas del origen hematopoyético de los osteoclastos mediante estudios *in vitro* que describen la diferenciación de osteoclastos, proceso conocido como **osteoclastogénesis**, en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), a partir de células mononucleares de sangre periférica (Matsuzaki *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1998)

El proceso de diferenciación a osteoclasto comienza cuando las células madre hematopoyéticas dan lugar a progenitores mieloides comunes en respuesta a la estimulación de moléculas como el factor de células madre, la IL-3 y la IL-6. Más tarde, se promueve la diferenciación de estos progenitores mieloides comunes en progenitores de granulocitos/macrófagos (GMP), gracias al factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF).

La primera molécula clave en el proceso de diferenciación de osteoclastos es **M-CSF**, que es producido por una gran variedad de células, como células del músculo liso (Schrader *et al.*, 1991), fibroblastos (Fibbe *et al.*, 1988), linfocitos T (Takahashi *et al.*, 1988) y células del linaje osteoblástico (Zhao *et al.*, 2002). No obstante, se consideran como principales productoras de M-CSF en el microambiente óseo a las células mesenquimales presentes en la médula ósea (Suda *et al.*, 1999). Este factor es esencial para la diferenciación de los progenitores de granulocitos/macrófagos en células del linaje de monocito/macrófago y su supervivencia. El M-CSF ejerce sus efectos uniéndose y activando su receptor específico, c-Fms (Figura 4) (Sherr, 1990), estimulando las vías de señalización de ERK y PI3K/Akt que dan como resultado la proliferación y la supervivencia de los precursores de osteoclastos (Feng & Teitelbaum, 2013).

La segunda molécula central en la osteoclastogénesis es **RANKL**, una proteína homotrimérica de la superfamilia de los factores de TNF que puede ser expresada en la membrana celular o bien secretada (Anderson *et al.*, 1997). Los primeros estudios

realizados *in vitro* demostraron que RANKL, además de regular la diferenciación de osteoclastos, también tiene efectos en la supervivencia y activación de células del sistema inmune, como las células dendríticas (Josien *et al.*, 1999) y los linfocitos T (Bachmann *et al.*, 1999). RANKL es producido por numerosos tipos celulares como linfocitos B, linfocitos T (Anderson *et al.*, 1997) y sinoviocitos fibroblásticos (Wu *et al.*, 2005). El efecto de RANKL tiene lugar debido a la unión al receptor activador para el factor nuclear κ B (RANK), una proteína transmembrana homotrimérica de tipo I que actúa como receptor. Al igual que su ligando, su expresión no solo se limita a los precursores de osteoclastos, sino que se ha detectado en células tumorales de cáncer de mama y próstata, dos de los tumores con más potencial de metástasis en hueso (Chen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

Aunque la formación de osteoclastos inducida por RANKL es la principal vía de osteoclastogénesis, existen otras vías alternativas no canónicas, activadas por diferentes citocinas y factores de crecimiento. Estas se dividen en: las activadas por factores humorales de la superfamilia del TNF, como TNF- α , APRIL, BAFF y LIGHT, y aquellas no relacionadas con esta superfamilia, como TGF- β , interleucinas (IL-6, IL-11, IL-8), el factor de crecimiento nervioso y los IGF-I e IGF-II (Sabokbar *et al.*, 2016). Estas vías alternativas sugieren cierta redundancia en la señalización de los factores de crecimiento para la formación de osteoclastos. En general, los osteoclastos diferenciados por estas vías no canónicas son más pequeños, con menos núcleos y generan fosas de resorción ósea de menor profundidad en comparación con los osteoclastos inducidos por RANKL (Edwards *et al.*, 2006).

Durante el proceso de osteoclastogénesis, los osteoclastos experimentan diversos cambios, incluyendo modificaciones en su morfología, en los patrones de expresión génica y en sus procesos metabólicos. El desarrollo de los osteoclastos puede dividirse en tres fases principales: compromiso, maduración y resorción (Takegahara *et al.*, 2024).

La iniciación del **compromiso** con la línea osteoclástica a partir de precursores del linaje monocito/macrófago está impulsada principalmente por la señalización iniciada por la unión del ligando RANKL a su receptor, induciendo la trimerización y activación de RANK. Esto permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras, incluyendo el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) (Kobayashi *et al.*, 2001), a través de los sitios de unión intracelulares presentes en RANK, iniciando así la cascada de señalización intracelular. Finalmente, la vía converge en la activación de determinadas quinasas que, con su actividad, promueven la activación y translocación nuclear de dos factores de transcripción críticos: el factor nuclear kappa B (NF κ B) (Franzoso *et al.*, 1997) y la

proteína activadora 1 (AP-1) (Wagner, 2002). Ambos factores contribuyen a la inducción inicial del factor nuclear de células T activadas 1 (NFATc1) (Yamashita *et al.*, 2007).

En este sentido, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de **NFATc1** induce la formación de osteoclastos a partir de precursores tratados con M-CSF, sin necesidad de RANKL, indicando que NFATc1 actúa aguas abajo de NFκB y AP-1 (c-Fos/c-Jun) (Sherr *et al.*, 1985). Por ello, NFATc1 ha sido descrito como el regulador maestro de la osteoclastogénesis. NFATc1, activa la expresión de genes críticos para la activación de los osteoclastos, incluyendo los de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), catepsina K, la MMP-9, el receptor de calcitonina (CTR) y c-myc (Takayanagi *et al.*, 2002).

La vía de señalización RANKL-RANK coordina la expresión de los genes hasta ahora señalados, lo que permite que los osteoclastos comprometidos progresen hacia una fase de **maduración** caracterizada por la adhesión celular, la fusión, la motilidad y la formación del anillo de actina. Durante esta fase, los osteoclastos sufren un proceso denominado multinucleación, considerado clave en la diferenciación. En este sentido, el aumento transitorio de la proliferación inducido por RANKL conduce a una citocinesis incompleta regulada por la activación de Akt, lo que contribuye a la formación de células multinucleadas (Takegahara *et al.*, 2016). No obstante, es necesaria la participación de otras moléculas para que se complete la multinucleación, como las moléculas de adhesión celular, incluyendo las integrinas y las cadherinas (Fiorino & Harrison, 2016; McHugh *et al.*, 2000). Durante esta fase se producen reordenamientos del citoesqueleto para permitir que, finalmente, los osteoclastos comprometidos sufran una fusión célula-célula. Para ello, el factor NFATc1 regula la expresión varias moléculas implicadas en la fusión de osteoclastos, como son la proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) (Yagi *et al.*, 2005), la proteína transmembrana estimuladora de osteoclastos (OC-STAMP) (Miyamoto *et al.*, 2012) y la subunidad d2 de la v-ATPasa (Lee *et al.*, 2006).

En la fase de maduración, los osteoclastos se adhieren a la superficie ósea y la maquinaria resortiva se polariza hacia la interfase hueso-célula (Feng & Teitelbaum, 2013). La integrina $\alpha\beta3$ del osteoclasto reconoce la secuencia de ácido arginil-glicil-aspartico (GRD) presente en varias proteínas de la matriz ósea, como la osteopontina, la vitronectina y la sialoproteína ósea (Duong *et al.*, 2000). La unión de la integrina $\alpha\beta3$ a sus ligandos activa las GTPasas de la familia Rho y regula la organización del citoesqueleto. En la etapa final o de resorción, un osteoclasto maduro acaba creando estructuras adhesivas ricas en F-actina. Éstas forman una zona de sellado, denominada

anillo de actina, en las membranas ventrales en contacto con la superficie ósea. Este sellado está diseñado con el objetivo de liberar protones y proteasas a su interior para la desmineralización y degradación de la matriz ósea (Novack & Teitelbaum, 2008). Por ello, la señalización mediada por la integrina $\alpha\beta3$ se considera crítica para la formación de la zona de sellado y la resorción ósea (Zou et al., 2007).

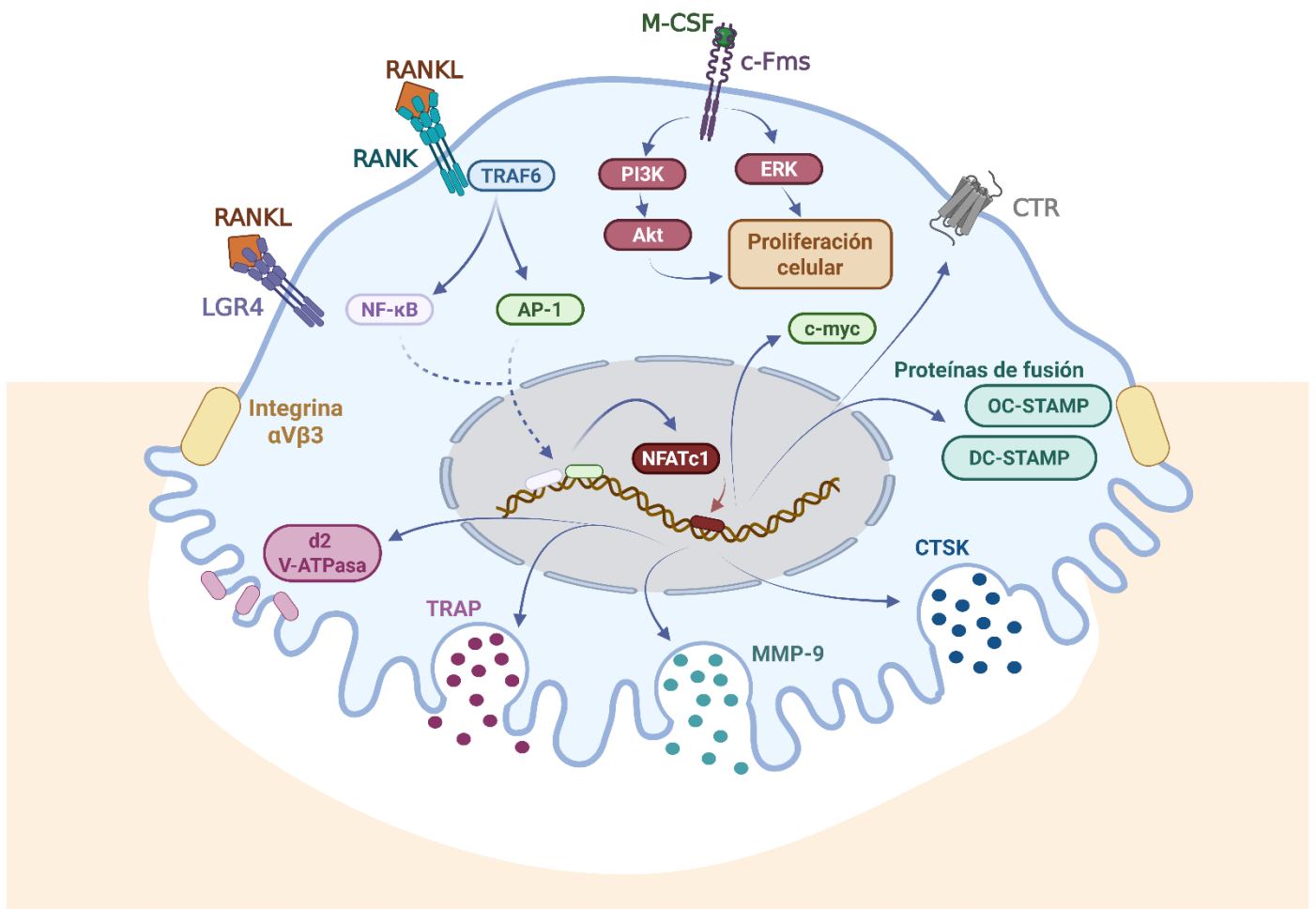


Figura 4. Señalización implicada en el proceso de osteoclastogénesis.

Osteoblastos

Las células del linaje osteoblástico incluyen a los progenitores mesenquimales, osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento óseo. El origen de los progenitores mesenquimales puede variar en función de la etapa vital siendo las principales fuentes las distintas poblaciones de células mesenquimales de medula ósea. Por ello, la denominación “células osteoprogenitoras” resulta controvertida (Sipp *et al.*, 2018).

El proceso de diferenciación del osteoblasto está regulado por numerosas cascadas de señalización (Figura 5). No obstante, al igual que ocurre en la osteoclastogénesis, existe un regulador maestro de la diferenciación a osteoblasto. Este es el factor de transcripción relacionado con Runt 2 (**Runx2**), ya que en última instancia promueve la expresión de genes específicos osteogénicos como la ALP o la osteocalcina (Bruderer *et al.*, 2014).

La vía de **señalización de Wnt** es ampliamente reconocida como el mecanismo más relevante en la diferenciación de osteoblastos. Esta familia de glicoproteínas solubles contiene numerosos factores proteicos que son ligandos, principalmente, de la familia de receptores frizzled (FZD). Las señales intracelulares que se activan en respuesta a estos ligandos se clasifican en dos grandes grupos: la vía canónica o clásica y la vía no canónica. En la señalización canónica, Wnt forma complejos con FZD y los correceptores LRP5 o LRP6 (proteína 5 o 6 asociada al receptor de lipoproteínas de baja densidad) (He *et al.*, 2004; Tamai *et al.*, 2000). Cuando tiene lugar la interacción ligando/receptor, un conjunto de proteínas inhibe la función de la GSK3 (quinasa 3 sintetasa de glucógeno), lo que resulta en una reducción de la fosforilación de β -catenina (Hay *et al.*, 2005). Como consecuencia, la estabilidad de β -catenina mejora y se acumula en el citoplasma, translocándose finalmente al núcleo, lo que conlleva una regulación al alza de Runx2. Por otra parte, la vía no canónica se activa a través de un mecanismo dependiente de PKC (proteína quinasa C), donde Wnt5a o Wnt7b se unen con FZD para activar proteínas G heterotriméricas y, posteriormente, aumentar el calcio intracelular para promover la función osteoblástica (Veeman *et al.*, 2003).

TGF- β y las BMPs, miembros de la superfamilia de TGF- β , también desempeñan roles cruciales en la diferenciación de los osteoblastos (Wu *et al.*, 2024). La señalización de estos factores depende, en gran medida, de las proteínas Smad. Existen tres tipos de proteínas Smad. El primero son las Smad reguladas por receptores (R-Smads), que pueden ser activadas por BMPs (Smad1/5/8) o por TGF- β (Smad2/3). Las segundas son las co-Smad, como Smad4, que pueden ser co-activadas por BMPs y TGF- β . Y, por último, las Smad inhibidoras, como Smad6 y Smad7, que pueden regular negativamente la señalización de BMPs y TGF- β . Las R-Smads y los co-Smads se combinan para formar un complejo que se desplaza al núcleo y controla la expresión de genes específicos de osteoblastos (Chen *et al.*, 2012). Aparte de las vías dependientes de Smad, las BMPs pueden regular la diferenciación de los osteoblastos a través de otros mecanismos de señalización. La BMP-2 estimula la expresión de ALP y osteocalcina activando la vía de señalización de MAPK. Además, BMP-2 también puede inducir la expresión de Osterix, un factor de transcripción que regula la expresión de genes osteoblásticos como osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea y la metilación del colágeno tipo I (Lai & Cheng, 2002).

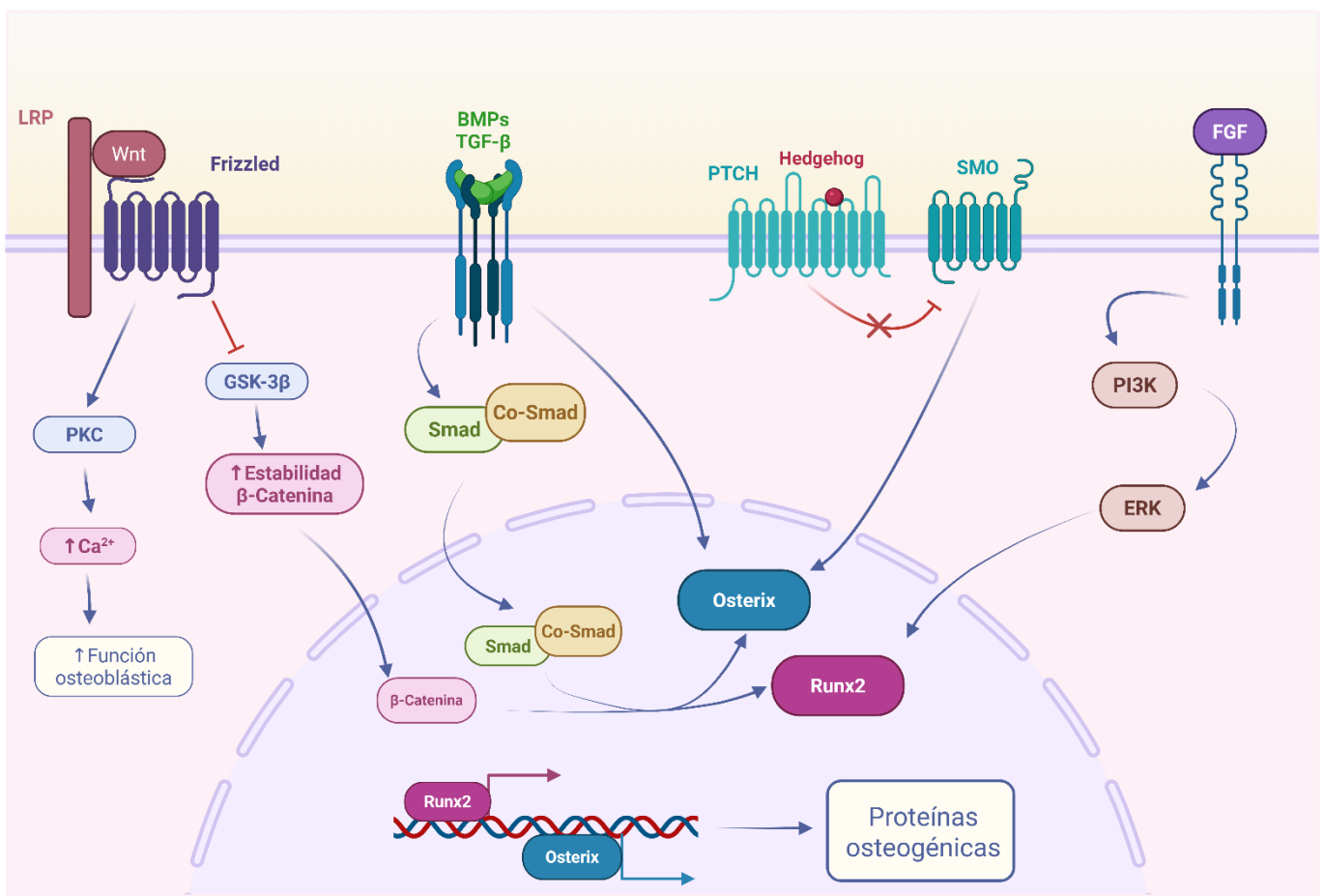


Figura 5. Principales vías de señalización relacionadas con la diferenciación osteoblástica.

La vía de **señalización Hedgehog** (Hh), activada en vertebrados por tres ligandos Hh homólogos, presenta un importante papel en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. La activación de esta vía de señalización, mediada por la unión de Hh a su receptor PTCH y la posterior activación de SMO, regula la activación del factor de transcripción Osterix, modulando así la expresión de genes específicos de los osteoblastos (Long *et al.*, 2004).

Por último, los **factores de crecimiento fibroblástico** (FGFs) también han sido posicionados como péptidos con funciones en el control de la osificación (Ornitz & Marie, 2002). Concretamente la unión a su receptor puede regular la diferenciación de los osteoblastos y la expresión génica específica del factor de transcripción Runx2 a través de vías como PI3K/AKT y ERK (Jeon *et al.*, 2012; Jeon *et al.*, 2013).

Osteocitos

Durante la diferenciación de osteoblastos a osteocitos existen numerosos cambios en la transcripción y traducción de moléculas que regulan la homeostasis ósea y el metabolismo del fosfato (Plotkin & Bellido, 2016). Aunque no se ha postulado ningún factor de transcripción como regulador central de la diferenciación de osteocitos, se han identificado diferentes genes responsables de los cambios en la morfología celular y la formación de la compleja red lacuno-canalicular en la que éstos se localizan. En este sentido, se ha descrito que la transición de osteoblasto a osteocito, conocida como osteocitogénesis, va acompañada de un aumento en la expresión de la proteína de matriz dentinaria 1 (DMP1) (Bellido *et al.*, 2014), que es esencial para su maduración (Feng *et al.*, 2006) además de un descenso en la expresión génica de *BGLAP*, codificante de la osteocalcina (Figura 6). Las MMPs también aumentan durante la diferenciación de osteoblasto a osteocito, lo que permite la formación y elongación de las proyecciones dendríticas (Zhao *et al.*, 2000). La conexina 43, por su parte, permite la comunicación entre osteocitos adyacentes a través de uniones tipo gap, así como entre osteocitos y las células de la médula ósea, preserva su viabilidad y media la transducción de señales mecánicas (Bivi *et al.*, 2011). Además, la expresión de Podoplanina/E11 es requerida por los osteocitos para iniciar una correcta formación de dendritas (Hughes *et al.*, 1994; Ohizumi *et al.*, 2000; Skupien *et al.*, 2014).

La diferenciación del osteocito también se caracteriza por el aumento en la expresión de proteínas que regulan el metabolismo del fosfato y la mineralización de la matriz (Bellido *et al.*, 2014). Uno de estos reguladores es factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), que se une a los receptores de FGF y al correceptor Klotho expresado en las células tubulares del riñón, actuando sobre el metabolismo del fosfato (Shimada *et al.*, 2001). Además, la expresión de FGF23 es a su vez modulada por otros factores

producidos por los osteocitos, incluyendo la endopeptidasa neutra reguladora del fosfato ligada al cromosoma X (PHEX), DMP1 y la fosfoproteína extracelular de la matriz (MEPE). En humanos, las mutaciones inactivadoras en el gen de PHEX conducen a la acumulación de FGF23 en la circulación, dando lugar a hipofosfatemia (Feng et al., 2013). También, los ratones *knockout* para PHEX muestran osteomalacia y un sistema lacuno-canalicular irregular (Yuan et al., 2008). De manera similar, las mutaciones y eliminaciones en DMP1 causan raquitismo hipofosfatémico recesivo autosómico, que está asociado con una alta producción de FGF23 (Farrow et al., 2009). Sin embargo, la eliminación genética de MEPE en modelos murinos aumenta la densidad mineral ósea (Gowen et al., 2003). De modo que, en general, la disfunción de cualquiera de los genes mencionados anteriormente en los osteocitos provoca alteraciones en el metabolismo del fosfato (Quarles, 2003).

Los osteocitos también son una **fente importante de RANKL**, concretamente en su forma unida a membrana, así como de **esclerostina (SOST)**, un antagonista soluble de la señalización Wnt y potente supresor de la formación ósea (Nakashima et al., 2011). De hecho, mutaciones en el gen de SOST dan lugar a esclerosteosis, una patología caracterizada por un crecimiento progresivo y excesivo de los huesos (Seménov et al., 2005). Cabe señalar que la esclerostina no se expresa en las etapas tempranas de diferenciación de la línea osteoblástica, sino que aumenta a medida que los osteocitos maduran, alcanzando niveles máximos cuando éstos quedan completamente rodeados por matriz ósea mineralizada (Dallas & Bonewald, 2010).

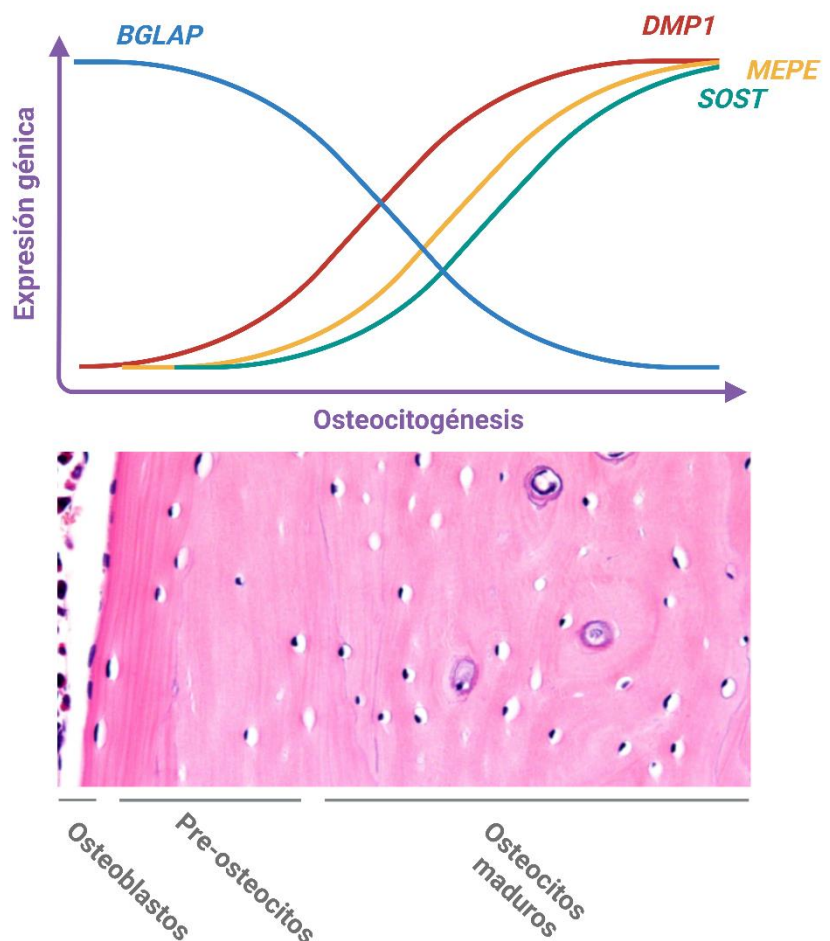


Figura 6. Modulación de los marcadores genéticos durante la osteocitogénesis.

El mapeo reciente del transcriptoma de osteocitos murinos ha revelado numerosos genes que controlan la compleja red que forman estas células. La firma osteocítica comprende más de 1.000 genes diferencialmente expresados en los osteocitos. No obstante, la función en el metabolismo óseo de aproximadamente el 80% de estos genes es actualmente desconocida. Sin embargo, más de 26 genes dentro de esta firma transcriptómica fueron identificados como reguladores críticos de la estructura y función ósea. Además, los genes homólogos humanos de algunos de ellos se relacionan con displasias esqueléticas monogénicas y están asociados con enfermedades poligénicas como la osteoporosis y la artrosis (Youlten *et al.*, 2021). Estos nuevos hallazgos desvelan la identidad genética de la red de osteocitos y destacan el papel crítico de estas células en las patologías óseas. Es muy interesante el hecho de que muchos de estos genes han sido identificados como contribuyentes a la formación de redes neuronales, lo que sugiere que sean relevantes para la generación y el mantenimiento de la red de osteocitos (Youlten *et al.*, 2021).

Sistemas de regulación intercelular en el tejido óseo

Sistema RANK/RANKL/OPG

Las células del linaje osteoblástico, además de sintetizar los componentes orgánicos de la matriz ósea, regulan la osteoclastogénesis mediante la síntesis de diversos factores con acciones paracrinas. Entre ellos destacan el **RANKL y la osteoprotegerina (OPG)**, dos proteínas de la familia TNF cuyo equilibrio determina la diferenciación y activación de los osteoclastos.

La señalización activada por RANKL, tanto soluble como de membrana, estimula la diferenciación y fusión de los osteoclastos, favorece su adhesión al hueso y activa los osteoclastos ya existentes, al tiempo que inhibe su apoptosis (Kobayashi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Para contrarrestar esta señalización y actuar como sistema de regulación de la homeostasis ósea, las MSCs y células del linaje osteoblástico producen OPG. Esta proteína actúa como un receptor señuelo soluble con capacidad de unirse a RANKL e impedir su interacción con RANK (Lacey *et al.*, 1998; Simonet *et al.*, 1997). De este modo, inhibe la diferenciación y activación osteoclástica, favoreciendo la apoptosis de los osteoclastos. La expresión de OPG está regulada por múltiples factores. En este sentido se ha descrito un incremento en sus niveles en respuesta a la estimulación por diferentes citocinas (TNF- α , IL-1, IL-18, TGF- β), BMPs y hormonas esteroideas, mientras que los glucocorticoides, la hormona paratiroidea (PTH) y la prostaglandina E2 inducen una reducción en su expresión (Carrillo-Lopez *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, se ha considerado que RANK era el único receptor del RANKL. Sin embargo, recientemente se ha identificado un segundo receptor en la membrana de los osteoclastos: el LGR4 (*leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 4*). Su activación produce una señalización que compite con RANK, ya que inhibe la expresión de NFATc1 (De Leon-Oliva *et al.*, 2023). Además, estudios recientes han demostrado que el LGR4 participa en el desarrollo de múltiples órganos y en la modulación de alteraciones inmunológicas, metabólicas y cancerígenas (Yang *et al.*, 2021).

Comunicación Osteoclasto-Osteoblasto

El proceso de resorción ósea mediado por los osteoclastos produce la liberación de factores que afectan al proceso de diferenciación de las células del linaje osteoblástico. Estos factores han sido denominados como “**clastoquinas**” y, en la actualidad, están siendo ampliamente investigados debido a su papel clave en la homeostasis ósea (Daponte *et al.*, 2024). En primer lugar, se ha descrito, entre dichas moléculas, el TFG- β , un factor que se encuentra unido en su forma inactiva a los cristales de hidroxiapatita (Rifkin, 2005). Durante el proceso de resorción ósea, este mediador se libera al microambiente óseo, favoreciendo el reclutamiento de MSCs y su diferenciación a osteoblasto en los sitios donde está teniendo lugar el remodelado óseo (Tang *et al.*, 2009). De igual forma, el factor IGF-1 se encuentra integrado en la matriz ósea y también se libera al microambiente durante el proceso de resorción (Crane & Cao, 2014), aumentando la actividad catabólica del osteoblasto (Nagata *et al.*, 2021).

Además, experimentos realizados tanto en modelos animales como en pacientes con osteopetrosis, han aportado información fundamental sobre cómo se coordina la remodelación ósea (Del Fattore *et al.*, 2006). En esta patología, el número de osteoclastos es comparable al de individuos sanos; sin embargo, estas células presentan mutaciones que comprometen directamente su actividad resortiva, impidiendo la degradación del tejido óseo y provocando una acumulación anómala de matriz mineralizada. También se postuló que los osteoclastos también liberan factores reguladores que contribuyen a mantener el equilibrio en la proliferación y la actividad de los osteoblastos. Uno de estos factores es la esfingosina 1-fosfato (SP1), que cuando es liberada al microambiente produce el aumento de la producción de RANKL por parte de los osteoblastos, favoreciendo la osteoclastogénesis (Ryu *et al.*, 2006). No obstante, la señalización producida por SP1 también incrementa la diferenciación de osteoblastos, promoviendo la señalización mediada por BMP-2 y favoreciendo la traslocación al núcleo de β -catenina (Matsuzaki *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2012).

Las **BMPs** constituyen otro ejemplo de “clastoquinas”. Concretamente, los osteoclastos son productores de BMP-2, BMP4, BMP6 y BMP7 (Garimella *et al.*, 2008),

proteínas posicionadas como potentes moduladoras de la diferenciación y función de osteoblastos, utilizándose actualmente en el tratamiento de procesos patológicos como fracturas (Simmonds *et al.*, 2013). Además, las BMPs regulan la osteoclastogénesis tanto de forma directa (Lademann *et al.*, 2020) como indirecta, a través de la ratio RANKL/OPG (Kanatani *et al.*, 1995). Por último, se ha descrito la liberación de Wnt5a y Wnt10b por el osteoclasto, favoreciendo la diferenciación de osteoblastos a través de la vía Wnt/ β -catenina (Daponte *et al.*, 2024).

No obstante, la comunicación en el microambiente óseo no solo se reduce a la actividad de factores solubles, sino que también existen **factores anclados a la membrana** del osteoclasto que regulan la homeostasis ósea. Uno de éstos es la semaforina 4D, que se une a su receptor en los osteoblastos para inhibir la formación de hueso (Negishi-Koga *et al.*, 2011). Por otra parte, Zhao *et al.* demostraron en 2006 que los osteoclastos expresan ephrina B1 y ephrina B2, mientras que los osteoblastos además de expresar ambas isoformas de la ephrina B, también presentaban receptores Eph B, en particular Eph B4 y Eph B3 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2024; Zhao *et al.*, 2006). De este modo, se ha descrito que las interacciones de ephrina B2 de los osteoclastos con la Eph B4 en los osteoblastos tienen efectos bidireccionales, inhibiendo la osteoclastogénesis y estimulando la diferenciación de los osteoblastos (Zhao *et al.*, 2006). En el linaje de los osteoblastos, estas interacciones regulan la apoptosis (Tonna *et al.*, 2014), mientras que en los osteocitos regulan la mineralización y la calidad ósea (Vrahnas *et al.*, 2019). Además, estudios recientes en modelos murinos *knockout* para el receptor Eph B3 han demostrado que este receptor actúa como un regulador negativo de la diferenciación osteogénica (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2024), apuntando a la diversidad de funciones aún no descritas de estas moléculas.

Recientemente, se ha evidenciado que las **vesículas extracelulares** (EVs) liberadas por los osteoclastos contienen RANK en su membrana. De modo que éstas pueden interactuar con el RANKL de la superficie celular de los osteoblastos, dando lugar a una nueva forma de comunicación entre ambos tipos celulares (Ikebuchi *et al.*, 2018). También se ha demostrado que las EVs derivadas de osteoclastos contienen miRNAs con acciones duales. Concretamente, aquellas que contienen el miR-214-3p inhiben la diferenciación de los osteoblastos (Li *et al.*, 2016), mientras que las portadoras del miR-324 potencian la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales primarias y la mineralización (Liang *et al.*, 2021).

Actividad reguladora de los osteocitos

Para abordar funcionalmente el impacto del RANKL expresado por los osteocitos *in vivo*, se generaron ratones en los que se deletionó el gen de RANKL de manera

específica en dichas células (O'Brien *et al.*, 2013). Aunque los ratones se desarrollaron con normalidad y sin cambios en su esqueleto al nacer, se observó un aumento de la masa ósea cuando se analizaron a los 3 o 6 meses de edad. De modo que estos resultados evidenciaron que los osteocitos son una fuente esencial del RANKL que induce la osteoclastogénesis.

Los osteocitos están estrechamente conectados entre sí por uniones de tipo gap, formando así una red tridimensional implantada en la matriz ósea denominada **sistema lacuno-canalicular**. Actualmente existe un amplio campo de investigación que estudia el papel del osteocito en el proceso de transducción de los estímulos mecánicos recibidos por el hueso en señales bioquímicas (Tate *et al.*, 2008). Así, tras la mecanorrecepción y su conversión en una señal química, los osteocitos **orquestan la formación y la resorción ósea** actuando sobre la diferenciación y la función de osteoblastos y osteoclastos.

El mecanismo por el cual los osteocitos regulan la biología de los osteoblastos en condiciones fisiológicas es controvertido. Existen pruebas que indican que los osteocitos regulan negativamente la diferenciación de los osteoblastos y la formación ósea, y que la densidad de osteocitos correlaciona de manera negativa con la osteogénesis (Lazenby, 1990). Además, otros estudios han demostrado que la apoptosis de osteocitos (Bivi *et al.*, 2012) o la alteración de la red de osteocitos, obtenida mediante la sobreexpresión específica del oncogén *BCL2*, aumenta la formación ósea (Moriishi *et al.*, 2012). Por el contrario, otras investigaciones demuestran que la ablación *in vivo* de osteocitos reduce gravemente la formación ósea (Tatsumi *et al.*, 2007). Aunque es necesario seguir avanzando en la investigación para dilucidar completamente las interacciones reguladoras entre osteocitos y osteoblastos, los estudios acerca de los mecanismos activados en los osteocitos por el estrés mecánico que terminan regulando a osteoblastos se focalizan en la esclerostina. Como se ha señalado anteriormente, se trata de una glicoproteína secretada por los osteocitos que inhibe la diferenciación y la función de los osteoblastos, antagonizando la vía canónica Wnt (van Bezooijen *et al.*, 2004). En este sentido, aunque los mecanismos específicos que regulan la expresión génica de RANKL en los osteocitos siguen sin detallarse, se ha descrito que la esclerostina contribuye de forma significativa a la regulación del RANKL osteocítico. Concretamente en pre-osteocitos humanos y en la línea celular murina de osteocitos MLO-Y4, la esclerostina aumenta de manera dosis-dependiente la expresión de RANKL, lo que provoca un incremento en la ratio RANKL/OPG (Wijenayaka *et al.*, 2011). Por ello, el RANKL y la esclerostina derivados de los osteocitos contribuyen a la homeostasis ósea, regulando tanto la osteoclastogénesis como la diferenciación y actividad de los osteoblastos (Bellido, 2014; Delgado-Calle *et al.*, 2017).

Por otro lado, también se han descrito funciones reguladoras de los osteocitos sobre los osteoclastos. Así, se ha demostrado que la apoptosis de los osteocitos es un acontecimiento regulador de la osteoclastogénesis. Se produce en condiciones específicas, sobre todo después de la menopausia o en condiciones patológicas como las microfracturas, y va estrechamente unida a un aumento de la resorción ósea (Komori, 2013). Dada la alta densidad de osteocitos, tanto en el hueso cortical como en el esponjoso, es concebible que los microdaños dentro de la matriz ósea alteren los canalículos de los osteocitos, provocando su apoptosis (Ejiri & Ozawa, 1982). Además, esta hipótesis ha sido validada formalmente por varios investigadores. Franssen y colaboradores describieron como un procedimiento ortopédico que provoca fisuras óseas daba lugar a la desaparición de los osteocitos de sus lagunas óseas (Franssen et al., 2008). Dichos autores evidenciaron, además, que el microdaño inducido experimentalmente originó un estallido transitorio de apoptosis de los osteocitos, al que siguió, varios días después, la diferenciación co-localizada de osteoclastos (Noble et al., 2003). En este sentido, cabe señalar que los osteocitos apoptóticos expresan niveles más altos de factores estimulantes de la osteoclastogénesis, como RANKL, TNF- α , IL-6 e IL-11 (Al-Dujaili et al., 2011; Kogianni et al., 2008; Shandala et al., 2012) en comparación con los osteocitos normales.

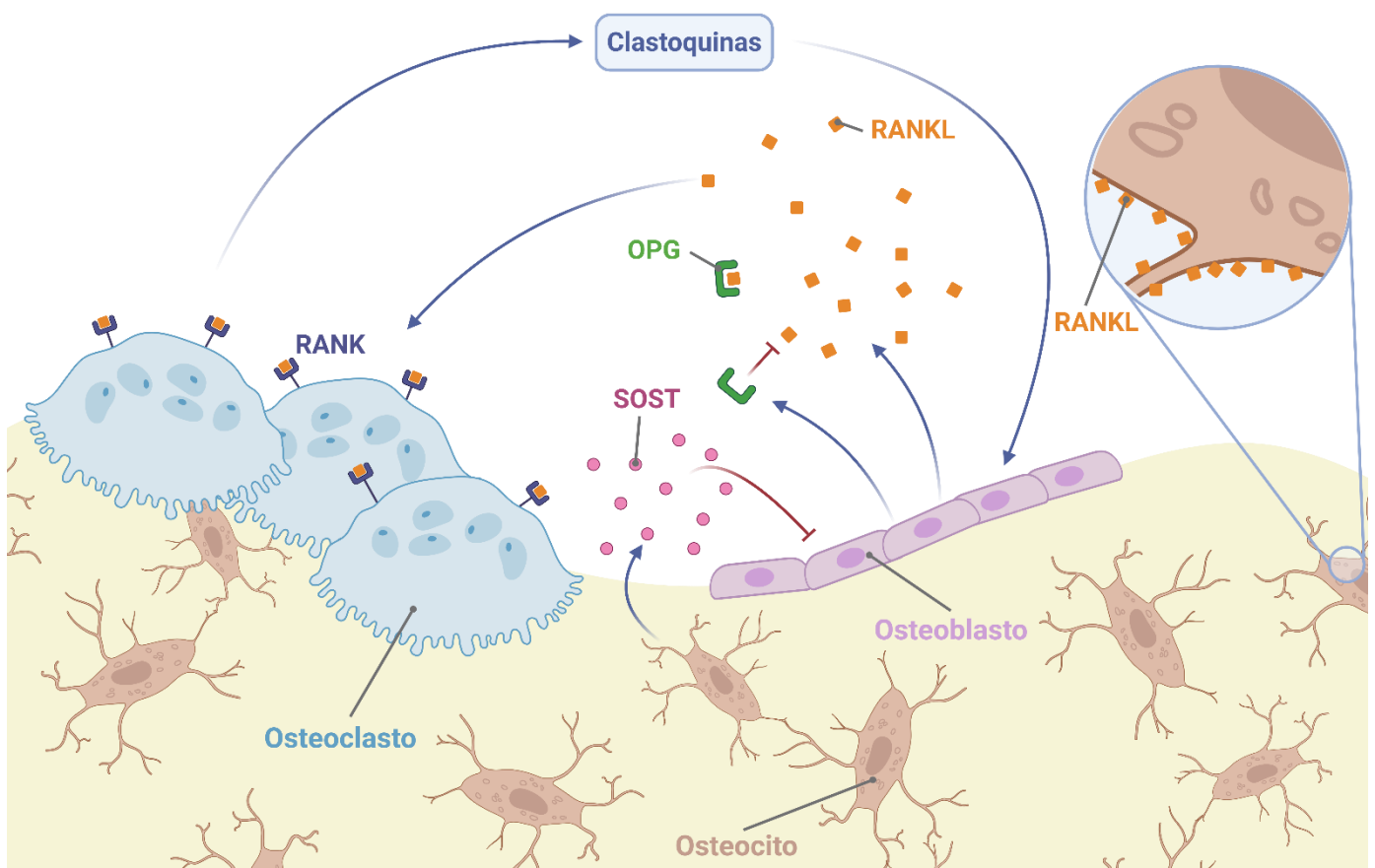


Figura 7. Principales sistemas para la regulación intercelular en el tejido óseo

Remodelado óseo

Mecanismos celulares y moleculares de la resorción ósea

Un osteoclasto activo es una célula altamente polarizada con una organización citoesquelética distintiva que crea la zona de sellado o **anillo de actina**, un lugar de aposición de la membrana a la superficie ósea. La zona de sellado delimita un dominio de membrana funcional único, el borde festoneado. La resorción ósea tiene lugar en la superficie en contacto con dicho borde, creando una laguna o fosa de resorción. Los osteoclastos se adhieren al hueso mediante integrinas $\alpha\beta3$, que se organizan en podosomas y, con el reclutamiento de vinculina y α -actinina forman la superestructura del anillo de actina, especializada en la adhesión. Esto constituye la zona de sellado, que aísla un espacio central en el que se liberan y permanecen concentrados los ácidos y las proteasas necesarios para el proceso de resorción (Feng & Teitelbaum, 2013).

Más allá de la adhesión física a la superficie ósea, la unión de las **integrinas $\alpha\beta3$** con los epítomos RGD del colágeno activa vías de señalización esenciales en el remodelado del citoesqueleto. De hecho, muchos modelos murinos con deleciones de estos y otros reguladores del citoesqueleto muestran un fenotipo osteopetrótico (Teitelbaum, 2011), indicando la importancia de la adhesión celular en la actividad resortiva del osteoclasto.

La membrana plegada dentro de la zona de sellado se genera por la fusión de vesículas intracelulares con la membrana plasmática local, dando lugar a una superficie muy extensa. Algunas de estas vesículas portan proteínas transmembrana como el canal de cloruro y la ATPasa vacuolar, ambas críticas para reducir el pH en la laguna de resorción (Minoshima *et al.*, 2019). Para secretar HCl y acidificar la laguna de resorción, la célula debe generar iones a través de la acción de la anhidrasa carbónica 2 en el citoplasma y mantener la electroneutralidad con el intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, situado en la membrana basolateral (Ribet *et al.*, 2021).

Tras disolver los cristales de hidroxapatita gracias al microambiente ácido, los osteoclastos también degradan la parte orgánica de la matriz ósea. La más importante de este conjunto de enzimas que realizan su función a pH bajo es la **catepsina K**, responsable de la degradación de las fibras de colágeno. Es de resaltar que, mutaciones homocigóticas en el gen que la codifica, *CTSK*, causan picnodisostosis, un trastorno de masa ósea elevada con fracturas frecuentes, así como baja estatura, osteólisis de las falanges terminales y suturas craneales abiertas (Clarke & Hollak, 2015). De hecho, la secreción de catepsina K es independiente de la formación del borde festoneado y de la secreción ácida (Cremasco *et al.*, 2012). Los osteoclastos también liberan TRAP,

enzima que ha sido descrita como un marcador génico e histológico de la actividad del osteoclasto.

Además de la catepsina K, los osteoclastos liberan una variedad de **MMPs** que degradan el colágeno y una amplia serie de otras proteínas residentes en la matriz, favoreciendo la liberación de los factores de crecimiento anclados al hueso (Hardy & Fernandez-Patron, 2020). De hecho, ratones *knockout* para MMP-9 y MMP-2 presentan alteraciones significativas en la composición, arquitectura y biomecánica ósea (Nyman *et al.*, 2011).

Aunque sólo los osteoclastos son capaces de eliminar tanto los componentes mineralizados como los no mineralizados del hueso de forma coordinada, otras células del microentorno, incluidas las células de revestimiento óseo y los macrófagos residentes (osteomacs), pueden producir MMPs que degraden el colágeno las superficies óseas, permitiendo así la formación de zonas de sellado y acelerando la resorción osteoclástica (Batoon *et al.*, 2021).

Por último, la eliminación de los productos resultado de la resorción ósea tiene lugar mediante un proceso vesicular denominado transcitosis (Salo *et al.*, 1997). Éste incluye varias etapas: en primer lugar, los productos degradados son endocitados, luego transportados a lo largo de una vía vesicular de transcitosis hacia la membrana basolateral del osteoclasto y, finalmente, liberados al exterior celular.

Proceso de mineralización de la matriz ósea

El proceso de síntesis del osteoide y la posterior mineralización del mismo es llevado a cabo principalmente por los osteoblastos y osteocitos. Este proceso se ha dividido en dos grandes fases, denominadas mineralización primaria y secundaria.

En lo relativo a la **mineralización primaria**, el descubrimiento de vesículas en la matriz extracelular supuso un gran avance en el estudio del proceso de mineralización ósea (Ali *et al.*, 1970; Wuthier, 1975). Con anterioridad, una teoría basada en las propiedades fisicoquímicas de la matriz sustentaba que la ALP proporcionaría fosfatos a través de la hidrólisis de sustratos y, a continuación, ayudaría a la formación de los cristales de fosfato cálcico. No obstante, tras el descubrimiento de estas vesículas, una teoría basada en la regulación de los transportadores, enzimas de membrana y las proteínas extracelulares secretadas por los osteoblastos ha sido adoptada de forma generalizada (Hasegawa *et al.*, 2017).

En este sentido, la mineralización primaria se puede dividir, de nuevo, en dos fases: una basada en vesículas y otra en la mineralización de colágeno. Así, una vez elevados los niveles de calcio y fosfato en el microambiente gracias a la osteocalcina y otras

sialoproteínas presentes en el osteoide, los osteoblastos comienzan el proceso de mineralización liberando pequeñas vesículas hacia la matriz ósea. La membrana de estas vesículas contiene diferentes transportadores de membrana y enzimas, mientras que la luz proporciona el microambiente necesario para la formación de cristales de hidroxiapatita. Por otra parte, la ALP y la anexina A5 expresadas en la superficie de las vesículas se unen al colágeno de tipo I presente en el osteoide, produciendo así la fijación de la vesícula en la matriz a mineralizar (Pawlina & Ross, 2024). El incremento de Ca^{2+} y PO_4 en el interior de la vesícula provoca un aumento del punto isoeléctrico local, favoreciendo la formación de cristales de fosfato octacálcico. Este cristal comienza a crecer gracias a la alta concentración de iones de Ca^{2+} y PO_4 en el interior de la vesícula hasta formar cristales de hidroxiapatita. Los cristales, insolubles y con forma de aguja, se acumulan en el interior de la vesícula y posteriormente se liberarán gracias a la presencia de fosfolipasas, que generan poros en la membrana formando nódulos mineralizados de hidroxiapatita (Pawlina & Ross, 2024).

Para la mineralización de la matriz ósea es necesario la formación de nódulos mineralizados de hidroxiapatita en diferentes zonas. Estos cristales crecen rápidamente entre las fibras de colágeno y la sustancia fundamental del osteoide hasta que se unen a cristales adyacentes de otros nódulos de mineralización. De esta forma se produce una segunda fase denominada **mineralización de colágeno** donde una onda de cristalización recorre el osteoide hasta que queda completamente inmerso en una red de cristales de hidroxiapatita (Carvalho *et al.*, 2021).

Tras la mineralización primaria, se produce un incremento de la densidad mineral ósea en un proceso denominado **mineralización secundaria**, el cual es independiente de la formación ósea por parte de osteoblastos (Hasegawa *et al.*, 2011). Esto se logra gracias a los procesos fisicoquímicos de transporte de minerales llevado a cabo por la red de osteocitos (Nagai *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). En este sentido, los osteocitos gracias a su organización en el sistema lacuno-canalicular son capaces de detectar los cambios mecánicos y moleculares asociados a un refuerzo de la matriz ósea. De esta forma, transportan Ca^{2+} y PO_4 , además de sintetizar moléculas reguladoras del metabolismo óseo como MEPE o DMP1 (Oya *et al.*, 2017; Ubaidus *et al.*, 2009), pudiendo elevar la densidad mineral ósea de aquellas zonas donde es necesario.

Fisiología del remodelado óseo

La remodelación ósea es un proceso que tiene una duración de varias semanas y la llevan a cabo grupos de osteoclastos y osteoblastos. Ambos tipos celulares se encuentran dispuestos dentro de estructuras anatómicas temporales conocidas como **unidades multicelulares básicas** (BMU). Las BMU están rodeadas por una cubierta

celular que crea un compartimento de remodelación ósea, y están reguladas por la actividad osteocítica (Hauge et al., 2001). El fenotipo de la célula que forma parte de la cubierta sigue siendo objeto de debate. Las pruebas en humanos sugieren que se trata de una célula de revestimiento óseo (Pettit et al., 2008). Desde el punto de vista funcional, se ha propuesto que la estructura de la cubierta celular genera un microambiente para facilitar la resorción de los osteoclastos y la formación de osteoblastos, garantizando un cambio neto mínimo en el volumen óseo durante la remodelación ósea fisiológica (Andersen et al., 2009).

Una BMU activa está formada por un frente principal de osteoclastos resorptivos. Le continúan unas células de fenotipo poco claro, que cubren la superficie ósea recién expuesta y la preparan para la deposición de hueso de sustitución. Los osteoblastos están dispuestos en la parte distal de la BMU, secretan la matriz ósea no mineralizada conocida como osteoide, dirigen su formación y mineralización en hueso laminar maduro. Esta disposición espacial y temporal de los diferentes tipos celulares dentro de la BMU garantiza la coordinación de las distintas fases secuenciales de la remodelación ósea: activación, resorción, reversión, formación y finalización (Figura 8) (Raggatt & Partridge, 2010).

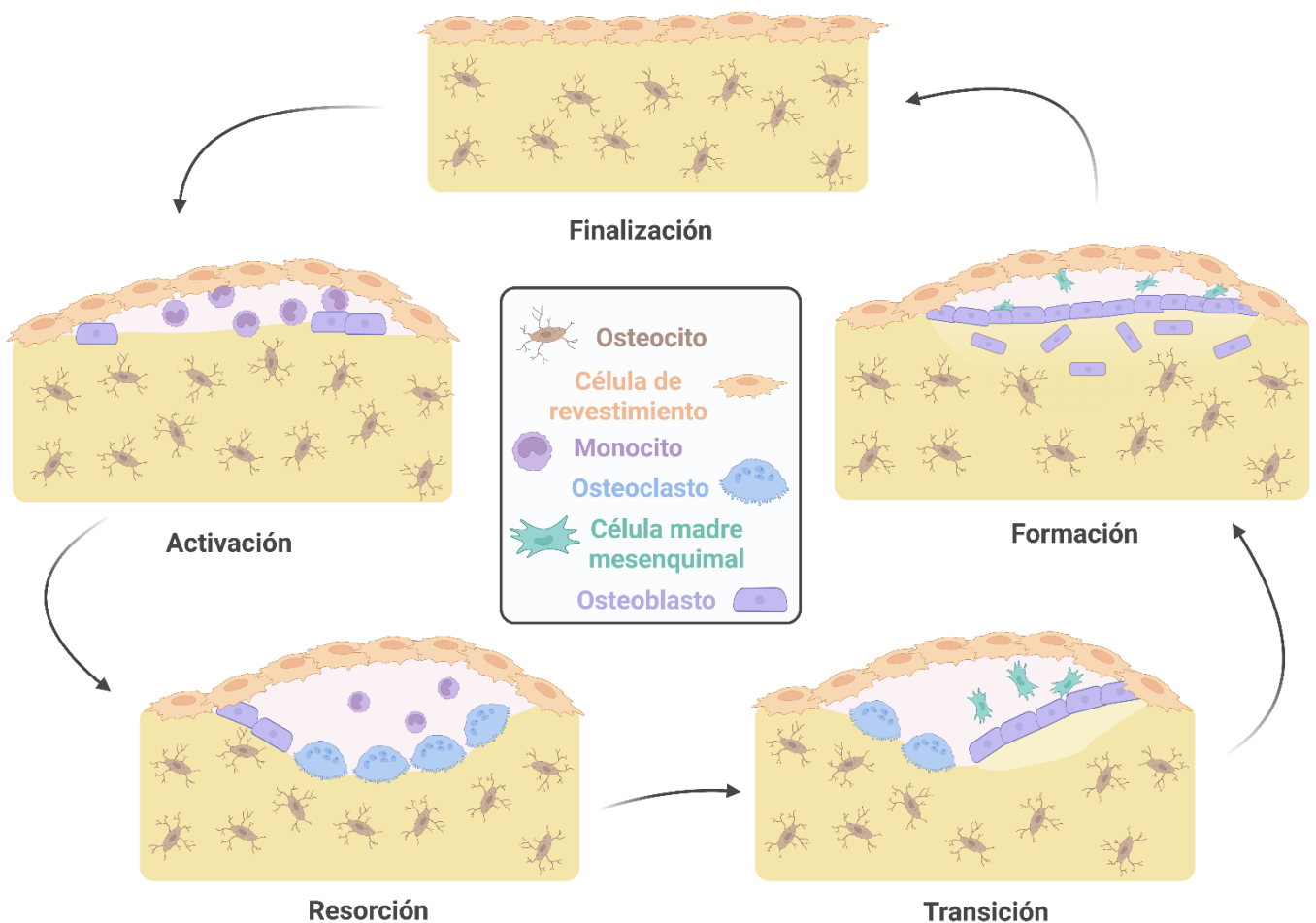


Figura 8. Fases del proceso de remodelado óseo

Activación

La primera fase de la remodelación ósea implica la detección de una señal de remodelación inicial. Esta señal puede ser, por ejemplo, una tensión mecánica directa sobre el hueso que provoque un daño estructural o una acción hormonal (por ejemplo, estrógenos o PTH) sobre las células óseas en respuesta a cambios en la homeostasis.

La actividad diaria somete al esqueleto a una tensión mecánica continua. Los osteocitos perciben los cambios en estas fuerzas físicas y los traducen en señales biológicas que inician la remodelación ósea (Bonewald, 2007). Los daños en la matriz ósea (Verborgt *et al.*, 2002) o la inmovilización de las extremidades provocan la apoptosis de los osteocitos y el aumento de la osteoclastogénesis (Aguirre *et al.*, 2006). En condiciones basales, los osteocitos secretan grandes cantidades de TGF- β , inhibiendo la osteoclastogénesis. La apoptosis focal de los osteocitos reduce los niveles locales de TGF- β y aumenta la producción de RANKL (Al-Dujaili *et al.*, 2011), eliminando las señales inhibitorias de la osteoclastogénesis y permitiendo el reclutamiento de monocitos para la formación de osteoclastos.

Resorción

Los osteoblastos responden a las señales generadas por los osteocitos o a las señales de activación endocrina y reclutan precursores de osteoclastos en el lugar de remodelación. Además del reclutamiento de precursores de osteoclastos, los osteoblastos expresan los factores centrales de la osteoclastogénesis, M-CSF y RANKL. La expresión de OPG se reduce, y la producción de M-CSF y RANKL aumenta para promover la formación y actividad de osteoclastos (Ma *et al.*, 2001).

Las MMPs también son secretadas por los osteoblastos en respuesta a señales de remodelación mecánicas y endocrinas (Partridge *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2004). Las MMPs degradan el osteoide no mineralizado que recubre la superficie ósea y exponen sitios en el hueso mineralizado que son necesarios para facilitar la adhesión de los osteoclastos. Los osteoclastos se anclan a estos sitios a través de la integrina $\alpha\beta3$ (McHugh *et al.*, 2000) secretando protones a la zona sellada, que producen la disolución de la matriz mineralizada en este espacio ácido, y generan finalmente las lagunas de resorción. A continuación, la matriz ósea orgánica restante es degradada por un conjunto de enzimas colagenolíticas con un pH óptimo bajo, destacando entre ellas la catepsina K (Saftig *et al.*, 1998).

Transición

Tras la resorción mediada por osteoclastos, las lagunas permanecen cubiertas de matriz colágena desmineralizada no digerida (Everts *et al.*, 2002). Células mononucleares, de un linaje aún indeterminado, eliminan estos restos de colágeno y preparan la superficie ósea para la posterior formación de hueso mediada por osteoblastos. No obstante, la función final de las células de transición podría ser recibir y producir señales de acoplamiento que permitan la transición de la resorción ósea a la formación ósea dentro de la BMU (Everts *et al.*, 2002; Pettit *et al.*, 2008).

Formación

La naturaleza de la señal de acoplamiento que coordina esta transición y dirige la formación ósea, precisamente a los lugares de resorción ósea, sigue siendo controvertida. Inicialmente, se propuso que la molécula o moléculas de acoplamiento se almacenaban en la matriz ósea y se liberaban durante la resorción ósea. Los factores IGF y TGF- β se liberan durante este proceso y parecen ser una señal clave para el reclutamiento de células madre mesenquimales en los lugares de degradación de la matriz ósea (Tang *et al.*, 2009). Sin embargo, en modelos murinos y pacientes con disfunción osteoclástica, la formación ósea mediada por osteoblastos se conserva incluso en ausencia de factores de crecimiento liberados desde la matriz. Como se ha mencionado en apartados anteriores, estas observaciones han llevado a plantear la hipótesis de que los osteoclastos producen factores de acoplamiento denominados “clastoquinas” (Daponte *et al.*, 2024). Se han propuesto varios posibles mecanismos de acoplamiento, como la proteína SP-1 y el complejo de señalización bidireccional del receptor EphB4 en osteoblastos y el ligando ephrina-B en osteoclastos (Pederson *et al.*, 2008). Estos complejos de comunicación directa ofrecen una oportunidad única para activar la formación ósea e inhibir la resorción simultáneamente en este punto de transición crítico. Sin embargo, las limitaciones anatómicas y temporales de la BMU hacen que el contacto celular directo entre osteoclastos y osteoblastos no siempre sea posible y, de hecho, el reclutamiento de osteoblastos y la deposición de matriz continúan mucho después de que los osteoclastos hayan abandonado el lugar de resorción. Por lo tanto, para lograr el acoplamiento pueden ser necesarios varios mecanismos, entre los que se incluyen tanto el contacto directo como las señales solubles.

En este sentido, la estimulación mecánica y la acción endocrina de la PTH pueden inducir señales de formación ósea a través de los osteocitos. En condiciones de reposo, los osteocitos expresan esclerostina (van Bezooijen *et al.*, 2004), que bloquea directamente la señalización Wnt. La tensión mecánica sobre el hueso y la señalización

producida por la PTH, inhiben la expresión de esclerostina en los osteocitos (Marino & Bellido, 2024), eliminando la inhibición de la señalización Wnt.

Finalización

Cuando se ha reemplazado una cantidad igual de hueso reabsorbido, el ciclo de remodelación concluye. En este proceso, el papel de los osteocitos como reguladores de la homeostasis ósea es fundamental. Tras la mineralización, los osteoblastos maduros sufren apoptosis, vuelven a su fenotipo de revestimiento óseo o se incrustan en la matriz mineralizada y se diferencian en osteocitos, aumentando la producción de esclerostina. Así, la pérdida de expresión de esclerostina que se produjo para iniciar la formación de hueso, probablemente se incrementa hacia el final del ciclo de remodelación. El entorno de la superficie ósea retorna a su estado de reposo y se mantiene hasta que se inicia la siguiente oleada de remodelación (Robling & Bonewald, 2020).

Regulación de la homeostasis ósea

Sistema endocrino

El sistema endocrino, mediante la secreción de hormonas, juega un papel fundamental en la regulación de múltiples procesos fisiológicos como el metabolismo energético, la reproducción, la cognición y el desarrollo. Concretamente, el sistema endocrino modula el metabolismo óseo a través de varias hormonas como la hormona del crecimiento (GH), andrógenos, estrógenos, la PTH, insulina o calcitonina.

La **GH** induce en células diana, como osteoblastos, la producción de IGF-1 (Ranke & Wit, 2018). Este factor estimula la diferenciación y proliferación de osteoblastos *in vitro* de forma directa, e indirectamente gracias a la acción estabilizadora de la señalización de Wnt/ β -catenina (Playford *et al.*, 2000). Además, esta hormona también regula la osteoclastogénesis, modulando la expresión de RANKL (Wang *et al.*, 2006) y OPG (Mrak *et al.*, 2007), al tiempo que aumenta la producción de citocinas, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que potencian la función osteoclástica (Ueland, 2005). Por otro lado, las principales hormonas sexuales, también ejercen efectos directos sobre los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos, ya que éstos expresan sus receptores específicos (Manolagas *et al.*, 2013; Richards *et al.*, 2018). Dichas hormonas contribuyen al mantenimiento de la masa ósea, principalmente disminuyendo la resorción ósea y la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, mientras que promueven la de osteoclastos (Manolagas *et al.*, 2013; Ru & Wang, 2020).

Otro ejemplo de gran interés en el metabolismo óseo es la **PTH**. Esta hormona desempeña un papel esencial en la homeostasis del calcio y el fosfato (Brown, 2013). Induce un aumento de los niveles de calcio en el organismo. No obstante, su actividad

sobre las células del microambiente óseo aún no se encuentra detallada, ya que existen investigaciones que demuestran su actividad estimuladora sobre la actividad osteoclástica, mientras que otras indican que puede inducir la formación de hueso (Wein & Kronenberg, 2018). Todos estos efectos están principalmente mediados por su receptor PTH1R que se expresa en osteoblastos, osteocitos y en MSCs de médula ósea (BM-MSCs) (Langub *et al.*, 2001; Marino & Bellido, 2024).

