

Premio:
«Evaluación de la actividad resortiva
de macrófagos de línea
celular humana y de ratón fusionados con PEG»

Carlos A. Guerrero^{1*}, M. Andrea. Murillo¹, Carmen. A. Cardozo de Martinez²

Resumen

Los osteoclastos son células grandes multinucleadas, tienen diferentes características que incluyen la expresión de la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), receptor de calcitonina (RCT) y la capacidad de resorber hueso. Su origen no se ha dilucidado plenamente, sin embargo hay evidencias que sugieren que los osteoclastos proceden de la fusión de precursores mononucleares pertenecientes al linaje monocito/macrófago. En este trabajo quisimos evaluar si es la fusión *per se* la que promueve la actividad de los osteoclastos o si se requiere activación previa de los precursores de osteoclastos con hormonas osteoclastogénicas. Para responder esta pregunta fusionamos artificialmente macrófagos de la línea celular U937/A (humanos) o J774 (ratón) con polietilenglicol (PEG) en un estado no confluyente del cultivo. Se evaluó la capacidad de formación de "TRAP positive multinuclear cell" (TPMNC) y su capacidad resortiva sobre láminas de hueso bovino tanto en macrófagos sin estimular como pre estimulados con hormona paratiroidea (PTH), $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, dexametasona, RANKL o BMP2. Los resultados mostraron que al fusionar macrófagos con PEG de ambas líneas se aumentó el número de células TRAP positivas al igual que su capacidad resortiva. Además la confluencia del 100% y la sincronización de las células en metafase y Go aumentan la formación de TPMNC. Respecto a las hormonas, la PTH ($0.01\mu M$) aumentó la capacidad

resortiva de las TPMNC, mientras que la $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, dexametasona, RANKL y BMP2 disminuyeron dicha capacidad. Concluimos que la fusión de macrófagos de las líneas celulares U937/A o J774 con PEG induce la formación de células multinucleadas con actividad resortiva y en todos los experimentos se demostró que es la fusión *per se*, más no los estímulos con hormonas osteoclastogénicas, excepto PTH, el evento que lleva a la formación de células con actividad resortiva. (El artículo completo está siendo sometido para publicación por la revista «Bone» y consta de 15 figuras no presentadas aquí).

Palabras claves: Fusión de macrófagos, osteoclasto, polietilenglicol, TRAP, resorción ósea.

Introducción

El hueso tiene un recambio constante como resultado de la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos, en el cual los osteoclastos degradan la matriz orgánica e inorgánica del hueso y el proceso es revertido por los osteoblastos en un proceso fisiológico llamado remodelamiento óseo (1). Se ha demostrado que algunos factores como el RANKL y MCS-F secretados por las células estromales/osteoblastos estimulan la osteoclastogénesis (1). Estas dos citoquinas son requeridas para inducir la expresión

¹ Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina. Laboratorio de Biología Celular y Molecular de virus.

² Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología.

* Carlos Arturo Guerrero, M.D., MSc, Ph.D. Facultad de Medicina Guerra039@yahoo.com

tanto de genes que tipifican el linaje osteoclasto como de los genes que codifican para la fosfatasa ácida resistente al tartrato (fosfatasa ácida resistente al tartrato) (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina (CT) y la integrina $\beta 3$ lo que lleva al desarrollo de osteoclastos maduros (1, 2). Una vez las células precursoras de los osteoclastos han proliferado se lleva a cabo la fusión de dichas células (3). La fusión celular es un evento en el cual las membranas de las células a fusionarse se acercan, entran en contacto y tras mezclar los lípidos de sus bicapas forman un poro de fusión el cual se expande y permite el contacto de los citoplasmas (4, 5). Una hipótesis sugiere que los macrófagos en respuesta a estímulos locales, expresan una maquinaria de fusión proteica, la cual es inducida inicialmente y reprimida cuando se completa la fusión/multinucleación. Se han descrito tres proteínas involucradas en la fusión de macrófagos: el receptor de fusión de macrófagos (MFR) (7), CD47 y CD44 (9).

Se han identificado varias moléculas que intervienen en la diferenciación y activación de los osteoclastos (10) como M-CFS (macrophage colony-stimulating factor), RANKL (receptor activator nuclear factor kappa B ligand), bone morphogenetic proteins (BMPs) las cuales son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante ($TGF-\beta$); su efecto es aumentar la diferenciación de los osteoclastos. Dentro de las BMPs se encuentra la BMP2 la cual aumenta la formación de los osteoclastos a partir de macrófagos derivados de médula ósea (11). Igualmente, la PTH (2, 12, 13) y la $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (14) tienen efectos sobre el hueso tanto en la formación como en la degradación de éste ya que ambas hormonas estimulan la expresión de genes involucrados en la formación ósea en los osteoblastos así como también la expresión de RANKL, citoquina que promueve la formación de osteoclastos.

