



**Universidad Nacional  
de La Plata**

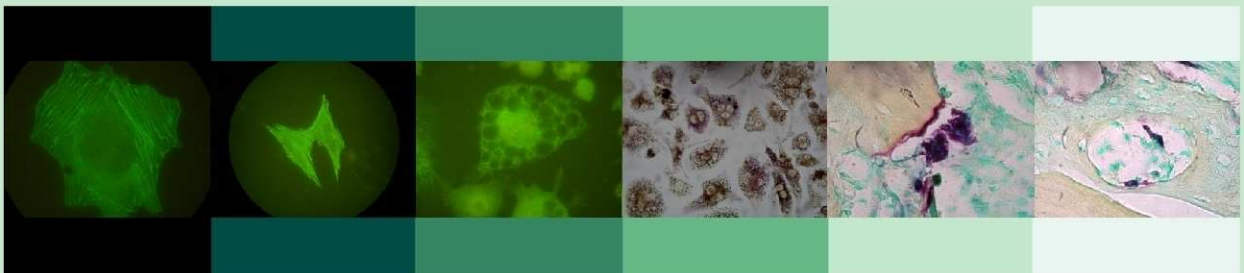
**Facultad de Ciencias Exactas**

---

**"Efectos de los productos  
de glicación avanzada  
(AGEs) y la Metformina  
sobre el hueso; estudios  
*in vitro* e *in vivo*"**

---

**Bioquímica: Verónica Arnol**



**Año 2012**

**Directora: Ana María Cortizo**

**Co- Director: Antonio Desmond McCarthy**

Trabajo de tesis para acceder al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Bioquímica Verónica Arnol, realizado bajo la dirección de la Dra. Ana María Cortizo y la codirección del Dr. Antonio McCarthy.

El presente trabajo se realizó en la Cátedra de Bioquímica Patológica y en la Cátedra de Anatomía e Histología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, y fue posible gracias a la beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A mi querida familia

A Mauricio

## Agradecimientos

A mis papas por confiar en mí y darme la seguridad necesaria para desenvolverme en la vida, desde que era pequeña hasta el día de hoy y en adelante, siempre han sido mi gran contención. Agradezco el esfuerzo que han hecho para poder otorgarme algo tan importante, como es la educación. Los adoro y me siento afortunada de tener los padres que tengo.

A mi hermano Christian por ayudarme, cuidarme y quererme; a mis sobrinos Santos y Martina por alegrar mis días desde que soy tía, por sus ocurrencias y ternura y por brindarme todo su cariño. A mis tías, Olga y Susy que siempre me han acompañado a lo largo de la vida, alentándome y alegrándose por cada logro que he obtenido.

A Mauricio por acompañarme a lo largo de esta etapa, desde los comienzos de la tesis, por alentarme, darme entusiasmo, enseñarme a que casi ningún problema en esta vida, es lo suficientemente grave como para quitarte una sonrisa, que vale la pena seguir adelante. Quiero agradecerle también por ayudarme de mil maneras, haciéndome feliz día a día. Y como si esto fuera poco, realizó el diseño de la tesis, una vez más, gracias.

A mi grupo de trabajo GIOMM: especialmente a mis directores Ana y Antonio por darme la posibilidad de llevar a cabo mis estudios de postgrado, confiando en mí y guiándome en el desarrollo de la tesis. Quiero agradecerles también, por el grupo que han formado, no solo por las capacidades y habilidades de las personas que lo integran, si no también por sus valores humanos. A mis compañeros: Virginia, María José, Juan Ignacio, Silvina, Josefina, Juan Manuel, Malala, Sara, Carla, Gimena, Anabela, Laura y Paola, por el importantísimo apoyo a lo largo de todo este tiempo, porque sin ellos este logro no hubiese sido posible,

han sido un eslabón fundamental para concretar mi tesis. Gracias GIOMM por estos años compartidos!

A mis amigos de toda la vida, a los que he conocido a lo largo de la carrera de Bioquímica y a los que conocí durante mi etapa de becaria, a todos ellos, gracias por darle alegría a mi corazón y hacer que todo sea más ameno.

A mis compañeros de la cátedra de Fisiología: Gustavo, Alejandro, Silvia, Belén, Romina y Paola, por otorgarme un espacio de formación, por la comprensión y cariño.

A Florencia Álvarez y la Dra. Mónica Mele por la ayuda brindada en la obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia, a Vanina Pérez por su colaboración en el uso del microscopio confocal y a mi amiga Laura, con su gran aporte realicé los últimos trabajos experimentales de la tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata por permitirme realizar mis estudios tanto de grado, como de postgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las becas que hicieron posible el desarrollo de la tesis.

# Índice

<b>I Introducción</b>	<b>1</b>
I 1 Diabetes mellitus	2
I 1 1 Definición y descripción de la enfermedad	2
I 1 2 Clasificación de la Diabetes mellitus	4
I 1 2 1 Diabetes mellitus tipo 1	4
I 1 2 1 1 Inmunomediada	4
I 1 2 1 2 Idiopática	5
I 1 2 2 Diabetes mellitus tipo 2	5
I 1.2.3 Otros tipos de Diabetes	6
I 1.2.3.1 Defectos genéticos de las células $\beta$	6
I 1.2.3.2 Defectos genéticos en la acción de la insulina	7
I 1.2.3.3 Enfermedad del páncreas exócrino	7
I 1.2.3.4 Endocrinopatías	7
I 1.2.3.5 Diabetes inducida por drogas o tóxicos	7
I 1.2.3.6 Infecciones	7
I 1.2.3.7 Formas poco frecuentes de Diabetes inmunomediadas	7
I 1.2.3.8 Otros síndromes genéticos asociados con Diabetes	8
I 1.2.4 Diabetes mellitus Gestacional (DMG)	8
I 1.3 Complicaciones de la Diabetes	8
I 1.3.1 Complicaciones Agudas	8
I 1.3.2 Complicaciones Crónicas	9
I 1.3.2.1 Macroangiopatía	10

I 1.3.2.2 Microangiopatía	10
I 1.3.2.3 Alteraciones óseas	10
I 1.4 Mecanismos de patogenicidad	11
I 2 Productos de glicación avanzada (AGEs)	12
I 2.1 Formación	12
I 2.2 Metabolismo	14
I 2.3 Efectos de los AGEs	15
I 2.3.1 Efectos Directos	15
I 2.3.2 Efectos Indirectos o mediados por receptores	16
I 2.4 Receptores para AGEs	19
I 2.5 AGEs y complicaciones en la Diabetes	20
I 2.5.1 AGEs y microangiopatías	20
I 2.5.1.1 Retinopatía diabética	21
I 2.5.1.2 Nefropatía diabética	21
I 2.5.1.3 Neuropatía diabética	21
I 2.5.2 AGEs y macroangiopatías	22
I 2.5.3 AGEs y alteraciones óseas	22
I 3 Tejido óseo	24
I 3.1 Estructura	24
I 3.1.1 Hueso esponjoso o trabecular	25
I 3.1.2 Hueso compacto o cortical	26
I 3.2 Matriz ósea	27

I 3.3 Células del tejido óseo	28
I 3.3.1 Células osteoprogenitoras	28
I 3.3.2 Osteoblasto	30
I 3.3.3 Osteocito	30
I 3.3.4 Células de revestimiento óseo	31
I 3.3.5 Osteoclastos	31
I 3.4 Mecanismos reguladores del metabolismo óseo	37
I 3.4.1 Regulación por factores de transcripción	37
I 3.4.2 Regulación por otras proteínas	37
I 3.5 Modelado óseo	39
I 3.6 Remodelado óseo	39
I 3.7 Proceso de reparación ósea	43
I 3.7.1 Primera etapa: inflamación	45
I 3.7.2 Segunda etapa: formación del callo blando	45
I 3.7.3 Tercera etapa: formación del callo duro	46
I 3.7.4 Cuarta etapa: remodelado óseo	47
I 3.8 El modelo anabólico/catabólico de reparación de fracturas	48
I 4 Metabolismo óseo y Diabetes	50
I 4.1 Generalidades	50
I 4.2 DMO en Diabetes mellitus tipo 1	50
I 4.3 DMO en Diabetes mellitus tipo 2	51

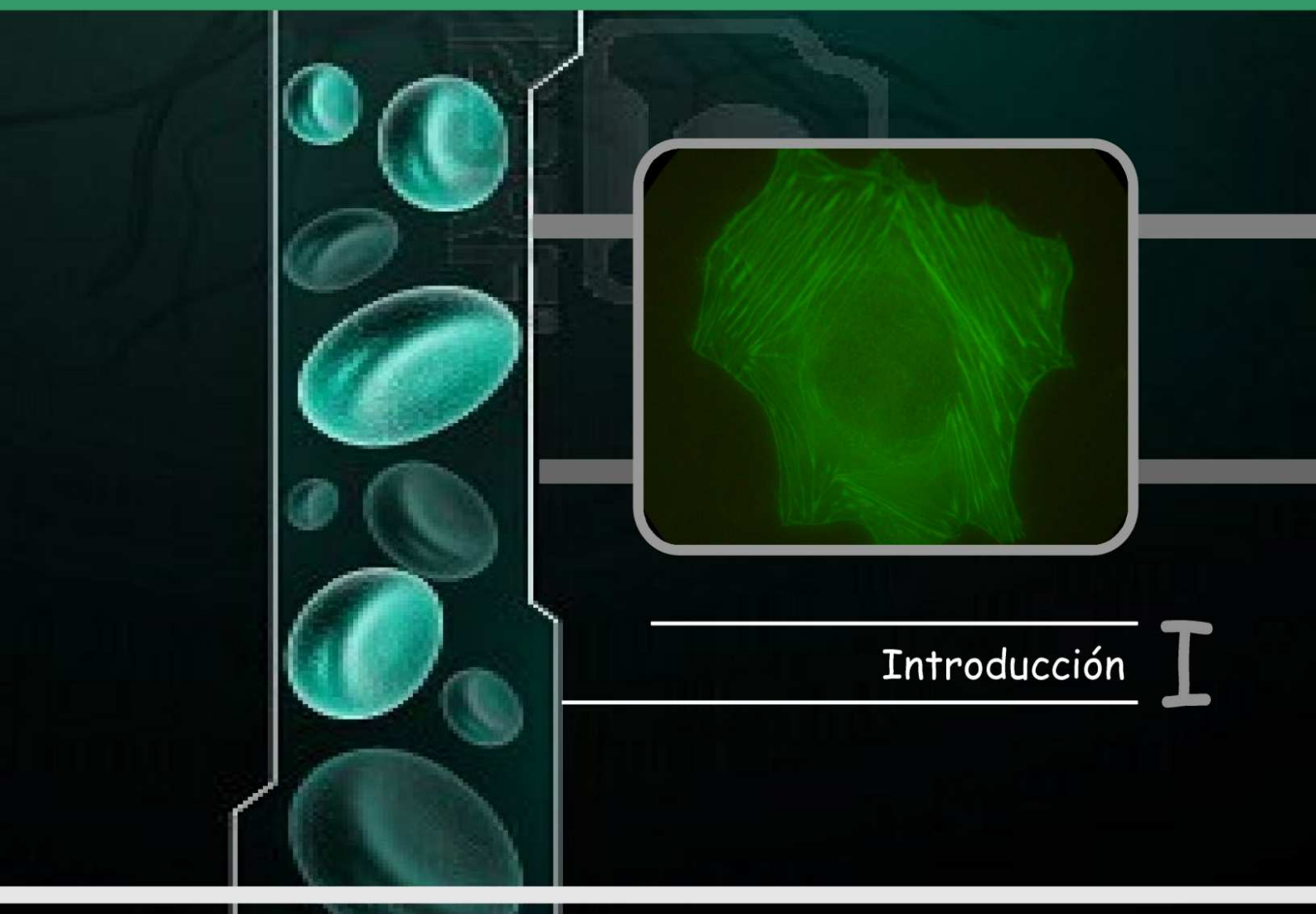


I 4.4 Efecto de drogas anti-diabéticas sobre el metabolismo óseo	52
I 4.5 Patofisiología del mayor riesgo de fracturas en Diabetes mellitus	53
<b>I 5 Metformina</b>	<b>56</b>
I 5.1 Un poco de historia	56
I 5.2 Mecanismos de acción	58
I 5.3 Farmacología	60
I 5.4 Efectos adversos	61
I 5.5 Eficacia	61
I 5.6 Otros usos clínicos	64
I 5.7 Metformina y sus efectos sobre el tejido óseo	66
<b>I 6 Hipótesis y Objetivos</b>	<b>69</b>
<b>II Materiales y métodos</b>	<b>70</b>
II 1 Estudios in vitro	71
II 1.1 Cultivos celulares	71
II 1.1 a) UMR106	71
II 1.1 b) MC3T3E1	71

II 1.1 c) Raw 264.7	72
II 1.1 d) Osteoclastos	72
II 1.2 Preparación de los productos de glicación avanzada (AGEs)	73
II 1.3 Ensayos sobre Osteoblastos	73
II 1.3.1 Evaluación de la diferenciación osteoblástica	73
II 1.3.2 Evaluación de la muerte celular	74
II 1.3.3 Determinación de la producción intracelular de especies de oxígeno reactivas (ROS)	75
II 1.3.4 Western Blot para el análisis de la expresión de dos receptores para AGE: RAGE y Galectina 3	76
II 1.3.5 Estudios de inmunofluorescencia	77
II 1.3.5 a) Directa	77
II 1.3.5 b) Indirecta	77
II 1.4 Ensayos sobre Osteoclastos	78
II 1.4.1 Cuantificación del número de células multinucleadas	78
II 1.4.2 Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)	78
II 1.4.3 Western blot para evaluar la expresión del RANKL	78
II 1.4.4 Evaluación de la expresión de la enzima P-AMPK por inmunofluorescencia indirecta	79
II 2 Estudios in vivo	80
II 2.1 Modelo de Diabetes tipo I en animales	80
II 2.2 Modelo de reosificación ósea	80
II 2.3 Análisis histológico del hueso parietal	81
II 2.3 a) Tinción con Hematoxilina & Eosina	82

II 2.3 b) Tinción histoquímica para fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP)	82
II 3 Análisis estadístico	83
<b>III Resultados</b>	<b>84</b>
III 1 Resultados In Vitro sobre Osteoblastos	85
III 1.1 Efecto de la Metformina y los AGEs sobre las fibras de Actina	85
III 1.2 Efecto de la Metformina y los AGEs sobre la diferenciación celular	87
III 1.3 Efecto de la Metformina y los AGEs sobre la muerte celular	89
III 1.4 Efecto de la Metformina sobre el estrés oxidativo inducido por AGEs	92
III 1.5 Efecto de AGEs y Metformina sobre la expresión del receptor para AGEs (RAGE)	93
III 1.6 Efecto de AGEs y Metformina sobre la expresión del receptor Galectina -3	95
III 2 Resultados In Vitro sobre Osteoclastos (OC)	98
III 2.1 Efecto de la Metformina sobre la cantidad de células multinucleadas	98

III 2.2 Efecto de la Metformina sobre la diferenciación osteoclástica	99
III 2.3 Efecto de la Metformina sobre la expresión de RANKL en los osteoblastos UMR 106	99
III 2.4 Evaluación del efecto de la Metformina sobre la fosforilación de la enzima AMPK (p-AMPK)	100
III 3 Resultados In Vivo	102
III 3.1 Efecto de la Metformina sobre la reparación ósea en ratas diabéticas y no diabéticas	102
<b>IV Discusión</b>	<b>105</b>
<b>V Conclusiones</b>	<b>119</b>
<b>VI Bibliografía</b>	<b>122</b>



Introducción I



### I 1 Diabetes Mellitus

#### I 1.1 Definición y descripción de la enfermedad

La Diabetes mellitus comprende un grupo heterogéneo de alteraciones metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia crónica, y que se pueden deber a defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma, o en ambas (Expert Committee 2011).

La hiperglucemia crónica presente en la Diabetes está asociada con daño a largo plazo, disfunción, y falla de diferentes órganos, especialmente a nivel ocular, riñones, nervios, corazón, y vasos sanguíneos.

Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la Diabetes, desde destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas con la consecuente deficiencia en los niveles de insulina, a anomalías que resultan en resistencia a la acción de la insulina. Debido a la acción ineficaz de la insulina en los tejidos blanco, el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas se ve afectado. La

deficiencia en la acción de la insulina, resulta de la inadecuada secreción y/o disminución en la respuesta tisular a la misma.

Alteraciones en la secreción de insulina y deficiencias en su acción frecuentemente coexisten en el mismo paciente, y a menudo es incierto cual anomalía es la causa primaria de la hiperglucemia.