Sistema inmune (Osteoinmunología)

Actualmente, existe un gran campo de investigación que estudia las relaciones entre el sistema inmune y el sistema esquelético. El término “**osteoinmunología**” que denomina a este área de investigación proviene de un artículo publicado en *Nature* en el año 2000, donde por primera vez se describía una regulación de la actividad resorptiva de los osteoclastos por parte de los linfocitos T (Arron & Choi, 2000).

La exploración de la interacción entre el sistema inmune y óseo comienza con la comprensión de que el hueso proporciona un microentorno crítico para el desarrollo de las células madre hematopoyéticas, de las que derivan las células del sistema inmune, y que diversas citocinas inmunorreguladoras influyen en el destino de las células óseas. Los mecanismos por los que el hueso proporciona este microambiente ideal para el mantenimiento y la diferenciación de los progenitores del sistema inmune se han dilucidado a partir de estudios recientes que demuestran que los osteoblastos aportan factores clave para el desarrollo de dicho nicho. Además, cada vez son más las evidencias que indican que el hueso desempeña un papel en la inmunidad adaptativa, más allá del desarrollo de los linfocitos. Actualmente se conoce que las células T y B de memoria regresan a nichos especializados de la médula ósea. Por qué estas células permanecen en el hueso y de qué factores moleculares y ambientales dependen mientras lo hacen, son preguntas que podrán ser contestadas en el contexto de la osteoinmunología.

La primera observación de que las células inmunitarias podían influir en la actividad de los osteoclastos se produjo al descubrir que el sobrenadante de monocitos humanos de sangre periférica, estimulados con fitohemaglutinina, contenía factores que estimulaban la resorción ósea (Horton *et al.*, 1972). Esta actividad se denominó factor activador de osteoclastos. Cuando finalmente se purificó y secuenció, se descubrió que el principal estimulador de la resorción ósea era la **citocina IL-1** (Dewhirst *et al.*, 1985). Posteriormente, se ha identificado una larga lista de citocinas con efectos sobre el hueso. Entre los estimuladores de la resorción ósea se encuentran IL-1, TNF- α , IL-6, IL-11, IL-15 e IL-17. Por otro lado, los inhibidores de la resorción incluyen a IL-4, IL-10, IL-13, IL-18, GM-CSF e IFN- γ . Además, algunos factores como el TGF- β o las prostaglandinas

presentan efectos duales sobre la actividad y diferenciación de osteoclastos, dependiendo de las condiciones y el diseño experimental en el que han sido examinados (Martin *et al.*, 1998).

Por otro lado, numerosas citocinas regulan la diferenciación y actividad de las células del linaje osteoblástico. Concretamente, TNF- α inhibe la diferenciación de los osteoblastos (Gilbert *et al.*, 2000). Sin embargo, IL-1 e IFN- γ inhiben la síntesis de colágeno en los osteoblastos, afectando de forma negativa a su función mineralizadora (Smith *et al.*, 1987). Además, los ratones que sobreexpresan IL-4 presentan una disminución de la formación de hueso y de osteoblastos diferenciados en la superficie ósea (Lewis *et al.*, 1993). También se ha estudiado el papel de algunas citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α en la apoptosis de los osteoblastos, observándose que estimulan su muerte celular (Jilka *et al.*, 1998).

Por último, B7-H3 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Recientemente, se ha descubierto que esta proteína se expresa en los osteoblastos en desarrollo, y que su expresión aumenta durante la maduración celular. Además, los ratones deficientes en B7-H3 presentan una disminución de la densidad mineral ósea cortical en comparación con los ratones de control (Suh *et al.*, 2004).

Sistema nervioso

La idea de que el sistema nervioso podía mediar en el recambio óseo se inició con el descubrimiento del impacto que tiene la leptina (Zhang *et al.*, 1994) sobre el hueso. La leptina es una hormona producida por los adipocitos que inhibe el apetito y favorece el gasto energético, principalmente a través de circuitos que involucran núcleo al arqueado del hipotálamo (Friedman, 2014). Dado que los adipocitos y los osteoblastos comparten un origen común a partir de células madre mesenquimales, distintos investigadores plantearon la hipótesis de una interacción paracrina entre ambos tipos celulares. De este modo, tras el descubrimiento de la leptina y su receptor, los estudios iniciales se centraron en determinar su acción periférica sobre las células óseas. En conjunto, sugirieron que la leptina funcionaba como hormona osteogénica en la que el sistema nervioso se encuentra altamente involucrado en su regulación (Cornish *et al.*, 2002; Holloway *et al.*, 2002).

Múltiples análisis han revelado que el esqueleto presenta una inervación mucho más extensa de lo que se había reconocido previamente, y que diversas fibras nerviosas esqueléticas expresan neuropéptidos y otras moléculas de señalización neuronal. Estas fibras se localizan en el periostio, el hueso cortical y la médula ósea y secretan neuropéptidos como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP),

sustancia P o el neuropéptido Y (NPY) (Bjurholm *et al.*, 1988a; Hill & Elde, 1991; Hukkanen *et al.*, 1992; Lerner & Persson, 2008). Además, la presencia de receptores funcionales para una amplia gama de neuropéptidos tanto en osteoblastos como osteoclastos aportan una evidencia adicional sobre la participación del sistema nervioso en el remodelado óseo. (Lerner & Persson, 2008).

Entre los neuropéptidos con más relevancia en el microambiente óseo se encuentra el **NPY**. Éste es un péptido de 36 aminoácidos que además de regular la ingesta de alimentos, la termogénesis y las concentraciones plasmáticas de insulina y corticosterona, también se encuentra implicado en la homeostasis ósea (Wong *et al.*, 2008). En la mediación de las señales del NPY participan cinco receptores (Y1R, Y2R, Y4R, Y5R e Y6R), todos ellos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), entre los que se ha observado que el Y1R, el Y2R y el Y6R ejercen distintos efectos sobre la remodelación ósea (Khor *et al.*, 2016). Concretamente, se ha descrito que Y1R está directamente implicado en la inhibición de la diferenciación de las BM-MSCs y la actividad de los osteoblastos maduros, constituyendo un posible mecanismo para el fenotipo de masa ósea elevada en el modelo murino *knockout* para Y1R (Lee *et al.*, 2010). Mientras que Y6R, conocido por regular los ritmos circadianos, también se ha relacionado con mantenimiento de la homeostasis ósea, apuntando a que la falta de señalización de Y6R altera la remodelación ósea y da lugar a una disminución significativa de la masa ósea.

Además, existen numerosas evidencias de que este neuropéptido no solo es expresado por células neuronales, sino también por células del microambiente óseo como los osteoblastos, osteocitos o las BM-MSCs (Dong *et al.*, 2018; Igwe *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2010). Estudios *in vitro* han demostrado que el NPY tiene efectos directos sobre las células del linaje osteoblástico, concretamente la sobreexpresión de este neuropéptido en osteoblastos da lugar a una disminución del número, grosor y volumen de trabéculas óseas (Matic *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios con pacientes con lesiones craneoencefálicas han demostrado una relación entre los niveles de NPY séricos y la gravedad de la lesión (Gu *et al.*, 2016).

Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

El desarrollo evolutivo ha dado lugar a sistemas biológicos de alta complejidad, destacando entre ellos la interacción entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino. Esta intrincada red de comunicación, conocida como **neuroinmunomodulación**, permite la coordinación bidireccional de estos sistemas para preservar la homeostasis del organismo. Este diálogo se facilita mediante mediadores y receptores compartidos, constituyendo un mecanismo fundamental en la respuesta adaptativa del cuerpo (Krsek et al., 2024).

Un ejemplo paradigmático de esta interacción es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal frente a estímulos estresantes crónicos. Esta activación culmina en la liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo, reconocidos por sus propiedades inmunosupresoras sobre células como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y granulocitos (Goehler et al., 2000; Liberman et al., 2018).

Actualmente, la neuroinmunomodulación se concibe no solo como una interacción molecular, sino como un sistema integral. De hecho, estudios recientes sugieren que los exosomas, un tipo de vesículas extracelulares implicadas en la comunicación intercelular, desempeñan un papel crucial en los procesos de inflamación sistémica (Krsek et al., 2024). Dichos exosomas actuarían como mensajeros entre las células sanguíneas periféricas y el sistema nervioso, transfiriendo miRNAs específicos que modulan la respuesta inmune (Gomes de Andrade et al., 2018).

Entre los mediadores clave de esta red de intercomunicación destaca el **péptido intestinal vasoactivo** (VIP). Un neuropéptido ampliamente distribuido en los sistemas nervioso, inmune y endocrino. VIP fue identificado por primera vez en 1969 por el Dr. Sami Said, quien describió un agente peptídico con actividad vasodilatadora en pulmones de mamíferos. Posteriormente, este investigador en colaboración con el Dr. Viktor Mutt purificó parcialmente este péptido del pulmón porcino (Said & Mutt, 1969). Dada la limitación y los problemas experimentados al intentar purificar el péptido completo del pulmón, ambos investigadores decidieron examinar el intestino, ya que los dos tejidos presentan el mismo origen embrionario. Así, utilizando tejido duodenal porcino, consiguieron aislar el péptido completo y presentarlo a la comunidad científica bajo el nombre de Péptido Intestinal Vasoactivo (Said & Mutt, 1970).

Unos años más tarde, la presencia de este péptido fue identificada en diferentes áreas del sistema nervioso central y periférico, como los somas, axones y dendritas neuronales (Giachetti et al., 1977; Johansson & Lundberg, 1981; Said & Rosenberg, 1976). En este sentido también se describió su presencia en las terminaciones nerviosas

presinápticas, clasificando a VIP como un neuropéptido con propiedades neurotransmisoras y neuromoduladoras. Además, estos efectos fueron corroborados al describir la presencia de receptores de VIP en numerosas áreas del sistema nervioso central (Staunolsen *et al.*, 1982).

Posteriormente se identificó la existencia de VIP en diferentes áreas del **sistema inmune**. Concretamente, el primer hallazgo data de 1985, cuando Felten y colaboradores describen inmunoreactividad frente a VIP en fibras nerviosas de timo (Felten *et al.*, 1985). A partir de ahí, numerosas investigaciones describen la presencia de terminaciones nerviosas VIP-érgicas en órganos inmunes como bazo, nódulos linfáticos y mucosas asociadas al sistema inmune (Felten *et al.*, 1985).

Así, la presencia de VIP en distintos órganos se debe a su liberación desde los terminales sinápticos que los inervan. Además de en los órganos del sistema inmune señalados anteriormente, también se ha demostrado la existencia de VIP en múltiples órganos como corazón, riñón, tiroides o el tracto urogenital. No obstante, la producción de VIP no está limitada a las terminaciones nerviosas. De hecho, VIP es sintetizado y liberado por diferentes tipos celulares. La primera evidencia científica data de 1978, donde Cutz y colaboradores describen la liberación de VIP en células cebadas a través de técnicas de radioinmunoensayo o inmunohistoquímica en el peritoneo, intestino y pulmón de rata (Cutz *et al.*, 1978). Posteriormente se describe la presencia de VIP en células polimorfonucleares de sangre periférica, concretamente en neutrófilos y eosinófilos (Aliakbari *et al.*, 1987; Odorisio *et al.*, 1980). VIP también es sintetizado por células del linaje linfóide, concretamente en 1990 se describió la síntesis y secreción de VIP en linfocitos T y B murinos (Gomariz *et al.*, 1993; Gomariz *et al.*, 1994a; Leceta *et al.*, 1996). Además, se ha comprobado que la síntesis y liberación de VIP por parte de linfocitos es inducida por moléculas relacionadas con procesos inmunológicos como la presentación de antígenos o la inflamación (Martinez *et al.*, 1999).

Estructura bioquímica de VIP y su familia

VIP pertenece a una extensa familia de neuropéptidos y hormonas caracterizados por similitudes estructurales y de secuencia, denominada **familia glucagón/secretina/VIP**. Esta familia incluye otros miembros relevantes como el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP), con sus isoformas PACAP27 y PACAP38, el péptido relacionado con PACAP (PRP), la helodermina, el péptido histidina-metionina en humanos (PHM) (o su equivalente en otros mamíferos), el péptido histidina-isoleucina (PHI), además de los péptidos relacionados con el glucagón (GLP1 y GLP2), el factor liberador de hormona del crecimiento (GHFR) y el péptido inhibidor gástrico (GIP) (Couvineau & Laburthe, 2012c).

Todos los ligandos que conforman esta familia comparten una serie de características comunes (Couvineau & Laburthe, 2012c; Neumann *et al.*, 2008):

- Péptido precursor: constituido por un péptido señal, de uno a tres péptidos bioactivos y segmentos N- y C-terminales.
- Longitud: varía entre 27 y 44 residuos de aminoácidos.
- Origen: sintetizados y secretados por células del sistema endocrino, nervioso y/o inmune.
- Estructura secundaria: predisposición a formar estructuras α -hélice.
- Dominio N-Cap: consistente en un clúster hidrofóbico entre residuos no polares del N-terminal y un puente de hidrógeno entre dos residuos polares.
- Función: desempeñan roles fundamentales en procesos fisiológicos.

La homología estructural entre los neuropéptidos de esta familia es notablemente alta, destacando PACAP27 como el miembro con mayor similitud estructural al VIP. Sus secuencias están altamente conservadas entre especies a lo largo de la evolución, lo que sugiere que todos derivan de un gen ancestral que experimentó un proceso de duplicación génica previo a la diversificación de los vertebrados (Sherwood *et al.*, 2000).

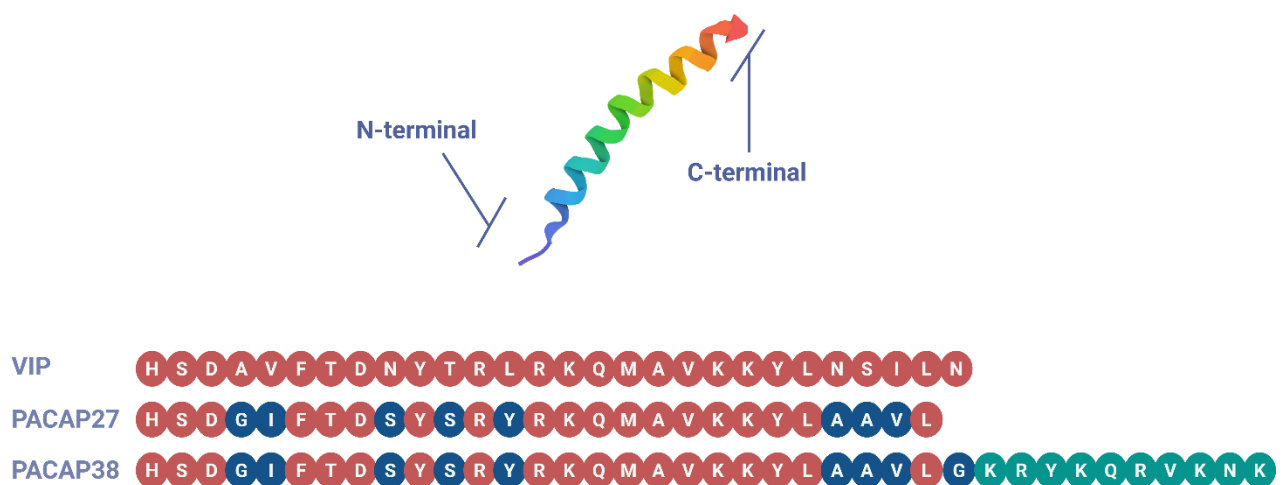


Figura 9. Estructura bioquímica del péptido intestinal vasoactivo (VIP). Parte superior: representación tridimensional. Parte inferior: Comparación de las secuencias de aminoácidos de VIP, PACAP27 y PACAP38.

VIP es un péptido de naturaleza básica y carácter anfipático, con un peso molecular de 3.326 Da. Su estructura primaria consta de una cadena de 28 aminoácidos cuya secuencia está altamente conservada evolutivamente (Nicole *et al.*, 2000b). La estructura secundaria incluye una región de estructura no determinada en el extremo N-terminal y una α -hélice en el extremo C-terminal (Wray *et al.*, 1993). Todos los aminoácidos son esenciales para su función biológica; sin embargo, los residuos His1,

Val5, Arg14, Lys15, Lys21, Leu23 e Ile26 resultan cruciales para su interacción con sus receptores (Nicole et al., 2000a).

La biosíntesis del VIP comienza a partir de una molécula precursora de 170 aminoácidos conocida como prepro-VIP. Este precursor es procesado mediante escisiones enzimáticas mediadas por proteasas en el retículo endoplásmico, generando el pro-VIP de 140 aminoácidos, que contiene las secuencias de VIP y PHM. Posteriormente, el pro-péptido es escindido por prohormonas convertasas para originar VIP-GRK y PHM-GRK. Las carboxipeptidasas-B y las monooxigenasas amidantes de peptidil-glicina metabolizan estos precursores para producir finalmente VIP y PHM (Itoh et al., 1983).

El gen que codifica el prepro-VIP está localizado en el cromosoma 6q25.2 y consta de 8837 pares de bases organizadas en 7 exones y 6 intrones. Los exones 4 (102 pb) y 5 (132 pb) codifican, tras los procesos de transcripción, traducción y procesamiento, los péptidos PHM y VIP, respectivamente (Bodner et al., 1985).

Receptores de VIP

Tras el éxito del aislamiento de VIP por Said y Mutt, se iniciaron estudios para caracterizar sus receptores. Pronto se demostró su amplia distribución en diversos tipos celulares y tejidos, incluyendo hepatocitos y adipocitos (Bataille et al., 1974), páncreas exocrino y, de manera destacada, en el epitelio intestinal (Christophe et al., 1976; Prieto et al., 1979).

El descubrimiento en 1989 de los péptidos PACAP27 y PACAP38 evidenció una elevada homología estructural entre estos compuestos, lo que permitió postular que los receptores de VIP también podrían interaccionar con PACAP (Miyata et al., 1989). Este hallazgo abrió nuevas líneas de investigación para comprender las actividades biológicas de ambos neuropéptidos.

Actualmente, se reconoce que tanto VIP como PACAP ejercen su función mediante la unión a tres receptores denominados por la *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR) como **VPAC1**, **VPAC2** y PAC1 (Harmar et al., 2012). Éstos pertenecen a la familia B, también conocida como clase II, de los GPCRs que incluye receptores para todos los péptidos estructuralmente relacionados con VIP y PACAP, así como receptores para PTH, el factor liberador de corticotropina, la calcitonina y péptidos relacionados (Couvineau & Laburthe, 2012b; Harmar, 2001). Esta familia de receptores presenta las siguientes características comunes (Couvineau & Laburthe, 2012a):

- Se componen de 7 dominios transmembrana (TM1-7) conectados entre sí por tres bucles extracelulares (EC1-3) y tres intracelulares (IC1-3). Estos últimos son los encargados de la interacción con la proteína G.
- Un dominio N-terminal (N-ted) especialmente largo, implicado en la unión del ligando. Se compone de seis residuos de cisteína que mediante puentes disulfuro mantienen la conformación del receptor, un péptido señal apolar para la inserción del receptor en la membrana plasmática y varios sitios de glicosilación implicados en la modulación del tráfico del receptor.

Además, el N-ted desempeña un papel crucial en el reconocimiento del ligando, lo que ha motivado numerosos estudios estructurales sobre este dominio (Couvineau & Laburthe, 2012c; Laburthe & Couvineau, 2002; Laburthe *et al.*, 2007). Como se describió inicialmente para el receptor CRF2 de ratón, que reconoce al neuropéptido conocido como factor liberador de corticotropina (CRF) (Grace *et al.*, 2004), esta área incluye un dominio Sushi caracterizado por dos láminas β antiparalelas estabilizadas por tres enlaces disulfuro y un puente salino, intercalados entre los anillos aromáticos de dos residuos de triptófano.

Si bien existían discrepancias en la forma de activación de los receptores, los datos estructurales más modernos respaldan el modelo de dos sitios para la unión de péptidos a los GPCRs de la familia B. En dicho modelo, las partes C-terminal y α -helicoidal central del péptido interactúan con el dominio Sushi en el N-ted, posicionando finalmente el extremo N-terminal del péptido para que contacte con la región transmembrana, lo que resulta en la activación del receptor (Couvineau & Laburthe, 2012b; Laburthe & Couvineau, 2002; Laburthe *et al.*, 2007). Esta región de contacto sigue siendo desconocida, ya que no se ha determinado ninguna estructura completa de los GPCRs de la familia B. Sin embargo, la presencia de un motivo helicoidal en la región de N-Cap en los ligandos peptídicos afines a todos los receptores de la familia B, incluidos VIP y PACAP, respalda que la conformación plegada del N-Cap se forma durante la unión al receptor y constituye un elemento clave en la activación de esta familia de GPCRs (Neumann *et al.*, 2008; Piper *et al.*, 2022)

El receptor VPAC1

En 1992, a partir de tejido pulmonar de rata, fue aislado el receptor para VIP y PACAP de tipo I (VPAC1) (Ishihara *et al.*, 1992). Este receptor en humanos se encuentra codificado en el cromosoma 3 p22.1. Se trata de un gen de alta complejidad, ya que presenta 13 exones que codifican una proteína de **51 kDa**. Esto provoca la presencia de



Figura 10. Representación estructural del receptor VPAC1.

diferentes variantes de expresión (Langer *et al.*, 2022). Por ejemplo, se ha identificado una variante con una eliminación de los exones 10 y 11 por procesos de *splicing* del RNA mensajero. Esto produce un receptor con 88 aminoácidos restantes y 5 dominios transmembrana identificado en células mononucleares de sangre periférica y en líneas celulares tumorales humanas como HuT-78 y Colo205. Aunque se expresa en la superficie celular, esta variante presenta alteraciones para la señalización intracelular, ya que no interacciona correctamente con la subunidad G α s (Bokaei *et al.*, 2006).

En cuanto a la regulación de su expresión, el gen del receptor VPAC1 se encuentra regulado por sitios de unión de factores de transcripción como Runx2, Sox2, Ctcf o Ahr (Lachmann *et al.*, 2010). Además, presenta metilaciones en una isla CpG de su promotor, por lo que su regulación se encuentra también sometida a mecanismos epigenéticos (Mohammad Nezhady *et al.*, 2020).

VPAC1 une con una afinidad similar VIP y PACAP, además de reconocer otros péptidos estructuralmente relacionados como la secretina o PHM (Dickson *et al.*, 2006). En cuanto a su distribución, se encuentra altamente expresado en zonas del sistema nervioso central como el córtex o el hipocampo (Ishihara *et al.*, 1992; Usdin *et al.*, 1994) así como en otros órganos invadidos por neuronas VIP-érgicas como el corazón, pulmón, intestino, hígado o útero (Bajo *et al.*, 2000; Ishihara *et al.*, 1992). También se ha caracterizado su expresión en diferentes tipos celulares del sistema inmune como linfocitos, granulocitos, monocitos o macrófagos (Carrión *et al.*, 2016; Delgado & Ganea, 2000a, 2000b; Gomariz *et al.*, 2006; Leceta *et al.*, 1996; Villanueva-Romero *et al.*, 2019) y en células del microambiente articular como sinoviocitos fibroblásticos, osteoblastos y osteoclastos (Juarranz *et al.*, 2008; Lerner & Persson, 2008; Lundberg *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2020).

Aunque los GPCR han sido clásicamente definidos como receptores localizados en la membrana plasmática, actualmente se sabe que tienen capacidad para señalizar desde otros compartimentos celulares como endosomas, retículo endoplásmico o el núcleo (Mohammad Nezhady *et al.*, 2020). En el año 2010 se describió por primera vez la presencia del receptor VPAC1 en el núcleo de células de tejido mamario humanas, describiendo la presencia de una secuencia NLS (*Nuclear localization sequence*) en el extremo C-terminal del receptor (Barbarin *et al.*, 2014; Valdehita *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017). También se ha descrito la presencia de procesos de palmitoilación de una de las cisteínas del extremo N-terminal que podría derivar en la internalización del receptor y su traslocación a otros compartimentos celulares (Barbarin *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2017).

El receptor VPAC2

El receptor para VIP y PACAP de tipo II o VPAC2 fue identificado por primera vez en 1993 (Lutz *et al.*, 1993). Este receptor se encuentra codificado en humanos en el cromosoma 7q36.3 y consta de 13 exones y 12 intrones que codifican una proteína de **49 kDa**. Debido a su complejidad, se han identificado diferentes variantes del receptor. Un ejemplo es la identificada en linfocitos humanos caracterizada por la pérdida del exón 11 (Langer *et al.*, 2022), variante que puede unir VIP de forma normal pero presenta una disminución en la señalización intracelular (Bokaei *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006).

En cuanto a la regulación de su expresión, a nivel epigenético se han descrito alteraciones en el patrón de metilación de las islas CpG en pacientes de cáncer colorrectal y en menores con trastornos de déficit de atención (Vega-Benedetti *et al.*, 2020; Wilmot *et al.*, 2016).

La afinidad de VIP por VPAC2 es ligeramente inferior a la de VPAC1, uniéndose con la misma afinidad las dos isoformas de PACAP. Además, también reconoce otros péptidos de la familia estructuralmente relacionados como la helodermina, aunque a diferencia de VPAC1, la secretina presenta una escasa afinidad para este receptor (Dickson *et al.*, 2006).

En lo relativo a su distribución, de nuevo se encuentra altamente expresado en zonas del sistema nervioso central como el tálamo, medula espinal dorsal, ganglios raquídeos y el núcleo supraquiasmático (Lutz *et al.*, 1993). Está implicado en procesos de control de ritmos circadianos y en el desarrollo cerebral, habiéndose descrito una asociación



Figura 11. Representación estructural del receptor VPAC2

entre microduplicaciones del gen de VPAC2 y el desarrollo de trastornos del espectro autista o esquizofrenia (Ago *et al.*, 2021; Firouzabadi *et al.*, 2017; Vacic *et al.*, 2011). En cuanto a tejidos periféricos, se ha descrito su expresión en numerosos órganos como el estómago, páncreas, útero o pulmón (Bajo *et al.*, 2000; Busto *et al.*, 2000; Usdin *et al.*, 1994). También se ha caracterizado su presencia en tipos celulares como sinoviocitos fibroblásticos (Juarranz *et al.*, 2008) o en células del sistema inmune como linfocitos o macrófagos (Carrión *et al.*, 2016; Gomariz *et al.*, 1994a; Gomariz *et al.*, 1994b).

Vías de señalización de los receptores de VIP

El principal mecanismo de señalización de los GPCRs tiene lugar mediante **proteínas G heterotriméricas**, compuestas por tres subunidades denominadas α , β y γ . Estas subunidades, en humanos, incluyen 16 tipos diferentes de $G\alpha$ s, 5 $G\beta$ y 13 $G\gamma$, que, combinándose entre sí, pueden dar lugar a una gran variedad de complejos de proteínas G.

En estado basal, cuando no hay interacción ligando-receptor, el trímero se encuentra unido a una molécula de GDP. Tras la unión del ligando al receptor, se modifica la conformación de sus hélices transmembrana y permite que el receptor se una a la subunidad $G\alpha$ de la proteína G que contiene GDP. La unión del GPCR a la proteína G induce un cambio de conformación que provoca el intercambio de GDP por una molécula de GTP. Como resultado de este intercambio se produce la hidrólisis del trímero, dando lugar a la unidad $G\alpha$ unida a GTP y al heterodímero $G\beta\gamma$. Ambos señalizan de manera independiente. La subunidad $G\alpha$ se agrupa en 4 grupos principales:

- Subgrupo $G\alpha$ s, señalizan a través de AMPc
- Subgrupo $G\alpha$ i/o, disminuyen los niveles de AMPc
- Subgrupo $G\alpha$ q/11, modulan la actividad de la fosfolipasa C (PLC)
- Subgrupo $G\alpha$ 12/13, señalizan a través de Rho-GTPasas

La señalización de las proteínas G finaliza tras la hidrólisis del GTP asociado a la subunidad $G\alpha$. Como consecuencia, se produce un cambio conformacional que favorece la reorganización de la proteína heterotrimérica basal a partir de la unión de la subunidad $G\alpha$ -GDP a un heterodímero $G\beta\gamma$ basal (Lu *et al.*, 2022; Smith *et al.*, 2018)

VPAC1 y VPAC2 se acoplan principalmente al **subgrupo de $G\alpha$ s**, lo que conduce a la activación de la adenilato ciclasa, enzima que cataliza la **formación de AMPc** a partir de ATP (Figura 12). La acumulación celular de este compuesto promueve la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Vaudry *et al.*, 2009). La PKA puede activar el factor de transcripción CREB o diferentes subfamilias de MAPK que activan vías de señalización

canónica. Concretamente la vía AMPc/PKA/ERK estimula proliferación de células neuroendocrinas (Alleaume *et al.*, 2003; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2005; Le Pechon-Vallee *et al.*, 2000) así como una inhibición de la caspasa 3 y un aumento del factor Bcl-2, promoviendo la supervivencia celular (Blechman & Levkowitz, 2013; Seaborn *et al.*, 2011; Vaudry *et al.*, 2009). La activación de PKA producida por VIP es la principal responsable de sus funciones antiinflamatorias, ya que modula factores de transcripción como AP-1 o IRF que están implicados en aumentar los niveles de citocinas proinflamatorias (Gonzalez-Rey *et al.*, 2007). Por otro lado, la subunidad G $\beta\gamma$ puede interactuar con diferentes proteínas, como Ras que activa a ERK (Alleaume *et al.*, 2003; Crespo *et al.*, 1994; Maier *et al.*, 1999).

Los receptores de VIP también pueden señalar a través del **incremento del Ca²⁺** intracelular a través de la activación de las subunidades G α_i o G α_q . Aunque esta vía de señalización es menos frecuente que la mediada por AMPc (Dickson *et al.*, 2006; Tasma *et al.*, 2022), el incremento en el Ca²⁺ es destacable debido a su importancia fisiológica (Dickson *et al.*, 2006). La PLC se activa a través de la apertura de canales de Ca²⁺ en un proceso en el que está implicado el heterodímero G $\beta\gamma$, catalizando la reacción de hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato (PIP2) en inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El incremento en IP3 aumenta la concentración de Ca²⁺ intracelular a través de la activación de los canales de calcio del retículo endoplasmático, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C (PKC), mediando la activación de otras quinasas (MacKenzie *et al.*, 2001).

En este sentido, se ha descrito la modulación de numerosas vías canónicas de señalización por parte de los receptores de VIP como la vía JAK-STAT (Delgado & Ganea, 2000a), la señalización por NF- κ B (Delgado *et al.*, 1999) o la vías implicadas en el proceso de diferenciación osteogénica o condrogénica Wnt/ β Catenina, Hedgehog o las BMPs (Juhász *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2020).

Los GPCR, están sometidos a una regulación mediada por proteínas quinasas de los GPCRs (GRK). La fosforilación del receptor por las GRK provoca que aumente su afinidad por la β -arrestina, bloqueando la capacidad del receptor de interactuar con proteínas G. Además, como resultado de esta unión, los receptores experimentan un proceso de endocitosis mediada por clatrina, mediante el cual pueden ser reciclados de nuevo a la membrana plasmática (Moore *et al.*, 2007; Sexton *et al.*, 2009). Por otro lado, las proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMPs) son una familia de tres proteínas transmembrana (RAMP1, 2 y 3) que heterodimerizan con los GPCRs modificando su tráfico, señalización y farmacología. En este sentido, se ha descrito la interacción de los 3 subtipos de RAMP con los receptores VPAC1 (Sexton *et al.*, 2006) y

VPAC2 (Wootten *et al.*, 2013), además de un ligero aumento de IP₃ para el heterodímero VPAC1-RAMP2 y un desplazamiento leve de la EC₅₀ en el acoplamiento de G α_i en el caso de la interacción de VAPC2 con la interacción de los 3 subtipos de RAMP.

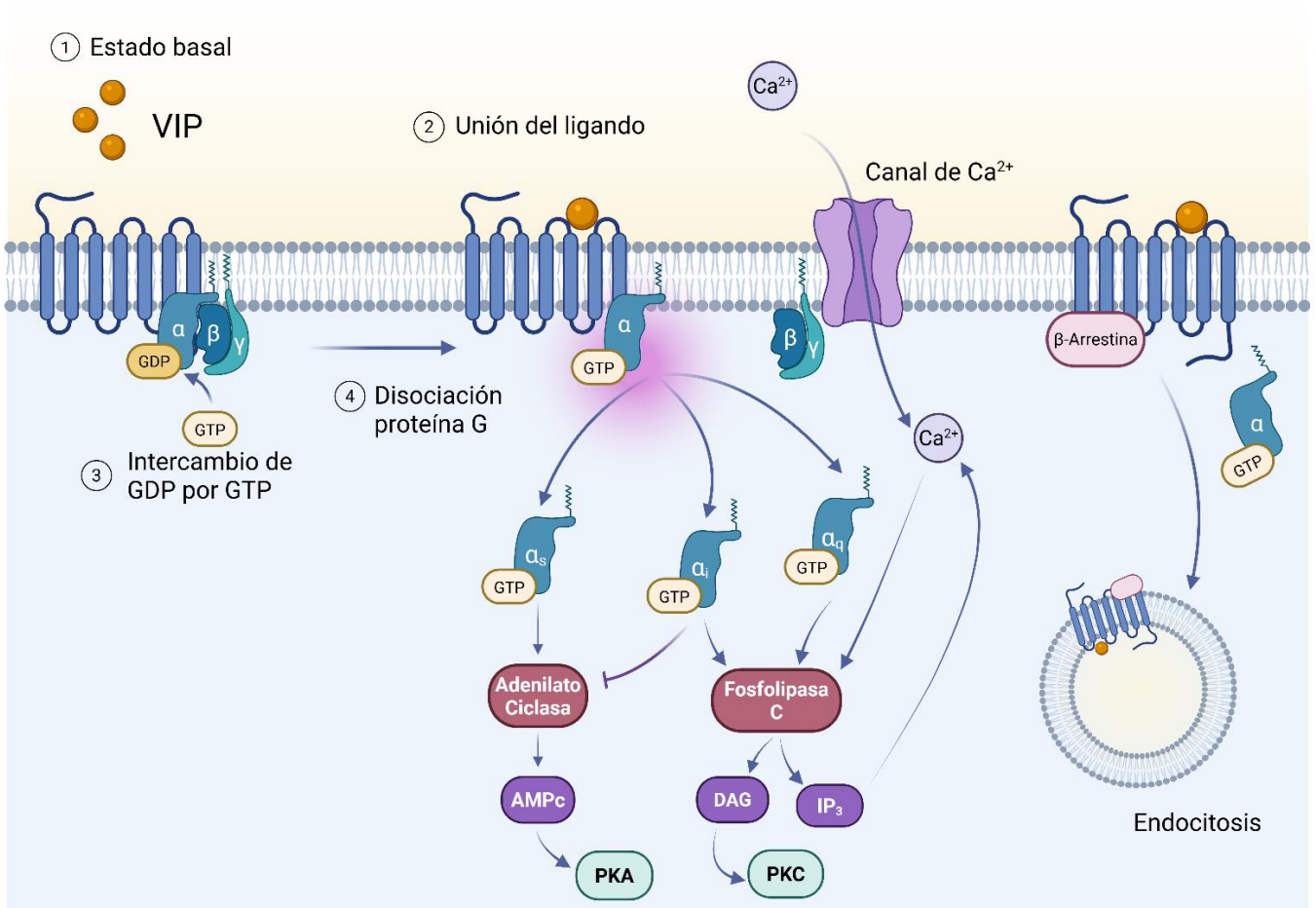


Figura 12. Principales vías de señalización de los receptores VPAC1 y VPAC2

Acciones biológicas de VIP

La presencia de VIP en el microambiente celular, como ya hemos mencionado previamente, tiene tres orígenes: *i.* terminaciones nerviosas *ii.* células del sistema inmune *iii.* células endocrinas. Por ello, los estudios realizados con modelos murinos *knockout* de VIP para estudiar las consecuencias de la ausencia de este péptido son numerosos. Estos modelos presentan fenotipos con alteraciones en los ritmos circadianos (Colwell *et al.*, 2003), la respuesta inflamatoria (Abad *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015) y el metabolismo (Martin *et al.*, 2010). De este modo, actualmente se conoce su actividad reguladora autocrina y paracrina de la producción y secreción de mediadores como citocinas, hormonas o neurotransmisores (Figura 13) (Delgado & Ganea, 2013).

Tras la identificación de VIP como un neuropéptido, se realizaron los primeros estudios sobre su implicación en el sistema nervioso central. Así, se ha descrito que VIP parece actuar como un factor de crecimiento durante la etapa embrionaria, promoviendo el desarrollo cerebral y del sistema nervioso central (Gressens *et al.*, 1993; Gressens *et al.*, 1994), aumentando la supervivencia neuronal y regulando el metabolismo del glucógeno en el córtex cerebral (Sherwood *et al.*, 2000). En relación con el sistema digestivo, las acciones de VIP han sido ampliamente estudiadas, demostrando que aumenta la proliferación de las células epiteliales en los órganos que lo componen (Yusta *et al.*, 2012); incrementa la secreción e inhibe la absorción del líquido luminal (Eklund *et al.*, 1980); relaja el músculo liso, estando implicado en los reflejos de distensión intestinal (Sohn *et al.*, 2014), y favorece la liberación de enzimas pancreáticas (Ito *et al.*, 2000). También se han estudiado sus funciones en otros sistemas, como el circulatorio, donde regula la contracción cardíaca y produce una vasoconstricción sistémica (Henning & Sawmiller, 2001); el sistema endocrino, estimulando la secreción de insulina y glucagón (Sanlioglu *et al.*, 2012), o el sistema respiratorio, donde presenta un efecto broncodilatador (Delgado *et al.*, 2004) y aparece implicado en la relajación de las vías respiratorias y el músculo liso asociado al tejido pulmonar. Todos estos efectos son un claro indicador de su pleiotropismo, al estar implicado en un gran abanico de actividades fisiológicas.

No obstante, los efectos observados de este neuropéptido están condicionados por el modelo animal, tipo celular o patología de estudio, indicando que el papel esencial de VIP es contribuir al mantenimiento de la homeostasis (Delgado & Ganea, 2013; Gomariz *et al.*, 2006; Gomariz *et al.*, 2001). En lo relativo al sistema inmune, el éxito de su actividad reside en conseguir un balance entre las citocinas y quimiocinas mediadoras de la inmunidad innata y adaptativa. Es de resaltar que, entre otras funciones, el mecanismo de acción de VIP es la regulación de la producción de dichos mediadores inmunológicos. Resumir los efectos de VIP sobre cada citocina es complejo debido a que, tal y como se ha indicado, su acción final depende del modelo de estudio empleado. De forma general, podemos concluir que el efecto de VIP es inhibir la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias y estimular la producción de IL-4 o IL-10 para fomentar un escenario antiinflamatorio (Arranz *et al.*, 2008b; Delgado & Ganea, 2013; Gomariz *et al.*, 2010).

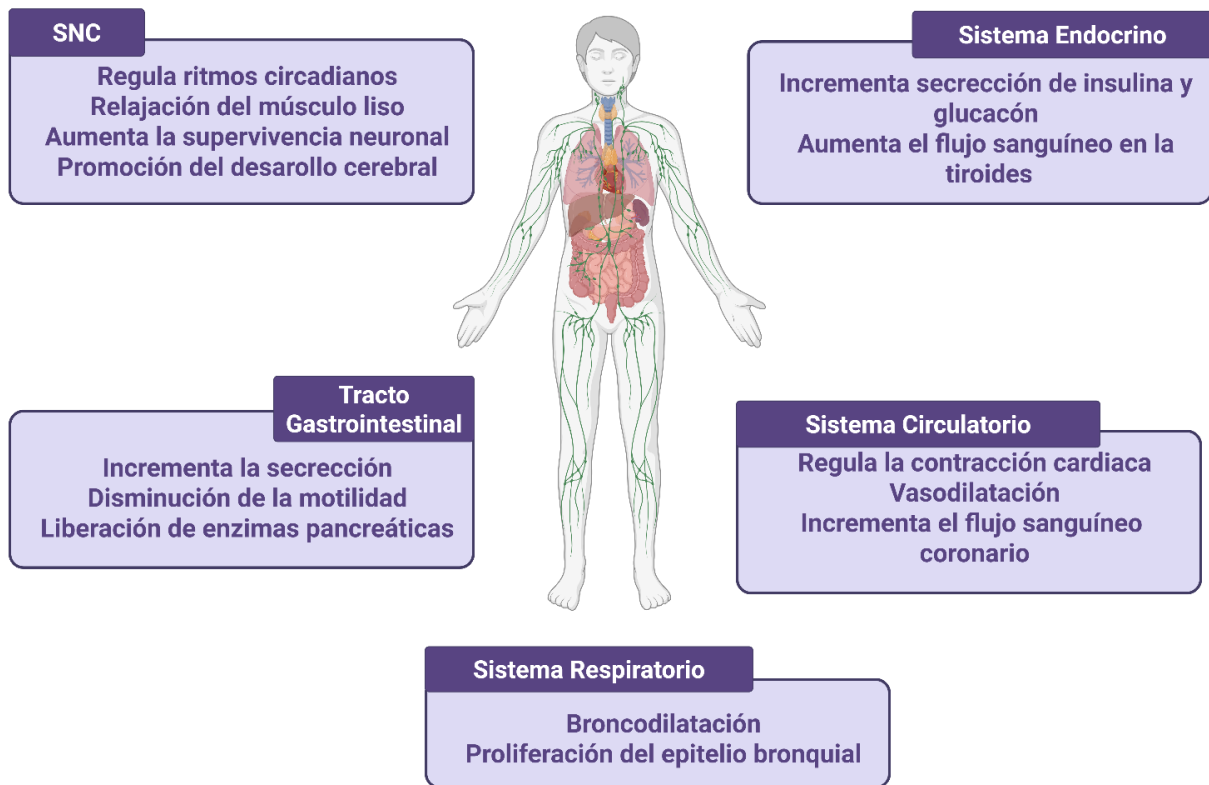


Figura 13. Principales acciones biológicas de VIP.

Efectos sobre la inmunidad innata

En **macrófagos y células dendríticas** se ha descrito la capacidad de VIP para inhibir la producción de TNF- α , IL-6 o IL-12, mientras que en la microglía, suprime la respuesta inflamatoria frente al péptido β -amiloide (Ganea et al., 2015; Martínez et al., 2020). En cuanto a la modulación de los receptores tipo toll (TLR) por parte de VIP, esta acción fue descrita por primera vez en el modelo murino de colitis aguda inducida con TNBS, donde inhibe la expresión de TLR2 y TLR4 (Gomariz et al., 2005). Además, en la línea celular macrófaga RAW264.7 y en macrófagos murinos o monocitos estimulados con lipopolisacárido (LPS), VIP reduce la expresión de TLR4 (Arranz et al., 2006; Arranz et al., 2008b; Foster et al., 2007; Jiang et al., 2012). En las células dendríticas, VIP induce los perfiles tolerogénicos de este tipo celular, a través de un aumento de IL-10 y una reducción de moléculas estimuladoras como CD40 o CD80, dificultando el proceso de presentación antigénica y, por lo tanto, favoreciendo que los linfocitos T CD4 adquieran un perfil regulador (Delgado & Ganea, 2013).

En los últimos años se ha descrito un nuevo tipo celular de la inmunidad innata de enorme interés fisiológico y terapéutico. Son células sin un receptor de antígeno de superficie identificado que reflejan cierto paralelismo fisiológico con los linfocitos T

colaboradores ya que producen una gran variedad de citocinas características de dichos linfocitos. A estas células se las ha denominado **células linfoides innatas** o ILCs. (Spits & Cupedo, 2012). Según la producción de citocinas, esos tipos celulares se pueden clasificar en tres grandes grupos (Tabla 1) (Zhang *et al.*, 2023) :

	Citocinas producidas	Factor de transcripción asociado	Paralelismo con subpoblaciones de linfocitos T colaboradores
ILC1	IFN- γ y TNF- α	T-bet	Th1
ILC2	IL-5 e IL-13	GATA3	Th2
ILC3	L-22 e IL-17	ROR γ t	Th17

Tabla 1. Características de las subpoblaciones celulares de ILCs

En este sentido, en células ILC de tipo 2 aisladas de intestino de ratón tratadas con VIP se ha descrito un aumento de la secreción de IL-5, citocina relacionada con el reclutamiento de eosinófilos (Nussbaum *et al.*, 2013). Además, VIP también potencia el reclutamiento y activación de las ILC2 e ILC3 en intestino, proporcionando protección frente a patógenos entéricos (Pascal *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2021).

Efectos sobre la inmunidad adquirida

La inmunidad adaptativa es el segundo mecanismo activado en la respuesta inmune. En ella participan múltiples células y procesos sistémicos altamente especializados dirigidos a eliminar el patógeno específico. Entre estas células se encuentran los linfocitos T CD4, células especializadas en la producción de citocinas específicas para modular la respuesta inmune. Durante el proceso inflamatorio, se activan diferentes subpoblaciones de células T caracterizadas por la expresión de marcadores de transcripción específicos y la síntesis de citocinas, resultando fundamentales en el correcto desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Tabla 2) (Zhu, 2018).

	Citocinas producidas	Factor de transcripción asociado
Th1	IFN- γ y TNF- α	T-bet
Th2	IL-5 e IL-4	GATA3
Th17	IL-22 e IL-17	ROR γ t

Tabla 2. Características de los principales subtipos de los linfocitos T

La principal vía de acción de VIP sobre la inmunidad adaptativa se produce mediante la modulación de la diferenciación y la actividad de las diferentes subpoblaciones de

linfocitos T CD4. Estudios realizados tanto *in vitro* como en modelos animales de artritis, colitis ulcerosa, diabetes, miocarditis autoinmune, lupus o esclerosis múltiple, han demostrado que VIP reduce la expresión de las citocinas proinflamatorias propias de los perfiles Th1 y Th17, al mismo tiempo que aumenta aquellas relacionadas con los perfiles Th2 y T regulador (Arranz *et al.*, 2008a; Delgado, 2003; Gomariz *et al.*, 2006; Jimeno *et al.*, 2012; Villanueva-Romero *et al.*, 2018). El estudio del efecto de VIP sobre estas citocinas, sus receptores o factores de transcripción asociados a las diferentes subpoblaciones de linfocitos T demuestra que la actividad del neuropéptido se centra en mantener el equilibrio de subpoblaciones para conseguir la homeostasis inmune. Por ejemplo, VIP disminuye la proporción de células Th1/Th2, Th17/Treg o Th1/Treg, ejerciendo un efecto regulador sobre el ambiente proinflamatorio, reduciendo la patogenicidad y favoreciendo la tolerancia inmunitaria (Deng *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2019; Gomariz *et al.*, 2005).

No obstante, los efectos de VIP sobre la inmunidad adaptativa no solo se producen en los linfocitos T. Estudios recientes demuestran que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria intestinal mediante la regulación de los **linfocitos B reguladores** y su producción de IL-10 (Sun *et al.*, 2019; X. Sun *et al.*, 2020). Estos resultados, apuntan a que VIP no solo tendría un gran potencial en un contexto patológico autoinmune sino también en procesos inflamatorios derivados de condiciones como las alergias alimentarias (Zeng *et al.*, 2019).

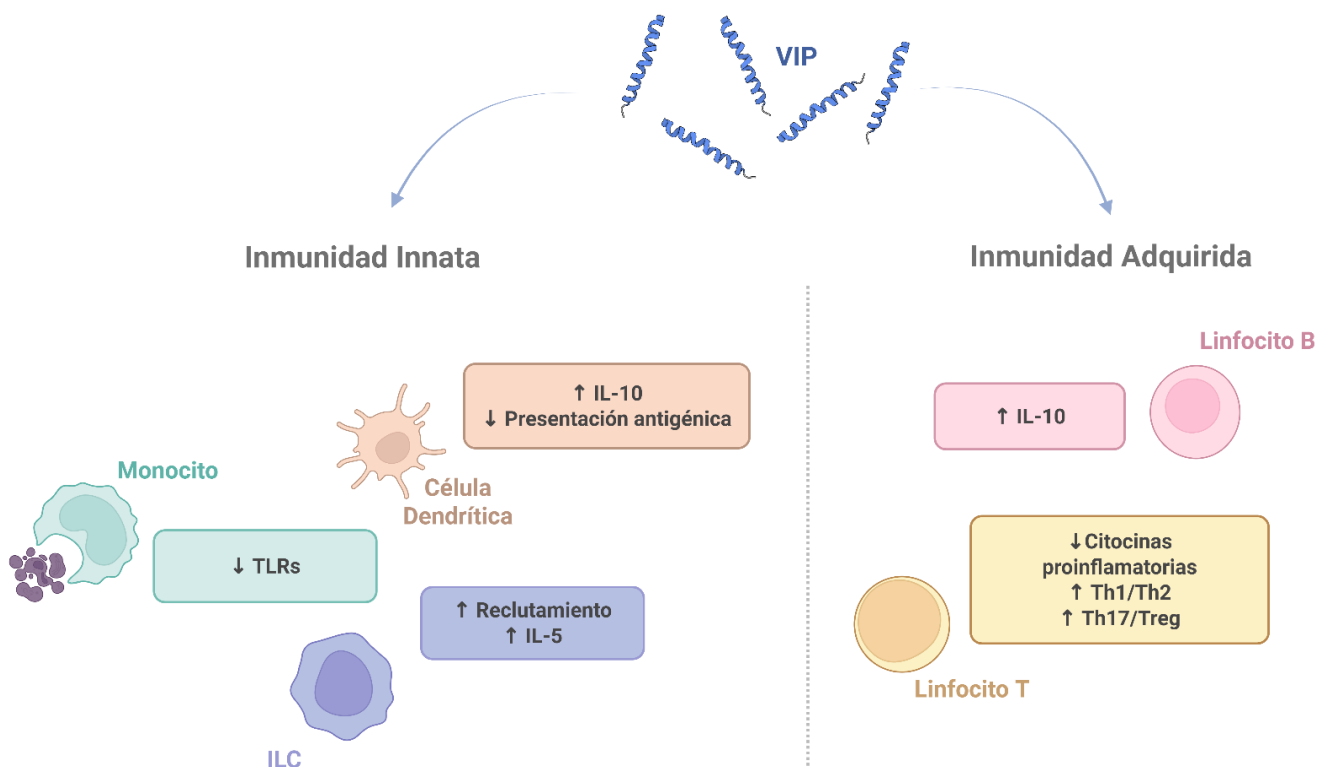


Figura 14. Efectos de VIP en la inmunidad

Efectos sobre la homeostasis ósea

Tras el primer estudio demostrando la presencia del neuropéptido SP en el tejido óseo en 1984 (Gronblad *et al.*, 1984), numerosas investigaciones han centrado su interés en la detección de neuropéptidos, incluido VIP. En este sentido, se ha descrito la presencia de terminaciones nerviosas que liberan VIP en el periostio y epífisis de los huesos (Bjurholm *et al.*, 1988b; Hohmann *et al.*, 1986). Concretamente, VIP suele liberarse junto con la acetilcolina en las terminaciones nerviosas colinérgicas que inervan el hueso.

El primer efecto de VIP descrito sobre la homeostasis ósea data de 1983, tres años antes del descubrimiento de fibras nerviosas VIP-érgicas en el hueso. Concretamente, se demostró su efecto sobre calvarias de ratón, favoreciendo la liberación de calcio (Hohmann *et al.*, 1983). A continuación, numerosos estudios han demostrado la presencia de los receptores de VIP tanto en líneas celulares de hueso humanas como murinas (Greenfield *et al.*, 1996; Hohmann & Tashjian, 1984; Lerner *et al.*, 1994; Michelangeli *et al.*, 1989). No obstante, la expresión de ambos receptores sigue siendo un objeto de estudio debido a las diferencias encontradas. Concretamente, en estudios con osteoblastos murinos se ha descrito la expresión génica del receptor VPAC2, mientras que VPAC1 podría estar inducido por la diferenciación osteogénica (Lundberg *et al.*, 2001). Por otro lado, estudios realizados con RNA procedente de tejido óseo detallan la expresión de VPAC1, mientras que VPAC2 no fue detectado (Togari *et al.*, 1997). En cuanto a los efectos funcionales de VIP sobre los osteoblastos, los estudios publicados hasta el momento apuntan a su papel osteogénico, aumentando la producción de ALP en osteoblastos murinos cultivados *in vitro* (Lundberg *et al.*, 2000). Además, la deficiencia de estrógenos mediante ovariectomía en rata, un procedimiento que resulta en la fragilidad ósea, influye en el sistema VIP/receptores, encontrando una disminución en la expresión de VIP y el VPAC2 al analizar el fémur completo de dichos animales. Estos resultados sugieren que la extirpación del ovario podría estar afectando a la homeostasis ósea a través de señales locales mediadas por VIP (Liu *et al.*, 2018). Estudios recientes también describen su efecto osteogénico en un modelo de rata, induciendo la diferenciación angiogénica de las BM-MSc y al tiempo que estimulan la reparación ósea *in vivo* mediante la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Shi *et al.*, 2020).

Por otro lado, los estudios sobre la expresión de los receptores de VIP en osteoclastos se limitan a modelos murinos, en los que tan solo se indica la presencia de VPAC1 (Ransjö *et al.*, 2000). En cuanto a su función sobre la osteoclastogénesis, se ha demostrado una actividad inhibitoria de la diferenciación inducida por 1,25(OH)₂-vitamina D3 o PTH en precursores murinos (Lundberg *et al.*, 2000). Por último, en lo relativo a su papel en la resorción ósea, aunque inicialmente se describió como un

estimulador de la actividad osteoclastogénica en calvarias de ratón (Hohmann *et al.*, 1983), investigaciones posteriores han demostrado su papel osteoprotector en modelos murinos, reduciendo la contracción citoplasmática, la motilidad y la actividad resortiva de los osteoclastos diferenciados *in vitro* (Lundberg *et al.*, 2000).

Además, se ha estudiado el efecto de VIP sobre moléculas relacionadas con la homeostasis ósea como RANKL y OPG. Los ensayos *in vitro* utilizando cultivos de células de médula ósea, tanto de ratón como de rata, indican que este neuropéptido incrementa la expresión de OPG y disminuye la expresión de RANKL inducida por 1,25(OH)₂-vitamina D₃, resultando en un descenso de la ratio RANKL/OPG (Mukohyama *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2021). Estos resultados han sido corroborados con cultivos de osteoblastos murinos donde se observa un efecto similar (Persson & Lerner, 2011). Además, VIP inhibe el reclutamiento de osteoclastos inducido por 1,25(OH)₂-vitamina D₃, que se asocia a la regulación elevada de OPG y a la baja modulación de RANKL y RANK (Sun *et al.*, 2020). Finalmente, esta modulación del microambiente óseo no solo se limitaría al sistema RANKL/OPG. Concretamente, VIP puede estimular indirectamente a los osteoblastos para que sintetizen moléculas como LIF (factor inhibidor de leucemia) o la prostaglandina E₂, relacionadas con la inhibición de la resorción ósea a través del osteocito (Elefteriou, 2005; Greenfield *et al.*, 1996).

Patologías reumáticas

Las enfermedades reumáticas incluyen al conjunto de patologías médicas que afectan al aparato locomotor, concretamente a articulaciones, tendones, músculos y al metabolismo óseo, entre otras. Las causas de estas patologías son muy variadas, desde un origen mecánico degenerativo, a fenómenos inflamatorios en relación con procesos autoinmunes. Su prevalencia es considerablemente alta; en España, 1 de cada 5 personas padece algún tipo de dolencia reumática. No obstante, esta cifra aumenta con la edad llegando hasta el 50% de la población mayor de 65 años.

Desde un abordaje sencillo, las patologías reumáticas se pueden clasificar basándose en la afección de los tejidos articulares dañados. Una articulación está formada, en esencia, por dos superficies óseas cuyas epífisis se encuentran recubiertas de cartílago hialino, el cual permite un deslizamiento suave entre ellas. Estas estructuras se alojan dentro de una cavidad revestida por una fina membrana sinovial rodeada por una cápsula y ligamentos que proporcionan estabilidad y soporte. El sistema músculo-tendinoso asociado es el encargado de generar y controlar los movimientos. Las patologías reumáticas se pueden dividir en cuatro grandes grupos (S.E.R, 2014):

- **Artrosis:** caracterizada por daños en el cartílago articular debido a procesos de degradación, inflamación y envejecimiento que afecta principalmente a las articulaciones de carga como rodillas, cadera, columna y manos.
- **Artritis:** presenta una respuesta inflamatoria persistente localizada en el tejido sinovial que reviste la cavidad articular y forma parte de la vaina de muchos tendones. Este grupo representa el núcleo básico de la reumatología, donde se incluyen más de 100 tipos de entidades patológicas distintas.
- **Reumatismos de partes blandas:** caracterizados por una respuesta inflamatoria frente a tendones y músculos. Se trata de un grupo heterogéneo de patologías distinguidas por dolencias no propiamente articulares como tendinitis, dorsalgia o bursitis.
- **Enfermedades metabólicas óseas:** cuyo órgano diana es el hueso. Dentro de este grupo se incluyen, entre otras, la osteoporosis, la osteomalacia o la enfermedad de Paget.

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una inflamación sistémica crónica que afecta principalmente a las articulaciones sinoviales. Inicialmente se describió como una patología asociada a la inflamación, daño articular y a un aumento en la disfuncionalidad. No obstante, actualmente se entiende como un

síndrome muy amplio en el que se incluye el aumento de otras morbilidades como neuropatías o riesgo de cáncer (Firestein, 2014; Firestein & McInnes, 2017).

Esta patología debuta principalmente en manos, muñecas y pies, donde la progresión de la enfermedad provoca deformidades y afecta gravemente a la funcionalidad de la articulación. Su inicio, denominado como **etapa pre-clínica**, se caracteriza por la propagación de una autoinmunidad asintomática que incrementa los mediadores proinflamatorios a nivel sistémico. Por ello, los síntomas de esta primera etapa son leves mientras que van aumentando los niveles de autoanticuerpos anti-inmunoglobulinas G (conocidos como factor reumatoide) y frente a péptidos citrulinados. Finalmente, debido a los procesos de autoinmunidad e inflamación localizados en la membrana sinovial, se produce dolor, hinchazón y rigidez articular, evolucionando a una **AR temprana** que, en estadios muy avanzados, puede dar lugar a la **AR crónica** o establecida (Smolen *et al.*, 2018).

La predisposición genética desempeña un papel clave en esta patología, en la que los familiares de primer grado de pacientes con AR tienen un riesgo de dos a cinco veces mayor de desarrollarla (Hemminki *et al.*, 2009; S.E.R, 2014). Se han asociado múltiples alelos con un mayor riesgo de AR. La evidencia más sólida respalda el papel del gen que codifica HLA-DRB1, perteneciente al complejo principal de histocompatibilidad y, en particular, una secuencia clave de cinco aminoácidos conocida como epítipo compartido (Gregersen *et al.*, 1987; van der Helm-van Mil *et al.*, 2006). Estudios de asociación del genoma completo a gran escala (GWAS) han identificado numerosos mecanismos genéticos y loci asociados con la AR como es el caso del gen del receptor RANK, *TNFRSF11A* (Ishigaki *et al.*, 2022). Estudios recientes han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en los genes del sistema de regulación RANK/RANKL/OPG con una asociación significativa a la densidad mineral ósea y marcadores de severidad de la patología (Pei *et al.*, 2025; Triguero-Martinez *et al.*, 2024).

El proceso inflamatorio que tiene lugar en la AR es complejo debido a su carácter dinámico. Durante su desarrollo numerosos mediadores, tanto moleculares como celulares, participan en los diferentes estadios patológicos, siendo las citocinas unas de sus protagonistas. De hecho, terapias basadas en la inhibición de citocinas clave como IL-6 o TNF- α cuentan con un gran éxito clínico (Smolen *et al.*, 2023).

Las **células del sistema inmune**, tanto innato como adaptativo, cumplen un importante papel en la progresión de la AR. Entre ellas se encuentran los linfocitos B y Th1, Th2 y Th17 (Salnikova *et al.*, 2024). Los monocitos y macrófagos residentes en la articulación sinovial también participan en el desarrollo de esta patología (Morell *et al.*,

2017). Además, las células dendríticas, los neutrófilos, los mastocitos y algunas células inmunorreguladoras, como los linfocitos T reguladores (Treg), forman parte de la compleja red que mantiene la inflamación crónica (Mishra *et al.*, 2021). A esto se suman los sinoviocitos fibroblásticos (FLS), que constituyen el principal componente celular residente de la membrana sinovial y que, al adquirir un fenotipo alterado, contribuyen al mantenimiento y cronicidad de la AR. De modo que en su conjunto, todas estas células estimulan la síntesis de moduladores locales de la inflamación, como citocinas, quimiocinas y sus respectivos receptores (Choi *et al.*, 2016).

Los **monocitos** representan un tipo celular de especial importancia por su implicación en la iniciación, mantenimiento y amplificación de la inflamación en la articulación sinovial. La migración de monocitos desde la circulación hacia la membrana sinovial se encuentra facilitada por los receptores de quimiocinas presentes en los monocitos CD14⁺ y CD16⁺. Dichos receptores interactúan con sus ligandos correspondientes, liberados por los FLS (Li *et al.*, 2008). Ciertas metaloproteasas y otros productos liberados por los FLS, tales como el GM-CSF, el TNF- α y la IL-1 β también promueven la migración de monocitos (Choi *et al.*, 2016). Posteriormente, estos monocitos presentan una mayor expresión de receptores de quimiocinas y antígenos en su superficie celular, como CD14, CD16, TLRs, HLA-DR, y las integrinas β 1 y β 2. Por último, fomentan y propagan el microambiente inflamatorio al secretar citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Wolf *et al.*, 2019).

