



## ACTUALIZACIONES / Reviews

# LOS OSTEOCITOS COMO MECANOSENSORES DEL HUESO

Carola B. Bozal

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

### Resumen

Los osteocitos y el sistema de lagunas y canalículos que los contienen forman una red sincicial de intercomunicación entre ellos: el sistema lacuno-canalicular osteocitario (SLCO), a través del cual también establecen comunicación con las células osteoblásticas de la superficie del hueso. Existen evidencias que demuestran que las cargas mecánicas y la ausencia de estas cargas en el hueso provocan cambios en la expresión de diversos factores en los osteocitos, sugiriendo que estas células actuando como mecanosensores participarían en la regulación de los procesos de modelación y remodelación óseas adaptativas. Los osteocitos actuando como mecanosensores del hueso sensan los estímulos mecánicos, los transducen a señales bioquímicas y, a través de la comunicación y liberación de diversos factores, comunican el estímulo a las células efectoras (osteoblastos y osteoclastos). Es a través de sus procesos citoplasmáticos y de la red de comunicación dentro del SLCO que los osteocitos tienen esta capacidad. Los cambios en el entorno

lacunar periosteocitario-pericanalicular actuarían como amplificadores locales de las fuerzas recibidas y favorecerían la transmisión de las señales entre las células. La presente revisión bibliográfica tiene por objeto resumir los conocimientos actuales sobre la función mecanotransdutora de los osteocitos y su relación con la regulación de los procesos de modelación y remodelación adaptativas.

**Palabras clave:** osteocito, mecanotransducción, fuerzas mecánicas.

### Summary

### OSTEOCYTES AS MECHANOSENSORS IN BONE

*Osteocytes and lacunae and canaliculi system containing them form a syncytial network known as the osteocytic lacuno-canalicular system (OLCS), through which they also communicate with osteoblastic cells on the bone surface. There is evidence that the presence and absence of mechanical loads on bone*

\* Dirección postal: Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Odontología, UBA. Marcelo T. de Alvear 2142 1ºA. (1122) Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: [carolaboza@yahoo.com](mailto:carolaboza@yahoo.com)

*cause changes in the expression of a variety of factors in osteocytes, suggesting that osteocytes may play a role as mechanosensors in the regulation of adaptive bone modeling and remodeling processes. Acting as mechanosensors of bone, osteocytes sense mechanical stimuli, transduce them into biochemical signals, and through the release of a number of factors, they communicate the stimulus to effector cells (osteoblasts and osteoclasts). It is through their cytoplasmic processes and the communication network in the OLCS that osteocytes have this ability. The changes in the perilacunar-pericanalicular environment would seemingly serve to amplify the strain, and enable signal transmission to the cells. The aim of this review is to present current knowledge on the mechanosensory function of osteocytes, and its relation with adaptive bone modeling and remodeling processes.*

**Key words:** *osteocyte, mechanotransduction, mechanical forces.*

### **El osteocito y el sistema lacuno-canalicular (SLC)**

Los osteocitos, las células óseas más abundantes del tejido óseo, son células no proliferativas que residen en el interior de la matriz ósea mineralizada, alojadas en lagunas. Presentan largos procesos citoplasmáticos a través de los cuales establecen contacto y se comunican con las células osteoblásticas presentes en la superficie del hueso y con osteocitos vecinos. La red celular tridimensional que forman los cuerpos y los procesos citoplasmáticos de los osteocitos es conocida como red osteocitaria (ON: *osteocyte network*). Esta red celular está alojada en lagunas y canalículos en el interior de la matriz ósea, que conforman el sistema lacuno-canalicular (SLC).<sup>1-4</sup> El SLC representa la impronta o “el negativo” de la red osteocitaria en la matriz ósea. En conjunto, ambos sistemas de interconexión (red osteocitaria y SLC) conforman el sistema lacuno-canalicular os-

teocitario (SLCO).<sup>5</sup> En este sistema la comunicación a nivel celular se establece a través de uniones *gap*<sup>6-9</sup> que permiten la comunicación de señales eléctricas y el transporte extracelular e intracelular de moléculas de señalización. Estos contactos célula-célula se establecen desde el momento de la diferenciación de osteoblasto a osteocito.<sup>10</sup> Con los osteoclastos y sus precursores, en cambio, los osteocitos no establecen contacto directo y la comunicación se lograría a través de la difusión de moléculas de señalización liberadas por ellos.<sup>11-12</sup> Además, en el SLCO se establece comunicación a nivel extracelular por medio del fluido que transcurre por el espacio comprendido entre la membrana plasmática de los osteocitos y la pared de la laguna y los canalículos (espacio periosteocitario) dentro del *sistema lacuno-canalicular*.<sup>3,4,13</sup> Teniendo en cuenta la amplia superficie ósea expuesta a nivel del SLC, el líquido que transcurre por dentro de este sistema representa una extensa área para el intercambio molecular.<sup>4,5</sup> Este espacio entre el osteocito y la matriz ósea contiene proteínas no colagenosas propias de la matriz (laminina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína ósea, fibronectina, entre otras) y proteoglicanos (principalmente ácido hialurónico). Estas proteínas no colagenosas tienen la particularidad de ligar los iones de calcio.<sup>14</sup> Además, esta matriz contiene la proteína de matriz dentinaria tipo I (DMP-1) y fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE). Una de las principales funciones de DMP-1 es mantener la integridad y rigidez de las paredes lacunar y canalicular, y su expresión se encuentra principalmente aumentada ante las fuerzas mecánicas.<sup>15-17</sup> La MEPE es una proteína que se concentra principalmente por fuera de la pared mineralizada de la laguna, en la matriz no mineralizada que rodea los osteocitos y procesos citoplasmáticos.<sup>18</sup> Los osteocitos se encuentran anclados en la matriz ósea que los circunda a través de uniones focales dependientes de integrina,<sup>19-20</sup> aunque más recientemente se sugirió que la



pronunciada capa de matriz no colágena (0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de espesor) rica en ácido hialurónico que forma una especie de glicocálix alrededor del cuerpo de los osteocitos impediría el anclaje directo en la matriz mineralizada.<sup>21</sup> A diferencia del cuerpo celular, los procesos citoplasmáticos sí evidencian anclaje directo a través de integrinas (integrina  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ ) posiblemente con la osteopontina (OPN) de la matriz que los rodea.<sup>21</sup>

En estudios sobre el movimiento del fluido óseo por el SLC se demostró que trazadores con tamaños de entre 6 y 10 nm tienen la capacidad de penetrar el SLC<sup>22,23</sup> y la penetración dentro del sistema se incrementa por la aplicación de fuerzas en el hueso, sugiriendo que el deslizamiento del fluido intersticial dentro del SLC genera un estrés que se relacionaría con la capacidad de sensado de las fuerzas en el hueso.<sup>24-26</sup>