Los síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y visión borrosa. La hiperglucemia crónica a veces afecta al crecimiento y aumenta la susceptibilidad a ciertas infecciones. La cetoacidosis y el síndrome hiperosmolar no cetósico ocurren en los casos de Diabetes no controlada, son de alta gravedad, y comprometen la vida del paciente.

Las complicaciones de la Diabetes a largo plazo incluyen, retinopatías con potencial pérdida de la visión; nefropatías; neuropatía periférica con riesgo de ulceraciones en los pies; y neuropatía autonómica que causa síntomas

gastrointestinales, genitourinarios, y cardiovasculares.

Los pacientes diabéticos tienen alta incidencia de aterosclerosis y sus consecuencias clínicas más importantes: infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente vascular periférico. También pueden padecer hipertensión y anormalidad en el metabolismo de las lipoproteínas.

La mayoría de los casos de Diabetes entran dentro de dos categorías etiopatogénicas. En una de ellas, Diabetes mellitus tipo 1, la causa es un déficit absoluto en la secreción de insulina. La mayoría de los individuos con alto riesgo de padecer este tipo de Diabetes pueden ser diagnosticados por su perfil serológico que muestra evidencia de un proceso patológico autoinmune que ocurre a nivel de los islotes pancreáticos, también presentan marcadores genéticos específicos. En la otra categoría, mucho más prevalente, la Diabetes mellitus tipo 2, la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada compensación

secretoria de la misma. En este tipo de Diabetes, se presenta un grado de hiperglucemia suficiente como para causar cambios patológicos en diversos tejidos blanco, por un largo tiempo antes de que se detecte la enfermedad, sin ocasionar síntomas clínicos al paciente. Durante este periodo asintomático, es posible demostrar anormalidades en el metabolismo de los carbohidratos, midiendo los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas o mediante la prueba de tolerancia oral a la glucosa.

El grado de hiperglucemia puede cambiar a lo largo del tiempo, dependiendo del avance de la enfermedad subyacente. El proceso de la enfermedad puede estar presente, pero puede no haber progresado lo suficiente como para causar hiperglucemia.

En algunos individuos con Diabetes, un control adecuado de la glucemia puede ser logrado con reducción del peso corporal, ejercicio y/o drogas hipoglucemiantes. Por consiguiente estos individuos no requieren insulina. Otras personas que tienen una secreción residual de

insulina pero requieren insulina exógena para un adecuado control de la glucemia pueden sobrevivir sin ella. Individuos con una gran destrucción de las células  $\beta$  del páncreas y debido a esto sin secreción endógena de insulina, requieren del aporte de insulina exógena para sobrevivir. Así, el grado de hiperglucemia refleja la severidad del proceso metabólico subyacente y su tratamiento.

### I 1.2 Clasificación de la Diabetes mellitus

#### I 1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1:

I 1.2.1.1 *Inmunomediada*. Este tipo afecta al 5-10% de los pacientes diabéticos, presentan destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas. Dentro de los marcadores de destrucción autoinmune están incluidos autoanticuerpos contra células del islote, insulina y decarboxilasa del ácido glutámico (GAD), tirosina-fosfatasa IA-2 y IA-2 $\beta$ . Al menos uno y usualmente más de estos autoanticuerpos están presentes en un 85- 90% de los individuos cuando la hiperglucemia en ayunas es detectada. También esta enfermedad tiene una asociación alta

con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH): ciertos alelos pueden ser predisponentes o protectores.

En esta forma de Diabetes, la tasa de destrucción de las células  $\beta$  es muy variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente en lactantes y niños) y lenta en otros (principalmente adultos). Algunos pacientes, particularmente niños y adolescentes, presentan como primera manifestación cetoacidosis. Otros tienen una leve hiperglucemia en ayunas que puede cambiar rápidamente a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis ante la presencia de algún tipo de estrés.

En pacientes adultos, se puede dar el caso de que mantengan una funcionalidad suficiente de las células  $\beta$  como para prevenir la cetoacidosis por varios años.

La Diabetes autoinmune se presenta mayoritariamente en la niñez y adolescencia, pero puede ocurrir a cualquier edad, aún en la octava o novena década de vida.

Los pacientes con este tipo de Diabetes raramente padecen



obesidad, aunque no es incompatible con el diagnóstico.

I 1.2.1.2 *Idiopática*. Algunas formas de la Diabetes mellitus tipo 1 tienen etiologías desconocidas. Los pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a sufrir cetoacidosis, pero no tienen evidencia de destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas.

Solo una minoría de pacientes entran dentro de esta categoría, y dentro de los que la padecen se encontró que son de ascendencia Africana o Asiática.

Esta forma de Diabetes es altamente hereditaria.

I 1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2:

Este tipo de Diabetes afecta al 90-95% de los pacientes diabéticos, previamente se la conocía como Diabetes no dependiente de insulina o Diabetes del adulto, abarca individuos que presentan resistencia a la insulina y por lo general tienen relativa (no absoluta) deficiencia de insulina. Inicialmente, y a menudo a lo largo de toda la vida, estos individuos no necesitan ser tratados con

insulina. Existen muchas causas diferentes para este tipo de Diabetes, aunque la etiología específica no se conoce, si se sabe que no hay destrucción de las células  $\beta$  del páncreas.

La mayoría de los pacientes con Diabetes mellitus de tipo 2 presentan obesidad, y la obesidad por si misma causa resistencia a la insulina. No es común que estos pacientes sufran cetoacidosis y en caso de padecerla suele darse debido al estrés ocasionado por otra enfermedad como puede ser en el caso de una infección.

Este tipo de Diabetes suele permanecer por años sin ser diagnosticada debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en los primeros estadios es leve, de modo que el paciente no nota los síntomas clásicos de la enfermedad. De todos modos, estos pacientes, tienen un alto riesgo de padecer complicaciones macro- y micro-vasculares. Dependiendo del estadio de la enfermedad, los pacientes con este tipo de Diabetes pueden tener niveles de insulina

bajos, normales o elevados (aunque siempre menores a los que se esperarían por los altos niveles de glucemia que presentan). De este modo, la secreción de insulina es deficiente en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción del peso corporal y/o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia. El riesgo de desarrollar este tipo de Diabetes aumenta con la edad, obesidad y falta de actividad física. La enfermedad se da con más frecuencia en mujeres que previamente hayan padecido Diabetes mellitus gestacional y en individuos con hipertensión o dislipemia.

La frecuencia de la Diabetes mellitus tipo 2 también depende de la etnia. A menudo está asociada con una gran predisposición genética, más que en el caso de la Diabetes mellitus tipo 1 inmunomediada. No obstante, la genética de este tipo de Diabetes es compleja y no está claramente definida.

### I 1.2.3 Otros tipos de Diabetes

I 1.2.3.1 *Defectos genéticos de las células  $\beta$* . Varias formas de Diabetes están asociadas con defectos monogénicos en la función de las células  $\beta$ . En este tipo de Diabetes los casos de hiperglucemia se dan a una edad temprana (antes de los 25 años). Se caracterizan por afectación de la secreción de insulina sin alterarse su acción o pueden existir defectos mínimos en su actividad. Es hereditaria, del tipo autosómico dominante. Se han detectado anomalías en seis loci genéticos en diferentes cromosomas. La forma más común está asociada al cromosoma 12 en un factor de transcripción hepático (HNF-1 $\alpha$ ). Una segunda forma está asociada con mutaciones en el gen de la glucoquinasa en el cromosoma 7<sub>p</sub> y resulta en defectos en la molécula de glucoquinasa. Otras formas menos comunes se dan por mutaciones en otros factores de transcripción, incluyendo HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\beta$ , factor promotor de la insulina (IPF-1) y neuroD1.

I 1.2.3.2 *Defectos genéticos en la acción de la insulina.* Son poco comunes las causas de Diabetes que se dan por anomalías en la acción de la insulina. Las anomalías metabólicas asociadas con mutaciones en el receptor de insulina pueden variar desde hiperinsulinemia e hiperglucemia leve a Diabetes severa.

I 1.2.3.3 *Enfermedad del páncreas exocrino.* Cualquier proceso que afecte al páncreas puede causar Diabetes. Estos procesos adquiridos, incluyen pancreatitis, trauma, infección, pancreotomía, carcinoma pancreático.

I 1.2.3.4 *Endocrinopatías.* Algunas hormonas, como la hormona de crecimiento, cortisol, glucagon, epinefrina, son antagonistas de la acción de la insulina. Cantidades excesivas de las mismas (ejemplo, acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma) pueden causar Diabetes. Generalmente ocurre en individuos con defectos preexistentes en la secreción de insulina. La hiperglucemia se normaliza cuando se

resuelve el problema que ocasiona el desequilibrio hormonal.

I 1.2.3.5 *Diabetes inducida por drogas o tóxicos.* Varias drogas pueden afectar la secreción de insulina. Estas drogas por sí solas no causan Diabetes, pero pueden precipitar la aparición de la enfermedad en individuos con resistencia a la insulina.

I 1.2.3.6 *Infecciones.* Ciertos virus se han asociado con destrucción de células  $\beta$ . La Diabetes se manifiesta en pacientes con rubeola congénita, aunque la mayoría de estos pacientes tienen alelos del CMH y marcadores inmunológicos característicos de la Diabetes mellitus tipo 1. Además, el virus coxsackie B, citomegalovirus, adenovirus, se han asociado en ciertos casos con Diabetes.

I 1.2.3.7 *Formas poco frecuentes de Diabetes inmunomediadas.* En esta categoría, hay dos condiciones conocidas. El síndrome del hombre rígido es un trastorno del sistema nervioso central caracterizado por rigidez de los músculos y espasmos. Los

pacientes usualmente presentan títulos altos de autoanticuerpos anti GAD.

Los anticuerpos que se unen al receptor de insulina, pueden causar Diabetes, ya que bloquean la unión de la insulina a su receptor en tejidos blanco. No obstante, en algunos casos, estos anticuerpos actúan como agonistas de la insulina ocasionando hipoglucemia. Este tipo de anticuerpos se encuentran en pacientes que padecen lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes.

I 1.2.3.8 *Otros síndromes genéticos asociados con Diabetes.* Varios síndromes genéticos están acompañados por una alta incidencia de Diabetes. Entre ellos se incluyen anomalías cromosómicas como el síndrome de Down, síndrome de Klinefelter y síndrome de Turner.

I 1.2.4 Diabetes mellitus Gestacional (DMG)

Se ha definido a este tipo de Diabetes como una alteración de la tolerancia a la glucosa que se inicia o se reconoce por primera vez en el embarazo en curso (tercer trimestre

del embarazo). La definición se aplica independientemente de si se utiliza insulina o solo modificación de la dieta como tratamiento o si la condición persiste después del embarazo. Posteriormente al parto, la mujer debe ser reclasificada, en una de las siguientes categorías: Diabetes, glucosa alterada en ayunas (IFG), prueba de tolerancia a la glucosa alterada (IGT), normoglucemia. En la mayoría de los casos de DMG, la regulación de la glucosa volverá a la normalidad después del parto.

Aunque la DMG es una alteración metabólica frecuente durante el embarazo, la verdadera prevalencia de la enfermedad es aún confusa. La prevalencia de la DMG en la población general es variable. La media oscila entre 3 y 5%, con un límite superior de 14% en Estados Unidos, resultando en más de 20000 casos anuales.

I 1.3 Complicaciones de la Diabetes

I 1.3.1 Complicaciones Agudas

Los pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 son vulnerables a sufrir tanto descompensaciones metabólicas hiperglucémicas graves

(cetoacidosis) como episodios hipoglucémicos (tratamiento con insulina). La cetoacidosis se encuentra favorecida por la deficiencia de insulina acoplada con incrementos de glucagón (dado que no se encuentra contrabalanceado) lo que provoca en primer lugar hiperglucemia, como así también aumento de la lipólisis con la consecuente oferta de ácidos grasos libres al hígado para su oxidación a cuerpos cetónicos (ácido acetoacético,  $\beta$  hidroxibutírico y acetona) que pueden ser utilizados por las células como fuente de energía supliendo la imposibilidad del consumo de glucosa. La cantidad de cuerpos cetónicos producidos supera la capacidad de su oxidación celular y su acumulación en la sangre desencadena acidosis y agravamiento de la hiperosmolaridad.

En el caso de Diabetes mellitus tipo 2, los pacientes descompensados pueden presentar coma hiperosmolar no cetósico, debido a una deshidratación severa a causa de la diuresis hiperglucémica.

### I 1.3.2 Complicaciones Crónicas

Las complicaciones a largo plazo son las mismas para Diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, y son las principales causas de morbilidad y mortalidad.

En la mayoría de los pacientes las complicaciones tardías más frecuentes pueden comprometer a la pared de los grandes vasos (aterosclerosis), o al endotelio y/o membrana basal de los pequeños vasos (microangiopatía). En este último caso puede afectar la microcirculación de diversos órganos: riñones (nefropatía diabética), retina (retinopatía), nervios (neuropatía), entre otros.

Así, se han denominado complicaciones microvasculares a la retinopatía, nefropatía y neuropatía, mientras que las complicaciones macrovasculares o macroangiopatía se deben a la formación de ateromas y sus secuelas clínicas (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente vascular periférico con gangrena). Existen complicaciones mixtas como el pie diabético y las alteraciones óseas y articulares. A continuación se amplían

aspectos de las diversas complicaciones, profundizando en las alteraciones óseas dado que se relaciona directamente con el tema del presente trabajo de tesis

I 1.3.2.1 *Macroangiopatía*. Se denomina así, al daño que la Diabetes va produciendo en los vasos de mediano y grueso calibre. En la Diabetes se producen una serie de trastornos que, de diferentes maneras van dañando el endotelio vascular y llegan a producir una placa de ateroma (depósito en la túnica íntima de colesterol, tejido fibroso, miocitos y células inflamatorias) que puede llegar a obstruir la luz del vaso haciendo que el flujo sanguíneo se reduzca, comprometiendo la circulación de los órganos irrigados.

Además, estas placas de ateroma pueden ulcerarse formándose rápidamente un trombo sobre ellas, pudiendo obstruir el vaso (o una de sus ramificaciones) completamente y de forma repentina, dando lugar a un infarto agudo de miocardio si afecta a las arterias coronarias, o a un accidente cerebro-

vascular si afecta a alguna de las arterias que irrigan el encéfalo.

I 1.3.2.2 *Microangiopatía*. En la Diabetes se produce un engrosamiento de la membrana basal de los capilares, con o sin alteraciones del endotelio y/o pérdida de pericitos, lo cual ocasiona la microangiopatía. También se sabe que los capilares diabéticos son más permeables a las proteínas plasmáticas. La microangiopatía diabética afecta de manera precoz y específica a la retina (retinopatía), también es la base para el desarrollo de la nefropatía diabética y algunas de las formas de la neuropatía diabética, donde se ven afectados, tanto el sistema nervioso central como periférico, comprometiendo en este último caso, a los miembros inferiores principalmente.

I 1.3.2.3 *Alteraciones óseas*. Este tipo de complicación, junto con las alteraciones articulares y el pie diabético entran dentro de la clasificación de complicaciones mixtas, en las cuales se interrelacionan disfunciones micro- y macrovasculares.

Este tipo de complicación se ampliara con mayor profundidad en la sección Metabolismo óseo y Diabetes

### I 1.4 Mecanismos de patogenicidad

En estudios como el DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) y UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) se ha identificado a la hiperglucemia como uno de los factores de riesgo involucrado en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la Diabetes mellitus. Existen varias hipótesis para explicar el origen de dichas complicaciones, entre ellas: la hipótesis de los productos de glicación avanzada (AGE, advanced glycation endproducts) (Vlassara H 1997); la hipótesis de la vía de los polioles (Hotta N 1995); estrés oxidativo (Baynes JW 1991); estrés reductor o pseudohipoxia (Williamson JR 1993); hipoxia verdadera (Cameron NE 1997); estrés carbonílico (Lyons 1997), alteraciones en el metabolismo de las proteínas (Witztum 1997); aumento de la actividad de la proteína-quinasa C (PKC) (Ishii 1998); modificaciones en la actividad de factores de

crecimiento (Pfeiffer 1995) o citoquinas (Sharma 1997); vía de las hexosaminas (Kolm-Litty 1998).

Estas hipótesis se superponen unas con otras. La formación de AGEs y la acumulación de polioles pueden provocar estrés oxidativo, el estrés oxidativo puede acelerar la formación de AGEs, el estrés reductor puede activar la PKC, los AGEs pueden inducir la expresión de citoquinas y factores de crecimiento.