En función del nivel de expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16, se pueden diferenciar tres subpoblaciones de monocitos: clásicos (CD14⁺⁺ CD16⁻), intermedios (CD14⁺⁺ CD16⁺) y no clásicos (CD14⁺ CD16⁺⁺). El número de monocitos intermedios es muy elevado en la sangre periférica y en la sinovia de pacientes con AR, además de aumentar con el desarrollo de la patología (Chara *et al.*, 2015). Este tipo celular secreta TNF- α , IL-1 β e IL-6 en grandes cantidades favoreciendo el ambiente inflamatorio de la articulación (Sorensen *et al.*, 2022). Además, la diferenciación de los monocitos intermedios da lugar a subconjuntos de monocitos inflamatorios y macrófagos con fenotipo M1 proinflamatorio. Además de su papel en la inflamación, los monocitos intermedios conducen a la activación directa y expansión de los linfocitos Th17 en las articulaciones sinoviales inflamadas. Los monocitos clásicos además de producir TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en altas concentraciones (Sorensen *et al.*, 2022; Wolf *et al.*, 2019), pueden sufrir una diferenciación hacia monocitos intermedios, macrófagos inflamatorios y osteoclastos en las regiones de inflamación (Salnikova *et al.*, 2024). Los monocitos clásicos, por su lado, también contribuyen a la erosión ósea, fomentando la inflamación sinovial y además funcionan como células fagocíticas. De hecho, el subconjunto de monocitos CD16⁻, representan a los progenitores osteoclasticos

circulantes que sufrirán el proceso de osteoclastogénesis (Komano *et al.*, 2006). Por ello, los monocitos clásicos son considerados como los predecesores circulantes de los osteoclastos en la AR erosiva. Todos estos hallazgos han inducido a considerar que los niveles de monocitos clásicos e intermedios puedan ser utilizados como un biomarcador asociado a severidad y respuesta a tratamientos en pacientes con AR (Chara *et al.*, 2015).

La osteopenia periarticular y la erosión ósea adyacente a la proliferación de tejido sinovial inflamatorio en las articulaciones sinoviales, son dos de los eventos más destructivos observados en pacientes con AR de alta actividad (Salnikova *et al.*, 2024). Los monocitos precursores de osteoclastos migran de forma continua hacia la sinovia inflamada y, junto con los macrófagos residentes se diferencian en osteoclastos, especialmente en fases activas de la enfermedad y en presencia de erosión ósea (Komano *et al.*, 2006). Además, estos monocitos aumentan la expresión del receptor RANK en su superficie e interactúan con su ligando RANKL, que es expresado principalmente por los FLS, osteoblastos y linfocitos T activados. Por último, los monocitos de pacientes con AR muestran una mayor expresión del receptor coestimulador asociado a osteoclastos (OSCAR), el cual, al interactuar con los ligandos colágeno tipo II y tipo I presentes en el cartílago articular inflamado, favorece aún más la osteoclastogénesis y la resorción ósea (Salnikova *et al.*, 2024).

Los linfocitos Th17 también desempeñan un papel clave en el desarrollo de la osteoclastogénesis, ya que estimulan la expresión de RANKL por parte de los FLS y células mesenquimales (Kim *et al.*, 2015; Kotake *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2013). Además, la producción de IL-17, junto con TNF- α , IL-1 β e IL-6, puede amplificar aún más este proceso (Salnikova *et al.*, 2024).

Eje VIP receptores en las patologías reumáticas

Los primeros trabajos que describieron el papel protector y potencialmente terapéutico de VIP en las patologías reumáticas fueron publicados en 2001. En un modelo murino de **artritis inducida por colágeno** (CIA), la administración de VIP, tanto de forma diaria como en días alternos, confería protección frente a un cuadro clínico grave. Además, los ratones que recibieron una única dosis de VIP mostraron una reducción significativa en la severidad de la enfermedad. Estos efectos beneficiosos de VIP fueron relacionados con la regulación del balance de las poblaciones de linfocitos Th1 y Th2, la reducción de mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-1- β e IL-6, y la disminución de la expresión de MMP-2, implicada en la destrucción de la matriz extracelular (Delgado *et al.*, 2001). Posteriormente, también en el modelo murino de CIA, se corroboró la capacidad de este neuropéptido para reducir los niveles de

citocinas proinflamatorias, así como la expresión de mediadores asociados a la destrucción ósea, entre los que destaca RANKL (Juarranz *et al.*, 2005). Asimismo, el tratamiento con VIP promovía el aumento de factores antiinflamatorios y asociados a la protección articular a través del bloqueo de las rutas de señalización de NF- κ B y AP-1 (Juarranz *et al.*, 2005).

Los efectos de VIP han sido también corroborados en el modelo de CIA en ratas, demostrando un efecto antiinflamatorio a través de la regulación de las poblaciones de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg, así como la modulación de mediadores de la erosión ósea (Deng *et al.*, 2010). Además, en este modelo también se ha descrito un efecto inhibitorio de VIP sobre la actividad erosiva de osteoclastos y se ha estudiado su implicación en la restauración de la función inmunosupresora de los monocitos reguladores a través de la inducción de IL-10 (Guan *et al.*, 2019; Muschter *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en modelos animales han permitido el avance en el estudio de la acción moduladora VIP sobre los diferentes **tipos celulares involucrados en patologías reumáticas** como la AR y la artrosis. Los primeros trabajos *in vitro* con células humanas revelaron que VIP disminuía la expresión de los factores proinflamatorios IL-6, CXCL8 y CCL6 en FLS tanto de pacientes con AR como con artrosis (Juarranz *et al.*, 2004; Juarranz *et al.*, 2008). Estos efectos se encuentran mediados por la regulación de la actividad inmunomoduladora de los receptores TLR2 y TLR4, que experimentan una reducción en su expresión y función (Arranz *et al.*, 2008a; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006) También en estas células se ha descrito la capacidad del neuropéptido para regular sensores de RNA como TLR3 y TLR7, así como las helicasas RIG-I y MDA5, a través de la inhibición de la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, lo que conlleva una reducción de la expresión de IFN- β y de mediadores proinflamatorios (Carrión *et al.*, 2011). Asimismo, en presencia de estímulos inflamatorios, VIP induce en estas células sinoviales una disminución de la expresión de IL-22, IL-23, IL-12 y del receptor de IL-17 (Carrión *et al.*, 2014; Carrión *et al.*, 2013). Además, el tratamiento con VIP de **FLS** de artrosis sometidos a estímulos inflamatorios, reduce la expresión de enzimas de destrucción de matriz como las ADAMTS (Desintegrina y metaloproteína con motivos trombospondina), la serín proteasa uPA o las metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13 (Pérez-García *et al.*, 2016). Por último, el análisis proteómico de co-cultivos de FLS y **condrocitos** de artrosis ha revelado la capacidad de VIP para reducir proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio, con la activación del sistema de complemento y con la destrucción de la matriz articular (Pérez-García *et al.*, 2021).

Respecto a los receptores de VIP, se ha descrito su expresión diferencial asociada a patologías musculoesqueléticas. El receptor VPAC2 es el mayoritariamente expresado en FLS de AR mientras que VPAC1 es predominante en los FLS de artrosis. No obstante, la expresión de VPAC2 en estos últimos puede ser inducida tras el tratamiento con TNF- α , sugiriendo una modulación de la expresión de los receptores de VIP a través del microambiente inflamatorio (Juarraz et al., 2008).

En lo relativo a la actividad de VIP sobre los **macrófagos** humanos, se corroboran los resultados generados en otros tipos celulares. Así, son numerosas las investigaciones que identifican el papel del neuropéptido como inhibidor de la síntesis de factores proinflamatorios (Ganea & Delgado, 2001; Gonzalez-Rey & Delgado, 2008). Además, en línea con lo observado en FLS, VIP disminuye la expresión de TLR2 y TLR4 reduciendo la respuesta inflamatoria inducida por LPS (Arranz et al., 2008b; Foster et al., 2007). Por otra parte, en estudios *in vitro* sobre macrófagos humanos con un perfil M1 (similar al identificado en AR), se ha demostrado que VIP reduce significativamente la expresión de IL-6, IL-12 y TNF- α . Asimismo, la presencia de VIP durante el proceso de polarización de dichas células reduce la expresión de marcadores asociados al perfil M1 y aumenta los asociados al M2, fenotipo relacionado con un perfil antiinflamatorio (Carrión et al., 2016). En lo relativo a la expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2 en monocitos, se ha descrito la expresión de ambos receptores. No obstante, se ha observado una mayor expresión de VPAC1 en aquellos monocitos polarizados *in vitro* hacia un perfil proinflamatorio, así como una disminución de VPAC1 y VPAC2 durante el proceso de diferenciación a macrófagos (Carrión et al., 2016).

En cuanto a la actividad del neuropéptido sobre los **linfocitos** en la AR, se ha demostrado que VIP reduce significativamente la producción de moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, CCL2 y CXCL8, promoviendo además la síntesis de citocinas antiinflamatorias relacionadas con la respuesta Th2 (Gutierrez-Cañas et al., 2008). En los linfocitos Th17, VIP reduce el perfil patogénico durante su activación, favoreciendo la proliferación hacia el perfil Th17 no patogénico (Jimeno et al., 2015a; Jimeno et al., 2015b). Además, en linfocitos Th *naïve* VIP reduce la expresión de IFN- γ e IL-23, demostrando su papel en la modulación de la plasticidad Th17/1 (Villanueva-Romero et al., 2022). Por otro lado, durante la progresión de la AR, se sabe que el porcentaje de células Th senescentes aumenta, estando correlacionado con el incremento de mediadores de degradación ósea. En este sentido, VIP atenúa el perfil senescente en células Th procedentes de donantes (Villanueva-Romero et al., 2020). Además, se ha descrito una regulación dinámica de los receptores de VIP en linfocitos Th, tanto en donantes sanos como en pacientes con AR. La expresión génica de VPAC1 no se altera durante la activación de este tipo celular, aunque su localización cambia

de la membrana plasmática a la envoltura nuclear. Sin embargo, la expresión del receptor VPAC2 se ve incrementada durante la activación, sin que se hayan observado cambios en su localización celular (Villanueva-Romero *et al.*, 2019). Estos resultados demuestran que la expresión de estos receptores es dinámica, tanto en procesos fisiológicos como patológicos, y podría estar relacionada con el papel inmunomodulador de VIP.

Finalmente, todos estos estudios han proporcionado las bases para la **exploración clínica** del eje VIP/receptores en distintas patologías reumáticas, incluyendo la AR, la artrosis y la espondiloartritis. Así se ha descrito su papel como un potencial biomarcador de pronóstico en estas patologías. En primer lugar, se ha observado que niveles bajos de VIP en suero, tanto de pacientes de artritis de reciente comienzo como de espondiloartritis, se correlacionan con un peor pronóstico de la enfermedad (Seoane *et al.*, 2015) así como con un mayor requerimiento de la intensidad en el tratamiento (Martínez *et al.*, 2014). De hecho, se ha descrito una combinación de genotipos asociados a las concentraciones séricas de VIP bajas que correlaciona con una mayor intensidad en el tratamiento de pacientes con AR (Seoane *et al.*, 2018). Por otro lado, estudios longitudinales relativos a la expresión génica de los receptores de VIP en PBMCs de pacientes de AR han demostrado la existencia de una regulación dinámica de este sistema. Concretamente, tras una estratificación de los pacientes, se ha observado una correlación negativa entre los índices de actividad de esta patología y los niveles de IL-6 con la expresión génica de VPAC1 (Seoane *et al.*, 2016). Dada la implicación del sistema VIP/receptores en patologías donde existe un escenario de autoinmunidad, recientemente ha sido publicado un estudio en el que se identifica una firma de miRNAs asociados a la expresión tanto de VIP como de VPAC2 en pacientes con diferentes patologías inflamatorias inmunomediadas, lo que sugiere su potencial en clínica (Lamana *et al.*, 2022).

Hipótesis y objetivos



Hipótesis y Objetivos

VIP destaca entre los diferentes neuropéptidos implicados en las interacciones que aseguran la coordinación funcional entre las células del tejido óseo. Tanto en estudios *in vivo* con modelos animales, como *in vitro* con células murinas, VIP ha demostrado efectos osteoprotectores al inhibir la osteoclastogénesis y favorecer la diferenciación osteoblástica. Asimismo, este neuropéptido juega un papel relevante en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, gracias a sus propiedades antiinflamatorias y a su capacidad inmunomoduladora.

Por todo lo expuesto anteriormente, formulamos la siguiente **hipótesis**:

El eje VIP/receptores actúa como un modulador osteoprotector del metabolismo óseo humano, limitando la resorción ósea al tiempo que favorece la osteogénesis. Su acción contribuye a restaurar el equilibrio alterado entre osteoclastos y osteoblastos en condiciones patológicas, regulando la función coordinadora de los osteocitos.

Para la validación de la hipótesis nos planteamos desarrollar los siguientes **objetivos**:

1. Caracterizar la expresión de VIP y sus receptores VPAC1 y VPAC2 durante la diferenciación *in vitro* de osteoclastos, osteoblastos y osteocitos humanos.
2. Analizar el efecto inhibitorio de VIP en la osteoclastogénesis humana, evaluando su influencia en la actividad resorptiva.
3. Valorar el efecto de VIP sobre la diferenciación y funcionalidad de osteoblastos, así como su implicación en la producción de mediadores que regulan biología de los osteoclastos.
4. Estudiar el efecto de VIP sobre el proceso de diferenciación *in vitro* de osteocitos humanos y la repercusión en su fisiología.
5. Dilucidar el papel de VIP en las interacciones entre las células del tejido óseo mediante la utilización de triple co-cultivo de osteoblastos junto con osteocitos y osteoclastos en diferenciación.
6. Determinar la posible relación entre los niveles séricos de VIP y los mediadores implicados en el remodelado óseo en el contexto de la artritis reumatoide.

Artículo 1

The Neuropeptide VIP Limits Human Osteoclastogenesis: Clinical Associations with Bone Metabolism Markers in Patients with Early Arthritis.

Biomedicines. 2021 Dec 10;9(12):1880.





Article

The Neuropeptide VIP Limits Human Osteoclastogenesis: Clinical Associations with Bone Metabolism Markers in Patients with Early Arthritis

David Castro-Vazquez ¹, Amalia Lamana ¹, Paula Arribas-Castaño ¹, Irene Gutiérrez-Cañas ¹, Raúl Villanueva-Romero ¹, Selene Pérez-García ¹, Carmen Martínez ¹, Yasmina Juarranz ¹, Sara Fernández de Córdoba ², Isidoro González-Álvarez ², Rosa P. Gomariz ^{1,*} and Mar Carrión ¹

¹ Department of Cell Biology, Faculty of Biology and Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain; dcastr01@ucm.es (D.C.-V.); amaliala@ucm.es (A.L.); pauarr02@ucm.es (P.A.-C.); irgutier@ucm.es (I.G.-C.); ravillan@ucm.es (R.V.-R.); selene@ucm.es (S.P.-G.); cmmora@ucm.es (C.M.); yashina@ucm.es (Y.J.); macarrio@ucm.es (M.C.)

² Rheumatology Department, Hospital Universitario La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de La Princesa, 28006 Madrid, Spain; sarfdezco@gmail.com (S.F.d.C.); isidoro.ga@ser.es (I.G.-Á.)

* Correspondence: gomariz@ucm.es; Tel.: +34-91-394-4971



Citation: Castro-Vazquez, D.; Lamana, A.; Arribas-Castaño, P.; Gutiérrez-Cañas, I.; Villanueva-Romero, R.; Pérez-García, S.; Martínez, C.; Juarranz, Y.; Fernández de Córdoba, S.; González-Álvarez, I.; et al. The Neuropeptide VIP Limits Human Osteoclastogenesis: Clinical Associations with Bone Metabolism Markers in Patients with Early Arthritis. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1880. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121880>

Academic Editor: Josef Troger

Received: 10 November 2021

Accepted: 9 December 2021

Published: 10 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: We aimed to evaluate the direct action of VIP on crucial molecules involved in human osteoclast differentiation and function. We also investigated the relationship between VIP serum levels and bone remodeling mediators in early arthritis patients. The expression of VIP receptors and osteoclast gene markers in monocytes and in vitro differentiated osteoclasts was studied by real-time PCR. NFATc1 activity was measured using a TransAM[®] kit. Osteoclastogenesis was confirmed by quantification of tartrate-resistant acid phosphatase positive multinucleated cells. OsteoAssay[®] Surface Multiple Well Plate was used to evaluate bone-resorbing activity. The ring-shaped actin cytoskeleton and the VPAC1 and VPAC2 expression were analyzed by immunofluorescence. We described the presence of VIP receptors in monocytes and mature osteoclasts. Osteoclasts that formed in the presence of VIP showed a decreased expression of osteoclast differentiation gene markers and proteolytic enzymes involved in bone resorption. VIP reduced the resorption activity and decreased both $\beta 3$ integrin expression and actin ring formation. Elevated serum VIP levels in early arthritis patients were associated with lower BMD loss and higher serum OPG concentration. These results demonstrate that VIP exerts an anti-osteoclastogenic action impairing both differentiation and resorption activity mainly through the negative regulation of NFATc1, evidencing its bone-protective effects in humans.

Keywords: VIP; arthritis; osteoclastogenesis; bone erosion; osteoclast; $\alpha v \beta 3$ integrin; actin cytoskeleton; NFATc1

1. Introduction

Bone remodeling maintains skeletal integrity thanks to the coordinated activity of osteoclasts and osteoblasts. Therefore, when the activity of these cells is uncoupled, the physiological balance between bone resorption and formation is altered, with pathological repercussions on bone tissue [1,2]. Such is the case of rheumatoid arthritis (RA), an inflammatory autoimmune disease characterized by a chronic inflammation of the diarthrodial joints and articular bone erosions, mainly attributed to the hyperactivation of osteoclasts [3,4].

Osteoclasts are large multinucleated cells resulting from the fusion and differentiation of mononuclear precursors, found in bone marrow as well as in the monocyte fraction of peripheral blood, through a process known as osteoclastogenesis [5]. The resorptive activity of mature osteoclasts is initiated with their adhesion to bone matrix. This process is

mediated by $\alpha v \beta 3$ transmembrane integrins and strongly determined by the reorganization of the actin cytoskeleton into a peripheral ring that interacts with integrins to form a sealing zone around the resorption compartment [6,7].

The driving force of osteoclastogenesis is the interaction of the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) with its specific receptor RANK on osteoclast precursors in the presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) which expands the osteoclast cellular precursor pool [8,9]. The RANKL signaling pathway finally induces the expression and activation of NFATc1, recognized as the master transcription factor in the regulation of osteoclast differentiation [10]. NFATc1 translocates into the nucleus where it targets numerous osteoclast-specific genes encoding for proteins and enzymes involved in cell differentiation and fusion, such as the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), as well as in resorptive function, including tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), integrin $\beta 3$, cathepsin K (CTSK) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) [11–13]. In addition to the RANK/RANKL pair, there is a third molecule considered a key player in the orchestration of osteoclastogenesis. Osteoprotegerin (OPG) is a soluble decoy receptor for RANKL that prevents its interaction with RANK, thereby blocking osteoclast differentiation. Accordingly, the balance between RANKL and OPG is critical in regulating the extent to which osteoclastogenesis occurs [14]. In joints affected by RA, the presence of proinflammatory cytokines and autoantibodies along with an increased RANKL/OPG ratio provides a pro-osteoclastogenic microenvironment that enhances the differentiation of bone-resorbing osteoclasts [15–17]. In fact, systemic inflammation in RA patients has been linked to loss of bone mineral density (BMD) and increased risk of fractures [18,19]. In this regard, disease remission has been shown to be associated with maintenance of BMD, whereas active disease is accompanied by higher radiological damage and lower BMD [20–22].

A growing body of knowledge demonstrates that bone remodeling is not only modulated by inflammatory mediators and systemic hormones, but also by nervous system in a complex network of neuro-immuno-osteogenic interactions [23–25]. In this sense, several neuropeptides detected in the joint microenvironment, including the vasoactive intestinal peptide (VIP), have been proven to elicit modulatory actions on the osteoclastogenic process [26–30]. VIP is a 28 amino acid peptide found in the peripheral and central nervous system that is also expressed by immune and endocrine cells, exerting its biological actions through two specific receptors, VPAC1 and VPAC2 [31,32]. Many studies have demonstrated its potent anti-inflammatory and immunomodulatory properties both in RA animal models and in human ex vivo studies [33]. Moreover, serum VIP levels have been recently identified as a potential prognostic biomarker in early arthritis, as patients with low baseline levels have a poorer clinical course and thus require more intensive treatment [34,35]. VIP treatment has been evidenced to reduce bone erosion in the collagen-induced mouse model of arthritis (CIA) by modulating the synthesis of several osteoclastogenic factors as well as by lowering the RANKL/OPG ratio [36,37]. Furthermore, in vitro studies on rat and mouse osteoclasts have evidenced a direct inhibitory effect of VIP on their differentiation, activation and resorptive function [28–30,38]. However, there is still a lack of studies assessing the impact of VIP on the osteoclastogenic potential of human osteoclast progenitors and on their resorptive activity.

In the present study we aimed to examine if the anti-osteoclastogenic effects of VIP described in animal models are also replicated in human cells by analyzing its direct action on crucial molecules and cellular structures involved in human osteoclast differentiation and function. Additionally, we investigated whether there is a relationship between serum levels of VIP and mediators involved in bone remodeling in early arthritis patients. The results of this study will contribute to elucidate the molecular mechanisms likely to be impaired by VIP in human osteoclast biology and to perform a preliminary clinical translational approach to evaluate its potential involvement in modulating bone homeostasis in RA patients.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Peripheral blood samples from 12 healthy donors were obtained from the Transfusion Center of the Community of Madrid (CAM, Spain). The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committees of the Transfusion Center of CAM. Following the Spanish Personal Data Protection law, the patients' demographic information was confidential. All donors signed an informed consent form before sampling.

To address the study of the impact of VIP on bone metabolism in patients with early arthritis, we used the following variables recorded in the Princesa Early Arthritis Register Longitudinal (PEARL) study database: total RANKL serum concentrations, OPG and VIP serum levels and the variation in bone mineral density during the first two years of follow-up. PEARL study includes patients referred to the Early Arthritis Clinic at the Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain. To be referred to the clinic, patients must have had one or more swollen joints for at least 4 weeks and symptoms for less than a year. Patients with other specific causes of arthritis were excluded. The register's protocol included five visits during a follow-up period of two years. Baseline blood samples were collected before treatment prescription. At each visit, sociodemographic, clinical and laboratory test data were collected and entered into an electronic database. A more detailed description of the PEARL protocol has been published previously [39].

The Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa Research Ethics Committee reviewed and approved the protocol of PEARL study (PI-518), and all experiments were performed in accordance with the guidelines and regulations of this committee. All patients signed an informed consent form before data were included in the register, and biological samples were stored at the local Biobank.

2.2. Isolation of PBMCs and Cell Culture

Peripheral blood samples from healthy donors were collected and PBMCs were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient (Rafer, Madrid, Spain). For monocyte isolation by adherence, PBMCs were plated at 5×10^5 cells/cm² in 6-, 24- or 48-well plates and allowed to adhere overnight at 37 °C and 5% CO₂ in α -MEM Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) supplemented with 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), 1% Penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 30 ng/mL M-CSF with or without 10^{-8} M VIP (Bachem A.G., Bubendorf, Switzerland). Non-adherent cells were removed and monocytes were cultured for 14 days in α -MEM Glutamax supplemented with 10% FBS and 1% Penicillin/streptomycin, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 10 ng/mL M-CSF, 1 ng/mL RANKL and 5 ng/mL TGF β -1 (Peprotech, East Windsor, NJ, USA) in the presence or absence of 10^{-8} M VIP.

2.3. Quantification of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Positive (TRAP+) Stained Osteoclast

After 14 days of culture, to confirm osteoclastogenesis, cells were fixed and stained using the Leukocyte acid Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's protocol. Assays were made in triplicate; TRAP positive and multinucleated cells (≥ 3 nuclei) were counted as osteoclasts under a bright field microscope using FIJI-Image J Software 1.52p version.

2.4. Resorption Assay

To evaluate bone-resorbing activity in osteoclast-like cells, cells were seeded on OsteoAssay[®] Surface Multiple Well Plate (Corning, Sigma-Aldrich) under the experimental conditions described above. After 14 days of culture, wells were stained by Von Kossa staining, thus the intact bone matrix was stained in black color whereas the resorption area of osteoclast was visualized in white. Assays were made in triplicate; resorption areas were quantified using FIJI-Image J software 1.52p version.

2.5. Real-Time PCR Analysis

Total RNA from cells under osteoclast differentiation conditions for 14 days was extracted using TriReagent method (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). RNA quantity and purity were measured on a NanoDrop[®] and 2 µg was used for cDNA synthesis using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Real-time PCR analyses for all target genes (*NFATc1*, *DCSTAMP*, *TNFRSF11A*, *CALCR*, *ACP5*, *CTSK*, *MMP9*, *ITGAV* and *ITGB3*) and one house keeping gene (*GADPH*) were performed using TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific), with manufacturer-predesigned primers. VIP receptors (*VIPR1* and *VIPR2*) were tested by semiquantitative RT-PCR using Real-time Ready Assay probes from the Universal Probe Library (Roche Life Science, Barcelona, Spain). Amplification was performed in a LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche Life Science). Assays were made in triplicate, and results were normalized according to the expression levels of *GADPH*.

2.6. Transcription Factor Activity Assay (TransAM)

The activity of NFATc1 was assessed on 3 µg nuclear extracts using the TransAM[™] NFATc1 Transcription Factor Assay Kit (Active Motif, Carlsbad, USA), according to manufacturer's instructions. A Nuclear Extract Kit (Active Motif) was used for nuclear extract preparation, and the protein content was measured with a QuantiPro[™] BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich). The results (OD 450/655 nm) were reported as a percentage increase over control cells.

Time-course experiment to evaluate the best time of NFATc1 activation following 1 ng/mL RANKL stimulation was performed, including 6, 12 and 24 h. According to the results obtained, a stimulation time of 12 h was selected.

2.7. Immunofluorescence Microscopy

Visualization of actin ring, VPAC1 and VPAC2 expression was analyzed by immunofluorescence. Cells were seeded on 12 mm coverslips coated with poly-L-Lysine under different experimental conditions and after 14 days were fixed and permeabilized. After rehydration and blocking, actin was stained with 5 U/mL Atto 645N-Phalloidin. For VPAC1 and VPAC2 detection coverslips were incubated with rabbit polyclonal antihuman VPAC1 antibody (1:100, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and mouse monoclonal antihuman VPAC2 (1:50, Abnova, Fisher Scientific, Madrid, Spain) for 1 h at RT. After washing, Alexa Fluor 488 donkey antirabbit IgG and Alexa Fluor 594 goat antimouse IgG (1:500, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) were used as secondary antibodies (1 h at RT). Nuclei staining was performed with 1 mg/mL Hoechst (Sigma-Aldrich). Fluorescence was examined using Leica SP-8 LIGHTNING confocal microscope (Leica DM IRE2; objective, 63×; Leica Microsystems, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). Negative controls were performed in the absence of anti-VPAC1 and anti-VPAC2 antibodies. Images were analyzed by FIJI-ImageJ software.

2.8. Statistical Analysis and New Variables

Additional variables were defined to elucidate the role of VIP in bone metabolism. We define a coded variable based on the serum concentration of VIP. VIP levels were considered to be low when the concentration was below the 25th percentile of its concentration in the PEARL population (383 pg/mL) and high when the concentration was over the 75th percentile (513 pg/mL).

The data were analyzed using STATA15 (StataCorp LP, College Station, TX, USA) and GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Non-parametric variables were analyzed using the Mann–Whitney U test or Kruskal–Wallis and Dunn's as a *post-hoc* test. *p*-values less than 0.05 were considered significant (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001).

3. Results

3.1. VPAC1 and VPAC2 Receptors Are Expressed by Both Human Monocytes and In Vitro Differentiated Osteoclasts

Since the primary hypothesis underlying our study was the existence of a direct effect of VIP on human osteoclastogenesis and osteoclast function, we decided first to map the expression of VIP receptors in human osteoclast precursors isolated from both healthy donors and early arthritis patients, and in the respective mature osteoclast differentiated in vitro. To determine the expression pattern of VIP receptors in the different cell types, mRNA levels of VIP receptors, VPAC1 and VPAC2, were analyzed by real-time PCR.

VPAC1 and VPAC2 gene expression was detected in both monocytes and in vitro differentiated osteoclasts. The results showed a generalized reduction in the expression of VIP receptors genes in mature osteoclast. VPAC1 expression was significantly higher ($p = 0.041$) in monocytes from healthy donors compared with mature osteoclasts (Figure 1A) whereas in early arthritis patients a significant down-regulation of both receptors (VPAC1 and VPAC2) was observed after osteoclastogenesis ($p = 0.001$ and $p = 0.002$, respectively) (Figure 1B).

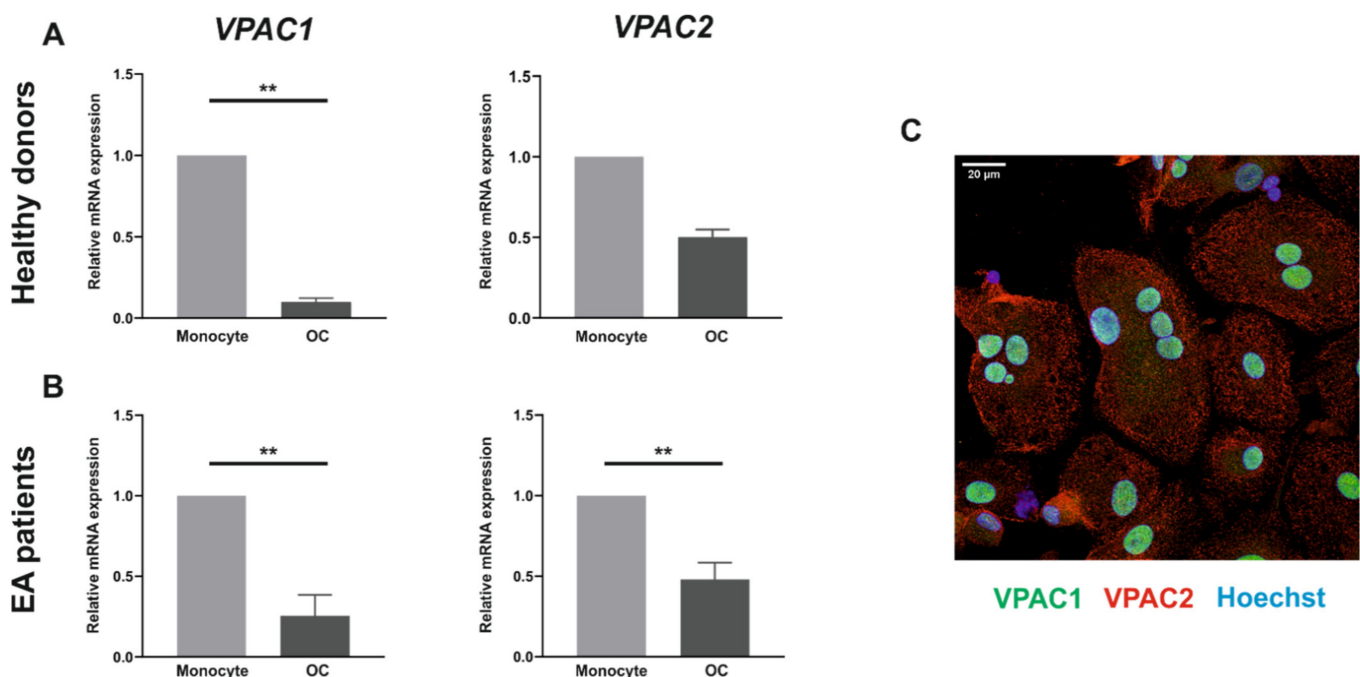


Figure 1. VPAC1 and VPAC2 expression in monocytes and in vitro differentiated osteoclasts. VPAC1 and VPAC2 mRNA expression levels in monocytes and in differentiated osteoclasts (OC) from 5 healthy donors (A) and 5 early arthritis patients (B) was determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels). The means \pm SEM of triplicate determinations are shown. Mann–Whitney U test was performed (** $p < 0.01$). (C) Immunofluorescence analysis on in vitro differentiated osteoclasts from healthy donors using specific antibodies for VPAC1 (Alexa Fluor 488, green) and VPAC2 (Alexa Fluor 594, red). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Fluorescence was examined on a Leica SP8 LIGHTNING confocal microscopy.

To confirm the protein expression of VIP receptors in human osteoclasts, immunofluorescence and confocal microscopy detection techniques were performed. The images confirmed the data obtained in the mRNA analysis, showing the presence of both receptors, VPAC1 (green) and VPAC2 (red), in in vitro differentiated osteoclasts (Figure 1C).

All together these results indicate that VPAC1 and VPAC2 are present in both human monocytes and in vitro differentiated osteoclasts showing no differential expression between RA patients and healthy donors.

3.2. VIP Limits the In Vitro Osteoclast Differentiation

Once confirmed that VPAC1 and VPAC2 receptors exhibit a similar expression pattern in osteoclasts derived from healthy donors and early arthritis patients, we next elucidated whether VIP was able to affect the differentiation process. To this end, differentiating osteoclasts were exposed to VIP and after 14 days of in vitro culture, mature osteoclasts were quantified considering TRAP-positive multinucleated cells with three or more nuclei. Results revealed a significant decrease in the number of osteoclasts per cm^2 ($p = 0.030$) when differentiated in the presence of VIP (Figure 2).

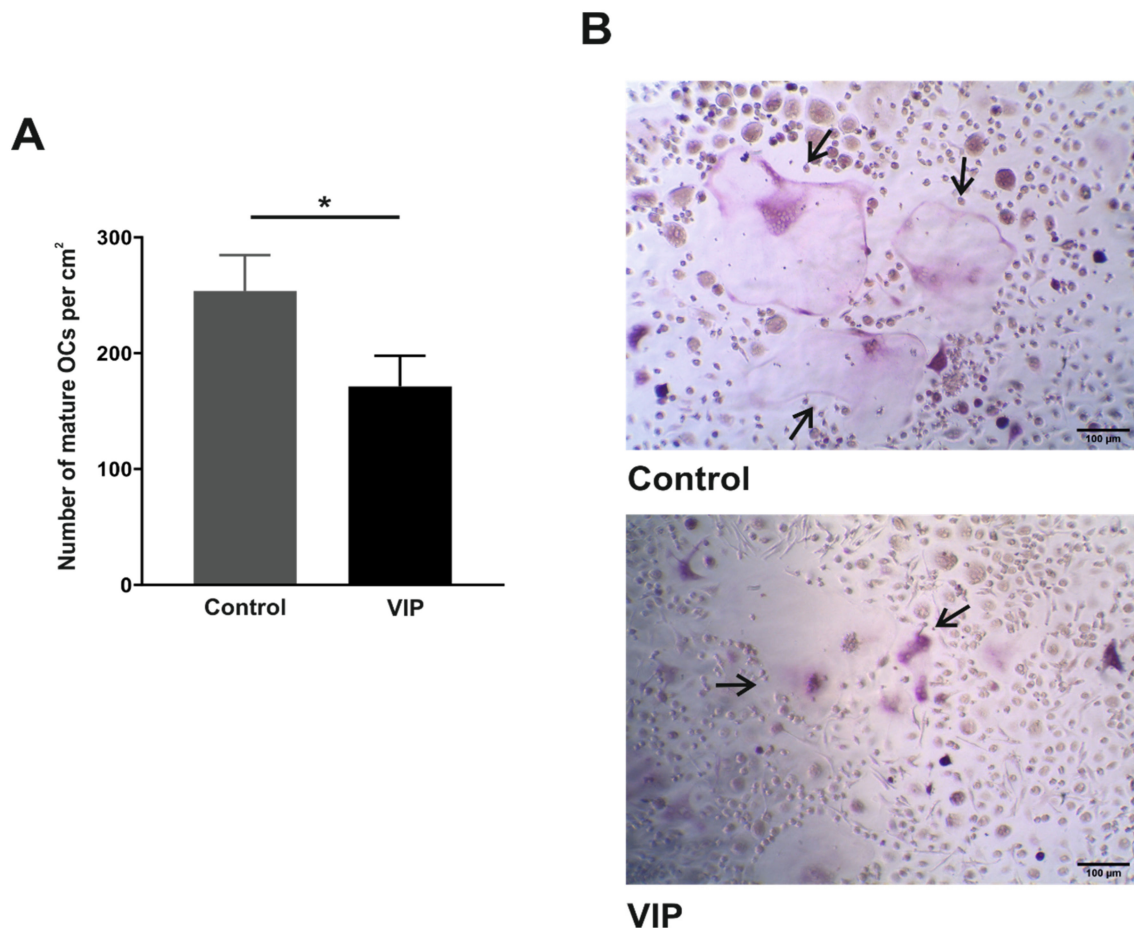


Figure 2. Effect of VIP on osteoclast differentiation. After 14 days of in vitro differentiation osteoclasts were TRAP stained and Hematoxylin was used to visualize the nuclei. TRAP+ cells with 3 or more nuclei were counted. (A) Effect of VIP on mature osteoclast number. (B) Photomicrographs of the effect of VIP on osteoclast formation. Osteoclasts are indicated with black arrows. The means \pm SEM of triplicate determinations of 12 independent experiments are shown. Mann–Whitney U test was performed (* $p < 0.05$).

3.3. Osteoclast Specific Gene Markers Are Negatively Regulated by VIP

Considering the inhibitory action of VIP on osteoclastogenesis reported above, and given that MCSF and RANKL are necessary and enough to induce osteoclast differentiation, we first analyzed whether the presence of VIP during in vitro differentiation modulates the expression of their receptors, cFms and RANK, respectively.

Real-time PCR analyses revealed that the coding gene for cFms (*CSF1R*) was significantly down-regulated after differentiation ($p < 0.001$) whereas the expression of *TNFRS11A*, the gene encoding for RANKL, was significantly up-regulated ($p = 0.031$). No significant effects of VIP in either gene were found (Figure 3A).

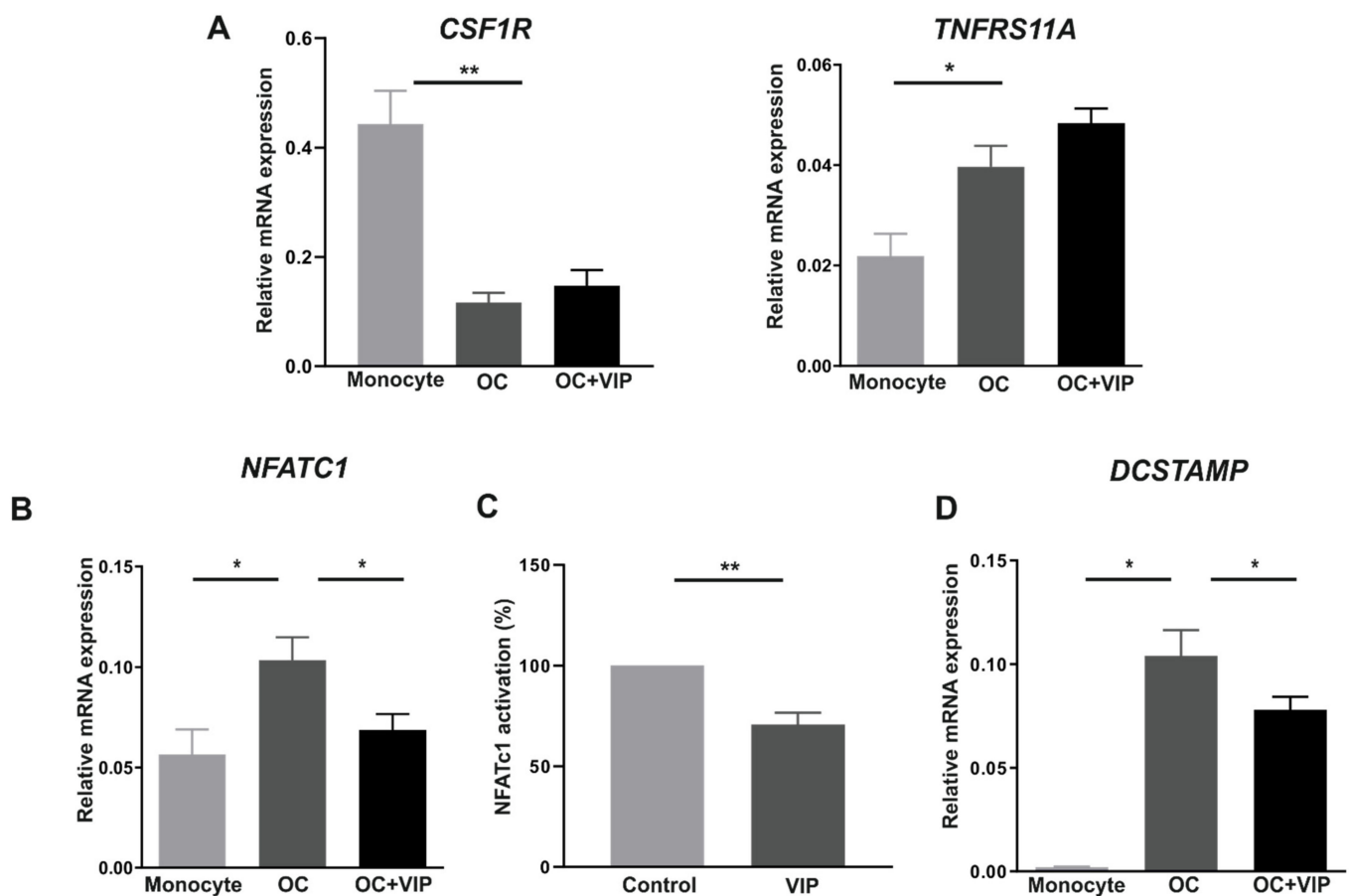


Figure 3. VIP down-regulates the expression of osteoclast-specific markers. *CSF1R*, *TNFRS11A* (A) and *NFATC1* (B) mRNA expression levels in monocytes and differentiated osteoclasts in absence (OC) or presence of VIP 10^{-8} M (OC+VIP) was determined by real-time PCR. (C) Activation and nuclear translocation of NFATc1 after 12 h of stimulation with 1 ng/mL RANKL (control) or RANKL and VIP 10^{-8} M (VIP). NFATc1 activation was measured in nuclear extracts by TransAM. Results were reported as a percentage increase over control stimulation. (D) *DCSTAMP* mRNA expression in monocytes and differentiated osteoclasts in absence (OC) or presence of VIP 10^{-8} M (OC+VIP). Real-time PCR results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels). The means \pm SEM of triplicate determinations of 6 independent experiments are shown. Mann–Whitney U test and Kruskal–Wallis using Dunn’s *post hoc* test was performed (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

To further explore the molecular mechanisms potentially involved in the anti-osteoclastogenic activity of VIP, we then characterized the mRNA expression profiles of *NFATC1* and *DCSTAMP*, two osteoclast specific gene markers, in osteoclasts differentiated in the presence or absence of VIP. Concerning *NFATC1*, results showed a significant decrease in its relative expression in the osteoclasts differentiated in the presence of VIP ($p = 0.038$) (Figure 3B). Given that NFATc1 is considered a master transcription regulator of RANKL-induced differentiation, we next evaluated if the reduction in its expression was also accompanied by a functional change. We studied the activation and nuclear translocation of NFATc1 after 12 h of stimulation with RANKL in presence or absence of VIP. There was a significant decrease of NFATc1 activation ($p = 0.002$) when the stimulation occurred in presence of the neuropeptide (Figure 3C). Finally, when we studied the expression of *DCSTAMP*, the results revealed that VIP significantly down-regulates *DCSTAMP* expression ($p = 0.020$) in mature osteoclasts (Figure 3D).

3.4. Osteoclast Resorptive Activity In Vitro Is Impaired in the Presence of VIP

In relation to the possible effect of VIP on the resorbing activity, differentiating osteoclasts grown on OsteoAssay[®] surface were exposed or not to VIP during the 14 days of

culture and the relative resorption area was evaluated. A significant decrease of resorption area was detected when osteoclasts were differentiated in presence of VIP ($p = 0.014$) (Figure 4A,B)

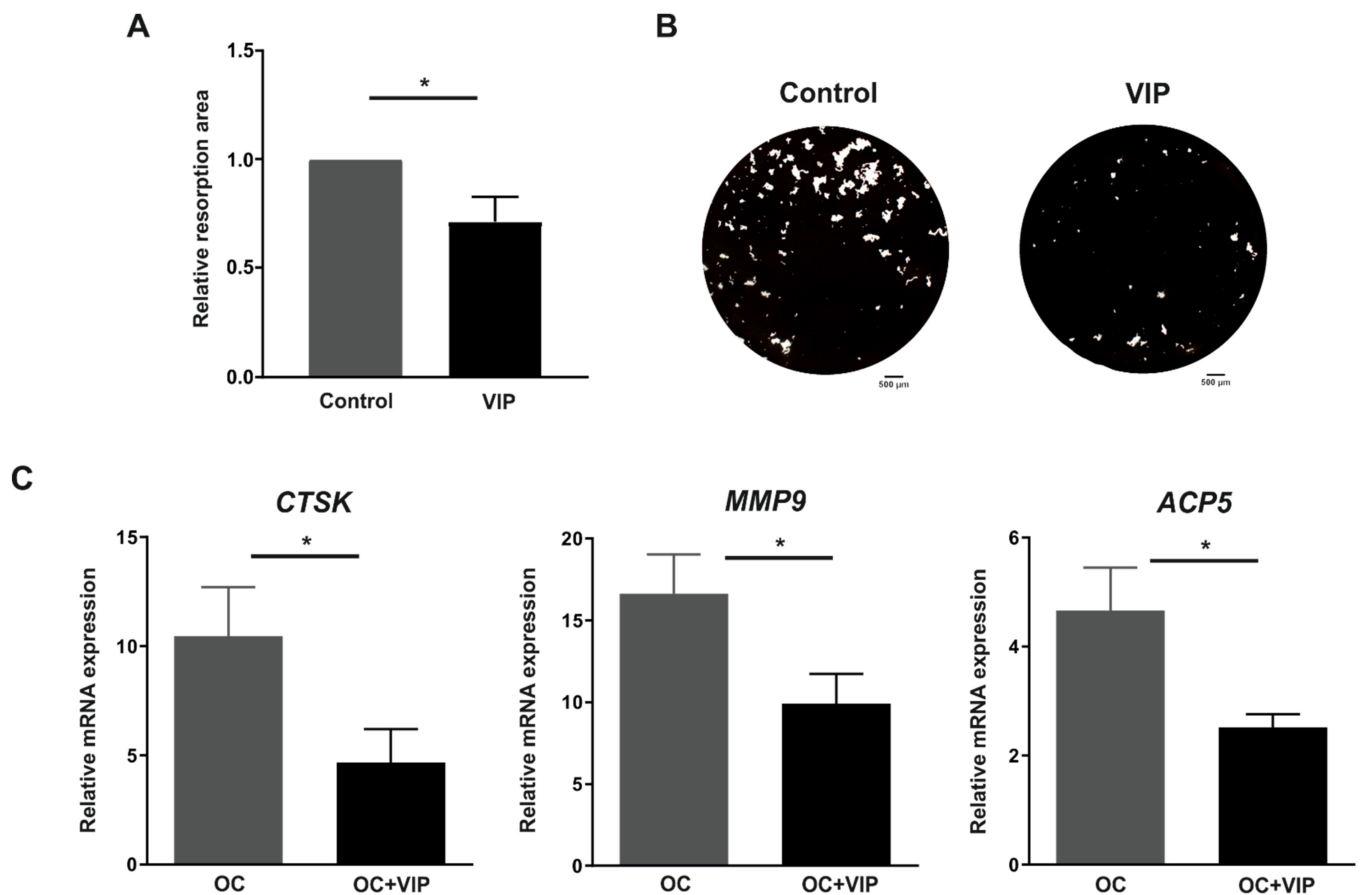


Figure 4. Osteoclast resorptive activity in vitro is decreased by VIP. After 14 days of in vitro differentiation on OsteoAssay[®] Surface Multiple Well Plate in presence or absence of VIP 10^{-8} M, wells were stained by Von Kossa staining and resorption area was quantified. (A) Effect of VIP on resorption area generated by mature osteoclast. Results are presented as percentages relative to the control (mature osteoclasts). (B) Photomicrographs of resorption areas formed by osteoclasts differentiated in the absence (control) or presence of VIP (VIP). (C) *CTSK*, *MMP9* and *ACP5* mRNA expression levels in differentiated osteoclasts in absence (OC) or presence of VIP 10^{-8} M (OC+VIP) was determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels). The means \pm SEM of triplicate determinations of 12 independent experiments are shown. Mann–Whitney U test was performed (* $p < 0.05$).

To evaluate the molecular mechanisms mediating the inhibitory effect of VIP on osteoclast resorptive activity, we further analyzed whether the gene expression of molecules involved in bone resorption, including *CTSK*, *MMP9* and *TRAP*, were modulated in osteoclasts differentiated in the presence of VIP. The results showed that VIP significantly down-regulates the mRNA levels of these three genes: *CTSK*, *MMP9* and *ACP5* ($p = 0.042$, $p = 0.035$ and $p = 0.022$, respectively) (Figure 4C).

3.5. The Formation of the Bone Resorption Lacuna Is Interfered by VIP

The formation of the resorption lacuna is dependent on $\alpha v\beta 3$ integrin interactions as well as on changes in actin cytoskeleton of osteoclast, thus we next characterized their expression in human osteoclasts differentiated in presence or absence of VIP.

Although no differences in the gene expression of αv subunit (*ITGAV*) were found, $\beta 3$ subunit (*ITGB3*) transcripts levels tend to decrease when the osteoclastogenesis occurs in presence of VIP ($p = 0.158$) (Figure 5A).

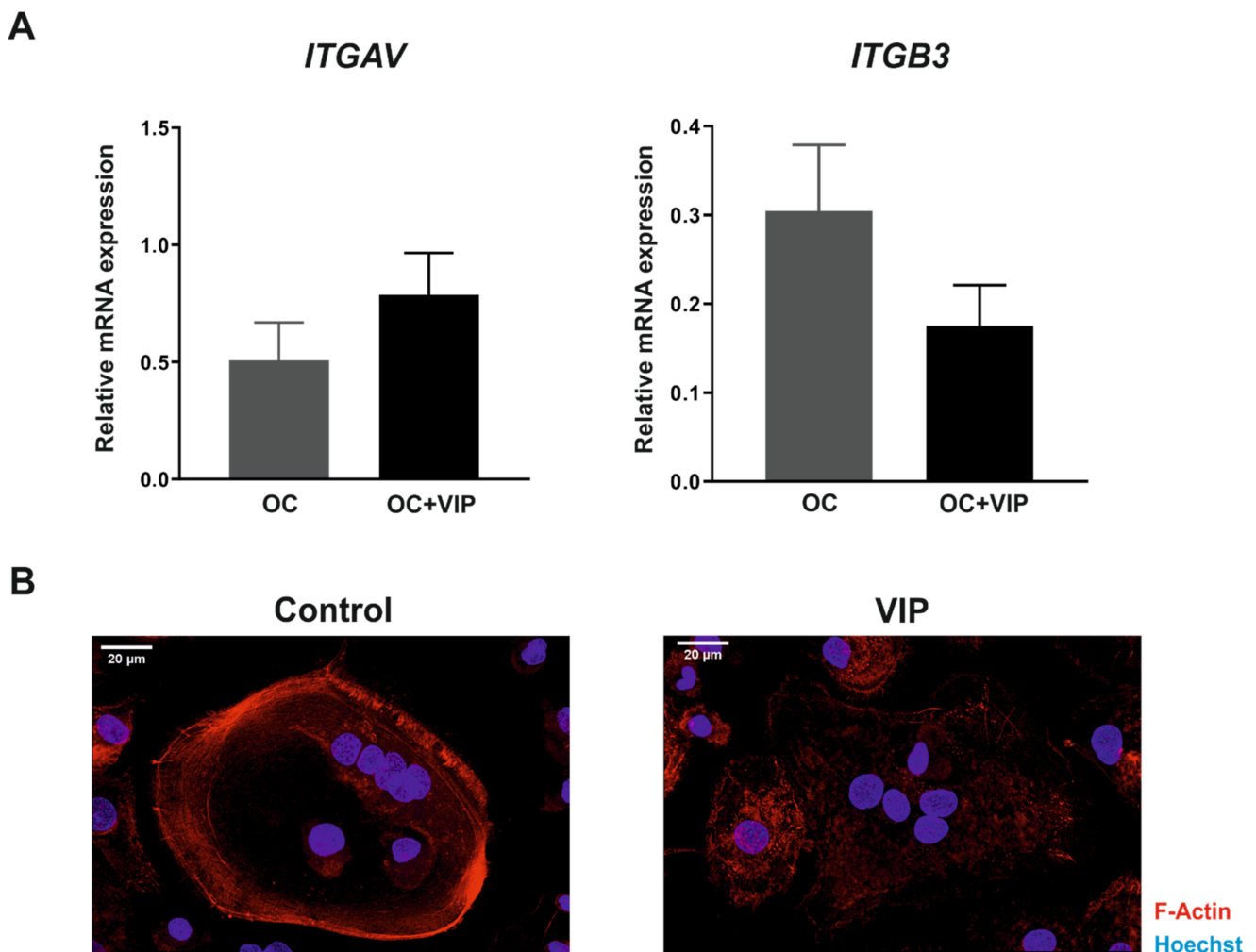


Figure 5. VIP interferes with the formation of the bone resorption lacuna. **(A)** Gene expression of $\alpha\beta 3$ integrin subunits *ITGAV* and *ITGB3* in differentiated osteoclasts in absence (OC) or presence of VIP 10^{-8} M (OC+VIP) was determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels). The means \pm SEM of triplicate determinations of 6 independent experiments are shown. Mann–Whitney U test was performed. **(B)** Photomicrographs of the effect of VIP on the ring-shaped actin cytoskeleton in differentiating osteoclast. Detection of F-actin was performed using Atto 645N-Phalloidin staining (red), nuclei were counterstained with Hoechst. Fluorescence was examined on a Leica SP8 LIGHTNING confocal microscopy.

In addition, to elucidate the effect of VIP on the actin ring formation, immunodetection and confocal microscopy techniques were performed. Our results evidenced that VIP treatment during osteoclast differentiation also affects the reorganization of the ring-shaped actin cytoskeleton, where disorganized actin structures were observed (Figure 5B).

3.6. VIP Serum Levels Influences Bone Metabolism in Early Arthritis Patients

Next, in light of our *in vitro* results, we aimed to assess whether there is a relationship between endogenous VIP levels and osteoclast resorption in RA patients. To this end, we evaluated the serum levels of molecules implicated in resorptive activity in early arthritis patients with high and low serum VIP levels.

In addition, we studied whether the serum levels of certain key molecules in bone metabolism could be related to baseline serum VIP levels in patients with early arthritis. Results revealed a trend towards a decrease in serum RANKL levels ($p = 0.27$) as well as a significant increase in OPG concentration in those patients with higher serum VIP levels ($p = 0.04$) (Figure 6A,B).

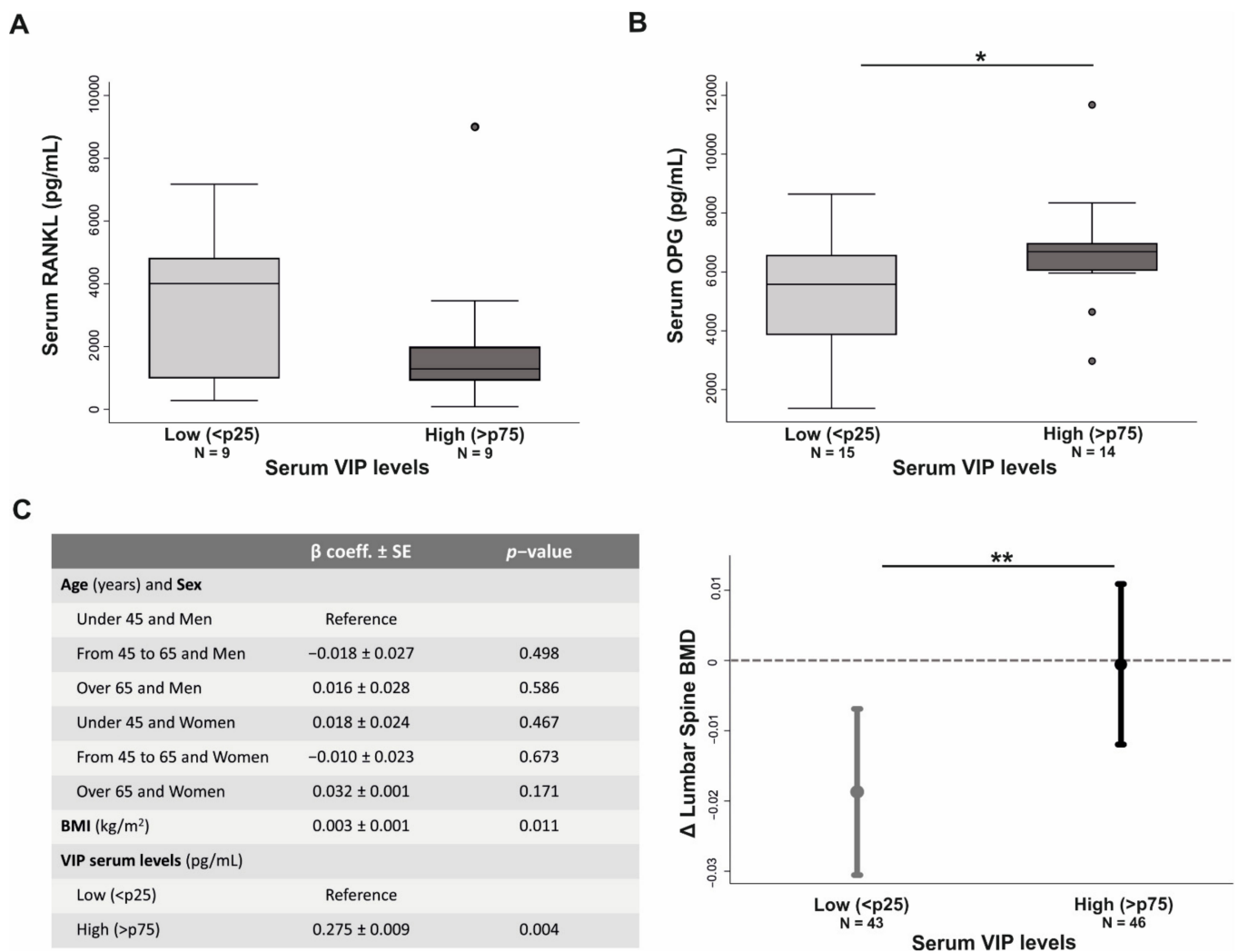


Figure 6. High serum VIP levels reduce bone metabolism markers in patients with early arthritis. Serum concentration of total RANKL (A) and OPG (B) in early arthritis patients with low (<p25) and high serum (>p75) VIP levels. Data are represented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p90 (line above the box), p10 (line below the box) and dots represents outliers. Mann–Whitney U test was performed. (C) Association between serum VIP levels and bone mineral density (BMD) variation from lumbar spine for two years follow-up in early arthritis patients. Data are shown as the mean value of BMD variation for early arthritis patients with low and high serum VIP levels adjusted for the other variables included in the multivariate analysis and the 95% confidence interval. Dotted line indicates no change in lumbar spine BMD (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$).

Finally, to further explore the potential connection between VIP and bone integrity in patients with RA, we studied the effect of serum VIP levels on bone mineral density (BMD) variation after two years follow-up in RA patients. In view of the confounding factors that could influence BMD variation, we performed a multivariate regression model with the next criteria: BMD variation as dependent variable, Body Mass Index (BMI) and the intersection between age of disease onset and sex as independent confounding factors, and VIP serum levels as independent variable. After adjustment for these confounders, our statistical analysis showed that having high serum VIP concentration was significantly associated ($p = 0.004$) with a lower BMD lost (Figure 6C).

4. Discussion

The imbalance between bone resorption and formation results in an excessive destruction of bone in rheumatic joints. In fact, an increased osteoclast differentiation and resorptive activity is recognized as a characteristic feature of RA [1,40,41]. Osteoclastogen-

esis is a multistep process controlled by complex neuro-immune-osteogenic interactions mediated by systemic hormones, local cytokines and neuropeptides. Among them, VIP has been proven to act as a negative regulator of differentiation and resorptive activity of rat and mouse osteoclasts [28–30,38], demonstrating a protective action on bone destruction in experimentally-induced arthritis [36,37]. However, the role of VIP in human osteoclastogenesis remains unexplored. To our knowledge, here we investigated for the first time the effect of VIP in human osteoclast formation and activity, corroborating its inhibitory action and unraveling the underlying molecular mechanisms and signaling pathways involved. Furthermore, we found a connection between serum levels of VIP and key regulators of osteoclastogenesis in early arthritis patients that corresponds with its bone-protective effects described in the CIA model [36,37], suggesting that VIP may contribute to improving bone homeostasis in these patients.

Our findings evidence the presence of VPAC1 and VPAC2 receptors in human osteoclast precursors and mature osteoclast differentiated in vitro, in accordance with those previously described in mouse and rat bone marrow-derived osteoclasts [28,38,42,43]. We also found that VIP receptor transcripts levels were reduced at the end of the differentiation process, showing an expression pattern consistent with that recently described in the differentiation of mouse pre-osteoclasts from bone marrow-derived macrophages [38]. These results are also in accordance with the lesser expression of VIP receptors in the human monocyte to macrophage differentiation in vitro [44], suggesting that the myeloid cell differentiation process would entail a reduction in the expression of VPAC1 and VPAC2. However, further studies are needed to determine the functional implications of these changes in the expression pattern of VIP receptors.

When we examined the modulatory action of VIP on the in vitro differentiation of human osteoclasts, a significant decrease in the number of mature osteoclasts formed was observed, in agreement with that previously reported in studies on murine models [29,38]. The molecular mechanism potentially involved in this inhibitory action showed that VIP does not affect the gene expression of receptors for M-CSF and RANKL, two critical cytokines for inducing the differentiation process [8,45]. Given that the expression of RANKL receptor is dependent on signals induced by M-CSF [46], not finding a VIP effect on the cell-surface receptor c-Fms could explain the lack of change in transcripts for RANK. Conversely, in osteoclasts formed in the presence of VIP, we detected a decrease in the expression levels of *NFTAC1* and *DCSTAMP* genes, identified as markers of osteoclast differentiation [8]. In this regard, the VIP-induced reduction of NFATc1 transcription factor is particularly noteworthy given that it is recognized as the master regulator of osteoclast formation and function [47]. As NF κ B and c-Fos are upstream of NFATc1 [48], and VIP has been shown to prevent the NF κ B and AP-1 nuclear translocation [49], this might be involved in the decreased expression of NFATc1 reported. Indeed, Qu et al. have recently reported that VIP treatment suppresses the NF κ B signaling pathway in RANKL-induced rat osteoclast formation [30]. Moreover, our findings proved that VIP also inhibits the RANKL-induced activation and nuclear translocation of NFATc1, consistent with the reduced transcriptional activity of NFAT isoform c3 (NFATc3) described in primary pulmonary artery smooth muscle cells after VIP treatment [50]. Indeed, we further reported the down-regulation of the NFATc1-regulated *DCSTAMP* gene in the presence of VIP. DCSTAMP is a protein critical for mononuclear osteoclast fusion [51], therefore a reduction in its expression could validate the decrease of mature osteoclast number observed when precursors were exposed to VIP. Taken together, our results suggest that VIP, rather than affecting the early steps of MCSF/RANKL-mediated osteoclastogenesis, exerts its modulatory action downstream of this signaling pathway by negatively regulating NFATc1 expression and activation.

