



ACTUALIZACIONES / Reviews

BIFOSFONATOS, CONEXINAS Y APOPTOSIS DE OSTEÓBLASTOS Y OSTEÓCITOS: NUEVO MECANISMO DE ACCIÓN CON IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS

Lilian I. Plotkin, PhD*

Department of Anatomy and Cell Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN. Estados Unidos de América.

Resumen

Los bifosfonatos son drogas ampliamente utilizadas para el tratamiento de patologías en las que hay un aumento en la fragilidad ósea. Estos agentes detienen la pérdida de hueso al inhibir la actividad de los osteoclastos, las células que resorben el hueso. Sin embargo, el modesto efecto de los bifosfonatos en el aumento en la masa ósea no explica completamente la disminución en la incidencia de fracturas observada en individuos tratados con estos agentes. Basados en la falta de correlación entre el aumento de la densidad mineral y la disminución en la incidencia de fracturas, hemos explorado la posibilidad de que parte del efecto beneficioso de los bifosfonatos se debe a la inhibición de la apoptosis de los osteocitos. Los osteocitos, osteoblastos diferenciados que se rodean de matriz ósea, constituyen la mayoría de las células que forman el hueso y, a través de sus prolongaciones, forman una red que recorre el hueso. Debido a su posición en el hueso, los osteocitos constituyen las células ideales para percibir cambios mecánicos u hormonales e iniciar señales que llevan a la reparación del tejido, previniendo el deterioro del hueso y la posibilidad de fracturas. Los osteocitos se comunican entre sí y

con las células en la superficie del hueso a través de canales de conexinas (Cx), especialmente Cx43. Nuestro grupo ha demostrado que los bifosfonatos, aún los que carecen de actividad anti-catabólica, previenen la apoptosis de osteocitos *in vitro* e *in vivo*. La protección de la viabilidad celular requiere la apertura de hemicanales de Cx43, pero es independiente de la activación de las uniones *gap*. La apertura de los hemicanales es seguida por la activación de las quinasas Src y ERKs. Esto lleva a la fosforilación de factores citoplasmáticos y a la inhibición de la apoptosis. Utilizando ratones modificados genéticamente en los cuales la expresión de Cx43 es eliminada de células osteoblásticas, demostramos que Cx43 también es necesaria para el efecto de los bifosfonatos en estas células *in vivo*. Encontramos además que un análogo de los bifosfonatos que no inhibe la acción de los osteoclastos previene la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, la pérdida de masa ósea y la reducción en la habilidad del hueso de resistir fuerzas mecánicas inducidos por glucocorticoides. Estos resultados muestran un nuevo mecanismo de acción desencadenado por la apertura de hemicanales de Cx43, que lleva al mantenimiento de la integridad de la

* Dirección postal: Department of Anatomy and Cell Biology, Indiana University School of Medicine, 635 Barnhill Drive, MS-5035. Indianapolis, IN 46202-5120, USA. Correo electrónico: lplotkin@iupui.edu

red formada por los osteocitos. Esta acción de los bifosfonatos y la posibilidad de disociarla de su acción sobre osteoclastos utilizando análogos que carecen efecto anti-catabólico, abre posibilidades terapéuticas para tratar patologías en las que la disminución en la resorción ósea no es aconsejable.

Summary

BISPHOSPHONATES, CONNEXINS AND APOPTOSIS OF OSTEOCYTES AND OSTEOBLASTS: A NOVEL MECHANISM OF ACTION WITH THERAPEUTIC POTENTIAL

Bisphosphonates are widely used for the treatment of conditions with increased bone fragility. These agents stop bone loss by inhibiting the activity of osteoclasts, the bone resorbing cells. However, the modest effect of bisphosphonates on bone mass cannot completely explain the reduction in fractures observed in patient treated with these agents. Based on the lack of correlation between increased bone mass and decreased fracture incidence, we have explored the possibility that part of the beneficial effect of bisphosphonates on the skeleton is due to prevention of osteocyte apoptosis. Osteocytes, mature osteoblasts that become surrounded by bone matrix, constitute the majority of the cells in bone. Osteocytes and their projections form a network that spreads out throughout the bone. Due to their position within the bone matrix, osteocytes are ideally located to perceive changes in mechanical and hormonal stimuli and to trigger signals that lead to bone repair, preventing the deterioration of the bone quality and the possibility of bone fractures. Osteocytes communicate among themselves and with cells on the bone surface through connexin (Cx) channels, in particular, those formed by Cx43. Work of our group has demonstrated that bisphosphonates, even those that do not have anti-catabolic actions, are able to