Por su carácter de células multinucleadas, los osteoclastos no se reproducen; esto hace que experimentalmente sea difícil tener un cultivo primario de estas células o una línea celular. Con los modelos reportados en la literatura para obtención de osteoclastos (2, 6, 11, 12, 15, 16, 17, 18) no se puede separar el efecto que pueda tener la confluencia celular o el estímulo con citoquinas y/o hormonas sobre la fusión y formación de células similares a osteoclasto. En nuestro trabajo exploramos la hipótesis que al fusionar las células químicamente con polietilenglicol (PEG) en estado no confluyente se podría aclarar si la fusión de membranas induce la expresión genética necesaria para que la célula multinucleada tenga actividad osteoclastica o si se requiere de tratamiento previo con factores osteoclastogénicos para que dicha actividad se presente. Hasta ahora no se ha utilizado el PEG con el fin de analizar la actividad resortiva después de fusionar macrófagos, siendo este el primer reporte. El mecanismo exacto de la fusión inducida por PEG ($HO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$) no está claro pero se

piensa que, por sus características hidrofílicas, ocupa el espacio de «agua libre» llevando a la aglutinación de las células (19) favoreciendo la fusión de éstas. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar si la fusión de macrófagos con polietilenglicol (PEG) induce actividad resortiva o requiere activación previa con sustancias osteoclastogénicas como PTH, $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, RANKL o BMP2.

Materiales y métodos

Cultivos celulares: En los experimentos se utilizaron macrófagos de dos líneas celulares U937/A (humanos) y J774 (ratón) los cuales se mantuvieron en cultivo RPMI (LIFE) suplementado con suero fetal bovino (Biowhitaker) al 10% (v/v) en incubadora a 37 °C y atmósfera 5% de CO_2 .

Histoquímica: Para determinar la morfología de las células multinucleadas y compararla con las mononucleadas las células se fijaron en paraformaldehído (Carlo Erba Reagenti) al 4% en PBS durante 40 minutos a 4 °C y se colorearon con hematoxilina de Mayer durante cinco minutos, tras dos lavados con PBS se contra-colorearon con eosina durante 30 segundos.

Fusión celular: Las células en estado no confluyente se desprendieron con PBS-EDTA y se centrifugaron, al sobrenadante se le colocó 50 μL de polietilenglicol (se evaluaron diferentes pesos moleculares: 1450, 3000, 6000 y 8000) y tras diferentes tiempos (3, 5, 10, 12 y 15 min.) se lavaron las células, se centrifugaron, se resuspendió el botón muy suavemente y se sembraron sobre laminillas de vidrio o sobre láminas de hueso cortical bovino.

Evaluación de la actividad de osteoclasto: Las células después de fusionadas se fijaron y se evaluó la actividad de la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y las células sembradas sobre hueso se colorearon para TRAP, se contaron, se desprendieron y el hueso se coloreó con hematoxilina y azul de comassie, luego se procedió a contar las lagunas de resorción en microscopio óptico (40X).

Una vez se determinó cual PEG era el más eficiente, el tiempo de fusión y la estabilidad postfusión se realizaron experimentos con hormonas osteoclastogénicas como PTH (0.025 μM , 0.05 μM , 0.01 μM) $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (0.025 μM , 0.05 μM , 0.01 μM), RANKL (10 ng./mL, 20 ng./mL, 40 ng./mL, 80 ng./mL), BMP2 (10 ng./mL, 20 ng./mL, 50 ng./mL, 100 ng./mL) y dexametasona (0.025 μM , 0.05 μM , 0.01 μM).

Análisis Estadístico: Los datos fueron expresados como la media \pm el error promedio de la media de tres experimentos independientes para cada condición experimental. Las diferencias entre grupos se analizaron por el método de Duncan y para determinar si el número de células multinucleadas TRAP positivas tenía relación las demás variables (tiempo y peso molecular del PEG) se realizó un análisis de medidas

repetidas con el procedimiento GLM de SAS. El nivel de significancia usado fue de 95% ($\alpha = 0.05$).

