

Implicación de la Cx43 y el cilio primario en la actividad de los osteocitos

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2020000400005>

Herederó-Jiménez S, Tirado-Cabrera I, Martín-Guerrero E, Ardura Rodríguez JA, R Gortázar A

Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU. Madrid (España)

Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo CEU. Madrid (España)

Fecha de recepción: 09/11/2020 - Fecha de aceptación: 30/01/2021

Trabajo remitido como prestación por una beca para asistir al 39º Congreso de la ASBMR (Denver, 2017)

Resumen

Objetivo: El tejido óseo tiene la capacidad de adaptarse a los estímulos del entorno alterando su morfología y metabolismo. Las diferentes células óseas se comunican entre sí a través de uniones comunicantes (UCs). La conexina 43 (Cx43) es la proteína más abundante de las UCs; tiene funciones clave en la transducción de señales y en la respuesta a estímulos hormonales y mecánicos. Otro elemento mecanosensor de los osteocitos es el cilio primario, formado por microtúbulos y que se desarrolla en la fase G0 del ciclo celular.

Los objetivos de este estudio fueron determinar la implicación de la Cx43 y del cilio primario en la actividad de los osteocitos, analizar la posible interacción entre estos dos mecanosensores, y evaluar el papel que desempeñan en la detección y respuesta de los osteocitos ante el estímulo mecánico y la estimulación del receptor de la parathormona tipo 1 (PTH1R) por su ligando, la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) (1-36).

Material y métodos: Se comparó la línea celular de osteocitos MLO-Y4 control (Cx43+/+) con MLO-Y4 deficientes en Cx43 (Cx43/-). El análisis de expresión de la proteína del transporte intraflagelar 88 (IFT88), de la Cx43 y de la fosforilación de la quinasa reguladora de la señal extracelular (P-ERK) se determinó mediante Western blot. Para caracterizar la posible colocalización entre el cilio primario y Cx43 se realizó una inmunofluorescencia. Para simular el estímulo mecánico *in vitro*, las células se sometieron a un estrés mecánico de 10 dinas/cm² por flujo de fluido durante 10 minutos.

Resultados: Los resultados obtenidos muestran que el número de células con cilio primario no varía por la expresión de Cx43 (p=0,089); y que en las células con presencia en Cx43, el estímulo mecánico por flujo de fluido y la PTHrP aumentan la fosforilación de quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) respecto a las células no estimuladas (p=0,049 y p=0,011, respectivamente).

Conclusiones: El cilio primario y la Cx43 actúan como elementos mecanosensores de los osteocitos. La deficiencia en Cx43 no influye en la ciliogénesis ni en la activación por parte del estímulo mecánico de las rutas de señalización pro-supervivencia en los osteocitos.

Palabras clave: osteocitos, conexina 43, cilio primario, estímulo mecánico, PTHrP.

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo tiene la capacidad de adaptarse a los estímulos del entorno mediante la alteración de su morfología y de su metabolismo¹.

La formación, la remodelación y la reparación del tejido óseo son procesos dinámicos regulados por la acción conjunta de las células óseas (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos). Los osteocitos son el tipo celular más abundante en el hueso. Se localizan en la matriz ósea mineralizada, formando una extensa red de intercomunicación celular; denominada sistema lacuno-canalicular osteocitario (SLCO). Los osteocitos son las principales células mecanosensoras del hueso², es decir, son capaces de detectar los estímulos mecánicos de su entorno y comunicar dicha señal a las células efectoras (osteoblastos y osteoclastos). Presentan diferentes estructuras mecanosensoras: los canales iónicos,

las integrinas³, el ligando del receptor de la parathormona tipo 1 (PTH1R), las conexinas⁴ y el cilio primario. Se ha constatado que algunos de estos mecanosensores interactúan entre sí, permitiendo la integración de las múltiples señales extracelulares³.

El estímulo mecánico regula la remodelación ósea. La desregulación de este proceso produce osteoporosis, una patología que se caracteriza por la disminución de la masa ósea y el aumento de su fragilidad⁵.

Los osteocitos responden al estímulo mecánico gracias a la activación de diversas vías de señalización, como la proteína tipo Wntless (Wnt)/β-catenina, y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y Hedgehog (HH). En este trabajo se analizan algunas moléculas que intervienen en estas vías de señalización, específicamente la P-ERK y la ERK.