prevent osteocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo*. This survival effect requires the opening of Cx43 hemichannels, but it is independent of gap junctions. Hemichannel opening is followed by activation of the kinases Src and ERKs. This leads to the phosphorylation of cytoplasmic factors and to inhibition of apoptosis. Using genetically modified mice in which Cx43 expression was specifically deleted from osteoblastic cells, we have demonstrated that Cx43 is also required for the effect of bisphosphonates on these cells *in vivo*. In addition, we found that a bisphosphonate analog that does not inhibit osteoclast activity is still able to prevent apoptosis of osteoblasts and osteocytes, and the loss of bone mass and strength induced by glucocorticoids. Our studies revealed a novel mechanism of action triggered by opening of Cx43 hemichannels, which results in the maintenance of the osteocytic network. This action of bisphosphonates and its dissociation from their effect on osteoclasts using analogs that lack anti-catabolic actions open new therapeutic possibilities for conditions in which a decreased in bone resorption is not desired.

Los bifosfonatos previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos a través de la activación de las kinasas activadas por señales extracelulares (ERKs)

El hueso está formado por dos tipos celulares que mantienen su estructura y su capacidad mecánica: los osteoblastos y los osteoclastos. Los osteoblastos son las células que forman el hueso, depositando la matriz orgánica formada principalmente por colágeno e induciendo su mineralización. Los osteoclastos, a su vez, resorben el hueso gracias a la acción de enzimas que son secretadas al medio extracelular. Como en otros tejidos que se regeneran continuamente, el número de células maduras en el hueso depende no solamente de la velocidad con que se diferencian los progenitores, pero también de la muerte de las células maduras.¹ En base a observa-



ciones histomorfométricas, realizadas principalmente por el Dr. Michael Parfitt,² se determinó que todos los osteoclastos y aproximadamente el 50% de los osteoblastos mueren por apoptosis. El resto de los osteoblastos se convierten en "lining cells", las células que cubren la superficie en reposo del hueso, o en osteocitos. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso. Derivan de los osteoblastos, luego que estos completaron su función secretoria de matriz ósea y se rodean de dicha matriz. Debido a su ubicación en el hueso y a su habilidad de conectarse entre sí y con células de la superficie ósea, se ha postulado que los osteocitos son las células encargadas de detectar la necesidad de aumentar o disminuir la cantidad de hueso, así como también la presencia de daño localizado en el hueso y de enviar señales que lleven a su reparación. Mientras que la disminución en el número de osteoblastos debido a un exceso en apoptosis resultaría en una tasa de formación ósea disminuida, el aumento en la prevalencia de la apoptosis de osteocitos llevaría a la interrupción de la comunicación entre estas células y la superficie del hueso, con la consecuente disminución de la calidad del hueso y su capacidad mecánica. Efectivamente, numerosos trabajos de nuestro grupo, así como también de otros investigadores, demostraron que en condiciones que resultan en disminución de la masa ósea y aumento de la fragilidad hay un aumento en la apoptosis de osteoblastos y osteocitos; mientras que agentes que mantienen la integridad del hueso previenen la apoptosis de estas células.³⁻¹¹ Basadas en esta evidencia, en estudios hechos bajo la dirección de la Dra. Teresita Bellido investigamos si parte de la acción beneficiosa de los bifosfonatos se debe a la prevención de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos. Utilizando la línea celular osteocítica MLO-Y4, así como también cultivos primarios de células de calvaria, nuestros estudios demostraron que los bifosfonatos previenen la apoptosis inducida por diversos agentes, incluyendo el

glucocorticoide dexametasona y el inhibidor de la reparación de ADN etopósido.¹² Este efecto beneficioso de los bifosfonatos fue observado también *in vivo*, utilizando un modelo animal de enfermedad ósea como consecuencia de la administración excesiva de glucocorticoides¹³ y en animales en los cuales la apoptosis de los osteocitos fue inducida por sobrecarga mecánica.¹⁴