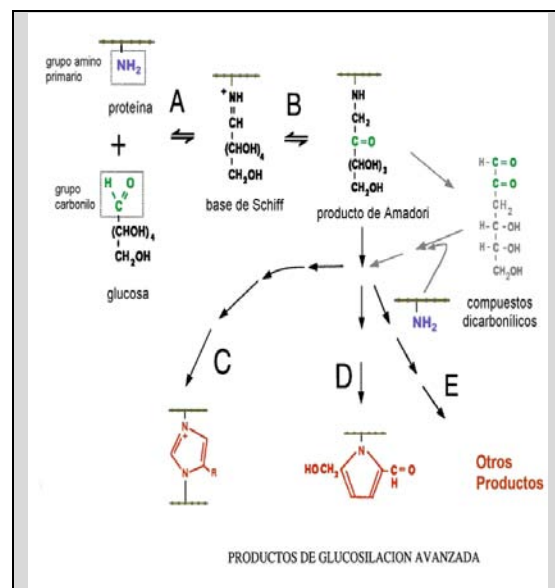
De las diversas hipótesis propuestas se desarrollará en profundidad, la de los productos de glicación avanzada AGEs, dado que se relaciona de forma directa con el tema de tesis, pero previo a exponer la forma en que los AGEs originan las complicaciones de la Diabetes, se ampliaran diferentes conceptos respecto a los productos de glicación avanzada, en la siguiente sección

## I 2 Productos de glicación avanzada (AGEs)

### I 2.1 Formación

Los productos de glicación avanzada (AGEs) se forman por medio de la reacción de Maillard, un proceso no enzimático entre el carbonilo libre de un azúcar reductor en su forma acíclica (mayoritariamente glucosa), y un grupo amino libre de una proteína ( $\alpha$ -amino terminal o  $\epsilon$ -amino de una lisina). A lo largo de esta reacción se pueden distinguir tres etapas: inicialmente se produce la asociación del azúcar con la proteína, formando un compuesto denominado base de Schiff (Figura I 1A), la estructura de este compuesto se reordena hacia una forma más estable, denominada producto de Amadori (Figura.I 1B). Éste posteriormente sufre una serie de lentas y complejas transformaciones que conducen a la formación de compuestos generalmente coloreados y/o fluorescentes (Figura.I 1C, D y E). En condiciones fisiológicas la aparición de estos compuestos está determinada por la concentración de azúcares reductores y por el tiempo

de exposición de la proteína a los mismos (vida media de la proteína). En proteínas de recambio rápido, el proceso de glicosilación no enzimática no supera, en general, las etapas iniciales (formación de la base de Schiff y eventualmente del producto de Amadori), mientras que sobre las proteínas de vida media larga se llegan a formar los productos de glicación avanzada.



**Figura I 1.** Esquema de reacción del proceso de glicación no enzimática de proteínas. (A) Formación de la base de Schiff. (B) Reordenamiento de Amadori. A través de una serie de reacciones complejas los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C) pirrólica (D) y otras diversas (iminas, furanos, piridinas, etc).

La base de Schiff inicialmente formada, es sólo estable por un corto tiempo, luego del cual se inicia un



proceso de reordenamiento de los enlaces químicos, que da lugar a un producto más estable denominado genéricamente producto de Amadori. Dicho producto aun posee un grupo carbonilo con capacidad de seguir reaccionando con grupos amino primarios accesibles y, al igual que lo que ocurría con los azúcares. Este producto, aunque de formación reversible, es relativamente estable.

El hecho de que ambas reacciones sean reversibles y consecutivas determina que de acuerdo al tiempo de evolución del sistema considerado, habrá predominio de la base de Schiff (horas) o del producto de Amadori (días). La interrupción del contacto de la glucosa con la proteína en cualquiera de estas etapas produce la reversión completa del efecto. Una vez formado el producto de Amadori, puede sufrir una serie de modificaciones oxidativas y no oxidativas por medio de reacciones irreversibles pero lentas, que demoran semanas o años. Así se llega a una muy variada familia de productos covalentemente unidos a

proteínas de vida media larga, llamados AGEs, que son originados por mecanismos diferentes. La más sencilla de estas vías, corresponde a la oxidación directa de la cetona perteneciente a un producto de Amadori, dando como resultado una molécula de carboximetil-lisina (CML), unida irreversiblemente a la proteína.

En otra vía, un producto de Amadori puede sufrir una deshidratación no oxidativa. Esta reacción espontánea deriva en la recuperación de la estructura proteica original (grupo amino libre) y en la producción de 3-desoxiglucosona (3DG), un compuesto dicarbonílico muy reactivo que ya no se encuentra covalentemente unido a la proteína; de esta manera, el 3DG puede difundir y reaccionar con otro producto de Amadori (dando como resultado compuestos pirrólicos como la pirralina) o con la cadena lateral de una arginina (dando compuestos imidazólicos como la imidazolona) (Figura I 1).

*In vivo*, la cantidad de AGEs que se encuentran sobre una proteína depende de la reactividad de sus

grupos amino, y está determinada por su microambiente, la concentración de glucosa, y la vida media de las proteínas (Wautier y Schmidt 2004).

Inicialmente, se creía que los AGEs se formaban principalmente entre la glucosa y las proteínas extracelulares. Sin embargo, debido a la mayor reactividad de los precursores dicarbonílicos derivados de la glucosa generados intracelularmente (glioal, metilglioal y 3DG), en la actualidad se considera que la alta concentración de glucosa dentro de la célula (observado por ejemplo en los tejidos no insulino dependientes de un paciente con Diabetes descompensada) es el evento principal de la iniciación en la formación de AGEs intracelulares (Brownlee 2005, Brownlee 2001).

### I 2.2 Metabolismo

La formación de AGEs se produce lentamente, en condiciones fisiológicas, y afecta principalmente a proteínas de larga vida media, como el colágeno, importante en los procesos de envejecimiento (Forbes 2005). Otras proteínas de vida media larga

que sufren glicación son la mielina, tubulina, activador del plasminógeno 1 y el fibrinógeno (Vlaasara 1996).

Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia o estrés oxidativo, la formación de AGEs aumenta considerablemente (Jay 2006), las personas diabéticas tienen concentraciones séricas de AGEs más altas que los individuos no diabéticos (Sharp 2003).

Existen mecanismos de detoxificación, como los sistemas enzimáticos compuestos por la oxaldehído reductasa y la aldosa reductasa. Los sistemas enzimáticos glioalasa I y II, fructosamina-3-quinasa y fructosamina oxidasa también son responsables de la interrupción de las reacciones de glicación en diferentes etapas. No obstante, en condiciones de exceso en la formación de AGEs, como por ejemplo en la Diabetes, estos sistemas pueden no ser suficientes.

La eliminación de los AGEs formados sobre los distintos componentes tisulares, se realiza por proteólisis extracelular o por células *scavenger* como los macrófagos, que

endocitan AGEs a través de receptores y realizan una proteólisis intracelular (Bierhaus 1998). La proteólisis intracelular de AGEs produce productos que, tras ser liberados al plasma, pueden ser excretados en la orina (Gugliucci 2007). Por lo tanto, la eficiencia de remoción de AGEs depende, en última instancia, de la eficacia de la depuración renal. En pacientes diabéticos con falla renal (nefropatía), se ve afectada la depuración de los AGEs y esto contribuye en gran parte, a la acumulación de altas concentraciones de AGEs sérico y tisular encontrados en estos individuos (Gugliucci 2007, Nakamura 2003).

### I 2.3 Efectos de los AGEs

#### I 2.3.1 Efectos Directos

Las complicaciones crónicas en apariencia tan diferentes, poseen alteraciones vasculares similares. Todas se caracterizan por un aumento en la permeabilidad del endotelio vascular con extravasación de proteínas plasmáticas, deposición irreversible de estas proteínas sobre el colágeno del subendotelio,

engrosamiento de la matriz extracelular subendotelial de las células subyacentes. El efecto conjunto de estos eventos patológicos es un estrechamiento progresivo de la luz de la vasculatura en pacientes diabéticos, con perfusión inadecuada de los órganos afectados (Brownlee 1997).

Varios estudios han revelado que existe un entrecruzamiento progresivo entre las fibras de colágeno, que aumenta con la edad de un individuo normal. Estos entrecruzamientos (que son al azar, a diferencia de las uniones sitio-específicas catalizadas por la enzima lisil-oxidasas) hacen al colágeno menos soluble y menos sensible a la digestión enzimática (Schinder & Khon 1981), confiriendo una mayor rigidez y falta de elasticidad al tejido que lo contiene (por ejemplo, la pared vascular) (Schuyler 1976). Estos procesos de envejecimiento fisiológico se ven acelerados en individuos diabéticos y se asocian en forma directa con los niveles tisulares de AGE-colágeno (Beisswenger 1995).

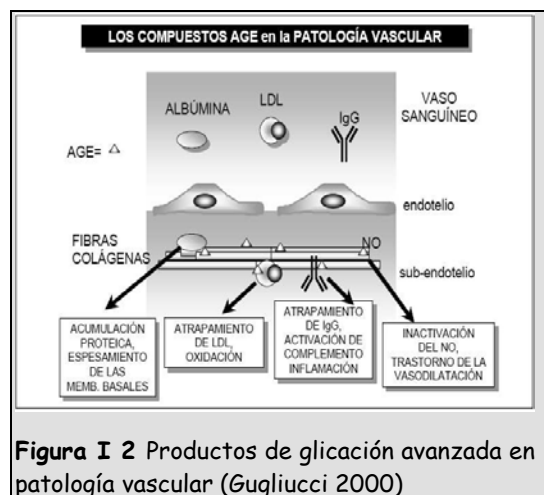
Las estructuras AGEs, unidas covalentemente al colágeno de la matriz extracelular en la pared vascular, pueden actuar como una red para el atrapamiento de albúmina, inmunoglobulinas y LDL plasmáticas extravasadas, estén o no glicadas (Figura I 2). Una vez que estas proteínas de vida media corta quedan atrapadas en la matriz subendotelial, pueden servir de sustrato para la formación de más AGEs, contribuyendo así al engrosamiento de la pared vascular (Bucala 1992).

La formación de AGEs sobre proteínas de la matriz extracelular puede también provocar alteraciones en ciertas funciones de la membrana basal, provocando aumentos en el diámetro de poro de la matriz vascular, facilitando la extravasación de proteínas plasmáticas.

La acumulación de AGEs también afecta el tono vascular y el flujo sanguíneo local, dado que provoca inactivación química del NO (Bucala 1991), sustancia que regula ambos procesos. Debido en parte a este efecto, los pacientes diabéticos padecen hipertensión y presentan

defectos en la respuesta vasodilatadora del lecho vascular (McVeigh 1992).

Por otro lado, la acumulación de AGEs sobre la fosfatasa alcalina, provoca una disminución en su actividad (McCarthy 1998). Esta enzima interviene en el remodelado óseo; así, un aumento en el grado de glicación de esta enzima podría tener consecuencias patológicas para el tejido óseo.



**Figura I 2** Productos de glicación avanzada en patología vascular (Gugliucci 2000)

### I 2.3.2 Efectos Indirectos o mediados por receptores

Diversos tipos celulares expresan receptores específicos para AGEs: Se ha demostrado su expresión en macrófagos, células del endotelio vascular, células mesangiales renales, fibroblastos, linfocitos T, células musculares lisas, células neuronales y

células óseas. La unión específica AGE-receptor inicia una secuencia de procesos que va a depender de la célula sobre la cual se expresa el receptor. La intensidad de la respuesta va a ser función de la concentración tisular de los AGEs, lo cual explica, en parte, las alteraciones celulares asociadas a varias complicaciones crónicas de la Diabetes.

En los **macrófagos** la unión AGE-receptor induce la síntesis y secreción de factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento insulina-símil (IGF-I) (Vlassara 1998, Kirstein 1992, Morohoshi 1995). En pacientes diabéticos descompensados, el aumento tisular de AGEs tendería a sobre estimular la proliferación celular y la producción de matriz extracelular, ambos procesos implicados en la formación de complicaciones vasculares (Figura I 3)



**Figura I 3** Productos de glicación avanzada: rol de los receptores (Gugliucci 2000)

En las **células del endotelio vascular**, la unión AGE-receptor induce un aumento en la permeabilidad de la monocapa celular, permitiendo la extravasación de proteínas plasmáticas al subendotelio (Espósito 1989). Además, incrementa la síntesis y expresión en la membrana endotelial tanto del factor tisular, como del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Ambas proteínas tenderían a provocar un estado protrombótico. La unión de proteínas-AGE a su receptor, induce un estrés oxidativo que provoca la activación del factor nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) (Figura I 3), lo que activa la expresión posterior de endotelina-1, molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), selectina E, factor tisular, trombosmodulina, el factor de

crecimiento endotelial vascular (VEGF) y citoquinas proinflamatorias como las interleuquinas-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-6 y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), además regula positivamente al receptor para AGE (RAGE). El bloqueo de RAGE, a su vez, inhibe la activación de NF- $\kappa$ B (Yonekura 2005, Goldin 2006)

La unión de AGEs a receptores específicos en las **células mesangiales renales** induce un aumento en la síntesis y secreción de factores de crecimiento como el transformante-beta (TGF- $\beta$ ) e IGF-1, así como de proteínas constituyentes de la matriz extracelular glomerular (colágeno de tipo IV, fibronectina y laminina) (Skolnik 1991, Pugliese 1997, Tsuji 1998). TGF- $\beta$  e IGF-1 son estimuladores potentes de la síntesis de matriz, pero ejercen efectos opuestos sobre la proliferación celular. Así, la acumulación renal de AGEs sería clave en la expansión mesangial característica de la nefropatía diabética, a través de la inducción de factores de crecimiento y acumulación de matriz extracelular (Figura I 4).

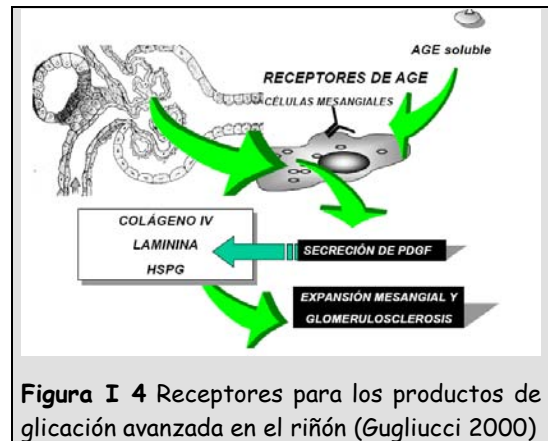


Figura I 4 Receptores para los productos de glicación avanzada en el riñón (Gugliucci 2000)

En los **osteoblastos** el aumento de los AGEs sobre la matriz proteica del hueso, disminuye su potencial para la inducción de la formación ósea, proceso que es mediado por osteoblastos. En nuestro grupo (McCarthy 1997, McCarthy 2001a, McCarthy 2001b) se ha demostrado previamente que los AGEs modulan el crecimiento y diferenciación de osteoblastos, mediante su acción vía receptores específicos de membrana y reducción de los niveles de IGF-1 libre. Las proteínas modificadas por AGE también tienen efectos sobre los **osteoclastos**: recientemente, en nuestro grupo, Gangoiti MV (Tesis doctoral, Gangoiti María Virginia 2011) estudió el efecto de los AGEs sobre osteoclastos en cultivo y encontró que los AGEs también afectan a este tipo celular, inhibiendo su crecimiento y diferenciación

(expresión de TRAP) e incrementando su expresión de RAGE.

En sintonía con los resultados de Gangoiti (2011), Valcourt U y colaboradores (2007) encontraron que la interacción de AGEs con sus receptores de membrana modula la osteoclastogénesis, disminuye el remodelado óseo y el recambio de colágeno, facilitando la acumulación de más AGEs en la matriz ósea.

En contraste con lo expuesto anteriormente, Miyata T y colaboradores (1997) han reportado que la resorción ósea se encuentra aumentada en presencia de AGEs.

### I 2.4 Receptores para AGEs

Se han descrito varias clases de receptores para los AGEs, entre ellos el mejor caracterizado es el RAGE. Este receptor pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas de superficie celular. El gen que codifica para RAGE se encuentra localizado en el cromosoma 6 en el complejo mayor de histocompatibilidad. Las regiones de consenso para el factor NF- $\kappa$ B y la IL-6 se localizan en el promotor del

gen de RAGE, y controlan la expresión de este receptor, asociando al RAGE con las respuestas inflamatorias.

Se ha demostrado la expresión de esta proteína en células endoteliales, miocitos, monocitos, células de la microglía, neuronas, fibroblastos y osteoblastos. Dicha expresión se encuentra aumentada en condiciones de exceso de AGE (Lin 2006, Goldin 2006, Cortizo 2003, Mercer 2007).