Resultados

Al fusionar las células con PEG se observaron células multinucleadas, las cuales expresan la enzima TRAP desde las 2 horas post fusión y su actividad fue estable hasta por 5 días, tiempo que duró la observación. Esto indica que la fusión de macrófagos con PEG está induciendo la actividad de la enzima TRAP y parece ser específica de este linaje celular ya que al fusionar osteoblastos no se obtuvieron células multinucleadas TRAP positivas.

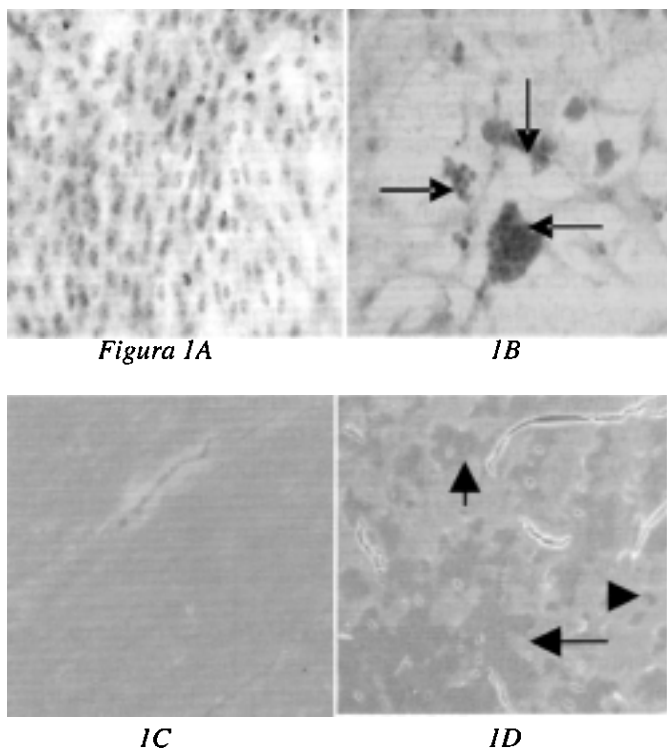


FIGURA 1. A. Células sin fusionar U937/A TRAP negativas, (control negativo), contra coloreadas con Hematoxilina (Objetivo 40x). **B.** Células U937/A fusionadas con PEG 6000 durante 12 min, multinucleadas TRAP positivas y contra-coloreadas con hematoxilina (Objetivo 40x). **C.** Control del hueso cortical bovino sin células (Quanta 200 Phillips FEI Electron Microscope 600x magnification). **D.** Hueso cortical bovino sobre el cual se cultivaron células U937/A fusionadas, se observan las lagunas de resorción señaladas con flechas (Quanta 200 Phillips FEI Electron Microscope 600x magnification).

Se evaluaron diferentes pesos moleculares del PEG y diferentes tiempos de exposición de las células encontrando que el PEG con peso molecular de 6000 y 12 minutos fue el que indujo la mayor formación de células multinucleadas TRAP positivas en la línea U937/A. Para la línea J774 el PEG que indujo mayor eficiencia de la fusión fue el de 3000 y 6 minutos, los demás pesos moleculares presentaron baja eficiencia de la fusión y gran desviación promedio.

Al comparar el efecto de la fusión, cuando se encuentra diferente número de células en el cultivo (confluencia) encontramos que no hubo diferencias significativas (prueba de Duncan) en las confluencias entre el 20-80%, mientras que para el 100% el número de células multinucleadas TRAP positivas aumentó casi 6 veces. Como control del experimento se utilizaron células al 100% de confluencia pero sin fusionar, esto con el objeto de cuantificar la fusión espontánea debido a la confluencia celular alta. En este caso, se observó la formación de un número muy bajo de células multinucleadas TRAP positivas fusionados con PEG. Este resultado sugiere que entre el 20% y 80% de confluencia la expresión de las moléculas fusionadoras no varía en la membrana citoplasmática, mientras que al llegar al 100% de confluencia es posible que se aumente la expresión de estas moléculas promoviendo un aumento en la fusión celular o la expresión de otras proteínas. Para evaluar si el efecto de la confluencia sobre la formación de células multinucleadas TRAP positivas está influenciado por la sincronización del ciclo celular, como consecuencia de la confluencia, el cultivo no confluyente se sincronizó con colchicina, la cual detiene las células en metafase (mitosis) y luego se realizó la fusión. Encontramos un aumento en el número de células multinucleadas TRAP positivas fusionadas con PEG tanto en el control (sin PEG) como en las células fusionadas tratadas con colchicina. La colchicina aumentó el número de multinucleadas TRAP positivas cuando se colocó en el cultivo 1, 2, 4, 8 y 24 horas y este número disminuyó a las 48 horas. Estos resultados mostraron que al sincronizar las células en metafase, fusionadas o no, se aumentó el número de células multinucleadas TRAP positivas. Esto sugiere que la sincronización facilita de alguna manera la fusión celular, probablemente por la expresión simultánea de moléculas implicadas en la fusión de membranas. Igualmente, podría inducir la expresión de genes que caracterizan al osteoclasto como la enzima TRAP a juzgar por las diferencias entre el control y la fusión para cada uno de los tiempos. La fracción de células muertas fue más alta en las células tratadas con colchicina y fusionadas con PEG respecto al control y fusión sin colchicina. Esto puede explicarse porque la mortalidad es reflejo del número de células fusionadas no sincronizadas o en estas condiciones el PEG es tóxico para un porcentaje de células.