Correspondencia: Arancha R. Gortázar (argortazar@ceu.es)

Para el mantenimiento de la homeostasis del tejido óseo es fundamental la interacción entre las células que lo conforman⁶. La comunicación celular a través de uniones comunicantes (UCs) es una de las más importantes, permitiendo la interacción entre los citoplasmas de células adyacentes y, por tanto, la difusión intercelular de moléculas pequeñas⁷. Las UCs no solo sirven como canales pasivos, también intervienen en la regulación de diferentes rutas de señalización⁸.

Las Cxs son proteínas transmembrana que se denominan por su peso molecular, de 26 a 59 kDa. La Cx43 es la proteína más abundante en las UCs de las células óseas. Las conexinas, en particular la Cx43, interactúan con las moléculas estructurales y de señalización, regulando las funciones celulares^{9,10}.

El cilio primario es una estructura basada en microtúbulos; en el que se localizan numerosos canales y proteínas receptoras, que permiten la actuación del cilio como mecanosensor^{11,12}. El PTH1R es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), que se expresa en los cilios primarios y tiene un papel fundamental en la transducción de señales mecánicas en células MLO-Y4¹³. Este receptor presenta dos ligandos ampliamente caracterizados: la PTH y la PTHrP (proteína relacionada con la parathormona). Tanto la PTH como la PTHrP tienen efectos en la formación ósea y son utilizados como agentes anabólicos en el tratamiento de la osteoporosis^{13,14}.

También se ha demostrado que la estimulación por PTHrP y la estimulación mecánica por flujo de fluido inducen la activación de ERK, impidiendo así el aumento de la apoptosis de células osteocíticas¹⁵.

En el presente estudio se hipotetizó que el cilio primario y la Cx43 actúan de manera conjunta en la regulación de vías de señalización implicadas en la supervivencia celular y en la capacidad de adhesión celular. Se determinó la expresión del cilio primario, tanto en células Cx43+/+ como en Cx43-/- y la no colocalización de estos dos mecanosensores. Por tanto, se sugiere que la deficiencia en Cx43 no está involucrada en el desarrollo del cilio primario, pero sí podría influir en otros aspectos, como su funcionalidad, longitud o en el transporte intraflagelar.

Asimismo, se analizó la respuesta celular de los osteocitos (fosforilación de ERK) tras estimular el PTH1R, tanto con PTHrP, obteniéndose un mayor aumento de P-ERK en las células Cx43-/- respecto a Cx43+/+, como mecánicamente, que produjo un aumento de la expresión de P-ERK independiente de la deficiencia en Cx43.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

En este proyecto se trabajó con la línea continua de osteocitos MLO-Y4 de huesos largos murinos Cx43+/+, utilizadas como control, y deficientes en Cx43 (Cx43-/-), que fueron cedidas amablemente por la Dra. L. I. Plotkin.

Dichas células se sembraron a una concentración de 24.000 células/cm². Se cultivaron con el medio *α-Modified Eagle's Medium* (α -MEM) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, España), suplementado con 2,5% de suero de ternero (*Calf Serum*; CS), 2,5% de suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*; FBS), 1% de L-Glutamina, 1% de Penicilina/Estreptomina y Puromicina (de *Streptomyces alboniger*, Sigma Aldrich, BioReagent, Merck, España) a una concentración 10 μ g/ml.

Para favorecer el desarrollo del cilio primario, las células se cultivaban en medio de depleción, compuesto por α -MEM (Gibco™) suplementado con 1% de peni-

lina/estreptomina y puromicina a una concentración de 10 μ g/ml, durante 24 h.

Todas las superficies sobre las que se sembraron estas células debían estar previamente colagenizadas, con colágeno tipo I al 0,01% de ácido acético, para simular la matriz de colágeno donde se encuentran embebidos los osteocitos *in vivo*. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂.

2. Western blot

Se extrajo la proteína total de las células empleando el buffer RIPA (Sigma-Aldrich, Merck, España), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Calbiochem, Merck, España).

Posteriormente, se procedió a la cuantificación de proteínas mediante el ensayo de ácido bicinónico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, España), que genera una reacción colorimétrica detectable a 562 nanómetros (nm). Para realizar la lectura se utilizó el lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific), mediante el programa SkanIt Software 2.4.3 RE.