This promising anti-osteoclastogenic potential of VIP was reinforced by functional studies of in vitro resorption assay. Osteoclasts generated in the presence of VIP displayed a reduced matrix resorption activity, in accordance with previous findings in rat osteoclasts [28,30,52]. In addition, we found a decrease in the mRNA levels of proteolytic enzymes involved in osteoclast resorption, including CTSK, MMP9, and TRAP, three medi-

ators regulated by NFATc1 [53–56]. A protease-signaling network has been suggested to explain their regulation. MMP9 is produced as a latent pro-enzyme, thus requiring removal of a prodomain which can be elicited by CTSK in the resorption lacuna. In turn, CTSK is endocytosed along with bone breakdown products into the osteoclast to finally fuse with TRAP-containing vesicles. This allows TRAP to be cleaved and activated by CTSK in the transcytotic vesicles where it will complete the degradation of organic components of bone [57,58]. Thus, the lesser expression of these three enzymes observed in the presence of VIP is likely to have an impact on the resorptive activity of osteoclasts which could be also explained by the negative modulation of NFATc1. Additionally, and in agreement with our results, it had already been described that VIP-signaling induces a reduction in MMP9 expression in rodent models of colitis and lung damage [59,60] as well as in fibroblastic synoviocytes from patients with osteoarthritis [61].

Adhesion of osteoclasts to the bone matrix and cell migration, both processes mediated by the membrane integrin $\alpha v \beta 3$, are essential initial steps for bone resorption [7,62]. Subsequently, reorganization of the actin cytoskeleton into a peripheral ring that also involves integrins takes place in podosomes, forming a sealing zone which isolates the resorption lacuna from the environment [6,63]. Interestingly, our results showed that osteoclast differentiation in the presence of VIP influences integrin expression as well as actin ring formation. We detected a clear trend in the reduction of integrin $\beta 3$ subunit mRNA level, which is concordant with our findings since the *ITGB3* gene is a direct target of the VIP-negatively regulated NFATc1 transcription factor [64]. Although there are no previous data regarding the impact of VIP on actin ring formation, Lundberg et al. reported that VIP reduces the number of pits in rat osteoclast cultures by inducing a rapid cytoplasmic contraction and reduced motility, both effects attributable to an altered actin cytoskeleton reorganization [28]. Therefore, results related to osteoclast activity suggest that VIP impairs bone resorption by down-regulating proteolytic enzymes and by disrupting two vital molecular mechanisms underlying the creation of a functional resorption lacuna, i.e., $\alpha v \beta 3$ integrin-dependent interactions and changes in actin filament organization.

Given that osteoclasts derived from early arthritis patients express VPAC receptors and VIP opposes the osteoclastogenic effects of M-CSF and RANKL and reduces bone resorption in vitro, we hypothesized that the VIP/VPAC receptors axis, through the action of endogenous VIP, may be involved in bone function. As a first approach to test our translational hypothesis, and considering that VIP-induced decrease of the RANKL/OPG has been involved in its protective effect on bone destruction in the CIA model [36], we analyzed their serum levels in early arthritis patients clustered according to VIP serum levels. Patients with high VIP levels showed a lower concentration of RANKL which, although not statistically significant, is noteworthy as significantly increased levels of OPG were also found, thus resulting in a decrease in the RANKL/OPG ratio. Interestingly, an analogous reduction of the RANKL/OPG balance associated with a decrease in osteoclast activity has been shown to be induced by VIP in vitamin D-stimulated osteoclastogenesis in mouse marrow cultures [29] as well as in rat osteoclasts [30]. Moreover, we further found that early arthritis patients with elevated serum VIP levels exhibit lower BMD loss, a clinical marker for bone strength that has been associated with joint damage in RA [19,21,22]. Consequently, our data would imply that VIP might dampen the osteoclastic component in RA pathogenesis by modulating the RANKL/OPG ratio in favor of OPG. These findings would agree with recent studies showing that serum VIP levels can be used as a prognostic biomarker in early arthritis given that, although no differences in serum neuropeptide levels between patients and healthy donors have been reported, those patients with low baseline levels have a poorer clinical course [34,35].

In summary, our results from the differentiation of human osteoclasts in vitro in the presence of VIP indicate that its direct anti-osteoclastogenic effect is present in human cells, impairing both differentiation and resorption activity, mainly through the negative regulation of NFATc1. In addition, our findings on the relationship between serum levels of VIP and bone metabolism markers in early arthritis patients are in line with our hypothesis

about bone-protective effects of VIP in humans, and also point out that in addition to exerting a direct inhibitory effect on osteoclasts, this neuropeptide seems to regulate the RANK/RANKL/OPG system. Therefore, although other molecular mechanisms underlying the VIP anti-osteoclastogenic effects need to be explored, our present results could contribute to establishing the basis to validate the potential of VIP in the improvement of bone homeostasis in RA patients.

Author Contributions: Conceptualization, D.C.-V., M.C. and R.P.G.; methodology, D.C.-V., A.L., P.A.-C., I.G.-C. and M.C.; software, D.C.-V., P.A.-C. and R.V.-R.; validation, A.L. and I.G.-C.; formal analysis, D.C.-V., A.L. and P.A.-C.; investigation, D.C.-V., P.A.-C., R.P.G. and M.C.; resources, A.L., C.M., Y.J. and I.G.-Á.; data curation, D.C.-V., A.L. and S.P.-G.; writing—original draft preparation, D.C.-V., M.C. and R.P.G.; writing—review and editing, I.G.-C., P.A.-C., R.V.-R., S.P.-G., C.M., Y.J., S.F.d.C. and I.G.-Á.; supervision, Y.J., I.G.-Á. and R.P.G.; project administration, Y.J., I.G.-Á. and R.P.G.; funding acquisition, Y.J., I.G.-Á. and R.P.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, grant numbers PI17/00027, PI20/00078, RD16/0012/0008 and RD16/0012/0011, co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Institutional Review Board Statement: All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (PI-518).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the lack of an existing repository.

Acknowledgments: We are grateful to Elena Neumann's Lab (Department of Internal Medicine and Rheumatology, Justus-Liebig-Universität Giessen) for their assistance and guidance in osteoclast differentiation techniques and study of osteoclast biology. We thank Miriam González Diego for her generous assistance in obtaining the study samples.

Conflicts of Interest: I.G.-A. reports personal fees from Lilly (Indianapolis, IN, USA) and Sanofi (Gentilly, France); personal fees and non-financial support from BMS (New York, NY, USA); personal fees and non-financial support from AbbVie (Madrid, Spain); research support, personal fees, and non-financial support from Roche Laboratories; research support from Gebro Pharma (Barcelona, Spain); and non-financial support from MSD (Branchburg, NJ, USA), Pfizer (New York, NY, USA), and Novartis (Madrid, Spain), not related to the submitted work. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Fang, Q.; Zhou, C.; Nandakumar, K.S. Molecular and Cellular Pathways Contributing to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. *Mediat. Inflamm.* **2020**, *2020*, 3830212. [[CrossRef](#)]
2. Gravallesse, E.M.; Harada, Y.; Wang, J.T.; Gorn, A.H.; Thornhill, T.S.; Goldring, S.R. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152*, 943–951.
3. Smolen, J.; Aletaha, D.; Barton, A. Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4*, 18001. [[CrossRef](#)]
4. Karmakar, S.; Kay, J.; Gravallesse, E.M. Bone Damage in Rheumatoid Arthritis: Mechanistic Insights and Approaches to Prevention. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **2010**, *36*, 385–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Shaw, A.T.; Gravallesse, E.M. Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *49*, 2–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Blangy, A.; Bompard, G.; Guerit, D.; Marie, P.; Maurin, J.; Morel, A.; Vives, V. The osteoclast cytoskeleton—Current understanding and therapeutic perspectives for osteoporosis. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, jcs244798. [[CrossRef](#)]
7. Nakamura, I.; Pilkington, M.; Lakkakorpi, P.; Lipfert, L.; Sims, S.; Dixon, S.J.; Rodan, G.; Duong, L. Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 3985–3993. [[CrossRef](#)]
8. Jacome-Galarza, C.E.; Percin, G.I.; Muller, J.T.; Mass, E.; Lazarov, T.; Eitler, J.; Rauner, M.; Yadav, V.K.; Crozet, L.; Bohm, M.; et al. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *568*, 541–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Tanaka, S.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Tamura, T.; Akatsu, T.; Stanley, E. Mcsf is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin. Investig.* **1993**, *91*, 257–263. [[CrossRef](#)]
10. Takayanagi, H.K.; Sunhwa, K.; Takako, N.; Hiroshi, I.; Masashi, Y.; Hiroki, S.; Akio, I.; Miho, Y.; Taeko, I.; Jun, I.; et al. Induction and activation of the transcription factor nfatc1 (nfat2) integrate rankl signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 889–901. [[CrossRef](#)]
11. Park, J.H.; Lee, N.K.; Lee, A.S.Y. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol. Cells* **2017**, *40*, 706–713. [[CrossRef](#)]
12. Dodds, R.A.; James, I.E.; Rieman, D.; Ahern, R.; Hwang, S.M.; Connor, J.R.; Thompson, S.D.; Veber, D.F.; Drake, F.H.; Holmes, S.; et al. Human Osteoclast Cathepsin K Is Processed Intracellularly Prior to Attachment and Bone Resorption. *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 478–486. [[CrossRef](#)]
13. Zhu, L.; Tang, Y.; Li, X.-Y.; Keller, E.T.; Yang, J.; Cho, J.-S.; Feinberg, T.Y.; Weiss, S.J. Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Udagawa, N.; Koide, M.; Nakamura, M.; Nakamichi, Y.; Yamashita, T.; Uehara, S.; Kobayashi, Y.; Furuya, Y.; Yasuda, H.; Fukuda, C.; et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J. Bone Miner. Metab.* **2021**, *39*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Walsh, M.; Choi, Y. Biology of the rankrank-opg system in immunity, bone, and beyond. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 511. [[CrossRef](#)]
16. Steffen, U.; Schett, G.; Bozec, A. How Autoantibodies Regulate Osteoclast Induced Bone Loss in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1483. [[CrossRef](#)]
17. Neumann, E.; Gay, S.; Müller-Ladner, U. The RANK/RANKL/osteoprotegerin system in rheumatoid arthritis: New insights from animal models. *Arthritis Rheum.* **2005**, *52*, 2960–2967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Walsh, N.C.; Crotti, T.N.; Goldring, S.R.; Gravallesse, E.M. Rheumatic diseases: The effects of inflammation on bone. *Immunol. Rev.* **2005**, *208*, 228–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Guler-Yuksel, M.; Bijsterbosch, J.; Goekoop-Ruiterman, Y.P.M.; De Vries-Bouwstra, J.K.; Hulsmans, H.M.J.; De Beus, W.M.; Han, K.H.; Breedveld, F.C.; Dijkmans, B.A.C.; Allaart, C.F.; et al. Changes in bone mineral density in patients with recent onset, active rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67*, 823–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Devlin, J.; Lilley, J.; Gough, A.; Huissoon, A.; Holder, R.; Reece, R.; Perkins, P.; Emery, P. Clinical associations of dual-energy X-ray absorptiometry measurement of hand bone mass in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* **1996**, *35*, 1256–1262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Deodhar, A.A.; Brabyn, J.; Pande, I.; Scott, D.L.; Woolf, A.D. Hand bone densitometry in rheumatoid arthritis, a five year longitudinal study: An outcome measure and a prognostic marker. *Ann. Rheum. Dis.* **2003**, *62*, 767–770. [[CrossRef](#)]
22. Llorente, I.; Garcia-Castaneda, N.; Valero, C.; Gonzalez-Alvaro, I.; Castaneda, S. Osteoporosis in rheumatoid arthritis: Dangerous liaisons. *Front. Med.* **2020**, *7*, 601–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Auréal, M.; Machuca-Gayet, I.; Coury, F. Rheumatoid Arthritis in the View of Osteoimmunology. *Biomolecules* **2020**, *11*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Huang, S.; Li, Z.; Liu, Y.; Gao, D.; Zhang, X.; Hao, J.; Yang, F. Neural regulation of bone remodeling: Identifying novel neural molecules and pathways between brain and bone. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 5466–5477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lerner, U.H. Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2002**, *2*, 440–447. [[PubMed](#)]
26. Lerner, U.H.; Persson, E. Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2008**, *8*, 154–165.
27. Lundberg, P.; Boström, I.; Mukohyama, H. Neuro-hormonal control of bone metabolism: Vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mrna expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules. *Regul. Pept.* **1999**, *85*, 47–58. [[CrossRef](#)]
28. Lundberg, P.; Lie, A.; Bjurholm, A.; Lehenkari, P.; Horton, M.; Lerner, U.; Ransjö, M. Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts. *Bone* **2000**, *27*, 803–810. [[CrossRef](#)]
29. Mukohyama, H.; Ransjö, M.; Taniguchi, H.; Ohyama, T.; Lerner, U. The Inhibitory Effects of Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide on Osteoclast Formation Are Associated with Upregulation of Osteoprotegerin and Downregulation of RANKL and RANK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *271*, 158–163. [[CrossRef](#)]
30. Qu, H.; Zhuang, Y.; Zhu, L.; Zhao, Z.; Wang, K. The effects of vasoactive intestinal peptide on rankl-induced osteoclast formation. *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 127. [[CrossRef](#)]
31. Gozes, I. VIP, From Gene to Behavior and Back: Summarizing my 25 Years of Research. *J. Mol. Neurosci.* **2008**, *36*, 115–124. [[CrossRef](#)]
32. Gomariz, R.P.; Juarranz, Y.; Carrión, M.; Pérez-García, S.; Romero, R.V.; González-Álvaro, I.; Gutiérrez-Cañas, I.; Lamana, A.; Martínez, M.D.C. An Overview of VPAC Receptors in Rheumatoid Arthritis: Biological Role and Clinical Significance. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 729. [[CrossRef](#)]
33. Martínez, C.; Juarranz, Y.; Gutiérrez-Cañas, I.; Carrión, M.; Pérez-García, S.; Villanueva-Romero, R.; Castro, D.; Lamana, A.; Mellado, M.; González-Álvaro, I.; et al. A Clinical Approach for the Use of VIP Axis in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Martínez, C.; Ortiz, A.M.; Juarranz, Y.; Lamana, A.; Seoane, I.V.; Leceta, J.; García-Vicuña, R.; Gomariz, R.P.; González-Álvaro, I. Serum Levels of Vasoactive Intestinal Peptide as a Prognostic Marker in Early Arthritis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e85248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Seoane, I.V.; Martínez, M.D.C.; García-Vicuña, R.; Ortiz, A.M.; Juarranz, Y.; Talayero, V.C.; González-Álvaro, I.; Gomariz, R.P.; Lamana, A. Vasoactive intestinal peptide gene polymorphisms, associated with its serum levels, predict treatment requirements in early rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Juarranz, Y.; Abad, C.; Martínez, C.; Arranz, A.; Gutierrez-Cañas, I.; Rosignoli, F.; Gomariz, R.P.; Leceta, J. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **2005**, *7*, R1034–R1045. [[CrossRef](#)]
37. Delgado, M.; Abad, C.; Martínez, C.; Leceta, J.; Gomariz, R.P. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 563–568. [[CrossRef](#)]
38. Eger, M.; Liron, T.; Hiram-Bab, S.; Awida, Z.; Giladi, E.; Dangoor, D.; Fridkin, M.; Kohavi, D.; Gozes, I.; Gabet, Y. Therapeutic Potential of Vasoactive Intestinal Peptide and its Derivative Stearyl-Norleucine-VIP in Inflammation-Induced Osteolysis. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 638128. [[CrossRef](#)]
39. Gonzalez-Alvaro, I.; Ortiz, A.M.; Álvaro-Gracia, J.M.; Castañeda, S.; Díaz-Sánchez, B.; Carvajal, I.; García-Vadillo, J.A.; Humbría, A.; López-Bote, J.P.; Patiño, E.; et al. Interleukin 15 Levels in Serum May Predict a Severe Disease Course in Patients with Early Arthritis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e29492. [[CrossRef](#)]
40. Schett, G.; Gravalles, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: Mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 656–664. [[CrossRef](#)]
41. Fardellone, P.; Salawati, E.; Le Monnier, L.; Goëb, V. Bone Loss, Osteoporosis, and Fractures in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3361. [[CrossRef](#)]
42. Muschter, D.; Schäfer, N.; Stangl, H.; Straub, R.H.; Grässel, S. Sympathetic Neurotransmitters Modulate Osteoclastogenesis and Osteoclast Activity in the Context of Collagen-Induced Arthritis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139726. [[CrossRef](#)]
43. Ransjö, M.; Lie, A.; Mukohyama, H.; Lundberg, P.; Lerner, U. Microisolated mouse osteoclasts express vip-1 and pacap receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274*, 400–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Carrión, M.; Pérez-García, S.; Martínez, C.; Juarranz, Y.; Estrada-Capetillo, L.; Puig-Kröger, A.; Gomariz, R.P.; Gutiérrez-Cañas, I. VIP impairs acquisition of the macrophage proinflammatory polarization profile. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 1385–1393. [[CrossRef](#)]
45. Paniagua, R.T. C-fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2010**, *12*, R32. [[CrossRef](#)]
46. Arai, F.; Miyamoto, T.; Ohneda, O.; Inada, T.; Sudo, T.; Brasel, K.; Miyata, T.; Anderson, D.; Dirk, M.; Suda, T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-fms and receptor activator of nuclear factor kappa b (rank) receptors. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1741–1754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Takayanagi, H. RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* **2021**, *39*, 13–18. [[CrossRef](#)]
48. Kim, J.H.; Kim, N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J. Bone Metab.* **2014**, *21*, 233–241. [[CrossRef](#)]
49. Carrión, M.; Juarranz, Y.; Pérez-García, S.; Jimeno, R.; Pablos, J.L.; Gomariz, R.P.; Gutiérrez-Cañas, I. RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum.* **2011**, *63*, 1626–1636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Szema, A.M.; Forsyth, E.; Ying, B.; Hamidi, S.A.; Chen, J.J.; Hwang, S.; Li, J.C.; Dwyer, D.S.; Ramiro-Diaz, J.M.; Giermakowska, W.; et al. NFATc3 and VIP in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170606. [[CrossRef](#)]
51. Ishii, T.; Ruiz-Torruella, M.; Ikeda, A.; Shindo, S.; Movila, A.; Mawardi, H.; Albassam, A.; Kayal, R.A.; Al-Dharrab, A.A.; Egashira, K.; et al. OC-STAMP promotes osteoclast fusion for pathogenic bone resorption in periodontitis via up-regulation of permissive fusogen CD. *FASEB J.* **2018**, *32*, 4016–4030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Qu, H.; Wang, K.; Zhuang, Y. Expression of neuropeptide y and vasoactive intestine peptide in pathological tissues of con-genital pseudarthrosis of the tibia and its clinical significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2016**, *9*, 8172–8180.
53. Logar, D.B.; Komadina, R.; Preželj, J.; Ostanek, B.; Trošt, Z.; Marc, J. Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* **2007**, *25*, 219–225. [[CrossRef](#)]
54. Matsumoto, M.; Kogawa, M.; Wada, S.; Takayanagi, H.; Tsujimoto, M.; Katayama, S.; Hisatake, K.; Nogi, Y. Essential Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45969–45979. [[CrossRef](#)]
55. Song, I.; Kim, J.H.; Kim, K.; Jin, H.M.; Youn, B.U.; Kim, N. Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2435–2440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kim, K.; Kim, J.; Lee, J.; Jin, H.; Lee, S.; Fisher, D.; Kook, H.; Kim, K.; Choi, Y.; Kim, N. Nuclear factor of activated t cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cyto-kine-mediated osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35209–35216. [[CrossRef](#)]
57. Christensen, J.; Shastri, V.P. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. *BMC Res. Notes* **2015**, *8*, 322. [[CrossRef](#)]

58. Ljusberg, J.; Wang, Y.; Lång, P.; Norgård, M.; Dodds, R.; Hultenby, K.; Ek-Rylander, B.; Andersson, G. Proteolytic Excision of a Repressive Loop Domain in Tartrate-resistant Acid Phosphatase by Cathepsin K in Osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28370–28381. [[CrossRef](#)]
59. Ganea, D.; Hooper, K.; Kong, W. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: Direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. *Acta Physiol.* **2015**, *213*, 442–452. [[CrossRef](#)]
60. Liu, Y.-P.; Guan, C.-X.; Bai, H.-B.; Qin, X.-Q.; Liu, H.-J. Effects of vasoactive intestinal peptide on LPS-induced MMP-9 expression by alveolar macrophages in rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **2005**, *30*, 645–649. [[PubMed](#)]
61. Pérez-García, S.; Carrión, M.; Jimeno, R.; Ortiz, A.M.; González-Álvaro, I.; Fernández, J.; Gomariz, R.P.; Juarranz, Y. Urokinase Plasminogen Activator System in Synovial Fibroblasts from Osteoarthritis Patients: Modulation by Inflammatory Mediators and Neuropeptides. *J. Mol. Neurosci.* **2013**, *52*, 18–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Novack, D.V.; Faccio, R. Osteoclast motility: Putting the brakes on bone resorption. *Ageing Res. Rev.* **2011**, *10*, 54–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Jurdic, P.; Saltel, F.; Chabadel, A.; Destaing, O. Podosome and sealing zone: Specificity of the osteoclast model. *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 195–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Crotti, T.N.; Flannery, M.; Walsh, N.C.; Fleming, J.D.; Goldring, S.R.; McHugh, K.P. NFATc1 regulation of the human β 3 integrin promoter in osteoclast differentiation. *Gene* **2006**, *372*, 92–102. [[CrossRef](#)]


Artículo 2

Vasoactive intestinal peptide exerts an osteoinductive effect in human mesenchymal stem cells.

Biofactors. 2024 Nov-Dec;50(6):1148-1160.



Vasoactive intestinal peptide exerts an osteoinductive effect in human mesenchymal stem cells

David Castro-Vázquez¹  | Paula Arribas-Castaño¹ | Iván García-López¹ | Irene Gutiérrez-Cañas¹ | Selene Pérez-García¹ | Amalia Lamana¹ | Raúl Villanueva-Romero¹ | Alicia Cabrera-Martín¹ | Karolina Tecza¹ | Carmen Martínez² | Yasmina Juarranz¹ | Rosa P. Gomariz¹ | Mar Carrión¹

¹Department of Cell Biology, Faculty of Biological Science, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

²Departmental Section of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Correspondence

Mar Carrión, Department of Cell Biology, Faculty of Biological Science, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.
Email: macarrio@ucm.es

Funding information

Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III), Grant/Award Numbers: PI20/00078, RD21/0002/004; European regional development fund (ERDF)

Abstract

Several neuropeptides present in bone tissues, produced by nerve fibers and bone cells, have been reported to play a role in regulating the fine-tuning of osteoblast and osteoclast functions to maintain bone homeostasis. This study aims to characterize the influence of the neuropeptide vasoactive intestinal peptide (VIP) on the differentiation process of human mesenchymal stem cells (MSCs) into osteoblasts and on their anabolic function. We describe the mRNA and protein expression profile of VIP and its receptors in MSCs as they differentiate into osteoblasts, suggesting the presence of an autocrine signaling pathway in these cells. Our findings reveal that VIP enhances the expression of early osteoblast markers in MSCs under osteogenic differentiation and favors both bone matrix formation and proper cytoskeletal reorganization. Finally, our data suggest that VIP could be exerting a direct modulatory role on the osteoblast to osteoclast signaling by downregulating the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin ratio. These results highlight the potential of VIP as an osteoinductive differentiation factor, emerging as a key molecule in the maintenance of human bone homeostasis.

KEYWORDS

actin cytoskeleton, bone metabolism, human mesenchymal stem cells, osteogenesis, VIP

1 | INTRODUCTION

Physiological bone remodeling and bone homeostasis depend to a large extent on the dynamic coupling

David Castro-Vázquez and Paula Arribas-Castaño contributed equally to this study.

Yasmina Juarranz and Mar Carrión jointly supervised this work.

between osteoclastic resorption and osteoblastic osteogenesis. The fine-tuning of this system is essential for the proper maintenance of the skeleton and for fracture healing.¹ Therefore, when such a fine equilibrium is pathologically disrupted in favor of bone erosion, homeostasis is compromised. In some pathological conditions, such as osteoporosis, resorption exceeds formation, compromising bone integrity. In others, resorption occurs

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2024 The Authors. *BioFactors* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

autonomously without direct association with subsequent bone formation, leading to focal bone loss, as observed in rheumatoid arthritis (RA).^{2,3}

Osteoblasts are cuboidal shaped cells responsible for bone matrix synthesis and mineralization mostly located on active bone-forming surfaces. These cells arise from the sequential commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells (MSCs) to the osteoblastic lineage.⁴ Upon osteoblastic commitment, preosteoblasts undergo proliferation, exit the cell cycle and initiate an early differentiation to immature osteoblasts, characterized by the secretion of bone matrix proteins.⁵ The maturation of extracellular matrix is followed by calcium deposition that depends on the expression of alkaline phosphatase (ALP) by phenotypically mature osteoblasts, thus mediating the extracellular matrix mineralization.⁶ Therefore, the osteoblastogenic process actually involves a tightly organized sequence of biochemical events controlled by numerous signals. Among them, the transcription factor Runx2 is recognized as a key molecular switch in osteoblast differentiation, being essential for both the attenuation of osteoblast growth and the activation of genes encoding major osteoid proteins, such as type I collagen. In turn, this osteoblast master regulator is modulated by different upstream signaling pathways, including the Wnt/ β -catenin system.⁷ Moreover, cell adhesion dynamics and structural changes in F-actin networks are important events during osteoblastogenesis.⁸ Differentiating osteoblasts adhere to the extracellular matrix through focal adhesion complexes involving vinculin, which plays a key role in the dynamic of these molecular complexes.⁹ When MSCs undergo osteogenic differentiation, the actin cytoskeleton becomes more diffuse, and the distribution of focal adhesions changes.⁸ This cytoskeletal rearrangement is accompanied by changes in cell morphology and cytoskeletal tension, which are suggested to ultimately regulate the spatiotemporal genetic program that governs osteoblast commitment and maturation.^{10,11}

Multilayered control of MSCs osteodifferentiation is in accordance with the crucial role of osteoblasts in the maintenance of bone homeostasis. In fact, normal bone metabolism relies on the balance between its osteogenic activity and osteoclast-mediated osteolysis, being further orchestrated by a variety of autocrine and paracrine factors ranging from systemic hormones to local osteotropic cytokines and growth factors.^{12,13} One of the main cross-talking pathways between osteoblast and osteoclast is the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG) system. RANKL, mainly produced by osteoblasts, binds to its receptor RANK on osteoclast precursors and stimulates their differentiation, activity, and survival. This osteoclastogenic signaling can in turn be blocked by OPG, a decoy receptor for RANKL

also secreted by osteoblasts.^{14,15} Besides, several lines of evidence indicate that neuropeptides released from skeletal nerve fibers, and in some cases, by bone cells, are likewise involved in the complex network of signals regulating bone homeostasis.^{16–19}

The vasoactive intestinal peptide (VIP) is a ubiquitous neuropeptide expressed in both the peripheral and central nervous system as well as in immune and endocrine cells. The presence of VIP-immunoreactive nerve fibers has been demonstrated in bone and periosteum tissue in several mammalian species, including humans.^{20,21} More recently, immunohistochemistry has shown that VIP is expressed in the subchondral bone, bone marrow cavities, and bone cells of patients with osteoarthritis.¹⁹ According to its wide distribution, VIP exhibits pleiotropic effects in physiological and pathological conditions, which are mainly exerted through two specific G protein-coupled receptors, VPAC1 and VPAC2. In fact, VIP has shown potent anti-inflammatory and immunomodulatory properties in different inflammatory/autoimmune contexts.²² In particular, findings from murine models of RA and human studies have evidenced a protective action of VIP on bone destruction, which is likely associated with a decreased RANKL/OPG ratio.^{23–25} Furthermore, VIP has also demonstrated anti-osteoclastogenic effects in animal models and in human cells, impairing both differentiation and resorption activity.^{25–29} However, data on human osteoblasts are very scarce and limited to describing the presence of functional VIP receptors in human periosteum-derived osteoblastic cells (SaM-1) and human osteosarcoma-derived cells (SaOS-2, HOS, and MG-63).^{30–33}

This study aims to address the research gap regarding the influence of VIP on the differentiation process of human MSCs to osteoblasts and on their anabolic function. We further analyze whether such potential osteogenic effects are accompanied by a modulation of the osteoblast regulatory activity on osteoclastogenesis. Overall, our results could represent a key first step in deciphering the involvement of VIP in the maintenance and restoration of human bone homeostasis, as it might play a pivotal role in coordinating osteoblast and osteoclast biology.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Osteogenic differentiation cell culture

Bone marrow-human mesenchymal stem cells (BM-hMSC) from four healthy donors (two men and two women) belonging to different ethnicities and age ranges

(30–50 years) were used. These cells were obtained commercially from StemCell Technologies (Catalog #70071) and are characterized for MSC specific markers and tested for their ability to differentiate *in vitro* into the different lineages. Culture wells were previously treated with a commercial attachment solution to facilitate cell adherence. Then, BM-hMSC were plated at 8×10^3 cells/cm² in 24-well plates and 8-well chambers in MesenCult™-ACF Plus medium (StemCell) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Cultek), 1% glutamax (Sigma-Aldrich), and 0.2% of its specific commercial supplement. Once the cells reached 90% confluency, osteogenic induction was performed. MesenCult medium was exchanged for Osteogenic Differentiation medium (StemCell) supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamax and 20% of its specific commercial supplement, medium was changed every 3 days. At this point, 10^{-8} M VIP (Bachem A.G.) was added to some of the wells. As previously described,³⁴ differentiation cultures in the presence and absence of the neuropeptide were maintained over 14 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

The optimal dose of VIP for our study was selected based on a preliminary experiment using osteoblast differentiation cultures of an human telomerase reverse transcriptase (hTERT) immortalized adipose-derived mesenchymal stem cell line. The effect of different concentrations of VIP (10^{-6} , 10^{-7} , and 10^{-8} M) on the gene expression of the osteogenic master regulator Runx2 was studied on Days 1, 4, and 7. Results indicated that 10^{-8} M was the most effective concentration of VIP for upregulating the mRNA levels of Runx2 (data not shown) and therefore the optimal concentration for studying the osteoinductive effects of VIP.

2.2 | Real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis

Total RNA from both BM-hMSC and cells under osteoblast differentiation conditions on Days 1, 4, 7, 10 and 14 was extracted using TriReagent (Sigma-Aldrich). RNA

quantity and purity were measured on NanoDrop®, and 2 µg were used for complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies).

Specific TaqMan probes for target genes (*CTNBN1*, *RUNX2*, *COL1A1*, *TNFSF11*, *TNFRSF11B*, *VIPR1*, and *VIPR2*) and one house-keeping gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)) with manufacturer-predesigned primers were used along with TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) to perform real-time PCR analyses. For the VIP gene, transcript levels were analyzed by semi-quantitative PCR with SYBR® Green PCR Master Mix (Promega) using *GAPDH* as the house-keeping gene. The sequence of primers used and accession numbers of the genes analyzed with SYBR® technology are summarized in Table 1. Assays were made in triplicate, and results were normalized according to the expression levels of *GAPDH*.

2.3 | Western blot analysis of VPAC receptors, β-catenin and Runx2

Protein extracts were obtained in ice-cold radioimmuno-precipitation assay buffer (ThermoFisher). Protein extracts (25 µg for β-catenin and Runx2 and 30 µg for VIP receptors) were subjected to 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-human β-catenin (1:1000, Invitrogen), rabbit monoclonal anti-human Runx2 (1:500, Invitrogen), rabbit polyclonal anti-human VPAC1 (1:10000, ThermoFisher), and mouse monoclonal anti-human VPAC2 (1:1000, Abnova). Rabbit anti-*GAPDH* (1:5000, Sigma-Aldrich) was used as a loading control. Then, anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:5000, ECL) were used, and proteins were detected using SuperSignal WestPico Chemiluminescent System (Cytiva Amersham). Results were analyzed using the Bio-Rad Quantity One program and normalized against *GAPDH*.

TABLE 1 Sequence of primers and accession numbers of the genes analyzed.

Gene	GenBank accession no.	Sequence position	Primers	Sequence
VIP	NM_003381.4	98–209	hVIP	Forward: 5'-TCAGCACCTAAGACAGCTCCA-3' Reverse: 5'-AGCACACTGAGAAGAGTCAGG-3'
GAPDH	NM_002046.7	57–130	hGAPDH	Forward: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' Reverse: 5'-GAGTAAAAGCAGCCCTGTTG-3'

2.4 | Determination of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentrations

Levels of cAMP were determined by the HitHunter cAMP Assay for Small Molecules Kit (DiscoverX). On the seventh day of the osteogenic process, 40×10^3 cells were stimulated with 10^{-8} M VIP, 10^{-8} M VPAC1 agonist [Lys¹⁵Arg¹⁶Leu²⁷VIP(1-7)-GRF(8-27)] (Bachem, Bubendorf, Switzerland) or 10^{-8} M VPAC2 agonist (RO 25-1553; Bachem). After 30 min at 37°C, the reaction was terminated, and cells were lysed. Concentration of cAMP in the lysates was measured according to the manufacturer's instructions.

2.5 | Measurement of vasoactive intestinal peptide levels in culture supernatants

Levels of VIP were assessed using a commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Phoenix Pharmaceuticals) according to the manufacturer's instructions. Supernatant samples were concentrated at 2:1 using the Eppendorf Concentrator Plus. Thanks to the establishment of a standard curve with known concentrations and its extrapolation, supernatant VIP levels were determined, applying the corresponding dilution factor. Each sample was assayed twice.

2.6 | Evaluation of alkaline phosphatase concentration in culture supernatants

After 10 days of BM-hMSC culture in osteogenic differentiation medium, evaluation of ALP levels in culture supernatants was assessed by means of a commercial kit (MAK447-Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The enzyme present in the sample hydrolyzes the *p*-nitrophenyl phosphate of the kit's working reagent, resulting in a yellow-colored reaction. The absorbance at 405 nm was measured at time 0 and after 4 min of said reaction. All generated data were included in the instruction's formula so that ALP units per liter of sample could be calculated.

2.7 | Quantification of calcium deposits through alizarin red stain

On Day 10 of osteogenic differentiation cultures, the mineralizing activity of cells was assessed following a method

similar to an already published protocol.^{35,36} Cells were fixed and then stained with alizarin red (pH 4.2, Sigma) for 20 min in the dark at room temperature. After washing, only the calcium deposits produced by the cells were stained bright red. These results were photographed with a microscope coupled to a Nikon DS-Ri2 camera. To quantify the amount of alizarin red bound to the mineralized matrix, the staining was solubilized in a 10% cetylpyridinium chloride (CPC) solution (pH 7, Sigma) for 30 min. The optical density (OD) values were measured at 562 nm and the results were interpolated in a standard line prepared in the range 0.03–2 mM with alizarin red solubilized in CPC.

2.8 | Detection of F-actin and vinculin by confocal fluorescence microscopy

Immunocytochemistry studies were performed with the Actin Cytoskeleton/Focal Adhesion Staining Kit (FAK100, Sigma-Aldrich). BM-hMSC were seeded into 8-well chambers (Ibidi) and cultured for 4 days under osteogenic differentiation conditions. On Day 4, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with 0.1% Triton/phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min. Once cells were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA)/PBS for 30 min at room temperature (RT), the samples were incubated for 1 h at RT with mouse anti-human vinculin (1:250) and TRITC-conjugated phalloidin (for F-actin labeling) (1:500). After washing, cells were incubated in darkness with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (ThermoFisher) (1:500) for 1 h at RT. Lastly, nuclei cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1:1000. Fluorescence was examined using a Leica SP-8 LIGHTNING confocal microscope (Leica DM IRE2; objective 40x; Leica Microsystems). Acquired images were processed by FIJI-Image J software.

2.9 | Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 8.0 software. Parametric variables were analyzed via *t*-test and analysis of variance (ANOVA) together with Dunnett's *post hoc* test, while non-parametric variables were analyzed using the Mann-Whitney *U* test. Two-sided *p*-values less than 0.05 were considered significant (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). G*Power software was used to estimate the number of independent experiments required for statistical analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Characterizing the VIP/receptor axis in human osteoblast differentiation *in vitro*

To determine the expression pattern of VIP and its receptors, VPAC1 and VPAC2, mRNA levels were analyzed by real-time PCR in donor BM-hMSCs and on Days 1, 4, 7, 10, and 14 of osteogenic differentiation cultures.

VIP gene expression was detected both in mesenchymal cells prior to osteogenic induction and in osteoblasts during the last stages of their differentiation, showing a reduction of VIP transcript levels on Day 7, which was reversed on Days 10 and 14 reaching values above those of the BM-hMSCs (Figure 1A). VIP was also quantified by ELISA in the culture supernatants after 10 days of osteogenic induction, obtaining a concentration of 517.8 ± 9.4 pg/mL (Figure S51).

VPAC1 and VPAC2 gene expression was observed at different time points during the 14 days of human osteoblast differentiation period *in vitro*. The results revealed a greater expression of VPAC1 compared to VPAC2 ($p < 0.001$ for Days 1, 4, 7, and 14 and $p = 0.003$ for Day 10) (Figure 1B). Moreover, this pattern was stable during the osteogenic process, showing no differences in the ratio VPAC1/VPAC2 (data not shown). To confirm the protein expression of VIP receptors in human osteoblasts, VPAC1 and VPAC2 were detected by Western blot and quantified (Figure 1C), confirming the results obtained at the RNA level.

Having characterized the expression of both receptors and knowing that adenylate cyclase activation is the main pathway mediating the effects of VIP, the functionality of VPAC1 and VPAC2 was studied through cAMP quantification. Stimulation with 10^{-8} M VIP, VPAC1 agonist, or VPAC2 agonist significantly increased intracellular levels of cAMP ($p < 0.001$, $p = 0.001$, and $p = 0.001$, respectively) in osteoblast differentiated for 7 days (Figure 1D).

3.2 | VIP upregulates the expression of β -catenin and Runx2

We next elucidated whether the presence of VIP during *in vitro* differentiation modulates the expression of two master regulators of this process: β -catenin (*CTNNB1*) and Runx2 (*RUNX2*).

Relative gene expression was analyzed by real-time PCR in BM-hMSCs and after 1, 4, and 7 days of osteogenic induction in the presence or absence of VIP 10^{-8} M. Both genes showed higher expression when the

differentiation was performed in the presence of VIP, with significant differences at Day 4 for *CTNNB1* ($p = 0.0093$) (Figure 2A) and at Day 7 for *RUNX2* ($p < 0.001$) (Figure 2B).

Protein levels of β -catenin and Runx2 were also quantified by Western blot after 7 days of culture of Human bone marrow mesenchymal stem cell (hBM-MSCs) with osteogenic medium in the presence or absence of VIP 10^{-8} M. The results confirmed the mRNA data, showing a significant increase of β -catenin ($p = 0.030$) and Runx2 ($p = 0.032$) in those cells differentiated in the presence of VIP (Figure 2C,D).

3.3 | VIP enhances type I collagen expression and cytoskeletal changes associated with osteoblast differentiation

To explore the influence of VIP on the osteogenic process, we next characterized the genetic expression profile of type I collagen (*COL1A1*), an early gene marker of osteoblast differentiation, by real-time PCR at Days 1, 4, 7, and 14 of BM-hMSCs cultured under osteogenic induction in the presence or absence of VIP 10^{-8} M. A similar pattern of *COL1A1* gene expression was observed throughout osteogenesis in both conditions. However, cells maintained in differentiation conditions in the presence of VIP reached the maximum expression earlier, which also exceeded that of cells cultured under basal conditions ($p = 0.009$) (Figure 3A).

To elucidate the effect of VIP on cytoskeletal reorganization associated with MSCs osteogenic differentiation, immunofluorescence staining of both F-actin and vinculin of focal adhesions was performed on Day 4 of the differentiation cultures in presence or absence of VIP. Qualitative observation of the confocal images obtained (Figure 3B) suggested differences in the thickness of actin filaments and in the pattern of focal adhesions. Under basal osteoinduction conditions, spindle-shaped cells exhibited parallel thick actin bundles traversing their entire length whereas in the presence of VIP, cells showed a network of thinner actin filaments and a more cuboidal morphology accompanied by a change in the distribution of focal adhesions (Figure 3B,C).

3.4 | The presence of VIP increases osteoblast bone-forming activity

After studying the stimulatory effect of VIP on the expression of different osteogenic markers both at the genetic and protein level, its action on the bone-forming activity of osteoblasts was analyzed. ALP in cell

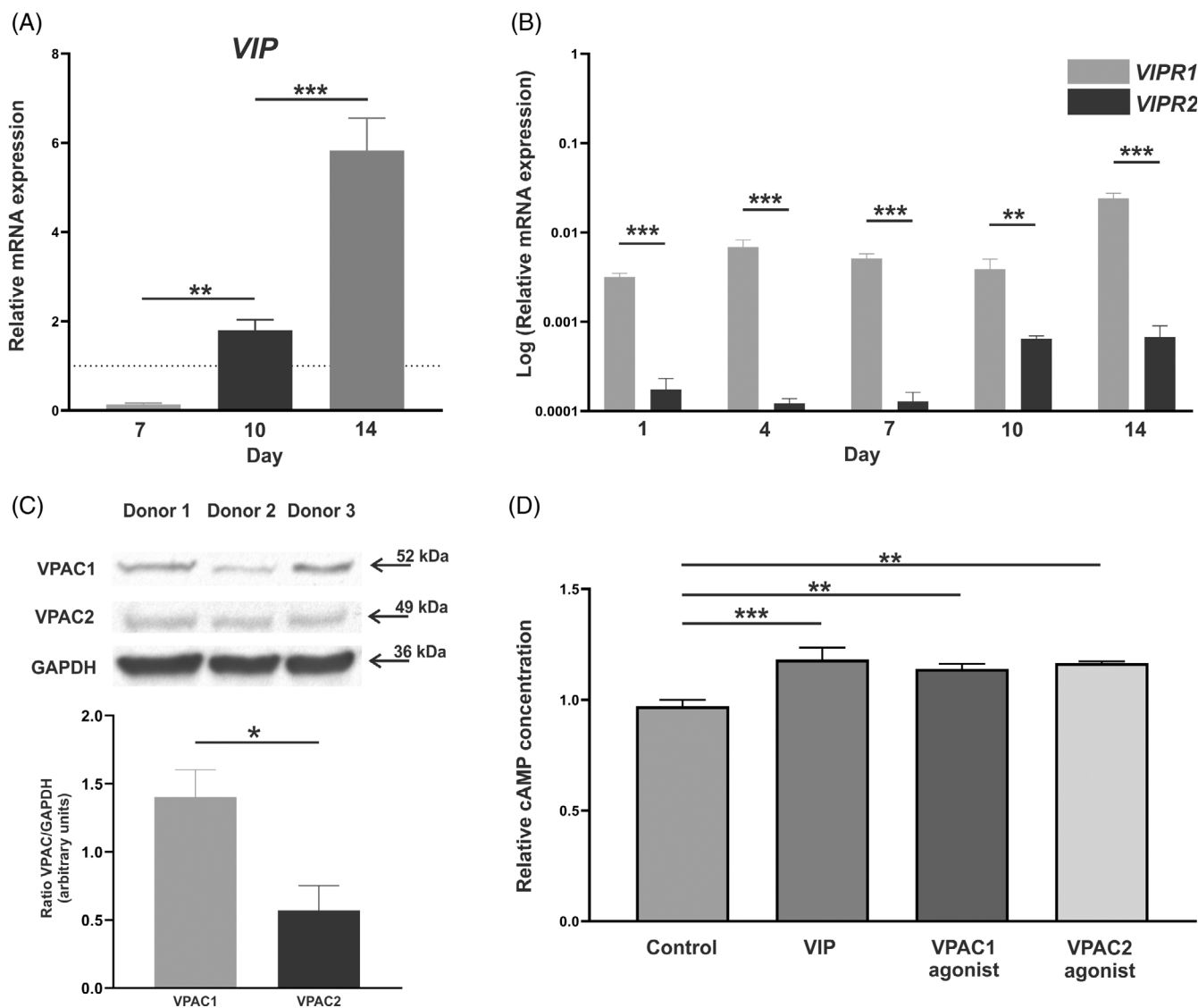


FIGURE 1 Characterization of the vasoactive intestinal peptide (VIP)/receptor axis during *in vitro* human osteoblast differentiation. *VIP* (A), *VIPR1* (VPAC1), and *VIPR2* (VPAC2) (B) mRNA expression levels in donor bone marrow-human mesenchymal stem cells (BM-hMSCs), before differentiation is initiated (dotted line) and after 1, 4, 7, 10, or 14 days of osteogenic induction was determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels) and, in the case of *VIP*, referenced to undifferentiated cells (BM-hMSCs). The means \pm standard error of the mean (SEM) of triplicate determinations of five independent experiments are shown. *t* Tests were performed (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) (C) Protein detection of VIP receptors after 7 days of differentiation was determined by Western blot and *GAPDH* was used as a control. The intensity of the bands of VPAC1 and VPAC2 was quantified by densitometric analysis and normalized against the intensity of *GAPDH*. Results represent the means \pm SEM of three independent experiments. *t*-Test was performed (* $p < 0.05$). (D) Intracellular levels of cAMP in osteoblast differentiated for 7 days were quantified after stimulation with 10^{-8} M of VIP or agonist for either VPAC1 or VPAC2. cAMP concentration data are expressed relative to control cells. Means \pm SEM of triplicate determinations of three independent experiments are shown, ANOVA was performed and Dunnett's test was applied as *post hoc* (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

culture supernatants and calcium deposits were quantified after 10 days of osteoblast differentiation cultures in the presence or absence of the neuropeptide at a concentration of 10^{-8} M. Results revealed a significant increase in both ALP secretion ($p = 0.0281$) (Figure 4A) and calcium deposition ($p = 0.009$) when osteogenic induction occurred in the presence of VIP (Figure 4B,C).

3.5 | VIP is involved in the crosstalk osteoblast-osteoclast

Finally, to explore the potential osteoprotective mechanism that VIP might mediate, we next analyzed by real-time PCR the gene expression of RANKL (*TNFSF11*) and OPG (*TNFRSF11B*) from *in vitro* differentiated human

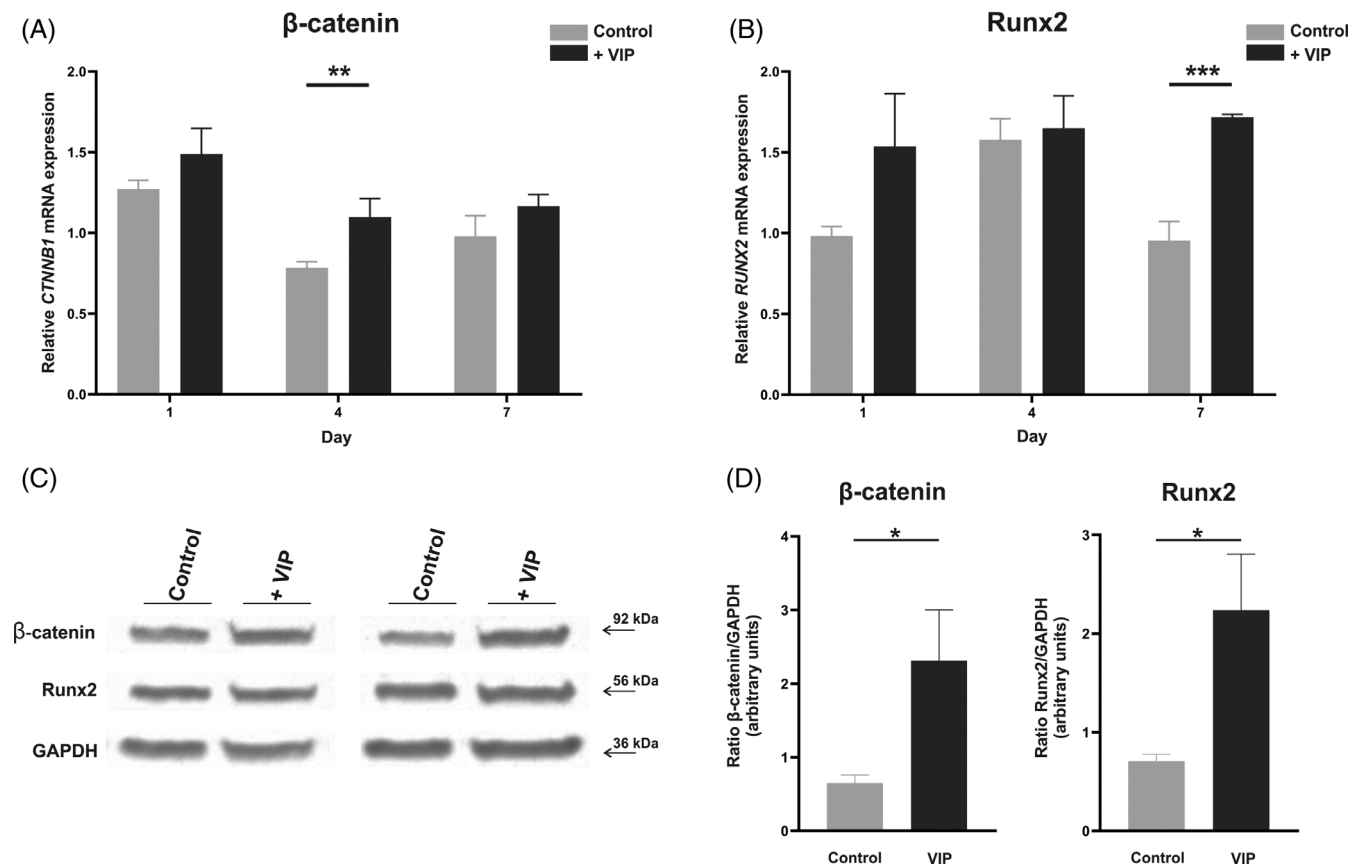


FIGURE 2 Vasoactive intestinal peptide (VIP) upregulates the expression of β -catenin and Runx2. *CTNNB1* (β -catenin) (A) and *RUNX2* (Runx2) (B) mRNA expression levels after 1, 4, or 7 days of bone marrow-human mesenchymal stem cells (BM-hMSCs) osteogenic induction in absence or presence of VIP 10^{-8} M was determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels) and referenced to undifferentiated cells (BM-hMSCs). The means \pm SEM of triplicate determinations of four independent experiments are shown. β -catenin and Runx2 protein quantification at Day 7 of differentiation was determined by Western blot (C). Picture is a representative example of six experiments with similar results. (D) Relative expression levels of protein bands were calculated with the densitometry values of the band corresponding to the protein of interest relative to *GAPDH* and referenced to basal levels. Mann-Whitney *U* was performed (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

osteoblasts after 14 days of osteogenic induction of BM-hMSCs with or without the addition of VIP 10^{-8} M. Results showed that although OPG gene expression was not modulated by VIP (Figure 5B), there was a significant decrease in the levels of RANKL transcripts ($p < 0.001$) (Figure 5A). Therefore, a significant decrease in the RANKL/OPG ratio was obtained ($p = 0.018$) when the osteogenic process occurred in the presence of VIP (Figure 5C).

4 | DISCUSSION

An array of systemic factors and mediators produced within the bone microenvironment regulate the fine-tuning between osteoblast and osteoclast functions, which is necessary for preserving homeostatic bone remodeling.^{12,13,37,38} Among them, the neuropeptide VIP

has been demonstrated to exhibit anti-osteoclastogenic activity in both murine and human studies.^{23–29} However, comprehensive knowledge about VIP regulating role in human osteoblast differentiation and anabolic activity remains unknown. In the present study, we have reported, for the first time, the stimulatory influence of VIP on BM-hMSCs osteogenic differentiation and osteoblast synthetic function. Results revealed that the presence of VIP during *in vitro* osteoinduction of human BM-MSCs enhances the expression of osteoblast differentiation-stage-specific markers and favors the characteristic reorganization of both actin cytoskeleton and focal adhesion complexes. We further found that such pro-osteoblastogenic effects are accompanied by an increase in matrix mineralization and an attenuation of osteoblast-mediated osteoclastogenesis. The findings of this study would confirm in humans the osteoprotective effects of VIP previously demonstrated in animal

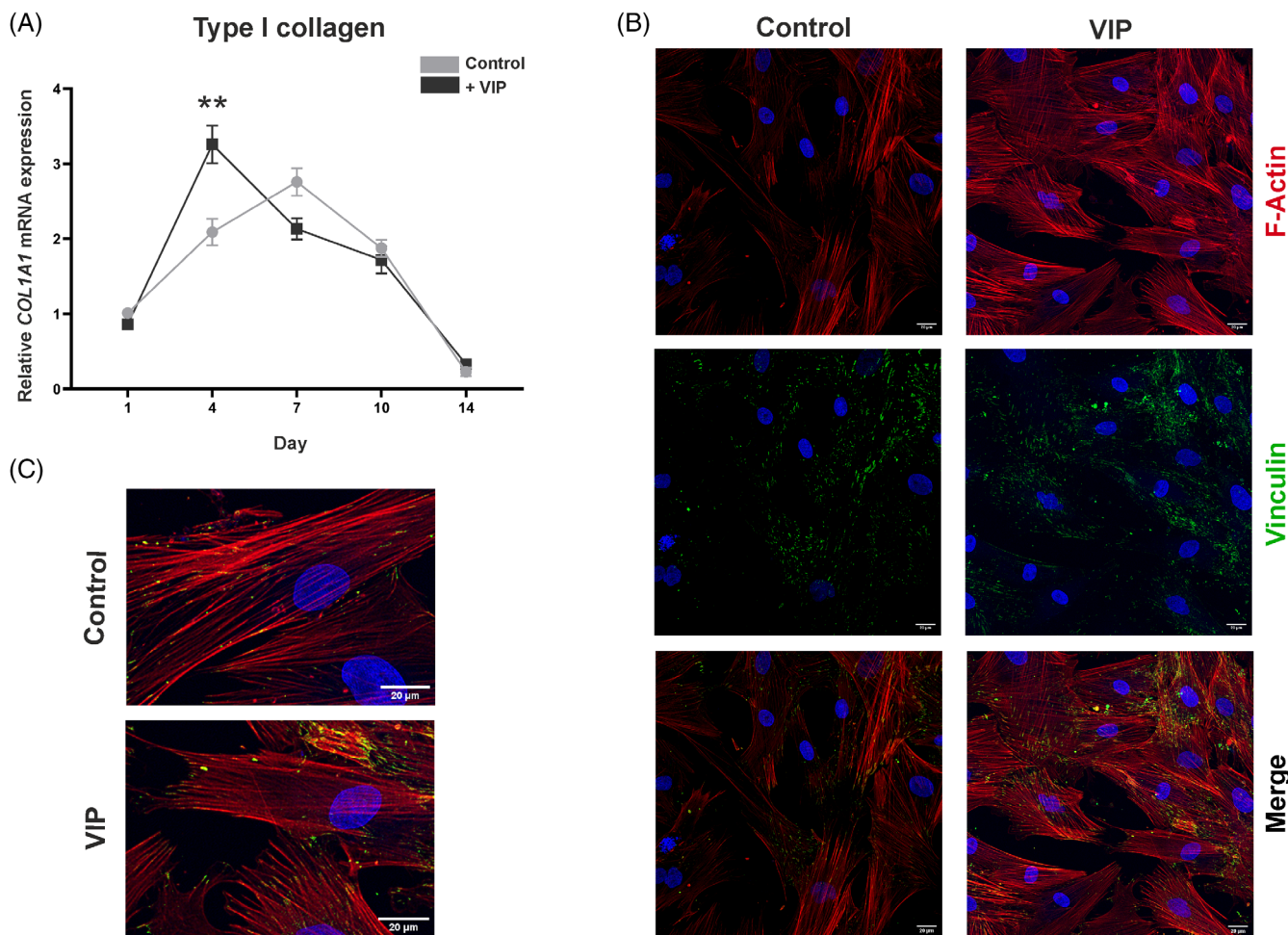


FIGURE 3 Vasoactive intestinal peptide (VIP) promotes type I collagen gene expression and cytoskeletal reorganization. (A) Type I collagen gene (*COL1A1*) expression after 1, 4, 7, 10, or 14 days of osteogenic induction in absence or presence of VIP 10^{-8} M was determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels) and referenced to undifferentiated cells (bone marrow-human mesenchymal stem cells [BM-hMSCs]). The means \pm SEM of triplicate determinations of five independent experiments are shown, Mann–Whitney *U* was performed (** $p < 0.01$). (B) Photomicrographs of the effect of VIP on the actin cytoskeleton and focal adhesions in differentiating osteoblasts (Leica SP8 Lightning confocal microscope, Scale bar: 20 μ m). (C) Magnified image of a representative cell of the cytoskeleton morphology in mesenchymal stem cell under basal osteogenic conditions and with the presence of VIP. Detection of F-actin was performed using Phalloidin staining (TRITC, Red), specific primary and secondary antibodies were used for the detection of vinculin (Alexa Fluor 488, green), nuclei were counterstained with DAPI.

models, suggesting a promising pivotal role for this neuropeptide in the maintenance of homeostatic human bone metabolism.

According to the neuro-osteological hypothesis, neuropeptides released by sympathetic fibers innervating bone tissues can exert paracrine effects on cells expressing their receptors in the vicinity of nerve endings.²⁸ Since Hohman et al. demonstrated in 1986 the existence of VIP-immunoreactive nerve fibers in rat bone tissue,²⁰ further findings have confirmed their presence in the rat periosteum, epiphysis, and bone marrow cavity.^{39,40} More recent studies in human subchondral bone have shown, by immunochemistry, that VIP is expressed not only along the surface of trabecular bone and in bone marrow

cavities but also in osteocyte-like cells.^{19,41} In line with this, our present data revealed that *in vitro* differentiated human osteoblasts express the neuropeptide VIP, both at the genetic and protein level. These results appear to be in disagreement with those previously published by Togari et al. showing no expression of VIP transcripts in human periosteum-derived osteoblastic cells (SaM-1) and in human osteosarcoma-derived cells (SaOS-2, HOS, and MG-63).³² However, this discrepancy could be derived from differences in experimental conditions since the cell model studied and the mRNA detection methods that were used are different. Given that we further detected protein levels of VIP in osteoblast supernatants, it is worth speculating that osteoblast lineage cells, including

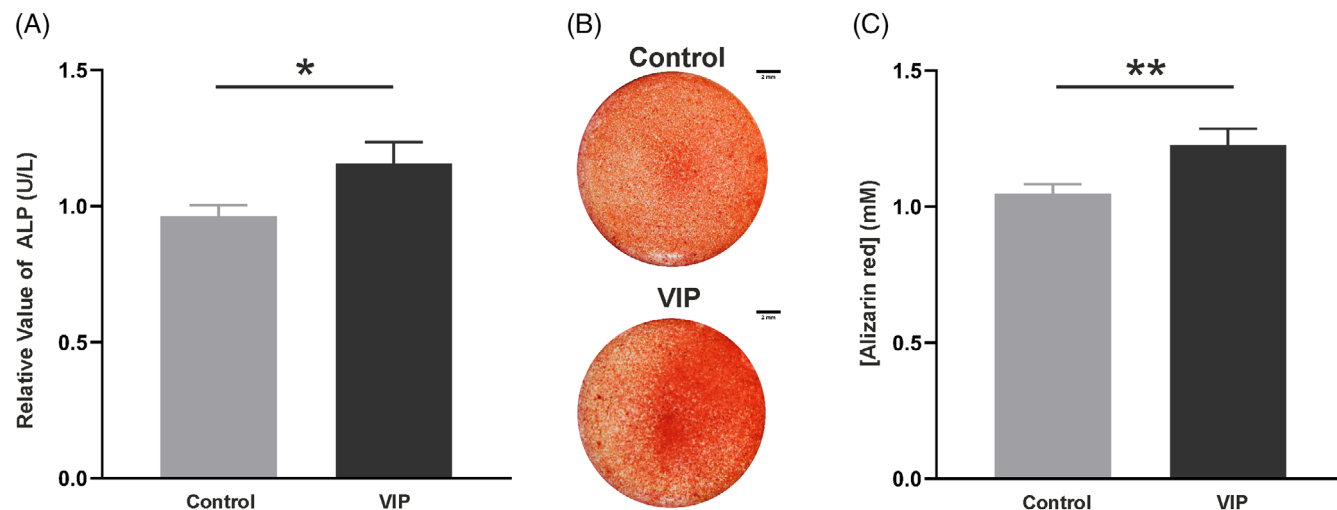


FIGURE 4 Osteoblast anabolic activity is promoted by vasoactive intestinal peptide (VIP). (A) Alkaline phosphatase (ALP) present in the supernatant was determined after 10 days of bone marrow-human mesenchymal stem cells culture under osteogenic induction in presence or absence of VIP 10^{-8} M. The results shown represent the mean \pm SEM of the relative concentration of ALP referred to the basal condition obtained in five independent experiments. (B) Photomicrographs of calcium deposits after stained with alizarin red, in the wells of cells subjected to both experimental conditions (scale bar: 2 mm). (C) Quantification of alizarin red staining using spectrophotometry. Data are presented as the means \pm SEM of duplicate determinations of six independent experiments referred to control condition. *t*-Test was performed (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

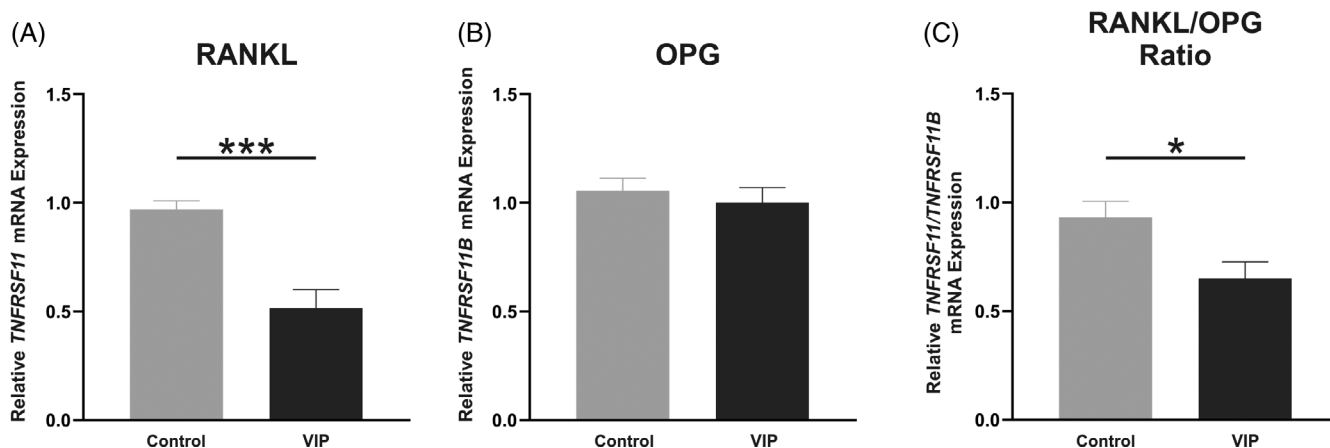


FIGURE 5 Vasoactive intestinal peptide (VIP) modulates gene expression of mediator molecules in osteoclast-osteoblast communication. Relative mRNA expression of (A) *TNFRSF11* (RANKL) and (B) *TNFRSF11B* (OPG) after 14 days of osteoblast differentiation in absence or presence of VIP 10^{-8} M was determined by real-time PCR. (C) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG) ratio of gene expression values. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *GAPDH* levels) and referenced to the control group. The means \pm SEM of triplicate determinations of four independent experiments are shown, *t* test was performed (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

osteoblasts and osteocytes, might represent an additional source of VIP in the bone environment that would allow higher local levels of this neuropeptide.