Al sembrar células U937/A fusionadas con PEG, sobre láminas de hueso, se encontró que el área total de resorción aumentó cuando se sembraron células fusionadas respecto al control (células no fusionadas). Al discriminar los resultados por tamaño del área de resorción en la laguna de resorción, se observó que el área correspondiente a lagunas pequeñas y medianas no muestra diferencias en los cinco días que duró el cultivo, mientras que hubo un aumento durante los cinco días para las lagunas denominadas grandes. Los

resultados fueron similares para la línea de macrófagos J774, mientras que para fibroblastos fusionados con PEG se observó una actividad resortiva 10 veces más baja que las U937/A o J774 fusionadas.

Para determinar si PTH, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y dexametasona tenían algún efecto sobre la formación de células multinucleadas TRAP positivas fusionadas con PEG y sobre la capacidad resortiva de éstas, se estimularon macrófagos U937/A durante 4 días con estas hormonas. El número de células multinucleadas TRAP positivas fue mayor cuando se fusionaban con PEG respecto a sus respectivos controles aún cuando se estimularon con PTH y $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (figura 2). Es

posible que la acción del PEG en estas células pre estimuladas potencia la expresión de genes fusionadores y del gen de la enzima TRAP lo que llevaría a mayor número de células multinucleadas TRAP positivas y mayor capacidad resortiva. En el caso de la dexametasona no se observó este efecto a ninguna de las concentraciones usadas, es posible que 4 días de estímulo no sean suficientes para inducir un aumento en la capacidad resortiva de éstas células humanas ya que al parecer el efecto de los glucocorticoides depende de la especie, del tipo de células y del tiempo de exposición a estas hormonas.