La unión de AGEs al receptor RAGE, lleva a la producción de estrés oxidativo debido a la estimulación de NAD(P)H oxidasa que provoca un aumento de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Goldin 2006). La generación de ROS incrementa los niveles de la proteína G p21Ras, lo que provoca como consecuencia el reclutamiento de fosfatidil-inositol-3'-quinasa (PI3K), y posterior activación de proteín-quinasa B (PKB) y quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), ERK1 y ERK2. Esta cascada de señales intracelulares provoca la activación del NF- $\kappa$ B, el cual modula la expresión de diferentes grupos de genes,

dependiendo del tipo celular (Yan 1994, Lander 1997, Deora 1998).

Los AGEs no son los únicos ligandos para RAGE, sino que este receptor tiene afinidad por otros péptidos y proteínas, incluyendo algunas isoformas de S100 (Stern 2002) y anfoterina (HMGB-1) (Yan 2004), ligandos implicados en la lesión vascular y en las alteraciones que ocasionan los AGEs en el tejido óseo (Zhou 2011).

El RAGE soluble (sRAGE) es una variante del receptor de membrana. Esta proteína carece de los dominios transmembrana y puede unirse a ligandos extracelulares. El exceso de sRAGE puede unir competitivamente a ligandos del RAGE, evitando de esta manera su interacción con el receptor RAGE y, por lo tanto, impidiendo la señalización celular. Se ha investigado en modelos experimentales de nefropatía diabética y aterosclerosis el uso de sRAGE como agente terapéutico (Goh 2008).

Como se mencionó anteriormente, existen varios receptores capaces de reconocer y

unirse a AGEs, como por ejemplo, AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3/galectina-3, Ezrin, radixin y moesina (familia de ERM) (McRobert 2003) y receptores *scavenger* de macrófagos (Goldin 2006).

El receptor AGE-R1 (oligosacaryltransferasa 48) está implicado en el aclaramiento de AGEs.

Por otro lado, el AGE-R3 (galectina 3) pertenece a la familia de las lectinas (proteínas de unión a hidratos de carbono). Este receptor está regulado positivamente en la hiperglucemia. Mercer N y colaboradores (2004) encontraron que el AGE-R3 es modulado por AGEs, hallándose aumentada su expresión en cultivos de osteoblastos incubados con AGEs.

### I 2.5 AGEs y complicaciones en la Diabetes

Los AGEs se consideran mediadores patogénicos importantes de las complicaciones de la Diabetes.

#### I 2.5.1 AGEs y microangiopatías

Las células endoteliales de los capilares de la retina, las células mesangiales de los glomérulos renales,



las neuronas y las células de Schwann de los nervios periféricos son afectadas en gran medida por la hiperglucemia, ocasionando:

I 2.5.1.1 *Retinopatía diabética:* los pericitos retinales son los primeros en ser afectados, ya que acumulan sorbitol, pierden capacidad contráctil, y mueren. Simultáneamente, ocurre una vasodilatación capilar, que se debe en parte a la pérdida de pericitos. Los pericitos expresan receptores RAGE que cuando interactúan con sus ligandos AGEs, desencadenan el aumento de la transducción de señales celulares y causan la pérdida de los mismos. En las células endoteliales, la interacción de los AGEs con sus receptores RAGE causa sobreproducción del factor de crecimiento de las células del endotelio vascular (VEGF), que a su vez, estimula la angiogénesis y la neovascularización, ambos procesos implicados en la patogénesis de la retinopatía (Ahmed 2005).

I 2.5.1.2 *Nefropatía diabética:* la acumulación de AGE en el riñón pueden contribuir a la alteración

progresiva de la arquitectura renal y pérdida de la función renal en los pacientes diabéticos a través de diversos mecanismos (Bohlender 2005). La formación de AGEs en proteínas de la matriz extracelular altera tanto la interacción de proteínas de la matriz entre sí, como la interacción entre las células y la matriz, participando de esta manera en la glomerulosclerosis diabética. Por ejemplo, la glicación no enzimática del colágeno tipo IV y laminina reduce sus capacidades de interactuar con proteoglicanos cargados negativamente, aumentando así la permeabilidad vascular a la albúmina (Silbiger 1993). Además, la formación de AGE en varios tipos de proteínas de la matriz impide su degradación por metaloproteinasas, lo que contribuye al engrosamiento de la membrana basal y expansión mesangial característica de la nefropatía diabética (Mott 1997).

I 2.5.1.3 *Neuropatía diabética:* la glicación de proteínas del citoesqueleto de las fibras nerviosas se ha relacionado con la patogénesis de la neuropatía diabética (Dyck

1996). En estudios *in vivo* hechos en ratas diabéticas se ha encontrado una disminución en la velocidad de conducción nerviosa, como así también en la generación de potenciales de acción de los nervios, y del flujo sanguíneo a los nervios periféricos, esto se pudo prevenir tratando a las ratas con inhibidores de los AGEs (Cullum 1991, McLean 1997).

La vía AGE-RAGE es un mecanismo probable que vincula la microangiopatía y la neuropatía, y es sustentado por la co-localización de la carboximetil-lisina (CML), RAGE, el NF- $\kappa$ B e IL-6 en los vasos epineurales, perineurales y endoneurales.

I 2.5.2 AGEs y macroangiopatías. Los AGEs son perjudiciales para la integridad de los vasos sanguíneos. En la pared de los vasos forman enlaces cruzados intra- e intermoleculares sobre proteínas de la matriz, lo que provoca rigidez de la vasculatura, e inhibe la actividad del óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Los AGEs no solo disminuyen los niveles de estos dos factores relajantes, sino que también inducen

la producción de endotelina-1, que es un potente vasoconstrictor, en respuesta a la activación de NF- $\kappa$ B.

Por otro lado, los AGEs son agentes quimiotácticos para los monocitos sanguíneos humanos, tanto *in vivo*, como *in vitro*. La localización de AGEs en el subendotelio induce migración de monocitos a través de la monocapa celular endotelial. La activación del NF- $\kappa$ B es esencial en la adhesión y migración de monocitos inducida por AGEs. La activación de RAGE por su unión a AGEs aumenta la permeabilidad del endotelio.

La unión de AGEs a RAGE en el endotelio también ocasiona cambios en la estructura de la superficie celular, pasando de un endotelio anticoagulante a un endotelio con características procoagulantes, vía reducción de la actividad de la trombosmodulina, acoplado a un aumento en la expresión del factor tisular (Goldin 2006)

I 2.5.3 AGEs y alteraciones óseas

El rol de los AGEs en este tipo de complicaciones se desarrolla en la

sección de metabolismo óseo y  
Diabetes.

### I 3 Tejido óseo

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo que, como otros tejidos conjuntivos, está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue al tejido óseo es la mineralización de su matriz, que produce un tejido de alta dureza pero a la vez resistencia a la flexión, capaz de proveer sostén y protección. El mineral es fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . Estos cristales son pequeños y contienen numerosas impurezas tales como carbonato, magnesio y fosfatos ácidos. Estas sales minerales se depositan por cristalización en el entramado formado por las fibras de colágeno, durante el proceso de mineralización.

Debido a su contenido mineral el tejido óseo sirve como sitio de reserva de calcio y fosfato. Tanto el calcio como el fosfato pueden ser movilizados de la matriz ósea y captados por la sangre según sea necesario para mantener las concentraciones adecuadas en todo el organismo. Por lo tanto, además de

brindar sostén y protección, el tejido óseo desempeña un papel importante en la regulación homeostática de la calcemia.

#### I 3 1 Estructura

Los huesos se pueden clasificar según su forma en huesos planos, como los del cráneo, mandíbula, etc, y huesos largos como el fémur, la tibia y el húmero.

La estructura de un hueso largo (Figura I 5) está constituida por: **diáfisis** (parte alargada del hueso), **epífisis** (extremos ensanchados o terminaciones del hueso), **metáfisis** (unión de la diáfisis con las epífisis), **cartílago articular** (fina capa de cartílago hialino que recubre la epífisis donde el hueso se articula con otro hueso), **periostio** (membrana que rodea la superficie del hueso no cubierta por cartílago, es esencial en el crecimiento óseo, su reparación y nutrición), **cavidad medular** (espacio cilíndrico ubicado en la parte central de la diáfisis), **endostio** (membrana que contiene células osteoprogenitoras, osteoblastos y osteoclastos y se

encuentra tapizando la cavidad medular)

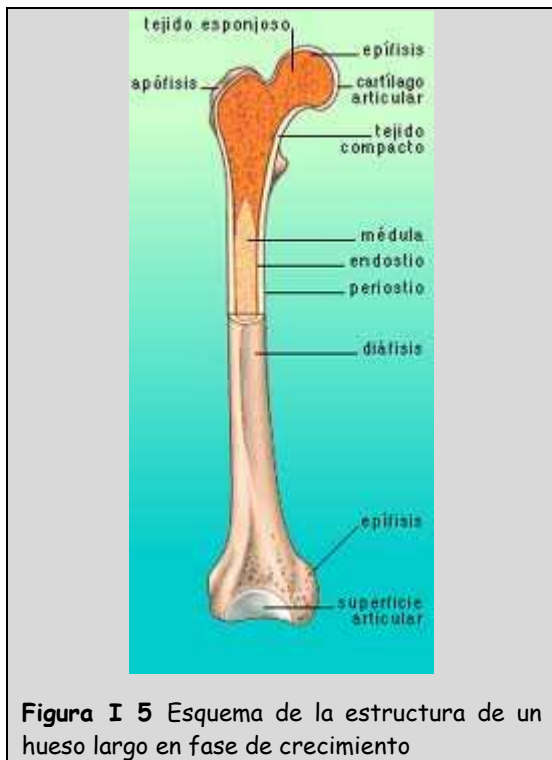


Figura I 5 Esquema de la estructura de un hueso largo en fase de crecimiento

De acuerdo con el patrón de colágeno que forma el osteoide el hueso se puede clasificar en: **hueso primario**, que se caracteriza por una organización irregular de fibras de colágeno y es mecánicamente débil o **hueso laminar** que se caracteriza por una organización regular paralela de colágeno en láminas y es mecánicamente fuerte (se detalla a continuación). El hueso primario es el que constituye inicialmente el esqueleto del feto, y es el que se genera en adultos cuando la formación de hueso nuevo se produce

rápidamente como ocurre en la reparación de una fractura. Este hueso es reemplazado posteriormente por hueso laminar más resistente mediante el mecanismo de remodelación (ver sección I 3 6). Prácticamente todos los huesos en el adulto maduro sano son hueso laminar.

Desde el punto de vista macroscópico, el tejido óseo se organiza en los huesos de dos formas diferentes. El tejido óseo esponjoso o hueso trabecular, compuesto por trabéculas que se entrecruzan en distintas direcciones y forman un reticulado esponjoso cuyos espacios huecos intercomunicantes están ocupados por la médula ósea. Por el contrario el tejido óseo compacto o hueso cortical forma, a simple vista, una masa compacta. A nivel microscópico ambos tipos de huesos, están compuestos por una estructura básica denominada osteona.

### I 3 1 1 Hueso esponjoso o trabecular

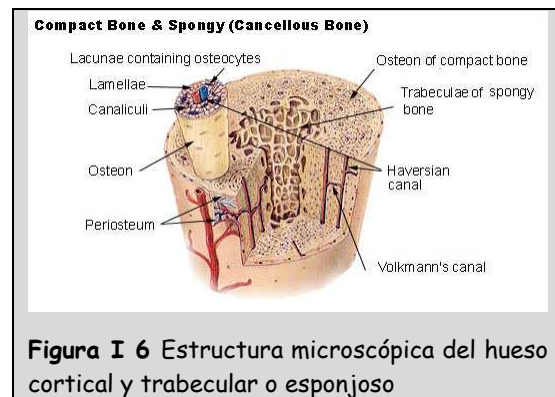
Es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos

El tejido óseo trabecular también está compuesto por láminas, pero no forman sistemas de Havers, dado que no se observan conductos de Havers ni de Volkmann, ni vasos sanguíneos. El elemento básico estructural del tejido óseo trabecular es la osteona trabecular. En dichas osteonas, las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando las trabéculas. Estas trabéculas forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de médula ósea (Figura I 6). Dentro de las trabéculas están los osteocitos. Los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos.

### I 3 1 2 Hueso compacto o cortical

Constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como la parte externa de todos los huesos del cuerpo. Tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers que se extienden longitudinalmente (Figura I 6). Estos

canales están conectados con otros llamados canales de Volkmann que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos y nervios para extenderse por el hueso.



Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay orificios o lagunas donde se encuentran los osteocitos, cada laguna tiene una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones de los osteocitos, que le permiten intercambiar nutrientes con el líquido intersticial. Estos canalículos se conectan entre sí y también lo hacen con los canales de Havers.

Se define osteona o sistema de Havers al conjunto de un canal central, las láminas concéntricas que lo rodean y las lagunas, canalículos y osteocitos en ellas. Las láminas

ubicadas entre osteonas se denominan láminas intersticiales.

### I 3. 2 Matriz ósea

Los principales componentes estructurales de la matriz ósea son el colágeno de tipo I, y en menor medida, el colágeno de tipo V. También se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos III, XI y XIII. Todos los colágenos constituyen alrededor del 90% de la masa total de proteínas de la matriz ósea.

La matriz también contiene otras proteínas no colágenas. Estas proteínas, que constituyen el 10-15% del peso total de proteínas, son indispensables para el desarrollo, crecimiento, remodelado y reparación del hueso. Aproximadamente un cuarto de ellas son exógenas como la albumina y la  $\alpha_2$ HSGlicoproteína (derivada del suero), los factores de crecimiento y citoquinas, que son proteínas reguladoras pequeñas entre las que se encuentran los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), los

factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y las interleucinas (IL-1, IL-6). Las BMP inducen la diferenciación de las células mesenquimáticas en osteoblastos, las células formadoras de tejido óseo

Además del colágeno las células óseas sintetizan y secretan proteínas no colágenas que se pueden dividir en tres grupos:

#### ✓ Proteínas

glicosiladas: fosfatasa alcalina, osteonectina, tetranectina, tenascina-C y tenascina-W.

#### ✓ glucoproteínas

multiadhesivas: osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, vitronectina fibrilina 1 y 2, entre otras.

#### ✓ proteínas

dependientes de la vitamina K osteoespecíficas, que incluyen a la osteocalcina, que captura el calcio desde la circulación y atrae y estimula los osteoclastos en el remodelado óseo.

Las células óseas también sintetizan macromoléculas de proteoglucanos que contribuyen a que el tejido ofrezca resistencia a la compresión

En la matriz ósea hay espacios llamados lagunas u osteoplastos, cada uno de los cuales contiene una célula ósea u osteocito. El osteocito extiende una gran cantidad de prolongaciones en túneles estrechos denominados canalículos. Los canalículos atraviesan la matriz mineral para conectar las lagunas contiguas y permitir el contacto entre las prolongaciones de osteocitos vecinos. De esta manera se forma una red continua de canalículos y lagunas con células y sus prolongaciones en toda la masa del tejido mineralizado.

### I 3.3 Células del tejido óseo

Los tipos celulares presentes en el tejido óseo son cinco: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y osteoclastos. Con excepción del osteoclasto, cada una de estas células puede considerarse una forma diferenciada del mismo tipo celular básico (Figura I 7). Cada una se

transforma de una forma más inmadura a una más madura en relación con la actividad funcional (crecimiento óseo). En cambio, el osteoclasto tiene su origen en una línea celular diferente y actúa en la resorción ósea, actividad relacionada con el remodelado de los huesos.