Regarding VIP receptors, although several studies have shown that mouse calvarial osteoblasts and murine osteosarcoma cell lines are provided with functional VPAC1 and VPAC2 receptors,^{31,33,42} data on human cells

are limited to a single report by Togari et al. analyzing their mRNA expression in different human osteosarcoma cell lines and in the human osteoblast SaM-1 cell line.³² Therefore, our results show for the first time the expression profile of VIP receptors during the time course of human MSCs osteogenic differentiation. These findings evidence the presence of VPAC1 and VPAC2 receptors in

BM-hMSCs and in mature osteoblasts differentiated *in vitro*, showing a progressive induction of both transcripts throughout the differentiation process with a constant ratio between their mRNA levels in favor of VPAC1 receptor. While these results are not consistent with the exclusive expression of VPAC1 previously described by Togari et al. in human osteoblast cell lines,³² it is worthy to note that VPAC1 transcripts have also been shown to be induced during osteogenic differentiation of mouse calvarial osteoblasts, while VPAC2 is constitutively expressed.³³ Nevertheless, discrepancies in the pattern of receptor subtypes observed between these reports are not mutually incompatible, since different cell types, stage of differentiation and species were studied using distinct methods of analysis. Moreover, concerning the signaling pathways elicited by VIP, our data revealed that VPAC receptors are linked to cAMP as an intracellular mediator in human osteoblasts differentiated *in vitro*, in line with the VIP-induced adenylate cyclase activation previously described in mouse calvarial osteoblasts, osteosarcoma cell lines, and in human osteoblast-like cells derived from explants of trabecular bone.^{31,42–44}

Differentiation of MSCs toward the osteoblastic phenotype entails several stages, including the synthesis of the osteoid matrix, changes in cell morphology and cytoskeleton, as well as osteoid mineralization.^{4,5} On a molecular level, Runx2 is identified as the master transcription factor driving the primary commitment of mesenchymal progenitors to osteoblast lineage, being upstream regulated by the Wnt pathway via the stabilization of cytoplasmic β -catenin.^{7,45–47} Our study of β -catenin and Runx2 levels in BM-hMSCs cultured under osteoinduction conditions demonstrates an increase in gene and protein expression of both osteogenic factors in the presence of VIP. This is consistent with the recently demonstrated promoting effect of this neuropeptide on both the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the expression of the downstream *RUNX2* gene, in turn mediating VIP-enhancing action on the differentiation of rat bone marrow MSCs to osteoblasts.⁴⁸

Besides, when we examined the effect of VIP presence on the expression of type I collagen, the main osteoid component and an early marker of osteogenesis, a maximum in its transcript levels was reached at an earlier time point during BM-hMSCs osteogenic differentiation *in vitro*, exceeding those measured under basal conditions. This expression profile reflects an increased initial bone matrix formation in the presence of the neuropeptide, in agreement with previous findings in rat osteoblasts differentiated *in vitro*⁴⁸ and as expected based on our results, given that the *COL1A1* gene is a direct target of the VIP upregulated Runx2 transcription factor.⁴⁹ Although further immunocytochemical quantitative

studies are needed to characterize more precisely the modulatory action of VIP on the cytoskeleton organization during MSCs osteogenic differentiation, we described differences in both F-actin and vinculin distribution based on qualitative visual analysis of confocal immunofluorescence microscopy images. Cells cultured in the presence of VIP exhibited a thinner actin network distributed throughout the cytoplasm, resembling the thin and dense microfilament meshwork filling the interior of terminally differentiated osteoblasts. Changes in their morphology and in the distribution of vinculin present in focal adhesions were also evident. These cells displayed a larger spreading area and a shape resembling polyhedral cells, characteristic of later stages in osteoblast maturation. Given that several studies have reported that changes in cell morphology and actin cytoskeleton are important early events during osteogenesis of MSCs^{8,11,50–52} and that reorganization of focal adhesions is necessary for osteoblast attachment and subsequently for extracellular matrix synthesis,^{10,11} our results suggest that VIP promotes BM-hMSCs osteogenesis and anabolic activity of osteoblasts by favoring the rearrangement of the cytoskeleton. Interestingly, modulation of intracellular cAMP concentrations by G protein-coupled receptor (GPCR)-coupled mechanisms has been demonstrated to play a regulatory role in actin cytoskeleton reorganization⁵³ and bone formation,^{54,55} which would be in accordance with the reported upregulation of cAMP levels upon stimulation of VPAC receptors in differentiating osteoblasts. Therefore, VIP emerges as a component of the network of mediators regulating human osteoblastic differentiation through the modulation of cytoskeletal structures, possibly using cAMP as an intracellular messenger.

In the present study, we also found a stimulatory effect of the presence of VIP on ALP production and calcium deposits in osteoblastic differentiation cultures of BM-hMSCs, evidencing an increase in active bone formation and in the mineralizing capacity that supports the ability of the neuropeptide to promote osteogenic functions. This is consistent with a previous study in osteogenically induced rat MSCs, where an increased ALP activity and mineralized nodules formation were observed under VIP treatment.⁴⁸ Moreover, in agreement with our data showing that VPAC receptors on human osteoblasts are linked to cAMP formation, other authors have demonstrated that this second messenger acts as a signal transducing mechanism mediating VIP-induced enhancement of ALP expression in human osteoblast cell lines as well as in primary cultures of mouse calvarial osteoblasts.^{44,56}

Finally, given the important role played by osteoblasts in the regulation of osteoclast biology through the

production of RANKL and OPG, and considering that a decrease in the RANKL/OPG ratio has been linked to the VIP osteoprotective effects observed in RA animal models and patients,^{23–25} we hypothesized that this neuropeptide may exert a regulatory effect on osteoblast-mediated osteoclastogenesis by modulating the expression of such cytokines. Our data revealed a significant decrease in RANKL gene expression when osteoblasts were differentiated in the presence of VIP, leading to a consequent reduction of the RANKL/OPG ratio. Furthermore, this is in line with previous data showing the ability of VIP to decrease the 1,25(OH)₂-vitamin D₃-stimulated expression of RANKL in mouse bone marrow cultures.²⁷ Therefore, the present results suggest that, in addition to our previous demonstration of the direct inhibitory action of VIP on human osteoclasts,²⁵ this neuropeptide also exerts an indirect anti-osteoclastogenic effect by regulating osteoblast factors controlling osteoclast biology.

To summarize, although further studies are needed to complete the whole mapping of the VIP/VPAC system in human osteoblast lineage cells, our present in vitro results suggest the existence of an autocrine signaling pathway for VIP in these cells, contributing to the neuro-osteogenic network involved in the regulation of human bone metabolism. The present findings also support the potential of VIP as an osteoinductive differentiation factor that promotes human MSCs osteogenesis by enhancing the expression of early osteoblast markers and promoting bone matrix formation as well as proper cytoskeletal reorganization. Finally, our data indicate that VIP could be playing a direct modulatory role on the osteoblast to osteoclast signaling by regulating RANKL/OPG ratio, thus emerging as a pivotal molecule in the maintenance of human bone homeostasis. Therefore, while additional studies are needed to evaluate and optimize the suggested osteoinductive effects of VIP, our results represent an initial and relevant step in the exploration of new therapeutic targets for a plethora of musculoskeletal diseases characterized by the disruption of bone remodeling balance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, MC; methodology, DC-V, PA-C, and IG-L; validation MC; investigation, DC-V and PA-C; resources, MC and RPG; data curation, DC-V, PA-C, and IG-L; writing—original draft preparation, MC, DC-V, and PA-C; writing—review and editing, DC-V, PA-C, IG-L, IG-C, SP-G, AL, RV-R, AC-M, KT, CM, YJ, RPG and MC; visualization, DC-V, PA-C, and IG-L; supervision, MC, YJ, and RPG; project administration YJ; funding acquisition, YJ and CM. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Genomics and Fluorescence Microscopy Centres of Complutense University for the use of their facilities. We are also grateful to Mariano R. Rodríguez-Sosa for his assistance with osteoblast differentiation techniques.

FUNDING INFORMATION

This research was funded by grants RD21/0002/004 and PI20/00078 from the Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III) and co-funded by European regional development fund (ERDF) “A way to make Europe.”

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data and further details regarding the manuscript will be made available by request to the corresponding author.

ORCID

David Castro-Vázquez  <https://orcid.org/0000-0003-2446-5075>

REFERENCES

- Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res.* 2022;10:48.
- Sakthiswary R, Uma Veshaliini R, Chin KY, Das S, Sirasanagandla SR. Pathomechanisms of bone loss in rheumatoid arthritis. *Front Med.* 2022;9:962–9.
- Song S, Guo Y, Yang Y, Fu D. Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis. *Pharmacol Ther.* 2022; 237:108–68.
- Rutkovskiy A, Stenslokken KO, Vaage IJ. Osteoblast differentiation at a glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016;22:95–106.
- Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast differentiation and signaling: established concepts and emerging topics. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(13):6651.
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421–746.
- Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells.* 2013;5:136–48.
- Mathieu PS, Lobo EG. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012;18:436–44.
- Bays JL, DeMali KA. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:2999–3009.
- Zhao Y, Sun Q, Huo B. Focal adhesion regulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Biomater Transl.* 2021;2:312–22.



11. Wu MC, Yu HW, Chen YQ, Ou MH, Serrano R, Huang GL, et al. Early committed polarization of intracellular tension in response to cell shape determines the osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 2023;163:287–301.
12. Nakahama K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:4001–9.
13. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. *Cells.* 2020;9:2073.
14. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:33–63.
15. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen.* 2020;40:2.
16. Garcia-Castellano JM, Diaz-Herrera P, Morcuende JA. Is bone a target-tissue for the nervous system? New advances on the understanding of their interactions. *Iowa Orthop J.* 2000;20:49–58.
17. Lerner UH, Persson E. Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8:154–65.
18. Igwe JC, Jiang X, Paic F, Ma L, Adams DJ, Baldock PA, et al. Neuropeptide Y is expressed by osteocytes and can inhibit osteoblastic activity. *J Cell Biochem.* 2009;108:621–30.
19. Kanemitsu M, Nakasa T, Shirakawa Y, Ishikawa M, Miyaki S, Adachi N. Role of vasoactive intestinal peptide in the progression of osteoarthritis through bone sclerosis and angiogenesis in subchondral bone. *J Orthop Sci.* 2020;25:897–906.
20. Hohmann EL, Elde RP, Rysavy JA, Einzig S, Gebhard RL. Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science.* 1986;232:868–71.
21. Lerner UH. Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2:440–7.
22. Martinez C, Juarranz Y, Gutierrez-Cañas I, Carrion M, Perez-Garcia S, Villanueva-Romero R, et al. A clinical approach for the use of VIP axis in inflammatory and autoimmune diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):65.
23. Juarranz Y, Abad C, Martínez C, Arranz A, Gutierrez-Cañas I, Rosignoli F, et al. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:1034–45.
24. Muschter D, Schafer N, Stangl H, Straub RH, Grassel S. Sympathetic neurotransmitters modulate osteoclastogenesis and osteoclast activity in the context of collagen-induced arthritis. *PLoS One.* 2015;10:139–726.
25. Castro-Vazquez D, Lamana A, Arribas-Castaño P, Gutierrez-Cañas I, Villanueva-Romero R, Perez-Garcia S, et al. The neuropeptide VIP limits human Osteoclastogenesis: clinical associations with bone metabolism markers in patients with early arthritis. *Biomedicine.* 2021;9:1880.
26. Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH, et al. Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts. *Bone.* 2000;27:803–10.
27. Mukohyama H, Ransjo M, Taniguchi H, Ohyama T, Lerner UH. The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271:158–63.
28. Lundberg P, Lerner UH. Expression and regulatory role of receptors for vasoactive intestinal peptide in bone cells. *Microsc Res Tech.* 2002;58:98–103.
29. Qu H, Zhuang Y, Zhu L, Zhao Z, Wang K. The effects of vasoactive intestinal peptide on RANKL-induced osteoclast formation. *Ann Transl Med.* 2021;9:127.
30. Hohmann EL, Tashjian AH Jr. Functional receptors for vasoactive intestinal peptide on human osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1984;114:1321–7.
31. Bjurholm A, Kreicbergs A, Schultzberg M, Lerner UH. Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, and Saos-2) and primary bone cells. *J Bone Miner Res.* 1992;7:1011–9.
32. Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett.* 1997;233:125–8.
33. Lundberg P, Lundgren I, Mukohyama H, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH. Vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in mouse calvarial osteoblasts: presence of VIP-2 receptors and differentiation-induced expression of VIP-1 receptors. *Endocrinology.* 2001;142:339–47.
34. Ciuffreda MC, Malpasso G, Musarò P, Turco V, Gnecci M. Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. In: Gnecci M, editor. *Mesenchymal stem cells: methods and protocols.* New York: Springer; 2016. p. 149–58.
35. Berberi A, Al-Nemer F, Hamade E, Noujeim Z, Badran B, Zibara K. Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2017;21:1599–609.
36. Bou Assaf R, Fayyad-Kazan M, Al-Nemer F, Makki R, Fayyad-Kazan H, Badran B, et al. Evaluation of the osteogenic potential of different scaffolds embedded with human stem cells originated from Schneiderian membrane: an in vitro study. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2868673.
37. Goldring SR, Goldring MB. Cytokines and skeletal physiology. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;324:13–23.
38. Kontinen Y, Imai S, Suda A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. State of the art. *Acta Orthop Scand.* 1996;67:632–9.
39. Bjurholm A, Kreicbergs A, Terenius L, Goldstein M, Schultzberg M. Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *J Auton Nerv Syst.* 1988;25:119–25.
40. Hill EL, Elde R. Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *Cell Tissue Res.* 1991;264:469–80.
41. Xiao J, Yu W, Wang X, Wang B, Chen J, Liu Y, et al. Correlation between neuropeptide distribution, cancellous bone

- microstructure and joint pain in postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *Neuropeptides*. 2016;56:97–104.
42. Hohmann EL, Levine L, Tashjian AH Jr. Vasoactive intestinal peptide stimulates bone resorption via a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology*. 1983; 112:1233–9.
 43. Rahman S, Dobson PR, Bunning RA, Russell RG, Brown BL. The regulation of connective tissue metabolism by vasoactive intestinal polypeptide. *Regul Pept*. 1992;37:111–21.
 44. Lundberg P, Bostrom I, Mukohyama H, Bjurholm A, Smans K, Lerner UH. Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules. *Regul Pept*. 1999;85:47–58.
 45. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*. 2005;280:33132–40.
 46. Zhao Z, Zhao M, Xiao G, Franceschi RT. Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells in vitro and in vivo. *Mol Ther*. 2005;12: 247–53.
 47. Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1694.
 48. Shi L, Feng L, Zhu ML, Yang ZM, Wu TY, Xu J, et al. Vasoactive intestinal peptide stimulates bone marrow-mesenchymal stem cells osteogenesis differentiation by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes rat skull defect repair. *Stem Cells Dev*. 2020;29:655–66.
 49. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 2010;339: 189–95.
 50. Sonowal H, Kumar A, Bhattacharyya J, Gogoi PK, Jaganathan BG. Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *J Biomed Sci*. 2013;20:71.
 51. Suzuki H, Tatei K, Ohshima N, Sato S, Izumi T. Regulation of MC3T3-E1 differentiation by actin cytoskeleton through lipid mediators reflecting the cell differentiation stage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;514:393–400.
 52. Khan AU, Qu R, Fan T, Ouyang J, Dai J. A glance on the role of actin in osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11:283.
 53. Chen K, Obinata H, Izumi T. Detection of G protein-coupled receptor-mediated cellular response involved in cytoskeletal rearrangement using surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron*. 2010;25:1675–80.
 54. Romanello M, Moro L, Pirulli D, Crovella S, D'Andrea P. Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282:1138–44.
 55. Luo J, Zhou W, Zhou X, Li D, Weng J, Yi Z, et al. Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48. *Development*. 2009;136:2747–56.
 56. Ma W, Zhang X, Shi S, Zhang Y. Neuropeptides stimulate human osteoblast activity and promote gap junctional intercellular communication. *Neuropeptides*. 2013;47:179–86.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Castro-Vázquez D, Arribas-Castaño P, García-López I, Gutiérrez-Cañas I, Pérez-García S, Lamana A, et al. Vasoactive intestinal peptide exerts an osteoinductive effect in human mesenchymal stem cells. *BioFactors*. 2024;50(6):1148–60. <https://doi.org/10.1002/biof.2062>

Artículo 3

Vasoactive intestinal peptide induces an osteoprotective phenotype in human triple cultures of osteocytes, osteoblasts and osteoclasts.

Cellular and Molecular Life Sciences. *Under review*



ORIGINAL ARTICLE



Vasoactive intestinal peptide induces an osteoprotective phenotype in human triple cultures of osteocytes, osteoblasts and osteoclasts

David Castro-Vázquez¹, Iván García-López¹, Katharina Wirsig³, Paula Arribas-Castaño¹, Rosa P. Gomariz¹, Carmen Martínez^{2,4}, Yasmina Juarranz^{1,4}, Anne Bernhardt³ and Mar Carrión^{*1,4}

© The Author(s) 2025

Abstract

Bone remodelling is a dynamic process of osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption, regulated by local, paracrine and endocrine factors, in which osteocytes act as orchestrators of bone homeostasis. Among these regulatory factors, the neuropeptide VIP (vasoactive intestinal peptide) has demonstrated osteoprotective effects by inhibiting osteoclastogenesis and promoting osteoblast differentiation. However, its potential role in osteocyte biology remains unexplored. In this study, we investigated the effect of VIP on the differentiation of primary human osteocytes. We describe for the first time the expression of VIP and its receptors during *in vitro* osteocyte differentiation. Our results show that VIP promotes osteocytogenesis, accompanied by a reduction in the *RANKL/OPG* ratio, thereby supporting its role as an anti-osteoclastogenic factor. To better mimic the complexity of bone tissue, we performed triple co-cultures of osteoblasts and simultaneously differentiating osteocytes and osteoclasts, in the presence or absence of VIP. Our results confirmed that VIP supports the osteoblast-to-osteocyte transition and promotes an osteoprotective phenotype, characterized by a reduced *RANKL/OPG* ratio and decreased *SOST* expression. The downregulation of sclerostin may attenuate osteocyte-mediated inhibitory signalling toward osteoblasts and, in turn, contribute to the reduction of the osteoblastic *RANKL/OPG* ratio. Collectively, our findings reinforce the anti-osteoclastogenic actions of VIP, supporting its role as a potential osteoprotective factor.

Keywords VIP; osteocyte differentiation; bone remodelling; *in vitro* bone model, sclerostin; *RANKL/OPG* ratio

Yasmina Juarranz, Anne Bernhardt and Mar Carrión jointly supervised this work

✉ Mar Carrión
macarrio@ucm.es

- 1 Complutense University of Madrid, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, 28040 Madrid, Spain.
- 2 Complutense University of Madrid, Departmental Section of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine, 28040 Madrid, Spain.
- 3 Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, University Hospital Carl Gustav Carus and Faculty of Medicine, Technische Universität Dresden, Germany.
- 4 Musculoskeletal Pathology Group, San Carlos Clinical Hospital, San Carlos Health Research Institute (IdISSC)

Introduction

Bone remodelling is a complex physiological process essential for maintenance of the bone structure, its adaptation to mechanical demands and the repair of skeletal damage. It depends on the tightly coordinated activity of osteoclasts, which degrade old or damaged bone, and osteoblasts, responsible for the production of new bone restoring tissue integrity and strength [1, 2]. The dynamic interplay between these cells is regulated at multiple levels, including local cytokines and growth factors, systemic hormones, and neural signalling molecules. Osteocytes play a central role in this process, acting as mechanosensors and endocrine regulators [3-5].

Osteocytes, the most abundant cells in adult bone, represent terminally differentiated cells of the osteoblast lineage that become surrounded by the newly mineralizing bone matrix. During transition from osteoblasts to osteocytes, termed osteocytogenesis, cells downregulate osteoblastic markers related to mineralizing activity such as alkaline phosphatase and osteocalcin, encoded by *ALPL*

and BGLAP respectively, while upregulating osteocyte-specific genes including SOST and MEPE, which encode sclerostin and matrix extracellular phosphoglycoprotein [6, 7]. Simultaneously, their morphology evolves from a polygonal to a stellate shape, with extensive cytoskeletal remodelling. The formation of dendritic processes leads to their integration into the lacuno-canalicular network connecting neighbouring osteocytes as well as other effector cells in the bone. This structural adaptation is crucial for sensing mechanical and hormonal stimuli, allowing osteocytes to orchestrate bone homeostasis via paracrine signalling to osteoclasts and osteoblasts [5, 8].

Mature osteocytes are characterized by the expression of SOST, which inhibits osteoblast function and suppresses bone formation [8]. As regulators of bone resorption, osteocytes are also the main source of the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) responsible for driving the process of osteoclast differentiation and activation, known as osteoclastogenesis [9, 10]. RANKL is a cytokine of the tumour necrosis factor superfamily, which is additionally synthesized by bone marrow-derived stromal cells, osteoblasts and activated T lymphocytes [11]. The interaction between RANKL and its receptor RANK on the surface of osteoclast precursors represents a critical step for activating the nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1). This transcriptional factor is recognized as a master regulator for osteoclastogenesis, promoting the expression of genes such as dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), essential for osteoclast multinucleation, as well as tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and cathepsin K, both critical enzymes for bone resorption activity [12, 13]. On the other hand, RANKL induced osteoclastogenesis can be neutralized by the presence of osteoprotegerin (OPG), a decoy receptor frequently released by RANKL-expressing cells, including both osteoblasts and osteocytes. Under physiological conditions, the RANKL/OPG ratio represents a key index of bone resorption and osteoclastogenesis, acting as a crucial determinant of bone mass [14].

Concomitantly, growing evidence indicates that bone homeostasis is tightly regulated by neural signalling networks. Notably, a wide range of bioactive neuropeptides contribute to the coordinated activity of bone cells through their specific receptors expressed within the bone microenvironment [3, 4]. Among these, vasoactive intestinal peptide (VIP) has been identified as a bone homeostatic mediator, exerting its effects mainly through VPAC1 and VPAC2 receptors [15]. Compelling findings from animal models and *in vitro* studies using human and murine cells indicate that VIP inhibits osteoclastogenesis by directly impairing osteoclast differentiation and resorptive activity, and indirectly through a negative

modulation of the RANKL/OPG ratio [16-22]. Evidence from *in vivo* studies consistently demonstrates that VIP reduces bone erosion in experimental models of rheumatoid arthritis [23, 24] and is associated with a slower rate of bone density decline in early arthritis patients [16], while also inhibiting alveolar bone loss in rat models of periodontitis [25]. Furthermore, VIP has been shown to stimulate osteogenic differentiation of rat and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) [26, 27]. In addition, VIP enhanced bone repair *in vivo*, promoting healing in rat skull defect models and accelerating fracture recovery in chemically sympathectomized mice [26, 28].

In line with its proposed role in neuro-osteogenic interactions, VIP has been detected in the bone marrow, the epiphyseal growth plate, and periosteal nerve fibres [21, 29]. Notably, its expression is not restricted to physiological conditions, as VIP has also been identified in subchondral bone, bone marrow cavities, and osteocyte-like cells of patients with osteoarthritis [30, 31]. Furthermore, beyond its neuronal origin, VIP is also produced by immune and endocrine cells [32], and more recently, its expression has been demonstrated in human osteoblasts differentiated *in vitro* [27], suggesting a potential autocrine role within the bone microenvironment.

Despite accumulating evidence positioning VIP as a neuropeptide critically involved in regulating the cellular mechanisms underlying bone homeostasis, and the well-established role of osteocytes as pivotal mediators of bone turnover, the effect of VIP on osteocytogenesis and on osteocyte biology remain largely unexplored to date. Furthermore, the influence of this neuropeptide on the reciprocal interactions among bone cells responsible for bone remodelling has yet to be elucidated. In this context, a 3D *in vitro* model of osteocyte differentiation [33] and a recently established triple co-culture system comprising primary human osteoblasts and precursors of both osteocytes and osteoclasts [34] was used to investigate the effects of VIP exposure on the involved cell types completing its characterization as a neuroimmunological-osteogenic mediator with osteoprotective effects.

Material and Methods

1. Cell culture

1.1. Sources of osteoblasts/osteocytes and osteoclasts

Osteoblast precursors were isolated from human femoral heads of patients who had undergone total hip replacement surgery at the University Hospital Carl Gustav Carus Dresden (Germany) as described in [33]. Samples were obtained from 7 donors with ages ranging from 55 to 75 years (Table 1). The precursors were cultured in the

expansion medium (α -MEM, 10 % FCS and 1 % P/S), until passage 4 was reached. Then, the cells were cultured for 7 days in osteogenic medium [α -MEM, 10% FCS, 1% P/S, 10mM β -GP, 50 μ M AAP and 10⁻⁷M dexamethasone] to obtain mature osteoblasts.

Osteoclasts were differentiated from PBMC, which were isolated from four samples of leuco-platelet concentrate obtained from the German Red Cross, Dresden. Information on sex and age of the blood donors was not provided by the German Red Cross. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation, followed by lysing of erythrocytes. For monocyte isolation by adherence, PBMCs were seeded in 24-well plates at 1·10⁶ cells/well in α -MEM supplemented with 10% hi-FCS, 1% P/S and 25 ng/mL M-CSF (macrophage colony stimulating factor) and maintained at 37°C in an incubator for 3 days (Figure 1)

1.2. Osteoblasts and differentiation of osteocytes

For osteocyte differentiation, human pre-osteoblasts from 7 donors were harvested with Trypsin/EDTA 1X following expansion in α -MEM with 10 % FCS and 1 % penicillin/streptomycin (P/S). After osteogenic differentiation for 7 days (expansion medium supplemented with 10⁻⁷ M dexamethasone (Dex), 10 mM

β -glycerophosphate (β -GP) and 12.5 μ g/mL ascorbic acid-2-phosphate (AAP), all osteogenic supplements from Sigma-Aldrich), pre-differentiated osteoblasts were embedded in collagen gels based on the protocol described by Bernhardt et al. [35]. Briefly, collagen gels were prepared by mixing 8 parts of collagen solution [3 mg/mL rat tail type I collagen (Meidrix)] with 1 part of HBSS 10X (PAN-Biotech GmbH) with phenol red as pH indicator and 1 M NaOH to adjust the pH of the mixture to physiological conditions. Osteoblasts were resuspended in this mixture at a final concentration of 1·10⁵ cells/mL, and 500 μ L of this suspension was added to 24-well plates. Subsequently, gels were allowed to solidify at 37°C for 30 minutes. After collagen gelation, 500 μ L of monoculture medium consisting of α -MEM, 2% fetal calf serum (FCS), 1 % P/S, 10 mM β -GP, 50 μ M AAP and 100 ng/mL bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) were added to each well. Besides this control group, VIP 10⁻⁸ M was added to test its impact on osteocyte differentiation. Osteocyte monocultures in the presence and absence of the neuropeptide were maintained for 14 days at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂, with a complete medium change on day 7 and VIP added every 3-4 days to maintain a stable concentration.

Monoculture		
Experiment no.	Osteoblasts/osteocytes	
1	female 75 years	
2	female 56 years	
3	female 58 years	
4	male 65 years	
5	male 57 years	
6	male 55 years	
7	male 62 years	
Triple culture		
Experiment no.	Osteoblasts/osteocytes	Osteoclasts
1	female 56 years	PBMC donor 1
2	male 62 years	PBMC donor 2
3	male 65 years	PBMC donor 2
4	female 55 years	PBMC donor 3
5	male 57 years	PBMC donor 3
6	female 55 years	PBMC donor 4
7	male 57 years	PBMC donor 4

Table 1. Donor information for primary human cells, which were used for the differentiation of osteoblasts, osteocytes and osteoclasts in seven independent experiments for monoculture and seven independent experiments for triple culture.

1.3. Triple co-cultures with osteoblasts and simultaneously differentiating osteocytes and osteoclasts from their respective precursors

In vitro bone triple co-cultures of collagen hydrogel-embedded osteoblasts (differentiating to osteocytes), osteoblasts and PBMCs (differentiating to osteoclasts) were performed in transwell inserts (0.4 µm pore size, TC Inserts Sarstedt) in 24-well plates as previously published [34] (Figure 1). A total of seven independent triple co-cultures were established under these conditions (Table 1).

These transwell constructs consisted of primary human osteoblasts predifferentiated in osteogenic medium and embedded in 250 µL collagen gel matrix at a final concentration of $1 \cdot 10^5$ cells/mL on the basal side of the transwell inserts. Once the gels were solidified, osteoblasts were seeded with a density of $5 \cdot 10^4$ cells to the apical side of the membrane of the transwell inserts. Cells were allowed to attach to the membrane for 3h in the incubator at 37°C. Afterwards, the constructs were placed in 24-well plates pre-seeded with PBMCs (10^6 cells per well, see 1.1).

After the triple co-cultures were built up, medium that supports both osteocyte-differentiation and osteoclast-formation (α -MEM + 1% heat inactivated FCS (hi-FCS) + 1% human serum + 1% P/S + 100 ng/mL BMP2) was added

to the constructs in substitution of monocyte culture medium. Besides, triple co-cultures were conducted in the presence or absence of VIP 10^{-8} M. and maintained for 14 days (Figure 1). Culture medium was replaced on day 7 and VIP was added every 3-4 days to keep a stable concentration.

2. Fluorescence microscopy

Immunofluorescence studies were performed to visualize F-actin in osteocytes, osteoblasts and osteoclasts. Osteocyte-containing collagen gels were removed from wells (monocultures) or inserts (triple co-cultures). The samples were washed with PBS, fixed with 4 % paraformaldehyde for 1 h, permeabilized with 0.1 % TritonX-100 in PBS for 15 min and then blocked with 5 % bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 hour. Once blocked, the samples were incubated overnight at 4 °C with Phalloidin-iFluor 488 (1:1000; Abcam) to visualize the cytoskeleton and DAPI (1:1000) to stain nuclei. Images were captured using an Olympus FluoView-1200 and, additional images included as supplementary data obtained with a Keyence BZ-X810. All images were processed with ImageJ.

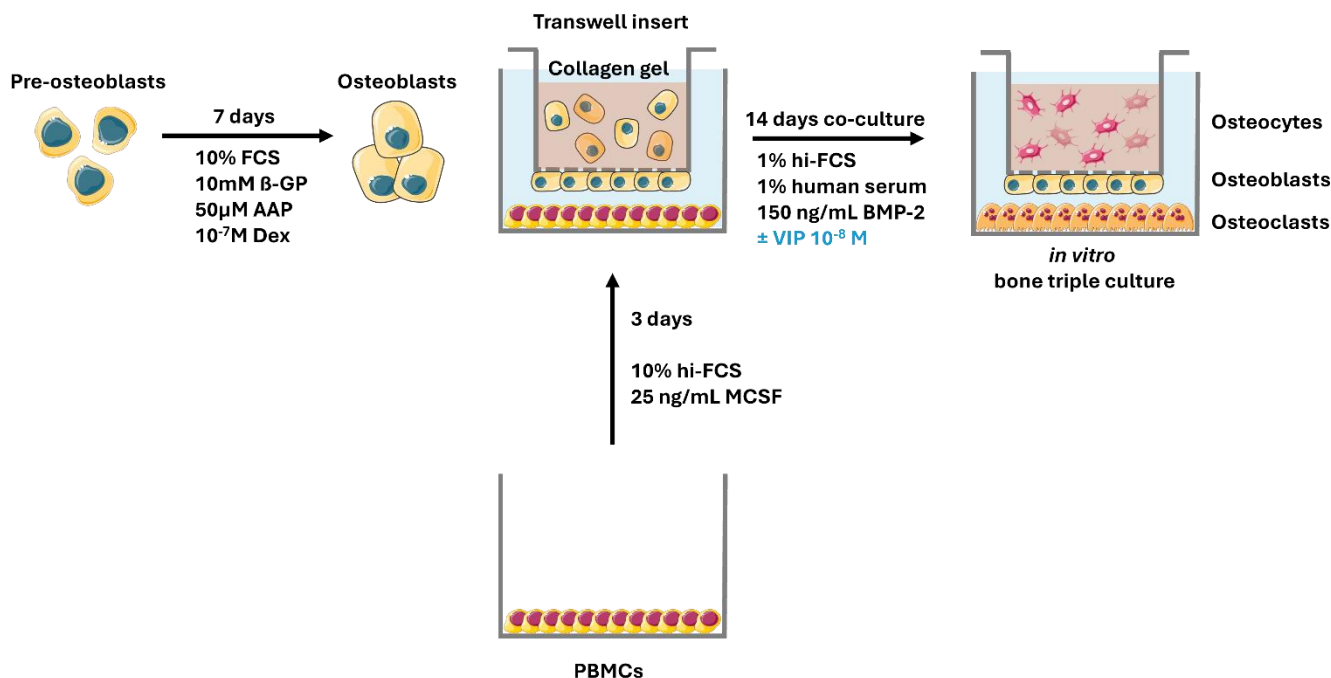


Figure. 1. Diagram of the experimental design used to establish *in vitro* triple cultures of osteoblasts and simultaneously differentiating osteocytes and osteoclasts derived from freshly isolated PBMCs. β -glycerophosphate (β -GP), ascorbic acid-2-phosphate (AAP), dexamethasone (Dex), heat inactivated FCS (hi-FCS), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), macrophage colony stimulating factor (MCSF), vasoactive intestinal peptide (VIP).

3. RNA isolation, cDNA synthesis and PCR

For gene expression analysis, RNA was isolated from osteocytes, osteoblasts or osteoclasts. Osteocyte-containing collagen gels from monocultures and triple co-cultures were removed from the wells or the inserts, respectively, and digested for RNA isolation. Gels were incubated in a collagenase II solution (3 mg/mL in α -MEM, supplemented with 1 % P/S, 10 % FCS and 3 mM CaCl₂) for 1 h at 37 °C with orbital shaking. The samples were then centrifuged at 1500 rpm for 5 min, washed with PBS and centrifuged again to obtain an osteocyte pellet.

For the triple co-cultures, membranes with osteoblasts were separated from the transwell inserts using surgical tweezers. For each experimental group and cell type, three RNA samples from two triple cultures/monocultures were generated using the commercially available peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit (PepqLab). RNA was quantified using Nanodrop, and cDNA synthesis was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies).

Specific TaqMan gene expression assays for target genes (*ALPL*, *BGLAP*, *SOST*, *MEPE*, *DCSTAMP*, *NFATC1*, *CTSK*, *ACP5*, *TNFSF11*, *TNFRSF11B*, *VIPRI* and *VIPR2*) and *ACTB* as housekeeping gene were used along with TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) to perform real-time qPCR analysis. PCR was run with an Applied Biosystems 7500 fast Real-Time PCR system. Assays were made in triplicate and gene expression results were normalized to the expression levels of *ACTB*. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

The VIP gene was amplified by means of conventional PCR (Biotools). The sequence of primers used for human VIP (NM_003381.4) was forward, 5'-ACGTCCTCAGATGCAGTCTTCAC-3'; and reverse, 5'-TCGTCCTCTTCCATTGAGAATT-3'. The PCR products were analysed in agarose gels, purified with the Qiagen PCR purification Kit and the correct size and sequence of the amplified products were checked through Sanger sequencing.

4. Western blot for VIP receptors VPAC1 and VPAC2

As described in the RNA isolation section, osteocytes were isolated from collagen gels using a digestion step with collagenase II. Then, the protein extracts were obtained using ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (ThermoFisher). Total protein was quantified using the commercial Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher). 50 μ g of total protein from each sample was used for VIP receptor immunodetection experiments. Protein separation was performed by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) under

denaturing conditions and then transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. After blocking, membranes were incubated o/n at 4°C with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-human VPAC2 (1:1000; Abnova), rabbit polyclonal anti-human VPAC1 (1:10000; ThermoFisher) and rabbit anti-human GAPDH (1:10000; Sigma) as a loading control. Then, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Amersham ECL) were used: anti-mouse (1:5000) and anti-rabbit (1:10000 for VPAC1 and 1:15000 for GAPDH). Proteins were detected using SuperSignal WestPico PLUS (ThermoFisher). Results were photographed with Bio-Rad Gel Doc XR+ System.

5. Immunohistochemistry of VIP in human compact bone sections

Trabecular bone fragments (50 mm) were isolated from the femoral heads, fixed overnight with 4 % PFA in PBS, decalcified using Osteosoft solution (Merck) for 12 weeks, embedded in paraffin, and sectioned at 3 μ m thickness. Sections were incubated in citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05 % Tween-20 pH 6) at 60 °C for 1 h. After antigen retrieval, the endogenous peroxidase was blocked by incubation with 3 % H₂O₂ in methanol for 10 min. The samples were blocked with 5 % BSA in PBS for 1 h and then incubated with the primary rabbit anti-human VIP antibody (1:100 in PBS-BSA 2 %; Sigma), overnight at 4°C. Sections incubated with 2 % PBS-BSA were used as a secondary antibody control. Slides were then incubated for 35 min with HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:100 in PBS-BSA 2 %; ECL). Staining was visualized with diaminobenzidine (DAB), and samples were counterstained with 1 % alcian blue and 2 % light green in distilled H₂O - acetic acid 3 % and 2 %, respectively.

6. Statistical analysis

Data were analysed using GraphPad Prism 8.0 software. Parametric variables were analysed via t-test, while non-parametric variables were analysed using Mann-Whitney U test. Welch's correction was also applied when variances of the analysed groups were different. Two-sided p-values less than 0.05 were considered significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Results

Characterizing the VIP/receptor axis in human osteocytes

Based on our previous findings demonstrating the expression of VIP and its specific receptors in human osteoblasts, we first assessed whether this signalling system is maintained in human osteocytes after their differentiation from osteoblasts.

VIP gene expression was detected by conventional PCR in all samples of human osteocytes differentiated in 3D collagen gels. The identity of the PCR products was confirmed by electrophoretic analysis followed by sequencing (Figure 2A, negative control and sequencing data not shown). In addition, immunohistochemistry in human compact bone sections was performed to corroborate the expression of VIP at protein level in osteocytes (Figure 2B, arrows). Results revealed VIP presence in osteocytic cells at both mRNA and protein levels.

To determine the expression pattern of the VIP receptors, VPAC1 and VPAC2, their transcript levels were analysed in human osteocytes after 14 days of *in vitro* differentiation by real-time qPCR. Both *VPAC1* and *VPAC2* transcripts were detected (Figure 2C), and the presence of the corresponding proteins was further confirmed by Western

blot analysis (Figure 2D), supporting the expression of both receptors in differentiated human osteocytes.

Regulation of osteocyte marker gene expression and cell morphology by VIP during *in vitro* differentiation

We next elucidated whether the presence of VIP modulates *in vitro* osteocyte differentiation. After 14 days of osteocyte differentiation in monocultures, in presence or absence of 10^{-8} M VIP osteocyte specific gene expression was analysed by real-time qPCR. Exposure to VIP resulted in a significant decrease in gene expression of the mature osteoblast marker *BGLAP* (p -value = 0.0006) (Figure 3A). At the same time, a significant increase was observed on *MEPE* (p -value=0.0460) and *SOST* (p -value=0.0307), both gene markers associated with late stages of osteocyte differentiation (Figure 3B, 3C).

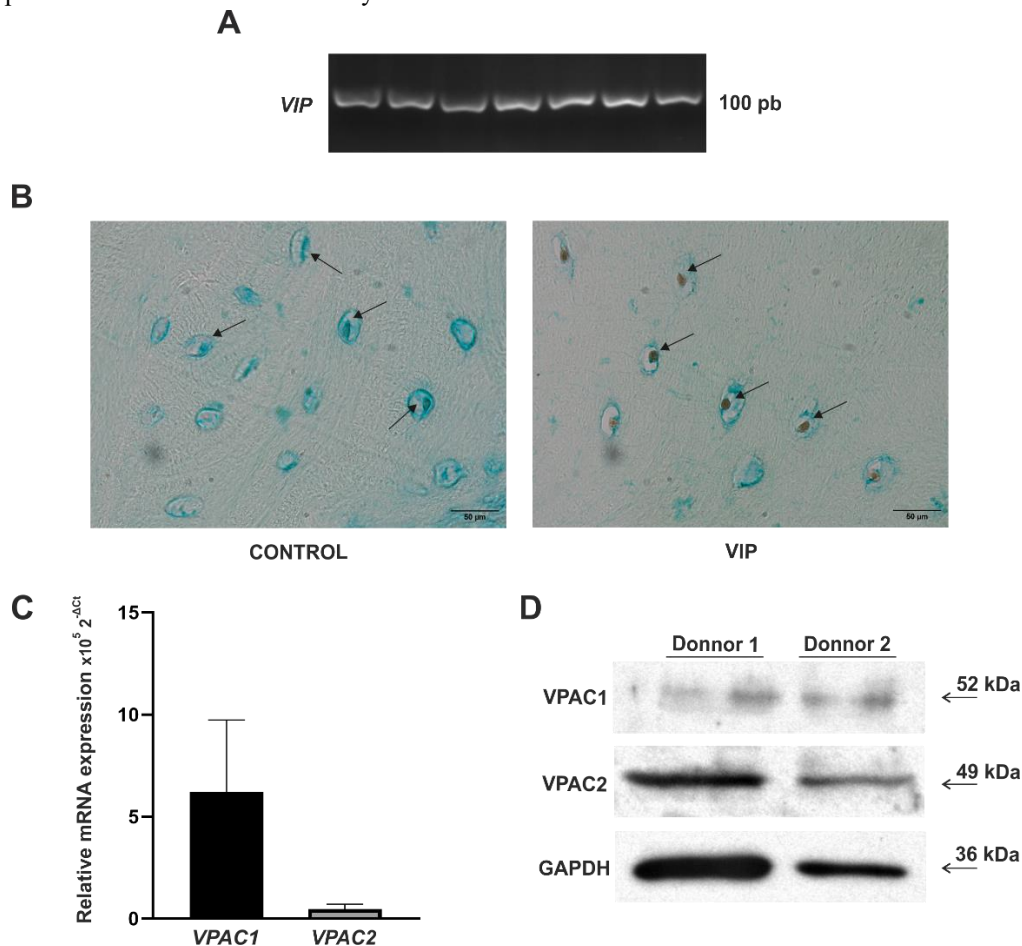


Figure 2. Characterizing the VIP/receptor axis in human osteocytes. **A.** VIP mRNA expression in human osteocytes of seven different donors differentiated in 3D type I collagen gels. Electrophoretic analysis of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) products. **B.** Immuno-peroxidase staining of VIP (arrows) in 3 μ m human compact bone sections (alcian blue and light green counterstained). Images were captured with Olympus BX51 microscope (100x). **C.** *VPAC1* and *VPAC2* gene expression in *in vitro*-differentiated human osteocytes determined by real time-PCR. Results of seven independent experiments are expressed as relative mRNA expression (relative to *ACTB* levels). **D.** Protein detection of VIP receptors after 14 days of human osteocytes differentiation was determined by western blot and GAPDH was used as a loading control. Representative result is shown.

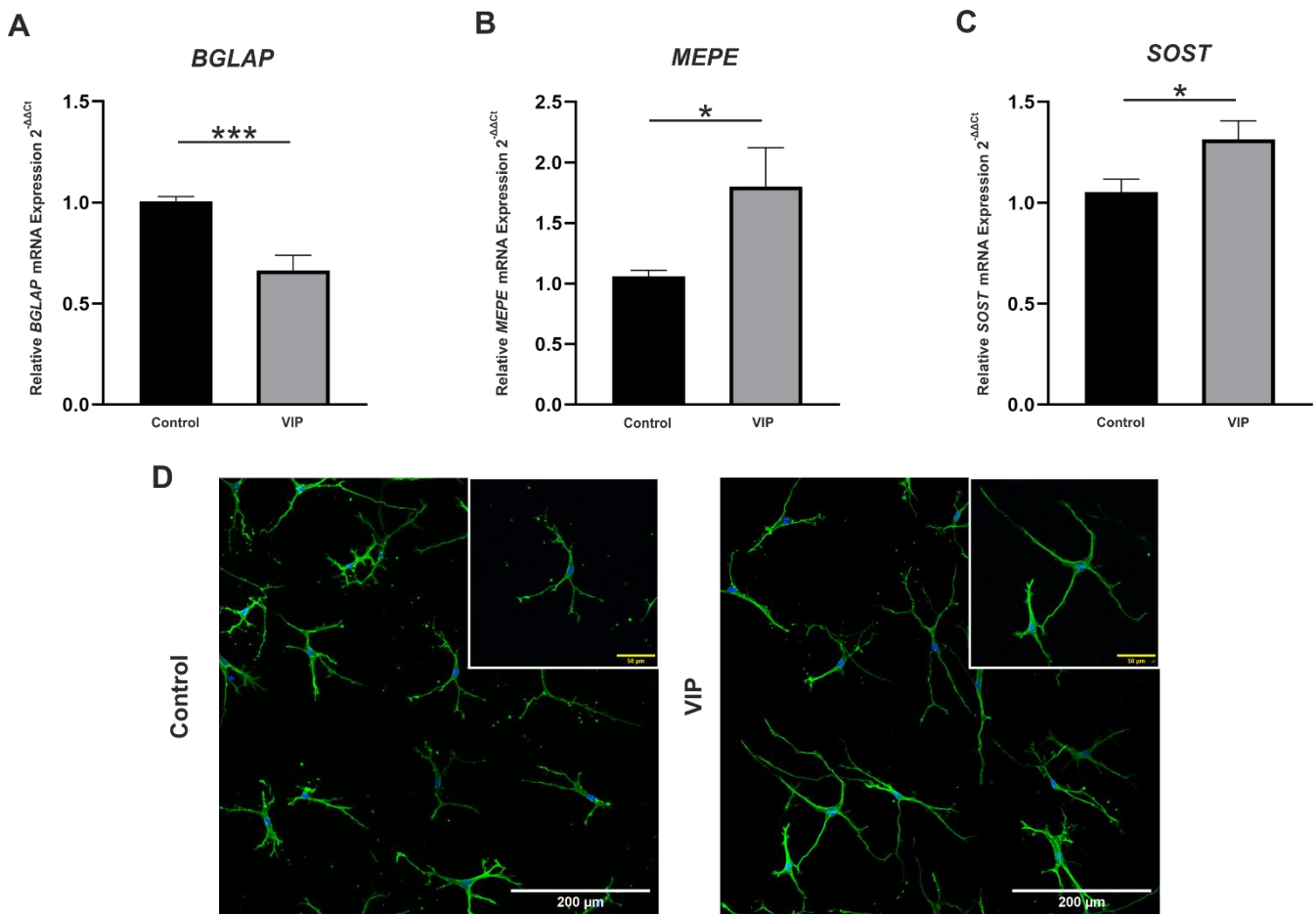


Figure 3. Effect of VIP on osteocyte-associated gene markers expression and morphology during *in vitro* differentiation. *BGLAP* (A), *MEPE* (B), *SOST* (C) mRNA expression levels in differentiated human osteocytes after 14 days of monoculture in 3D type I collagen gels, in absence or presence of VIP 10^{-8} M, determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *ACTB* levels) and referenced to the control group. The means \pm SEM of triplicate determinations of seven independent experiments are shown. T-Test and Mann Whitney U test were performed ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). **D.** Photomicrographs of the effect of VIP on the actin cytoskeleton in *in vitro*-differentiated osteocytes (Olympus FluoView-I200 confocal microscope, 40x). Detection of F-actin was performed using Phalloidin-iFluor 488 (Abcam, green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars represent 200 μ m (white) and 50 μ m (yellow). Representative result is shown.

To investigate whether VIP influences the cytoskeletal reorganization required for the morphological transition to the characteristic dendritic morphology of osteocytes, immunofluorescence staining of F-actin was performed after 14 days of *in vitro* induction. Qualitative assessment of the immunofluorescence images (Figure 3D) demonstrated successful osteocyte differentiation in both control and VIP-treated groups, with development of the typical dendritic outgrowths. Despite limitations of qualitative imaging, osteocytes exposed to VIP appeared to develop somewhat longer and more clearly defined dendritic processes (see supplementary figure 1).

VIP modulates RANKL/OPG ratio in differentiating osteocytes

In order to explore the potential modulatory effects of VIP on bone remodelling by regulating osteocyte-mediated

coordination of osteoblasts and osteoclasts, we investigated whether this neuropeptide could modulate the RANKL/OPG system in osteocytes. Gene expression of RANKL (*TNFSF11*) and OPG (*TNFRSF11B*) was analysed after 14 days of *in vitro* osteocytogenesis in the presence or absence of VIP by real-time qPCR. Although RANKL transcript levels remain unchanged (Figure 4A), the presence of VIP significantly increased OPG gene expression (p -value <0.001) in differentiated osteocytes (Figure 4B), resulting in a significant decrease in the RANKL/OPG ratio (p -value=0.0040) (Figure 4C).

Regulation of bone cell differentiation markers by VIP in triple co-cultures

Next, we explored the role of VIP in a system that mimicked the physiological conditions of bone remodelling. For this propose, triple cultures containing

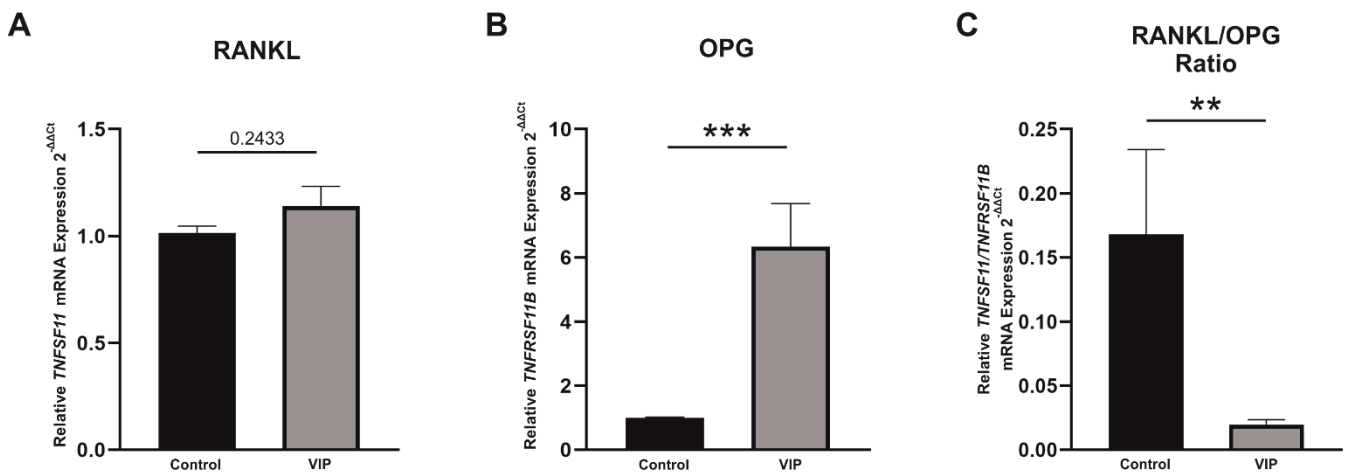


Figure 4. VIP modulates RANKL/OPG ratio in osteocytes. Relative mRNA expression of *TNFSF11* (RANKL) (A) and *TNFRSF11B* (OPG) (B) in human osteocytes after 14 days of *in vitro* differentiation in the absence or presence of VIP 10^{-8} M, determined by real-time PCR. C. RANKL/OPG (*TNFSF11* / *TNFRSF11B*) ratio on gene expression level. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *ACTB* levels) and referenced to the control group. The means \pm SEM of triplicate determinations of seven independent experiments are shown. T-Test and Mann Whitney U test were performed (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

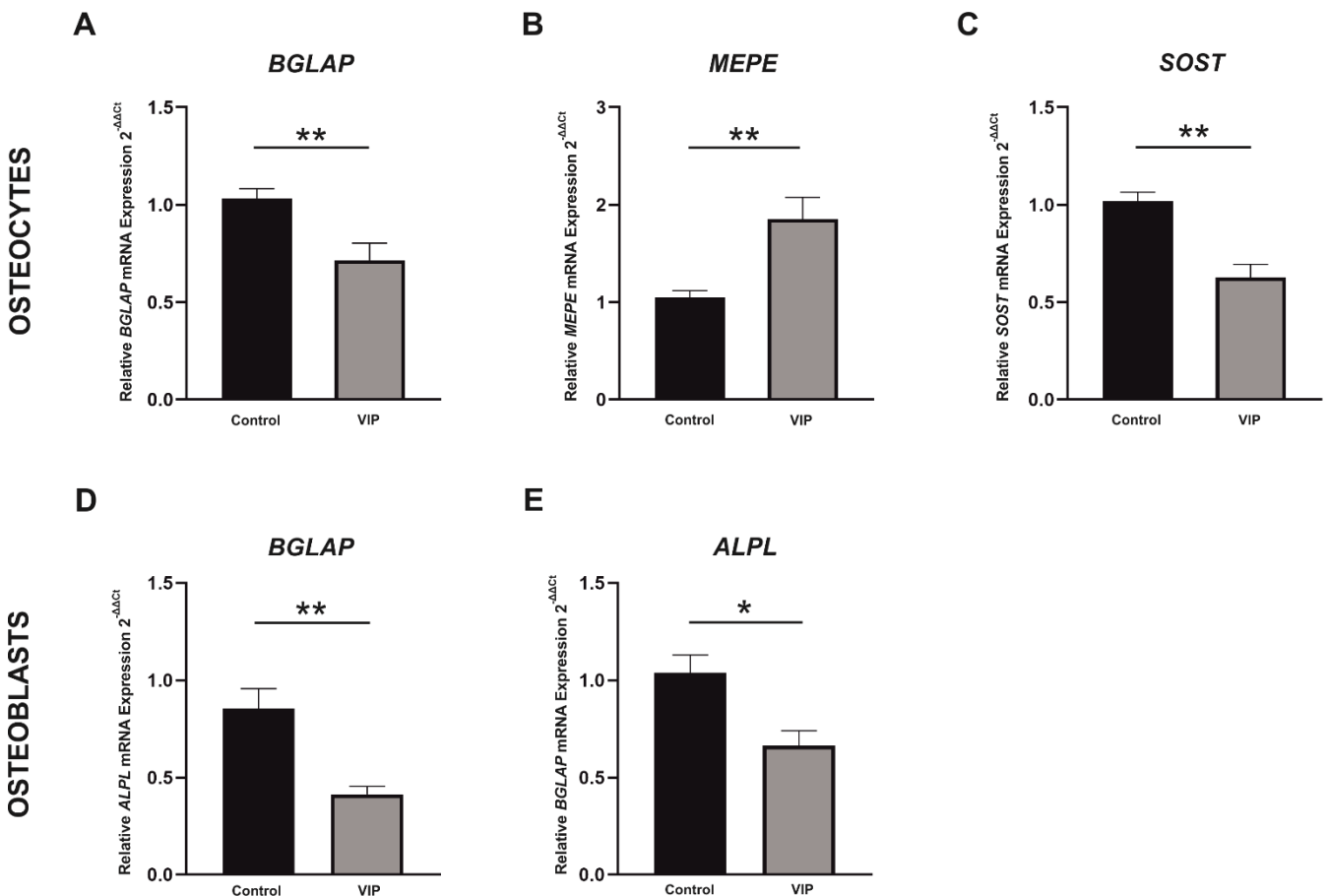


Figure 5. Effect of VIP on osteoblast and osteocyte gene markers in bone triple co-cultures. Relative mRNA expression of *BGLAP* (A, D), *MEPE* (B), *SOST* (C) and *ALPL* (E) in osteoblasts and osteocytes after 14 days of triple co-culture, in absence or presence of VIP 10^{-8} M, was determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *ACTB* levels) and referenced to the control group. The means \pm SEM of triplicate determinations of seven independent experiments are shown. T-Test and Mann Whitney U test were performed (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

mature osteoblasts, as well as osteocytes and osteoclasts undergoing simultaneous differentiation, were performed in the presence or absence of the neuropeptide. After 14 days in triple culture, gene expression of the involved cell types was examined.

Osteocytes differentiated in the presence of VIP in triple culture exhibited a significant reduction of *BGLAP* mRNA expression (p -value=0.0082) (Figure 5A), a marker of mature osteoblasts. Furthermore, neuropeptide exposure significantly upregulated *MEPE* gene expression (p -value=0.0043) (Figure 5B), accompanied by a significant reduction in *SOST* (p -value=0.0015) (Figure 5C). Regarding osteoblast gene expression, VIP treatment in triple culture induced a significant downregulation of both

BGLAP (p -value=0.0159) and *ALPL* (p -value=0.0079) gene expression (Figure 5D, 5E).

Finally, when osteoclast-associated genes were characterised, results showed a significant decrease in the expression of master regulator of osteoclastogenesis *NFATC1* (p -value=0.0043), as well as a tendency for decreased *DCSTAMP* expression (p -value=0.2544) when triple cultures were exposed to VIP (Figure 6A, 6B). Similarly, a decrease in the expression of *ACP5*, encoding TRAP (p -value=0.0722), and *CTSK*, encoding cathepsin k, (p -value=0.0008), two markers associated with resorptive activity, was observed under VIP stimulation (Figure 6C, 6D).