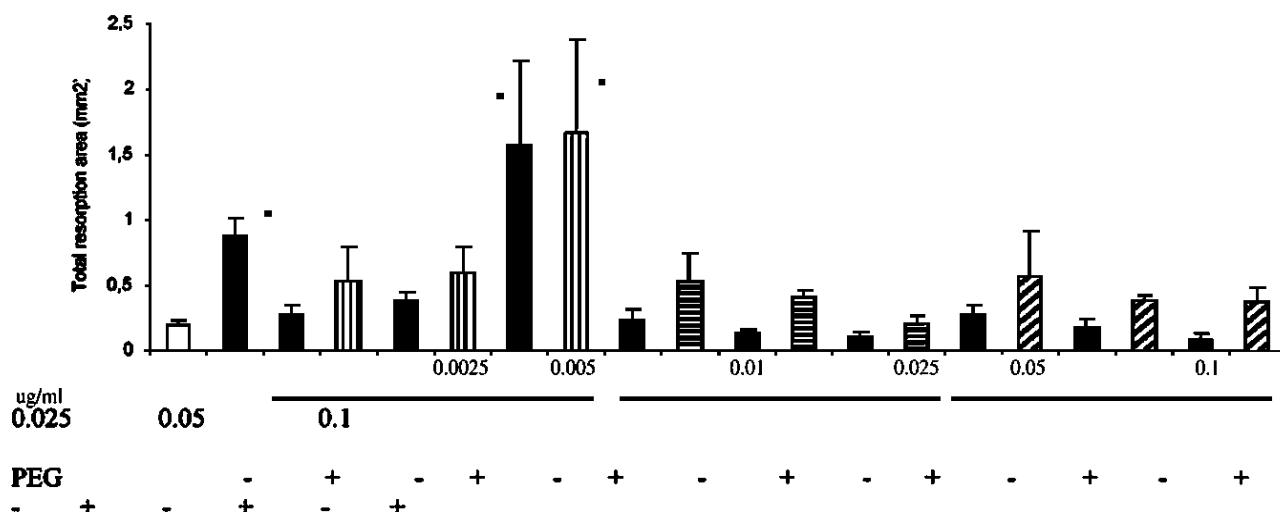


FIGURA 2. Capacidad resortiva de células U937/A pre estimuladas por 4 días con PTH, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y dexametasona. Las células se fusionaron con PEG 6000 por 12 min, se sembraron sobre láminas de hueso cortical bovino, se desprendieron y se cuantificó el área total de resorción. Los valores corresponden a la media \pm SD. * $P < 0.05$ Vs. control.

Ya que las citoquinas RANKL y BMP2 están involucradas en la osteoclastogénesis se estimularon macrófagos U937/A durante 4 días con RANKL y BMP2, como control se utilizaron células pre estimuladas pero sin fusionar. El RANKL y la BMP2 disminuyeron la formación de células multinucleadas TRAP positivas fusionadas con PEG al compararlas con las células sin tratar (en todas las concentraciones usadas de RANKL o BMP2). Hubo una disminución del área de resorción de las células pre estimuladas con RANKL o BMP2 y fusionadas con PEG al compararlas con las células fusionadas y sin estimular con RANKL, tampoco hubo diferencias al comparar entre las dosis de RANKL o BMP2 aplicado, excepto para la dosis más baja. Según nuestros resultados, es posible que in vivo o en cocultivos esta citoquina tenga un efecto sinérgico con otras moléculas y su efecto individual, como se evaluó

en este experimento, no sea significativo. Un comportamiento similar se encontró para la BMP2. En este caso ninguna concentración aumentó el número de células multinucleadas TRAP positivas, ni la actividad resortiva de las células fusionadas con PEG respecto al control. Se ha reportado que los macrófagos de la línea J774 (20) expresan la proteína BMP2 pero no se conoce su función. Para nosotros fue una sorpresa que ni RANKL ni BMP2 mostrasen efecto osteoclastogénico, sin embargo, llama la atención que haya un efecto inhibitorio proporcional a la dosis usada. Este mismo experimento indica que las células fusionadas con PEG presentan una clara diferencia significativa respecto a las fusionadas y pretratadas con las citoquinas. Esto sugiere que la fusión per se induce la actividad resortiva de los macrófagos y que dicha actividad es inhibida cuando se tratan las células con las citoquinas. Contrario a lo publicado

para los co-cultivos, la actividad de dichas citoquinas en esta línea celular fue negativa y no es por inactivación durante la preparación o el almacenamiento, ya que de ser así la actividad resortiva debería ser igual a las células fusionadas con PEG sin recibir ningún tratamiento.

Evaluamos si al tratar las células con ácido alendrónico (bisfosfonato) se disminuía el porcentaje de fusión y/o la resorción. Encontramos que en laminilla el ácido alendrónico disminuyó la capacidad de formar células multinucleadas TRAP positivas fusionados con PEG y aumentó la mortalidad respecto a las no fusionadas pero con tratamiento. En cambio sobre hueso, el número de células multinucleadas TRAP positivas no cambió al comparar las células tratadas con ácido alendrónico fusionados con PEG respecto a las fusionadas sin tratamiento. Al evaluar la capacidad resortiva de las células se observó una disminución del área de resorción para las células pre tratadas con ácido alendrónico y fusionadas con PEG respecto a la resorción efectuada por las células fusionadas sin ácido alendrónico.

En conclusión, la fusión con PEG es estable en los macrófagos tanto de la línea celular U937/A como J774 (5 y 10 días respectivamente) y este evento induce la actividad de la enzima TRAP. Se observó que células procedentes de otros linajes tienen capacidad de expresar la enzima TRAP y de realizar resorción. Sin embargo, los macrófagos de la línea U937/A realizan la mayor actividad resortiva respecto a las líneas J774 y respecto a cultivos primarios de fibroblastos. Nuestros resultados muestran que la fusión con PEG aumenta significativamente la actividad osteoclastogénesis respecto a la fusión espontánea, inducida por alta confluencia, a la pre-estimulación con PTH, $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, dexametasona, RANKL o BMP2. De igual forma eventos como la sincronización de las células en cultivo, en metafase aumenta la formación de células multinucleadas TRAP positivas sin afectar la proporción de células multinucleadas muertas. Con los resultados mostrados en este trabajo aportamos evidencia que la fusión *per se* induce la actividad similar a osteoclasto. Adicionalmente nuestro trabajo permite la obtención de un método relativamente sencillo, respecto a lo reportado (23), de obtener células multinucleadas con la posibilidad de ser utilizadas para estudiar la bioquímica de la resorción o la actividad farmacológica relacionada con la resorción ósea.