### I 3.3.1 Células osteoprogenitoras

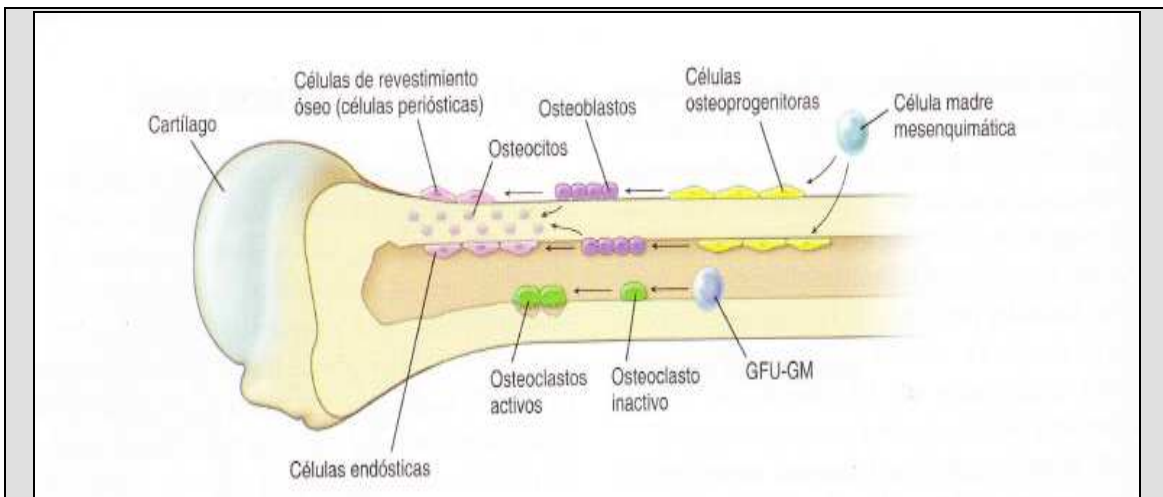
Estas células derivan de células progenitoras mesenquimáticas. La osteogénesis, proceso de formación de tejido óseo nuevo, necesita una población renovable de células osteoprogenitoras (células precursoras de osteoblastos) que respondan a estímulos moleculares que las transformen en células formadoras de hueso. Las células osteoprogenitoras derivan de células mesenquimáticas de la médula ósea que tienen la potencialidad de diferenciarse en varios tipos celulares diferentes, entre ellos fibroblastos, osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células musculares. La proteína principal que desencadena la diferenciación osteogénica de las células



mesenquimáticas es el factor de transcripción llamado factor fijador central alfa 1 (CBFA 1) o Runx2. Esta proteína estimula la expresión de genes característicos del fenotipo osteoblástico.

también podrían hallarse en la microvasculatura que irriga el tejido óseo.

La célula osteoprogenitora es una célula en reposo que puede transformarse en un osteoblasto para luego secretar matriz ósea. Estas células se ubican en las superficies externas e internas de los huesos y



**Figura I 7** Representación esquemática de las células asociadas con el hueso. Todas las células, excepto los osteoclastos, tienen su origen en células madre mesenquimáticas, las que se diferencian en células osteoprogenitoras, osteoblastos y, por último, osteocitos y células de revestimiento óseo. Las células de revestimiento óseo que están en las superficies externas del hueso forman parte del periostio, de ahí el término células periósticas. En cambio, las células de revestimiento óseo ubicadas en las superficies internas del hueso con frecuencia reciben el nombre de células endósticas. Obsérvese que las células osteoprogenitoras y las células de revestimiento óseo tienen un aspecto semejante y suele ser difícil distinguir unas de otras. Los osteoclastos se originan en células progenitoras hemopoyéticas, las que se diferencian en células que resorben tejido óseo. (Ross-Pawlina 5ª edición, 2007)

### I 3.3.2 Osteoblasto

Es la célula encargada de formar hueso, que como el fibroblasto y el condroblasto conserva la capacidad de dividirse. Secreta colágeno de tipo I, otras proteínas de la matriz ósea, así como la sustancia fundamental, las cuales constituyen en conjunto la matriz no mineralizada inicial, llamada osteoide. Las proteínas de la matriz ósea producidas por el osteoblasto incluyen proteínas fijadoras de calcio, como la osteocalcina y la osteonectina, glucoproteínas multiadhesivas como las sialoproteínas óseas I y II, fosfatasa alcalina entre otras. Otra función del osteoblasto es llevar a cabo la mineralización de la matriz.

En contraste con los osteoblastos secretores que están presentes en los lugares donde hay depósito activo de matriz, los osteoblastos inactivos son células aplanadas que revisten la superficie ósea. Estas células se parecen morfológicamente a las células osteoprogenitoras. Los osteoblastos responden a estímulos mecánicos (entre otros) para mediar los cambios

en el crecimiento y remodelado de los huesos. A medida que se deposita la matriz u osteoide, el osteoblasto va quedando rodeado por ella. Cuando termina incluido por completo dentro de la matriz mineralizada, puede morir por apoptosis o convertirse en un osteocito. Los osteoblastos también regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos. Así, los osteoblastos junto con los osteoclastos, juegan un papel importante en el recambio óseo y en la homeostasis del calcio.

### I 3.3.3 Osteocito

Como se ha descrito, una vez que el osteoblasto queda totalmente rodeado por la matriz mineralizada, si no muere por apoptosis cambia su nombre por el de osteocito, la célula que ahora es responsable de mantener la matriz ósea. Una de las funciones de los osteocitos es la mecanotransducción, proceso en el cual la célula responde a fuerzas mecánicas aplicadas al hueso. Diferentes estímulos mecánicos (por ejemplo, la falta de gravedad o el aumento de la carga mecánica) alteran no solo la expresión génica sino

también el mecanismo apoptótico celular. Los osteocitos pueden sintetizar matriz nueva y también resorberla, al menos en un grado limitado. Estos procesos contribuyen de manera importante no solo a mantener la calidad de la matriz ósea mineralizada, sino también a la homeostasis del calcio en sangre.

La muerte de los osteocitos por traumatismos (fracturas), envejecimiento celular o apoptosis, da como resultado la resorción de la matriz ósea por actividad de los osteoclastos, seguida por reparación o remodelado del tejido óseo por acción de los osteoblastos.

Cada osteocito ocupa un espacio, la laguna u osteoplasto, que se adapta a la forma de la célula. Los osteocitos extienden prolongaciones citoplasmáticas a través de canalículos en la matriz para establecer contacto con las prolongaciones de osteocitos vecinos y de células de revestimiento óseo del entorno mediante uniones comunicantes o nexos. Los osteocitos también pueden comunicarse en forma indirecta con osteoblastos, pericitos

de los vasos sanguíneos y otras células óseas distantes por medio de la expresión de moléculas de señal diversas, como el óxido nítrico.

### I 3.3.4 Células de revestimiento óseo

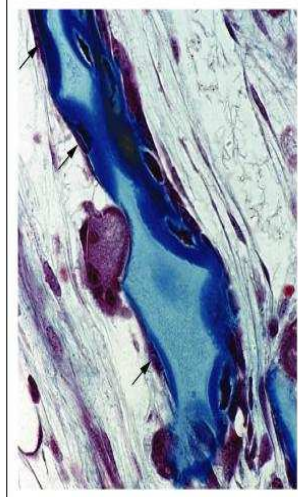
Derivan de los osteoblastos y tapizan el tejido óseo que no está siendo remodelado. En dichos sitios, las superficies óseas están revestidas por una capa de células aplanadas, que son las células de revestimiento. Se cree que estas células participan en el mantenimiento y nutrición de los osteocitos incluidos en la matriz ósea subyacente y que regulan el movimiento bidireccional de calcio y fosfato entre la sangre y el hueso.

### I 3.3.5 Osteoclastos

Son células multinucleadas grandes que aparecen en los sitios en los que hay resorción ósea. Están apoyados directamente sobre la superficie ósea en proceso de resorción (Figura I 8).

Como consecuencia de su actividad, en el hueso situado por debajo del osteoclasto se forma una excavación llamada laguna de resorción (laguna de Howship). Posee

gran cantidad de enzimas, entre ellas la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) que es indicadora de actividad y diferenciación osteoclástica.



**Figura I 8** Espícula de cartílago calcificado teñida con la técnica de Mallory (coloreada de azul pálido) con una cubierta de tejido óseo (teñido de azul oscuro). Se puede observar la presencia de un osteoclasto (lado izquierdo de la espícula) que ha resorbido tejido óseo y ahora está en una depresión (laguna de Howship) de la superficie especular. Las flechas señalan el citoplasma de las células de revestimiento (Ross-Pawlina 5<sup>o</sup> edición, 2007).

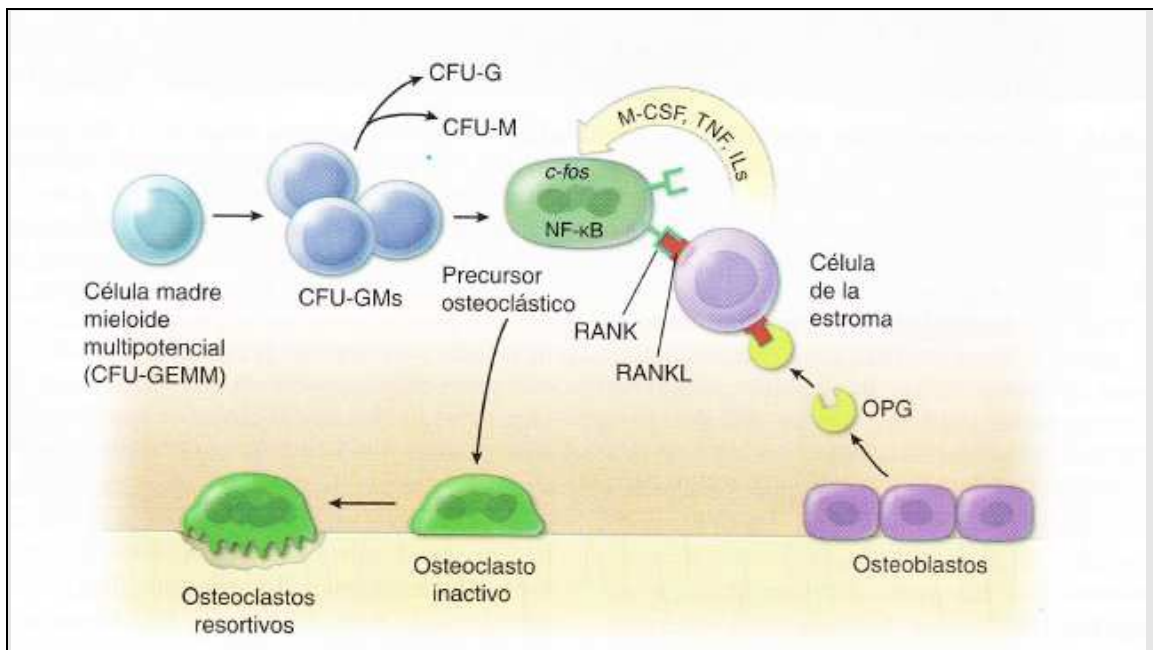
Los osteoclastos derivan de la fusión de células progenitoras hematopoyéticas mononucleares (CFU-GM) bajo el efecto de diferentes citoquinas. Estas células CFU-GM dan origen a los linajes de granulocitos neutrófilos (CFU-G) y de monocitos (CFU-M). La formación de los osteoclastos ocurre en asociación estrecha con células del estroma de la médula ósea. Estas células secretan

citoquinas indispensables para la diferenciación a partir de células CFU-GM tanto de los osteoclastos como de los macrófagos. Son ejemplos de estas citoquinas el factor estimulante de colonia de monocitos (M-CSF), el TNF y varias interleuquinas. En un principio las células predestinadas a convertirse en osteoclastos (precursores osteoclásticos) expresan dos factores de transcripción importantes, c-fos y NF $\kappa$ B; luego una molécula receptora llamada RANK (receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B) se expresa en su superficie. El receptor RANK interactúa con la molécula ligando de RANK (RANKL) producida por las células del estroma y expresada en la superficie de estas células (Figura I 9). El mecanismo de señalización RANK-RANKL es indispensable para la diferenciación y la maduración de los osteoclastos. El RANKL también actúa sobre el osteoclasto maduro estimulando la actividad resorptiva e influyendo sobre la organización del citoesqueleto. Otro factor importante que participa en la

diferenciación osteoclástica es el M-CSF, ya que promueve la proliferación de precursores y la supervivencia de todos los miembros del linaje osteoclástico, ejerciendo este efecto a través de su receptor que posee actividad de tirosina quinasa (c-Fms). El M-CSF es producido por una variedad de células, particularmente las células osteoblásticas

La vía RANK-RANKL puede ser bloqueada por la osteoprotegerina (OPG), que se puede unir a RANKL y así neutralizar su acción. Esto afecta el mecanismo de señalización RANK-RANKL en el osteoclasto y actúa como un inhibidor poderoso tanto de la formación de los osteoclastos, como de la activación de osteoclastos maduros. Los osteoblastos son los productores principales de OPG, cuya

secreción está modulada por muchos reguladores metabólicos óseos, como la IL-1, el TNF, el TGF- $\beta$ , la vitamina D y la prostaglandina E<sub>2</sub>. Varios estudios recientes indican que las sustancias que promueven la diferenciación osteoclástica y la resorción ósea actúan a través del sistema OPG/RANKL en la médula ósea. Los osteoclastos recién formados sufren un proceso de activación para convertirse en células capaces de llevar a cabo la resorción ósea. El osteoclasto neoformado tiene que activarse para poder llevar a cabo la resorción. Durante este proceso sufre una polarización muy bien definida.



**Figura I 9** Los osteoclastos derivan de la fusión de células progenitoras hematopoyéticas mononucleares (CFU-GM), que provienen de células madre mieloides pluripotenciales (CFU-GEMM). Las células CFU-GM dan origen también a los linajes granulocitos neutrofilos (CFU-G) y de monocitos (CFU-M). La formación de los osteoclastos ocurre en asociación estrecha con las células del estroma de la médula ósea, que secretan factores estimulantes de colonia de monocitos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF) y varias interleuquinas (IL). Los precusores osteoclasticos expresan c-fos,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  y moléculas receptoras llamadas RANK (receptor activador del factor nuclear  $\text{K}\beta$ ). La señal generada por la interacción del receptor RANK con la molécula ligando de RANK (RANKL) es indispensable para la diferenciación y maduración de los osteoclastos. La osteoprotegerina puede bloquear este mecanismo (Ross-Pawlina 5<sup>o</sup> edición, 2007).

Cuando resorben hueso en forma activa los osteoclastos muestran tres regiones especializadas: 1) Borde festoneado o borde en cepillo, que es la porción de la célula en contacto directo con el hueso. Contiene muchos repliegues profundos de la membrana plasmática que forman estructuras del tipo de las microvellosidades y están encargados de aumentar la extensión de la superficie para la exocitosis de las enzimas hidrolíticas y la secreción

de protones por las bombas protónicas dependientes de ATP, lo mismo que para la endocitosis de los productos de degradación y los detritos óseos.

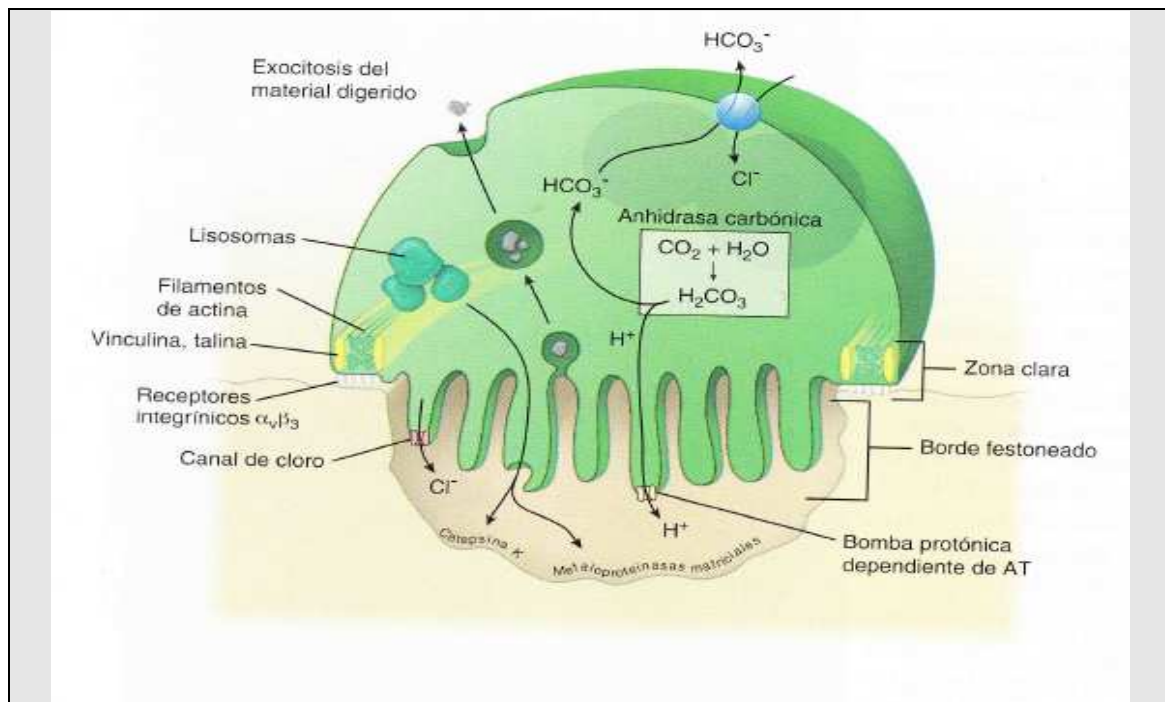
2) Zona clara (zona de sellado): es un perímetro de citoplasma anular contiguo al borde festoneado que delimita la superficie ósea en resorción. Contiene abundantes microfilamentos de actina, estos se hallan organizados en una estructura anular que está rodeada en ambos

lados por proteínas de unión a la actina, como la vinculina y la talina (Figura I 10). La membrana plasmática a la altura de la zona clara contiene moléculas de adhesión célula-matriz extracelular que tienen a su cargo la formación de un sello apretado entre la membrana celular y la matriz ósea mineralizada. Este sello se mantiene por la presencia de receptores integrinas (por ejemplo, receptor  $\alpha_v\beta_3$  para vitronectina, receptor  $\alpha_2\beta_1$  para colágeno o receptor  $\alpha_v\beta_1$ )

3) Región basolateral: interviene en la exocitosis del material digerido (Figura I 10). Las vesículas de transporte con material óseo degradado que sufrió endocitosis a la altura del borde festoneado se fusionan aquí con la

membrana celular para liberar su contenido por exocitosis. Dentro de estas vesículas se ha encontrado TRAP, lo que señala su papel en la fragmentación del material incorporado por endocitosis.