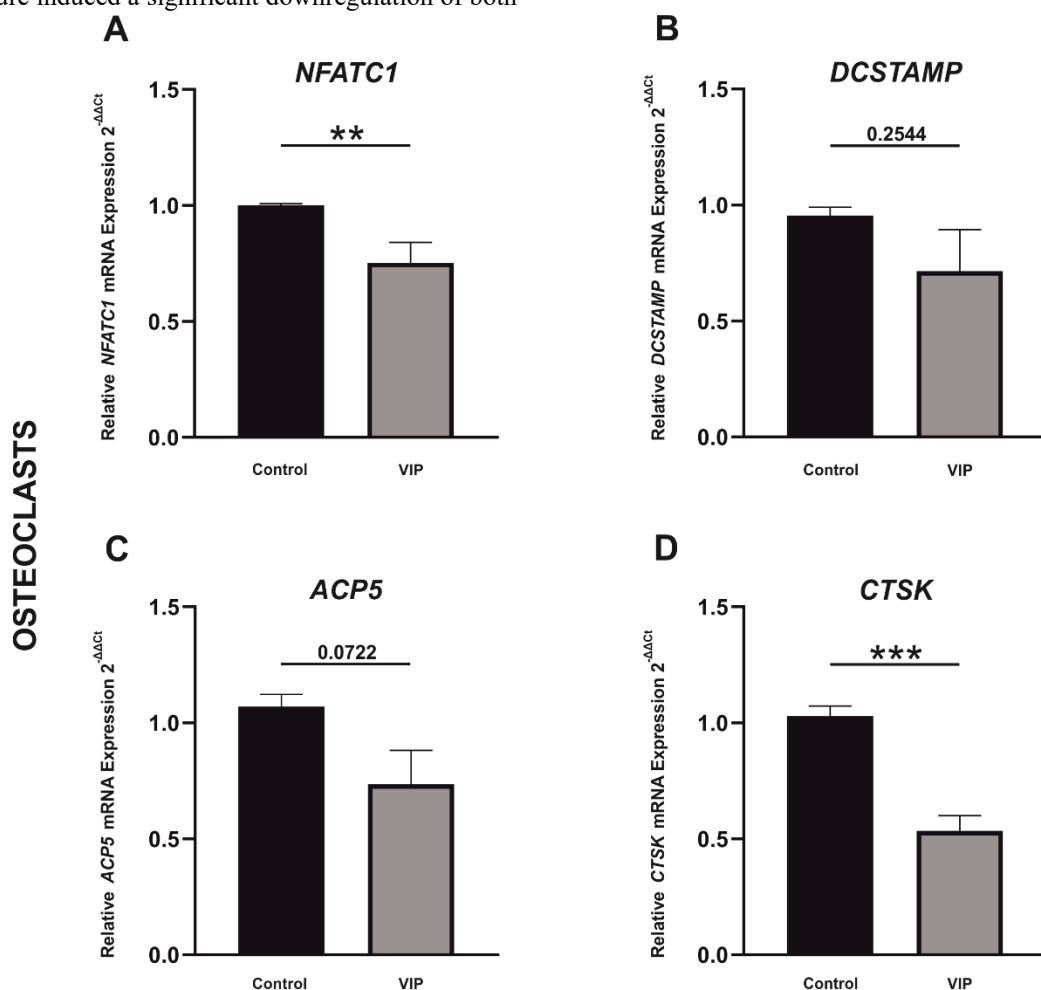


Figure 6. VIP down-regulates the expression of osteoclast-specific markers in triple co-cultures. (A) *NFATC1*, (B) *DCSTAMP*, (C) *ACP5* and (D) *CTSK* mRNA expression levels in differentiated osteoclasts after 14 days of triple co-culture, in absence or presence of VIP 10^{-8} M, determined by real-time PCR. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *ACTB* levels) and referenced to the control group. The means \pm SEM of triplicate determinations of seven independent experiments are shown. *T*-Test and Mann Whitney U test were performed (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

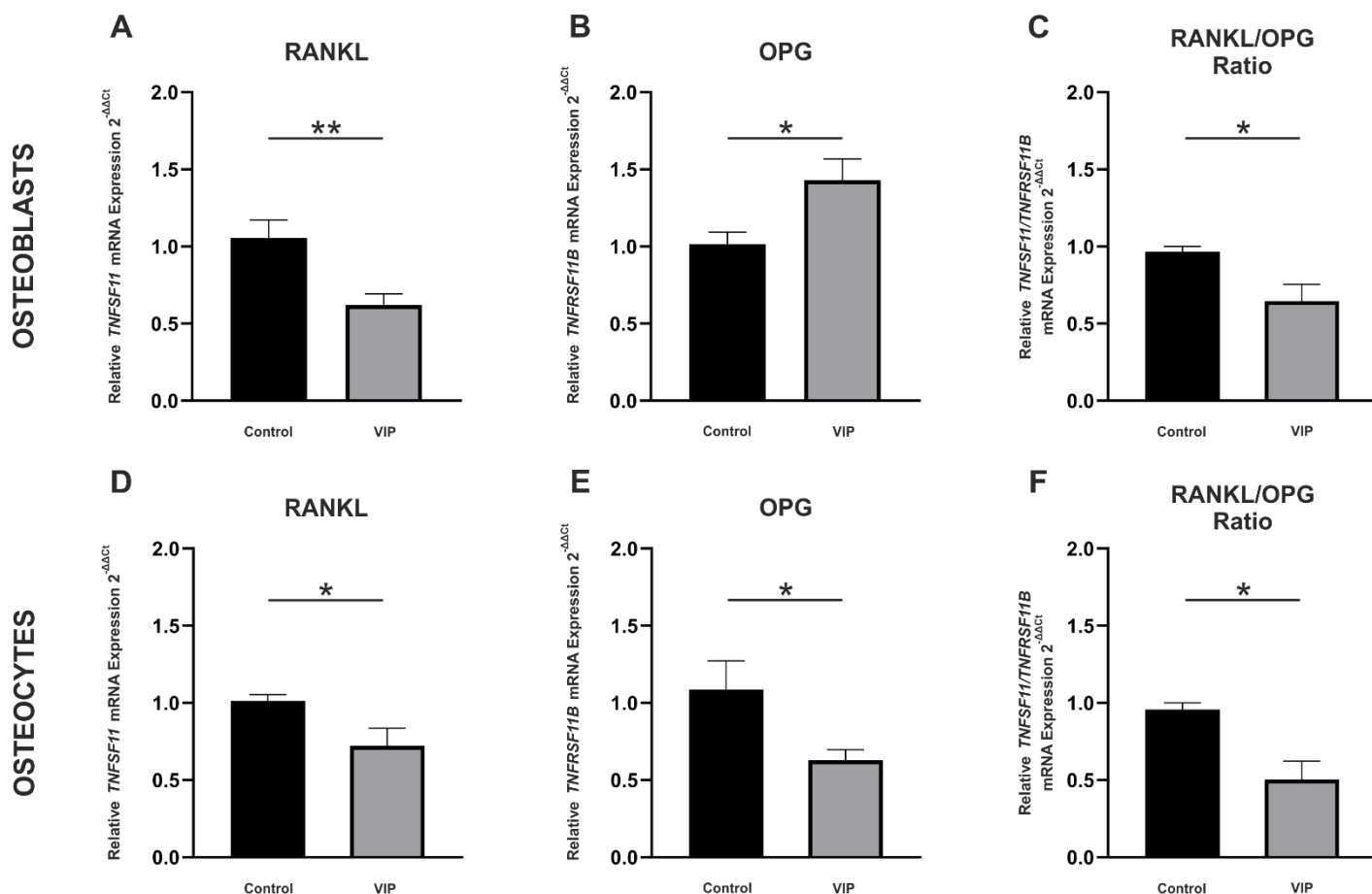


Figure 7. Effect of VIP on osteoblast and osteocyte RANKL and OPG gene expression in triple co-cultures. Relative mRNA expression of *TNFSF11* (RANKL) (A, D) and *TNFRSF11B* (OPG) (B, E) after 14 days of triple co-culture in absence or presence of VIP 10^{-8} M was determined by real-time PCR in osteoblasts and osteocytes. RANKL/OPG (*TNFSF11*/*TNFRSF11B*) (C, F) ratio of gene expression values. Results are expressed as relative mRNA expression (relative to *ACTB* levels) and referenced to the control group. The means \pm SEM of triplicate determinations of seven independent experiments are shown. T-Test and Mann Whitney U test were performed (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

VIP modulates RANKL and OPG gene expression in osteoblasts and osteocytes within triple co-cultures

Given that osteogenic lineage cells, including osteoblasts and osteocytes, are considered the main sources of OPG and RANKL, respectively, playing a fundamental role in regulating bone homeostasis, we examined whether their gene expression (*TNFRSF11B* and *TNFSF11*) was altered in bone triple co-cultures exposed to VIP. In osteoblasts, the presence of VIP led to a significant decrease in RANKL gene expression (p -value = 0.0476) accompanied by an increase in OPG mRNA levels (p -value = 0.0149) (Figure 7A, 7B), resulting in a significant reduction of the RANKL/OPG ratio for this cell type (p -value = 0.0476) (Figure 7C).

In contrast, although osteocytes showed significantly decreased RANKL mRNA levels, they exhibited a downregulation of OPG (p -value = 0.456 and p -

value = 0.0350, respectively) (Figure 7D, 7E). However, the RANKL/OPG ratio in osteocytes, showed a significant reduction in the presence of VIP within the triple co-culture similar to osteoblasts (p -value = 0.0183) (Figure 7F).

Impact of VIP on cell morphology of osteoblast, osteocytes and osteoclasts in triple co-cultures

Cytoskeletal reorganization and the consequent morphological transitions are critical for the differentiation and functional activity of all three bone cell types present in the triple co-cultures. To evaluate the impact of VIP on mature osteoblasts as well as on differentiating osteocytes and osteoclasts, immunofluorescence staining of F-actin was performed in all three cell types after 14 days of culture. Similar to osteocyte differentiation experiments in 3D collagen gels, qualitative assessment of the immunofluorescence images confirmed osteocyte differentiation in both control and VIP-treated groups, with

development of extended dendritic processes (Figure 8B). Besides, we recognized a reduction in osteoclast density accompanied by disorganized actin structures that impaired the formation of the sealing actin ring required for resorption lacunae development (Figure 8A). Finally, no changes were reported on osteoblast cell morphology between control and VIP treatment (Figure 8C).

Discussion

Extensive research described the molecular and cellular pathways that mediate the regulatory actions of VIP in bone remodelling. However, its impact on osteocyte biology has not been elucidated yet, probably due to the technical difficulty involved in the *in vitro* differentiation of primary osteocytes. In the present study, by establishing 3D collagen gel cultures for osteocyte differentiation, we report for the first time that human osteocytes not only

express VIP but also its specific receptors, suggesting a potential autocrine signalling mechanism. Moreover, our data demonstrate that exogenous VIP enhances the *in vitro* differentiation of human osteocytes, raising the possibility of a direct modulatory role of this neuropeptide in osteocyte biology. Consistently, our findings in a more complex cellular context using a triple co-culture model indicate that, in the presence of VIP, the osteoblast-to-osteocyte transition is enhanced toward an osteoprotective phenotype. This phenotype is characterized by reduced sclerostin levels and a lower RANKL/OPG ratio, promoting osteogenesis while limiting osteoclastogenesis. These results reveal novel insights into VIP-mediated cellular crosstalk in bone, highlighting its modulatory influence on the orchestrating activity of osteocytes, which underlies its reported bone homeostatic effects [16, 23, 24, 26, 27].

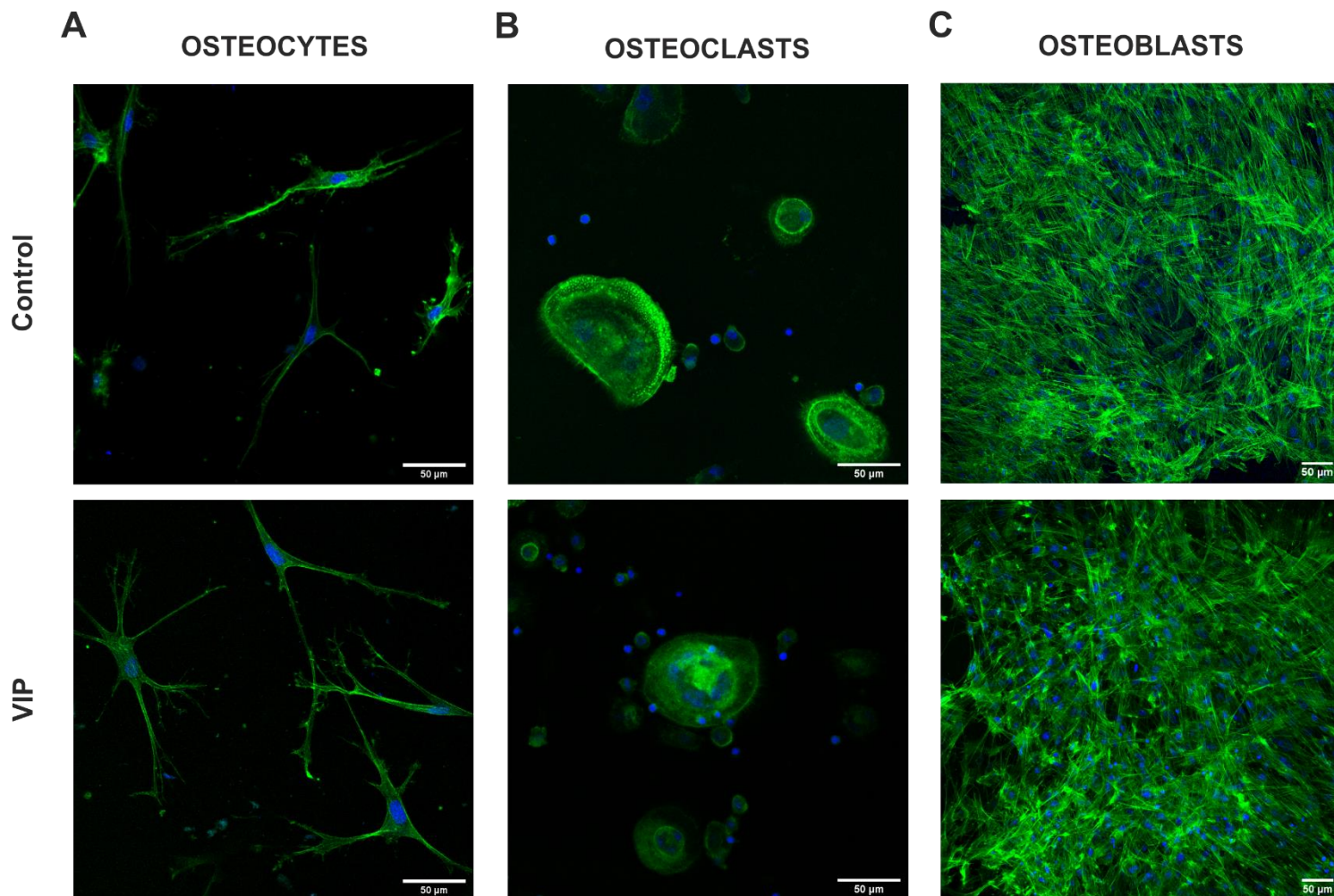


Figure 8. Cell morphology of osteoclasts, osteocytes and osteoblasts in triple co-culture in the absence or presence of VIP. Photomicrographs of the effect of VIP presence on the actin cytoskeleton in osteoclasts (A), osteocytes (B) and osteoblasts (C) after 14 days of triple co-cultures (Olympus FluoView-I200 confocal microscope, 40x). Detection of F-actin was performed using Phalloidin-iFluor 488 (Abcam, green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue).

Our initial objective was to characterize the VIP/receptor axis in human osteocytes and to determine whether these cells, as terminally differentiated osteoblasts, retain the expression of VIP and its specific receptors, previously reported in *in vitro*-differentiated human osteoblasts [27]. As anticipated, VIP transcripts were detected in 3D-differentiated human osteocytes and confirmed in bone matrix-embedded cells through immunohistochemical analysis of compact bone sections, in agreement with a previous report describing VIP expression in osteocyte-like cells within the subchondral bone of osteoarthritic patients [31]. These findings suggest that osteocytes may act as an additional source of VIP within the bone microenvironment contributing to further increase its local levels, similar to reports on the neuropeptide NPY [36]. Moreover, our results provide the first evidence for VPAC1 and VPAC2 expression in human osteocytes, consistent with the preservation of receptor expression previously demonstrated in *in vitro*-differentiated human osteoblasts [27] and also reported in human periosteum-derived osteoblastic cells (SaM-1) and osteosarcoma-derived cell lines (SaOS-2, HOS, and MG-63) [37-40]. The presence of both receptors suggests that VIP can directly modulate osteocyte activity and, together with its local production by osteogenic lineage cells, supports the concept of VIP acting as an osteocytic autocrine and paracrine factor within the bone microenvironment.

Accumulating evidence has established VIP as an endogenous osteoinductive factor, directly promoting the osteogenic differentiation of human and rat BM-MSCs by upregulating specific osteoblastic markers and inducing the actin cytoskeletal rearrangements characteristic of cuboidal osteoblasts [26, 27]. As osteocytes express the receptors mediating VIP activity, the present study explored its potential role in regulating the transition from mature osteoblasts to osteocytes. Our results demonstrate that in *in vitro* 3D-differentiated osteocytes, VIP exposure upregulated the anti-mineralization gene *MEPE* and the bone formation inhibitor *SOST*, well-established markers of mature osteocytes [41]. These data align with findings in a murine model of alveolar bone healing, where VIP increased osteogenic related markers, along with upregulation of osteocytic genes such as *SOST* [42]. Besides, we also observed a significant reduction in the mature osteoblast marker *BGLAP* in osteocytes differentiated under VIP stimulation, consistent with an enhancement of the osteocytogenic process, during which osteoblasts progressively downregulate bone matrix production [43]. Additionally, as osteocytogenesis requires cytoskeletal plasticity for the formation of dendritic extensions within the canalicular network [1], and given that VIP has been shown to induce F-actin reorganization in osteogenic cells [27], we examined the cytoskeletal architecture of osteocytes exposed to VIP. Qualitative

morphological analysis indicated that VIP-stimulated osteocytes retained their characteristic stellate morphology and exhibited extended dendritic projections, potentially reflecting progression in the differentiation process [43]. Therefore, the present findings support the hypothesis that VIP may facilitate the transition from osteoblast to osteocyte by promoting a progressive reduction in bone matrix production, inducing osteocyte-specific gene expression, and enabling cytoskeletal rearrangements required for extensive dendritic branching.

As central regulators of bone homeostasis, osteocytes exert paracrine effects on osteoblasts and osteoclasts through direct cell-cell interactions and the release of regulatory molecules [44]. Specifically, osteocytes play a fundamental role in modulating osteoclast biology, primarily through the production of RANKL and OPG [43]. As both cytokines have been identified as targets of VIP in its osteoblast-mediated anti-osteoclastogenic effects [27, 45], and given that the osteoprotective activity of this neuropeptide in both animal models and early arthritis patients has been linked to a reduced RANKL/OPG ratio [16, 24], we aimed to determine whether a similar regulatory effect occurs in osteocytes. Our data reveal a significant increase in the OPG mRNA levels in osteocytes differentiated in the presence of VIP, consistent with its reported ability to counteract the inhibitory effect of 1,25(OH)₂-vitamin D₃ on OPG expression in mouse bone marrow cultures [45] and to upregulate OPG in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells [46]. Consequently, we also detected a decrease in the osteocytic RANKL/OPG ratio, similar to that observed in *in vitro*-differentiated human osteoblasts [27], supporting the notion that VIP may also exert anti-osteoclastogenic effects through the regulation of these osteocyte-derived factors.

However, to fully assess the modulatory effects of VIP on osteocyte-mediated bone homeostasis, it is essential to consider the reciprocal interactions among osteoblasts, osteoclasts and osteocytes. Therefore, to better mimic the bone remodelling process, we analysed the impact of the neuropeptide in the triple co-culture system, in which osteocytes and osteoclasts were simultaneously differentiated from their progenitors in the presence of mature osteoblasts [34]. In line with our findings in osteocyte monocultures, exposure to VIP downregulated the mature osteoblast marker *BGLAP* in differentiating osteocytes, while concurrently increasing the osteocytic marker *MEPE*, and inducing a more pronounced dendritic morphology, characteristic of fully differentiated osteocytes. In contrast, our results demonstrated that VIP significantly downregulated *SOST* expression in triple culture, a finding that should be interpreted within the specific context of the triple co-culture, as sclerostin not only acts as a direct inhibitor of osteoblast differentiation

[6, 47-49] but also indirectly promotes osteoclastogenesis through osteoblast-mediated signalling [50, 51]. Thus, by downregulating osteocytic sclerostin, VIP may promote the differentiation of osteogenic lineage cells and further facilitate osteocytogenesis, consistent with the well-established inhibitory role of this protein in the mature osteoblast-to-osteocyte transition [52]. This hypothesis aligns with the significant decrease in *BGLAP* and *ALPL* expression detected in mature osteoblasts cultivated in triple cultures exposed to VIP, reflecting a reduction in the mineralizing activity required for their transition into osteocytes [53]. Interestingly, this regulatory mechanism may not be strictly unidirectional, as there are osteoblast-derived factors that influence *SOST* expression in osteocytes [54]. Among these, VIP is known to stimulate the production of LIF (leukaemia inhibitory factor) [55] and PGE2 (prostaglandin E2) [56] in osteoblasts, which could negatively affect sclerostin gene expression in osteocytes present in the triple co-culture model.

In this context, the downregulation of *SOST* observed in VIP-treated bone triple co-cultures may be related to the reduced osteoblastic RANKL/OPG ratio, consistent with the role of sclerostin in enhancing RANKL while suppressing OPG in mature osteoblasts [50]. In this sense, our findings from the triple co-culture model demonstrate a marked reduction in osteoclast differentiation markers (*NFATC1* and *DCSTAMP*) and resorptive activity markers (*ACP5* and *CTSK*) in the presence of VIP, accompanied by disruption of the actin cytoskeletal reorganization essential for osteoclast resorptive function. This decrease in osteoclastogenic gene and morphological markers likely reflects both the well-established direct inhibitory effect of VIP on osteoclasts biology [16, 20, 45] and the downstream consequences of the reduced RANKL/OPG ratio observed in osteoblasts.

Although multiple cell types contribute to RANKL production during bone remodelling, osteocytes are widely recognized as the predominant source of functional RANKL driving osteoclastogenesis [43]. Interestingly, within the bone triple co-culture model, VIP stimulation led to a marked decrease in osteocyte RANKL expression, an effect that was not observed under monoculture conditions. This microenvironment-dependent response could partly result from the VIP-induced decrease in sclerostin, which promotes a pro-osteoclastogenic phenotype in human primary pre-osteocytes and in the murine osteocyte-like cell line MLO-Y4 by stimulating RANKL expression [50, 51, 57]. Thus, the reduction of osteocytic *SOST* observed in the presence of VIP could not only attenuate the osteocyte-mediated inhibition of osteogenesis but also represent an additional mechanism underlying the anti-osteoclastogenic effects of VIP, potentially interfering with the RANKL-dependent pathway by which osteocytes

support osteoclast differentiation. Conversely, our data also reveal that the OPG gene expression is downregulated in osteocytes exposed to VIP within the triple co-culture. This could potentially compromise its anti-osteoclastogenic action, as OPG functions as a soluble decoy receptor for RANKL, thereby preventing osteoclast formation and bone resorption. Nevertheless, this effect is not expected to substantially impact bone cellular crosstalk, since it does not alter the OPG dominance in the osteocytic RANKL/OPG ratio. Furthermore, osteoblasts are widely recognized as the predominant source of OPG within the bone microenvironment [58, 59]. Despite this, osteocytic OPG may play an important role in the mechanisms that regulate subcellular RANKL trafficking, as it has been described that the formation of the OPG-RANKL complex within the Golgi apparatus is necessary for RANKL trafficking to the plasma membrane [60, 61]. Given that membrane-bound RANKL but not soluble RANKL constitutes the physiologically active form required for osteoclast formation [9, 10], the VIP-induced decrease in osteocytic OPG expression could impair RANKL trafficking to the cell surface, thereby further reinforcing an anti-osteoclastogenic profile.

In summary, our findings indicate that VIP may function as an autocrine and paracrine modulator of osteoblast and osteocyte activity, introducing a new regulatory component within the neuro-osteogenic pathway. In addition, our results show that VIP promotes osteocytogenesis, leading to the acquisition of an osteoprotective phenotype characterized by reduced sclerostin expression. This decrease not only attenuates osteocyte-mediated inhibitory signalling toward osteoblasts but also contributes to an anti-osteoclastogenic profile by lowering the osteoblastic RANKL/OPG ratio. This suppressive effect of VIP on osteoclast biology may be further reinforced by downregulation of RANKL in osteocytes, resulting in a reduced osteocytic RANKL/OPG ratio, along with a concomitant decrease in OPG expression that could impair RANKL localization to the osteocyte membrane.

Although additional studies are needed to better understand the mechanisms involved, our findings represent an important advancement in understanding the role of VIP in osteocyte-mediated regulation of bone metabolism. This research represents a significant step toward exploring new therapeutic targets for a wide range of musculoskeletal disorders characterized by impaired bone homeostasis.

Bibliography

1. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A (2022) Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res* 10:48. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8>.

2. Krasnova O, Neganova I (2023) Assembling the Puzzle Pieces. Insights for *in vitro* Bone Remodeling. *Stem Cell Rev Rep* 19:1635-1658. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10558-6>.
3. Sun W, Ye B, Chen S, Zeng L, Lu H, Wan Y, et al. (2023) Neuro-bone tissue engineering: emerging mechanisms, potential strategies, and current challenges. *Bone Res* 11:65. <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00302-8>.
4. Liu S, Chen T, Wang R, Huang H, Fu S, Zhao Y, et al. (2022) Exploring the effect of the "quaternary regulation" theory of "peripheral nerve-angiogenesis-osteoclast-osteogenesis" on osteoporosis based on neuropeptides. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:908043. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.908043>.
5. Choi JUA, Kijas AW, Lauko J, Rowan AE (2021) The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States. *Front Cell Dev Biol* 9:770143. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.770143>.
6. Robling AG, Bonewald LF (2020) The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol* 82:485-506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>.
7. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015:421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
8. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013) The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev* 34:658-690. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>.
9. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine* 17:1231-1234. <https://doi.org/10.1038/nm.2452>.
10. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA (2011) Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 17:1235-1241. <https://doi.org/10.1038/nm.2448>.
11. Takegahara N, Kim H, Choi Y (2022) RANKL biology. *Bone* 159:116353. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116353>.
12. Park JH, Lee NK, Lee SY (2017) Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells* 40:706-713. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0225>.
13. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3:889-901. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00369-6](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00369-6).
14. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. (2021) Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab* 39:19-26. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>.
15. Lerner UH, Persson E (2008) Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8:154-165.
16. Castro-Vázquez D, Lamana A, Arribas-Castano P, Gutierrez-Canas I, Villanueva-Romero R, Perez-Garcia S, et al. (2021) The Neuropeptide VIP Limits Human Osteoclastogenesis: Clinical Associations with Bone Metabolism Markers in Patients with Early Arthritis. *Biomedicines* 9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121880>.
17. Qu H, Zhuang Y, Zhu L, Zhao Z, Wang K (2021) The effects of vasoactive intestinal peptide on RANKL-induced osteoclast formation. *Ann Transl Med* 9:127. <https://doi.org/10.21037/atm-20-7607>.
18. Eger M, Liron T, Hiram-Bab S, Awida Z, Giladi E, Dangoor D, et al. (2021) Therapeutic Potential of Vasoactive Intestinal Peptide and its Derivative Stearyl-Norleucine-VIP in Inflammation-Induced Osteolysis. *Front Pharmacol* 12:638128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.638128>.
19. Muschter D, Schaefer N, Stangl H, Straub RH, Graessel S (2015) Sympathetic Neurotransmitters Modulate Osteoclastogenesis and Osteoclast Activity in the Context of Collagen-Induced Arthritis. *Plos One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139726>.
20. Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH, et al. (2000) Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts. *Bone* 27:803-810. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00394-x](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00394-x).
21. Lerner UH (2002) Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2:440-447.
22. Deng S, Xi Y, Wang H, Hao J, Niu X, Li W, et al. (2010) Regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. *Cellular Immunology* 265:105-110. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.07.010>.
23. Delgado M, Abad C, Martinez C, Laceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nature Medicine* 7:563-568. <https://doi.org/10.1038/87887>.
24. Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Cañas I, Rosignoli F, et al. (2005) Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 7:R1034-R1045. <https://doi.org/10.1186/ar1779>.
25. Gurkan A, Emingil G, Nizam N, Doganavsargil B, Sezak M, Kutukuler N, et al. (2009) Therapeutic efficacy of vasoactive intestinal peptide in escherichia coli lipopolysaccharide-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 80:1655-1664. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090031>.
26. Shi L, Feng L, Zhu ML, Yang ZM, Wu TY, Xu J, et al. (2020) Vasoactive Intestinal Peptide Stimulates Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells Osteogenesis Differentiation by Activating Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway and Promotes Rat Skull Defect Repair. *Stem Cells Dev* 29:655-666. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0148>.
27. Castro-Vázquez D, Arribas-Castaño P, Garcia-Lopez I, Gutierrez-Cañas I, Perez-Garcia S, Lamana A, et al. (2024) Vasoactive intestinal peptide exerts an osteoinductive effect in human mesenchymal stem cells. *Biofactors*. <https://doi.org/10.1002/biof.2062>.
28. Shi L, Liu Y, Yang Z, Wu T, Lo HT, Xu J, et al. (2021) Vasoactive Intestinal Peptide Promotes Fracture Healing in Sympathectomized Mice. *Calcif Tissue Int* 109:55-65. <https://doi.org/10.1007/s00223-021-00820-9>.
29. Hohmann EL, Elde RP, Rysavy JA, Einzig S, Gebhard RL (1986) Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science* 232:868-871. <https://doi.org/10.1126/science.3518059>.
30. Xiao J, Yu W, Wang X, Wang B, Chen J, Liu Y, et al. (2016) Correlation between neuropeptide distribution, cancellous bone microstructure and joint pain in postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *Neuropeptides* 56:97-104. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.12.006>.
31. Kanemitsu M, Nakasa T, Shirakawa Y, Ishikawa M, Miyaki S, Adachi N (2020) Role of vasoactive intestinal peptide in the progression of osteoarthritis through bone sclerosis and angiogenesis in subchondral bone. *J Orthop Sci* 25:897-906. <https://doi.org/10.1016/j.jos.2019.11.010>.
32. Martinez C, Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Carrion M, Perez-Garcia S, Villanueva-Romero R, et al. (2019) A Clinical Approach for the Use of VIP Axis in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21010065>.
33. Bernhardt A, Wolf S, Weiser E, Vater C, Gelinsky M (2020) An improved method to isolate primary human osteocytes from

- bone. *Biomed Tech (Berl)* 65:107-111. <https://doi.org/10.1515/bmt-2018-0185>.
34. Wirsig K, Bacova J, Richter RF, Hintze V, Bernhardt A (2024) Cellular response of advanced triple cultures of human osteocytes, osteoblasts and osteoclasts to high sulfated hyaluronan (sHA3). *Mater Today Bio* 25:101006. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101006>.
35. Bernhardt A, Skottke J, von Witzleben M, Gelinsky M (2021) Triple Culture of Primary Human Osteoblasts, Osteoclasts and Osteocytes as an *In vitro* Bone Model. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22147316>.
36. Wu JQ, Jiang N, Yu B (2020) Mechanisms of action of neuropeptide Y on stem cells and its potential applications in orthopaedic disorders. *World J Stem Cells* 12:986-1000. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i9.986>.
37. Hohmann EL, Tashjian AH, Jr. (1984) Functional receptors for vasoactive intestinal peptide on human osteosarcoma cells. *Endocrinology* 114:1321-1327. <https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1321>.
38. Bjurholm A, Kreicbergs A, Schultzberg M, Lerner UH (1992) Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, and Saos-2) and primary bone cells. *J Bone Miner Res* 7:1011-1019. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070903>.
39. Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T (1997) Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett* 233:125-128. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00649-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00649-6).
40. Lundberg P, Lundgren I, Mukohyama H, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH (2001) Vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in mouse calvarial osteoblasts: presence of VIP-2 receptors and differentiation-induced expression of VIP-1 receptors. *Endocrinology* 142:339-347. <https://doi.org/10.1210/endo.142.1.7912>.
41. Kitase Y, Prideaux M (2023) Targeting osteocytes vs osteoblasts. *Bone* 170:116724. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116724>.
42. Azevedo MCS, Fonseca AC, Colavite PM, Melchhiades JL, Tabanez AP, Codo AC, et al. (2021) Macrophage Polarization and Alveolar Bone Healing Outcome: Despite a Significant M2 Polarizing Effect, VIP and PACAP Treatments Present a Minor Impact in Alveolar Bone Healing in Homeostatic Conditions. *Front Immunol* 12:782566. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.782566>.
43. Marahleh A, Kitaura H, Ohori F, Noguchi T, Mizoguchi I (2023) The osteocyte and its osteoclastogenic potential. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14:1121727. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1121727>.
44. Delgado-Calle J, Bellido T (2022) The osteocyte as a signaling cell. *Physiol Rev* 102:379-410. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2020>.
45. Mukohyama H, Ransjo M, Taniguchi H, Ohyama T, Lerner UH (2000) The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem Biophys Res Commun* 271:158-163. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2599>.
46. Yoo YM, Kwag JH, Kim KH, Kim CH (2014) Effects of neuropeptides and mechanical loading on bone cell resorption *in vitro*. *Int J Mol Sci* 15:5874-5883. <https://doi.org/10.3390/ijms15045874>.
47. Semenov M, Tamai K, Xi H (2005) SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 280:26770-26775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504308200>.
48. Tresguerres FGF, Torres J, Lopez-Quiles J, Hernandez G, Vega JA, Tresguerres IF (2020) The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Ann Anat* 227:151422. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151422>.
49. van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. (2004) Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *Journal of Experimental Medicine* 199:805-814. <https://doi.org/10.1084/jem.20031454>.
50. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ (2011) Sclerostin Stimulates Osteocyte Support of Osteoclast Activity by a RANKL-Dependent Pathway. *Plos One* 6:9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025900>.
51. Shu R, Bai D, Sheu T, He Y, Yang X, Xue C, et al. (2017) Sclerostin Promotes Bone Remodeling in the Process of Tooth Movement. *PLoS One* 12:e0167312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167312>.
52. Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR, et al. (2011) Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 26:1425-1436. <https://doi.org/10.1002/jbmr.345>.
53. Twine NA, Chen L, Pang CN, Wilkins MR, Kassem M (2014) Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone* 67:23-32. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.027>.
54. Sims NA, Chia LY (2012) Regulation of Sclerostin Expression by Paracrine and Endocrine Factors. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 10:98-107. <https://doi.org/10.1007/s12018-011-9121-7>.
55. Greenfield EM, Horowitz MC, Lavish SA (1996) Stimulation by parathyroid hormone of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor expression in osteoblasts is an immediate-early gene response induced by cAMP signal transduction. *J Biol Chem* 271:10984-10989. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10984>.
56. Eleftheriou F (2005) Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:2339-2349. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5175-3>.
57. Ohori F, Kitaura H, Marahleh A, Kishikawa A, Ogawa S, Qi J, et al. (2019) Effect of TNF-alpha-Induced Sclerostin on Osteocytes during Orthodontic Tooth Movement. *J Immunol Res* 2019:9716758. <https://doi.org/10.1155/2019/9716758>.
58. Cawley KM, Bustamante-Gomez NC, Guha AG, MacLeod RS, Xiong J, Gubrij I, et al. (2020) Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts Suppresses Bone Resorption. *Cell Rep* 32:108052. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108052>.
59. Tsukasaka M, Asano T, Muro R, Huynh NC, Komatsu N, Okamoto K, et al. (2020) OPG Production Matters Where It Happened. *Cell Rep* 32:108124. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108124>.
60. Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N, et al. (2010) Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 25:1907-1921. <https://doi.org/10.1002/jbmr.89>.
61. Ostrowski MC (2010) A new role for OPG: putting RANKL in its place. *J Bone Miner Res* 25:1905-1906. <https://doi.org/10.1002/jbmr.206>.

Statements and Declarations

Acknowledgements: We thank the Genomics and Fluorescence Microscopy Centres of Complutense University for the use of their facilities. We are grateful to all donors and the collaborating clinicians for their participation in this study. We also appreciate the assistance of Isabel Montero, for her assistance with histology techniques.

Author contributions: All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by David Castro-Vázquez, Katharina Wirsig, Iván García-López and Anne Bernhardt. The first draft of the manuscript was written by David Castro-Vázquez, Iván García-López, Paula Arribas-Castaño and Mar Carrión and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest: The authors declare no competing interests.

Funding: This research was funded by grants RD24/0007/0014 and RD21/0002/0004 from the Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III), co-funded by European regional development fund (ERDF) and by the UCM grants PR12/24-31568 and PR12/24-31572. DC-V was awarded

with an EMBO Scientific Exchange Grant (SEG 10287). KW was awarded a scholarship funded by and in cooperation with the Saxon Ministry for Higher Education and Arts and the Studentenwerk Dresden.

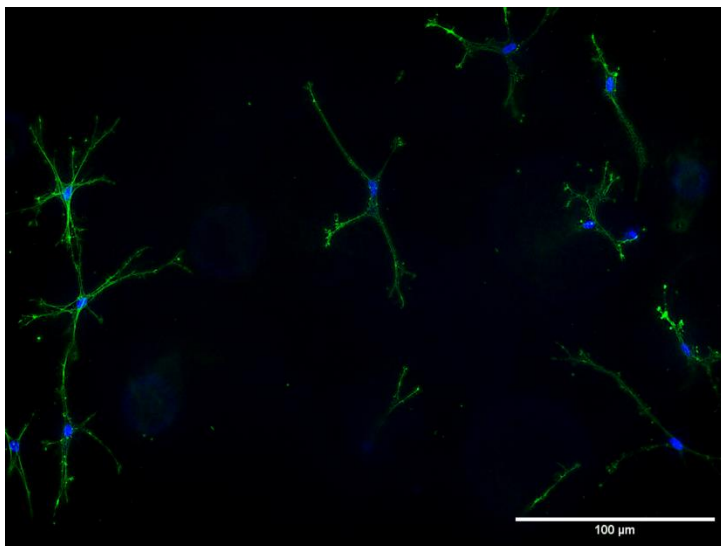
Data availability: Data and further details regarding the manuscript will be made available by request to the corresponding author.

Ethics approval: This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of the San Carlos Clinical Hospital (25/112-E, Feb 2025). Primary human pre-osteoblasts were isolated from human femoral heads after informed consent (approval by the ethics commission of TU Dresden, EK 303082014).

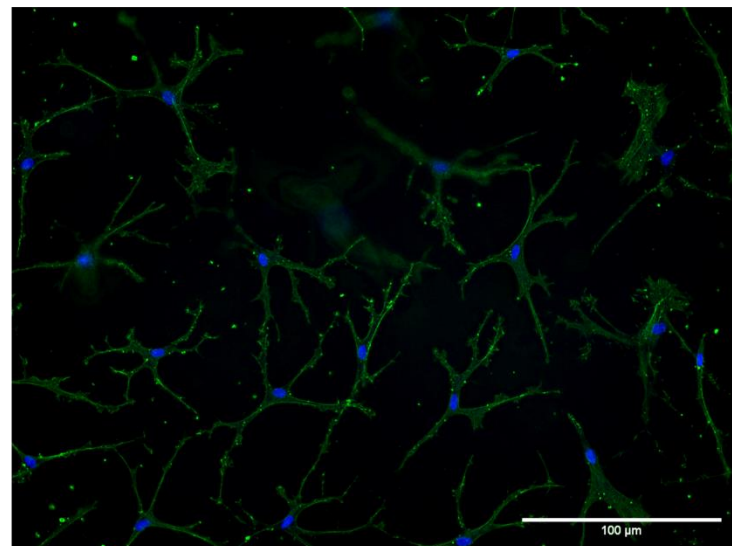
Consent to participate: Not applicable.

Consent to publish: Not applicable.

Supplementary Data



Control



VIP

Supplementary Figure 1. Effect of VIP on osteocyte morphology during *in vitro* differentiation Photomicrographs of the effect of VIP on the actin cytoskeleton in *in vitro*-differentiated osteocytes (Keyence BZ-X810 microscope, 20×). Detection of F-actin was performed using Phalloidin-iFluor 488 (Abcam, green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars represent 100 μm. Representative result is shown.

Discusión



Discusión

La integridad y resistencia del tejido óseo dependen de la actividad coordinada de osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. Los osteoclastos degradan la matriz ósea antigua o dañada, mientras que los osteoblastos sintetizan nuevo hueso, restaurando así la arquitectura y la función del tejido. Los osteocitos, por su parte, quedan atrapados en la matriz mineralizada y actúan como coordinadores centrales de la homeostasis ósea, regulando de forma paracrina y autocrina tanto la resorción como la formación del hueso. El equilibrio entre estos procesos catabólicos y anabólicos, esencial en el remodelado óseo, está controlado por una red de señales entre las que se incluyen hormonas, factores de crecimiento locales, citocinas y neuropéptidos. Entre estos últimos, VIP ha emergido como un modulador clave del microambiente óseo. Diversos estudios han demostrado sus efectos osteoprotectores tanto *in vivo* en modelos animales como *in vitro* en cultivos celulares murinos, al inhibir la osteoclastogénesis y estimular la diferenciación osteoblástica, además de mostrar propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias.

Con el fin de profundizar en el papel modulador de VIP sobre la homeostasis ósea en humanos, resulta necesario caracterizar con mayor detalle los patrones de expresión de los receptores de VIP, VPAC1 y VPAC2, en las células del tejido óseo. De este modo, en relación con el estudio de la expresión de los receptores de VIP durante la osteoclastogénesis, los resultados del [artículo 1](#) demuestran la **presencia de ambos receptores de VIP tanto en osteoclastos diferenciados *in vitro* como en sus precursores monocíticos**. Estos resultados corroboran los previamente descritos en osteoclastos procedentes de medula ósea de ratón y rata (Eger *et al.*, 2021; Lundberg *et al.*, 2000; Muschter *et al.*, 2015). Además, revelan una disminución de la expresión génica de ambos receptores en los osteoclastos diferenciados con respecto a la de los monocitos. Este patrón de expresión concuerda con la regulación dinámica de los receptores de VIP descrita previamente en el proceso de diferenciación de macrófagos humanos (Carrión *et al.*, 2016; Hohenhaus *et al.*, 2013). Concretamente, la expresión de VPAC1 y VPAC2 experimenta una reducción a lo largo de los 7 días requeridos para la diferenciación de los macrófagos a partir de sus precursores monocíticos (Carrión *et al.*, 2016). Por tanto, nuestros resultados corroboran datos previos que describen la reducción de la expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2 en células de linaje mieloide cuando están sometidas a procesos de diferenciación celular. No obstante, serían necesarios estudios complementarios para determinar la implicación funcional de esta regulación dinámica.

En lo relativo a la presencia de los receptores de VIP en las células del linaje osteogénico, estudios previos realizados con osteoblastos de calvaria de ratón y líneas celulares de osteosarcoma murino señalan la expresión de VPAC1 y VPAC2 (Gomariz *et al.*, 2019; Gozes, 2008; Martínez *et al.*, 2020). Sin embargo, la descripción de su presencia en células humanas se limita a un trabajo en el que se emplean líneas celulares de osteosarcoma y la línea celular SaM-1 de osteoblastos inmortalizados (Togari *et al.*, 1997). En el **artículo 2** de esta tesis doctoral **describimos, por primera vez, el patrón de expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2 durante el proceso de diferenciación de osteoblastos y, en el artículo 3, su presencia en osteocitos maduros.** En todos los puntos analizados a lo largo de los 14 días de diferenciación osteoblástica, nuestros resultados revelan que el receptor VPAC1 presenta niveles de expresión más elevados que el receptor VPAC2, manteniéndose además una proporción constante entre ambos. Sin embargo, en trabajos previos en líneas celulares de osteoblastos humanos solo se señala la expresión de VPAC1, mientras que en osteoblastos murinos diferenciados a partir BM-MSM se ha descrito que la expresión de VPAC1 se induce durante la osteogénesis y que VPAC2 se expresa de forma constitutiva (Lundberg *et al.*, 2001; Togari *et al.*, 1997). Estas discrepancias no son incompatibles con nuestros presentes resultados ya que para dichos estudios se utilizaron tipos celulares, fases de diferenciación y especies diferentes, además de técnicas experimentales de menor sensibilidad para la detección de ARNm. Por último, y en línea con lo publicado previamente en osteoblastos primarios de ratón, en osteoblastos humanos aislados de hueso trabecular, así como en líneas celulares de osteosarcoma (Gozes, 2008; Muschter *et al.*, 2015; Ransjö *et al.*, 2000), nuestros resultados del **artículo 2** también revelan que ambos son receptores funcionales y que su activación está acoplada a AMPc como mediador intracelular.

En el contexto del eje neuro-osteogénico, es ampliamente reconocido que numerosos neuropéptidos liberados por las fibras simpáticas que inervan el tejido óseo ejercen acciones paracrinas sobre las células del microambiente óseo. En este sentido, desde que Hohman y colaboradores demostraron la existencia de terminaciones nerviosas inmunorreactivas para VIP en tejido óseo de rata (Hohmann *et al.*, 1986; Hohmann *et al.*, 1983), investigaciones posteriores han confirmado la presencia de este neuropéptido en el periostio, epífisis y médula ósea de rata (Bjurholm *et al.*, 1992; Gronblad *et al.*, 1984; Hohmann *et al.*, 1986). Estudios recientes realizados en muestras humanas han descrito que VIP no solo se expresa en la superficie del hueso trabecular y médula ósea sino también en células tipo osteocito (Kanemitsu *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2016). En línea con estos datos, los resultados del **artículo 2 y 3** revelan que **tanto osteoblastos como osteocitos humanos diferenciados *in vitro* expresan VIP.** Así, mediante análisis

inmunohistoquímico en secciones de hueso compacto, pudimos corroborar la expresión de VIP en osteocitos, ya descrita por Kanemitsu y colaboradores en 2020 a través de esta misma técnica en secciones de hueso subcondral de pacientes con artrosis (Kanemitsu *et al.*, 2020). Estos resultados apuntan a que osteoblastos y osteocitos podrían actuar como una fuente adicional de VIP en el microambiente óseo, contribuyendo al aumento de sus niveles locales, tal y como se ha descrito para el neuropéptido NPY (Wu *et al.*, 2020). Por tanto, nuestros hallazgos sugieren que **VIP, además de actuar como un neuropéptido regulador a nivel sistémico, podría participar como mediador autocrino en las células del linaje osteoblástico.**

Dada la información previa generada en modelos murinos que respalda el potencial anti-osteoclastogénico de VIP, nuestro siguiente objetivo fue el estudio del efecto de este neuropéptido sobre la diferenciación y funcionalidad de osteoclastos humanos. En el **artículo 1**, al analizar la acción moduladora de VIP sobre el proceso de osteoclastogénesis humana *in vitro*, se observó un descenso significativo del número de osteoclastos, de acuerdo con lo publicado anteriormente en modelos murinos (Eger *et al.*, 2021; Mukohyama *et al.*, 2000). En la búsqueda de los mecanismos implicados en dichos efectos, no detectamos cambios en la expresión génica de los receptores de M-CSF y de RANKL, dos citocinas clave en el proceso de osteoclastogénesis (Jacome-Galarza *et al.*, 2019; Paniagua *et al.*, 2010). Dado que la expresión de RANK es dependiente de la señalización activada por el receptor c-Fms, la ausencia de un efecto de VIP sobre este último podría explicar la falta de modulación del receptor de RANKL. No obstante, nuestros resultados demuestran que VIP induce una reducción significativa de la expresión génica y traslocación al núcleo del factor central de la osteoclastogénesis NFATc1 así como de los niveles de transcritos del marcador de diferenciación de osteoclastos *DCSTAMP*.

La expresión de *NFATC1* se encuentra regulada por las vías de señalización NF- κ B y AP-1 (Kim & Kim, 2016; Liu *et al.*, 2016). Cabe señalar que, entre los mecanismos moleculares antiinflamatorios de VIP, destaca su capacidad para inhibir la activación y translocación al núcleo de estos factores de transcripción (Martinez *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado un efecto inhibitorio de VIP sobre la vía de NF- κ B en osteoclastos murinos inducidos por RANKL (Kim & Kim, 2016; Liu *et al.*, 2016). Por último, en línea con nuestros resultados, se ha descrito que VIP actúa como inhibidor de la expresión de la isoforma c3 del factor NFAT en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Szema *et al.*, 2017).

Por otro lado, DC-STAMP es una de las proteínas clave en el proceso de fusión celular regulada por el factor central NFATc1 (Chiu *et al.*, 2017). Por ello, una reducción en su

expresión podría explicar los cambios observados en el número de osteoclastos diferenciados. De modo que este mecanismo inhibitorio de VIP sobre la señalización que regula la expresión de NFATc1, justificaría la reducción de expresión génica de *DCSTAMP* (Kim & Kim, 2016). En este sentido, nuestros resultados indicarían que **VIP no interfiere en los mecanismos iniciales de la osteoclastogénesis mediada por RANKL y MCSF, sino que ejercería su acción moduladora mediante la regulación negativa de la expresión y activación de NFATc1.**

Además, gracias a los ensayos *in vitro* de resorción ósea, el potencial de VIP como agente anti-osteoclastogénico se ha visto reforzado. Los osteoclastos humanos diferenciados en presencia de VIP presentan una menor área de resorción, dato que corrobora investigaciones previas realizadas con osteoclastos de rata (Lundberg *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2021). En cuanto al efecto de VIP sobre la expresión de marcadores de la actividad resorptiva, nuestros resultados indican que induce una reducción significativa de la expresión de los genes que codifican TRAP, catepsina K y MMP-9 (*ACP5*, *CTSK* y *MMP9*). Curiosamente, la expresión de estas moléculas se encuentra regulada principalmente por el factor de transcripción NFATc1 (Kim & Kim, 2016), por lo que el efecto inhibitorio de VIP descrito anteriormente sobre este factor podría estar influyendo en la expresión de dichos genes. Esta última hipótesis resulta, de hecho, compatible con los resultados de un estudio realizado en la línea celular de osteoclastos murinos RAW 264.7, en los que el bloqueo de la vía de señalización NF- κ B conlleva una reducción significativa de la expresión de *ACP5* y *CTSK* (Liu *et al.*, 2016). Por otra parte, de acuerdo con trabajos previos en modelos murinos de colitis y de daño pulmonar (Ganea *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2005), así como en sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con artrosis (Martínez *et al.*, 2020), en el presente trabajo describimos que la señalización activada por VIP reduce la expresión de MMP-9.

Finalmente, completamos nuestro estudio del osteoclasto analizando el impacto de VIP sobre sus mecanismos de interacción con la matriz mineralizada. La reorganización del citoesqueleto de actina junto con la acción de la integrina $\alpha\beta3$ resulta esencial en este proceso, dando lugar a un anillo periférico que define la cámara sellada donde se llevará a cabo la resorción (Blangy *et al.*, 2020; Crotti *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 1999; Novack & Faccio, 2011). En el presente trabajo demostramos una modulación de la expresión génica de la integrina $\alpha\beta3$ así como una disrupción del anillo de actina cuando la diferenciación de los osteoclastos se lleva a cabo en presencia de VIP. Concretamente, la tendencia en la reducción de la subunidad $\beta3$ de la integrina podría ser consecuencia de la modulación negativa del factor NFATc1, ya que el gen *ITGB3* que la codifica está regulado directamente por éste (Crotti *et al.*, 2006). En cuanto a los efectos de VIP sobre el citoesqueleto de actina, no existen datos previos que describan

su acción sobre la formación del anillo de actina. No obstante, Lundberg y colaboradores demostraron en un estudio *in vitro* que este neuropéptido disminuía el número de áreas de resorción de osteoclastos de rata como consecuencia de un aumento en la contracción citoplasmática y de la reducción de su motilidad celular (Lundberg *et al.*, 2000). En resumen, nuestros resultados sugieren que **este neuropéptido presenta un efecto anti-osteoclastogénico directo, afectando tanto a la diferenciación como a la funcionalidad de los osteoclastos humanos a través de la regulación negativa del factor NFATc1.**

El siguiente objetivo propuesto fue dilucidar la posible contribución de VIP en la diferenciación y funcionalidad de osteoblastos. El factor de transcripción Runx2 ha sido descrito como el regulador central de la diferenciación de osteoblastos, encontrándose regulado por la vía de señalización Wnt mediante la estabilización y traslocación nuclear de la β -catenina. Los resultados del [artículo 2](#) muestran un aumento de la expresión génica y proteica tanto de Runx2 como de β -catenina cuando la diferenciación osteoblástica se lleva a cabo en presencia de VIP. De modo que nuestros resultados confirmarían, en humanos, el efecto estimulador de VIP sobre la vía de señalización osteogénica Wnt/ β -catenina descrito previamente en BM-MSc de rata, promoviendo un incremento de los niveles de β -catenina que, a su vez, conllevaría un aumento del factor Runx2 regulado por esta vía (Shi *et al.*, 2020). Además, en presencia del neuropéptido, las células adquieren antes el máximo de la expresión del gen que codifica colágeno de tipo I (*COL1A1*), principal componente del osteoide y, por ello, considerado como un marcador temprano de la osteogénesis. Ya que el promotor del gen *COL1A1* es una de las dianas de Runx2 (Komori, 2019), este efecto inductor del VIP se corresponde con lo esperado.

En cuanto al efecto de VIP sobre la reorganización del citoesqueleto, se observan un mayor número de adhesiones focales y unas hebras de actina mucho más estilizadas en los osteoblastos diferenciados en su presencia. Dichas células presentan, además, una morfología más cuboidal, lo que las diferencia de las células en condiciones basales, que mantienen una morfología fusiforme característica de etapas más tempranas del proceso de la diferenciación (Khan *et al.*, 2020; Sonowal *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2019). En este sentido, es interesante señalar que el remodelado del citoesqueleto e incluso la diferenciación osteogénica han sido relacionados con cambios en las concentraciones intracelulares AMPc a través de mecanismos acoplados a GPCRs (Chen *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2009; Romanello *et al.*, 2001).

Al abordar cuál podía ser el impacto de VIP sobre la funcionalidad de los osteoblastos, detectamos un aumento de la concentración de la fosfatasa alcalina en los

sobrenadantes de aquellos que habían sido diferenciados en su presencia que, además, se acompañaba de un incremento en los depósitos de calcio de la matriz extracelular. Por lo tanto, la presencia de VIP durante la diferenciación de las BM-MSC humanas hacia osteoblastos estimularía su capacidad de mineralización del osteoide a través del aumento en la secreción de la ALP, de acuerdo con estudios previos en células murinas y en líneas celulares humanas osteoblásticas (Ma *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2020).

A partir de las evidencias que apuntan al potencial de VIP como un factor osteoinductor, presentadas en el [artículo 2](#), nuestro siguiente objetivo fue explorar su papel en la transición de osteoblastos maduros a osteocitos. Los resultados del [artículo 3](#) indican que los osteocitos diferenciados *in vitro* en presencia de VIP presentan un aumento de expresión de *MEPE* y de *SOST*. Dichos genes codifican, respectivamente, proteínas relacionadas con una actividad anti-mineralizadora e inhibidora de la formación ósea, siendo reconocidas como marcadores consolidados de osteocitos maduros (Kitase & Prideaux, 2023). Nuestros datos se alinean con los hallazgos en el modelo murino de regeneración de hueso alveolar, en el cual VIP incrementa la expresión de marcadores del osteocito, entre los que se encuentra *SOST* (Azevedo *et al.*, 2021). Asimismo, cuando VIP estuvo presente en los cultivos de diferenciación, observamos una reducción significativa de los transcritos del marcador de osteoblasto maduro *BGLAP*, lo cual sería compatible con un efecto intensificador de VIP sobre la transición desde osteoblasto a osteocito, proceso en el que experimentan una reducción progresiva en la producción de matriz ósea (Marahleh *et al.*, 2023).

Dilucidar el efecto de VIP sobre el citoesqueleto de actina de los osteocitos es de gran interés ya que, durante su diferenciación, sufren grandes cambios estructurales asociados a la generación de dendritas que resultan determinantes en establecimiento del sistema lacuno-canalicular (Tresguerres *et al.*, 2020). El análisis cualitativo de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia del citoesqueleto de actina de los osteocitos estimulados con VIP demostró que las células conservan su morfología estrellada característica y exhiben prolongaciones dendríticas más extensas, lo que podría reflejar un avance en el proceso de diferenciación (Marahleh *et al.*, 2023). En consecuencia, los hallazgos presentados respaldan la hipótesis de que **VIP podría facilitar la transición de osteoblasto a osteocito al promover una reducción progresiva en la producción de matriz ósea, inducir la expresión de genes específicos del osteocito y posibilitar los reordenamientos citoesqueléticos necesarios para el desarrollo de una extensa ramificación dendrítica.**

Dada la relevancia del papel regulador tanto de osteoblastos como de osteocitos sobre la biología de los osteoclastos, a través de la producción de RANKL y OPG, se

analizó la acción de VIP en ambos tipos celulares. En los osteoblastos diferenciados *in vitro* del [artículo 2](#), los resultados mostraron que la presencia de VIP durante la osteogénesis se asocia con una disminución significativa en la expresión de RANKL, con la consecuente reducción de la relación RANKL/OPG. Este hallazgo consolida el efecto protector de VIP frente a la erosión ósea y confirma datos previos generados en el modelo murino de CIA, donde se describe que el tratamiento con el neuropéptido reduce dicha relación mediante la disminución de los niveles de RANKL (Juarranz *et al.*, 2005). De hecho, este resultado en modelos animales corroboraba lo descrito en estudios *in vitro* previos realizados en células de médula ósea murina, donde VIP disminuye la expresión de RANKL inducida por 1,25(OH)₂-vitamina D₃ (Mukohyama *et al.*, 2000).

Conociendo que los osteocitos son osteoblastos completamente diferenciados y que son considerados como los reguladores centrales de la remodelación ósea (Delgado-Calle & Bellido, 2022), decidimos evaluar si VIP ejercía un efecto análogo sobre estas células ([artículo 3](#)). Nuestros datos revelan un incremento significativo en los niveles de ARNm de OPG en osteocitos diferenciados en presencia de VIP, en concordancia con estudios previos que evidencian su capacidad para contrarrestar el efecto inhibitorio de 1,25(OH)₂-vitamina D₃ sobre OPG en cultivos de médula ósea murina (Mukohyama *et al.*, 2000) y para inducir la expresión de OPG en células preosteoblásticas MC3T3-E1 (Yoo *et al.*, 2014). También se observó una reducción en la relación RANKL/OPG osteocítica tras estimulación con VIP, de manera similar a lo descrito en el [artículo 2](#) sobre osteoblastos humanos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que **VIP ejerce efectos anti-osteoclastogénicos, tanto a nivel de osteoblastos como de osteocitos, mediante la modulación coordinada de la relación RANKL/OPG, reforzando así su papel como mediador osteoprotector en la remodelación ósea.**

Para evaluar de manera integral los efectos moduladores de VIP sobre el remodelado óseo, resulta esencial considerar las interacciones recíprocas entre osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Por ello, en el [artículo 3](#), con el fin de reproducir de forma más precisa el proceso de remodelado óseo, se analizó el impacto del neuropéptido en un sistema de triple co-cultivo, en el cual osteocitos y osteoclastos se diferenciaron simultáneamente a partir de sus precursores en presencia de osteoblastos maduros. De acuerdo con los resultados que obtuvimos en los monocultivos de diferenciación de osteocitos, la presencia de VIP redujo la expresión del marcador de osteoblastos maduros *BGLAP* en los osteocitos del triple cultivo, al tiempo que aumentó el marcador osteocítico *MEPE*. Sin embargo, en contraposición con lo descrito anteriormente en osteocitos en monocultivo, se observó una disminución significativa de la expresión de *SOST* en presencia de VIP. Este hallazgo debe interpretarse en el contexto específico del

triple co-cultivo, ya que la esclerostina no solo actúa como inhibidor directo de la diferenciación osteoblástica (Robling & Bonewald, 2020; Semënov *et al.*, 2005; Tresguerres *et al.*, 2020; van Bezooijen *et al.*, 2004), sino que también promueve indirectamente la osteoclastogénesis a través de señales mediadas por osteoblastos (Shu *et al.*, 2017; Wijenayaka *et al.*, 2011). Además, al reducir la expresión de esclerostina osteocítica, VIP podría favorecer la osteocitogénesis, habiendo sido anteriormente demostrada la acción inhibitoria de esta proteína sobre la transición de osteoblasto a osteocito (Atkins *et al.*, 2011). Así, la disminución significativa en la expresión de *BGLAP* y *ALPL* observada en osteoblastos maduros presentes en el triple cultivo en presencia de VIP, refleja una reducción de la actividad mineralizadora necesaria para su transición hacia osteocitos (Twine *et al.*, 2014). Sin embargo, este mecanismo regulador podría no ser estrictamente unidireccional, ya que existen factores derivados de osteoblastos que influyen en la expresión de *SOST* en osteocitos (Sims & Chia, 2012). Entre ellos, se sabe que VIP estimula la producción de LIF (Greenfield *et al.*, 1996) y prostaglandina E2 en osteoblastos (Elefteriou, 2005), lo que podría repercutir negativamente en la expresión del gen de la esclerostina en osteocitos presentes en el modelo de triple co-cultivo.

Nuestros resultados del triple cultivo en presencia de VIP muestran una disminución de la ratio RANKL/OPG en los osteoblastos, corroborando los resultados del [artículo 2](#). En este sentido, la reducción de *SOST* en los osteocitos promovida por VIP sería compatible con el papel de esta molécula, previamente descrito, en la regulación de la expresión de RANKL y OPG en osteoblastos maduros, en los que aumenta la del primero y suprime la del segundo (Wijenayaka *et al.*, 2011). Asimismo, la reducción de la ratio RANKL/OPG observada en osteoblastos del triple co-cultivo, encontraría su correspondiente efecto en los osteoclastos en diferenciación de dichos cultivos. Los resultados generados en este estudio muestran que, en presencia de VIP, los osteoclastos del triple co-cultivo presentan una disminución en los marcadores de diferenciación (*NFATC1* y *DCSTAMP*) y de actividad resortiva (*ACP5* y *CTSK*). A ello se suma la desorganización del anillo de actina, estructura esencial para su función. En conjunto, estas observaciones no solo confirmarían el efecto inhibitorio directo de VIP sobre la biología osteoclástica descrito previamente en modelos animales (Lundberg *et al.*, 2000; Mukohyama *et al.*, 2000) y en humanos ([artículo 1](#)), sino que también ponen de relieve la complejidad de las interacciones celulares en este sistema.

Los osteocitos son considerados la principal fuente del RANKL funcional que impulsa la osteoclastogénesis (Marahleh *et al.*, 2023), a pesar de que otros muchos tipos celulares contribuyen a la producción de dicho factor. En nuestro modelo de triple co-cultivo, la presencia de VIP condujo a una reducción significativa de la expresión de

RANKL en osteocitos, efecto que no se observó en condiciones de monocultivo. Este hallazgo podría explicarse, al menos en parte, por la disminución de la expresión de esclerostina inducida por VIP. Esta proteína se ha asociado con un fenotipo pro-osteoclastogénico en pre-osteocitos humanos primarios y en la línea celular osteocítica murina MLO-Y4, promoviendo la expresión de RANKL (Ohori *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2017; Wijenayaka *et al.*, 2011). Así, la disminución de SOST por parte del osteocito observada en presencia de VIP podría tener un doble efecto: por un lado, mitigar el efecto inhibitor del osteocito sobre la formación de hueso, y por otro, contribuir a los efectos anti-osteoclastogénicos de VIP al interferir con la vía dependiente de RANKL utilizada por los osteocitos para sostener la diferenciación osteoclástica.

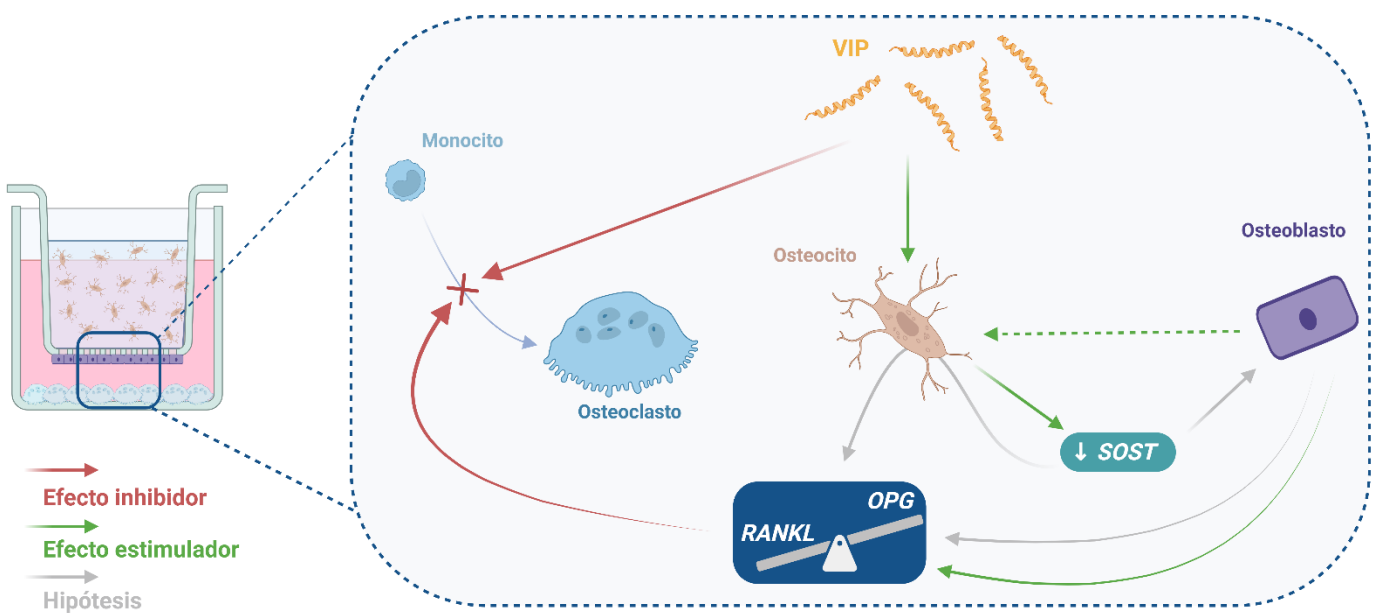


Figura 13. Esquema resumen de los efectos de VIP en el modelo de triple co-cultivo e hipótesis explicativa de los resultados observados.

