Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Original

Impacto de la PTHrP en la proliferación y polarización de macrófagos RAW 264.7

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

Laboratorio de Fisiopatología Ósea. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA)-Nemesio Díez. Alcorcón, Madrid. Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. CEU Universities. Alcorcón, Madrid

Resumen

Introducción: el hueso, un tejido conectivo mineralizado, está en constante remodelación gracias a la acción de los osteoclastos (resorción ósea) y los osteoblastos (formación ósea) en un proceso regulado por osteocitos, que actúan como mecanosensores. Además, el sistema inmune juega un papel esencial en la regeneración ósea, destacando la importancia de la interacción entre las células óseas y las células inmunitarias. En particular, los macrófagos pueden polarizarse hacia un fenotipo proinflamatorio M1 o antiinflamatorio o regenerativo M2, siendo estos relevantes en la reparación de tejidos.

Material y métodos: en este contexto, se ha observado que la PTHrP actúa como una citoquina que regula la proliferación y diferenciación celular, especialmente en células involucradas en la regulación ósea. En este estudio, se ha investigado como la PTHrP (1-37) afecta a la proliferación y polarización de los macrófagos RAW 264.7 hacia un fenotipo M1 o M2, así como su impacto en la expresión del receptor PTH1R y en marcadores osteoclásticos.

Resultados y conclusión: los resultados muestran que PTHrP no modifica la proliferación ni la polarización de los macrófagos, pero reduce la expresión de PTH1R en el fenotipo M2 y la de ciertos marcadores osteoclásticos. Esto sugiere un rol modulador de PTHrP en la capacidad osteoclástica de los precursores, indicando un posible impacto en la remodelación ósea y en la regulación inmune.

Palabras clave:
PTHrP. Macrófagos. Polarización. Proliferación. Osteoclastogénesis. PTH1R.

Recibido: 30/11/2024 • Aceptado: 15/04/2025

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

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Pizarro-Gómez J, Tirado-Cabrera I, Martín-Guerrero E, Heredero-Jiménez S, Gortázar AR, Ardura JA. Impacto de la PTHrP en la proliferación y polarización de macrófagos RAW 264.7. Rev Osteoporos Metab Miner 2025;17(2):66-73

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00068

Correspondencia:
Joan Pizarro-Gómez. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA)-Nemesio Díez. Universidad San Pablo-CEU. Campus Montepríncipe. Alcorcón, Madrid
e-mail: joan.pizarrogomez@usp.ceu.es

INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que presenta cuatro tipos celulares principales: osteoblastos, células de revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos (1). Desempeña funciones muy importantes en el organismo, como la locomoción, el soporte y la protección de los tejidos blandos, la hematopoyesis y el almacenamiento de calcio y fosfato (2). A pesar de su apariencia inerte, el hueso es un tejido dinámico y metabólicamente activo que está constantemente en remodelación, sufriendo resorción ósea por los osteoclastos y formación ósea por los osteoblastos (3). Además, hay evidencias de que los osteocitos actúan como mecanosensores que regulan este proceso (4).

Las células óseas e inmunitarias coexisten en la cavidad de la médula ósea y comparte diversas moléculas reguladoras. Además, el sistema inmunitario desempeña un papel importante en la reparación y regeneración de los tejidos, determinando así la capacidad del tejido óseo para regenerarse. De ahí la importancia de la comunicación de los osteocitos con todo su microambiente óseo, incluyendo monocitos, osteoclastos, precursores osteoblásticos y linfocitos T (5).

Los macrófagos son células inmunitarias que participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos como el desarrollo de órganos, la inflamación aguda y crónica, y la homeostasis y remodelación de tejidos (6). Los macrófagos pueden polarizarse fenotípicamente en función del estímulo recibido en dos grandes grupos: los macrófagos activados de forma clásica (M1), con efectos proinflamatorios; y los macrófagos activados de forma alternativa (M2), con efectos en la regulación inmunitaria y en la remodelación tisular (7-9).

Los macrófagos tipo I (M1) son inducidos principalmente por ligandos de receptores de tipo Toll (TLR) como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), produciendo citoquinas inflamatorias y presentando altos niveles de TNF-α e iNOS (10); mientras que la polarización a macrófagos M2 es inducida por citoquinas como la IL-4 e IL-13, produciendo citoquinas que promueven el anabolismo de los tejidos y presentando altos niveles de CD206 (9,11).