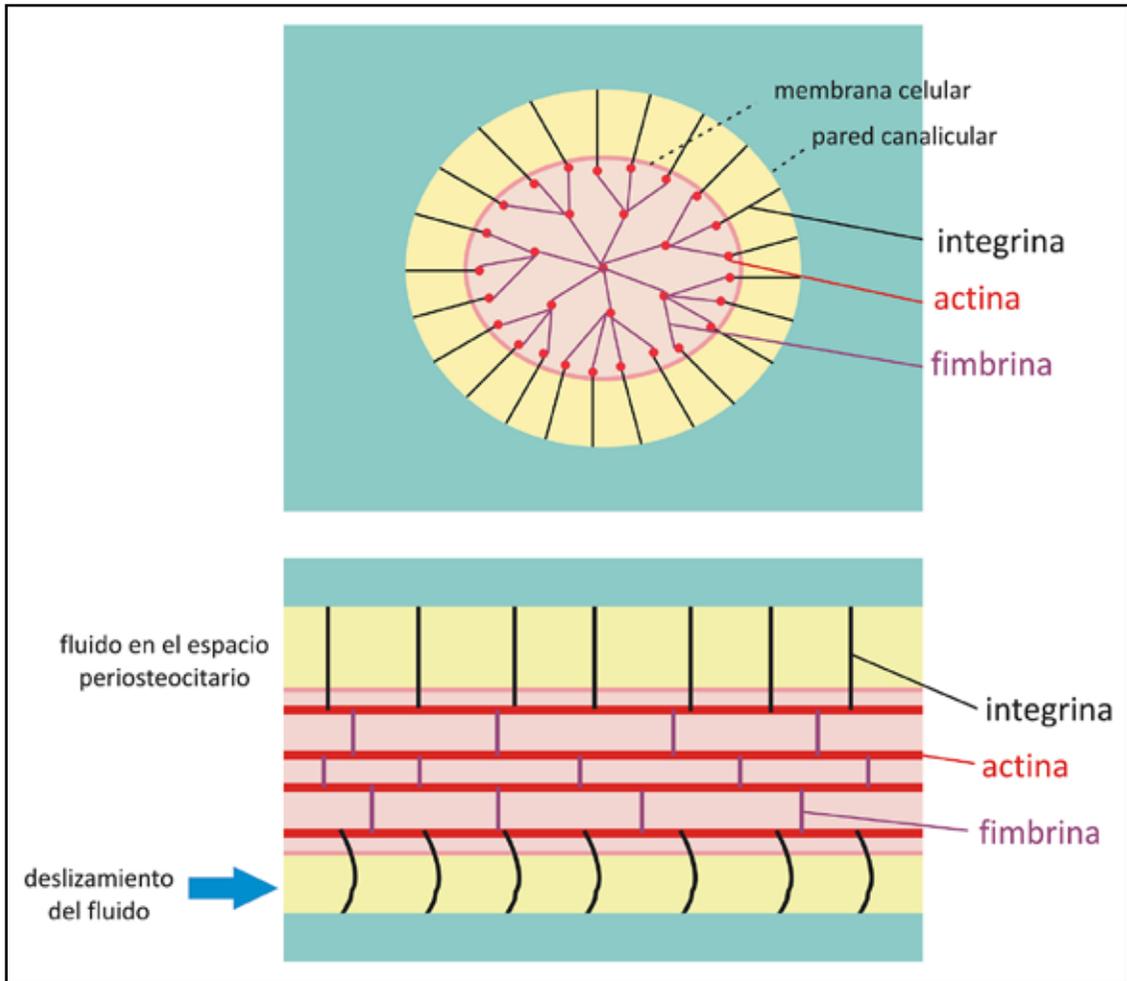
### **Mecanotransducción: el rol del osteocito en la adaptación del hueso a las cargas mecánicas**

Se define mecanotransducción como “el proceso por el cual las fuerzas físicas son convertidas en señales bioquímicas y estas señales son transformadas en respuestas celulares...”.<sup>27</sup> En otras palabras, la mecanotransducción es la capacidad de determinadas células de sensar un estímulo mecánico y traducirlo a señales bioquímicas que regulen la acción de otras células, las células efectoras. Los osteocitos son considerados “los mecanosensores” del hueso y, si bien no serían las únicas células óseas con capacidad de sensar fuerzas, serían los candidatos ideales por la ubicación estratégica en el interior de la matriz ósea y por la compleja red de interconexión que representan el SLC y el fluido óseo que por él transcurre.<sup>28</sup> Es a través de sus procesos citoplasmáticos y de la red de comunicación lacuno-canalicular que los osteocitos tienen la capacidad de sensar las cargas mecánicas que recibe el hueso y de transmitir la señal a los osteocitos vecinos

y a las células óseas residentes en la superficie capaces de iniciar el proceso de remodelación adaptativa.<sup>29,30,3</sup> Tradicionalmente se considera que el proceso de mecanotransducción en los osteocitos involucra cuatro etapas:<sup>29-31</sup> 1) acoplamiento mecánico: sensado de la señal mecánica por células “mecanosensibles”, 2) acoplamiento bioquímico: transducción de la señal mecánica en una señal bioquímica intracelular, 3) transmisión de la señal bioquímica a las células efectoras y 4) respuesta específica de las células efectoras.

### **Acoplamiento mecánico: el rol del SLC en la mecanotransducción osteocitaria**

En este primer paso de la mecanotransducción, los protagonistas son el SLC y la red de procesos citoplasmáticos y cuerpos celulares que este sistema aloja.<sup>32</sup> Las cargas mecánicas en el hueso inducen gradientes de presión en la matriz ósea que genera un flujo del fluido intersticial dentro del SLC.<sup>33</sup> Este flujo de fluido canalicular que se genera ha sido demostrado tanto en estudios *in vitro*<sup>34-38</sup> como también en algunos estudios *in vivo*.<sup>39, 24, 25</sup> Los osteocitos inmersos en el SLC son capaces de sensar las fuerzas de deslizamiento que se generan por este fluido intracanalicular. La teoría más aceptada propone que el osteocito se “activa” a través de la deformación que sufre su membrana plasmática y el citoesqueleto anclado en ella<sup>40, 41</sup> (Figura 1). Este modelo propone que las fuerzas de deslizamiento que se generan entre la membrana plasmática de los procesos citoplasmáticos y la pared canalicular ejercen tensión sobre las integrinas que anclan a los osteocitos en la matriz del hueso (uniones focales).<sup>42, 20</sup> En particular, los complejos que forman las integrinas  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  con componentes de la matriz ósea como OPN y vitronectina<sup>19</sup> actuarían como los principales sitios de transducción de la señal e iniciadores de los mecanismos de señalización intracelular.<sup>19</sup> Este estrés tensiona intracelularmente los filamentos de actina del citoesqueleto, especialmente abundantes en



**Figura 1.** Representación esquemática de una prolongación citoplasmática, el espacio periprocesal y la matriz mineralizada de la pared del canalículo en A) corte transversal y B) corte longitudinal. Basado en el modelo de amplificación de las cargas desarrollado por You y col. (2001, 2004). Se representan la actina del citoesqueleto de la prolongación citoplasmática y las proteínas asociadas integrina y fimbrina. La aplicación de fuerzas en el hueso provocarían el deslizamiento del fluido óseo que transcurre por el espacio periprocesal provocando tensión sobre las integrinas de anclaje de la membrana celular a la matriz. Esta tensión se transmite intracelularmente a los filamentos de actina del citoesqueleto de la prolongación desencadenando el mecanismo de respuesta intracelular. Modificado de You y col. (2001).

los procesos citoplasmáticos.<sup>40-41</sup> Como resultado de la activación se producen cambios en la organización del citoesqueleto que se manifiestan por aumentos en los niveles de  $\alpha$ -actinina (29%), filamina (185%) y vimentina (15%).<sup>43</sup>