Nuestros datos revelan que la expresión génica de OPG disminuye en osteocitos expuestos a VIP dentro del triple co-cultivo. En principio, este resultado podría sugerir un posible compromiso de la acción anti-osteoclastogénica. Sin embargo, este efecto no parece afectar de forma significativa la comunicación entre las células óseas, ya que no modifica la ratio RANKL/OPG del osteocito. Es pertinente mencionar que los osteoblastos son reconocidos como la principal fuente de OPG en el microambiente óseo (Cawley *et al.*, 2020), pero, aun así, no debe descartarse la relevancia de la producción de OPG por parte del osteocito (Cawley *et al.*, 2020). En este sentido, se ha descrito que podría desempeñar un papel relevante en los mecanismos que regulan el tráfico intracelular de RANKL, dado que la formación del complejo OPG-RANKL en el aparato de Golgi resulta necesaria para el transporte de RANKL hacia la membrana

plasmática (Aoki *et al.*, 2010; Ostrowski, 2010; Tsukasaki *et al.*, 2020). Considerando que la forma fisiológicamente activa de RANKL por parte del osteocito es la unida a membrana y no la soluble (Nakashima *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011), la reducción de la expresión de OPG osteocítico inducida por VIP podría dificultar el tráfico de RANKL a la superficie celular, contribuyendo así a consolidar un perfil anti-osteoclastogénico.

En conjunto, los hallazgos presentados evidencian que **el neuropéptido VIP desempeña un papel osteoprotector, al regular de forma coordinada la actividad de los tres principales linajes celulares implicados en el remodelado óseo**. La inhibición de la diferenciación y función osteoclástica, junto con la estimulación de la diferenciación osteoblástica y la transición hacia osteocitos, así como la regulación de la ratio RANKL/OPG, señalan a VIP como un mediador clave en la homeostasis ósea. La integración de estos resultados, obtenidos tanto en cultivos *in vitro* como en sistemas más complejos, no solo refuerza la solidez de la evidencia previa sobre la acción moduladora de VIP en el microambiente óseo, sino que además **sustenta su relevancia fisiopatológica en enfermedades caracterizadas por un marcado desequilibrio entre formación y resorción ósea, como es la artritis reumatoide**.

En este sentido, considerando los resultados en el modelo murino de CIA en el que VIP presentaba un papel protector sobre la erosión ósea al reducir la ratio RANKL/OPG (Juarranz *et al.*, 2005), nuestra primera aproximación traslacional fue el análisis de ambas citocinas en sueros de pacientes con AR. Los resultados incluidos en el **artículo 1** indican que aquellos pacientes con niveles de VIP altos presentan una tendencia a la reducción de RANKL así como un incremento de OPG sérica. Todo ello genera una disminución significativa en la ratio RANKL/OPG, tal y como se describe en el modelo murino de esta patología (Juarranz *et al.*, 2005) en cultivos estimulados con 1,25(OH)₂-vitamina D₃ de médula ósea de ratón (Mukohyama *et al.*, 2000) y en osteoclastos de rata (Qu *et al.*, 2021). Además, los polimorfismos de un solo nucleótido localizados en los genes de RANKL y OPG de pacientes con AR de reciente comienzo se han asociado con variables clínicas de severidad, así como con pérdidas en la densidad mineral ósea tras dos años de seguimiento (Triguero-Martinez *et al.*, 2024), posicionando a estas citocinas como claves en el desarrollo y gravedad de la patología. Adicionalmente, nuestros resultados indican una reducción en la pérdida de densidad mineral ósea en aquellos pacientes con los niveles séricos de VIP más elevados. Por ello, **nuestros datos sugieren que VIP podría atenuar el componente osteoclástico en la patogénesis de la AR mediante la modulación de la relación RANKL/OPG a favor de OPG**. Estos hallazgos concuerdan con estudios recientes que demuestran que los niveles séricos de VIP pueden emplearse como biomarcador pronóstico en la artritis temprana, dado que, aunque no se han descrito diferencias en los niveles séricos de este neuropéptido entre

pacientes y donantes sanos, aquellos pacientes con niveles basales bajos presentan una evolución clínica menos favorable (Martínez *et al.*, 2014; Seoane *et al.*, 2018).

A pesar de la solidez de nuestros hallazgos, es necesario considerar ciertas limitaciones intrínsecas que podrían condicionar la interpretación y extrapolación a contextos fisiológicos. En primer lugar, gran parte de los experimentos se realizaron empleando modelos *in vitro*, lo que, aun incluyendo células primarias humanas, no reproduce en su totalidad la complejidad celular, tisular y fisiológica del microambiente óseo *in vivo*. Además, si bien se realizaron correlaciones con datos clínicos de pacientes con AR, estas observaciones son principalmente asociativas y no permiten establecer causalidad. No obstante, esta tesis doctoral ofrece, por primera vez, una visión holística sobre el efecto del neuropéptido VIP en células óseas humanas. Por lo que, estos resultados, junto con las limitaciones, abren la puerta a futuros estudios que logren integrar con éxito la complejidad del tejido óseo y las patologías musculoesqueléticas, con el fin de validar y ampliar los hallazgos descritos.

Conclusiones



Conclusiones

1. Los receptores de VIP, VPAC1 y VPAC2, se expresan en osteoclastos, osteoblastos y osteocitos humanos diferenciados *in vitro* poniendo de manifiesto que la señalización mediada por el neuropéptido está presente en el microambiente óseo.
2. Osteoblastos y osteocitos humanos expresan VIP, lo que sugiere que, además de actuar como un neuropéptido regulador a nivel sistémico, podría participar como mediador autocrino en las células del linaje osteoblástico.
3. VIP ejerce un efecto anti-osteoclastogénico directo, limitando tanto la diferenciación como la funcionalidad de los osteoclastos humanos a través de la regulación negativa de la expresión y activación del factor de transcripción NFATc1.
4. VIP promueve la diferenciación osteoblástica de células mesenquimales humanas y su capacidad mineralizadora, induciendo una mayor expresión de β -catenina y Runx2, factores centrales de la vía Wnt/ β -catenina y de las primeras etapas de la osteogénesis.
5. VIP favorece la osteocitogénesis, atenuando la expresión de genes asociados al osteoblasto maduro, mientras activa genes específicos del osteocito y facilita los reordenamientos citoesqueléticos necesarios para la formación de una red dendrítica extensa.
6. A través de su acción sobre osteoblastos y osteocitos, VIP ejerce efectos anti-osteoclastogénicos indirectos al disminuir la relación RANKL/OPG, lo que evidencia su papel como mediador osteoprotector en la remodelación ósea.
7. En el modelo de triple co-cultivo de osteoblastos primarios y precursores de osteocitos y osteoclastos, VIP induce un fenotipo osteoprotector que podría estar asociado a la reducción de esclerostina osteocítica, lo que limitaría la señalización inhibitoria hacia los osteoblastos y disminuiría en ellos la ratio RANKL/OPG.
8. Los pacientes con artritis reumatoide de reciente comienzo que presentan niveles séricos altos de VIP muestran una disminución significativa en la ratio RANKL/OPG y una menor pérdida de densidad mineral ósea, respaldando al eje VIP/receptores como potencial biomarcador pronóstico en esta enfermedad.

Conclusions

1. VIP receptors, VPAC1 and VPAC2, are expressed in human osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes differentiated *in vitro*, demonstrating that VIP-mediated signalling is present within the bone microenvironment.
2. Human osteoblasts and osteocytes express VIP, suggesting that, in addition to its role as a systemic regulatory neuropeptide, it may act as an autocrine mediator within the osteoblastic lineage.
3. VIP exerts a direct anti-osteoclastogenic effect by limiting both the differentiation and functionality of human osteoclasts through the negative regulation of NFATc1 expression and activation.
4. VIP promotes the osteoblastic differentiation of human mesenchymal cells and enhances their mineralization activity, inducing greater expression of β -catenin and Runx2, key regulators of the Wnt/ β -catenin pathway and early stages of osteogenesis.
5. VIP supports osteocytogenesis by downregulating the expression of mature osteoblast-associated genes, while activating osteocyte-specific genes and facilitating the cytoskeletal rearrangements required for the formation of an extensive dendritic network.
6. Through its actions on osteoblasts and osteocytes, VIP exerts indirect anti-osteoclastogenic effects by reducing the RANKL/OPG ratio, reinforcing its role as an osteoprotective mediator in bone remodelling.
7. In a triple co-culture model of primary osteoblasts and precursors of osteocytes and osteoclasts, VIP induces an osteoprotective phenotype, which may be associated with reduced osteocytic sclerostin expression, thereby limiting inhibitory signalling toward osteoblasts and decreasing their RANKL/OPG ratio.
8. Patients with early-stage rheumatoid arthritis who present high serum levels of VIP display a significantly lower RANKL/OPG ratio and reduced bone mineral density loss, supporting the VIP/receptor axis as a potential prognostic biomarker in this disease.

Bibliografía



Bibliografía

- Abad, C., Tan, Y.-V., Cheung-Lau, G., Nobuta, H., & Waschek, J. A. (2012). VIP Deficient Mice Exhibit Resistance to Lipopolysaccharide Induced Endotoxemia with an Intrinsic Defect in Proinflammatory Cellular Responses. *Plos One*, 7(5), Article e36922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036922>
- Ago, Y., Asano, S., Hashimoto, H., & Waschek, J. A. (2021). Probing the VIPR2 Microduplication Linkage to Schizophrenia in Animal and Cellular Models. *Front Neurosci*, 15, 717490. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.717490>
- Aguirre, J. I., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., Manolagas, S. C., & Bellido, T. (2006). Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(4), 605-615. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060107>
- Al-Dujaili, S. A., Lau, E., Al-Dujaili, H., Tsang, K., Guenther, A., & You, L. (2011). Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro. *J Cell Biochem*, 112(9), 2412-2423. <https://doi.org/10.1002/jcb.23164>
- Alencar, C. H. M. F., Sampaio Silveira, C. R., Cavalcante, M. M., Maia Vieira, C. G., Diogenes Teixeira, M. J., Neto, F. A., de Abreu, A., & Chhabra, A. (2020). "Periosteum: An imaging review". *Eur J Radiol Open*, 7, 100249. <https://doi.org/10.1016/j.ejro.2020.100249>
- Ali, S. Y., Sajdera, S. W., & Anderson, H. C. (1970). Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67(3), 1513-1520. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1513>
- Aliakbari, J., Sreedharan, S. P., Turck, C. W., & Goetzl, E. J. (1987). SELECTIVE LOCALIZATION OF VASOACTIVE-INTESTINAL-PEPTIDE AND SUBSTANCE-P IN HUMAN EOSINOPHILS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148(3), 1440-1445. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(87\)80293-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(87)80293-0)
- Alleaume, C., Eychene, A., Caigneaux, E., Muller, J. M., & Philippe, M. (2003). Vasoactive intestinal peptide stimulates proliferation in HT29 human colonic adenocarcinoma cells: concomitant activation of Ras/Rap1-B-Raf-ERK signalling pathway. *Neuropeptides*, 37(2), 98-104. [https://doi.org/10.1016/s0143-4179\(03\)00020-9](https://doi.org/10.1016/s0143-4179(03)00020-9)
- Andersen, T. L., Sondergaard, T. E., Skorzynska, K. E., Dagnaes-Hansen, F., Plesner, T. L., Hauge, E. M., Plesner, T., & Delaisse, J.-M. (2009). A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *American Journal of Pathology*, 174(1), 239-247. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080627>
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., & Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), 175-179. <https://doi.org/10.1038/36593>
- Aoki, S., Honma, M., Kariya, Y., Nakamichi, Y., Ninomiya, T., Takahashi, N., Udagawa, N., & Suzuki, H. (2010). Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, 25(9), 1907-1921. <https://doi.org/10.1002/jbmr.89>
- Arranz, A., Abad, C., Juarranz, Y., Leceta, J., Martinez, C., & Gomariz, P. (2008a). Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation*, 15(1), 46-53. <https://doi.org/10.1159/000135623>
- Arranz, A., Abad, C., Juarranz, Y., Torroba, M., Rosignoli, F., Leceta, J., Perez Gomariz, R., & Martinez, C. (2006). Effect of VIP on TLR2 and TLR4 expression in lymph node immune cells during TNBS-induced colitis. In H. Vaudry & M. Laburthe (Eds.), *Vip, Pacap, and Related Peptides: From Gene to Therapy* (Vol. 1070, pp. 129-134). <https://doi.org/10.1196/annals.1317.001>

- Arranz, A., Androulidaki, A., Zacharioudaki, V., Martínez, C., Margioris, A. N., Gomariz, R. P., & Tsatsanis, C. (2008b). Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages via Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide. *Molecular Immunology*, 45(10), 2970-2980. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.01.023>
- Arranz, A., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Juarranz, Y., Pablos, J. L., Martínez, C., & Gomariz, R. P. (2008a). VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Molecular Immunology*, 45(11), 3065-3073. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.03.011>
- Arranz, A., Juarranz, Y., Leceta, J., Gomariz, R. P., & Martínez, C. (2008b). VIP balances innate and adaptive immune responses induced by specific stimulation of TLR2 and TLR4. *Peptides*, 29(6), 948-956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.019>
- Arron, J. R., & Choi, Y. (2000). Bone versus immune system. *Nature*, 408(6812), 535-536. <https://doi.org/10.1038/35046196>
- Atkins, G. J., Rowe, P. S., Lim, H. P., Welldon, K. J., Ormsby, R., Wijenayaka, A. R., Zelenchuk, L., Evdokiou, A., & Findlay, D. M. (2011). Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *J Bone Miner Res*, 26(7), 1425-1436. <https://doi.org/10.1002/jbmr.345>
- Azevedo, M. C. S., Fonseca, A. C., Colavite, P. M., Melchiades, J. L., Tabanez, A. P., Codo, A. C., de Medeiros, A. I., Trombone, A. P. F., & Garlet, G. P. (2021). Macrophage Polarization and Alveolar Bone Healing Outcome: Despite a Significant M2 Polarizing Effect, VIP and PACAP Treatments Present a Minor Impact in Alveolar Bone Healing in Homeostatic Conditions. *Front Immunol*, 12, 782566. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.782566>
- Bachmann, M. F., Wong, B. R., Josien, R., Steinman, R. M., Oxenius, A., & Choi, Y. (1999). TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *Journal of Experimental Medicine*, 189(7), 1025-1031. <https://doi.org/10.1084/jem.189.7.1025>
- Bajo, A. M., Juarranz, M. G., Valenzuela, P., Martínez, P., Prieto, J. C., & Guijarro, L. G. (2000). Expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human uterus. *Peptides*, 21(9), 1383-1388. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00282-5](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00282-5)
- Barbarin, A., Seite, P., Godet, J., Bensalma, S., Muller, J.-M., & Chadeneau, C. (2014). Atypical nuclear localization of VIP receptors in glioma cell lines and patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(4), 524-530. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.113>
- Bartl, R. (2013). Histology of Normal Bone and Bone Marrow, and Their Main Disorders. In A. Baur-Melnyk (Ed.), *Magnetic Resonance Imaging of the Bone Marrow* (pp. 3-20). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/174_2011_442
- Bataille, D., Freychet, P., & Rosselin, G. (1974). Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase. *Endocrinology*, 95(3), 713-721. <https://doi.org/10.1210/endo-95-3-713>
- Batoon, L., Millard, S. M., Raggatt, L. J., Wu, A. C., Kaur, S., Sun, L. W. H., Williams, K., Sandrock, C., Ng, P. Y., Irvine, K. M., Bartnikowski, M., Glatt, V., Pavlos, N. J., & Pettit, A. R. (2021). Osteal macrophages support osteoclast-mediated resorption and contribute to bone pathology in a postmenopausal osteoporosis mouse model. *Journal of Bone and Mineral Research*, 36(11), 2214-2228. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4413>

- Bellido, T. (2014). Osteocyte-Driven Bone Remodeling [Review]. *Calcified Tissue International*, 94(1), 25-34. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
- Bellido, T., Plotkin, L. I., & Bruzzaniti, A. (2014). Bone Cells (Publication Number 978-0-12-391459-0; 978-0-12-416015-6) [; Book Chapter, <Go to ISI>://WOS:000334105500003
- Bivi, N., Lezcano, V., Romanello, M., Bellido, T., & Plotkin, L. I. (2011). Connexin43 Interacts With β arrestin: A Pre-Requisite for Osteoblast Survival Induced by Parathyroid Hormone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(10), 2920-2930. <https://doi.org/10.1002/jcb.23208>
- Bivi, N., Nelson, M. T., Faillace, M. E., Li, J. L., Miller, L. M., & Plotkin, L. I. (2012). Deletion of Cx43 from Osteocytes Results in Defective Bone Material Properties but Does Not Decrease Extrinsic Strength in Cortical Bone. *Calcified Tissue International*, 91(3), 215-224. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9628-z>
- Bjurholm, A., Kreicbergs, A., Brodin, E., & Schultzberg, M. (1988a). Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides*, 9(1), 165-171. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(88\)90023-x](https://doi.org/10.1016/0196-9781(88)90023-x)
- Bjurholm, A., Kreicbergs, A., Schultzberg, M., & Lerner, U. H. (1992). Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, and Saos-2) and primary bone cells. *J Bone Miner Res*, 7(9), 1011-1019. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070903>
- Bjurholm, A., Kreicbergs, A., Terenius, L., Goldstein, M., & Schultzberg, M. (1988b). NEUROPEPTIDE Y-IMMUNOREACTIVE, TYROSINE HYDROXYLASE-IMMUNOREACTIVE AND VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE-IMMUNOREACTIVE NERVES IN BONE AND SURROUNDING TISSUES. *Journal of the Autonomic Nervous System*(2-3). <Go to ISI>://WOS:A1988T351800004
- Blair, H. C., Larrouture, Q. C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Tuan, R. S., Robinson, L. J., Schlesinger, P. H., & Nelson, D. J. (2017). Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev*, 23(3), 268-280. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2016.0454>
- Blangy, A., Bompard, G., Guerit, D., Marie, P., Maurin, J., Morel, A., & Vives, V. (2020). The osteoclast cytoskeleton - current understanding and therapeutic perspectives for osteoporosis [Review]. *Journal of Cell Science*(13). <https://doi.org/10.1242/jcs.244798>
- Blechman, J., & Levkowitz, G. (2013). Alternative Splicing of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor PAC1: Mechanisms of Fine Tuning of Brain Activity. *Frontiers in endocrinology*, 4, 55-55. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00055>
- Bodner, M., Fridkin, M., & Gozes, I. (1985). Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(11), 3548-3551. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.11.3548>
- Bokaei, P. B., Ma, X.-Z., Byczynski, B., Keller, J., Sakac, D., Fahim, S., & Branch, D. R. (2006). Identification and characterization of five-transmembrane isoforms of human vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors. *Genomics*, 88(6), 791-800. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.07.008>
- Bonewald, L. F. (2007). Osteocytes as dynamic multifunctional cells. In M. Zaidi (Ed.), *Skeletal Biology and Medicine, Pt A: Aspects of Bone Morphogenesis and Remodeling* (Vol. 1116, pp. 281-290). <https://doi.org/10.1196/annals.1402.018>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 26(2), 229-238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Brown, E. M. (2013). Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(3), 333-343. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.006>

- Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*, 28, 269-286. <https://doi.org/10.22203/ecm.v028a19>
- Busto, R., Carrero, I., Bodega, G., Zapatero, J., & Prieto, J. C. (2000). Immunohistochemical and immunochemical evidence for expression of human lung PACAP/VIP receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 921, 308-311. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06983.x>
- Carrillo-Lopez, N., Martínez-Arias, L., Fernández-Villabrilles, S., Ruiz-Torres, M. P., Dusso, A., Cannata-Andía, J. B., Naves-Díaz, M., Panizo, S., & European Renal Osteodystrophy, W. (2021). Role of the RANK/RANKL/OPG and Wnt/beta-Catenin Systems in CKD Bone and Cardiovascular Disorders. *Calcif Tissue Int*, 108(4), 439-451. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00803-2>
- Carrión, M., Juarranz, Y., Pérez-García, S., Jimeno, R., Pablos, J. L., Gomariz, R. P., & Gutiérrez-Cañas, I. (2011). RNA Sensors in Human Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Immune Regulation by Vasoactive Intestinal Peptide. *Arthritis and Rheumatism*, 63(6), 1626-1636. <https://doi.org/10.1002/art.30294>
- Carrión, M., Juarranz, Y., Seoane, I. V., Martínez, C., González-Alvaro, I., Luis Pablos, J., Gutiérrez-Cañas, I., & Gomariz, R. P. (2014). VIP Modulates IL-22R1 Expression and Prevents the Contribution of Rheumatoid Synovial Fibroblasts to IL-22-Mediated Joint Destruction. *Journal of Molecular Neuroscience*, 52(1), 10-17. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0177-3>
- Carrión, M., Pérez-García, S., Jimeno, R., Juarranz, Y., González-Alvaro, I., Luis Pablos, J., Gutiérrez-Cañas, I., & Gomariz, R. P. (2013). Inflammatory Mediators Alter Interleukin-17 Receptor, Interleukin-12 and -23 Expression in Human Osteoarthritic and Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts: Immunomodulation by Vasoactive Intestinal Peptide. *Neuroimmunomodulation*, 20(5), 274-284. <https://doi.org/10.1159/000350892>
- Carrión, M., Pérez-García, S., Martínez, C., Juarranz, Y., Estrada-Capetillo, L., Puig-Kroger, A., Gomariz, R. P., & Gutiérrez-Cañas, I. (2016). VIP impairs acquisition of the macrophage proinflammatory polarization profile. *J Leukoc Biol*, 100(6), 1385-1393. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0116-032RR>
- Carvalho, M. S., Cabral, J. M. S., da Silva, C. L., & Vashishth, D. (2021). Bone Matrix Non-Collagenous Proteins in Tissue Engineering: Creating New Bone by Mimicking the Extracellular Matrix. *Polymers (Basel)*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/polym13071095>
- Cawley, K. M., Bustamante-Gomez, N. C., Guha, A. G., MacLeod, R. S., Xiong, J., Gubrij, I., Liu, Y., Mulkey, R., Palmieri, M., Thostenson, J. D., Goellner, J. J., & O'Brien, C. A. (2020). Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts Suppresses Bone Resorption. *Cell Rep*, 32(10), 108052. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108052>
- Chara, L., Sanchez-Atrio, A., Perez, A., Cuende, E., Albarran, F., Turrion, A., Chevarria, J., del Barco, A. A., Sanchez, M. A., Monserrat, J., Prieto, A., de la Hera, A., Sanz, I., Diaz, D., & Alvarez-Mon, M. (2015). The number of circulating monocytes as biomarkers of the clinical response to methotrexate in untreated patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Translational Medicine*, 13, Article 2. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0375-y>
- Chen, G., Sircar, K., Aprikian, A., Potti, A., Goltzman, D., & Rabbani, S. A. (2006). Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*, 107(2), 289-298. <https://doi.org/10.1002/cncr.21978>
- Chen, G. Q., Deng, C. X., & Li, Y. P. (2012). TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation [Review]. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 272-288. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>

- Chen, K. X., Obinata, H., & Izumi, T. (2010). Detection of G protein-coupled receptor-mediated cellular response involved in cytoskeletal rearrangement using surface plasmon resonance. *Biosensors & Bioelectronics*(7).
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.12.006>
- Chiu, Y. H., Schwarz, E., Li, D., Xu, Y., Sheu, T. R., Li, J., de Mesy Bentley, K. L., Feng, C., Wang, B., Wang, J. C., Albertorio-Saez, L., Wood, R., Kim, M., Wang, W., & Ritchlin, C. T. (2017). Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP) Regulates Osteoclast Differentiation via the Ca(2+)/NFATc1 Axis. *J Cell Physiol*, 232(9), 2538-2549.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25638>
- Choi, J., Selmi, C., Leung, P. S. C., Kenny, T. P., Roskams, T., & Gershwin, M. E. (2016). Chemokine and chemokine receptors in autoimmunity: the case of primary biliary cholangitis [Review]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(6), 661-672.
<https://doi.org/10.1586/1744666x.2016.1147956>
- Christophe, J. P., Conlon, T. P., & Gardner, J. D. (1976). Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig. Binding of radioiodinated peptide. *J Biol Chem*, 251(15), 4629-4634.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/947900>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3(Suppl 3), S131-139.
<https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Clarke, L. A., & Hollak, C. E. M. (2015). The clinical spectrum and pathophysiology of skeletal complications in lysosomal storage disorders. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(2), 219-235.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.08.010>
- Colwell, C. S., Michel, S., Itri, J., Rodriguez, W., Tam, J., Lelievre, V., Hu, Z., Liu, X., & Waschek, J. A. (2003). Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(5), R939-949.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00200.2003>
- Cornish, J., Callon, K. E., Bava, U., Lin, C., Naot, D., Hill, B. L., Grey, A. B., Broom, N., Myers, D. E., Nicholson, G. C., & Reid, I. R. (2002). Leptin directly regulates bone cell function *in vitro* and reduces bone fragility *in vivo*. *Journal of Endocrinology*, 175(2), 405-415.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1750405>
- Couvineau, A., & Laburthe, M. (2012a). The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins. *Curr Drug Targets*, 13(1), 103-115.
<https://doi.org/10.2174/138945012798868434>
- Couvineau, A., & Laburthe, M. (2012b). VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol*, 166(1), 42-50.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01676.x>
- Couvineau, A., & Laburthe, M. (2012c). VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), 42-50.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01676.x>
- Crane, J. L., & Cao, X. (2014). Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation [Review]. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 92(2), 107-115.
<https://doi.org/10.1007/s00109-013-1084-3>
- Cremasco, V., Decker, C. E., Stumpo, D., Blackshear, P. J., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Lupu, T. S., Graham, D. B., Novack, D. V., & Faccio, R. (2012). Protein Kinase C-Delta Deficiency Perturbs Bone Homeostasis by Selective Uncoupling of Cathepsin K Secretion and Ruffled Border Formation in Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(12), 2452-2463.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.1701>
- Crespo, P., Xu, N. Z., Simonds, W. F., & Gutkind, J. S. (1994). RAS-DEPENDENT ACTIVATION OF MAP KINASE PATHWAY MEDIATED BY G-PROTEIN BETA-GAMMA-SUBUNITS. *Nature*, 369(6479), 418-420.
<https://doi.org/10.1038/369418a0>

- Crotti, T. N., Flannery, M., Walsh, N. C., Fleming, J. D., Goldring, S. R., & McHugh, K. P. (2006). NFATc1 regulation of the human $\beta 3$ integrin promoter in osteoclast differentiation. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.12.012>
- Currey, J. D., Pitchford, J. W., & Baxter, P. D. (2007). Variability of the mechanical properties of bone, and its evolutionary consequences. *J R Soc Interface*, 4(12), 127-135. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0166>
- Cutz, E., Chan, W., Track, N. S., Goth, A., & Said, S. I. (1978). RELEASE OF VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE IN MAST-CELLS BY HISTAMINE LIBERATORS. *Nature*, 275(5681), 661-662. <https://doi.org/10.1038/275661a0>
- Dallas, S. L., & Bonewald, L. F. (2010). Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. In M. Zaidi (Ed.), *Skeletal Biology and Medicine* (Vol. 1192, pp. 437-443). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x>
- Dallas, S. L., Veno, P. A., & Tiede-Lewis, L. M. (2019). Live Cell Imaging of Bone Cell and Organ Cultures. *Methods Mol Biol*, 1914, 467-506. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_27
- Daponte, V., Henke, K., & Drissi, H. (2024). Current perspectives on the multiple roles of osteoclasts: Mechanisms of osteoclast-osteoblast communication and potential clinical implications. *Elife*, 13. <https://doi.org/10.7554/eLife.95083>
- De Leon-Oliva, D., Barrena-Blazquez, S., Jimenez-Alvarez, L., Fraile-Martinez, O., Garcia-Montero, C., Lopez-Gonzalez, L., Torres-Carranza, D., Garcia-Puente, L. M., Carranza, S. T., Alvarez-Mon, M. A., Alvarez-Mon, M., Diaz, R., & Ortega, M. A. (2023). The RANK-RANKL-OPG System: A Multifaceted Regulator of Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Medicina (Kaunas)*, 59(10). <https://doi.org/10.3390/medicina59101752>
- Del Fattore, A., Peruzzi, B., Rucci, N., Recchia, I., Cappariello, A., Longo, M., Fortunati, D., Ballanti, P., Iacobini, M., Luciani, M., Devito, R., Pinto, R., Caniglia, M., Lanino, E., Messina, C., Cesaro, S., Letizia, C., Bianchini, G., Fryssira, H.,...Teti, A. (2006). Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *Journal of Medical Genetics*, 43(4), 315-325. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.036673>
- Delgado-Calle, J., & Bellido, T. (2022). The osteocyte as a signaling cell. *Physiol Rev*, 102(1), 379-410. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2020>
- Delgado-Calle, J., Sato, A. Y., & Bellido, T. (2017). Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone*, 96, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.007>
- Delgado, M. (2003). VIP: a very important peptide in T helper differentiation. *Trends in Immunology*, 24(5), 221-224. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00069-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00069-3)
- Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., & Gomariz, R. P. (2001). Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med*, 7(5), 563-568. <https://doi.org/10.1038/87887>
- Delgado, M., & Ganea, D. (2000a). Inhibition of IFN-gamma-induced janus kinase-1-STAT1 activation in macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Immunol*, 165(6), 3051-3057. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.6.3051>
- Delgado, M., & Ganea, D. (2000b). VIP and PACAP inhibit activation induced apoptosis in T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 921, 55-67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06951.x>
- Delgado, M., & Ganea, D. (2013). Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids*, 45(1), 25-39. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1184-8>

- Delgado, M., Muñoz-Elias, E. J., Gomariz, R. P., & Ganea, D. (1999). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: In vitro and in vivo studies. *Journal of Immunology*, 162(3), 1707-1716. <Go to ISI>://WOS:000078261000062
- Delgado, M., Pozo, D., & Ganea, D. (2004). The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation [Review]. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 249-290. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.7>
- Delmas, P. D., & Malaval, L. (1993). The Proteins of Bone. In *Physiology and Pharmacology of Bone* (pp. 673-724). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-77991-6_19
- Deng, S., Xi, Y., Wang, H., Hao, J., Niu, X., Li, W., Tao, Y., & Chen, G. (2010). Regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. *Cellular Immunology*, 265(2), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.07.010>
- Dewhirst, F. E., Stashenko, P. P., Mole, J. E., & Tsurumachi, T. (1985). PURIFICATION AND PARTIAL SEQUENCE OF HUMAN OSTEOCLAST-ACTIVATING FACTOR - IDENTITY WITH INTERLEUKIN-1-BETA. *Journal of Immunology*, 135(4), 2562-2568. <Go to ISI>://WOS:A1985AQY7500053
- Dickson, L., Aramori, I., McCulloch, J., Sharkey, J., & Finlayson, K. (2006). A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology*, 51(6), 1086-1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.017>
- Dong, P., Gu, X., Zhu, G., Li, M., Ma, B., & Zi, Y. (2018). Melatonin Induces Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Promotes Fracture Healing in a Rat Model of Femoral Fracture via Neuropeptide Y/Neuropeptide Y Receptor Y1 Signaling. *Pharmacology*, 102(5-6), 272-280. <https://doi.org/10.1159/000492576>
- Duong, L., Lakkakorpi, P., Nakamura, I., & Rodan, G. A. (2000). Integrins and signaling in osteoclast function [Review]. *Matrix Biology*, 19(2), 97-105. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(00\)00051-2](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(00)00051-2)
- Edwards, J. R., Sun, S. G., Locklin, R., Shipman, C. M., Adamopoulos, I. E., Athanasou, N. A., & Sabokbar, A. (2006). LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(5), 1451-1462. <https://doi.org/10.1002/art.21821>
- Eger, M., Liron, T., Hiram-Bab, S., Awida, Z., Giladi, E., Dangoor, D., Fridkin, M., Kohavi, D., Gozes, I., & Gabet, Y. (2021). Therapeutic Potential of Vasoactive Intestinal Peptide and its Derivative Stearyl-Norleucine-VIP in Inflammation-Induced Osteolysis. *Front Pharmacol*, 12, 638128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.638128>
- Ejiri, S., & Ozawa, H. (1982). SCANNING ELECTRON-MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF RAT TIBIA USING THE HCL-COLLAGENASE METHOD [Note]. *Archivum Histologicum Japonicum*, 45(4), 399-404. <https://doi.org/10.1679/aohc.45.399>
- Eklund, S., Fahrenkrug, J., Jodal, M., Lundgren, O., Schaffalitzky de Muckadell, O. B., & Sjoqvist, A. (1980). Vasoactive intestinal polypeptide, 5-hydroxytryptamine and reflex hyperaemia in the small intestine of the cat. *J Physiol*, 302, 549-557. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013260>
- Elefteriou, F. (2005). Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling [Review]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19-20), 2339-2349. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5175-3>
- Everts, V., Delaissé, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saffig, P., & Beertsen, W. (2002). The bone lining cell:: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(1), 77-90. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.77>

- Farrow, E. G., Davis, S. I., Ward, L. M., Summers, L. J., Bubbear, J. S., Keen, R., Stamp, T. C. B., Baker, L. R. I., Bonewald, L. F., & White, K. E. (2009). Molecular analysis of DMP1 mutants causing autosomal recessive hypophosphatemic rickets. *Bone*, 44(2), 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.10.040>
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., & Livnat, S. (1985). NORADRENERGIC AND PEPTIDERGIC INNERVATION OF LYMPHOID-TISSUE. *Journal of Immunology*, 135(2), S755-S765. <Go to ISI>://WOS:A1985AMF6200006
- Feng, J. Q., Clinkenbeard, E. L., Yuan, B. Z., White, K. E., & Drezner, M. K. (2013). Osteocyte regulation of phosphate homeostasis and bone mineralization underlies the pathophysiology of the heritable disorders of rickets and osteomalacia [Review]. *Bone*, 54(2), 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.046>
- Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S. G., Lu, Y. B., Xie, Y. X., Yuan, B. Z., Yu, X. J., Rauch, F., Davis, S. I., Zhang, S. B., Rios, H., Drezner, M. K., Quarles, L. D., Bonewald, L. F., & White, K. E. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature Genetics*, 38(11), 1310-1315. <https://doi.org/10.1038/ng1905>
- Feng, X., & Teitelbaum, S. L. (2013a). Osteoclasts: New Insights. *Bone Res*, 1(1), 11-26. <https://doi.org/10.4248/BR201301003>
- Feng, X., & Teitelbaum, S. L. (2013b). Osteoclasts: New Insights [Review]. *Bone Research*, 1, 16. <https://doi.org/10.4248/br201301003>
- Fibbe, W. E., Vandamme, J., Billiau, A., Duinkerken, N., Lurvink, E., Ralph, P., Altrrock, B. W., Kaushansky, K., Willemze, R., & Falkenburg, J. H. F. (1988). HUMAN-FIBROBLASTS PRODUCE GRANULOCYTE-CSF, MACROPHAGE-CSF, AND GRANULOCYTE-MACROPHAGE-CSF FOLLOWING STIMULATION BY INTERLEUKIN-1 AND POLY(RI)POLY(RC). *Blood*, 72(3), 860-866. <Go to ISI>://WOS:A1988Q102800004
- Fiorino, C., & Harrison, R. E. (2016). E-cadherin is important for cell differentiation during osteoclastogenesis. *Bone*, 86, 106-118. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.004>
- Firestein, G. S. (2014). The disease formerly known as rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 16(3), 114. <https://doi.org/10.1186/ar4593>
- Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis [Review]. *Immunity*, 46(2), 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
- Firouzabadi, S. G., Kariminejad, R., Vameghi, R., Darvish, H., Ghaedi, H., Banihashemi, S., Firouzkouhi Moghaddam, M., Jamali, P., Mofidi Tehrani, H. F., Dehghani, H., Narooie-Nejad, M., Jamshidi, J., Tafakhori, A., Sadabadi, S., Najmabadi, H., & Behjati, F. (2017). Copy Number Variants in Patients with Autism and Additional Clinical Features: Report of VIPR2 Duplication and a Novel Microduplication Syndrome. *Mol Neurobiol*, 54(9), 7019-7027. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0202-y>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simoes, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Foster, N., Lea, S. R., Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2007). Pivotal Advance: Vasoactive intestinal peptide inhibits up-regulation of human monocyte TLR2 and TLR4 by LPS and differentiation of monocytes to macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(4), 893-903. <https://doi.org/10.1189/jlb.0206086>
- Franssen, B., Van Diest, P. J., Schuurman, A. H., & Kon, M. (2008). Keeping osteocytes alive: A comparison of drilling and hammering K-wires into bone. *Journal of Hand Surgery-European Volume*, 33E(3), 363-368. <https://doi.org/10.1177/1753193408087104>

- Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L. P., Poljak, L., Shores, E. W., Brown, K. D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B. F., & Siebenlist, U. (1997). Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes & Development*, 11(24), 3482-3496. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3482>
- Friedman, J. (2014). Leptin at 20: an overview [Review]. *Journal of Endocrinology*, 223(1), T1-T8. <https://doi.org/10.1530/joe-14-0405>
- Fu, D., Senouthai, S., Wang, J., & You, Y. (2019). Vasoactive intestinal peptide ameliorates renal injury in a pristane-induced lupus mouse model by modulating Th17/Treg balance. *Bmc Nephrology*, 20(1), Article 350. <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1548-y>
- Fujisawa, R., & Tamura, M. (2012). Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17(5), 1891-1903. <https://doi.org/10.2741/4026>
- Ganea, D., & Delgado, M. (2001). Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 49(2), 101-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348014>
- Ganea, D., Hooper, K. M., & Kong, W. (2015). The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. *Acta Physiol (Oxf)*, 213(2), 442-452. <https://doi.org/10.1111/apha.12427>
- Garimella, R., Tague, S. E., Zhang, J. G., Belibi, F., Nahar, N., Sun, B. H., Insogna, K., Wang, J. X., & Anderson, H. C. (2008). Expression and synthesis of bone morphogenetic proteins by osteoclasts: A possible path to anabolic bone remodeling. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(6), 569-577. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.950394>
- Giachetti, A., Said, S. I., Reynolds, R. C., & Koniges, F. C. (1977). Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(8), 3424-3428. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3424>
- Gilbert, L., He, X. F., Farmer, P., Boden, S., Kozlowski, M., Rubin, J., & Nanes, M. S. (2000). Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*, 141(11), 3956-3964. <https://doi.org/10.1210/en.141.11.3956>
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P., Hansen, M. K., Anderson, K., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2000). Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neurosci*, 85(1-3), 49-59. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(00\)00219-8](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00219-8)
- Gomariz, R. P., Arranz, A., Abad, C., Torroba, M., Martínez, C., Rosignoli, F., García-Gómez, M., Leceta, J., & Juarranz, Y. (2005). Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(2), 491-502. <https://doi.org/10.1189/jlb.1004564>
- Gomariz, R. P., Delgado, M., Naranjo, J. R., Mellstrom, B., Tormo, A., Mata, F., & Leceta, J. (1993). VIP GENE-EXPRESSION IN RAT THYMUS AND SPLEEN. *Brain Behavior and Immunity*, 7(4), 271-278. <https://doi.org/10.1006/brbi.1993.1027>
- Gomariz, R. P., Garrido, E., Leceta, J., Martínez, C., Abalo, R., & Delgado, M. (1994a). Gene expression of VIP receptor in rat lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 203(3), 1599-1604. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2369>
- Gomariz, R. P., Gutiérrez-Cañas, I., Arranz, A., Carrión, M., Juarranz, Y., Leceta, J., & Martínez, C. (2010). Peptides Targeting Toll-Like Receptor Signalling Pathways for Novel Immune Therapeutics [Review]. *Current Pharmaceutical Design*, 16(9), 1063-1080. <https://doi.org/10.2174/138161210790963841>
- Gomariz, R. P., Juarranz, Y., Abad, C., Arranz, A., Leceta, J., & Martínez, C. (2006). VIP-PACAP system in immunity - New insights for multitarget therapy. In H. Vaudry & M. Laburthe (Eds.), *Vip, Pacap, and Related Peptides: From Gene to Therapy* (Vol. 1070, pp. 51-74). <https://doi.org/10.1196/annals.1317.031>

- Gomariz, R. P., Juarranz, Y., Carrión, M., Pérez-García, S., Villanueva-Romero, R., González-Alvaro, I., Gutiérrez-Cañas, I., Lamana, A., & Martínez, C. (2019). An Overview of VPAC Receptors in Rheumatoid Arthritis: Biological Role and Clinical Significance [Review]. *Frontiers in endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00729>
- Gomariz, R. P., Leceta, J., Garrido, E., Garrido, T., & Delgado, M. (1994b). Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes. *Regul Pept*, 50(2), 177-184. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)90033-7)
- Gomariz, R. P., Martinez, C., Abad, C., Leceta, J., & Delgado, M. (2001). Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 7(2), 89-111. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172702>
- Gomes de Andrade, G., Reck Cechinel, L., Bertoldi, K., Galvao, F., Valdeci Worm, P., & Rodrigues Siqueira, I. (2018). The Aging Process Alters IL-1beta and CD63 Levels Differently in Extracellular Vesicles Obtained from the Plasma and Cerebrospinal Fluid. *Neuroimmunomodulation*, 25(1), 18-22. <https://doi.org/10.1159/000488943>
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., & Delgado, M. (2007). Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol*, 7(1), 52-63. <https://doi.org/10.1038/nri1984>
- Gonzalez-Rey, E., & Delgado, M. (2008). Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells. *Brain Behav Immun*, 22(1), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.07.004>
- Gorski, J. P. (2011). Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16(7), 2598-2621. <https://doi.org/10.2741/3875>
- Gothlin, G., & Ericsson, J. L. E. (1976). OSTEOCLAST - REVIEW OF ULTRASTRUCTURE, ORIGIN, AND STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(120), 201-231. <Go to ISI>://WOS:A1976CJ24900031
- Gowen, L. C., Petersen, D. N., Mansolf, A. L., Qi, H., Stock, J. L., Tkalcevic, G. T., Simmons, H. A., Crawford, D. T., Chidsey-Frink, K. L., Ke, H. Z., McNeish, J. D., & Brown, T. A. (2003). Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (<i>OF45</i>) results in increased bone formation and bone mass. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1998-2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203250200>
- Gozes, I. (2008). VIP, From Gene to Behavior and Back: Summarizing my 25 Years of Research [; Proceedings Paper]. *Journal of Molecular Neuroscience*(1-3). <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9105-3>
- Grace, C. R., Perrin, M. H., DiGruccio, M. R., Miller, C. L., Rivier, J. E., Vale, W. W., & Riek, R. (2004). NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(35), 12836-12841. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404702101>
- Greenfield, E. M., Horowitz, M. C., & Lavish, S. A. (1996). Stimulation by parathyroid hormone of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor expression in osteoblasts is an immediate-early gene response induced by cAMP signal transduction. *J Biol Chem*, 271(18), 10984-10989. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10984>
- Gregersen, P. K., Silver, J., & Winchester, R. J. (1987). THE SHARED EPITOPE HYPOTHESIS - AN APPROACH TO UNDERSTANDING THE MOLECULAR-GENETICS OF SUSCEPTIBILITY TO RHEUMATOID-ARTHRITIS. *Arthritis and Rheumatism*, 30(11), 1205-1213. <https://doi.org/10.1002/art.1780301102>

- Gressens, P., Hill, J. M., Gozes, I., Fridkin, M., & Brenneman, D. E. (1993). Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature*, 362(6416), 155-158. <https://doi.org/10.1038/362155a0>
- Gressens, P., Hill, J. M., Painsaveine, B., Gozes, I., Fridkin, M., & Brenneman, D. E. (1994). Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *J Clin Invest*, 94(5), 2020-2027. <https://doi.org/10.1172/JCI117555>
- Gronblad, M., Liesi, P., Korkala, O., Karaharju, E., & Polak, J. (1984). Innervation of human bone periosteum by peptidergic nerves. *Anat Rec*, 209(3), 297-299. <https://doi.org/10.1002/ar.1092090306>
- Gu, X. C., Zhang, X. B., Hu, B., Zi, Y., & Li, M. (2016). Neuropeptide Y accelerates post-fracture bone healing by promoting osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Neuropeptides*, 60, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.09.005>
- Guan, L., Yu, D., Wu, G. H., Ning, H. J., He, S. D., Li, S. S., Hu, T. Y., Yang, G., Liu, Z. Q., Yu, H. Q., Sun, X. Z., Liu, Z. G., & Yang, P. C. (2019). Vasoactive intestinal peptide is required in the maintenance of immune regulatory competency of immune regulatory monocytes. *Clin Exp Immunol*, 196(2), 276-286. <https://doi.org/10.1111/cei.13259>
- Gutiérrez-Cañas, I., Juarranz, M. G., Collado, B., Rodríguez-Henche, N., Chiloeches, A., Prieto, J. C., & Carmena, M. J. (2005). Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *Prostate*, 63(1), 44-55. <https://doi.org/10.1002/pros.20173>
- Gutiérrez-Cañas, I., Juarranz, Y., Santiago, B., Arranz, A., Martínez, C., Galindo, M., Payá, M., Gomariz, R. P., & Pablos, J. L. (2006). VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology*, 45(5), 527-532. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei219>
- Gutiérrez-Cañas, I., Juarranz, Y., Santiago, B., Martínez, C., Gomariz, R. P., Pablos, J. L., & Leceta, J. (2008). Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun*, 22(3), 312-317. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.09.007>
- Hardy, E., & Fernandez-Patron, C. (2020). Destroy to Rebuild: The Connection Between Bone Tissue Remodeling and Matrix Metalloproteinases [Review]. *Frontiers in Physiology*, 11, Article 47. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00047>
- Harmar, A. J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*, 2(12), REVIEWS3013. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-12-reviews3013>
- Harmar, A. J., Fahrenkrug, J., Gozes, I., Laburthe, M., May, V., Pisegna, J. R., Vaudry, D., Vaudry, H., Waschek, J. A., & Said, S. I. (2012). Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), 4-17. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01871.x>
- Hasegawa, T., Li, M., Hara, K., Sasaki, M., Tabata, C., de Freitas, P. H., Hongo, H., Suzuki, R., Kobayashi, M., Inoue, K., Yamamoto, T., Oohata, N., Oda, K., Akiyama, Y., & Amizuka, N. (2011). Morphological assessment of bone mineralization in tibial metaphyses of ascorbic acid-deficient ODS rats. *Biomed Res*, 32(4), 259-269. <https://doi.org/10.2220/biomedres.32.259>
- Hasegawa, T., Yamamoto, T., Tsuchiya, E., Hongo, H., Tsuboi, K., Kudo, A., Abe, M., Yoshida, T., Nagai, T., Khadiza, N., Yokoyama, A., Oda, K., Ozawa, H., de Freitas, P. H. L., Li, M., & Amizuka, N. (2017). Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Jpn Dent Sci Rev*, 53(2), 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.09.002>

- Hauge, E. M., Qvesel, D., Eriksen, E. F., Mosekilde, L., & Melsen, F. (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(9), 1575-1582. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.9.1575>
- Hay, E., Faucheu, C., Suc-Royer, I., Touitou, R., Stiot, V., Vayssière, B., Baron, R., Roman-Roman, S., & Rawadi, G. (2005). Interaction between LRP5 and Frat1 mediates the activation of the Wnt canonical pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13616-13623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411999200>
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way [Review]. *Development*, 131(8), 1663-1677. <https://doi.org/10.1242/dev.01117>
- Hemminki, K., Li, X., Sundquist, J., & Sundquist, K. (2009). Familial Associations of Rheumatoid Arthritis With Autoimmune Diseases and Related Conditions. *Arthritis and Rheumatism*, 60(3), 661-668. <https://doi.org/10.1002/art.24328>
- Henning, R. J., & Sawmiller, D. R. (2001). Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res*, 49(1), 27-37. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00229-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00229-7)
- Hill, E. L., & Elde, R. (1991). Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *Cell Tissue Res*, 264(3), 469-480. <https://doi.org/10.1007/BF00319037>
- Hohenhaus, D. M., Schaale, K., Le Cao, K. A., Seow, V., Iyer, A., Fairlie, D. P., & Sweet, M. J. (2013). An mRNA atlas of G protein-coupled receptor expression during primary human monocyte/macrophage differentiation and lipopolysaccharide-mediated activation identifies targetable candidate regulators of inflammation. *Immunobiology*, 218(11), 1345-1353. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.07.001>
- Hohmann, E. L., Elde, R. P., Rysavy, J. A., Einzig, S., & Gebhard, R. L. (1986). Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science*, 232(4752), 868-871. <https://doi.org/10.1126/science.3518059>
- Hohmann, E. L., Levine, L., & Tashjian, A. H., Jr. (1983). Vasoactive intestinal peptide stimulates bone resorption via a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology*, 112(4), 1233-1239. <https://doi.org/10.1210/endo-112-4-1233>
- Hohmann, E. L., & Tashjian, A. H., Jr. (1984). Functional receptors for vasoactive intestinal peptide on human osteosarcoma cells. *Endocrinology*, 114(4), 1321-1327. <https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1321>
- Holloway, W. R., Collier, F. M., Aitken, C. J., Myers, D. E., Hodge, J. M., Malakellis, M., Gough, T. J., Collier, G. R., & Nicholson, G. C. (2002). Leptin inhibits osteoclast generation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(2), 200-209. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.2.200>
- Horton, J. E., Mergenhagen, S. E., Simmons, H. A., Raisz, L. G., & Oppenheim, J. J. (1972). BONE RESORBING ACTIVITY IN SUPERNATANT FLUID FROM CULTURED HUMAN PERIPHERAL-BLOOD LEUKOCYTES. *Science*, 177(4051), 793-+. <https://doi.org/10.1126/science.177.4051.793>
- Huang, W., Yang, S., Shao, J., & Li, Y. P. (2007). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*, 12, 3068-3092. <https://doi.org/10.2741/2296>
- Hughes, D. E., Salter, D. M., & Simpson, R. (1994). CD44 EXPRESSION IN HUMAN BONE - A NOVEL MARKER OF OSTEOCYTIC DIFFERENTIATION. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(1), 39-44.
- Hukkanen, M., Konttinen, Y. T., Rees, R. G., Santavirta, S., Terenghi, G., & Polak, J. M. (1992). Distribution of nerve endings and sensory neuropeptides in rat synovium, meniscus and bone. *Int J Tissue React*, 14(1), 1-10.

- Igwe, J. C., Jiang, X., Paic, F., Ma, L., Adams, D. J., Baldock, P. A., Pilbeam, C. C., & Kalajzic, I. (2009). Neuropeptide Y is expressed by osteocytes and can inhibit osteoblastic activity. *J Cell Biochem*, 108(3), 621-630. <https://doi.org/10.1002/jcb.22294>
- Ikebuchi, Y., Aoki, S., Honma, M., Hayashi, M., Sugamori, Y., Khan, M., Kariya, Y., Kato, G., Tabata, Y., Penninger, J. M., Udagawa, N., Aoki, K., & Suzuki, H. (2018). Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature*, 561(7722), 195-+. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0482-7>
- Ingram, R. T., Clarke, B. L., Fisher, L. W., & Fitzpatrick, L. A. (1993). Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res*, 8(9), 1019-1029. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650080902>
- Ishigaki, K., Sakaue, S., Terao, C., Luo, Y., Sonehara, K., Yamaguchi, K., Amariuta, T., Too, C. L., Laufer, V. A., Scott, I. C., Viatte, S., Takahashi, M., Ohmura, K., Murasawa, A., Hashimoto, M., Ito, H., Hammoudeh, M., Al Emadi, S., Masri, B. K.,...BioBank Japan, P. (2022). Multi-ancestry genome-wide association analyses identify novel genetic mechanisms in rheumatoid arthritis. *Nature Genetics*, 54(11), 1640-+. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01213-w>
- Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., & Nagata, S. (1992). FUNCTIONAL EXPRESSION AND TISSUE DISTRIBUTION OF A NOVEL RECEPTOR FOR VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE. *Neuron*, 8(4), 811-819. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90101-i](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90101-i)
- Ito, T., Hou, W., Katsuno, T., Igarashi, H., Pradhan, T. K., Mantey, S. A., Coy, D. H., & Jensen, R. T. (2000). Rat and guinea pig pancreatic acini possess both VIP(1) and VIP(2) receptors, which mediate enzyme secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278(1), G64-74. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.1.G64>
- Itoh, N., Obata, K. I., Yanaihara, N., & Okamoto, H. (1983). HUMAN PREPROVASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE CONTAINS A NOVEL PHI-27-LIKE PEPTIDE, PHM-270. *Nature*, 304(5926), 547-549. <https://doi.org/10.1038/304547a0>
- Jacome-Galarza, C. E., Percin, G. I., Muller, J. T., Mass, E., Lazarov, T., Eitler, J., Rauner, M., Yadav, V. K., Crozet, L., Bohm, M., Loyher, P. L., Karsenty, G., Waskow, C., & Geissmann, F. (2019). Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature*(7753). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1105-7>
- Jeon, E., Yun, Y. R., Kang, W., Lee, S., Koh, Y. H., Kim, H. W., Suh, C. K., & Jang, J. H. (2012). Investigating the Role of FGF18 in the Cultivation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Plos One*, 7(8), 6, Article e43982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043982>
- Jeon, Y. M., Kook, S. H., Rho, S. J., Lim, S. S., Choi, K. C., Kim, H. S., Kim, J. G., & Lee, J. C. (2013). Fibroblast growth factor-7 facilitates osteogenic differentiation of embryonic stem cells through the activation of ERK/Runx2 signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 382(1-2), 37-45. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1716-5>
- Jiang, X., McClellan, S. A., Barrett, R. P., Zhang, Y., & Hazlett, L. D. (2012). Vasoactive Intestinal Peptide Downregulates Proinflammatory TLRs While Upregulating Anti-Inflammatory TLRs in the Infected Cornea. *Journal of Immunology*, 189(1), 269-278. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200365>
- Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M., & Manolagas, S. C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(5), 793-802. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.5.793>

- Jimeno, R., Gomariz, R. P., Garin, M., Gutiérrez-Cañas, I., González-Alvaro, I., Carrión, M., Galindo, M., Leceta, J., & Juarranz, Y. (2015a). The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP. *J Mol Med (Berl)*, 93(4), 457-467. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1232-4>
- Jimeno, R., Leceta, J., Garin, M., Ortiz, A. M., Mellado, M., Rodríguez-Frade, J. M., Martínez, C., Pérez-García, S., Gomariz, R. P., & Juarranz, Y. (2015b). Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect. *Journal Leukocyte Biology*, 98(2), 257-269. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0714-327R>
- Jimeno, R., Leceta, J., Martínez, C., Gutiérrez-Cañas, I., Pérez-García, S., Carrión, M., Gomariz, R. P., & Juarranz, Y. (2012). Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells. *Immunology and Cell Biology*, 90(2), 178-186. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.23>
- Johansson, O., & Lundberg, J. M. (1981). ULTRASTRUCTURAL-LOCALIZATION OF VIP-LIKE IMMUNOREACTIVITY IN LARGE DENSE-CORE VESICLES OF CHOLINERGIC-TYPE NERVE-TERMINALS IN CAT EXOCRINE GLANDS. *Neuroscience*, 6(5), 847-862. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90167-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90167-6)
- Josien, R., Wong, B. R., Li, H. L., Steinman, R. M., & Choi, Y. W. (1999). TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *Journal of Immunology*, 162(5), 2562-2568. <Go to ISI>://WOS:000078699000016
- Juarranz, M. G., Santiago, B., Torroba, M., Gutiérrez-Cañas, I., Palao, G., Galindo, M., Abad, C., Martínez, C., Leceta, J., Pablos, J. L., & Gomariz, R. P. (2004). Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology*, 43(4), 416-422. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh061>
- Juarranz, Y., Abad, C., Martínez, C., Arranz, A., Gutiérrez-Cañas, I., Rosignoli, F., Gomariz, R. P., & Leceta, J. (2005a). Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(5), R1034-R1045. <https://doi.org/10.1186/ar1779>
- Juarranz, Y., Abad, C., Martínez, C., Arranz, A., Gutiérrez-Cañas, I., Rosignoli, F., Gomariz, R. P., & Leceta, J. (2005b). Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 7(5), R1034-R1045. <https://doi.org/10.1186/ar1779>
- Juarranz, Y., Gutiérrez-Cañas, I., Santiago, B., Carrión, M., Pablos, J. L., & Gomariz, R. P. (2008). Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatology*, 58(4), 1086-1095. <https://doi.org/10.1002/art.23403>
- Juhász, T., Helgadóttir, S. L., Tamas, A., Reglodi, D., & Zakany, R. (2015). PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*, 66, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.02.001>
- Kanatani, M., Sugimoto, T., Kaji, H., Kobayashi, T., Nishiyama, K., Fukase, M., Kumegawa, M., & Chihara, K. (1995). STIMULATORY EFFECT OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 ON OSTEOCLAST-LIKE CELL-FORMATION AND BONE-RESORBING ACTIVITY. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(11), 1681-1690. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650101110>
- Kanemitsu, M., Nakasa, T., Shirakawa, Y., Ishikawa, M., Miyaki, S., & Adachi, N. (2020). Role of vasoactive intestinal peptide in the progression of osteoarthritis through bone sclerosis and angiogenesis in subchondral bone. *J Orthop Sci*, 25(5), 897-906. <https://doi.org/10.1016/j.jos.2019.11.010>
- Khan, A. U., Qu, R. M., Fan, T. Y., Ouyang, J., & Dai, J. X. (2020). A glance on the role of actin in osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells [Review]. *Stem*

- Cell Research & Therapy(1).
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01789-2>
- Khor, E.-C., Yulyaningsih, E., Driessler, F., Kovacic, N., Wee, N. K. Y., Kulkarni, R. N., Lee, N. J., Enriquez, R. F., Xu, J., Zhang, L., Herzog, H., & Baldock, P. A. (2016). The γ_6 receptor suppresses bone resorption and stimulates bone formation in mice via a suprachiasmatic nucleus relay. *Bone*, 84, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.12.011>
- Kim, J. H., & Kim, N. (2016). Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J*, 52(1), 12-17. <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.12>
- Kim, K. W., Kim, H. R., Kim, B. M., Cho, M. L., & Lee, S. H. (2015). Th17 cytokines regulate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*, 185(11), 3011-3024. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.017>
- Kim, N. S., Kim, H. J., Koo, B. K., Kwon, M. C., Kim, Y. W., Cho, Y., Yokota, Y., Penninger, J. M., & Kong, Y. Y. (2006). Receptor activator of NF- κ B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(3), 1002-1013. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.3.1002-1013.2006>
- Kitase, Y., & Prideaux, M. (2023). Targeting osteocytes vs osteoblasts. *Bone*, 170, 116724. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116724>
- Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., & Inoue, J. (2001). Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *Embo Journal*, 20(6), 1271-1280. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1271>
- Kogianni, G., Mann, V., & Noble, B. S. (2008). Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(6), 915-927. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080207>
- Komano, Y., Nanki, T., Hayashida, K., Taniguchi, K., & Miyasaka, N. (2006). Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Research & Therapy*, 8(5), Article R152. <https://doi.org/10.1186/ar2046>
- Komori, T. (2013). Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass [Review]. *Cell and Tissue Research*, 352(2), 191-198. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1546-x>
- Komori, T. (2019). Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071694>
- Kotake, S., Yago, T., Kobashigawa, T., & Nanke, Y. (2017). The Plasticity of Th17 Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis [Review]. *Journal of Clinical Medicine*, 6(7), Article 67. <https://doi.org/10.3390/jcm6070067>
- Krsek, A., Ostojic, L., Zivalj, D., & Baticic, L. (2024). Navigating the Neuroimmunomodulation Frontier: Pioneering Approaches and Promising Horizons—A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/ijms25179695>
- Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M., & Xu, J. (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*, 45(12), 863-873. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021>
- Laburthe, M., & Couvineau, A. (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept*, 108(2-3), 165-173. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(02\)00099-x](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(02)00099-x)
- Laburthe, M., Couvineau, A., & Tan, V. (2007). Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides*, 28(9), 1631-1639. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.020>

- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I.,...Boyle, W. J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2), 165-176. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81569-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81569-x)
- Lachmann, A., Xu, H., Krishnan, J., Berger, S. I., Mazloom, A. R., & Ma'ayan, A. (2010). ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics*, 26(19), 2438-2444. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq466>
- Lademann, F., Hofbauer, L. C., & Rauner, M. (2020). The Bone Morphogenetic Protein Pathway: The Osteoclastic Perspective [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 8, Article 586031. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.586031>
- Lai, C. F., & Cheng, S. L. (2002). Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in normal human osteoblastic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15514-15522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200794200>
- Lamana, A., Castro-Vázquez, D., de la Fuente, H., Triguero-Martínez, A., Martínez-Hernández, R., Revenga, M., Villanueva-Romero, R., Llamas-Velasco, M., Chicharro, P., Juarranz, Y., Marazuela, M., Sales-Sanz, M., García-Vicuna, R., Tomero, E., Gonzalez-Alvaro, I., Martínez, C., & Gomariz, R. P. (2022). VIP/VPAC Axis Expression in Immune-Mediated Inflammatory Disorders: Associated miRNA Signatures. *Int J Mol Sci*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158578>
- Langer, I., Jeandriens, J., Couvineau, A., Sanmukh, S., & Latek, D. (2022). Signal Transduction by VIP and PACAP Receptors. *Biomedicines*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020406>
- Langub, M. C., Monier-Faugere, M. C., Qi, Q. L., Geng, Z., Koszewski, N. J., & Malleche, H. H. (2001). Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(3), 448-456. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.3.448>
- Lazenby, R. A. (1990). CONTINUING PERIOSTEAL APPPOSITION .2. THE SIGNIFICANCE OF PEAK BONE MASS, STRAIN EQUILIBRIUM, AND AGE-RELATED ACTIVITY DIFFERENTIALS FOR MECHANICAL COMPENSATION IN HUMAN TUBULAR BONES. *American Journal of Physical Anthropology*, 82(4), 473-484. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330820408>
- Le Pechon-Vallee, C., Magalon, K., Rasolonjanahary, R., Enjalbert, A., & Gerard, C. (2000). Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides stimulate mitogen-activated protein kinase in the pituitary cell line GH4C1 by a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate pathway. *Neuroendocrinology*, 72(1), 46-56. <https://doi.org/10.1159/000054570>
- Leceta, J., Martínez, C., Delgado, M., Garrido, E., & Gomariz, R. P. (1996). Expression of vasoactive intestinal peptide in lymphocytes: a possible endogenous role in the regulation of the immune system. *Adv Neuroimmunol*, 6(1), 29-36. [https://doi.org/10.1016/s0960-5428\(96\)00001-0](https://doi.org/10.1016/s0960-5428(96)00001-0)
- Lee, A. Y. S., Eri, R., Lyons, A. B., Grimm, M. C., & Korner, H. (2013). CC chemokine ligand 20 and its cognate receptor CCR6 in mucosal T cell immunology and inflammatory bowel disease: odd couple or axis of evil? [Review]. *Frontiers in Immunology*, 4, Article 194. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00194>
- Lee, N. J., Doyle, K. L., Sainsbury, A., Enriquez, R. F., Hort, Y. J., Riepler, S. J., Baldock, P. A., & Herzog, H. (2010). Critical Role for Y1 Receptors in Mesenchymal Progenitor Cell Differentiation and Osteoblast Activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(8), 1736-1747. <https://doi.org/10.1002/jbmr.61>