Los osteoclastos son células multinucleadas que derivan de células mononucleares del linaje hematopoyético (monocitos/macrófagos), cuya diferenciación es inducida por diversos factores, entre ellos el factor estimulante de macrófagos (M-CSF), producido por células mesenquimales osteoprogenitoras y osteoblastos (12), y RANKL, secretado por osteoblastos, osteocitos y células estromales (13). La interacción RANK/RANKL estimula la expresión de factores clave en la osteoclastogénesis, como el factor nuclear de células T activadas (NFATc1) y la proteína transmembrana siete expresada por dendrocitos (DC-STAMP). NFATc1, en colaboración con los factores de transcripción PU.1, c-FOS y MITF, regula la expresión de genes específicos de los osteoclastos, como catepsina K y la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), esenciales para la actividad osteoclástica (14). Es importante destacar que macrófagos y osteoclastos comparten un origen común, procediendo ambos de un mismo precursor hematopoyético (15).

La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) es una citoquina con funciones paracrinas y/o autocrinas, entre las que se encuentran el control del desarrollo de tejidos y órganos, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular mediante su interacción con el receptor tipo I de la PTH/PTHrP (PTH1R) (16,17). Se ha demostrado que células involucradas en la regulación ósea como son los osteoprogenitores, osteoblastos, osteocitos, células T y macrófagos expresan PTH1R, por lo que son sensibles a la estimulación con PTHrP (18-20). Aunque el papel del sistema PTHrP/PTH1R en células de la estirpe monocito/macrófago no está esclarecido, la presencia del receptor en estas células (21,22), sugiere un papel en la regulación del sistema inmunitario, pudiendo modular las respuestas inflamatorias, la inflamación y la migración (20).

En numerosos estudios se ha demostrado la importancia de los macrófagos en la reparación tisular y, especialmente en hueso, la polarización M1 y M2 es crucial para la regeneración (6,23). Además, los monocitos son precursores osteoclásticos cruciales para la resorción ósea (24). En base a estos antecedentes, se quiso analizar si PTHrP (1-37) afecta a la proliferación de los macrófagos, a la polarización M1 y M2 de los macrófagos, así como a la expresión del receptor PTH1R y de marcadores osteoclásticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVOS CELULARES

Los macrófagos murinos RAW 264.7 se cultivaron en medio DMEM (41966-029, Gibco) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 unidades/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) en un incubador con humedad al 5 % de CO_2 a 37 °C. Para el ensayo de viabilidad y proliferación, las células RAW 264.7 se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm^2 en placas de cultivos convencionales. Una vez sembradas las células, se realizó de manera simultánea la estimulación con 100 nM del péptido PTHrP (1-37) y con 100 ng/mL de LPS o 20 ng/mL de IL-4. Tras el tratamiento, las células se mantuvieron en cultivo durante 24, 48 y 72 horas. Para el ensayo de expresión génica, las células se sembraron a una densidad de 30.000 células/cm^2 en placas de cultivos convencionales. Las células se mantuvieron en cultivo hasta que estuvieron casi totalmente confluentes, momento en el que se realizó la estimulación durante 24 horas con 100 ng/mL de LPS

o 20 ng/mL de IL-4 para inducir la polarización de los macrófagos a un fenotipo M1 o M2, respectivamente. A continuación, antes de que finalizara la polarización M1 o M2, se llevó a cabo el tratamiento con PTHrP (1-37) (Bachem, Bubendorf, Suiza) a una concentración de 100 nM durante 6 horas, finalizando ambos tratamientos de manera simultánea. Transcurrido ese tiempo, se procedió a realizar la extracción de ARN con trizol (Ambion, Life Technologies).

ENSAYOS DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Transcurridos los periodos de tiempo descritos en el apartado de "Cultivos celulares", se rasparon las células con un *scrapper* y se recogieron en un tubo tanto las células adheridas como las no adheridas y se resuspendieron en medio de cultivo para su posterior tinción con azul de tripano. A continuación, se contó con una cámara de Neubauer el número de células vivas (no son capaces de captar el azul de tripano porque tienen la membrana intacta), obteniendo una curva de proliferación celular.

PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Se llevó a cabo la extracción de ARN total con el método de separación tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. A continuación, se cuantificó la cantidad de ARN obtenido con el NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific), y se llevó a cabo la retrotranscripción (a partir de 2 µg de ARN) para la obtención del ADN complementario (ADNc) utilizando el kit *high capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystem, Grand Island, NY) en un termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se realizó la qPCR en la QuantStudio™ 5 384-Well Block (ThermoFisher Scientific) usando SYBR Premix ex Taq (Takara, Otsu, Japón) y cebadores específicos para *Tnf* (TNF-α), *Nos2* (iNOS), *Mrc1* (CD206), *Pth1r* (PTH1R), *Acp5* (TRAP), *Nfatc1* (NFATc1) y *Tnfrsf11a* (RANK), utilizando como gen constitutivo el *18S* (18S). El protocolo utilizado consistió en una reacción inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C y 15 segundos a 72 °C; a continuación, para obtener la curva de disociación de los cebadores, la temperatura aumentaba a 95 °C, bajaba a 65 °C durante 15 segundos y volvía a subir a 95 °C. Finalmente, la temperatura disminuía a 40 °C durante 30 segundos. Los cambios en la expresión génica se han representado como niveles de expresión del gen diana respecto a su control. Para ello, se empleó el método de cuantificación relativa comparando los ciclos en los que se produce la amplificación mediante el ΔΔCt (25). Esta metodología considera un 100 % de eficiencia de amplificación durante el qPCR y una misma eficiencia para ambos genes. Las secuencias de los cebadores empleados se muestran en la tabla I.

Tabla I. Cebadores utilizados en la RT-qPCR

Gen	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'
18S	ATGCTCTTAGCTGAGGTGCCCG	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG
Tnf	AGGCACTCCCCCAAAAGATG	TGAGGGTCTGGGCCATAGAA
Nos2	CCTGCTTTGTGCGAAGTGTC	CCCTTTGTGCTGGGAGTCAT
Mrc1	CCACAGCATTGAGGAGTTTG	ACAGCTCATCATTTGGCTCA
Pth1r	TGAAGGACGCTGTGCTCTACTC	AGTAGAGGAAGAAGGTCACGGC
Acp5	CACGAGAGTCCTGCTTGTC	AGTTGGTGTGGGCATACTTC
Nfatc1	TCATCCTGTCCAACACCAAA	TCACCCTGGTGTTCTTCCTC
Rank	GGACAACGGAATCAGATGTGGTC	CCACAGAGATGAAGAGGAGCAG

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos están expresados como las medias ± desviaciones estándar (DE) y los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism versión 9.1.0. Para el análisis de la expresión génica se buscaron diferencias significativas en cada uno de los tratamientos. Estas diferencias se analizaron mediante análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido de la prueba de Mann-Whitney. La $p < 0,05$ se consideró significativa. En el caso del mapa de calor o *heatmap,* se ha aplicado el método lineal en dos etapas de Benjamini, Krieger y Yekutieli para controlar la FDR (tasa de detección de falsos positivos con un *q*-valor menor a 0,1.

RESULTADOS

PROLIFERACIÓN CELULAR

Se quiso comprobar cómo afecta a la proliferación de los macrófagos murinos RAW 264.7 el tratamiento para inducir la polarización hacia un fenotipo M1 o un fenotipo M2, con LPS e IL-4 respectivamente. Utilizando el colorante vital azul de tripano, se observó que el LPS indujo un aumento significativo de la proliferación en comparación con el control; sin embargo, la IL-4 no modificó la proliferación de las células RAW 264.7 (Fig. 1A). También se estudió si el tratamiento con PTHrP (1-37) afectaba a la proliferación celular en sinergia con el LPS y la IL-4. En ausencia de factores de polarización, PTHrP (1-37) no indujo cambios significativos en el número de células vivas que proliferan en el periodo de tiempo estudiado (Fig. 1B). En macrófagos estimulados

con LPS o con IL-4, PTHrP (1-37) no indujo cambios en el número de células vivas en comparación con su estímulo con LPS e IL-4, respectivamente (Fig. 1 C y D).

EFECTO DE PTHrP (1-37) EN LA POLARIZACIÓN M1 Y M2

Se verificó que el LPS y la IL-4 indujeran una polarización a un fenotipo M1 y M2 en las células RAW 264.7, respectivamente. El tratamiento con LPS estimuló la producción de TNF-α e iNOS (marcadores M1), mientras que disminuyó la expresión de CD206 (marcador M2). Por el contrario, la estimulación con IL-4 incrementó la expresión de CD206; mientras que la expresión de TNF-α disminuyó. El tratamiento con PTHrP (1-37) no afectó de manera significativa a la polarización M1 o M2, sin embargo, redujo significativamente la expresión de CD206 en células no tratadas con LPS o IL-4 (Fig. 2 A-C).

A continuación, se evaluó como afectaba la polarización de los macrófagos y el tratamiento con PTHrP (1-37) a la expresión del receptor PTH1R. Se observó que la polarización M1 y M2 produjo un descenso de la expresión de PTH1R. Sin embargo, la disminución en el fenotipo M1 fue más acusada (hasta 4 veces). Además, la PTHrP (1-37) indujo un descenso en la expresión del receptor, tanto en condiciones basales como en el fenotipo M2, pero no afectó a la expresión en el fenotipo M1 (Fig. 2D).