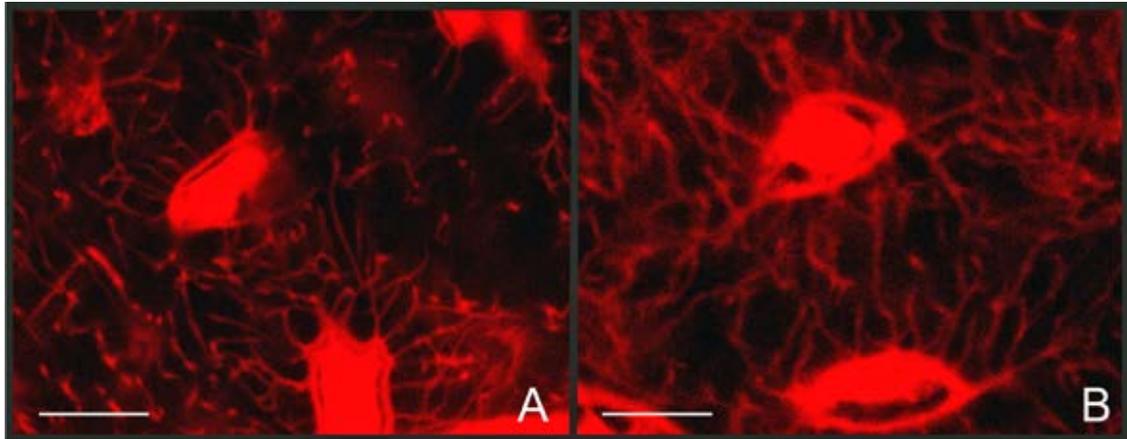
Sabíamos que luego de la aplicación de fuerzas *in vivo* durante 24 horas las lagunas osteocitarias del hueso alveolar aumentaban

de tamaño.<sup>44</sup> En un reciente estudio en el que analizamos las características tridimensionales del SLCO del hueso alveolar mediante microscopía confocal, observamos que tanto las fuerzas traccionales como las fuerzas compresivas provocaron cambios morfológicos ya desde 1 h de aplicadas las fuerzas, y tanto a nivel del SLC como de la red osteocitaria. Estos cambios se manifestaron princi-



palmente con incremento del volumen lacunar e incremento del espacio periprocésal (Figura 2), lo cual modificaría la permeabilidad dentro del sistema generando cambios en la dinámica del fluido intracanalicular y contribuyendo al sentido por parte de los osteocitos.<sup>45</sup>

Dentro de los cambios osteocitarios a las fuerzas, dependientes de la modificación del citoesqueleto, hemos observado que muy tempranamente los cuerpos celulares adoptan una forma redondeada.<sup>45</sup> En un estudio *in vitro* se observó que los osteocitos de morfo-



**Figura 2.** Microfotografías obtenidas con microscopio láser de barrido confocal de hueso alveolar teñido con fucsina básica. Se observa una zona del hueso alveolar sin descalcificar de (A) un animal control y (B) de un animal experimental luego de la aplicación de las fuerzas ortodóncicas durante 1 h. Nótese el aumento del volumen lacunar en B y el incremento del espacio periprocésal visible por penetración del colorante en la muestra de hueso que recibió la fuerza ortodóncica. Magnificación original 1500X. Escala 10  $\mu$ m.

logía esférica son más mecanosensibles que los osteocitos de morfología ovoide.<sup>46</sup> Esto sugiere que la morfología celular parecería estar involucrada en la capacidad de sentido y adaptación funcional del hueso a las cargas. En la hipótesis de la plasticidad osteocitaria propuesta por Rubin y col.<sup>47</sup> se postula que la célula estaría modificando activamente la arquitectura del citoesqueleto, anclándose en la matriz y modulando el espacio periosteocitario en un intento por optimizar el microambiente para sentir las fuerzas y que, cuando se produce un incremento en las fuerzas que recibe el hueso, los osteocitos rápidamente modifican la infraestructura de su citoesqueleto. En línea con esta hipótesis y de acuerdo con nuestros hallazgos,<sup>45</sup> postulamos que –independientemente de que las fuerzas

que recibe el hueso sean traccionales o sean compresivas– probablemente determinen cambios en la organización espacial del citoesqueleto de los osteocitos, modificando secundariamente el ambiente lacunar. Además, los cambios lacunares tal vez se asocien a modificaciones en las concentraciones de calcio y fosfato en el espacio periosteocitario.<sup>48</sup> De esta forma, el incremento del volumen lacunar observado inmediatamente luego de la aplicación de las fuerzas podría estar generando una movilización del calcio extracelular. En tanto uno de los primeros eventos en la activación mecánica de los osteocitos es la activación de canales de calcio voltaje dependientes<sup>49</sup> y la movilización intracitoplasmática del calcio que actúa como segundo mensajero, el calcio que se movi-

lizaría por modificación del espacio perios-teocitario estaría activando mecanismos de señalización en los osteocitos y regulando la expresión de genes específicos.<sup>50</sup> Nicoletta y col.<sup>51,52</sup> sugieren que la laguna osteocitaria actúa como un concentrador del estrés que provocan las fuerzas sobre el hueso, amplificando la magnitud de las fuerzas que actúan sobre él, mientras que el factor de amplificación de las fuerzas se relacionaría con las propiedades del tejido perilacunar.<sup>13</sup> Los resultados observados en forma inmediata a la aplicación de las fuerzas en el hueso<sup>45</sup> indican una modificación del espacio perios-teocitario tanto a nivel lacunar como canalicular, lo cual contribuiría a generar cambios en la dinámica del desplazamiento del fluido óseo dentro del SLC. Debido a que el estrés de deslizamiento es inversamente proporcional al diámetro (*cross-sectional area*) del sitio por el que transcurre el líquido y el diámetro canalicular es mucho menor que el diámetro lacunar, el estrés de deslizamiento que se generaría sobre los procesos citoplasmáticos sería mucho mayor que el que se generaría sobre los cuerpos osteocitarios.<sup>40,41</sup> Además, las prolongaciones citoplasmáticas son más rígidas que los cuerpos osteocitarios debido a la organización de los filamentos de actina interconectados en haces por la proteína fimbrina y dan una estructura tridimensional muy compactada.<sup>41</sup> De esta manera, la fuerza recibida resultaría amplificada.<sup>41</sup> Este modelo propuesto de amplificación de las fuerzas sirve para explicar cómo las deformaciones que soporta el hueso *in vivo* a nivel tisular (0,04-0,3%)<sup>53,54</sup> alcanzan magnitudes mayores en el nivel celular (1-10%)<sup>55</sup> capaces de activar células. You y col.<sup>40</sup> proponen que a nivel del SLC la tensión radial que se genera sobre los anclajes de los procesos citoplasmáticos en la pared ósea y la tensión que reciben los filamentos de actina amplificarían el estímulo mecánico inicial a nivel tisular entre 10 y 100 veces a nivel celular. En resumen, este modelo de

amplificación propone 3 componentes básicos y necesarios para sensar el estrés de deslizamiento del fluido óseo: 1) una matriz orgánica que ocupe el espacio pericelular que rodea al osteocito y sus procesos citoplasmáticos, 2) algún elemento que ancle y centre los procesos citoplasmáticos dentro de sus canaliculos (las integrinas) y 3) alguna estructura del citoesqueleto que resista la tensión y la deformación que le transmite el anclaje cuando recibe las fuerzas (los filamentos de actina).<sup>32</sup> Las ampliaciones propuestas para este modelo sugieren que determinadas estructuras cónicas que protruyen de la pared canalicular y se anclan en la prolongación citoplasmática (vistas por TEM) generarían una mayor amplificación de las fuerzas en la membrana de dicha prolongación.<sup>20</sup>

#### **Acoplamiento bioquímico: activación de la expresión génica**

Los osteocitos responden al estrés de deslizamiento del fluido traduciéndolo el estímulo mecánico a una señal intracelular mediante la activación de cascadas de señalización. Uno de los primeros eventos intracelulares luego de la activación mecánica es la movilización del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desde los depósitos intracelulares, a través de la activación de canales de calcio voltaje-dependientes y de la vía del inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ).<sup>49,55-57</sup> El  $\text{Ca}^{2+}$ , actuando como segundo mensajero, activa mecanismos de señalización que regulan la expresión de genes específicos dentro del núcleo celular.<sup>50</sup> Otra de las cascadas activadas es la de las MAP-quinasas (MAPK).<sup>58</sup> Otros autores han comprobado que, a los pocos minutos de sensar las fuerzas, se encontró en los osteocitos un aumento en los niveles de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa,<sup>59</sup> y a las 2 horas un aumento en los niveles de ARNm para c-fos.<sup>60</sup> A las 4 horas se incrementan la expresión de TGF- $\beta$ , de IGF<sup>61</sup> y de prostaglandinas, así como también se activa la síntesis de NO (óxido nítrico) y ATP.



