

Actualizaciones en Osteología 2(3):131-136,2006.

## PREVENCIÓN DE LA APOPTOSIS DE OSTEOCITOS Y OSTEOLASTOS CON BIFOSFONATOS: VÍA DE SOBREVIDA MEDIADA POR HEMICANALES DE CX43 Y LA ACTIVACIÓN DE QUINASAS REGULADAS POR SEÑALES EXTRACELULARES, INDEPENDIENTEMENTE DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates: a survival pathway mediated by Cx43 hemichannels and extracellular signal-regulated kinase activation, independently of gene transcription

TERESITA BELLIDO Y LILIAN I. PLOTKIN\*

*División de Endocrinología y Metabolismo, Centro de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas, Centro de Salud para los Veteranos de Arkansas, Universidad de Arkansas para las Ciencias Médicas, Little Rock, Arkansas, EUA.*

### Introducción

La fragilidad ósea que origina fracturas y discapacidad está asociada a la osteoporosis causada por exceso de glucocorticoides, deficiencia de esteroides sexuales y edad avanzada. Por ello, preservar la fortaleza ósea es el objetivo clave en el manejo de estas condiciones. Mientras que la mayoría de la fuerza del hueso está determinada por la cantidad de mineral, cerca del 40% se debe a otros factores. En realidad, se ha demostrado que la resistencia ósea también está afectada por el tamaño del hueso, las propiedades materiales (mineral, colágeno y microdaños), arquitectura cortical y trabecular y la viabilidad de los osteocitos.<sup>1-3</sup> Es más, los agentes antirresortivos –mejor ejemplificados por los bifosfonatos– mantienen la resistencia del hueso más de lo que puede esperarse por sus efectos sobre la densidad mineral ósea (DMO).<sup>4-5</sup> Específicamente, aunque la DMO aumenta sólo modestamente en los animales y humanos tratados con bifosfonatos, la fragilidad ósea disminuye dramáticamente. Este hecho sugiere que estos agentes ejercen ciertos efectos adicionales sobre los huesos además de frenar la resorción.

Los bifosfonatos son análogos estables del pirofosfato utilizados ampliamente para el tratamiento de las enfermedades que presentan un aumento de la fragilidad ósea.<sup>4-6-7</sup> El principal

efecto de estos agentes es inhibir la resorción ósea. Se cree que la disminución en el desarrollo del progenitor osteoclasto, la disminución del reclutamiento de osteoclastos y la promoción de la apoptosis de osteoclastos maduros, que origina una disminución del remodelamiento óseo, son los principales mecanismos de la acción antirresortiva de los bifosfonatos.<sup>8-9</sup> El mecanismo molecular de la acción de los bifosfonatos sobre los osteoclastos depende de su estructura. Así, los bifosfonatos sin el grupo amino como el clodronato y el etidronato, son metabolizados a análogos tóxicos del ATP, y los que tienen el grupo amino tales como el alendronato, inducen la apoptosis osteoclastica al inhibir las enzimas de la vía del mevalonato.<sup>10</sup>

Además de este efecto directo de los bifosfonatos sobre los osteoclastos, algunos de los efectos sobre la resorción podrían estar mediados indirectamente por su acción sobre las células de linaje osteoblástico. Por ello, las células osteoblásticas tratadas con bifosfonatos exhiben una capacidad reducida para promover la formación de osteoclastos a partir de precursores de la médula o el bazo, e inhiben la resorción ósea mediante los osteoclastos maduros.<sup>11-13</sup>

Asimismo, existe evidencia de que los bifosfonatos afectan directamente a las células del linaje osteoblástico. Se ha demostrado que estos agentes estimulan el desarrollo de progenitores osteoblásticos, como lo evidencia

\* Dirección postal: Division of Endocrinology and Metabolism, University of Arkansas for Medical Sciences. 4301 West Markham, Mail Slot 587, Little Rock, AR 72205, USA. Correo electrónico: lplotkin@uams.edu

el aumento en el número de las unidades formadoras de colonias para los fibroblastos (CFU-F) y de las unidades formadoras de colonia para los osteoblastos (CFU-Ob) *in vitro*, y el número de CFU-F en cultivos *ex-vivo* de médula ósea murina.<sup>14-19</sup> Además, varios bifosfonatos estimulan la proliferación y diferenciación de las líneas de células osteoblásticas y osteoblastos auténticos en cultivo.<sup>15</sup>