Seguidamente, se analizaron los efectos de la polarización y del tratamiento con PTHrP (1-37) en la expresión de los marcadores osteoclásticos TRAP, NFATc1 y RANK. La polarización de las células hacia un fenotipo M1 disminuyó la expresión de los marcadores osteoclásticos. En cambio, la polarización hacia un fenotipo M2 aumentó la expresión de TRAP sin afectar significativamente a la expresión de NFATc1 y reduciendo ligeramente la expresión de RANK. Además, el tratamiento con PTHrP (1-37) disminuyó la expresión de los marcadores osteoclásticos NFATc1 y RANK en los macrófagos M2 sin afectar en los macrófagos M1 (Fig. 2 E-G).

También generamos un gráfico de tipo *heatmap* en el que la correlación en la expresión de los genes estudiados se representa por colores (correlación positiva 0 a 1 [azul] o negativa 0 a -1 [rojo]) (Fig. 3). Se observa que existe una correlación positiva entre los marcadores osteoclásticos con el fenotipo M2 de macrófagos, mientras que hay una correlación negativa con el fenotipo M1. Además, también existe una correlación negativa en la expresión del PTH1R con el fenotipo M1, pero positiva con el fenotipo M2. Por último, en el caso de los marcadores osteoclásticos, estos correlacionan positivamente con la expresión del receptor, por lo que, cuando aumenta la expresión de PTH1R se produce un incremento en la expresión de los marcadores osteoclásticos.

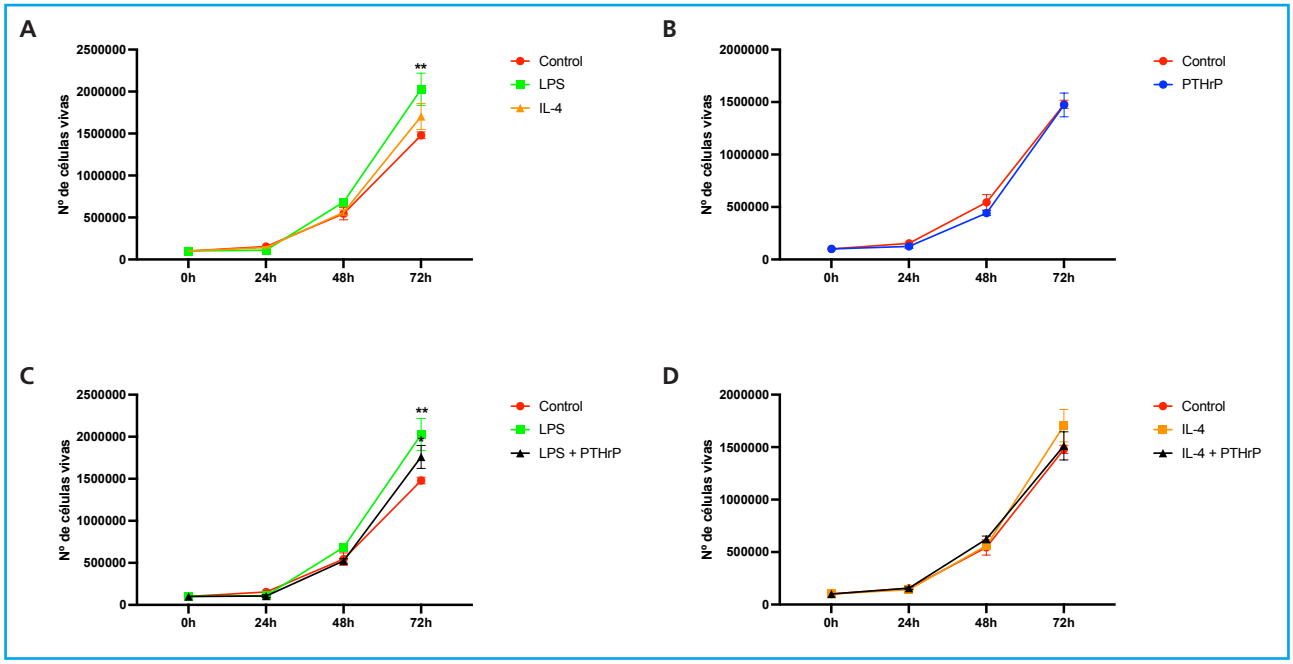

Figura 1. La PTHrP (1-37) no induce cambios significativos en la proliferación celular de los macrófagos M1 y M2. Número de células vivas en condiciones control, tratamiento con LPS y tratamiento con IL-4 A. Número de células vivas en condiciones control y tratamiento con PTHrP (1-37). B. Número de células vivas en condiciones control, tratamiento con LPS y tratamiento con LPS + PTHrP (1-37). C. Número de células vivas en condiciones control, tratamiento con IL-4 y tratamiento con IL-4 + PTHrP (1-37). D. Los resultados son las medias ± DE de triplicados de tres experimentos diferentes. *$p < 0,05$ *vs.* control; **$p < 0,01$ *vs.* control.