La prevención de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos resultante del tratamiento con bifosfonatos es mediada por un mecanismo de acción diferente a la inhibición de la vía del mevalonato, el mecanismo responsable de la acción de estas drogas en los osteoclastos.¹⁵ Nuestro grupo ha demostrado que los bifosfonatos inducen la activación de ERK1/2,¹³ un reconocido mediador de señales de sobrevivencia.¹⁶ La prevención de la apoptosis y la activación de ERKs es conferida no solamente por los bifosfonatos clásicos que actúan bloqueando la acción de los osteoclastos, sino también por compuestos tales como IG9402 (1-OH-pentane-1,1-bisphosphonate),¹³ o NE1809,¹⁷ que no afectan a los osteoclastos y no inhiben a las enzimas de la vía del mevalonato.¹⁸⁻²¹ Más aún, la concentración de bifosfonatos necesaria para prevenir la apoptosis de osteoblastos y osteocitos es 3 órdenes de magnitud menor que la necesaria para inhibir la actividad de los osteoclastos.^{13,21}

Los bifosfonatos previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos a través de la apertura de hemicanales de conexina 43

La comunicación entre las células que forman la red de osteocitos y los osteoblastos en la superficie del hueso se mantiene a través de uniones o canales *gap*, canales intercelulares que normalmente se encuentran cerrados y que se abren en forma transitoria para permitir el pasaje de moléculas de menos de 1 kDalton.²² Un canal *gap* se forma por la unión de 2 hemicanales en células adyacentes, cada uno compuesto por seis moléculas de conexina. Los hemicanales también se locali-

zan en membranas celulares que están en contacto con el medio extracelular, permitiendo la comunicación entre la célula y el exterior.^{23,24} La conexina más abundante en las células óseas es conexina 43 (Cx43),²⁵⁻³⁰ y su ausencia lleva a la reducción de la expresión de genes específicos de los osteoblastos y a una disminución de la fusión de los osteoclastos y su actividad resorptiva *in vitro*.³¹⁻³⁵ Nuestro grupo ha demostrado que los hemicanales de Cx43, pero no los canales *gap*, son esenciales para la transmisión de las señales de supervivencia de los bifosfonatos *in vitro* y en un ratón en el cual la expresión de Cx43 fue eliminada específicamente en osteoblastos y osteocitos.^{36,37} Más aún, solamente Cx43 (y no otros miembros de esta familia) es capaz de transformar células que no expresan conexinas y no responden a la acción de bifosfonatos en células respondedoras. Esta acción de Cx43 como mediador del efecto anti-apoptótico de los bifosfonatos requiere la molécula intacta, conteniendo la región transmembrana que forma el canal y el dominio C-terminal de la molécula, que se orienta hacia el citoplasma y que interactúa con quinasas y proteínas estructurales, incluyendo a la quinsa Src.^{38,39} Estos resultados permiten agregar a Cx43 a la lista de proteínas de membrana capaces de mediar la transmisión de señales de supervivencia en respuesta a estímulos extracelulares.

La inhibición de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos es mediada por la activación de ERKs en el citoplasma

La mayoría de los agentes que inducen activación de ERKs resultan en la acumulación de las quinasas en el núcleo y la activación de factores de transcripción, lo que lleva a un aumento en la transcripción de genes dependientes de ERKs. Tal es el caso de los esteroides sexuales estrógenos y andrógenos, que también previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos a través de un mecanismo que requiere activación de ERKs y Src.^{7,40,41} En el caso de los bifosfonatos, nues-

tros trabajos han demostrado que el efecto anti-apoptótico de estos agentes mediado por la vía de Cx43/ERK requiere la activación de la quinsa citoplasmática p90^{RSK}, la que a su vez media la fosforilación de la proteína pro-apoptótica BAD y de C/EBP β . La fosforilación de BAD resulta en su inactivación, mientras que la fosforilación de C/EBP β resulta en la formación de un dominio intramolecular que se une a pro-caspasas, inactivándolas independientemente de la función de C/EBP β como factor de transcripción (ver **Figura**). Más aún, estudios recientes demostraron que la proteína β -arrestina es necesaria para que ERKs sean retenidas en el citoplasma, un paso indispensable en la vía de inhibición de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos por acción de los bifosfonatos.⁴² En forma consistente con la evidencia que los bifosfonatos y estrógenos inducen la fosforilación de diferentes tipos de sustratos de ERKs, estos agentes tienen un efecto aditivo en la prevención de la apoptosis de células osteoblásticas.⁴¹