Esta evidencia, conjuntamente con el aumento del grosor de las paredes, un índice del aumento local del número de osteoblastos o su actividad,<sup>20-23</sup> ha planteado la posibilidad de que los bifosfonatos puedan no sólo inhibir la resorción y recambio óseo, sino que también pueden tener un efecto positivo sobre la formación de hueso. En efecto, el trabajo de nuestro grupo ha revelado que los bifosfonatos tienen efectos anti-apoptóticos sobre los osteocitos y osteoblastos *in vitro* e *in vivo*.<sup>24</sup> La preservación de la viabilidad de los osteocitos podría contribuir al mantenimiento de la función mecanosensora de la red de osteocitos y la demora en la apoptosis del osteoblasto podría resultar en un aumento del tiempo de trabajo de los osteoblastos, originando el aumento gradual del grosor trabecular observado en animales o pacientes tratados con estos agentes<sup>20-23</sup>. Ambos efectos podrían contribuir a la eficacia anti-fractura de los bifosfonatos. El presente manuscrito revisa los estudios realizados por nuestro grupo durante los últimos 8 años, con el objeto de elucidar el mecanismo del efecto de sobrevida que los bifosfonatos ejercen sobre los osteocitos y osteoblastos.

### **Los bifosfonatos previenen la apoptosis de osteocitos y osteoblastos mediante la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs)**

---

Los estudios realizados en la última década han demostrado que la apoptosis es tan importante como la mitosis para el crecimiento y mantenimiento del esqueleto y ha suministrado información sobre el significado y la regulación molecular de la apoptosis en las células óseas.<sup>25</sup> Todos los osteoclastos mueren por apoptosis luego de completar el ciclo de resorción ósea; la

mayoría de los osteoblastos también mueren mientras que los restantes se convierten en células de revestimiento (*lining cells*) u osteocitos; y aunque los osteocitos son de larga vida, también pueden morir prematuramente.<sup>25-26</sup> La prevalencia de la apoptosis de los osteoblastos es tal que cualquier cambio en su regulación y extensión puede impactar significativamente sobre el número de osteoblastos presentes en los sitios de formación ósea. En realidad, un aumento de la apoptosis osteoblástica es al menos parcialmente responsable de la disminución de formación ósea en la osteopenia inducida por exceso de glucocorticoides;<sup>27</sup> y, por el contrario, la inhibición de la apoptosis de los osteoblastos es el mecanismo más probable del efecto anabólico de la administración intermitente de PTH.<sup>28-29</sup>

Asimismo, se estima que los osteocitos, osteoblastos maduros atrapados en la matriz mineralizada, son las células mecanosensoras responsables de la respuesta adaptativa del esqueleto tanto a estímulos sistémicos como mecánicos, debido a su locación estratégica y capacidad para comunicarse entre ellas y con otras células óseas.<sup>30-32</sup> La apoptosis de osteocitos está incrementada en situaciones de fragilidad ósea aumentada, tales como la osteoporosis por exceso de glucocorticoides<sup>27</sup> y deficiencia de esteroides sexuales.<sup>33-34</sup> Además, una reducción de carga mecánica en los ratones conduce a la apoptosis de los osteocitos, sugiriendo que los niveles fisiológicos de deformación (*strain*) suministran señales de supervivencia a los osteocitos.<sup>35</sup> También, la pérdida progresiva de masa y fortaleza ósea que deviene con la edad está asociada con un aumento de la apoptosis de osteocitos.<sup>36</sup> De manera contraria, la apoptosis de los osteocitos puede prevenirse mediante la estimulación mecánica, los esteroides sexuales, y PTH *in vitro* e *in vivo*.<sup>28-33-34-37-38.</sup>