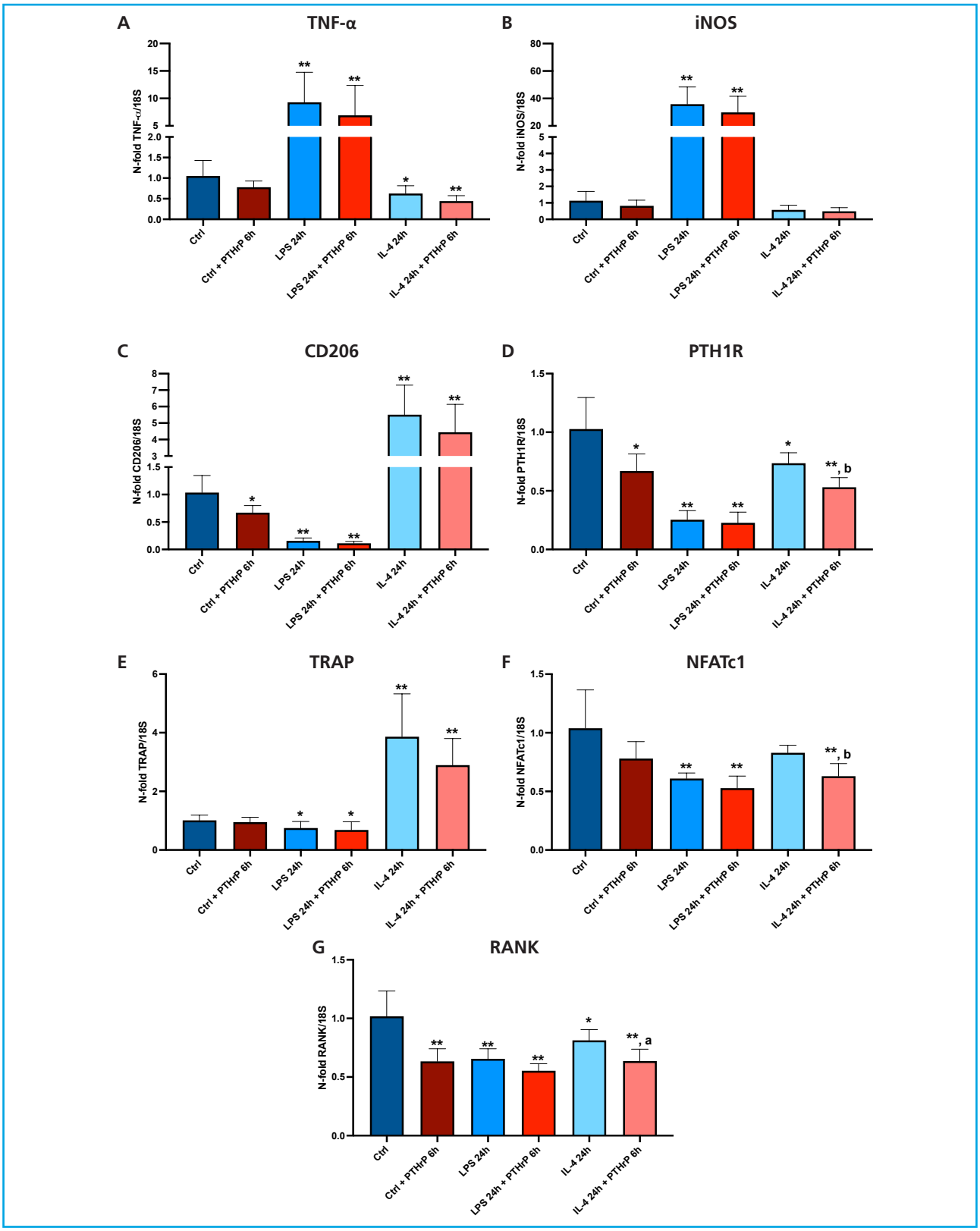

Figura 2. Expresión relativa de TNF-α (A), iNOS (B), CD206 (C), PTH1R (D), TRAP (E), NFATc1 (F) y RANK (G). Las células se trataron con LPS e IL-4 (100 ng/mL y 20 ng/mL, respectivamente) durante 24 horas y, las 6 últimas horas, se estimularon con PTHrP (1-37) 100 nM. Los resultados son las medias ± DE de triplicados de dos experimentos diferentes. *$p < 0,05$ *vs.* control; **$p < 0,01$ *vs.* control; ***$p < 0,001$ *vs*. control; [a]$p < 0,05$ *vs.* estímulo; [b]$p < 0,01$ *vs.* estímulo.