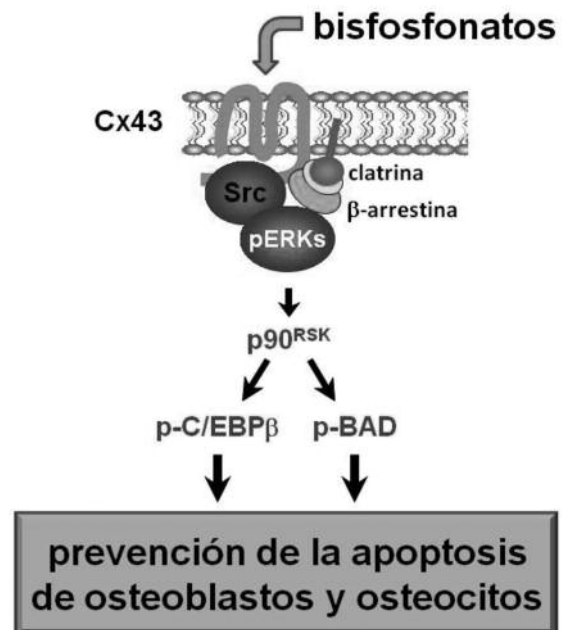


Figura. Vía de señalización activada por los bifosfonatos en osteoblastos y osteocitos.



La inhibición de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos sin afectar la resorción ósea es suficiente para prevenir al menos en forma parcial los efectos deletéreos de la administración de glucocorticoides

Estudios de nuestro grupo, así como también otros investigadores indican que los bifosfonatos no solamente son capaces de frenar la resorción ósea a través de su efecto directo sobre células de linaje osteoclástico,¹⁵ sino que también previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos *in vitro* e *in vivo*.^{13,14,17} Sin embargo, debido a que el efecto anti-resortivo predomina, no es posible determinar la contribución del efecto anti-apoptótico sobre células osteoblásticas en el efecto de los bifosfonatos en el esqueleto. Por ese motivo estudiamos una serie de compuestos análogos de los bifosfonatos tradicionales y encontramos que varios compuestos son capaces de prevenir la apoptosis de osteoblastos y osteocitos sin afectar a los osteoclastos.²¹ La disociación de estos dos efectos fue confirmada recientemente por el grupo del Dr. Brendon Noble.¹⁷ IG9402, uno de los compuestos que no inhibe la vía del mevalonato y no induce la apoptosis de osteoclastos *in vitro*, no afecta los indicadores de formación y resorción ósea cuando es inyectado diariamente a ratones, a diferencia de alendronato, que los reduce. A pesar de no afectar la remodelación ósea, IG9402 es tan efectivo como alendronato en la prevención de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos y de la pérdida de masa y fuerza ósea. En base a estos experimentos podemos concluir que la inhibición de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos contribuye al efecto beneficioso de los bifosfonatos en el esqueleto.

Conclusión

La prevención de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos es parte importante en el modo de acción tanto de agentes anti-catabólicos así como agentes anabólicos.¹ En particular, los bifosfonatos, conocidos por su

acción anti-resortiva, además de inhibir la acción de los osteoclastos, previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos *in vitro* e *in vivo*.¹³ Por lo tanto, parte de sus efectos beneficiosos en el esqueleto se deben a la prolongación de la vida activa de los osteoblastos y al mantenimiento de la red celular formada por los osteocitos. Sin embargo, debido a que los bifosfonatos inhiben la acción de los osteoclastos,⁴³ no es posible determinar la contribución del efecto anti-apoptótico sobre osteoblastos y osteocitos sobre el efecto general de estos agentes. Nuestro grupo ha identificado recientemente un grupo de análogos de los bifosfonatos que previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos sin afectar la actividad de los osteoclastos.^{21,44} Utilizando uno de estos compuestos hemos determinado que la prevención de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos es suficiente para contrarrestar algunos de los efectos deletéreos de los glucocorticoides en ratones, abriendo la posibilidad de la utilización terapéutica de estos compuestos en condiciones en las cuales una disminución del remodelado óseo está contraindicada.

Agradecimientos

Estos trabajos fueron realizados gracias a subsidios de los *National Institutes of Health* R01-AR053643 (L.I.P.) KO2-AR02127, R03 TW006919 y P01-AG13918 (Teresita Bellido), *American Cancer Society Pilot Study Subaward* IRG-91-021-11 (L.I.P.) y un subsidio interno de la Escuela de Medicina, UAMS (L.I.P.).

(Recibido y aceptado: noviembre de 2009)

Referencias

1. Jilka RL, Bellido T, Almeida M, *et al.* Apoptosis in bone cells. En: Principles of Bone Biology (JP Bilezikian, LG Raisz, TJ Martin, editors). San Diego; Academic Press, 2008:237-61.