La mayoría de las vesículas del osteoclasto son lisosomas. El contenido de las mismas se libera en el espacio extracelular (laguna de resorción) a la altura de las hendiduras que hay entre los repliegues citoplasmáticos del borde festoneado. Son hidrolasas lisosómicas que actúan fuera de la célula, entre ellas se encuentran la catepsina k y las metaloproteinasas de la matriz que degradan el colágeno y otras proteínas de la matriz ósea.



**Figura I 10** En esta figura se puede observar la estructura del osteoclasto con sus tres regiones: borde festoneado, zona clara y región basolateral. La zona clara contiene abundantes microfilamentos organizados en una estructura anular rodeada en ambos lados por proteínas de unión a la actina, como la vinculina y la talina. La membrana celular en la región de la zona clara contiene moléculas de adhesión célula-matriz extracelular (integrinas) que forman un sello entre la membrana plasmática y la matriz ósea mineralizada. Al ocurrir esto, la anhidrasa carbónica inicia la acidificación generando  $H^+$  y  $HCO_3^-$ . Los protones son transportados fuera de la célula hacia la laguna de resorción por una bomba de protones localizada en el borde festoneado. El pH intracelular se mantiene por la presencia de un canal de  $Cl^-$  localizado en el borde festoneado y transporta  $Cl^-$  a la laguna. La matriz orgánica compuesta básicamente por colágeno tipo I, se degrada mediante la acción de la catepsina k (Ross-Pawlina 5ª edición, 2007).

Antes de que se produzca la resorción, la matriz ósea tiene que ser descalcificada por medio de la acidificación de la superficie del hueso, lo que inicia la disolución del mineral. El citoplasma del osteoclasto contiene anhidrasa carbónica II, que produce ácido carbónico a partir de dióxido de carbono y agua. Luego el ácido carbónico se disocia en bicarbonato y un protón. Los protones

se transportan a través del borde festoneado por medio de bombas de protones dependientes de ATP, esto genera un pH bajo (4 o 5) en la laguna de resorción. El exceso de bicarbonato se elimina por intercambio pasivo con iones cloro mediante proteínas intercambiadoras de cloro y bicarbonato que están ubicadas en la membrana basolateral.



El medio ácido inicia la degradación del componente mineral del hueso (principalmente hidroxapatita) para convertirlo en iones calcio, fosfatos inorgánicos solubles y agua. Al degradarse el mineral, queda expuesta la matriz orgánica de colágeno, la cual es degradada por una enzima proteolítica, la catepsina K. Una vez completada la resorción, los osteoclastos sufren apoptosis (Ross-Pawlina 5<sup>o</sup> edición, 2007).

### I 3.4 Mecanismos reguladores del metabolismo óseo

#### I 3.4.1 Regulación por factores de transcripción

El Runx 2 es un factor clave en la diferenciación osteoblástica. Este factor se expresa en las células progenitoras mesenquimáticas en un estadio temprano. Posteriormente se expresa el factor Osterix, que induce la diferenciación terminal de los osteoblastos. El factor de transcripción de homeodominio Dlx5 regula la expresión de genes específicos en el osteoblasto que codifican para osteocalcina y fosfatasa alcalina, la sobreexpresión

de este factor inhibe la expresión de osteocalcina y por ende la última fase de la diferenciación osteoblástica.

#### I 3.4.2 Regulación por otras proteínas

Son varias las proteínas involucradas en la regulación osteoblástica, como las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), que estimulan la transcripción de los genes que codifican para Runx2. La actividad inductora de hueso de las BMPs es única entre los factores de crecimiento, se cree que son secretadas por los osteoblastos y se depositan en la matriz extracelular durante la formación ósea. Otros factores como TGF- $\beta$ , PDGF, FGF e IGFs son capaces de influenciar la diferenciación de progenitores osteoblásticos comprometidos hacia el linaje osteoblástico, pero no pueden inducir la diferenciación a partir de células progenitoras no comprometidas (Manolagas 2000).

La vía de señalización por Indian hedgehog (Inh) participa de la diferenciación de condrocitos y osteoblastos en la formación de hueso endocondral. También está

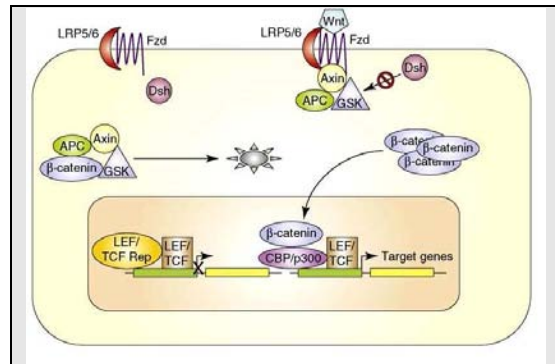
involucrada en el direccionamiento de las células progenitoras mesenquimáticas hacia el linaje osteoblástico, induciendo la expresión de Runx2. Este factor se requiere en una etapa temprana de la osteogenesis, cuando los precursores expresan Runx2, pero no Osterix.

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina induce proliferación y diferenciación de las células progenitoras mesenquimáticas hacia el linaje osteoblástico e inhibe la formación de condrocitos y adipocitos. Esta vía, a diferencia de la de Inh, actúa tanto en precursores osteogénicos Runx<sup>+</sup>/Osterix<sup>-</sup>, como Runx<sup>+</sup>/Osterix<sup>+</sup>.

Un nivel alto de Wnt favorece la proliferación osteoblástica, pero no su diferenciación. Esta vía es clave en la reparación de fracturas, y se han encontrado niveles aumentados de Wnt luego de producirse una fractura (Figura I 11) (Deschaseaux 2009)

Se ha demostrado que varios mecanismos de transducción de señales están involucrados en el crecimiento y desarrollo de las células óseas. El óxido nítrico (NO) es una molécula que es producida

constitutivamente por las células óseas y su expresión se ve incrementada en respuesta a diversos estímulos como hormonas sexuales, citoquinas proinflamatorias y tensión mecánica.



**Figura I 11** Vía de Wnt (canónica). Al unirse el Wnt a su receptor Fzd), la proteína GSK3β no fosforila a  $\beta$ -catenina y de esta manera, se impide su degradación y se trasloca al núcleo, donde induce la expresión de genes específicos. (Deschaseaux 2009)

El NO es generado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). En los osteoblastos se expresan dos isoformas, la iNOS (inducible) y la eNOS (endotelial). Se sabe que el NO tiene efectos bifásicos tanto en la formación como en la resorción ósea, es decir que afecta a los osteoblastos y osteoclastos de una manera que depende de su concentración en el medio. Pequeñas cantidades de NO estimulan el crecimiento de osteoblastos e inducen la resorción ósea mediada por osteoclastos. Altas

concentraciones de NO inhiben tanto el crecimiento y diferenciación de los osteoblastos, como la formación y actividad de los osteoclastos (Van't Hof y Ralston 2001). Se ha demostrado que ratones que no expresan genéticamente la enzima eNOS, tienen reducida formación ósea, disminución en el número de osteoblastos y bajo grado de mineralización, con lo que se concluye que la eNOS es indispensable en el metabolismo óseo, ya que es importante en la modulación de la función osteoblástica (Armour 2001).

La proteín-quinasa activada por mitógenos (MAPK) constituye una vía importante para la transducción de señales de las integrinas de la matriz extracelular al núcleo (Gumbiner 1996) con la subsecuente estimulación de la transcripción dependiente de cbfa1 (Runx2) (Xiao 2000). Esta vía regula la actividad de diversos factores que intervienen en la regulación, proliferación y apoptosis (Burdon 2002). Se ha sugerido que la cinética de activación/fosforilación de las quinasas reguladas por señales

extracelulares (ERK), así como el tiempo que las ERK fosforiladas (P-ERK) son retenidas en el núcleo, serían responsables de los efectos pro-apoptóticos versus anti-apoptóticos que los estrógenos provocan en la células óseas (Chen 2005).

### I 3 5 Modelado óseo

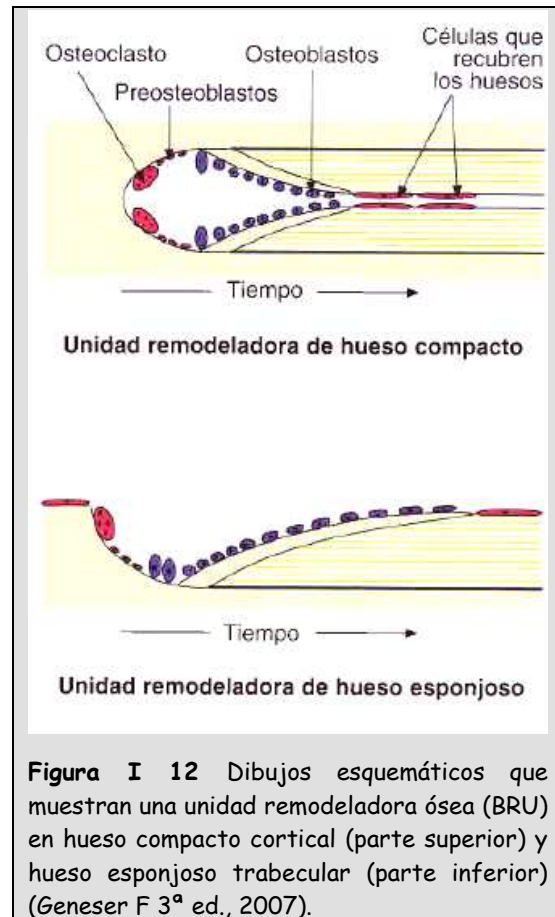
Es el mecanismo por el cual los huesos son formados o reformados. Ocurre durante el crecimiento o en el adulto cuando cambia la forma del hueso en respuesta a la variación de la carga mecánica. El modelado no está acoplado a una resorción previa y existe una independencia en la acción de los osteoblastos y los osteoclastos

### I 3.6 Remodelado óseo

Este proceso involucra la remoción de lagunas o túneles de hueso de la superficie de hueso trabecular o cortical respectivamente por los osteoclastos. Subsecuentemente, los osteoblastos llenan estas lagunas o túneles mediante el agregado de nueva matriz ósea. El remodelado comienza en la primera infancia y continúa durante toda la vida.

Durante el modelado óseo, los osteoblastos y los osteoclastos actúan con independencia unos de otros, con predominio general de la formación ósea. Por otro lado, el remodelado óseo se caracteriza porque la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos está fuertemente acoplada, de modo tal que trabajan en conjunto como una unidad denominada "unidad remodeladora ósea" (BRU), donde la cantidad de tejido óseo que se resorbe es reemplazada por una cantidad equivalente de tejido óseo recién formado. En el tejido óseo compacto primitivo, las fibras de colágeno se disponen de forma irregular generando láminas no muy definidas. Por remodelación, estas fibras cambian su disposición formando láminas concéntricas de transcurso paralelo. La remodelación comienza cuando un grupo de preosteoclastos se activa y da lugar a la aparición de osteoclastos, que comienzan a resorber la osteona y crean un conducto cilíndrico. Los osteoclastos forman una cabeza perforante o "cono de corte" que se

desplaza por el hueso y perfora un conducto cilíndrico por resorción, con un diámetro correspondiente al de la última osteona (Figura I 12, parte superior).



**Figura I 12** Dibujos esquemáticos que muestran una unidad remodeladora ósea (BRU) en hueso compacto cortical (parte superior) y hueso esponjoso trabecular (parte inferior) (Geneser F 3<sup>a</sup> ed., 2007).

La última parte de la resorción es llevada a cabo por células mononucleares (posiblemente preosteoclastos). Después de la resorción ocurre una neoformación vascular y entonces se diferencian osteoblastos, que depositan capa tras capa de tejido óseo sobre las paredes del conducto, que a continuación se rellena y da lugar a la formación de

una osteona cortical (secundaria). El depósito de tejido óseo comienza con la formación de una línea de cemento que separa la futura osteona del tejido óseo circundante. En un corte longitudinal del conducto en la unidad remodeladora se distingue una forma de cono alargado, el "cono de cierre", donde la punta del cono, expresa el cierre gradual del conducto (Figura I 12, parte superior). Por último, una cierta cantidad de osteoblastos se transforman en células de recubrimiento óseo, que tapizan el conducto de Havers, mientras que otros quedan atrapados y se transforman en osteocitos

En el tejido óseo esponjoso primitivo transcurren las mismas fases, con activación de osteoclastos, resorción y posterior fase de formación, pero aquí los osteoclastos no resorben un conducto, sino un surco, por lo que en un corte a través de la unidad remodeladora ósea se visualiza como una unidad cortical seccionada por la parte media (Figura I 12, parte inferior).

El proceso de remodelado descrito anteriormente ocurre cuando se reemplaza el hueso primario por hueso maduro. El remodelado que ocurre a lo largo de toda la vida y tiene como fin reemplazar hueso maduro envejecido por hueso maduro joven consta de cuatro fases:

1) Activación: durante esta fase se produce el reclutamiento de los precursores mononucleados de osteoclastos desde el pool de monocitos-macrófagos circulantes en la sangre, los cuales son estimulados y diferenciados bajo la influencia de ciertas citoquinas y factores de crecimiento a osteoclastos maduros activos.

2) Resorción: fase en la que tiene lugar la digestión del hueso por el osteoclasto. Al finalizar la resorción, los osteoclastos mueren por apoptosis.

3) Fase de reversión: durante esta fase la laguna de resorción se puebla de células mononucleadas, tales como monocitos, osteocitos y de preosteoblastos que son los responsables de la etapa de

formación. Es en esta etapa que se produce el acoplamiento entre resorción y la reposición de hueso removido, mediante la adecuada señalización.

4) Formación: esta etapa consta de dos pasos, inicialmente los osteoblastos sintetizan matriz orgánica y posteriormente regulan su mineralización. Cuando los osteoblastos completan la formación de matriz pueden tomar distintos caminos, un gran porcentaje muere por apoptosis, algunos quedan incorporados a la matriz como osteocitos y otros permanecen en la superficie como células óseas de revestimiento.

El acoplamiento de la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos, con activación, resorción y formación de tejido óseo, también denominado secuencia ARF (por sus siglas en inglés, activation, resorption and formation) en la remodelación ósea, implica que la formación de hueso siempre es precedida por resorción ósea, y que la resorción ósea siempre es seguida por formación de hueso. La frecuencia

con que determinada zona ósea sufre remodelación se denomina "frecuencia de activación" y se define por la frecuencia con la cual se forma una unidad remodeladora ósea por activación de un grupo de osteoclastos en un mismo sitio. La frecuencia de activación es afectada por factores locales tales como citoquinas secretadas y factores de crecimiento, y por sobrecargas mecánicas del tejido óseo, pero también por hormonas circulantes, en especial la hormona paratiroidea y las hormonas sexuales. La finalidad del proceso de remodelación es reemplazar el tejido óseo envejecido que, debido a las cargas, puede presentar microfracturas o contener osteocitos muertos, que con la remodelación son reemplazados por tejido óseo nuevo de mayor calidad. Los osteocitos pueden reaccionar frente a acciones mecánicas sobre el tejido óseo y es posible que junto con las células de recubrimiento, intervengan en la activación de la remodelación (Geneser F 3<sup>a</sup> ed. 2007).

### I 3.7 Proceso de reparación ósea

Previo a describir el proceso de reparación ósea es útil definir el concepto de defecto óseo de tamaño crítico o mínimo que se utiliza en los modelos de lesión ósea en animales de experimentación. Se define como defecto óseo de *tamaño crítico*, a aquella deficiencia intraósea que no se reparará con más del 10% de formación de hueso nuevo en el tiempo de expectativa de vida del animal (Kleinschmidt 1992), mientras que defecto de *tamaño mínimo*, se refiere a un defecto óseo que se reparará espontáneamente durante su curso temporal. Algunos autores difieren sobre el concepto de tamaño crítico definido originalmente y llaman defecto óseo de tamaño crítico a aquel que no se reparará durante la duración del experimento o estudio (Gosain 2000).