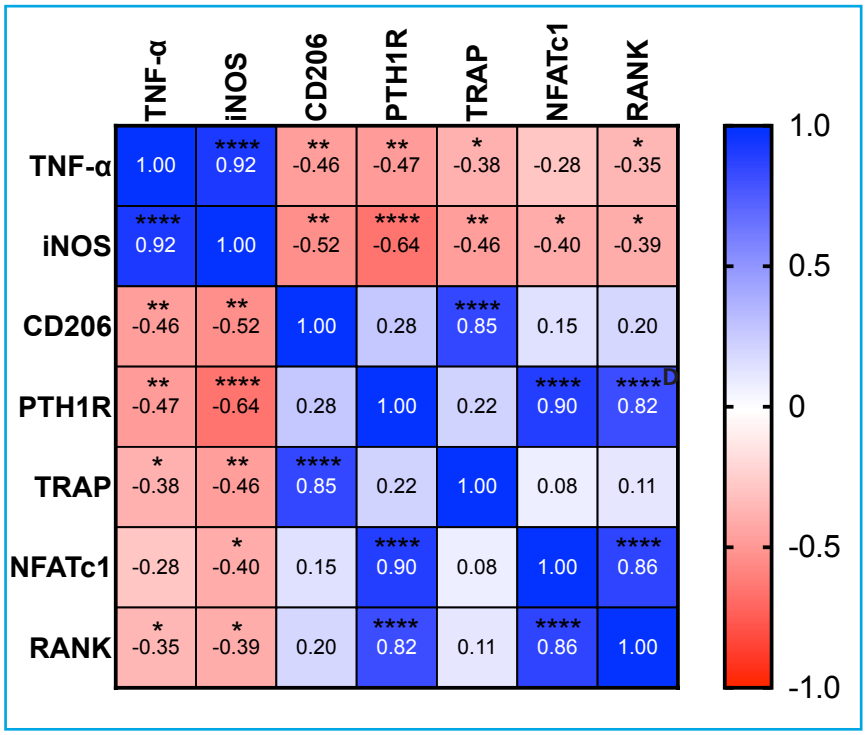

Figura 3. *Heatmap* de la correlación positiva o negativa entre la expresión de TNF-α, iNOS, CD206, PTH1R, TRAP, NFATc1 y RANK. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; ****$p < 0,0001$. Se ha aplicado el método lineal en dos etapas de Benjamini, Krieger y Yekutieli para controlar la FDR (tasa de detección de falsos positivos) con un q-valor menor a 0,1.

DISCUSIÓN

El hueso es un órgano dinámico que sufre un proceso de remodelación dirigido por los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos. Durante la remodelación ósea, el hueso dañado es eliminado por los osteoclastos y reemplazado por los osteoblastos. Este proceso de remodelación implica la formación de los osteoclastos a partir de sus precursores del linaje monocito-macrófago (3).

El receptor PTH1R se expresa en osteoblastos, osteocitos (26,27) y en otras células presentes en la médula ósea como los monocitos y las células T (21,28). En el presente trabajo demostramos que la línea de macrófagos RAW 264.7 expresa el receptor PTH1R, y que tras su estimulación por su ligando PTHrP (1-37), se modula la expresión de genes relacionados con la polarización y diferenciación osteoclástica sin afectar a la proliferación celular. Nuestros resultados indican que la estimulación con LPS induce un aumento significativo en la proliferación de las RAW 264.7. En el estudio llevado a cabo por Jiao y cols., en 2016, se demuestra que el LPS estimula la proliferación de monocitos/macrófagos a través de la regulación de la proteína TDAG51, que juega un papel esencial en la progresión del ciclo celular (29); y, además, se ha demostrado que la IL-4 aumenta la supervivencia de los basófilos de ratón diferenciados *in vitro* mediante una señalización independiente de la transcripción de fosfo inositol 3 quinasa (PI3K) (30), por lo que podría tener la misma función en el linaje monocito/macrófago.