Los extractos de proteína (20 μ g) se separaron mediante un gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones reductoras; posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.). El bloqueo se realizó con leche en polvo al 5%, en tampón Tris salino con Tween20 (TTBS) al 0,05%, durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se pusieron en agitación entre 15-18 h y 4°C los siguientes anticuerpos primarios: anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EE.UU.), anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) y anti-Cx43 (Sigma Aldrich, ST. Louis, Missouri, EE.UU.) y anti-tubulina (Sigma Aldrich). Todos son anticuerpos policlonales producidos en conejo, menos la anti-tubulina que es monoclonal producido en ratón. Después se incubó durante una hora a temperatura ambiente, con la correspondiente IgG acoplada a peroxidasa, y se reveló la membrana mediante quimioluminiscencia con el sustrato Clarity™ Western ECL (Bio-Rad, Life Science Research, España). La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría, usando DNR Bio Imaging System MF ChemiBIS3.2 y los programas Gelcapture y QuantityOne™ (Bio-Rad).

3. Inmunofluorescencia

Se sembraron 30.000 células/pocillo de las placas multipocillo (Falcon®, Thermo Fisher Scientific, España). Las células se crecieron hasta que alcanzaron una confluencia del 80%; y posteriormente se añadió medio de depleción durante 24 h para inducir la formación del cilio primario. Después, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5%. Seguidamente, se añadió la solución de bloqueo, compuesta por albumina de suero bovino (BSA) al 10%, suplementado con suero de cabra al 5%, durante 1 h. Posteriormente, se mantuvieron en agitación durante 15-18 h a 4°C los siguientes anticuerpos primarios: anti-Cx43 policlonal producido en conejo (Sigma Aldrich) y anti- α tubulina acetilada monoclonal producido en ratón (Sigma Aldrich), para observar así el cilio primario. A continuación, se dispusieron los anticuerpos secundarios: para cilio Alexa fluor® 488 de cabra anti-ratón (Invitrogen Molecular probes, Thermo Fisher Scientific™, España), y para Cx43, Alexa fluor® 568 anti-conejo IgG (Life technologies, Thermo Scientific™, España) (dilución 1:1000 en BSA al 10% y suero de cabra al 5%). Tras 1 h de incuba-

ción, se añadió 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los núcleos, el cilio primario y la Cx43 se visualizaron con el microscopio de fluorescencia (Leica CTR 6000). La fusión (*merged*) de las imágenes individuales del cilio primario, la Cx43 y núcleos celulares en una sola se realizó con el programa ImageJ.

4. Estimulación mecánica mediante flujo de fluido (*fluid flow*) y por PTHrP

Para realizar la estimulación mediante flujo de fluido (FF) y PTHrP, las células se sembraron en portaobjetos de cristal delimitados con teflón a una densidad de 25.000 células/cm². La técnica del FF se basa en bombear medio de cultivo de forma constante sobre la monocapa celular, en un circuito cerrado herméticamente, a 10 dinas/cm² durante 10 min, mediante una bomba peristáltica (Flexcell International Corp., Hillsborough, Carolina del Norte, EE.UU.). Las configuraciones del tiempo y frecuencia se establecieron a través del programa Master Flex Peristaltic Pump 2010. Por otro lado, se realizó la estimulación con PTHrP (1-36) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) a una concentración de 10⁻⁷ molar (M), durante 10 min. El mismo número de portaobjetos se cultivó con células que no fueron sometidas a ningún estímulo, constituyendo los controles estáticos (CE).

5. Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los resultados, los datos se expresan como media ± desviación estándar de al menos dos experimentos llevados a cabo por triplicado. Se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 8 (software GraphPad, La Jolla, California, EE.UU.). Para comparar medias entre dos grupos se llevó a cabo el test no paramétrico Mann-Whitney, y para comparar medias de más de dos grupos se empleó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Los análisis múltiples se llevaron a cabo mediante el test de Dunn. En todos los test estadísticos el intervalo de confianza establecido fue del 95%. Por tanto, se consideraron estadísticamente significativos los resultados con un valor de p<0,05.

RESULTADOS

1. Efecto de la Cx43 en el desarrollo del cilio primario en células Cx43+/+ y Cx43-/-

Los resultados obtenidos mediante Western blot nos indican que en las células deficientes en Cx43 la expresión de esta proteína disminuye significativamente con respecto a las células control Cx43+/+ (W=0, p=0,029), lo que nos permite corroborar la deficiencia de esta proteína (Figura 1). Además, se caracterizó la presencia del cilio primario mediante el análisis de expresión de la proteína IFT88. Se empleó IFT88 como marcador de la presencia de cilio primario, dado que es una proteína que se expresa de manera muy abundante en este orgánulo, debido a que está involucrada en el transporte intraflagelar, necesario para la ciliogénesis¹⁸. Se observó que la proteína IFT88 se expresa de forma similar, independientemente de la deficiencia en Cx43 (W=4, p=0,343).