En base a esta evidencia, investigamos si parte del efecto beneficioso de los bifosfonatos se debe a la prevención de la apoptosis de osteocitos y osteoblastos. Hemos encontrado que los

bifosfonatos inhiben la apoptosis de osteocitos y osteoblastos inducida *in vitro* por el glucocorticoide dexametasona, el inhibidor de la reparación del ADN etopósido, que bloquea la actividad de la topoisomerasa II,<sup>39</sup> y con TNF-alfa, un activador de los receptores de muerte.<sup>40</sup> Más aún, la prevención de la apoptosis de osteocitos y osteoblastos también se observó *in vivo*, en un modelo animal con exceso de glucocorticoides.<sup>24</sup> Los bifosfonatos previenen la apoptosis mediante la activación de las ERKs,<sup>24</sup> reconocidas quinasas de supervivencia.<sup>41</sup> Consistente con un mecanismo de acción diferente del requerido para inducir apoptosis osteoclástica, nosotros<sup>24</sup> y otros<sup>42</sup> encontramos que el efecto anti-apoptótico de los bifosfonatos sobre los osteocitos y osteoblastos no sólo es privativo de los bifosfonatos tradicionales sino también de compuestos tales como el IG9402, 1-OH-pentano-1,1-bifosfonato y NE11809 que no afectan los osteoclastos y no inhiben enzimas de la vía del mevalonato.<sup>43-46</sup> Es más, los bifosfonatos ejercen su efecto anti-apoptótico sobre osteoblastos y osteocitos a concentraciones que son varias órdenes de magnitud más bajas que las requeridas para inducir apoptosis de osteoclastos.<sup>24-46</sup>

### **Los bifosfonatos previenen la apoptosis de osteocitos y osteoblastos mediante la apertura de los hemicanales de conexina 43(Cx43)**

La comunicación intercelular entre células de la red de osteocitos y con osteoblastos se mantiene a través de uniones comunicantes (*gap junctions*), conglomerados de miles de canales que sólo se abren transitoriamente y permiten el intercambio de pequeñas moléculas (<1 kDalton) solubles en agua entre células adyacentes.<sup>32</sup> El canal de la unión comunicante está formado por dos hemicanales suministrados por cada célula adyacente; y, a su vez, cada hemicanal está compuesto por seis moléculas de conexina. Los hemicanales también están presentes en membranas celulares no opuestas y su apertura permite el intercambio del contenido citoplasmático con el fluido extracelular.<sup>47-48</sup> La Cx43 es la principal conexina expresada en los osteocitos y osteoblastos, y también en los osteoclastos.<sup>49-54</sup> La inhibición de la apertura del canal o una

reducción en la función de la Cx43 provoca una expresión reducida de los genes específicos del osteoblasto en cultivos de células osteoblásticas,<sup>55-56</sup> y una disminución de la fusión del precursor osteoclástico y de la resorción ósea osteoclástica *in vitro*.<sup>57-59</sup>

Utilizando fibroblastos embrionarios de ratón, líneas de células osteoblásticas y osteoblastos auténticos expresando o con deficiencia de Cx43, hemos demostrado que los hemicanales hexámeros Cx43, pero no las uniones comunicantes, son los transductores esenciales de los efectos anti-apoptóticos de los bifosfonatos.<sup>60</sup> Además, hemos encontrado que la Cx43 está presente en membranas celulares no comunicantes, y que los osteocitos y osteoblastos expresan hemicanales funcionales de Cx43 que se abren al exponerse al bifosfonato. Asimismo, la transfección de Cx43, pero no de otras conexinas, en células nativas de Cx43 (*Cx43-naïve cells*) le confiere respuesta *de novo* a la droga. La propiedad de transducción de señales de la Cx43 requiere del dominio que forma el poro y del dominio C-terminal de la proteína que interactúa con Src,<sup>61,62</sup> el activador de las ERKs. También, hemos encontrado que se requiere la actividad kinasa del Src y sus dominios SH2 y SH3 para la prevención de la apoptosis de osteocitos y osteoblastos. Esta evidencia suma a la Cx43 a la lista de proteínas transmembrana capaces de transducir señales de supervivencia en respuesta a pistas extracelulares y plantea la posibilidad de que la Cx43 puede servir por esta capacidad para moléculas producidas endógenamente o también otras drogas.

### **Los bifosfonatos y los estrógenos inhiben la apoptosis de osteocitos y de osteoblastos mediante mecanismos moleculares diferentes luego de la activación de las ERKs**

En forma similar a los bifosfonatos, la activación ligando-inducida de los receptores de esteroides sexuales también atenúa la apoptosis de osteocitos y osteoblastos por un mecanismo que requiere la activación de ERKs y Src.<sup>34</sup> Sin embargo, los eventos moleculares que provocan la activación de la vía Src/ERK por acción de los estrógenos y andrógenos son diferentes a los que desencadena la acción del bifosfonato. De esta forma, cualquier clase

de esteroides sexuales activa las ERKs mediante una función extra-nuclear de sus receptores que puede estar mediada por el dominio de unión de las proteínas.