Los resultados señalan, además, que la polarización de estas células hacia un fenotipo regenerativo M2 induce a su vez la expresión de marcadores osteoclásticos. Se observa que en los macrófagos polarizados a un fenotipo M2, existe una correlación positiva en la expresión génica del marcador M2 CD206 con los marcadores osteoclásticos TRAP, NFATc1 y RANK. Sin embargo, en los M1 la correlación con los marcadores osteoclásticos es negativa. El estudio presentado por Yu y cols., en 2009, muestra que la IL-4 es capaz de aumentar por sí sola la expresión génica de TRAP en células RAW 264.7 (31). Además, los macrófagos sinoviales F4/80$^+$CD206$^+$ M2 presentes en la artritis reumatoide pueden ser nuevos precursores osteoclásticos y contribuir significativamente a los cambios óseos, ya que se ha demostrado que expresan altamente RANK y pueden ser activados por RANKL y M-CSF para adquirir marcadores de osteoclastos y función de resorción ósea (32). Los osteoclastos son células multinucleadas del linaje de monocitos/macrófagos que requieren de M-CSF y RANKL para su diferenciación. Existen algunos estudios que sugieren que los macrófagos M2 pueden influir en la expresión de marcadores osteoclásticos como TRAP. Por ejemplo, en un estudio sobre la regeneración de alvéolos dentales después de una extracción, se observó que los M2 promovían la diferenciación de células osteoprogenitoras a través de la secreción de TGF-ß y, en las etapas tardías, se detectaron osteoclastos positivos para TRAP (33), lo que sugiere una conexión entre los macrófagos M2 y la formación de osteoclastos. Además, existen otras evidencias

que sugieren la posible fusión de macrófagos M2 con osteoclastos, lo que podría promover la secreción de citoquinas osteogénicas, estimulando así la diferenciación osteogénica y la formación ósea en materiales osteoinductores (34). Por lo tanto, podría existir una relación entre el aumento de expresión de TRAP y la polarización M2 de los macrófagos. Sin embargo, es importante destacar que otros estudios indican que la secreción de TNF-α e IL-1ß por los macrófagos M1 es capaz de madurar los precursores osteoclásticos para la formación de osteoclastos (35); mientras que los macrófagos M2 podrían inhibir el desarrollo de osteoclastos mediante la secreción de IL-4 e IL-10 (36). Esto podría sugerir que, aunque los macrófagos M2 derivados de las células RAW 264.7 expresen altos niveles de TRAP no se diferencien totalmente a un osteoclasto.

Por último, la PTHrP (1-37) induce un descenso significativo en la expresión de PTH1R en la línea de macrófagos RAW 264.7, lo que podría mostrar una regulación negativa inducida por el exceso de agonista del receptor.

Nuestros hallazgos sugieren que el estímulo con LPS e IL-4 puede afectar a la proliferación de los macrófagos M1 y M2, así como a la expresión de marcadores osteoclásticos modificando así la capacidad osteoclastogénica de estos precursores. Sin embargo, PTHrP (1-37) no modula la proliferación de las RAW 264.7, aunque sí tiene efectos en la expresión de los marcadores característicos de osteoclastos. Por todo ello, son necesarios más estudios que aborden el papel del PTH1R en estas células para esclarecer los posibles efectos de sus ligandos PTH y PTHrP en el linaje monocito-macrófago.