Asimismo, se analizó la Cx43 y el cilio primario mediante inmunofluorescencia para intentar determinar la posible interacción entre estos dos mecanosensores. La figura 2 muestra que tanto las células Cx43+/+ como las Cx43-/- desarrollan cilio primario, que se evidencia por la presencia del anticuerpo primario anti α -tubulina acetilada, y que este orgánulo se origina desde la superficie celular. También, se puede ver que la Cx43 se expresa fundamentalmente en la membrana celular, por lo que posiblemente se encuentre formando UCs. Además, parece observarse que el cilio primario no colocaliza con la Cx43. Por otra parte, se realizaron contajes de las células que presentaban cilio primario, a partir de nueve fotografías tomadas en distintos campos, con el microscopio de fluorescencia. En cada imagen se cuantificó el número (Nº) de células (cel.) totales y el número de células que presentaban cilio primario, y se calculó el cociente (Nº de cel. con cilio/Nº de cel. totales), tanto para la línea celular Cx43+/+ como para Cx43-/- (Tabla 1 y figura 3). En estos resultados se constató que el número de cilios formados no difería significativamente (p=0,089) entre las dos líneas celulares (Cx43+/+ y Cx43-/-).

Figura 1. Expresión de Cx43 e IFT88. A) Resultado del revelado de la membrana de nitrocelulosa para el análisis de Cx43, IFT88 y tubulina como control de carga, se utilizaron extractos de proteínas celulares totales (25 μ g). En el primer carril se dispuso el marcador de peso molecular (PM); los cuatro carriles siguientes pertenecen a cuatro réplicas de células MLO-Y4 control (Cx43+/+) y los cuatro últimos corresponden a cuatro réplicas de células MLO-Y4 deficientes en Cx43 (Cx43-/-). B) Promedio ± desviación estándar de Cx43/tubulina. C) Promedio ± desviación estándar de IFT88/tubulina. Los niveles proteicos se normalizaron frente a tubulina *p<0,05

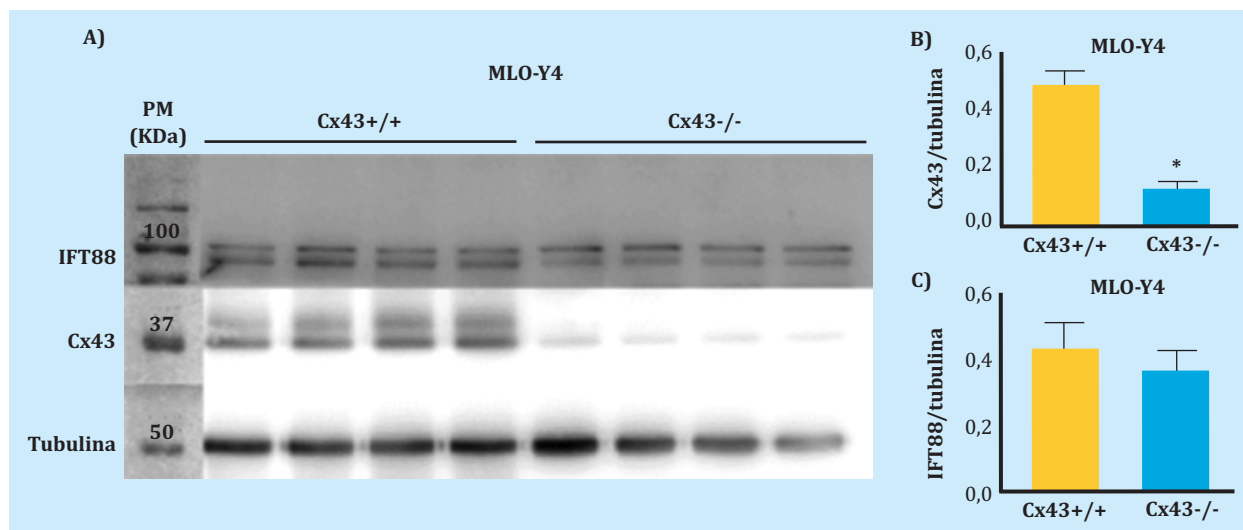


Figura 2. Inmunofluorescencia realizada con osteocitos de la línea MLO-Y4 (A) Cx43+/+ y (B) Cx43-/. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul), se utilizó anticuerpo anti α -tubulina acetilada para marcar el cilio primario (verde), anticuerpo anti Cx43 para marcar la Cx43 (rojo) y el merged. Las imágenes fueron realizadas con el objetivo de inmersión a 63X. Barra de escala = 16 μ m