La reparación de fracturas óseas es un proceso que se asemeja en ciertos aspectos al desarrollo y crecimiento del esqueleto, involucrando a un gran número de células, factores de crecimiento, como así también a la matriz

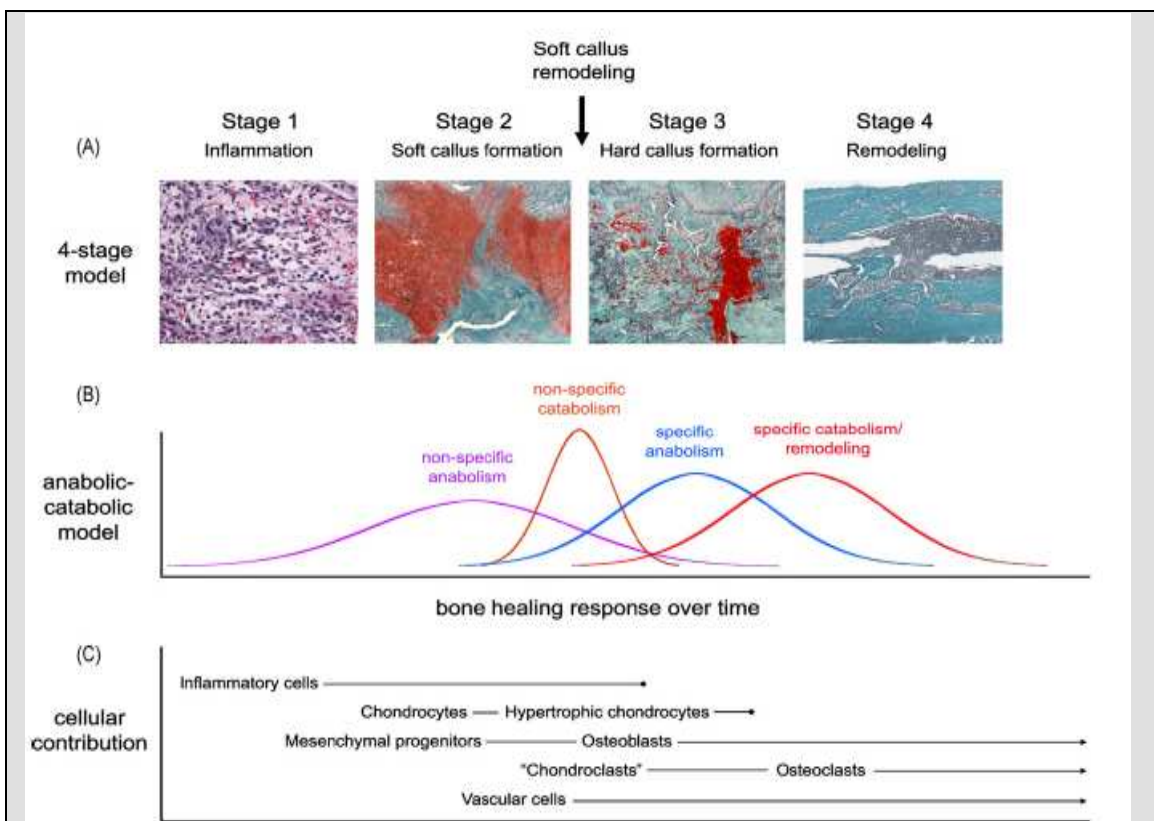
extracelular. Convencionalmente se divide al proceso de reparación en cuatro etapas, cada uno de ellas caracterizado por eventos moleculares y celulares específicos. Pero en términos prácticos no existe una definición clara de etapas; se da a menudo una superposición entre diferentes estadios durante la reparación de una fractura. En particular, y como se verá más adelante, el modelo de cuatro etapas se ajusta más a la reparación de fracturas de los huesos que soportan cargas mecánicas importantes (por ejemplo, vértebras y huesos de los miembros); mientras que en huesos que no soportan cargas importantes es más preciso hablar de tres etapas (ya que no ocurre la etapa de formación del callo blando cartilaginoso).

Este modelo de las cuatro etapas que tienen lugar en el proceso de reparación se basa en el resultado de observaciones histológicas tanto en pacientes como en modelos animales (Figura I 13 A). A nivel celular, las células inflamatorias, células vasculares, progenitores

osteoblásticos y osteoclastos son claves en el proceso de reparación. A nivel molecular, la reparación es realizada por tres clases principales de factores: citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, factores pro-osteogénicos y factores angiogénicos.

Los tejidos dañados se reparan y la fractura se rellena con un callo blando que luego es reemplazado por un callo duro. Este callo luego es

remodelado, para reestablecer la forma original del tejido dañado. En el caso de la reparación de fracturas de ciertos tipos de huesos con alta estabilidad mecánica y que no soportan un peso importante (por ejemplo, huesos planos del cráneo), la formación del callo duro intramembranoso es dominante y no existe una clara presencia de callo blando cartilaginoso que actúe como intermediario.



**Figura I 13** Modelo de reparación de fracturas y las células que participan en el mismo. (A) Imágenes representativas de los 4 eventos que forman parte de la reparación ósea. Entre los clásicos estadios 2 y 3, el callo blando es remodelado. (B) Versión más elaborada del modelo anabólico/catabólico de la reparación de fracturas, que incorpora el concepto de anabolismo no específico (proceso de reparación temprana de la herida) y catabolismo no específico (remodelado del callo blando). (C) Se muestra esquemáticamente la contribución celular al proceso de reparación. (Schindeler A, 2008)



### I 3.7.1 Primera etapa: inflamación

Una fractura se asocia con ruptura de la integridad del tejido blando, interrupción de la función vascular, y cambios en la médula ósea. La extravasación de sangre en el sitio de la fractura es contenida por el tejido circundante que se convertirá en un hematoma. Ocurre desgranulación de las plaquetas, y los macrófagos y otras células inflamatorias (granulocitos, linfocitos, y monocitos) se infiltran en el hematoma entre los fragmentos fracturados para combatir posibles infecciones, secretan citoquinas y factores de crecimiento y el hematoma avanza hacia un trombo fibrinolítico. Con el paso del tiempo, crecen capilares dentro del hematoma, el cual se reorganiza en forma de tejido granuloso. Los macrófagos y otras células fagocíticas limpian la zona fagocitando células necróticas y otros detritos.

Esta respuesta celular es coordinada por una serie de citoquinas y factores de crecimiento

que incluyen el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor estimulante de colonias monocítico/macrofágico (M-CSF), interleuquinas-1 y -6 (IL-1 y -6), proteínas morfogénicas óseas (BMPs), y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estos factores facilitan el reclutamiento de células inflamatorias adicionales, como así también la migración e invasión de células progenitoras mesenquimáticas. Estas células multipotentes se originan del periostio, médula ósea, circulación y tejidos cercanos, y se hallan implicadas en el proceso de formación y reparación ósea.

### I 3.7.2 Segunda etapa: formación del callo blando

La mayoría de las fracturas son inestables por lo que son reparadas mediante el proceso de osificación endocondral, lo que implica que la formación del callo óseo es precedida por la formación de cartílago.

A nivel celular este evento esta dominado por condrocitos y fibroblastos. Estas células producen un callo blando semi-rígido que es capaz de darle soporte mecánico a la fractura, también actúa como una plantilla para que un callo óseo posteriormente lo sustituya. El callo cartilaginoso es principalmente avascular, aunque el subsiguiente reemplazo por tejido óseo involucra invasión vascular.

Los condrocitos, provenientes de células progenitoras mesenquimales, proliferan y sintetizan matriz cartilaginosa hasta que el tejido granuloso es reemplazado por cartílago. En los lugares donde la producción de cartílago es deficiente, los fibroblastos reemplazan la región con tejido fibroso.

En los estadios finales de la producción del callo blando, los condrocitos se hipertrofian y mineralizan la matriz cartilaginosa, luego de lo cual sufren apoptosis.

La expresión coordinada de factores de crecimiento, como TGF- $\beta$ 2 y  $\beta$ 3, PDGF, FGF-1, y el factor de

crecimiento similar insulina (IGF) estimulan la proliferación fibroblástica, así como la proliferación y la diferenciación condrocítica. En respuesta a las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), los condrocitos son capaces de generar cantidades considerables de proteínas de matriz extracelular, particularmente colágeno tipo II (o colágeno tipo X por condrocitos hipertróficos).

Los factores pro-angiogénicos como VEGF, BMPs, FGF-1 y TGF- $\beta$  estimulan la invasión del callo blando por células endoteliales vasculares, estimulando así su angiogénesis.

I 3.7.3 Tercera etapa:  
formación del callo duro

Este paso es conocido también con el nombre de formación de hueso primario, en esta etapa se produce el periodo más activo de osteogénesis. Es caracterizado por altos niveles de actividad osteoblástica y formación de matriz ósea generalizada. El callo blando es removido y reemplazado por la formación del callo duro que otorga mayor estabilidad, en esta etapa se produce un proceso de

revascularización. Este callo está formado por hueso inmaduro. En condiciones de alta estabilidad mecánica (tal como el caso de los huesos del cráneo, que no soportan peso), el callo duro puede formarse mediante un mecanismo intramembranoso, es decir directamente a partir del tejido granular y/o fibroso (y en ausencia de una plantilla cartilaginosa).

Este tejido óseo inicial presenta una matriz extracelular proteica mineralizada, la cual es sintetizada por osteoblastos maduros, que se diferencian a partir de células osteoprogenitoras en presencia de factores osteogénicos. La familia de las BMPs son mediadores claves en este proceso, y se ha descrito que la acción de los mismos es suficiente para la formación de hueso *de novo*.

Es incierta la fuente de células osteoprogenitoras implicados en la reparación de fracturas. El periostio es una fuente rica en células progenitoras mesenquimáticas capaces de producir hueso, y se ha visto que la reparación ósea se

encuentra retrasada en los casos en que el periostio ha sido dañado. No obstante, el hueso retiene la capacidad de regenerarse post-lesión, aún en ausencia de periostio y/o células osteoprogenitoras medulares. Esto es posible si las células osteoprogenitoras se originan de otras fuentes, incluyendo la sangre, paredes de los vasos sanguíneos y otros tejidos cercanos.

Se sabe que la vasculatura es crítica para la formación del callo duro, incrementa la tensión de oxígeno localmente y esto es necesario para la diferenciación osteoblástica. En ciertos modelos experimentales se ha demostrado que la estimulación de la formación de vasos usando factores angiogénicos, puede aumentar la formación de hueso y mejorar la reparación de fracturas.

I 3.7.4 Cuarta etapa: remodelado óseo

El último paso de la reparación ósea abarca el remodelado del callo duro con el fin de reconstituir la configuración original cortical y/o trabecular. Esta etapa también se la

conoce con el nombre de formación ósea secundaria. Inicialmente involucra la transformación del callo inmaduro a hueso maduro. El remodelado es llevado a cabo por un proceso de acoplamiento de resorción ordenada seguida por formación de hueso maduro o laminillar.

La célula clave que participa en la resorción es el osteoclasto, descrito previamente. Como se mencionó antes, dos proteínas (M-CSF y RANKL) expresadas por osteoblastos son críticas para la inducción, supervivencia y activación de los osteoclastos. El M-CSF es importante en la inducción primaria de las células progenitoras hematopoyéticas para que se diferencien hacia el linaje osteoclástico. El RANKL, expresado por osteoblastos maduros, es responsable de la coordinación entre la formación y resorción ósea. La osteoprotegerina (OPG) es un importante regulador secretado por osteoblastos, que impide la diferenciación osteoclástica.

Existen una serie de factores que promueven la osteoclastogénesis,

principalmente factores de crecimiento y citoquinas presentes en la zona de fractura, entre ellos interleuquinas, TNF- $\alpha$ , BMPs, y TGF- $\beta$ .

### I 3.8 El modelo anabólico/catabólico de reparación de fracturas

Aunque el modelo de las cuatro etapas secuenciales describe las distintas fases del proceso de reparación, existe a menudo una superposición importante entre las etapas. Por ejemplo, el reemplazo de callo duro por hueso laminillar ocurre a la par del proceso de mineralización del cartílago, invasión vascular y formación de hueso inicial.

En el modelo anabólico/catabólico, se considera al proceso de reparación ósea como un balance entre respuestas anabólicas (formación ósea) y catabólicas (resorción ósea).

Varios tipos celulares reclutados en los estadios tempranos en el sitio de fractura, así como los factores de crecimiento y citoquinas asociados, han sido detectados también en respuesta a lesiones de otros tejidos no óseos. Por ello,

Schindeler y colaboradores (2008) proponen referirse a este proceso como anabolismo no específico y catabolismo no específico (Figura I 13 B). Proponen también que la velocidad de la reparación es determinada por el proceso de anabolismo y catabolismo no específico (reclutamiento de células, revascularización), mientras que la resistencia de la reparación se relaciona con el balance entre anabolismo y catabolismo específico (Schindeler A 2008).

## **I 4 Metabolismo óseo y Diabetes**

En esta sección se ampliarán conceptos sobre las alteraciones que causa la Diabetes sobre el hueso.

### **I 4.1 Generalidades**

La relación entre Diabetes, el riesgo de fracturas y enfermedad ósea ha sido descrita en los últimos 10 años (Schwartz 2003). En la Diabetes mellitus tipo 1 es frecuente encontrar pacientes con densidad mineral ósea (DMO) disminuida, mientras que en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 la DMO es similar o inclusive superior a la que presentan personas no diabéticas apareadas por edad, sexo e índice de masa corporal (Räkel 2008). Sin embargo, para ambos tipos de Diabetes el hueso frecuentemente presenta alteraciones tanto en su microarquitectura como en su capacidad de formación, lo cual se suele traducir en una menor calidad ósea. Estudios recientes han confirmado que tanto la Diabetes mellitus tipo 1 como tipo 2, están relacionadas con un mayor riesgo de fracturas (Janghorbani 2007). Son varios los factores que influyen en el riesgo de fracturas. La Diabetes

puede afectar el hueso de múltiples maneras, entre los que se incluyen: obesidad, cambios en los niveles de insulina, concentraciones altas de productos de glicación avanzada sobre proteínas de matriz extracelular y proteínas intracelulares, alta excreción urinaria de calcio, junto con mala absorción intestinal, respuesta inapropiada a la secreción de hormona paratiroidea (PTH), alteraciones en la regulación de la vitamina D, función renal disminuida, bajos niveles del factor de crecimiento similar insulina, microangiopatías e inflamación (Isidro 2010).

### **I 4.2 DMO en Diabetes mellitus tipo 1**

Desde hace más de veinte años, varios estudios han demostrado que la osteopenia y la osteoporosis son complicaciones frecuentes en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1, tanto en niños como en adultos. La DMO parece estar disminuida tanto a nivel de la columna vertebral como en la cadera. Usando técnicas de absorción de rayos X de energía dual (DEXA) se ha encontrado que un 50-60% de pacientes con Diabetes

mellitus tipo 1 presentan osteopenia, mientras que alrededor de un 14-20% de dichos pacientes tienen osteoporosis (Kayath 1998, Kemink 2000).

Algunos autores sugieren que la disminución en la DMO (es decir, la osteopenia u osteoporosis) podría deberse al hecho de que no se alcance el pico de masa ósea en la pubertad. Sin embargo, se han encontrado niveles disminuidos de DMO aún en pacientes que han desarrollado la Diabetes luego de alcanzar el pico de masa ósea (Tuominen 1999).

La relación entre DMO y el grado de control de la glucemia es poco clara (Heap 2004). Diversos autores proponen que la terapia con insulina y el logro de un buen control metabólico son determinantes para un aumento en la formación de matriz ósea, acoplado con una disminución en la resorción, lo que determinaría un balance positivo en el remodelado óseo (Bonfanti 1997)

### I 4.3 DMO en Diabetes mellitus tipo 2

La DMO en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 se encuentra

frecuentemente aumentada respecto a la de individuos no diabéticos (De Liefde 2005, Dobnig 2006) y persiste este incremento luego de la corrección por el índice de masa corporal (Strotmeyer 2004). La mayoría de los estudios han reportado que el recambio óseo está disminuido en pacientes con Diabetes de tipo 2, debido a una disminución tanto en la formación como en la resorción (Achemlal 2005). Krakauer y colaboradores (1995) propusieron que esta disminución en la frecuencia de ciclos de remodelado, junto con el balance negativo de masa ósea asociado con cada ciclo en adultos mayores, fueran los causantes del incremento relativo en la DMO observado en pacientes con Diabetes tipo 2 (respecto de individuos no diabéticos apareados). Es decir, el hueso diabético tendería a tener un mayor contenido mineral, pero a la vez una mayor acumulación de imperfecciones que lo harían más propenso a fracturarse.