Bibliografía

1. Ducy P, Schinke T, Karsenty G 2000 The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289 (1): 1501-1504.
2. Nakchbandi I A, Weir E E, Insonga KL, Philbrick W M, Broadus A E 2000 Parathyroid hormone-related protein induces spontaneous osteoclast formation via a paracrine cascade. *PNAS* 97 (13): 7296-7300.
3. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin J, Suda T 1990 Origin of osteoclast: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclast under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc.Nat. Acad.Sci.* 87:7260-7264.
4. Chernomordik L V, Leikina E, Frolov V, Zimmerberg J 1997 An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemmagglutinin depends upon membrane lipids. *The Journal of Cell Biology* 136 (1), 81-93.
5. Chernomordik L V, Frolov V, Leikina E, Bronk P, Zimmerberg J 1998 The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusión, and lipidic fusion pore formation. *The Journal of Cell Biology* 140 (6), 1369-1382.
6. Vignery A 2000 Osteoclast and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int.J. Exp. Path.* 81: 291-304.
7. Saginario Ch, Sterling H, Beckers C, Kobayashi R, Solimena M, Ullu E, Vignery A 1998 MFR, a putative receptor mediating the fusion of macrophages. *Molecular and Cellular Biology* 18 (11): 6213-6223.
8. Han X, Sterling H, Chen Y, Saginario Ch, Brown E J, Frazier W A, Lindberg F P, Vignery A 2000 CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 37984-37992.
9. Sterling H, Saginario Ch, Vignery A 1998 CD44 occupancy prevents macrophage multinucleation. *The Journal of Cell Biology* 143 (3).
10. Teitelbaum S L 2000 Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289 (5484): 1504-1508.
11. Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno Y, Yasuda S, Higashio K, Quinn J, Gillespie M T, Martin T J, Suda T, Takahashi N 2001 Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Endocrinology* 142: 3656-3662.
12. Liu BY, Wu PW, Bringhurst R, Wang JT 2002 Estrogen inhibition of PTH-stimulated osteoclast formation and attachment in vitro: involvement of both PKA and PKC. *Endocrinology* 143: 627-635.
13. Lee SK, Lorenzo JA 1999 Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140(8):3552-3561.
14. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie T, Martin J, Higashio K, Suda T 2000 Osteoprotegerin produced by osteoblast is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141: 3478-3484.
15. Kansaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H 2001 Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J. Dent Res* 80(3): 887-891.
16. Kamolmatyakul S, Chen W, Li YP 2011 Interferon-down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts

- and inhibits osteoclast formation. *J. Dent. Res* 80 (1): 351-355.
17. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N 1999 Osteoclast differentiation factor as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *The Journal of Immunology* 163: 434-442.
 18. Matsuzak K, Katayama K, Takahashi Y, Nakamura I, Udagawa N, Tsurukai T, Nishinakamura R, Toyama Y, Yabe Y, Hori M, Takahashi N, Suda T 1999 Human osteoclast-like cells are formed from peripheral blood mononuclear cells in a coculture with SaOS-2 cells transfected with the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related Protein receptor gene. *Endocrinology* 140(2):925-932.
 19. Burdon, R.H. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 13.
 20. Yamagiwa H, Endo N, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Takahashi HE 2001 In vivo bone-forming capacity of human bone marrow-derived stromal cells is stimulated by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J. Bone Miner Metab* 19: 20-28.
 21. Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno Y, Yasuda S, Higashio K, Quinn J, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T, Takahashi N 2001 Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Endocrinology* 142: 3656-3662.
 22. Fisher JE, Rodan GA, Reszka AA 2001 In vivo effects of bisphosphonates on the osteoclast mevalonate pathway. *Endocrinology* 141(12): 4793-4796.
 23. Kanaoka K, Kobayashi Y, Hashimoto F, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K, Kato Y, Sakai H 2000 A common downstream signaling activity of osteoclast survival factors that prevent nitric oxide-promoted osteoclast apoptosis. *Endocrinology* 141(8): 2995-3005.