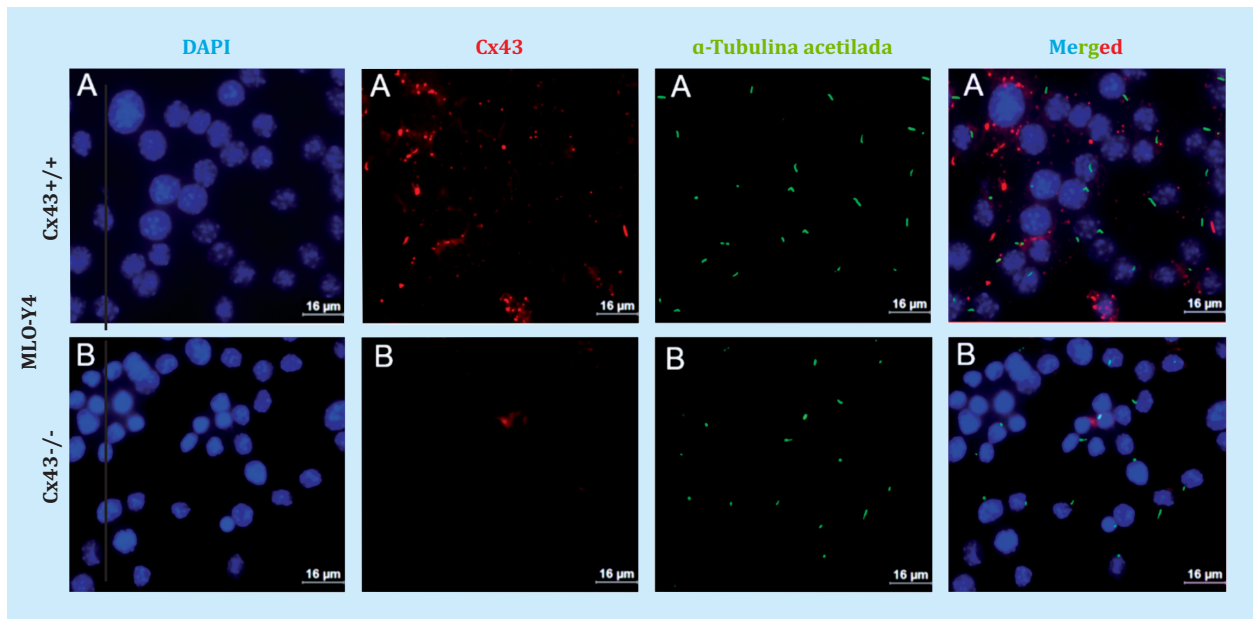


Tabla 1. Contajes de las células (cel.) que presentan cilio primario en las líneas MLO-Y4 Cx43+/+ y Cx43

Nº de foto	Nº de cel. totales Cx43+/+	Nº de cel. con cilio Cx43+/+	Nº de cel. con cilio/Nº cel. totales Cx43+/+ (%)	Nº de cel. totales Cx43-/-	Nº de cel. con cilio Cx43-/-	Nº de cel. con cilio/Nº cel. totales Cx43-/- (%)
1	96	43	44,792	94	41	43,617
2	93	44	47,312	84	36	42,857
3	95	41	43,158	93	20	21,505
4	110	51	46,364	77	33	42,857
5	103	56	54,369	91	24	26,374
6	77	32	41,558	125	55	44,000
7	66	33	50,000	106	61	57,547
8	95	44	46,316	104	49	47,115
9	111	52	46,847	195	69	35,385

Figura 3. Nº de células con cilio/Nº de células totales (%) en las líneas Cx43+/+ y Cx43-/. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar

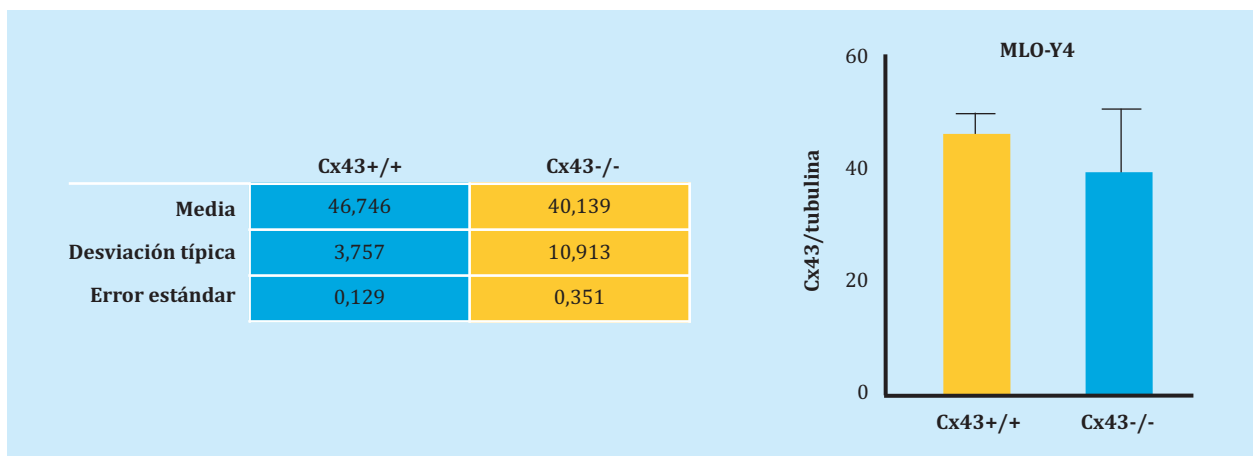
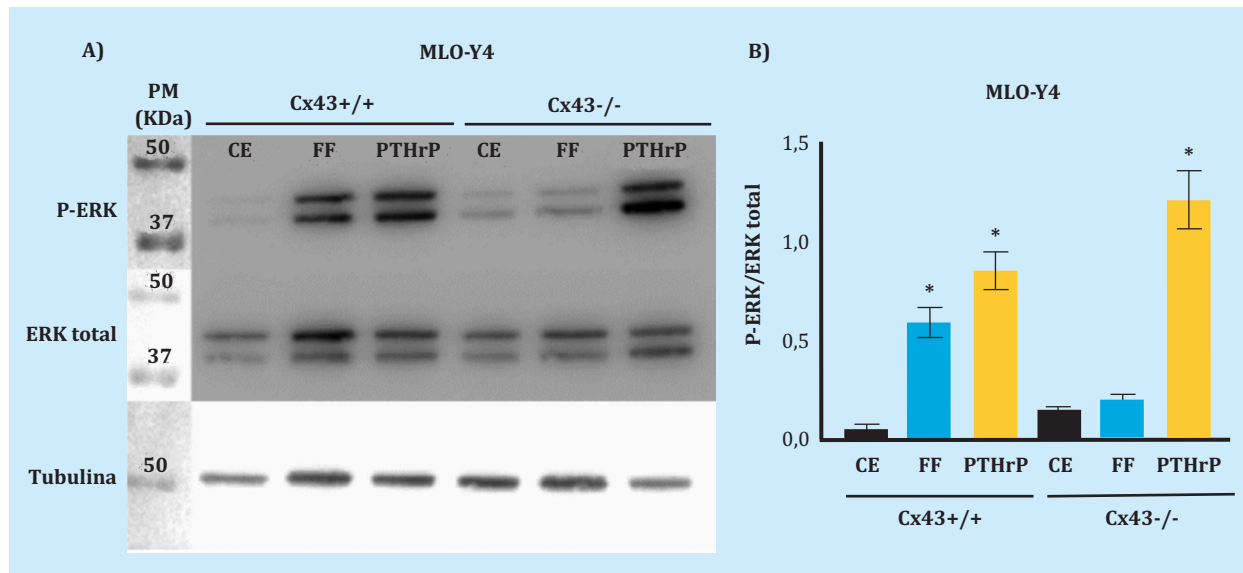


Figura 4. Análisis de P-ERK tras la estimulación mecánica y con PTHrP. Tras la estimulación mecánica y la estimulación con PTHrP, se evaluaron los cambios en los niveles proteicos, mediante Western blot, de P-ERK en extractos de proteína celular total, de las líneas celulares Cx43+/+ y Cx43-/-, que se estimularon o no (control estático, CE). Se utilizaron ERK total y tubulina para normalizar. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de un experimento por duplicado de cada condición experimental vs. CE