### **Transmisión de la señal bioquímica a las células efectoras: modulación de la reabsorción y la formación óseas**

Luego de activarse la expresión génica, se sintetizan y liberan diversos factores involucrados en la comunicación y regulación de la actividad de otras células, entre ellas de osteoblastos y osteoclastos. Si bien como resultado final de la aplicación de las fuerzas se induce la activación de la reabsorción y/o formación óseas como respuesta adaptativa, la respuesta osteocitaria a las fuerzas es distinta en función de que las fuerzas que recibe sean fuerzas fisiológicas o fuerzas extremas.

### **Participación de las uniones *gap* en la transmisión de la señal**

La transmisión de la señal se da a través de la comunicación entre osteocitos vecinos a través de uniones *gap*<sup>29</sup> y/o por señalización paracrina dentro del SLC.<sup>9,32</sup> Las uniones *gap* se forman por la unión de 2 hemicanales o conexones, uno de cada célula. Cada conexón tiene una estructura hexamérica compuesta por las proteínas transmembrana conexinas (Cx). Las uniones *gap* permiten la difusión de iones, metabolitos y moléculas de señalización entre las dos células que establecen el contacto, y presentan tamaño y carga específica dependiendo del tipo de conexinas participantes. Las Cx están involucradas en varios procesos que determinan el funcionamiento de las células óseas, entre ellos el control de la proliferación,<sup>62</sup> la diferenciación<sup>63</sup> y la supervivencia<sup>64</sup> de los osteocitos. Las Cx que se expresan en el tejido óseo son Cx43 (la más abundante), Cx45, Cx46,<sup>65</sup> y recientemente se determinó que también se expresa la Cx37.<sup>66-67</sup> Los conexones pueden ser activos incluso sin formar uniones *gap* con el conexón de otra célula. En este caso se los llama "hemicanales" y representan un canal de membrana con gran permeabilidad. Los hemicanales participan de la señalización luego de la estimulación mecánica de los osteocitos.<sup>68</sup> Los canales de Cx43 están presentes en forma activa

en los osteocitos y median la liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>69</sup> y ATP<sup>56</sup> luego de la estimulación mecánica. *In vitro* se demostró que, en los osteocitos, la estimulación mecánica induce la propagación de ondas de Ca<sup>2+</sup> hacia los osteoblastos.<sup>7</sup> Incluso, esta capacidad de los osteocitos de comunicar las señales mecánicas a los osteoblastos a través de uniones *gap* se inhibe por bloqueo farmacológico de las uniones *gap* o al impedir el contacto físico entre osteocitos y osteoblastos.<sup>70</sup> Sin embargo, el rol de los canales de Cx en la transducción de señales mecánicas en osteocitos, propuesta sobre la base de estudios *in vitro*, ha sido recientemente cuestionado. Tres diferentes grupos de investigadores han demostrado que en animales deficientes en Cx43 en células del linaje osteoblástico (incluidos osteocitos) la estimulación mecánica indujo, inesperadamente, una mayor respuesta anabólica.<sup>71-73</sup>

### **El osteocito como regulador de la reabsorción ósea**

Es sabido que determinadas señales mecánicas regulan la fusión de precursores y la actividad osteoclástica. En este sentido, las fuerzas extremas que provoquen microdaños (microfracturas) en la matriz ósea, o condiciones de ausencia de cargas mecánicas (desuso), promueven la osteoclastogénesis<sup>74</sup> incrementando la reabsorción ósea. En un estudio *in vivo* se ha demostrado que la ausencia de estimulación mecánica provoca un incremento en la prevalencia de osteocitos en apoptosis, seguido de un aumento en el reclutamiento de osteoclastos y de la reabsorción ósea.<sup>75</sup> En el mismo sentido, los microdaños generados por la fatiga que provoca el exceso de cargas mecánicas inducen el incremento de osteocitos en apoptosis seguido, luego de varios días, por un incremento local de la reabsorción osteoclástica, permitiendo el reemplazo del sitio dañado.<sup>99,100</sup> Ambas situaciones sugieren que los osteocitos apoptóticos, independientemente de la cau-

sa, llevan al reclutamiento osteoclástico induciendo un incremento de la reabsorción ósea. Sin embargo, en algunos estudios *in vitro* se determinó que determinadas cargas mecánicas inhiben la formación de osteoclastos.<sup>76-77</sup> Varios estudios recientes sugieren que la formación de los osteoclastos podría estar regulada mecánicamente por factores solubles sintetizados por los osteocitos en respuesta a su activación por el estrés de deslizamiento del fluido óseo.

La osteopontina (OPN) es una de las principales glicoproteínas de la matriz ósea y, por ser un factor que regula la quimiotaxis y adhesión de los osteoclastos a la superficie del hueso durante la reabsorción, se cree que cumple un rol importante en la regulación de la remodelación ósea.<sup>78,79</sup> En ausencia de estimulación mecánica, los osteocitos muestran un incremento significativo en la expresión de OPN.<sup>80</sup> Sin embargo, otros estudios revelan que la aplicación de fuerzas provoca también un incremento en los niveles de expresión de OPN en los osteocitos.<sup>81</sup>

Otros factores reguladores importantes de la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea son los factores del sistema RANK-RANKL-OPG. En un estudio *in vitro* se demostró que los osteocitos secretan RANKL y M-CSF (factor estimulante de colonias macrofágicas), que son dos de las citoquinas más importantes que promueven la osteoclastogénesis.<sup>82</sup> El hecho de que los osteocitos secreten RANKL como un factor regulador de la remodelación ósea sugiere que también podría ser a través de la liberación de RANKL que los osteocitos regularían la adaptación del hueso a las cargas.<sup>83</sup> Otro estudio *in vitro* demostró que los osteocitos (células MLO-Y4) sometidos a estrés de deslizamiento de fluido afectan la osteoclastogénesis disminuyendo el balance RANKL/OPG<sup>12</sup> y de esa forma probablemente regularían la reabsorción ósea.<sup>84</sup> Además, los osteocitos secretan OPG, el cual antagoniza con el RANKL compitiendo por su receptor en los osteoclastos y sus precursores.<sup>85</sup> El cam-

bio en el balance de RANKL/OPG sería uno de los factores que regularía la reabsorción ósea mediante la regulación de la osteoclastogénesis.<sup>86</sup> *In vivo* hemos observado que luego de la aplicación de fuerzas ortodóncicas se produce un incremento muy temprano en el porcentaje de osteocitos RANKL+ y en el cociente RANKL/OPG, lo que sugiere la participación de este sistema en la regulación de la modelación/remodelación ósea inducida por las fuerzas, favoreciendo la osteoclastogénesis y la sobrevida de los osteoclastos.<sup>87</sup>