Además, los esteroides sexuales requieren de la activación quinasa-dependiente de los factores de transcripción y de la transcripción génica para ejercer su efecto anti-apoptótico sobre las células osteoblásticas.<sup>63</sup> En cambio, la anti-apoptosis inducida por bifosfonatos no requiere la transcripción ni los factores de transcripción dependientes de ERKs.<sup>64</sup> Por el contrario, la anti-apoptosis mediada por Cx43/ERK inducida por los bifosfonatos requiere de la actividad de quinasas del objetivo citoplasmático de las ERKs, p90<sup>RSK</sup>, que a su vez fosforila a la proteína pro-apoptótica BAD y a la C/EBP-beta, proteína de unión al potenciador CCAAT. La proteína BAD fosforilada se convierte en inactiva, mientras que la fosforilación de C/EBP-beta induce su unión a procaspasas, inhibiendo así la apoptosis independientemente de la actividad transcripcional de este factor de transcripción. Consistente con la evidencia de que los estrógenos y bifosfonatos fosforilan diversos blancos de las ERKs, probablemente como resultado de la activación de *pools* espacialmente distintos de estas quinasas, los dos agentes presentan efectos aditivos sobre la supervivencia del osteocito.

## Conclusión

La creciente evidencia indica que la prevención de la apoptosis de osteocitos y osteoblastos es un importante mecanismo de la eficacia antiosteoporótica de los agentes tanto anticatabólicos como anabólicos. En realidad, los agentes antirresortivos bifosfonatos, además de detener la resorción ósea mediada por osteoclastos, también inhiben la apoptosis de osteocitos y osteoblastos *in vitro* e *in vivo*.<sup>24</sup> Por lo tanto, los efectos beneficiosos de estos agentes sobre el esqueleto pueden deberse en parte al mantenimiento de la integridad de la red de osteocitos y a la prolongación del tiempo de trabajo de los osteoblastos formadores de hueso. Sin embargo, como los bifosfonatos también inducen la apoptosis de osteoclastos,<sup>8</sup> no es posible determinar la contribución de este efecto de supervivencia de osteocitos y osteoblastos sobre el efecto beneficioso global de los bifosfonatos. Recientemente, hemos descrito un novedoso grupo de análogos de bifosfonatos que previenen la apoptosis de osteocitos y osteoblastos *in vitro* sin afectar la viabilidad de los osteoclastos.<sup>46</sup> Futuros estudios utilizando estos compuestos permitirán determinar la relevancia de la prevención de la apoptosis de osteocitos y osteoblastos para los efectos beneficiosos de los bifosfonatos sobre el esqueleto.

(Recibido: Mayo de 2006. Aceptado: Agosto, 2006)

## Referencias

- Weinstein RS. True Strength. *J Bone Min Res* 2000;15:621-25.
- Keen RW. Effects of lifestyle interventions on bone health. *Lancet* 1999;354:1923-24.
- Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther* 2005;27:1-11.
- Cummings SR, Karpf DB, Harris F, Genant HK, Ensrud K, LaCroix AZ, Black DM. Improvement in spine bone density and reduction in risk of vertebral fractures during treatment with antiresorptive drugs. *Am J Med* 2002;112:281-89.
- Watts NB, Cooper C, Lindsay R, Eastell R, Manhart MD, Barton IP, Van Staa TP, Adachi JD. Relationship between changes in bone mineral density and vertebral fracture risk associated with risedronate: greater increases in bone mineral density do not relate to greater decreases in fracture risk. *J Clin Densitom* 2004;7:255-61.
- Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin H, Chabot G, Lanoue G, Travers R. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 1998;339:947-52.
- Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, Thamsborg G, Liberman UA, Delmas PD, Malice MP, Czachur M, Daifotis AG. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:292-99.
- Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Min Res* 1995;10:1478-87.
- Hughes DE, MacDonald BR, Russell RC, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 1989;83:1930-1935.
- Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calif Tissue Int* 2004;75:451-61.

11. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, Yamamoto M, Nagata N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 1996;18:9-14.
12. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993;91:2004-11.
13. Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996;137:2324-33.
14. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 1998;22:455-61.
15. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000;60:6001-7.
16. Mathov I, Plotkin LI, Sgarlata C, Leoni J, Bellido T. ERKs and Calcium channels are involved in the proliferative effect of bisphosphonates on osteoblastic cells *in vitro*. *J Bone Min Res* 2001;16:2050-2056.
17. Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, Chellini F, Gambera D, Ferrata P, Baldi F, Falsetti P, Santucci A, Bocchi L, Marcolongo R. Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone* 2004;35:859-69.
18. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25:4105-15.
19. Pan B, To LB, Farrugia AN, Findlay DM, Green J, Gronthos S, Evdokiou A, Lynch K, Atkins GJ, Zannettino AC. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. *Bone* 2004;34:112-23.
20. Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997;100:1475-80.
21. Balena R, Toolan BC, Shea M, Markatos A, Myers ER, Lee SC, Opas EE, Sedor JG, Klein H, Frankenfield D. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* 1993;92:2577-86.
22. Storm T, Steiniche T, Thamsborg G, Melsen F. Changes in bone histomorphometry after long-term treatment with intermittent, cyclic etidronate for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Min Res* 1993;8:199-208.
23. Boyce RW, Paddock CL, Gleason JR, Sletsema WK, Eriksen EF. The effects of risedronate on canine cancellous bone remodeling: three-dimensional kinetic reconstruction of the remodeling site. *J Bone Min Res* 1995;10:211-21.
24. 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.
25. Boyce BF, Xing L, Jilka RL, Bellido T, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC. Apoptosis in bone cells. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, San Francisco, New York, London, Sydney, Tokyo: Academic Press, 2002:151-68.
26. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Min Res* 1998;13:793-802.
27. 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.
28. 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.
29. Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, Weinstein RS, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem* 2003;278:50259-72.
30. Marotti G, Cane V, Palazzini S, Palumbo C. Structure-function relationships in the osteocyte. *Ital J Min Electrol Metab* 1990;4:93-106.
31. Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol* 1996;101:25-79.
32. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 1981;33:509-12.
33. 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.
34. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719-30.
35. Aguirre JJ, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Min Res* 2006;21:605-15.
36. Parfitt AM, Weinstein RS, Bellido T, Jilka RL, O'Brien CA, Goellner J, Kousteni S, Stewart SA, Roberson PK, Manolagas SC. Age-related Loss of Bone Strength in the Spine and Hindlimb of Mice Independently of BMD. *J Bone Miner Res* 2005;20:S194.

37. 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-C643.
38. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and the targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C934-C943.
39. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, Pignatti C, Farruggia G, Masotti L, Guarnieri C, Calderera CM. Inhibition of etoposide-induced apoptosis with peptide aldehyde inhibitors of proteasome. *Biochem J* 1998;332:661-65.
40. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-8.
41. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004;23:2838-49.
42. Kogianni G, Mann V, Ebetino F, Nuttall M, Nijweide P, Simpson H, Noble B. Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. *Life Sci* 2004;75:2879-95.
43. 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;11:1492-97.
44. 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;13:253-58.
45. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ. 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.
46. 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; doi:10.1016/j.bone.2006.02.060.
47. Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function. *Mol Membr Biol* 2002;19:121-36.
48. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:285-94.
49. Schirrmacher K, Schmitz I, Winterhager E, Traub O, Brümmer F, Jones D, Bingmann D. Characterization of gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif Tissue Int* 1992;51:285-90.
50. 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.
51. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Min Res* 1997;12:2014-23.
52. Su M, Borke JL, Donahue HJ, Li Z, Warshawsky NM, Russell CM, Lewis JE. Expression of connexin 43 in rat mandibular bone and periodontal ligament (PDL) cells during experimental tooth movement. *J Dent Res* 1997;76:1357-66.
53. Ilvesaro J, Väänänen K, Tuukkanen J. Bone-Resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Min Res* 2000;15:919-26.
54. 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.
55. Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 1998;9:2249-58.
56. Upham BL, Suzuki J, Chen G, Wang Y, McCabe LR, Chang CC, Krutovskikh VA, Yamasaki H, Trosko JE. 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.
57. Ilvesaro J, Tavi P, Tuukkanen J. Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC Musculoskelet Disord* 2001;2:10.
58. 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.
59. 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.
60. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002;277:8648-57.
61. 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.
62. 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;276:8544-49.
63. Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin LI, Bellido T, Manolagas SC. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* 2003;111:1651-64.
64. 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.