- Lee, S. H., Rho, J., Jeong, D., Sul, J. Y., Kim, T., Kim, N., Kang, J. S., Miyamoto, T., Suda, T., Lee, S. K., Pignolo, R. J., Koczon-Jaremko, B., Lorenzo, J., & Choi, Y. (2006). v-ATPase V₀ subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nature Medicine*, 12(12), 1403-1409. <https://doi.org/10.1038/nm1514>
- Lerner, U. H., Lundberg, P., Ransjö, M., Persson, P., & Hakanson, R. (1994). HELODERMIN, HELOSPECTIN, AND PACAP STIMULATE CYCLIC-AMP FORMATION IN INTACT BONE, ISOLATED OSTEOBLASTS, AND OSTEOBLASTIC CELL-LINES. *Calcified Tissue International*, 54(4), 284-289. <https://doi.org/10.1007/bf00295952>
- Lerner, U. H., & Persson, E. (2008). Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide [; Research Support, Non-U.S. Gov't; Review]. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 8(2), 154-165. <Go to ISI>://MEDLINE:18622084
- Lewis, D. B., Liggitt, H. D., Effmann, E. L., Motley, S. T., Teitelbaum, S. L., Jepsen, K. J., Goldstein, S. A., Bonadio, J., Carpenter, J., & Perlmutter, R. M. (1993). OSTEOPOROSIS INDUCED IN MICE BY OVERPRODUCTION OF INTERLEUKIN-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), 11618-11622. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11618>
- Li, D. F., Liu, J., Guo, B. S., Liang, C., Dang, L., Lu, C., He, X. J., Cheung, H. Y. S., Xu, L., Lu, C. W., He, B., Liu, B., Shaikh, A. B., Li, F. F., Wang, L. Y., Yang, Z. J., Au, D. W. T., Peng, S. L., Zhang, Z. K.,...Zhang, G. (2016). Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nature Communications*, 7, 16, Article 10872. <https://doi.org/10.1038/ncomms10872>
- Li, L., Huang, L., Sung, S.-S. J., Vergis, A. L., Rosin, D. L., Rose, C. E., Jr., Lobo, P. I., & Okusa, M. D. (2008). The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney International*, 74(12), 1526-1537. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.500>
- Liang, M. M., Yin, X. F., Zhang, S., Ai, H. B., Luo, F., Xu, J. Z., Dou, C., Dong, S. W., & Ma, Q. Y. (2021). Osteoclast-derived small extracellular vesicles induce osteogenic differentiation via inhibiting ARHGAP1. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 23, 1191-1203. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.01.031>
- Liberman, A. C., Budzinski, M. L., Sokn, C., Gobbini, R. P., Steininger, A., & Arzt, E. (2018). Regulatory and Mechanistic Actions of Glucocorticoids on T and Inflammatory Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 235. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00235>
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., & Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol*, 11, 757. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
- Liu, S., Zhu, L., Zhang, J., Yu, J., Cheng, X., & Peng, B. (2016). Anti-osteoclastogenic activity of isoliquiritigenin via inhibition of NF-kappaB-dependent autophagic pathway. *Biochem Pharmacol*, 106, 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.03.002>
- Liu, X., Liu, H., Xiong, Y., Yang, L., Wang, C., Zhang, R., & Zhu, X. (2018). Postmenopausal osteoporosis is associated with the regulation of SP, CGRP, VIP, and NPY. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 742-750. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.044>
- Liu, Y. P., Guan, C. X., Bai, H. B., Qin, X. Q., & Liu, H. J. (2005). [Effects of vasoactive intestinal peptide on LPS-induced MMP-9 expression by alveolar macrophages in rats]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 30(6), 645-649. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16708801>
- Long, F. X., Chung, U. I., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H. M., & McMahon, A. P. (2004). Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development*, 131(6), 1309-1318. <https://doi.org/10.1242/dev.01006>
- Lu, J., Piper, S. J., Zhao, P., Miller, L. J., Wootten, D., & Sexton, P. M. (2022). Targeting VIP and PACAP Receptor Signaling: New Insights into Designing Drugs for the PACAP Subfamily of Receptors. *Int J Mol Sci*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158069>

- Lundberg, P., Boström, I., Mukohyama, H., Bjurholm, A., Smans, K., & Lerner, U. H. (1999). Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules. *Regulatory Peptides*, 85(1), 47-58. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(99\)00069-5](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(99)00069-5)
- Lundberg, P., Lie, A., Bjurholm, A., Lehenkari, P. P., Horton, M. A., Lerner, U. H., & Ransjo, M. (2000). Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts. *Bone*, 27(6), 803-810. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00394-x](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00394-x)
- Lundberg, P., Lundgren, I., Mukohyama, H., Lehenkari, P. P., Horton, M. A., & Lerner, U. H. (2001). Vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in mouse calvarial osteoblasts: Presence of VIP-2 receptors and differentiation-induced expression of VIP-1 receptors. *Endocrinology*, 142(1), 339-347. <https://doi.org/10.1210/en.142.1.339>
- Luo, J., Zhou, W., Zhou, X., Li, D. L., Weng, J. S., Yi, Z. F., Cho, S. G., Li, C. H., Yi, T. F., Wu, X. S., Li, X. Y., de Crombrughe, B., Höök, M., & Liu, M. Y. (2009). Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48. *Development*(16). <https://doi.org/10.1242/dev.033571>
- Lutz, E. M., Sheward, W. J., West, K. M., Morrow, J. A., Fink, G., & Harmar, A. J. (1993). THE VIP(2) RECEPTOR - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A CDNA-ENCODING A NOVEL RECEPTOR FOR VASOACTIVE-INTESTINAL-PEPTIDE. *Febs Letters*, 334(1), 3-8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81668-p](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81668-p)
- Ma, W., Zhang, X., Shi, S., & Zhang, Y. (2013). Neuropeptides stimulate human osteoblast activity and promote gap junctional intercellular communication. *Neuropeptides*, 47(3), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.12.002>
- Ma, Y. F. L., Cain, R. L., Halladay, D. L., Yang, X. H., Zeng, Q. Q., Miles, R. R., Chandrasekhar, S., Martin, T. J., & Onyia, J. E. (2001). Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) *in vivo* is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*, 142(9), 4047-4054. <https://doi.org/10.1210/en.142.9.4047>
- MacKenzie, C. J., Lutz, E. M., Johnson, M. S., Robertson, D. N., Holland, P. J., & Mitchell, R. (2001). Mechanisms of phospholipase C activation by the vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 2 receptor. *Endocrinology*, 142(3), 1209-1217. <https://doi.org/10.1210/en.142.3.1209>
- Maier, U., Babich, A., & Nürnberg, B. (1999). Roles of non-catalytic subunits in G β γ -induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms β and γ . *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 29311-29317. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29311>
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21(2), 115-137. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>
- Manolagas, S. C., O'Brien, C. A., & Almeida, M. (2013). The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease [Review]. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(12), 699-712. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.179>
- Marahleh, A., Kitaura, H., Otori, F., Noguchi, T., & Mizoguchi, I. (2023). The osteocyte and its osteoclastogenic potential. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, 1121727. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1121727>
- Marie, P. J., & Fromiguet, O. (2006). Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 1(4), 539-548. <https://doi.org/10.2217/17460751.1.4.539>
- Marino, S., & Bellido, T. (2024). PTH receptor signalling, osteocytes and bone disease induced by diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 20(11), 661-672. <https://doi.org/10.1038/s41574-024-01014-7>

- Martin, B., Shin, Y.-K., White, C. M., Ji, S., Kim, W., Carlson, O. D., Napora, J. K., Chadwick, W., Chapter, M., Waschek, J. A., Mattson, M. P., Maudsley, S., & Egan, J. M. (2010). Vasoactive Intestinal Peptide-Null Mice Demonstrate Enhanced Sweet Taste Preference, Dysglycemia, and Reduced Taste Bud Leptin Receptor Expression. *Diabetes*, 59(5), 1143-1152. <https://doi.org/10.2337/db09-0807>
- Martin, T. J., Romas, E., & Gillespie, M. T. (1998). Interleukins in the control of osteoclast differentiation [Review]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 8(2), 107-123. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExp.r.v8.i2.10>
- Martinez, C., Delgado, M., Abad, C., Gomariz, R. P., Ganea, D., & Leceta, J. (1999). Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 93(1-2), 126-138. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(98\)00216-1](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(98)00216-1)
- Martínez, C., Juarranz, Y., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Pérez-García, S., Villanueva-Romero, R., Castro, D., Lamana, A., Mellado, M., González-Alvaro, I., & Gomariz, R. P. (2020). A Clinical Approach for the Use of VIP Axis in Inflammatory and Autoimmune Diseases [Review]. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), Article 65. <https://doi.org/10.3390/ijms21010065>
- Martínez, C., Ortiz, A. M., Juarranz, Y., Lamana, A., Seoane, I. V., Leceta, J., García-Vicuna, R., Gomariz, R. P., & González-Álvaro, I. (2014). Serum Levels of Vasoactive Intestinal Peptide as a Prognostic Marker in Early Arthritis. *Plos One*, 9(1), Article e85248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085248>
- Matic, I., Matthews, B. G., Kizivat, T., Igwe, J. C., Marijanovic, I., Ruohonen, S. T., Savontaus, E., Adams, D. J., & Kalajzic, I. (2012). Bone-specific overexpression of NPY modulates osteogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 12(4), 209-218. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23196263>
- Matsuzaki, E., Hiratsuka, S., Hamachi, T., Takahashi-Yanaga, F., Hashimoto, Y., Higashi, K., Kobayashi, M., Hirofujii, T., Hirata, M., & Maeda, K. (2013). Sphingosine-1-phosphate promotes the nuclear translocation of β -catenin and thereby induces osteoprotegerin gene expression in osteoblast-like cell lines. *Bone*, 55(2), 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.04.008>
- Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K., & Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(1), 199-204. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8586>
- McHugh, K. P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M. H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F. P., Hynes, R. O., & Teitelbaum, S. L. (2000). Mice lacking $\beta 3$ integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *Journal of Clinical Investigation*, 105(4), 433-440. <https://doi.org/10.1172/jci8905>
- Michelangeli, V. P., Fletcher, A. E., Allan, E. H., Nicholson, G. C., & Martin, T. J. (1989). EFFECTS OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE ON CYCLIC-AMP FORMATION IN CHICKEN, RAT, AND MOUSE BONE-CELLS. *Journal of Bone and Mineral Research*, 4(2), 269-272. <Go to ISI>://WOS:A1989U330100019
- Miller, A. L., Verma, D., Grinninger, C., Huang, M.-C., & Goetzl, E. J. (2006). Functional splice variants of the type II G protein-coupled receptor (VPAC2) for vasoactive intestinal peptide in mouse and human lymphocytes. In H. Vaudry & M. Laburthe (Eds.), *Vip, Pacap, and Related Peptides: From Gene to Therapy* (Vol. 1070, pp. 422-426). <https://doi.org/10.1196/annals.1317.055>

- Minoshima, M., Kikuta, J., Omori, Y., Seno, S., Suehara, R., Maeda, H., Matsuda, H., Ishii, M., & Kikuchi, K. (2019). *In Vivo* Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed the Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps. *Acs Central Science*, 5(6), 1059-1066. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00220>
- Mishra, S., Srinivasan, S., Ma, C., & Zhang, N. (2021). CD8⁺ Regulatory T Cell - A Mystery to Be Revealed [Review]. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708874>
- Miyamoto, H., Suzuki, T., Miyauchi, Y., Iwasaki, R., Kobayashi, T., Sato, Y., Miyamoto, K., Hoshi, H., Hashimoto, K., Yoshida, S., Hao, W., Mori, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Morioka, H., Matsumoto, M., Chiba, K., Takeya, M.,...Miyamoto, T. (2012). Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(6), 1289-1297. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1575>
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M. D., & Coy, D. H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(1), 567-574. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91757-9)
- Mizoguchi, T., & Ono, N. (2021). The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 36(8), 1432-1447. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4410>
- Mohammad Nezhady, M. A., Rivera, J. C., & Chemtob, S. (2020). Location Bias as Emerging Paradigm in GPCR Biology and Drug Discovery. *iScience*, 23(10), 101643. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101643>
- Moore, C. A., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 69, 451-482. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712>
- Morell, M., Varela, N., & Maranon, C. (2017). Myeloid Populations in Systemic Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 53(2), 198-218. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8606-7>
- Moriishi, T., Fukuyama, R., Ito, M., Miyazaki, T., Maeno, T., Kawai, Y., Komori, H., & Komori, T. (2012). Osteocyte Network; a Negative Regulatory System for Bone Mass Augmented by the Induction of Rankl in Osteoblasts and Sost in Osteocytes at Unloading. *Plos One*, 7(6), 20, Article e40143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040143>
- Moriishi, T., Ozasa, R., Ishimoto, T., Nakano, T., Hasegawa, T., Miyazaki, T., Liu, W., Fukuyama, R., Wang, Y., Komori, H., Qin, X., Amizuka, N., & Komori, T. (2020). Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet*, 16(5), e1008586. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008586>
- Mrak, E., Villa, I., Lanzi, R., Losa, M., Guidobono, F., & Rubinacci, A. (2007). Growth hormone stimulates osteoprotegerin expression and secretion in human osteoblast-like cells. *Journal of Endocrinology*, 192(3), 639-645. <https://doi.org/10.1677/joe.1.07073>
- Mukohyama, H., Ransjo, M., Taniguchi, H., Ohyama, T., & Lerner, U. H. (2000). The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem Biophys Res Commun*, 271(1), 158-163. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2599>
- Muschter, D., Schaefer, N., Stangl, H., Straub, R. H., & Graessel, S. (2015). Sympathetic Neurotransmitters Modulate Osteoclastogenesis and Osteoclast Activity in the Context of Collagen-Induced Arthritis. *Plos One*, 10(10), Article e0139726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139726>
- Nagai, T., Hasegawa, T., Yimin, Yamamoto, T., Hongo, H., Abe, M., Yoshida, T., Yokoyama, A., de Freitas, P. H. L., Li, M., Yokoyama, A., & Amizuka, N. (2021). Immunocytochemical

- assessment of cell differentiation of podoplanin-positive osteoblasts into osteocytes in murine bone. *Histochem Cell Biol*, 155(3), 369-380. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01937-y>
- Nagata, Y., Miyagawa, K., Ohata, Y., Petrusca, D. N., Pagnotti, G. M., Mohammad, K. S., Guise, T. A., Windle, J. J., Roodman, G. D., & Kurihara, N. (2021). Increased S1P expression in osteoclasts enhances bone formation in an animal model of Paget's disease. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(3-4), 335-348. <https://doi.org/10.1002/jcb.29861>
- Nahian, A., & Davis, D. D. (2025). Histology, Osteoprogenitor Cells. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32644586>
- Nakamura, I., Pilkington, M. F., Lakkakorpi, P. T., Lipfert, L., Sims, S. M., Dixon, S. J., Rodan, G. A., & Duong, L. T. (1999). Role of $\alpha\beta 3$ integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *Journal of Cell Science*(22). <Go to ISI>://WOS:000084155100015
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q., Bonewald, L. F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E. F., Penninger, J. M., & Takayanagi, H. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17(10), 1231-1234. <https://doi.org/10.1038/nm.2452>
- Negishi-Koga, T., Shinohara, M., Komatsu, N., Bito, H., Kodama, T., Friedel, R. H., & Takayanagi, H. (2011). Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature Medicine*, 17(11), 1473-1478. <https://doi.org/10.1038/nm.2489>
- Neumann, J. M., Couvineau, A., Murail, S., Lacapere, J. J., Jamin, N., & Laburthe, M. (2008). Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends Biochem Sci*, 33(7), 314-319. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.05.001>
- Nicole, P., Lins, L., Rouyer-Fessard, C., Drouot, C., Fulcrand, P., Thomas, A., Couvineau, A., Martinez, J., Brasseur, R., & Laburthe, M. (2000a). Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC₁ and VPAC₂ receptors and development of a highly selective VPAC₁ receptor agonist -: Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24003-24012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002325200>
- Nicole, P., Rouyer-Fessard, C., Couvineau, A., Drouot, C., Fulcrand, P., Martinez, J., & Laburthe, M. (2000b). Alanine scanning of VIP -: Structure-function relationship for binding to human recombinant VPAC₁ receptor. In J. Fahrenkrug & S. I. Said (Eds.), *Vip, Pacap, Glucagon, and Related Peptides* (Vol. 921, pp. 352-356).
- Noble, B. S., Peet, N., Stevens, H. Y., Brabbs, A., Mosley, J. R., Reilly, G. C., Reeve, J., Skerry, T. M., & Lanyon, L. E. (2003). Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 284(4), C934-C943. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00234.2002>
- Novack, D. V., & Faccio, R. (2011). Osteoclast motility: Putting the brakes on bone resorption [Review]. *Ageing Research Reviews*(1). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.09.005>
- Novack, D. V., & Teitelbaum, S. L. (2008). The osteoclast: Friend or foe? [Review; Book Chapter]. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*, 3, 457-484. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151431>
- Nunes, A. F., Liz, M. A., Franquinho, F., Teixeira, L., Sousa, V., Chenu, C., Lamghari, M., & Sousa, M. M. (2010). Neuropeptide Y expression and function during osteoblast differentiation--insights from transthyretin knockout mice. *FEBS J*, 277(1), 263-275. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07482.x>

- Nussbaum, J. C., Van Dyken, S. J., von Moltke, J., Cheng, L. E., Mohapatra, A., Molofsky, A. B., Thornton, E. E., Krummel, M. F., Chawla, A., Liang, H. E., & Locksley, R. M. (2013). Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*, *502*(7470), 245-248. <https://doi.org/10.1038/nature12526>
- Nyman, J. S., Lynch, C. C., Perrien, D. S., Thiolloy, S., O'Quinn, E. C., Patil, C. A., Bi, X., Pharr, G. M., Mahadevan-Jansen, A., & Mundy, G. R. (2011). Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *J Bone Miner Res*, *26*(6), 1252-1260. <https://doi.org/10.1002/jbmr.326>
- O'Brien, C. A., Nakashima, T., & Takayanagi, H. (2013). Osteocyte control of osteoclastogenesis [Review]. *Bone*, *54*(2), 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.08.121>
- Odorisio, M. S., Odorisio, T. M., Cataland, S., & Balcerzak, S. P. (1980). VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE AS A BIOCHEMICAL MARKER FOR POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *96*(4), 666-672. <Go to ISI>://WOS:A1980KK79000010
- Ohizumi, I., Harada, N., Taniguchi, K., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Kaiho, S., & Mayumi, T. (2000). Association of CD44 with OTS-8 in tumor vascular endothelial cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, *1497*(2), 197-203. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(00\)00063-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(00)00063-x)
- Ogori, F., Kitaura, H., Marahleh, A., Kishikawa, A., Ogawa, S., Qi, J., Shen, W. R., Noguchi, T., Nara, Y., & Mizoguchi, I. (2019). Effect of TNF- α -Induced Sclerostin on Osteocytes during Orthodontic Tooth Movement. *J Immunol Res*, *2019*, 9716758. <https://doi.org/10.1155/2019/9716758>
- Ono, T., & Nakashima, T. (2018). Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol*, *149*(4), 325-341. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1636-2>
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease [Review]. *Genes & Development*, *16*(12), 1446-1465. <https://doi.org/10.1101/gad.990702>
- Ostrowski, M. C. (2010). A new role for OPG: putting RANKL in its place. *J Bone Miner Res*, *25*(9), 1905-1906. <https://doi.org/10.1002/jbmr.206>
- Oya, K., Ishida, K., Nishida, T., Sato, S., Kishino, M., Hirose, K., Ogawa, Y., Ikebe, K., Takeshige, F., Yasuda, H., Komori, T., & Toyosawa, S. (2017). Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization. *Histochem Cell Biol*, *147*(3), 341-351. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1490-z>
- Paniagua, R. T., Chang, A., Mariano, M. M., Stein, E. A., Wang, Q., Lindstrom, T. M., Sharpe, O., Roscow, C., Ho, P. P., Lee, D. M., & Robinson, W. H. (2010). c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis Research & Therapy*(1). <https://doi.org/10.1186/ar2940>
- Parkinson, I. H., & Fazzalari, N. L. (2013). Characterisation of Trabecular Bone Structure. In M. J. Silva (Ed.), *Skeletal Aging and Osteoporosis: Biomechanics and Mechanobiology* (pp. 31-51). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/8415_2011_113
- Partridge, N. C., Jeffrey, J. J., Ehlich, L. S., Teitelbaum, S. L., Fliszar, C., Welgus, H. G., & Kahn, A. J. (1987). HORMONAL-REGULATION OF THE PRODUCTION OF COLLAGENASE AND A COLLAGENASE INHIBITOR ACTIVITY BY RAT OSTEOGENIC-SARCOMA CELLS. *Endocrinology*, *120*(5), 1956-1962. <https://doi.org/10.1210/endo-120-5-1956>

- Pascal, M., Kazakov, A., Chevalier, G., Dubrule, L., Deyrat, J., Dupin, A., Saha, S., Jagot, F., Sailor, K., Dulauroy, S., Moigneu, C., Belkaid, Y., Lepousez, G., Lledo, P. M., Wilhelm, C., & Eberl, G. (2022). The neuropeptide VIP potentiates intestinal innate type 2 and type 3 immunity in response to feeding. *Mucosal Immunol*, 15(4), 629–641. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00516-9>
- Pawlina, W., & Ross, M. H. (2024). *Histología : texto y atlas correlación con biología molecular y celular* (9 edición ed.). Wolters Kluwer.
- Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J. J., Khosla, S., & Oursler, M. J. (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20764–20769. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805133106>
- Pei, B., Teng, Y., Dong, D., & Liu, L. (2025). OPG/RANK/RANKL Single-Nucleotide Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis: Associations with Disease Susceptibility, Bone Mineral Density, and Clinical Manifestations in a Chinese Han Population. *Int J Gen Med*, 18, 815–824. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S506743>
- Pérez-García, S., Calamia, V., Hermida-Gomez, T., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Villanueva-Romero, R., Castro, D., Martínez, C., Juarranz, Y., Blanco, F. J., & Gomariz, R. P. (2021). Proteomic Analysis of Synovial Fibroblasts and Articular Chondrocytes Co-Cultures Reveals Valuable VIP-Modulated Inflammatory and Degradative Proteins in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126441>
- Pérez-García, S., Gutierrez-Cañas, I., Seoane, I. V., Fernandez, J., Mellado, M., Leceta, J., Tio, L., Villanueva-Romero, R., Juarranz, Y., & Gomariz, R. P. (2016). Healthy and Osteoarthritic Synovial Fibroblasts Produce a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 4, 5, 7, and 12 Induction by IL-1 β and Fibronectin and Contribution to Cartilage Damage. *American Journal of Pathology*, 186(9), 2449–2461. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.05.017>
- Persson, E., & Lerner, U. H. (2011). The Neuropeptide VIP Regulates the Expression of Osteoclastogenic Factors in Osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(12), 3732–3741. <https://doi.org/10.1002/jcb.23304>
- Pettit, A. R., Chang, M. K., Hume, D. A., & Raggatt, L.-J. (2008). Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics [Review]. *Bone*, 43(6), 976–982. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.128>
- Piper, S. J., Deganutti, G., Lu, J., Zhao, P., Liang, Y. L., Lu, Y., Fletcher, M. M., Hossain, M. A., Christopoulos, A., Reynolds, C. A., Danev, R., Sexton, P. M., & Wootten, D. (2022). Understanding VPAC receptor family peptide binding and selectivity. *Nat Commun*, 13(1), 7013. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34629-3>
- Playford, M. P., Bicknell, D., Bodmer, W. F., & Macaulay, V. M. (2000). Insulin-like growth factor I regulates the location, stability, and transcriptional activity of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12103–12108. <https://doi.org/10.1073/pnas.210394297>
- Plotkin, L. I., & Bellido, T. (2016). Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility [Review]. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(10), 593–605. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.71>

- Prieto, J. C., Laburthe, M., & Rosselin, G. (1979). Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 1. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites. *Eur J Biochem*, 96(2), 229-237. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13033.x>
- Qu, H., Zhuang, Y., Zhu, L., Zhao, Z., & Wang, K. (2021). The effects of vasoactive intestinal peptide on RANKL-induced osteoclast formation. *Ann Transl Med*, 9(2), 127. <https://doi.org/10.21037/atm-20-7607>
- Quarles, L. D. (2003). FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization [Review]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(1), E1-E9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00016.2003>
- Quilhac, A., & de Buffrénil, V. (2021). Bone Tissue Types: A Brief Account of Currently Used Categories. In *Vertebrate Skeletal Histology and Paleohistology* (pp. 147-190). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351189590-8>
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, 285(33), 25103-25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
- Ranke, M. B., & Wit, J. M. (2018). Growth hormone - past, present and future [Review]. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(5), 285-300. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.22>
- Ransjö, M., Lie, A., Mukohyama, H., Lundberg, P., & Lerner, U. H. (2000). Microisolated mouse osteoclasts express VIP-1 and PACAP receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(2), 400-404. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3151>
- Ribet, A. B. P., Ng, P. Y., & Pavlos, N. J. (2021). Membrane Transport Proteins in Osteoclasts: The Ins and Outs [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, Article 644986. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.644986>
- Richards, J. S., Ren, Y. A., Candelaria, N., Adams, J. E., & Rajkovic, A. (2018). Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update [Review]. *Endocrine Reviews*, 39(1), 1-20. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00164>
- Rifkin, D. B. (2005). Latent transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteins:: Orchestrators of TGF- β availability [Review]. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7409-7412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400029200>
- Robling, A. G., & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol*, 82, 485-506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>
- Rodriguez-Sosa, M. R., Del Castillo, L. M., Belarra, A., Zapata, A. G., & Alfaro, D. (2024). The lack of EphB3 receptor prevents bone loss in mouse models of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 39(7), 1008-1024. <https://doi.org/10.1093/jbmr/zjae075>
- Romanello, M., Moro, L., Pirulli, D., Crovella, S., & D'Andrea, P. (2001). Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*(5). <Go to ISI>://WOS:000168434700012
- Ru, J.-y., & Wang, Y.-f. (2020). Osteocyte apoptosis: the roles and key molecular mechanisms in resorption-related bone diseases [Review]. *Cell Death & Disease*, 11(10), Article 846. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03059-8>
- Ryu, J., Kim, H. J., Chang, E. J., Huang, H., Banno, Y., & Kim, H. H. (2006). Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *Embo Journal*, 25(24), 5840-5851. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601430>
- S.E.R. (2014). *Manual SER de enfermedades reumáticas* (E. España, Ed. 6 ed.).

- Sabokbar, A., Mahoney, D. J., Hemingway, F., & Athanasou, N. A. (2016). Non-Canonical (RANKL-Independent) Pathways of Osteoclast Differentiation and Their Role in Musculoskeletal Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 51(1), 16–26. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8523-6>
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J. D., Schu, P., & von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13453–13458. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13453>
- Said, S. I., & Mutt, V. (1969). A peptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 107, 51–56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5375727>
- Said, S. I., & Mutt, V. (1970). POLYPEPTIDE WITH BROAD BIOLOGICAL ACTIVITY - ISOLATION FROM SMALL INTESTINE. *Science*, 169(3951), 1217–8. <https://doi.org/10.1126/science.169.3951.1217>
- Said, S. I., & Rosenberg, R. N. (1976). VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE - ABUNDANT IMMUNOREACTIVITY IN NEURAL CELL LINES AND NORMAL NERVOUS-TISSUE. *Science*, 192(4242), 907–908. <https://doi.org/10.1126/science.1273576>
- Salnikova, D. I., Nikiforov, N. G., Postnov, A. Y., & Orekhov, A. N. (2024). Target Role of Monocytes as Key Cells of Innate Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Diseases*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/diseases12050081>
- Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikko, K., & Vaananen, H. K. (1997). Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*, 276(5310), 270–273. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.270>
- Sanlioglu, A. D., Karacay, B., Balci, M. K., Griffith, T. S., & Sanlioglu, S. (2012). Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol*, 49(3), R157–167. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0156>
- Sato, C., Iwasaki, T., Kitano, S., Tsunemi, S., & Sano, H. (2012). Sphingosine 1-phosphate receptor activation enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(1), 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.130>
- Schrader, J. W., Moyer, C., Ziltener, H. J., & Reinisch, C. L. (1991). RELEASE OF THE CYTOKINES COLONY-STIMULATING FACTOR-I, GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR, AND IL-6 BY CLONED MURINE VASCULAR SMOOTH-MUSCLE CELLS. *Journal of Immunology*, 146(11), 3799–3808. <Go to ISI>://WOS:A1991FN05400018
- Seaborn, T., Masmoudi-Kouli, O., Fournier, A., Vaudry, H., & Vaudry, D. (2011). Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Against Apoptosis [Review]. *Current Pharmaceutical Design*, 17(3), 204–214. <https://doi.org/10.2174/138161211795049679>
- Semënov, M., Tamai, K., & Xi, H. (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 26770–26775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504308200>
- Seoane, I. V., Martinez, C., Garcia-Vicuna, R., Ortiz, A. M., Juarranz, Y., Talayero, V. C., Gonzalez-Alvaro, I., Gomariz, R. P., & Lamana, A. (2018). Vasoactive intestinal peptide gene polymorphisms, associated with its serum levels, predict treatment requirements in early rheumatoid arthritis. *Sci Rep*, 8(1), 2035. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20400-6>
- Seoane, I. V., Ortiz, A. M., Piris, L., Lamana, A., Juarranz, Y., García-Vicuña, R., González-Álvaro, I., Gomariz, R. P., & Martínez, C. (2016). Clinical Relevance of VPAC1 Receptor Expression in Early Arthritis: Association with IL-6 and Disease Activity. *Plos One*, 11(2), e0149141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149141>

- Seoane, I. V., Tomero, E., Martínez, C., García-Vicuña, R., Juarranz, Y., Lamana, A., Ocon, E., Ortiz, A. M., Gomez-Leon, N., González-Álvarez, I., & Gomariz, R. P. (2015). Vasoactive Intestinal Peptide in Early Spondyloarthritis: Low Serum Levels as a Potential Biomarker for Disease Severity. *J Mol Neurosci*, *56*(3), 577-584. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0517-6>
- Sexton, P. M., Morfís, M., Tilakaratne, N., Hay, D. L., Udawela, M., Christopoulos, G., & Christopoulos, A. (2006). Complexing receptor pharmacology: modulation of family B G protein-coupled receptor function by RAMPs. *Ann N Y Acad Sci*, *1070*, 90-104. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.076>
- Sexton, P. M., Poyner, D. R., Simms, J., Christopoulos, A., & Hay, D. L. (2009). Modulating receptor function through RAMPs: can they represent drug targets in themselves? [Review]. *Drug Discovery Today*, *14*(7-8), 413-419. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.12.009>
- Shandala, T., Ng, Y. S., Hopwood, B., Yip, Y. C., Foster, B. K., & Xian, C. J. (2012). The role of osteocyte apoptosis in cancer chemotherapy-induced bone loss. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(7), 2889-2897. <https://doi.org/10.1002/jcp.23034>
- Sherr, C. J. (1990). COLONY-STIMULATING FACTOR-1 RECEPTOR [Review]. *Blood*, *75*(1), 1-12. <Go to ISI>://WOS:A1990CF66400001
- Sherr, C. J., Rettenmier, C. W., Sacca, R., Rousell, M. F., Look, A. T., & Stanley, E. R. (1985). The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell*, *41*(3), 665-676. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80047-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80047-7)
- Sherwood, N. M., Krueckl, S. L., & McRory, J. E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily [Review]. *Endocrine Reviews*, *21*(6), 619-670. <https://doi.org/10.1210/er.21.6.619>
- Shi, L., Feng, L., Zhu, M. L., Yang, Z. M., Wu, T. Y., Xu, J., Liu, Y., Lin, W. P., Lo, J. H. T., Zhang, J. F., & Li, G. (2020). Vasoactive Intestinal Peptide Stimulates Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells Osteogenesis Differentiation by Activating Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway and Promotes Rat Skull Defect Repair. *Stem Cells Dev*, *29*(10), 655-666. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0148>
- Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., & Yamashita, T. (2001). Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(11), 6500-6505. <https://doi.org/10.1073/pnas.101545198>
- Shu, R., Bai, D., Sheu, T., He, Y., Yang, X., Xue, C., He, Y., Zhao, M., & Han, X. (2017). Sclerostin Promotes Bone Remodeling in the Process of Tooth Movement. *Plos One*, *12*(1), e0167312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167312>
- Simmonds, M. C., Brown, J. V. E., Heirs, M. K., Higgins, J. P. T., Mannion, R. J., Rodgers, M. A., & Stewart, L. A. (2013). Safety and Effectiveness of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Spinal Fusion A Meta-analysis of Individual-Participant Data [Review]. *Annals of Internal Medicine*, *158*(12), 877-+. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-12-201306180-00005>
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N.,...Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, *89*(2), 309-319. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80209-3)
- Sims, N. A., & Chia, L. Y. (2012). Regulation of Sclerostin Expression by Paracrine and Endocrine Factors. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, *10*(2), 98-107. <https://doi.org/10.1007/s12018-011-9121-7>

- Sipp, D., Robey, P. G., & Turner, L. (2018). Clear up this stem-cell mess [Editorial Material]. *Nature*, 561(7724), 455-457. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-06756-9>
- Skupien, A., Konopka, A., Trzaskoma, P., Labus, J., Gorlewicz, A., Swiech, L., Babraj, M., Dolezyczek, H., Figiel, I., Ponimaskin, E., Wlodarczyk, J., Jaworski, J., Wilczynski, G. M., & Dzwonek, J. (2014). CD44 regulates dendrite morphogenesis through Src tyrosine kinase-dependent positioning of the Golgi. *Journal of Cell Science*, 127(23), 5038-5051. <https://doi.org/10.1242/jcs.154542>
- Smith, D. D., Gowen, M., & Mundy, G. R. (1987). EFFECTS OF INTERFERON-GAMMA AND OTHER CYTOKINES ON COLLAGEN-SYNTHESIS IN FETAL-RAT BONE CULTURES. *Endocrinology*, 120(6), 2494-2499. <https://doi.org/10.1210/endo-120-6-2494>
- Smith, J. S., Lefkowitz, R. J., & Rajagopal, S. (2018). Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov*, 17(4), 243-260. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.229>
- Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V., & Yamamoto, K. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, Article 18001. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>
- Smolen, J. S., Landewe, R. B. M., Bergstra, S. A., Kerschbaumer, A., Sepriano, A., Aletaha, D., Caporali, R., Edwards, C. J., Hyrich, K. L., Pope, J. E., de Souza, S., Stamm, T. A., Takeuchi, T., Verschueren, P., Winthrop, K. L., Balsa, A., Bathon, J. M., Buch, M. H., Burmester, G. R.,...van der Heijde, D. (2023). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update [Review]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 82(1), 3-18. <https://doi.org/10.1136/ard-2022-223356>
- Sohn, W., Lee, O. Y., Lee, S. P., Lee, K. N., Jun, D. W., Lee, H. L., Yoon, B. C., Choi, H. S., Sim, J., & Jang, K. S. (2014). Mast cell number, substance P and vasoactive intestinal peptide in irritable bowel syndrome with diarrhea. *Scand J Gastroenterol*, 49(1), 43-51. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.857712>
- Sonowal, H., Kumar, A., Bhattacharyya, J., Gogoi, P. K., & Jaganathan, B. G. (2013). Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *Journal of Biomedical Science*. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-71>
- Sorensen, A. S., Andersen, M. N., Juul-Madsen, K., Brokso, A. D., Skejo, C., Schmidt, H., Vorup-Jensen, T., & Kragstrup, T. W. (2022). Tumor necrosis factor alpha neutralization attenuates immune checkpoint inhibitor-induced activation of intermediate monocytes in synovial fluid mononuclear cells from patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 24(1), Article 43. <https://doi.org/10.1186/s13075-022-02737-6>
- Spits, H., & Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*, 30, 647-675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075053>
- Staub Olsen, P., Ottesen, B., Bartels, P. D., Nielsen, M. H., Gammeltoft, S., & Fahrenkrug, J. (1982). RECEPTORS FOR VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE ON ISOLATED SYNAPTOSOMES FROM RAT CEREBRAL-CORTEX - HETEROGENEITY OF BINDING AND DESENSITIZATION OF RECEPTORS. *Journal of Neurochemistry*, 39(5), 1242-1251. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb12561.x>
- Steiniche, T., & Hauge, E. M. (2003). Normal Structure and Function of Bone. In Y. H. An & K. L. Martin (Eds.), *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage* (pp. 59-72). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-417-7_3

- Stenbeck, G. (2002). Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol*, 13(4), 285-292. <https://doi.org/10.1016/s1084952102000587>
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T., & Martin, T. J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews*, 20(3), 345-357. <https://doi.org/10.1210/er.20.3.345>
- Suh, W. K., Wang, S. X., Jheon, A. H., Moreno, L., Yoshinaga, S. K., Ganss, B., Sodek, J., Grynpas, M. D., & Mak, T. W. (2004). The immune regulatory protein B7-H3 promotes osteoblast differentiation and bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 12969-12973. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405259101>
- Sun, S., Diggins, N. H., Gunderson, Z. J., Fehrenbacher, J. C., White, F. A., & Kacena, M. A. (2020). No pain, no gain? The effects of pain-promoting neuropeptides and neurotrophins on fracture healing [Review]. *Bone*, 131, Article 115109. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115109>
- Sun, X., Guo, C., Zhao, F., Zhu, J., Xu, Y., Liu, Z.-Q., Yang, G., Zhang, Y.-Y., Gu, X., Xiao, L., Liu, Z., & Yang, P.-C. (2019). Vasoactive intestinal peptide stabilizes intestinal immune homeostasis through maintaining interleukin-10 expression in regulatory B cells. *Theranostics*, 9(10), 2800-2811. <https://doi.org/10.7150/thno.34414>
- Sun, X., Huang, Y., Zhang, Y. L., Qiao, D., & Dai, Y. C. (2020). Research advances of vasoactive intestinal peptide in the pathogenesis of ulcerative colitis by regulating interleukin-10 expression in regulatory B cells. *World J Gastroenterol*, 26(48), 7593-7602. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i48.7593>
- Suzuki, H., Tatei, K., Ohshima, N., Sato, S., & Izumi, T. (2019). Regulation of MC3T3-E1 differentiation by actin cytoskeleton through lipid mediators reflecting the cell differentiation stage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.093>
- Szema, A. M., Forsyth, E., Ying, B., Hamidi, S. A., Chen, J. J., Hwang, S., Li, J. C., Sabatini Dwyer, D., Ramiro-Diaz, J. M., Giermakowska, W., & Gonzalez Bosc, L. V. (2017). NFATc3 and VIP in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Plos One*, 12(1), e0170606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170606>
- Takahashi, M., Hong, Y. M., Yasuda, S., Takano, M., Kawai, K., Nakai, S., & Hirai, Y. (1988). MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR IS PRODUCED BY HUMAN T-LYMPHOBLASTOID CELL-LINE, CEM-ON - IDENTIFICATION BY AMINO-TERMINAL AMINO-ACID SEQUENCE-ANALYSIS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(3), 1401-1409. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80441-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80441-8)
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., & Taniguchi, T. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 3(6), 889-901. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00369-6](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00369-6)
- Takegahara, N., Kim, H., & Choi, Y. (2024). Unraveling the intricacies of osteoclast differentiation and maturation: insight into novel therapeutic strategies for bone-destructive diseases. *Exp Mol Med*, 56(2), 264-272. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01157-7>
- Takegahara, N., Kim, H., Mizuno, H., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Tomura, M., Kanagawa, O., Ishii, M., & Choi, Y. (2016). Involvement of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL)-induced Incomplete Cytokinesis in the Polyploidization of Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3439-3454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677427>
- Takito, J., Inoue, S., & Nakamura, M. (2018). The Sealing Zone in Osteoclasts: A Self-Organized Structure on the Bone. *Int J Mol Sci*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040984>

- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C. M., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P., & He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407(6803), 530-535. <https://doi.org/10.1038/35035117>
- Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., Nagy, T. R., Peng, X., Hu, J., Feng, X., Van Hul, W., Wan, M., & Cao, X. (2009). TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature Medicine*, 15(7), 757-U759. <https://doi.org/10.1038/nm.1979>
- Tasma, Z., Siow, A., Harris, P. W. R., Brimble, M. A., Hay, D. L., & Walker, C. S. (2022). Characterisation of agonist signalling profiles and agonist-dependent antagonism at PACAP-responsive receptors: Implications for drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 179(3), 435-453. <https://doi.org/10.1111/bph.15700>
- Tate, M. L. K., Falls, T. D., McBride, S. H., Atit, R., & Knothe, U. R. (2008). Mechanical modulation of osteochondroprogenitor cell fate [Review]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(12), 2720-2738. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.05.011>
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M. Q., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S., & Ikeda, K. (2007). Targeted ablation of Osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metabolism*, 5(6), 464-475. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.001>
- Teitelbaum, S. L. (2011). The osteoclast and its unique cytoskeleton. In M. Zaidi (Ed.), *Skeletal Biology and Medicine II: Bone and Cartilage Homeostasis and Bone Disease* (Vol. 1240, pp. 14-17). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06283.x>
- Togari, A., Arai, M., Mizutani, S., Mizutani, S., Koshihara, Y., & Nagatsu, T. (1997). Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neuroscience Letters*, 233(2-3), 125-128. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00649-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00649-6)
- Tonna, S., Takyar, F. M., Vrahnas, C., Crimeen-Irwin, B., Ho, P. W. M., Poulton, I. J., Brennan, H. J., McGregor, N. E., Allan, E. H., Nguyen, H., Forwood, M. R., Tatarczuch, L., Mackie, E. J., Martin, T. J., & Sims, N. A. (2014). EphrinB2 signaling in osteoblasts promotes bone mineralization by preventing apoptosis. *Faseb Journal*, 28(10), 4482-4496. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254300>
- Tresguerres, F. G. F., Torres, J., Lopez-Quiles, J., Hernandez, G., Vega, J. A., & Tresguerres, I. F. (2020). The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Ann Anat*, 227, 151422. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151422>
- Triguero-Martinez, A., Pardines, M., Montes, N., Ortiz, A. M., de la Iglesia-Cedeira, A., Valero-Martinez, C., Martin, J., Gonzalez-Alvaro, I., Castaneda, S., & Lamana, A. (2024). Genetic Variants in RANK and OPG Could Influence Disease Severity and Bone Remodeling in Patients with Early Arthritis. *Life (Basel)*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/life14091109>
- Tsukasaki, M., Asano, T., Muro, R., Huynh, N. C., Komatsu, N., Okamoto, K., Nakano, K., Okamura, T., Nitta, T., & Takayanagi, H. (2020). OPG Production Matters Where It Happened. *Cell Rep*, 32(10), 108124. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108124>
- Twine, N. A., Chen, L., Pang, C. N., Wilkins, M. R., & Kassem, M. (2014). Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone*, 67, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.027>

- Tzelepi, V., Tsamandas, A. C., Zolota, V., & Scopa, C. D. (2009). Bone Anatomy, Physiology and Function. In D. Kardamakis, V. Vassiliou, & E. Chow (Eds.), *Bone Metastases: A translational and clinical approach* (pp. 3-30). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9819-2_1
- Ubaidus, S., Li, M., Sultana, S., de Freitas, P. H., Oda, K., Maeda, T., Takagi, R., & Amizuka, N. (2009). FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 58(6), 381-392. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfp032>
- Ueland, T. (2005). GH/IGF-I and bone resorption *in vivo* and *in vitro* [Review]. *European Journal of Endocrinology*, 152(3), 327-332. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01874>
- Usdin, T. B., Bonner, T. I., & Mezey, E. (1994). 2 RECEPTORS FOR VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE WITH SIMILAR SPECIFICITY AND COMPLEMENTARY DISTRIBUTIONS. *Endocrinology*, 135(6), 2662-2680. <https://doi.org/10.1210/en.135.6.2662>
- Vacic, V., McCarthy, S., Malhotra, D., Murray, F., Chou, H. H., Peoples, A., Makarov, V., Yoon, S., Bhandari, A., Corominas, R., Iakoucheva, L. M., Krastoshevsky, O., Krause, V., Larach-Walters, V., Welsh, D. K., Craig, D., Kelsoe, J. R., Gershon, E. S., Leal, S. M.,...Sebat, J. (2011). Duplications of the neuropeptide receptor gene *VIPR2* confer significant risk for schizophrenia. *Nature*, 471(7339), 499-503. <https://doi.org/10.1038/nature09884>
- Valdehita, A., Bajo, A. M., Fernandez-Martinez, A. B., Isabel Arenas, M., Vacas, E., Valenzuela, P., Ruiz-Villaespesa, A., Prieto, J. C., & Carmena, M. J. (2010). Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer. *Peptides*, 31(11), 2035-2045. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.07.024>
- van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A. J., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P., & Löwik, C. (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *Journal of Experimental Medicine*, 199(6), 805-814. <https://doi.org/10.1084/jem.20031454>
- van der Helm-van Mil, A. H., Verpoort, K. N., Breedveld, F. C., Huizinga, T. W., Toes, R. E., & de Vries, R. R. (2006). The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(4), 1117-1121. <https://doi.org/10.1002/art.21739>
- Vanleeuwen, M. A., Vanrijswijk, M. H., Vanderheijde, D., Temeerman, G. J., Vanriel, P., Houtman, P. M., Vandeputte, L. B. A., & Limburg, P. C. (1993). THE ACUTE-PHASE RESPONSE IN RELATION TO RADIOGRAPHIC PROGRESSION IN EARLY RHEUMATOID-ARTHRITIS - A PROSPECTIVE-STUDY DURING THE 1ST 3 YEARS OF THE DISEASE. *British Journal of Rheumatology*, 32, 9-13. <Go to ISI>://WOS:A1993LF46400003
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B. K., Hashimoto, H., Galas, L., & Vaudry, H. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*, 61(3), 283-357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D., & Moon, R. T. (2003). A second canon:: Functions and mechanisms of β -catenin-independent wnt signaling [Review]. *Developmental Cell*, 5(3), 367-377. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00266-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00266-1)
- Vega-Benedetti, A. F., Loi, E., Moi, L., Orru, S., Ziranu, P., Pretta, A., Lai, E., Puzzoni, M., Ciccone, L., Casadei-Gardini, A., Cabras, F., Fortunato, F., Restivo, A., Zorcolo, L., Scartozzi, M., & Zavattari, P. (2020). Colorectal Cancer Early Detection in Stool Samples Tracing CpG Islands Methylation Alterations Affecting Gene Expression. *Int J Mol Sci*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124494>

- Verborgt, O., Tatton, N. A., Majeska, R. J., & Schaffler, M. B. (2002). Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(5), 907-914. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.5.907>
- Villanueva-Romero, R., Cabrera-Martín, A., Álvarez-Corrales, E., Carrión, M., Pérez-García, S., Lamana, A., Castro-Vázquez, D., Martínez, C., Gomariz, R. P., Gutiérrez-Cañas, I., & Juarranz, Y. (2022). Human CD4(+)CD45RA(+) T Cells Behavior after In Vitro Activation: Modulatory Role of Vasoactive Intestinal Peptide. *Int J Mol Sci*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042346>
- Villanueva-Romero, R., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., González-Álvaro, I., Rodríguez-Frade, J. M., Mellado, M., Martínez, C., Gomariz, R. P., & Juarranz, Y. (2019). Activation of Th lymphocytes alters pattern expression and cellular location of VIP receptors in healthy donors and early arthritis patients. *Sci Rep*, 9(1), 7383. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43717-2>
- Villanueva-Romero, R., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Pérez-García, S., Seoane, I. V., Martínez, C., Gomariz, R. P., & Juarranz, Y. (2018). The Anti-Inflammatory Mediator, Vasoactive Intestinal Peptide, Modulates the Differentiation and Function of Th Subsets in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*, 2018, 6043710. <https://doi.org/10.1155/2018/6043710>
- Villanueva-Romero, R., Lamana, A., Flores-Santamaría, M., Carrión, M., Pérez-García, S., Triguero-Martínez, A., Tomero, E., Criado, G., Pablos, J. L., González-Álvaro, I., Martínez, C., Juarranz, Y., Gomariz, R. P., & Gutiérrez-Cañas, I. (2020). Comparative Study of Senescent Th Biomarkers in Healthy Donors and Early Arthritis Patients. Analysis of VPAC Receptors and Their Influence. *Cells*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cells9122592>
- Vrahnas, C., Blank, M., Dite, T. A., Tatarczuch, L., Ansari, N., Crimeen-Irwin, B., Nguyen, H., Forwood, M. R., Hu, Y. F., Ikegame, M., Bamberg, K. R., Petibois, C., Mackie, E. J., Tobin, M. J., Smyth, G. K., Oakhill, J. S., Martin, T. J., & Sims, N. A. (2019). Increased autophagy in EphrinB2-deficient osteocytes is associated with elevated secondary mineralization and brittle bone. *Nature Communications*, 10, 16, Article 3436. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11373-9>
- Wagner, E. F. (2002). Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development [; Proceedings Paper]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61, 40-42. https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl_2.ii40
- Walker, D. G. (1973). OSTEOPETROSIS CURED BY TEMPORARY PARABIOSIS. *Science*, 180(4088), 875-875. <https://doi.org/10.1126/science.180.4088.875>
- Wang, H., Du, T., Li, R., Main, R. P., & Yang, H. (2022). Interactive effects of various loading parameters on the fluid dynamics within the lacunar-canalicular system for a single osteocyte. *Bone*, 158, 116367. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116367>
- Wang, Y., Nishida, S., Elalieh, H. Z., Long, R. K., Halloran, B. P., & Bikle, D. D. (2006). Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(9), 1350-1358. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060610>
- Wawrzyniak, A., & Balawender, K. (2022). Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals (Basel)*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/ani12151946>
- Wein, M. N., & Kronenberg, H. M. (2018). Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(8), Article a031237. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031237>
- Wijenayaka, A. R., Kogawa, M., Lim, H. P., Bonewald, L. F., Findlay, D. M., & Atkins, G. J. (2011). Sclerostin Stimulates Osteocyte Support of Osteoclast Activity by a RANKL-Dependent Pathway. *Plos One*, 6(10), 9, Article e25900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025900>

- Wilmot, B., Fry, R., Smeester, L., Musser, E. D., Mill, J., & Nigg, J. T. (2016). Methylomic analysis of salivary DNA in childhood ADHD identifies altered DNA methylation in VIPR2. *J Child Psychol Psychiatry*, 57(2), 152-160. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12457>
- Wolf, A. A., Yanez, A., Barman, P. K., & Goodridge, H. S. (2019). The Ontogeny of Monocyte Subsets [Review]. *Frontiers in Immunology*, 10, Article 1642. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01642>
- Wong, I. P. L., Zengin, A., Herzog, H., & Baldock, P. A. (2008). Central regulation of bone mass [Review]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(5), 452-458. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.08.001>
- Wooten, D., Lindmark, H., Kadmiel, M., Willcockson, H., Caron, K. M., Barwell, J., Drmota, T., & Poyner, D. R. (2013). Receptor activity modifying proteins (RAMPs) interact with the VPAC2 receptor and CRF1 receptors and modulate their function. *Br J Pharmacol*, 168(4), 822-834. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02202.x>
- Wray, V., Kakoschke, C., Nokihara, K., & Naruse, S. (1993). SOLUTION STRUCTURE OF PITUITARY ADENYLATE-CYCLASE ACTIVATING POLYPEPTIDE BY NUCLEAR-MAGNETIC-RESONANCE SPECTROSCOPY. *Biochemistry*, 32(22), 5832-5841. <https://doi.org/10.1021/bi00073a016>
- Wu, J. Q., Jiang, N., & Yu, B. (2020). Mechanisms of action of neuropeptide Y on stem cells and its potential applications in orthopaedic disorders. *World J Stem Cells*, 12(9), 986-1000. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i9.986>
- Wu, M. R., Wu, S. L., Chen, W., & Li, Y. P. (2024). The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease [Review]. *Cell Research*, 34(2), 101-123. <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00918-9>
- Wu, X., Conlin, V. S., Morampudi, V., Ryz, N. R., Nasser, Y., Bhinder, G., Bergstrom, K. S., Yu, H. B., Waterhouse, C. C. M., Buchan, A. M. J., Popescu, O. E., Gibson, W. T., Waschek, J. A., Vallance, B. A., & Jacobson, K. (2015). Vasoactive Intestinal Polypeptide Promotes Intestinal Barrier Homeostasis and Protection Against Colitis in Mice. *Plos One*, 10(5), Article e0125225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125225>
- Wu, Y., Liu, J., Feng, X., Yang, P., Xu, X., Hsu, H. C., & Mountz, J. D. (2005). Synovial fibroblasts promote osteoclast formation by RANKL in a novel model of spontaneous erosive arthritis. *Arthritis Rheum*, 52(10), 3257-3268. <https://doi.org/10.1002/art.21354>
- Wuthier, R. E. (1975). Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 409(1), 128-143. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(75\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(75)90087-9)
- Xiao, J., Yu, W., Wang, X., Wang, B., Chen, J., Liu, Y., & Li, Z. (2016). Correlation between neuropeptide distribution, cancellous bone microstructure and joint pain in postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *Neuropeptides*, 56, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.12.006>
- Xiong, J., Onal, M., Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Manolagas, S. C., & O'Brien, C. A. (2011). Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*, 17(10), 1235-1241. <https://doi.org/10.1038/nm.2448>
- Yagi, M., Miyamoto, T., Sawatani, Y., Iwamoto, K., Hosogane, N., Fujita, N., Morita, K., Ninomiya, K., Suzuki, T., Miyamoto, K., Oike, Y., Takeya, M., Toyama, Y., & Suda, T. (2005). DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *Journal of Experimental Medicine*, 202(3), 345-351. <https://doi.org/10.1084/jem.20050645>

- Yamashita, T., Yao, Z. Q., Li, F., Zhang, Q., Badell, I. R., Schwarz, E. M., Takeshita, S., Wagner, E. F., Noda, M., Matsuo, K., Xing, L. P., & Boyce, B. F. (2007). NF- κ B p50 and p52 regulate receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18245-18253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610701200>
- Yang, C. M., Chien, C. S., Yao, C. C., Hsiao, L. D., Huang, Y. C., & Wu, C. B. (2004). Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22158-22165. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401343200>
- Yang, L., Wang, J., Gong, X., Fan, Q., Yang, X., Cui, Y., Gao, X., Li, L., Sun, X., Li, Y., & Wang, Y. (2021). Emerging Roles for LGR4 in Organ Development, Energy Metabolism and Carcinogenesis. *Front Genet*, 12, 728827. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728827>
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., & Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3597-3602. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3597>
- Yoo, Y. M., Kwag, J. H., Kim, K. H., & Kim, C. H. (2014). Effects of neuropeptides and mechanical loading on bone cell resorption in vitro. *Int J Mol Sci*, 15(4), 5874-5883. <https://doi.org/10.3390/ijms15045874>
- Youtten, S. E., Kemp, J. P., Logan, J. G., Ghirardello, E. J., Sergio, C. M., Dack, M. R. G., Guilfoyle, S. E., Leitch, V. D., Butterfield, N. C., Komla-Ebri, D., Chai, R. C., Corr, A. P., Smith, J. T., Mohanty, S. T., Morris, J. A., McDonald, M. M., Quinn, J. M. W., McGlade, A. R., Bartonicek, N.,...Croucher, P. I. (2021). Osteocyte transcriptome mapping identifies a molecular landscape controlling skeletal homeostasis and susceptibility to skeletal disease. *Nature Communications*, 12(1), 21, Article 2444. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22517-1>
- Yu, H. B., Yang, H., Allaire, J. M., Ma, C., Graef, F. A., Mortha, A., Liang, Q., Bosman, E. S., Reid, G. S., Waschek, J. A., Osborne, L. C., Sokol, H., Vallance, B. A., & Jacobson, K. (2021). Vasoactive intestinal peptide promotes host defense against enteric pathogens by modulating the recruitment of group 3 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.2106634118>
- Yu, R., Liu, H., Peng, X., Cui, Y., Song, S., Wang, L., Zhang, H., Hong, A., & Zhou, T. (2017). The palmitoylation of the N-terminal extracellular Cys37 mediates the nuclear translocation of VPAC1 contributing to its anti-apoptotic activity. *Oncotarget*, 8(26), 42728-42741. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17449>
- Yuan, B., Takaiwa, M., Clemens, T. L., Feng, J. Q., Kumar, R., Rowe, P. S., Xie, Y. X., & Drezner, M. K. (2008). Aberrant *Phex* function in osteoblasts and osteocytes alone underlies murine X-linked hypophosphatemia. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 722-734. <https://doi.org/10.1172/jci32702>
- Yusta, B., Holland, D., Waschek, J. A., & Drucker, D. J. (2012). Intestinal trophic glucagon-like peptide-2 (GLP-2) activates intestinal gene expression and growth factor-dependent pathways independent of the vasoactive intestinal peptide gene in mice. *Endocrinology*, 153(6), 2623-2632. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1069>

- Zeng, H. T., Zhao, M., Yang, S. B., Huang, H., Geng, X. R., Liu, J. Q., Yang, G., Li, D. C., Yang, L. T., Zheng, P. Y., & Yang, P. C. (2019). Vasoactive intestinal peptide alleviates food allergy via restoring regulatory B cell functions. *Immunobiology*, 224(6), 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.08.006>
- Zhang, Y., Hu, L., Ren, G., Zeng, Y., Zhao, X., & Zhong, C. (2023). Distinct regulatory machineries underlying divergent chromatin landscapes distinguish innate lymphoid cells from T helper cells. *Front Immunol*, 14, 1271879. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1271879>
- Zhang, Y. H., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A., & Abu-Amer, Y. (2001). Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem*, 276(1), 563–568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008198200>
- Zhang, Y. Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). POSITIONAL CLONING OF THE MOUSE OBESE GENE AND ITS HUMAN HOMOLOG. *Nature*, 372(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., Suda, T., & Matsuo, K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metabolism*, 4(2), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.012>
- Zhao, S., Kato, Y., Zhang, Y., Harris, S., Ahuja, S. S., & Bonewald, L. F. (2002). MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(11), 2068–2079. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.11.2068>
- Zhao, W. G., Byrne, M. H., Wang, Y. M., & Krane, S. M. (2000). Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure of collagenase cleavage of collagen. *Journal of Clinical Investigation*, 106(8), 941–949. <https://doi.org/10.1172/jci10158>
- Zhu, J. (2018). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10), Article a030338. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030338>
- Zou, W., Kitaura, H., Reeve, J., Long, F., Tybulewicz, V. L. J., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H., Ross, F. P., & Teitelbaum, S. L. (2007). Syk, c-Src, the $\alpha\beta3$ integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *Journal of Cell Biology*, 176(6), 877–888. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611083>

Otros artículos publicados

Carrión, M., Ramos-Levi, A. M., Seoane, I. V., Martínez-Hernández, R., Serrano-Somavilla, A., **Castro, D.**, Juarranz, Y., González-Álvaro, I., Gomariz, R. P., & Marazuela, M. (2020). Vasoactive intestinal peptide axis is dysfunctional in patients with Graves' disease. *Sci Rep*, 10(1), 13018. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70138-3>

Lamana, A., **Castro-Vázquez, D.**, de la Fuente, H., Triguero-Martínez, A., Martínez-Hernández, R., Revenga, M., Villanueva-Romero, R., Llamas-Velasco, M., Chicharro, P., Juarranz, Y., Marazuela, M., Sales-Sanz, M., Garcia-Vicuna, R., Tomero, E., González-Álvaro, I., Martínez, C., & Gomariz, R. P. (2022). VIP/VPAC Axis Expression in Immune-Mediated Inflammatory Disorders: Associated miRNA Signatures. *Int J Mol Sci*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158578>

Martínez, C., Juarranz, Y., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Pérez-García, S., Villanueva-Romero, R., **Castro, D.**, Lamana, A., Mellado, M., González-Álvaro, I., & Gomariz, R. P. (2020). A Clinical Approach for the Use of VIP Axis in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*, 21(1), 41. <https://doi.org/10.3390/ijms21010065>

Pérez-García, S., Calamia, V., Hermida-Gómez, T., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Villanueva-Romero, R., **Castro, D.**, Martínez, C., Juarranz, Y., Blanco, F. J., & Gomariz, R. P. (2021). Proteomic Analysis of Synovial Fibroblasts and Articular Chondrocytes Co-Cultures Reveals Valuable VIP-Modulated Inflammatory and Degradative Proteins in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126441>

Pérez-García, S., Carrión, M., Gutiérrez-Cañas, I., Villanueva-Romero, R., **Castro, D.**, Martínez, C., González-Álvaro, I., Blanco, F. J., Juarranz, Y., & Gomariz, R. P. (2019). Profile of Matrix-Remodeling Proteinases in Osteoarthritis: Impact of Fibronectin. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010040>

Villanueva-Romero, R., Cabrera-Martín, A., Álvarez-Corrales, E., Carrión, M., Pérez-García, S., Lamana, A., **Castro-Vázquez, D.**, Martínez, C., Gomariz, R. P., Gutiérrez-Cañas, I., & Juarranz, Y. (2022). Human CD4(+)CD45RA(+) T Cells Behavior after In Vitro Activation: Modulatory Role of Vasoactive Intestinal Peptide. *Int J Mol Sci*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042346>