La PGE<sub>2</sub> es otra importante molécula de señalización que sintetizan y liberan los osteocitos en respuesta a la estimulación mecánica.<sup>35,88,89</sup> Esta citoquina actúa tanto sobre osteoblastos como sobre osteoclastos y desencadena tanto respuestas estimuladoras como inhibitorias.<sup>90</sup> En relación con la osteoclastogénesis, la PGE<sub>2</sub> promueve la diferenciación, maduración y sobrevida de osteoclastos en cultivos de células de la médula ósea y de células esplénicas.<sup>91,92</sup> La PGE<sub>2</sub> también promueve la osteoclastogénesis a través de la regulación del sistema RANK-RANKL-OPG.<sup>93</sup>

Por otro lado, los osteocitos normalmente secretan TGF-β, que inhibe la osteoclastogénesis y/o la reabsorción osteoclástica.<sup>94-96</sup> Algunos autores postulan que los osteocitos apoptóticos, por ausencia o pérdida de esta señal inhibitoria, regularían la reabsorción ósea.<sup>97</sup> La aplicación de fuerzas en el hueso que exceden el rango fisiológico (fuerzas extremas) o la presencia de condiciones patológicas como la osteoporosis, predisponen la aparición de microfracturas en la matriz ósea como consecuencia de la fatiga.<sup>98</sup> En este caso, los osteocitos que se encuentran próximos al sitio de la microfractura experimentan apoptosis<sup>99,100</sup> y esto atraería a los osteoclastos para el inicio de la reabsorción en el sitio del daño.<sup>97,100-104</sup> La disminución o corte del pasaje del fluido óseo a nivel canalicular en los alrededores de la microfractura provoca una reducción en la síntesis de óxido nítrico (NO) en los osteocitos y esto



causaría la apoptosis.<sup>105</sup> Algunos estudios *in vivo* revelan aumento en el número de osteocitos en apoptosis con incremento en el número de osteoclastos luego de la estimulación mecánica del hueso.<sup>100-103</sup> En diversos estudios *in vivo* se ha demostrado que, en zonas de microfracturas lineales por fatiga, los osteocitos se tornan apoptóticos, y que estas áreas son subsiguientemente reabsorbidas por osteoclastos, indicando que la apoptosis de los osteocitos es necesaria para iniciar la reabsorción osteoclástica en sitios de microfracturas inducidas por fatiga.<sup>106,107</sup> Recientemente se determinó que la activación de la reabsorción ósea en los huesos que experimentan fatiga mecánica involucra no solamente la apoptosis de los osteocitos en el sitio dañado sino también el incremento de señales pro-osteoclásticas procedentes de los osteocitos aledaños a la lesión.<sup>108</sup>

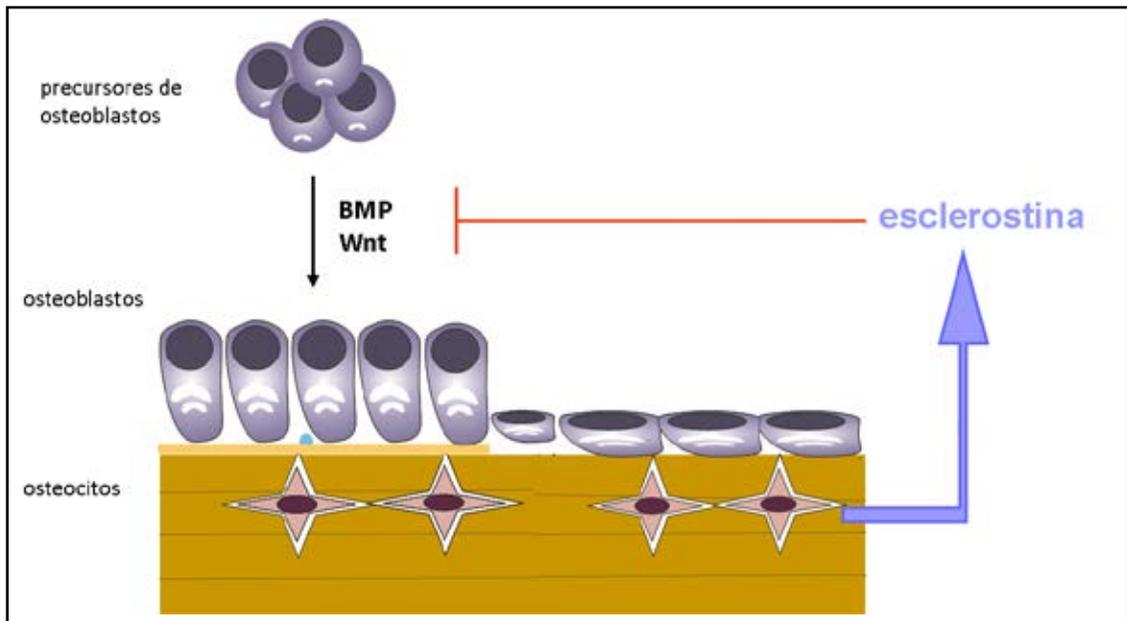
Sin embargo, las cargas mecánicas de rango fisiológico, muy por el contrario, no inducen apoptosis de los osteocitos sino que promueven su sobrevivencia. *In vitro* se ha demostrado que fuerzas fisiológicas previenen la apoptosis de los osteocitos.<sup>109</sup>

### **El osteocito como regulador de la formación ósea**

Segundos después de la estimulación mecánica, los osteocitos liberan NO, ATP y PGs.<sup>89</sup> Todas estas señales anabólicas activan a los osteoblastos y células de revestimiento óseo presentes en la superficie del hueso a través de uniones *gap*.<sup>70</sup> *In vitro* se observó que el NO es liberado segundos después de la estimulación mecánica de osteoblastos y osteocitos.<sup>89</sup> El NO en el hueso inhibe la reabsorción ósea y promueve la formación ósea. Anteriormente hicimos referencia a la capacidad de la PGE<sub>2</sub><sup>35</sup> como citoquina que actúa tanto sobre osteoblastos como sobre osteoclastos y desencadena tanto respuestas estimuladoras como inhibitorias.<sup>90</sup>

Si bien estas moléculas se asocian con la activación de una respuesta anabólica en el hueso, es la rápida activación del camino

canónico Wnt/ $\beta$ -catenina en los osteoblastos luego de la aplicación de una fuerza la que ha cobrado el mayor interés en el último tiempo. Se ha demostrado *in vitro* que la aplicación de fuerzas en el hueso estimula la vía de señalización canónica de Wnt entre las células óseas.<sup>110-112</sup> Los osteocitos a través de la síntesis y secreción de la glicoproteína esclerostina, producto del gen SOST, regulan la función osteoblástica a través de la vía de señalización de Wnt.<sup>113-117</sup> Dicha glicoproteína es un potente inhibidor de la formación ósea a través del bloqueo del camino de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en los osteoblastos al competir por el receptor Lrp5/6 bloqueando su unión a Wnt.<sup>118-120</sup> Se ha demostrado *in vitro* que la esclerostina promueve la apoptosis en osteoblastos<sup>121</sup> e inhibe la proliferación y varias etapas de la diferenciación osteoblástica.<sup>113</sup> Entre los efectos de la activación de la vía Wnt en osteoblastos encontramos que además regula la transcripción génica de OPG<sup>122</sup> y RANKL.<sup>123</sup> Hasta el momento se sabe que tanto el tratamiento con PTH<sup>124-125</sup> como la estimulación mecánica<sup>126-127</sup> reducen la expresión de esclerostina y de esta manera estimulan la formación ósea (Figura 3). *In vivo* se demostró que la aplicación de fuerzas provoca una disminución significativa en la proporción de osteocitos esclerostina-positivos 24 horas después de la aplicación de fuerzas, mostrando mayores reducciones en la zona donde el estímulo mecánico también fue mayor, lo que sugiere una asociación directa entre la expresión de esclerostina y la distribución de la fuerza.<sup>126</sup> Nosotros<sup>127</sup> hemos observado que ya a la hora de recibido el estímulo mecánico esta disminución es significativa, e independiente del tipo de fuerza recibida. Esto sugiere que uno de los mecanismos a través de los cuales los osteocitos regulan la remodelación ósea adaptativa incluye la activación del camino canónico Wnt/ $\beta$ -catenina mediante la supresión de la proteína esclerostina como modulador negativo de la formación ósea.