2. Efecto del estímulo mecánico y de PTHrP en células Cx43+/+ y Cx43-/-

En varios estudios se ha determinado que la estimulación mecánica inhibe la apoptosis de los osteocitos, mediante un mecanismo que implica la fosforilación de MAPK como ERKs¹⁶. Con este experimento se pretendía analizar si la deficiencia en Cx43 alteraba el efecto que tiene el estímulo mecánico en los osteocitos y determinar si la Cx43 interviene en la activación del receptor PTH1R, tras estimularlo con uno de sus ligandos, PTHrP. Para caracterizar los efectos que desencadenan la estimulación mecánica y la estimulación con PTHrP en las células MLO-Y4, se analizó mediante Western blot la expresión de P-ERK.

Se aplicó el test Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias entre los grupos Cx43+/+ y Cx43-/- para las condiciones: CE, FF y PTHrP. El resultado del test indicó que había diferencias entre algunos de los grupos ($p=0,0005$). Para determinar entre qué grupos, se realizó el test de comparaciones múltiples Dunn, que mostró que tanto el estímulo mecánico (FF) ($p=0,049$) como el estímulo con PTHrP ($p=0,017$) inducen el aumento significativo de la fosforilación de ERK respecto a las células no estimuladas (control estático, CE); en la línea celular MLO-Y4 Cx43+/+. Este resultado evidencia que los estímulos extracelulares favorecen la activación de la vía de señalización Src/ERK, que promueve la supervivencia celular. En el caso de las MLO-Y4 Cx43-/- se observa que tras la estimulación mecánica (FF), P-ERK no aumenta significativamente respecto a CE ($p=0,955$). Sin embargo, cuando estimulamos con PTHrP la fosforilación de ERK aumenta significativamente ($p=0,025$) (Figura 4).

DISCUSIÓN

Las conexinas y el cilio primario son elementos mecanosensores de las células óseas, desempeñando un papel fundamental en la detección de estímulos y transmisión de señales³.

Los resultados obtenidos mediante Western blot confirman que la línea celular Cx43-/- utilizada en el experimento era deficiente en esta proteína, pues el nivel de expresión de Cx43 disminuía significativamente en comparación con la línea Cx43+/+. También se analizó la expresión de la proteína IFT88, ya que en estudios previos se empleaba como marcador de la presencia del cilio primario¹⁷. Según los resultados obtenidos, se puede concluir que no existen diferencias significativas en la expresión de la proteína IFT88 entre las líneas Cx43+/+ y Cx43-/. Los resultados del análisis de IFT88 mediante Western blot, por sí solos, no permiten asegurar que el cilio primario se esté desarrollando correctamente, debido a que la proteína IFT88 podría estar expresándose en otro compartimento celular distinto al cilio primario. Por tanto, para comprobar si la deficiencia en Cx43 influye en la formación del cilio primario, se analizó la expresión de este orgánulo y de la Cx43 mediante inmunofluorescencia. Se observó que tanto las células Cx43+/+ como las células Cx43-/- desarrollaron cilio primario; asimismo, se constató que el número de cilios formados no difería significativamente entre las dos líneas celulares. Además, parece observarse que la Cx43 y el cilio primario no colocalizan; y que en las células Cx43+/+, la Cx43 se encuentra en la membrana plasmática de la célula, que sería la localización esperada, pues es donde forma las UCs.

Investigaciones previas han demostrado que las células MLO-Y4 son un modelo óptimo para realizar estudios de estimulación mecánica¹⁶. No obstante, para poder extrapolar los resultados obtenidos en estos estudios *in vitro* a las auténticas condiciones *in vivo*, es necesario trabajar con estímulos mecánicos que reproduzcan y generen respuestas similares a las que se producen en la situación fisiológica. Actualmente, el flujo de fluido (FF) sobre una monocapa de células osteocíticas es la técnica que más se aproxima a esta situación¹⁸.

La diana molecular elegida como indicador de la viabilidad de la línea MLO-Y4 fue P-ERK, porque su activación tras la estimulación mecánica es un indicador de

supervivencia en células osteocíticas^{16,18}. De acuerdo con las investigaciones mencionadas, se observó que el estímulo mecánico mediante FF induce el aumento en la expresión de P-ERK^{16,18}. Por tanto, se interpreta que el FF promueve la supervivencia de las células MLO-Y4.