2. Parfitt AM. Bone-forming cells in clinical conditions. En: Bone: A Treatise (BK Hall, editor). Boca Raton; CRC Press, 1990:351-430.
3. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998; 102: 274-82.
4. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999; 104: 439-46.
5. Bellido T, Plotkin L, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. PTH-mediated control of proteasome-mediated degradation of runx2/cbfa1: a pivotal determinant of the longevity of PTH-initiated anti-apoptosis signaling in osteoblastic cells. *J Bone Min Res* 2002; 17: S128 (Abstract).
6. 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.
7. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001; 104: 719-30.
8. Kousteni S, Chen JR, Bellido T, et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 2002; 298: 843-6.
9. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3128-35.
10. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem* 2007; 282: 27285-97.
11. Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C633-43.
12. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, et al. Inhibition of etoposide-induced apoptosis with peptide aldehyde inhibitors of proteasome. *Biochem J* 1998; 332: 661-5.
13. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104: 1363-74.
14. Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S, Condon K, Burr DB. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* 2007; 40: 1172-7.
15. Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 2004; 75: 451-61.
16. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004; 23: 2838-49.
17. Kogianni G, Mann V, Ebetino F, et al. Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. *Life Sci* 2004; 75: 2879-95.
18. Van Beek E, Lowik C, Que I, Papapoulos S. Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group. *J Bone Min Res* 1996; 11: 1492-7.
19. Brown RJ, Van Beek E, Watts DJ, Lowik CW, Papapoulos SE. Differential effects of aminosubstituted analogs of hydroxy bisphosphonates on the growth of *Dictyostelium discoideum*. *J Bone Min Res* 1998; 13: 253-8.



20. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 235-42.
21. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006; 39: 443-52.
22. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 509-12.
23. Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function. *Mol Membr Biol* 2002; 19: 121-36.
24. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 285-94.
25. Schirrmacher K, Schmitz I, Winterhager E, et al. Characterization of gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif Tissue Int* 1992; 51: 285-90.
26. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest* 1993; 91: 1888-96.
27. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 2014-23.
28. Su M, Borke JL, Donahue HJ, et al. Expression of connexin 43 in rat mandibular bone and periodontal ligament (PDL) cells during experimental tooth movement. *J Dent Res* 1997; 76: 1357-66.
29. Ilvesaro J, Väänänen K, Tuukkanen J. Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Min Res* 2000; 15: 919-26.
30. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 209-17.
31. Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, et al. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 2249-58.
32. Upham BL, Suzuki J, Chen G, et al. Reduced gap junctional intercellular communication and altered biological effects in mouse osteoblast and rat liver oval cell lines transfected with dominant-negative connexin 43. *Mol Carcinog* 2003; 37: 192-201.
33. Ilvesaro J, Tavi P, Tuukkanen J. Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC. Musculoskelet Disord* 2001; 2:10 (Abstract).
34. Schilling AF, Filke S, Rueger JM, Amling M. Signaling via gap junctions is important for the fusion of human osteoclasts in vitro. *J Bone Miner Res* 2002; 17: S348 (Abstract).
35. Ransjo M, Sahli J, Lie A. Expression of connexin 43 mRNA in microisolated murine osteoclasts and regulation of bone resorption in vitro by gap junction inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 1179-85.
36. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277: 8648-57.
37. Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 1712-21.
38. Loo LW, Kanemitsu MY, Lau AF. In vivo association of pp60v-src and the gap-junction protein connexin 43 in v-src-transformed fibroblasts. *Mol Carcinog* 1999; 25: 187-95.
39. Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH. Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43: role in

- the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* 2001; 276: 8544-9.
40. Kousteni S, Han L, Chen JR, *et al.* Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* 2003; 111: 1651-64.
41. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of ERK activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 7317-25.
42. Plotkin LI, Vyas K, Gortazar AR, Manolagas SC, Bellido T. β -Arrestin complexes with connexin (Cx) 43 and anchors ERKs outside the nucleus: a requirement for the Cx43/ERK-mediated anti-apoptotic effect of bisphosphonates in osteocytes. *J Bone Miner Res* 2006; 21: S65 (Abstract).
43. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, *et al.* Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Min Res* 1995; 10: 1478-87.
44. Plotkin LI, Goellner J, Vyas K, *et al.* A bisphosphonate analog that lacks anti-remodeling activity prevents osteocyte and osteoblast apoptosis *in vivo*. *J Bone Miner Res* 2007; 22:S4 (Abstract).



TARSO

Palabra proveniente del griego τάρσος, “cañizo”, probablemente por la similitud de los metatarsianos con cañas.