**Figura 3.** Esquema del mecanismo de acción de esclerostina sobre la diferenciación osteoblástica. Hasta el momento solo la administración continua de PTH y la aplicación de fuerzas mecánicas se demostró que tuvieron la capacidad de regular la síntesis y liberación de esclerostina en los osteocitos. (→) indica efecto promotor y (⊥) indica efecto represor. Modificado de Bellido et al 2006.

### Efecto de fuerzas de distinta magnitud sobre los osteocitos

Existen pocos estudios que hayan evaluado la respuesta de las células óseas a distintas magnitudes de fuerzas. Los primeros trabajos sobre la respuesta osteocitaria a estímulos mecánicos de diferentes magnitudes mostraron *in vitro* que el estrés generado por FFSS (*fluid flow shear stress*) de baja magnitud (0,5 Pa) e impacto (0,4 Pa/s) es más eficaz en inducir respuestas bioquímicas en los osteocitos que las fuerzas hidrostáticas compresivas de 13kPa y 35kPa;<sup>34,128</sup> esto sugiere que el mecanismo mecanotransductor de los osteocitos estaría activado por las fuerzas de deslizamiento de baja magnitud.

En un estudio *in vivo*<sup>129</sup> se evaluó la respuesta de huesos largos sometidos a dos protocolos de estimulación mecánica, uno de baja magnitud y alta frecuencia (500  $\mu\epsilon$  a 30 Hz) y otro de alta magnitud y baja frecuencia (3000  $\mu\epsilon$  a 1 Hz) durante 4 semanas, determinando que solo la baja magnitud estimuló la

formación ósea y la expresión de ARNm para Col I en los osteocitos. Algo similar determinaron Rubin y col.<sup>47</sup> sobre los huesos largos de animales gerontes. En este estudio determinaron que solo una fuerza de baja magnitud y alta frecuencia (500  $\mu\epsilon$  a 30 Hz) indujo una respuesta anabólica en el hueso con incremento en el número de osteocitos que expresaron integrina  $\beta 3$ , OPN y Col I. Noble y col.<sup>97</sup> en otro estudio *in vivo* compararon la respuesta osteocitaria del cúbito de la rata aplicando fuerzas axiales fisiológicas (hasta 4.000  $\mu\epsilon$ ) y suprafisiológicas (8.000  $\mu\epsilon$ ). En ese trabajo pudieron determinar que a 7, 14 y 28 días de iniciada la aplicación de fuerzas se redujo significativamente el número de osteocitos en apoptosis. Las fuerzas suprafisiológicas, en cambio, incrementaron la apoptosis de los osteocitos y la consiguiente remodelación cortical.

Algunos estudios evaluaron la respuesta osteocitaria *in vitro* en función de la aplicación de fuerzas de magnitudes crecientes.



Bacabac y col.<sup>130</sup> demostraron que la frecuencia y magnitud de las fuerzas es un parámetro importante para la activación de las células al estrés. En ese trabajo se estudió *in vitro* la respuesta de los osteoblastos a diferentes grados de estrés de deslizamiento del fluido y se determinó que la producción de NO es directamente proporcional al grado del estrés.<sup>130</sup> En otro trabajo donde se estimularon mecánicamente células osteoblásticas *in vitro* con fuerzas cíclicas traccionales de diferente magnitud durante 24 horas pudieron determinar que se produce un incremento magnitud-dependiente en la síntesis de OPG concomitante por una disminución en la síntesis de RANKL.<sup>131</sup> Más recientemente<sup>132</sup> se utilizaron diferentes tipos de estrés de deslizamiento del fluido (oscilatorio y unidireccional) para estimular mecánicamente a osteoblastos y osteocitos *in vitro* y se pudo determinar que las fuerzas oscilatorias provocan un retraso (más de 5 horas) en la formación y alineamiento de las fibras de estrés en osteoblastos con respecto a las fuerzas unidireccionales (1 hora); sin embargo, no mostraron diferencias sobre la inducción de la expresión de COX-2 (ciclooxigenasa-2) y OPN. En los osteocitos, en cambio, estas fibras de estrés se forman luego de 24 horas de exposición a las fuerzas unidireccionales, mientras que las fuerzas oscilatorias provocaron un incremento en el número de prolongaciones citoplasmáticas por célula con incremento en la expresión de COX-2, y ambas mostraron una regulación similar de la expresión de OPN.

Basados en nuestras observaciones, la aplicación *in vivo* de fuerzas ortodónicas de magnitudes extremas (fuerza fuerte de 230 g y fuerza liviana de 16 g) no mostró diferencias en la respuesta osteocitaria inmediata (1 y 2 horas después de la aplicación de las fuerzas); sin embargo, es de esperar que la respuesta muestre diferencias a medida que avanza el tiempo de aplicación.<sup>133</sup> Esto nos permite sugerir que los osteocitos responden en forma inmediata a la aplicación de las fuerzas,

independientemente de la magnitud, y que a medida que se mantiene el estímulo la célula comienza a manifestar respuestas diferentes en función de que las fuerzas estén dentro del rango fisiológico o, por el contrario, sean fuerzas suprafisiológicas o infra fisiológicas.

### Conclusiones

Como podemos apreciar, el osteocito desde hace ya algunos años no es más considerado como la mera diferenciación terminal del osteoblasto, que tan solo mantiene la vitalidad del tejido óseo. De hecho, reconocer su capacidad mecanosensora es reconocer en esta célula su capacidad de respuesta inmediata y su rol como orquestador de los procesos de modelación y remodelación óseas inducidos por las fuerzas. En este marco no solo sería el iniciador de la remodelación ósea sino que también estaría actuando como coordinador de la actividad de osteoblastos y osteoclastos en la respuesta adaptativa. En los últimos años, el conocimiento en profundidad de los mecanismos moleculares que regulan las funciones osteocitarias se ha convertido en el objeto central de estudio como *target* de nuevas terapéuticas para el tratamiento de diversas patologías óseas.

### Agradecimientos

La autora agradece muy especialmente a la Dra. Ángela M. Ubios por su valiosa colaboración en la lectura crítica del manuscrito. También agradece a la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por subsidiar las investigaciones del grupo de trabajo del cual forma parte a través de los subsidios UBACyT O013, O018 y 20020100100196 y CONICET PIP 6010.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: mayo de 2013.