Por otro lado, el sistema PTHrP/PTH1R también es fundamental en la regulación del remodelado óseo. Resultados preliminares sugieren que el PTH1R es clave en la respuesta anabólica ósea en respuesta a la estimulación mecánica *in vivo*. Se ha demostrado que este receptor actúa como mecanorreceptor en células osteoblásticas¹³. Los resultados del estudio efectuado indican que la administración exógena de PTHrP (1-36) (ligando del PTH1R) protege de la apoptosis de modo similar al de la estimulación mecánica en los osteocitos, debido a que induce el aumento de la expresión de P-ERK. De manera similar, estudios anteriores constataron que la PTHrP, al igual que la PTH, posee propiedades anti-apoptóticas en osteocitos¹⁶.

CONCLUSIONES

1. El número de células con cilio primario no varía por la expresión de Cx43.
2. El cilio primario y la Cx43 actúan como mecanosensores de los osteocitos.
3. El estímulo mecánico inducido mediante flujo de fluido (FF) promueve la supervivencia de las células MLO-Y4, independientemente de la deficiencia en Cx43, pues provoca un aumento en la expresión de P-ERK, tanto en células Cx43+/+ como en Cx43-/-.
4. La administración exógena de PTHrP (1-36) (ligando del PTH1R) produce un aumento de P-ERK en las células Cx43+/+ y Cx43-/- . No obstante, este aumento es mucho mayor en las células Cx43-/- . Por tanto, se sugiere que la Cx43 está inhibiendo al receptor PTH1R, lo que provoca que, tras la unión de su ligando PTHrP, la ruta de activación en la que interviene P-ERK no se active completamente.



Conflicto de intereses: Lo autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Matthew RA, Kelly K. Skeletal Imaging. In: Burr DB, Allen MR. Basic and Applied Bone Biology. 1ª ed. USA: Academic Press; 2013. p. 105-209.
2. Rupp M, Merboth F, Daghma DE, Biehl C, El Khassawna T, Heiß C. Osteocytes. Z Orthop Unfall. 2019;157(2):154-63.
3. Geoghegan IP, Hoey DA, McNamara LM. Integrins in osteocyte biology and mechanotransduction. Curr Osteoporos Rep. 2019;17(4):195-206.
4. Jiang JX, Cherian PP. Hemichannels formed by connexin 43 play an important role in the release of prostaglandin E(2) by osteocytes in response to mechanical strain. Cell Commun Adhes. 2003;10(4-6):259-64.
5. Tu KN, Lie JD, Wan CKV, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. P T. 2018;43(2): 92-104.
6. Plotkin LI, Laird DW, Amedee J. Role of connexins and pannexins during ontogeny, regeneration, and pathologies of bone. BMC Cell Biol. 2016;17(1):19-28.
7. Loiselle AE, Jiang JX, Donahue, HJ. Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. Bone. 2013;54(2):205-12.
8. Xu H, Gu S, Riquelme MA, Burra S, Callaway D, Cheng H, et al. Connexin 43 channels are essential for normal bone structure and osteocyte viability. J Bone Miner Res. 2015;30(3):436-48.
9. Solan JL, Lampe PD. Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2018; 1860(1):83-90.
10. Giepmans BN. Role of connexin43-interacting proteins at gap junctions. Adv Cardiol. 2006;42(1):41-56.
11. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk, RS. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. Cell Commun Signal. 2009;7(4):2-15.
12. Hoey DA, Downs ME, Jacobs CR. The mechanics of the primary cilium: an intricate structure with complex function. J Biomech. 2012;45(1):17-26.
13. Schwartz EEA, Leonard ML, Bizios R, Bowser SS. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. Am J Physiol. 1997;272(1):132-8.
14. Maycas M, Ardura JA, Castro, LF, Bravo B, Gortázar A R, Esbrit P. Role of the parathyroid hormone type 1 receptor (pth1r) as a mechanosensor in osteocyte survival. J Bone Miner Res. 2015; 30(7):1231-44.
15. Sleeman A, Clements JN. Abaloparotide: A new pharmacological option for osteoporosis. Am J Health Syst Pharm. 2019;76(3):130-5.
16. Maycas M. (2016). Mecanismos moleculares implicados en la mecanotransducción osteocítica. Alteraciones en la osteopatía diabética y efecto compensador de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Páginas 4-138.
17. 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(3):633-43.
18. Yuan X, Serra RA, Yang S. Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. Ann N Y Acad Sci. 2014;1335(1):78-99.