BIBLIOGRAFÍA

1. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. Phys Ther 2006;86(1):77-91. DOI: 10.1093/ptj/86.1.77
2. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol 2008;61(5):577-87. DOI: 10.1136/jcp.2007.048868
3. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. Annu Rev Cell Dev Biol 2009;25:629-48. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113308
4. Bonewald LF. The amazing osteocyte. J Bone Miner Res 2011;26(2):229-38. DOI: 10.1002/jbmr.320
5. Zhang W, Gao R, Rong X, Zhu S, Cui Y, Liu H, et al. Immunoporosis: Role of immune system in the pathophysiology of different types of osteoporosis. Front Endocrinol (Lausanne) 2022;13:965258. DOI: 10.3389/fendo.2022.965258
6. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. Bone 2018;106:78-89. DOI: 10.1016/j.bone.2015.10.019
7. Wang C, Ma C, Gong L, Guo Y, Fu K, Zhang Y, et al. Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. Front Immunol 2021;12:803037. DOI: 10.3389/fimmu.2021.803037
8. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 2008;8(12):958-69. DOI: 10.1038/nri2448. Erratum in: Nat Rev Immunol 2010;10(6):460.
9. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 2004;25(12):677-86. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015
10. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol 2018;233(9):6425-6440. DOI: 10.1002/jcp.26429
11. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. Immunity 2016;44(3):450-62. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.015
12. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. Lab Invest 1999;79(2):83-94
13. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. Osteoporos Int 2011;22(1):1-20. DOI: 10.1007/s00198-010-1272-8
14. Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. J Biol Chem 2004;279(44):45969-79. DOI: 10.1074/jbc.M408795200
15. Ardura JA, Rackov G, Izquierdo E, Alonso V, Gortazar AR, Escribese MM. Targeting Macrophages: Friends or Foes in Disease? Front Pharmacol 2019;10:1255. DOI: 10.3389/fphar.2019.01255
16. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. Physiol Rev 1996;76(1):127-73. DOI: 10.1152/physrev.1996.76.1.127
17. Fiaschi-Taesch NM, Stewart AF. Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences. Endocrinology 2003;144(2):407-11. DOI: 10.1210/en.2002-220818
18. Li JY, D'Amelio P, Robinson J, Walker LD, Vaccaro C, Luo T, et al. IL-17A Is Increased in Humans with Primary Hyperparathyroidism and Mediates PTH-Induced Bone Loss in Mice. Cell Metab 2015;22(5):799-810. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.09.012
19. Chen T, Wang Y, Hao Z, Hu Y, Li J. Parathyroid hormone and its related peptides in bone metabolism. Biochem Pharmacol 2021;192:114669. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114669
20. Rámila D, Ardura JA, Esteban V, Ortega A, Ruiz-Ortega M, Bosch RJ, et al. Parathyroid hormone-related protein promotes inflammation in the kidney with an obstructed ureter. Kidney Int 2008;73(7):835-47. DOI: 10.1038/sj.ki.5002775
21. Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F, Nieves J, et al. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. J Cell Biochem 2005;95(1):139-48. DOI: 10.1002/jcb.20388
22. Gay CV, Zheng B, Gilman VR. Co-detection of PTH/PTHrP receptor and tartrate resistant acid phosphatase in osteoclasts. J Cell Biochem 2003;89(5):902-8. DOI: 10.1002/jcb.10579

23. Schlundt C, Fischer H, Bucher CH, Rendenbach C, Duda GN, Schmidt-Bleek K. The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time. Acta Biomater 2021;133:46-57. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.04.052
24. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. J Immunol 2008;181(2):1232-44. DOI: 10.4049/jimmunol.181.2.1232
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
26. Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. Bone 2013;54(2):250-7. DOI: 10.1016/j.bone.2012.09.016
27. Maycas M, Ardura JA, de Castro LF, Bravo B, Gortázar AR, Esbrit P. Role of the Parathyroid Hormone Type 1 Receptor (PTH1R) as a Mechanosensor in Osteocyte Survival. J Bone Miner Res 2015;30(7):1231-44. DOI: 10.1002/jbmr.2439
28. Pacifici R. Role of T cells in the modulation of PTH action: Physiological and clinical significance. Endocrine 2013;14.
29. Pacifici R. Role of T cells in the modulation of PTH action: physiological and clinical significance. Endocrine 2013;44(3):576-82. DOI: 10.1007/s12020-013-9960-8
30. Reinhart R, Kaufmann T. IL-4 enhances survival of in vitro-differentiated mouse basophils through transcription-independent signaling downstream of PI3K. Cell Death Dis 2018;9(7):713. DOI: 10.1038/s41419-018-0754-z
31. Yu M, Moreno JL, Stains JP, Keegan AD. Complex regulation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression by interleukin 4 (IL-4): IL-4 indirectly suppresses receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-mediated TRAP expression but modestly induces its expression directly. J Biol Chem 2009;284(47):32968-79. DOI: 10.1074/jbc.M109.001016
32. Zhang H, Huang Y, Wang S, Fu R, Guo C, Wang H, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to bone erosion in collagen-induced arthritis by differentiating to osteoclasts. J Autoimmun 2015;65:82-9. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.08.010
33. Horibe K, Hara M, Nakamura H. M2-like macrophage infiltration and transforming growth factor-β secretion during socket healing process in mice. Arch Oral Biol 2021;123:105042. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2021.105042
34. Nie Z, Hu Z, Guo X, Xiao Y, Liu X, de Bruijn JD, et al. Genesis of osteoclasts on calcium phosphate ceramics and their role in material-induced bone formation. Acta Biomater 2023;157:625-38. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.11.005
35. Zha L, He L, Liang Y, Qin H, Yu B, Chang L, et al. TNF-α contributes to postmenopausal osteoporosis by synergistically promoting RANKL-induced osteoclast formation. Biomed Pharmacother.2018;102:369-374. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.080
36. Hu K, Shang Z, Yang X, Zhang Y, Cao L. Macrophage Polarization and the Regulation of Bone Immunity in Bone Homeostasis. J Inflamm Res 2023;16:3563-80. DOI: 10.2147/JIR.S423819