Aceptado: julio de 2013)

## Referencias

1. Frost HM. In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg* 1960; 42A:138-43.
2. Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Italian J Anat Embryol* 1996; 101:25-79.
3. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:1-8.
4. Noble BS. The osteocyte lineage. *Arch Biochem and Biophys* 2008; 473:106-11.
5. Schneider P, Meier M, Wepf R, Müller R. Towards quantitative 3D imaging of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone* 2010; 47:848-58.
6. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 1981; 33:509-12.
7. Yellowley CE, Li ZY, Zhou ZY, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15:209-17.
8. Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP<sub>2</sub> receptor. *J Biol Chem* 2003; 278(44):43146-56.
9. Tate MLK. "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. *J Biomech* 2003; 36:1409-24.
10. Palumbo C, Palazzini S, Zappe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbits: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat* 1990; 137:350-8.
11. Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Everts V, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone* 2007; 41:745-51.
12. You L, Temiyasathit S, Lee P, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 2008; 42:172-9.
13. Bonivitch AR, Bonewald LF, Nicoletta DP. Tissue strain amplification at the osteocyte lacuna: a microstructural finite element analysis. *J Biomech* 2007; 40:2199-206.
14. Talmage DW, Talmage RV. Calcium homeostasis: how bone solubility relates to all aspects of bone physiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7:108-12.
15. Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, et al. Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 2003; 18:807-17.
16. Yang W, Lu Y, Kalajic I, et al. Dentin matrix protein 1 gene cis regulation: use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280:20680-90.
17. Feng JQ, Ward LM, Liu S, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 2006; 38:1310-5.
18. Gluhak-Heinrich J, Pavlin D, Yang W, MacDougall M, Harris SE. MEPE expression in osteocytes during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* 2007; 52:684-90.
19. Miyauchi A, Gotoh M, Kamioka H, et al. AlphaVbeta3 integrin ligands enhance volume-sensitive calcium influx in mechanically stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab* 2006, 24(6):498-504.
20. Wang Y, Mcnamara LM, Schaffler MB, Weinbaum S. 2007. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:15941-6.
21. Mc Namara LM, Majeska RJ, Weinbaum S, Friedrich V, Schaffler MB. Attachment of osteocyte cell processes to the bone matrix. *Anat Rec (Hoboken)* 2009; 292:355-63.
22. Knothe Tate ML, Niederer P, Knothe U. In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone* 1998; 22:107-17.
23. Wang L, Ciani C, Doty SB, Fritton SP. Delineating bone's interstitial fluid pathway in vivo. *Bone* 2004; 34:499-509.
24. Knothe Tate ML, Knothe U. An ex vivo model



- to study transport processes and fluid flow in loaded bone. *J Biomech* 2000a; 33:247-54.
25. Knothe Tate ML, Steck R, Forwood MR, Niederer P. *In vivo* demonstration of load-induced fluid flow in the rat tibia and its potential implications for processes associated with functional adaptation. *J Exp Biol* 2000b; 203:2737-45.
  26. Tami AE, Schaffler MB, Knothe Tate ML. Probing the tissue to subcellular level structure underlying bone's molecular sieving function. *Biorheology* 2003; 40:577-90.
  27. Huang H, Kamm RD, Lee RT. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C1-11.
  28. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011; 26:229-38.
  29. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 1999; 13:101S-12S.
  30. Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int* 2002; 13:688-700.
  31. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:344-58.
  32. You L, Weinbaum S, Cowin SC. Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat Rec* 2004; 278A: 505-13.
  33. Wang L, Wang Y, Han Y, Henderson SC, Majeska RJ, Weinbaum S, Schaffler MB. In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system. *PNAS* 2005; 102:11911-6.
  34. Klein-Nulend J, Van der Plas A, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, Burger EH. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J* 1995; 9:441-5.
  35. Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Vrijheid-Lammers T, Alblas MJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes— a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225:62-8.
  36. Owan I, Burr DB, Turner CH, Qiu J, Tu Y, Onyia JE, Duncan RL. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol* 1997; 273:C810-5.
  37. Westbroek I, Ajubi NE, Alblas MJ, et al. Differential stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 in osteocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 16:268:414-9.
  38. Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, et al. Fluid shear stress inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res* 2006; 85:905-9.
  39. Pitsillides AA, Rawlinson SC, Suswillo RF, Bourrin S, Zaman G, Lanyon LE. Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling?. *FASEB J* 1995; 9:1614-22.
  40. You LD, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J Biomech* 2001; 34:1375-86.
  41. Han YF, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *PNAS* 2004; 101:16689-94.
  42. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* 1994; 27:339-60.
  43. Jackson WM, Jaasma MJ, Tang RY, Keaveny TM. Mechanical loading by fluid shear is sufficient to alter the cytoskeletal composition of osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295:1007-15.
  44. Bozal CB, Fiol JA, Ubios AM. Early osteocyte response to bone resorption stimuli. *Acta Odontol Latinoamer* 2001; 14:24-9.
  45. Bozal CB, Sánchez LM, Mandalunis PM, Ubios AM. Histomorphometric study and three-dimensional reconstruction of the osteocyte lacuno-canalicular network one hour after applying tensile and compressive forces. *Cells Tissues Organs* 2013, en prensa
  46. Bacabac RG, Mizuno D, Schmidt CF, et al.

- Round versus flat: bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *J Biomech* 2008; 41:1590-8.
47. Rubin C, Judex S, Hadjiargyrou M. Skeletal adaptation to mechanical stimuli in the absence of formation or resorption of bone. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2:264-7.
  48. Harris SE, Gluhak-Heinrich J, Harris MA, et al. DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: Theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. *J Musculoskel Neuron Interact* 2007; 7:313-5.
  49. You J, Reilly GC, Zhen X, et al. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem* 2001; 276:13365-71.
  50. Iqbal J, Zaidi M. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328:751-5.
  51. Nicoletta DP, Moravits DE, Gale AM, Bonewald LF, Lankford J. Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *J Biomech* 2006; 39:1735-43.
  52. Nicoletta DP, Feng JQ, Moravits DE, et al. Effects of nanomechanical bone tissue properties on bone tissue strain: implications for osteocyte mechanotransduction. *J Musculoskel Neuron Interact* 2008; 8:330-1.
  53. Rubin CT, Lanyon LE. Dynamic strain similarity in vertebrates; an alternative to allometric limb bone scaling. *J Theor Biol* 1984; 107:321-7.
  54. Fritton SP, McLeod KJ, Rubin CT. Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and selfsimilarity of low-magnitude strains. *J Biomech* 2000; 33:317-25.
  55. You J, Yellowley CE, Donahue HJ, Zhang Y, Chen Q, Jacobs CR. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *J Biomech Eng* 2000; 122:387-93.
  56. Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol* 2007; 212:207-14.
  57. Kamioka H, Sugawara Y, Murshid SA, Ishihara Y, Honjo T, Takano-Yamamoto T. Fluid shear stress induces less calcium response in a single primary osteocyte than in a single osteoblast: Implication of different focal adhesion formation. *J Bone Miner Res* 2006; 21:1012-21.
  58. Alford AI, Jacobs CR, Donahue HJ. Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism. *Bone* 2003; 33:64-70.
  59. Dodds RA, Ali N, Pead MJ, Lanyon LE. Early loading-related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae *in vivo*. *J Bone Miner Res* 1993; 8:261-7.
  60. Kawata A, Mikuni-Takagaki Y. Mechanotransduction in stretched osteocytes—temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:404-8.
  61. Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, et al. Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor-stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int* 2004; 74:388-97.
  62. Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 2001; 20:4138-49.
  63. Li Z, Zhou Z, Saunders MM, Donahue HJ. Modulation of connexin 43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C1248-C55.
  64. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277: 8648-57.
  65. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473:188-92.



66. Plotkin LI. Connexin 43 and bone: not just a gap junction protein. *Actual Osteol* 2011; 7:79-90.
67. Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone* 2013; 52:157-66.
68. Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* 2000; 26:417-22.
69. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 2005; 16:3100-6.
70. Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C545-52.
71. Grimston SK, Watkins MP, Brodt MD, Silva MJ, Civitelli R. Enhanced Periosteal and Endocortical Responses to Axial Tibial Compression Loading in Conditional Connexin43 Deficient Mice. *PLoS ONE* 2012; 7:e44222. doi:10.1371/journal.pone.0044222
72. Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, et al. Enhanced Osteoclastic Resorption and Responsiveness to Mechanical Load in Gap Junction Deficient Bone. *PLoS ONE* 2011; 6:e23516. doi:10.1371/journal.pone.0023516
73. Bivi N, Pacheco-Costa R, Brun LR, et al. Absence of Cx43 selectively from osteocytes enhances responsiveness to mechanical force in mice. *J Orthop Res* 2013; 31(7):1075:81
74. Bikle DD, Halloran BP. The response of bone to unloading. *J Bone Miner Metab* 1999; 17:233-44.
75. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, et al. Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss. *J Bone Min Res* 2006; 21:605-15.
76. Rubin J, Murphy T, Nanes MS, Fan X. Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C1126-32.
77. Klein-Nulend J, Veldhuijzen JP, Van Strien ME, De Jong M, Burger EH. Inhibition of osteoclastic bone resorption by mechanical stimulation in vitro. *Arthritis Rheum* 1990; 33:66-72.
78. Sodek J, Ganss B, Mckee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11:279-303.
79. Raheja LF, Genetos DC, Yellowley CE. Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 22:1061-6.
80. Gross TS, King KA, Rabaia NA, Pathare P, Srinivasan S. Upregulation of osteopontin by osteocytes deprived of mechanical loading or oxygen. *J Bone Miner Res* 2005; 20:250-6.
81. Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, et al. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 1999; 14:839-49.
82. Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17:2068-79.
83. Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2012; 27:499-505.
84. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1116:281-90.
85. Kramer I, Halleux C, Keller H, et al. Osteocyte Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Is Required for Normal Bone Homeostasis. *Mol Cell Biol* 2010; 30:3071-85.
86. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337-42.
87. Sánchez LM, Bozal CB, Mandalunis PM, Ubios AM. Expresión temprana de RANKL en las células del linaje osteoblástico luego de la aplicación de fuerzas ortodóncicas. Libro de Actas de la XLIV Reunión Anual de la SAIO, 2011 (Abstract).
88. Ajobi NE, Klein-Nulend J, Alblas MJ, Burger EH, Nijweide PJ. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol* 1999; 276:171-8.
89. Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH. The production of nitric oxide

- and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 2001; 34:671-7.
90. Quinn J, Sabokbar A, Denne M, de Vernejoul M, McGee J, Athanasou N. Inhibitory and stimulatory effects of prostaglandins on osteoclast differentiation. *Calcif Tissue Int* 1997; 60:63-70.
  91. Collins DA, Chambers TJ. Prostaglandin E2 promotes osteoclast formation in murine hematopoietic cultures through an action on hematopoietic cells. *J Bone Miner Res* 1992; 7:555-61.
  92. Ono K, Kaneko H, Choudhary S, et al. Biphasic Effect of Prostaglandin E2 on Osteoclast Formation in Spleen Cell Cultures. *J Bone Miner Res* 2005; 20:23-9.
  93. Liu X, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:225-33.
  94. Maejima-Ikeda A, Aoki M, Tsuritani K, et al. Chick osteocyte-derived protein inhibits osteoclastic bone resorption. *Biochem J* 1997; 322:245-50.
  95. Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *J Cell Biochem* 2002; 85:185-97.
  96. Karsdal MA, Hjorth P, Henriksen K, et al. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem* 2003; 278:44975-87.
  97. Noble BS. Bone microdamage and cell apoptosis. *Cells and Materials* 2003b; 6:46-56.
  98. Martin TJ, Seeman E. New mechanisms and targets in the treatment of bone fragility. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112:77-91.
  99. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* 2002; 17:907-14.
  100. Noble BS, Peet N, Stevens HY, et al. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284:C934-43.
  101. Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone* 1997; 20:273-82.
  102. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335:1095-101.
  103. Clark WD, Smith EL, Linn KA, Paul-Murphy JR, Muir P, Cook ME. Osteocyte apoptosis and osteoclast presence in chicken radii 0-4 days following osteotomy. *Calcif Tissue Int* 2005; 77:327-36.
  104. Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Vaananen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res* 2006; 21:616-25.
  105. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 2000; 15:60-7.
  106. Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone* 2012; 50:1115-22.
  107. Herman BC, Cardoso L, Majeska RJ, Jepsen KJ, Schaffler MB. Activation of bone remodeling after fatigue: Differential response to linear microcracks and diffuse damage. *Bone* 2010; 47:766-72.
  108. Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte Apoptosis Controls Activation of Intracortical Resorption in Response to Bone Fatigue. *J Bone Miner Res* 2009; 24:597-605.
  109. Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimu-



- lation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289:C633-43.
110. Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP, Pavalko FM. Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2004; 75:396-404.
111. Kolpakova E, Olsen BR. Wnt/beta-catenin—a canonical tale of cell-fate choice in the vertebrate skeleton. *Dev Cell* 2005; 8:626-7.
112. Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC, Wysolmerski JJ. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1103-13.
113. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003; 22:6267-76.
114. Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004; 199:805-14.
115. Van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowik CW. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:319-27.
116. Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2006; 199:805-14.
117. Van Bezooijen RL, Bronckers AL, Gortzak RA, et al. Sclerostin in Mineralized Matrices and van Buchem Disease. *J Dent Res* 2009; 88:569-74.
118. Li X, Zhang Y, Kang H, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280:19883-7.
119. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 2005; 280: 26770-5.
120. Semenov MV, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem* 2006; 281:38276-84.
121. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, et al. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004; 35:828-35.
122. Jackson A, Vayssiere B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* 2005; 36:585-98.
123. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever P. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* 2005; 119:1283-96.
124. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 2005; 146:4577-83.
125. Bellido T. Downregulation of SOST/sclerostin by PTH: a novel mechanism of hormonal control of bone formation mediated by osteocytes. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6:358-9.
126. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, et al. Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin. *J Biol Chem* 2008; 9:5866-75.
127. Bozal CB, Sánchez LM, Mandalunis PM, Ubios AM. Efectos tempranos de la estimulación mecánica sobre la expresión de esclerostina en los osteocitos del hueso alveolar. Libro de Actas de la XXVI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral, 2009. (Abstract)
128. Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts—correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995b; 217:640-8.
129. Sun YQ, McLeod KJ, Rubin CT. Mechanically

- induced periosteal bone formation is paralleled by the upregulation of collagen type one mRNA in osteocytes as measured by in situ reverse transcript-polymerase chain reaction. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:456-62.
130. Bacabac RG, Smit TH, Mullender MG, Dijcks SJ, Van Loon JJWA, Klein-Nulend J. Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:823-9.
131. Tang L, Lin Z, Li Y M. Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:122-8.
132. Ponik SM, Triplett JW, Pavalko FM. Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles. *J Cell Biochem* 2007; 15:794-807.
133. Bozal CB. Respuesta temprana del osteocito ante la aplicación *in vivo* de fuerzas mecánicas. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, 2011.