Si bien la evaluación de la DMO ha sido la forma más efectiva de evaluar el riesgo de fracturas en

personas con osteoporosis, no es útil dicho índice, por lo que se ha descrito anteriormente para la evaluación del riesgo de fracturas en pacientes diabéticos. Por eso resulta necesario encontrar otros marcadores de diagnóstico, como la *pentosidina* (producto de glicación avanzada). Varios estudios han revelado que el contenido de *pentosidina* en el hueso cortical o trabecular de vértebras o fémur se relaciona negativamente con las propiedades mecánicas (Hernandez 2005, Wang 2002, Viguet-Carrin 2006), y que la cantidad de *pentosidina* presente en hueso cortical o trabecular proveniente de pacientes con fractura de cuello femoral fueron mayores que en individuos controles de la misma edad (Saito 2006b, Saito 2006c). No obstante, las medidas de contenido de *pentosidina*, no es algo fácil de realizar, ya que implica la realización de procedimientos invasivos como una biopsia ósea. Un estudio reciente reveló que el contenido de *pentosidina* en plasma se correlaciona linealmente con el contenido en hueso cortical

(Odetti 2005), sugiriendo que el nivel de *pentosidina* sérico puede ser usado como marcador que permita evaluar la resistencia ósea.

### I 4.4 Efecto de drogas anti-diabéticas sobre el metabolismo óseo

Existe abundante evidencia que indica que el uso de tiazolidinedionas, como por ejemplo la rosiglitazona, tiene un impacto negativo sobre el metabolismo óseo. Grey A y colaboradores (2007) demostraron que el tratamiento durante 14 semanas con rosiglitazona disminuyó los marcadores de formación ósea en mujeres posmenopáusicas sanas. Schwartz AV y colaboradores (2006) reportaron que el uso de tiazolidinedionas a largo plazo, causó reducción de la DMO en todo el cuerpo en mujeres ancianas con Diabetes mellitus tipo 2, en un estudio que se realizó a lo largo de 4 años.

En cambio con respecto al uso de Metformina se sabe que se asocia con una significativa disminución en el riesgo de fracturas (Vestergaard 2005).



Borges JL y colaboradores (2011) llevaron a cabo recientemente un estudio que comparaba la seguridad del tratamiento por el término de 80 semanas con rosiglitazona/Metformina o solo Metformina sobre la DMO en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 que nunca habían recibido tratamiento, y observaron que el grupo que tomo rosiglitazona/Metformina presentaba una disminución de la DMO a nivel de las vértebras lumbares, mientras el grupo que solo tomo Metformina presento un incremento leve de la DMO a nivel de las vértebras lumbares y de la cadera, resultados que sugieren que el tratamiento con Metformina en pacientes diabéticos podría tener efectos beneficiosos sobre el hueso.

### I 4.5 Patofisiología del mayor riesgo de fracturas en Diabetes mellitus

Existen varios factores que podrían contribuir al mayor riesgo de fracturas óseas, como se enumeró anteriormente. De estos factores, se describirá con mayor detalle de qué manera los AGEs pueden afectar la

calidad ósea. Los AGEs se forman normalmente con la edad, pero en pacientes diabéticos se acumulan aceleradamente. El proceso de formación ósea puede ser influenciado y alterado por modificaciones que los AGEs provocan en las proteínas del hueso. Nuestro grupo ha estudiado el efecto que los AGEs provocan en cultivos de células óseas, encontrando que:

✓ La acumulación de AGEs sobre la matriz extracelular, así como el agregado de proteínas solubles modificadas por AGEs a cultivos de osteoblastos, inicialmente estimulan la proliferación celular. Sin embargo, incubaciones a largo plazo inhiben la diferenciación (expresión de FAL y secreción de colágeno tipo I) en forma dependiente de la dosis (McCarthy 1997, McCarthy 2001b). Por otro lado, la glicación de la FAL induce una inhibición de su actividad (McCarthy 1998).

✓ El colágeno modificado por AGEs es capaz de afectar la proliferación y diferenciación de los osteoblastos inhibiendo la actividad de fosfatasa alcalina y la formación de nódulos de mineralización. También se ha demostrado que la acumulación de AGEs sobre el colágeno altera las interacciones celulares con la matriz extracelular mediada por integrinas (McCarthy 2004).

Los efectos mencionados podrían estar mediados a través del sistema de los factores de crecimiento insulino-símiles (IGFs) y sus proteínas ligadoras por un mecanismo autocrino-paracrino (McCarthy 2001a), e involucrar diversas vías de transducción de señales como las ERK (Cortizo 2003) y el estrés oxidativo intracelular (inducción de ROS y NO) (McCarthy 2001b).

Se estudió la hipótesis de que los efectos deletéreos de los AGEs sobre los osteoblastos ocurren por interacción de los AGEs con

receptores específicos presentes en la membrana de células osteoblásticas. En este sentido, se encontró que las líneas UMR 106 y MC3T3E1 expresan sitios específicos de unión y que su densidad y afinidad por los AGEs dependen de la fase de desarrollo osteoblástico (McCarthy 1999). Al caracterizarlos se encontró que las células osteoblásticas expresan RAGE (Cortizo 2003) y galectina 3 (Mercer 2004). También se comprobó que la presencia de AGEs modula la expresión y secreción de RAGE y de galectina 3 (Mercer 2004), lo que podría tener consecuencias importantes en el metabolismo óseo.

Otros autores encontraron que la osteocalcina puede ser glicada, lo que alteraría su afinidad por la hidroxiapatita y jugaría un rol en la patogénesis de la osteoporosis y osteopenia presentes en la Diabetes (Gundberg 1986).

Se sabe que los enlaces cruzados de las moléculas de colágeno, juegan un rol crítico en la determinación de la resistencia ósea (Saito 2010). Los enlaces

entrecruzados de las moléculas de colágeno que se forman espontáneamente por glicación no enzimática (AGEs) otorgan fragilidad a las fibras de colágeno (Garnero 2006, Vashishth 2007), mientras que los entrecruzamientos fisiológicos (enzimáticos) fortalecen los vínculos entre las fibras de colágeno y confieren así resistencia ósea (Wang 2002, Banse 2002). En un modelo de ratas diabéticas se encontró que hubo una disminución de los enlaces entrecruzados de colágeno formados enzimáticamente y se detectó un incremento en los enlaces entrecruzados por AGEs, lo que resultó en un deterioro sobre la resistencia ósea, sin afectar el índice de DMO (Saito 2006a).

Por otro lado, se ha demostrado que los AGEs inhiben la diferenciación de células progenitoras mesenquimales a células osteoprogenitoras (Kume 2005), alterando así la formación ósea.

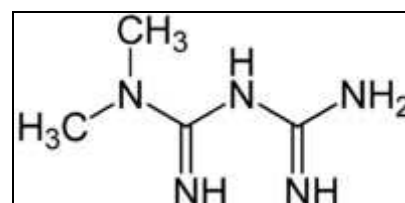
## I 5 Metformina

La Metformina es un fármaco de administración oral ampliamente utilizado para el tratamiento de la Diabetes, tanto en monoterapia en los estadios tempranos de la Diabetes mellitus tipo 2, como en terapia complementaria junto a otros medicamentos antihiper glucemiantes. Es un medicamento insulino-sensibilizador, por lo cual capaz de disminuir la glucemia, sin modificar en forma directa la secreción de insulina (Garber 2004). También se sabe que la Metformina es capaz de reducir los niveles de metilgloxal, un precursor de AGEs, en pacientes con Diabetes mellitus de tipo 2 (Beisswenger 1999).

El uso de la Metformina se ha expandido, debido a que esta droga posee efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa y, como ha sido demostrado recientemente, por sus beneficios sobre la prevención de eventos cardiovasculares. A diferencia de la insulina y secretagogos de la misma, la Metformina no incrementa el peso corporal y cuando se usa como monoterapia, no causa hipoglucemia.

Los efectos adversos más comunes asociados con Metformina son leves, síntomas gastrointestinales transitorios que usualmente son auto-limitados. Estos efectos secundarios pueden ser minimizados iniciando la terapia con bajas dosis y gradualmente ir subiéndola, y tomando Metformina con las comidas. La acidosis láctica causada por la Metformina es rara, y el riesgo de esta complicación puede ser disminuido por la observación de las precauciones y contraindicaciones que impiden la acumulación de Metformina o lactato en el cuerpo. La gran cantidad de beneficios y la ausencia de grandes riesgos cuando se usa con otros agentes antihiper glucemiantes hacen que la Metformina sea preferida cuando se usa en combinación con otros agentes orales.

### I 5.1 Un poco de historia



Los antidiabéticos de la familia de las biguanidas, incluyendo la

fenformina y buformina ya retiradas del mercado, tienen su origen histórico en una planta (*Galega officinalis*) conocida desde hace siglos en la medicina popular por su capacidad de reducir los efectos de la Diabetes (Witters 2001). En 1918 se redescubrió la utilidad de la planta como tratamiento hipoglucemiante, identificándose tres derivados de la guanidina: monoguanidinas (galegina), diguanidinas (sintalina) y biguanidas, formadas por la unión de dos moléculas de guanidina y la eliminación de un radical amino (Simó 2002). La Metformina fue descrita en la literatura científica por Emil Werner y James Bell en 1922, como un metabolito que aparece en la síntesis de N, N - dimetilguanidina (Werner 1921). En 1929 Slotta y Tschesche descubrieron su acción de disminución de los niveles de glucosa en sangre de conejos, señalando que era el más potente de los análogos de la biguanida hasta entonces estudiado. Como ocurrió con otros análogos de la biguanida, los resultados de Slotta y Tschesche pasaron al olvido, eclipsados fundamentalmente por la

insulina (Campbell 2007). Con el tiempo, reapareció el interés en la Metformina hacia finales de 1940. Luego, en 1950 se demostró que la Metformina, a diferencia de otros compuestos similares, no causaba una disminución en la presión arterial y la frecuencia cardíaca en los animales de experimentación (Dawes 1950). Ese mismo año, un médico filipino, Eusebio Y. Garcia utilizó la Metformina, que llamó «fluamina», para tratar la gripe y señaló que el medicamento lograba bajar los niveles de azúcar en sangre hasta límites fisiológicos en los pacientes tratados y sin toxicidad. García también le atribuyó a la Metformina acciones bacteriostáticas, antivirales, antipalúdicas, antipiréticas y analgésicas (Garcia 1950).

Mientras entrenaba en el Hospital de la Pitié-Salpêtrière, el diabetólogo francés Jean Sterne, estudió las propiedades antihiper glucémicas de la galegina, un alcaloide aislado de la misma planta *Galega officinalis*, estructuralmente relacionada con la Metformina (Simó 2002). Posteriormente, mientras

trabajaba en los laboratorios Aron en París, Sterne encontró motivación en el informe de García y trabajó en base a las bondades de la Metformina sobre el azúcar en la sangre. Sterne fue el primero en usar la Metformina en seres humanos como terapia para el tratamiento de la Diabetes y la llamo «glucofago» (comedor de glucosa) con el que nombró al fármaco y finalmente publicó sus resultados en 1957.

Fue solo con la retirada de otras biguanidas en la década de 1970 que se difundió un amplio interés en la Metformina. La Metformina fue aprobada en Canadá en 1972, pero no recibió la aprobación por las autoridades pertinentes en los Estados Unidos sino hasta 1995.

### I 5.2 Mecanismos de acción

Aunque las biguanidas han sido objeto de investigación durante décadas, sus mecanismos de acción aun no son claros. Una acción básica de la Metformina parece ser que aumenta la fluidez de las membranas celulares, y así contrarresta alguno de los efectos perjudiciales sobre la función del receptor de insulina que

deriva en hiperglucemia y aumenta los niveles de ácidos grasos (Wiernsperge 1999, Kashiwagura 1984). La fracción guanidino de la cadena de Metformina es distinguida por la naturaleza deslocalizada de los electrones en la región cargada positivamente y puede formar pares iónicos estables con grupos cargados negativamente de la superficie celular, como grupos heparan sulfato y proteínas transmembrana. Posiblemente relacionado con esto es la observada despolarización de las membranas celulares de los hepatocitos que abren sus canales de cloruros al exponerse a la Metformina (Lutz 2001). Es interesante notar que la caída del pH reduce extremadamente la gluconeogénesis hepática (Kashiwagura 1984). De este modo, al menos parte del efecto metabólico se debe simplemente a la acidez otorgada por las biguanidas.

Se sabe que tanto *in vitro* como *in vivo*, la droga puede actuar a través de la activación de tirosina-quinazas (Dominguez 1996). La Metformina facilita la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria,

que lleva a un aumento en la proporción celular de AMP/ATP (Elmir 2000, Leverve 2003). Debido a esto, se activa la quinasa activada por AMP (AMPK), un importante sensor regulatorio del balance energético intracelular. La Metformina incrementa la actividad de AMPK en glóbulos rojos también, que no poseen mitocondrias, por lo tanto, lo descrito anteriormente es suficiente pero no esencial para promover la acción de la Metformina (Leverve 2003). La enzima AMPK tiene un peso molecular de 200 kDa y está compuesta por tres subunidades. Es una enzima altamente conservada en las células eucariotas (Davie 1994). Dependiendo del tipo celular, aparece localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma (Salt 1998). Su estructura cristalina ha sido descrita a partir de su homólogo en levaduras (Towler 2007, Townley 2007). La potencial participación de la Metformina en la regulación de la AMPK fue estudiada por Zhou G y colaboradores (2001) en hepatocitos aislados de roedores y miocitos.

A pesar de las incertidumbres acerca del modo de interacción entre la Metformina y la AMPK, el descubrimiento del mecanismo es importante porque ayudaría a entender los diversos efectos clínicos de esta droga. Las vías catabólicas que aumentan la cantidad de ATP (ejemplo: consumo de glucosa y glucólisis) se activan por la enzima AMPK, mientras que las vías anabólicas consumidoras de ATP y otros procesos no esenciales (ejemplo: síntesis de proteínas, gluconeogénesis) se desactivan (Hardie 2003).

Un aumento en la actividad del receptor de insulina y consumo de glucosa por los tejidos periféricos se observa *in vitro* a altas concentraciones de Metformina (aproximadamente 10mg/l) que raramente se observa en pacientes, donde la máxima concentración (C<sub>max</sub>) es aproximadamente 1-3mg/l (Holland 2004, Scheen 1996). No obstante, la Metformina se acumula en los tejidos y estimula el consumo de glucosa, por lo que no se pueden descartar completamente efectos

periféricos sobre adipocitos o células musculares (Wilcock 1994, Luna 2006). En el órgano blanco principal, el hígado, la Metformina puede actuar por mecanismos no dependientes de AMPK (Guigas 2006).

Además, la Metformina inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, de esta manera atenúa respuestas proinflamatorias a IL-1 $\beta$  (por ejemplo, en células de músculo liso) (Isoda 2008). Por último, existe evidencia de que la Metformina facilita la liberación de 5-hidroxitriptamina (5-HT) y posiblemente otros neurotransmisores de la mucosa gastrointestinal, que jugarían un rol en los efectos gastrointestinales observados (Cubeddu 2000).

### I 5.3 Farmacología

La Metformina es una droga muy hidrofílica, por esta razón es altamente soluble en agua pero muy poco permeable a las membranas celulares (Amidon 1995). No es metabolizada y se absorbe incompletamente en el tracto gastrointestinal dentro de las 6 horas posteriores a la toma de la dosis

(Dunn 1995, Tucker 1981). En estudios clínicos, la ingesta de comida disminuye la cantidad y velocidad de absorción de esta droga demostrado por una menor concentración en plasma máxima (C<sub>max</sub> alrededor del 40%) comparado con una condición de ayuno (Sambol 1996). Se realizaron una serie de estudios independientes en humanos, usando dosis desde 500 a 1500 mg que confirmaron una biodisponibilidad del 40-60%, con una excreción predominantemente renal (Scheen 1996).

Los niveles de concentración máxima (C<sub>max</sub>) son aproximadamente 0.6 mg/l, 1.1 mg/l, 1.4 mg/l and 1.8 mg/l para dosis de 500 mg, 1000 mg, 1500 mg y 2000 mg respectivamente. La máxima dosis recomendada diariamente es de 2550 mg en adultos y de 2000 mg en pacientes entre 10 y 16 años. Las interacciones de la Metformina con otros agentes como por ejemplo materiales de contraste o furosemida, dificultan la eliminación de la Metformina por parte del riñón, y tienden a aumentar los niveles en sangre de esta droga. La nifedipina puede incrementar la



biodisponibilidad de la Metformina, mejorando su absorción intestinal.

### I 5.4 Efectos adversos

Un efecto adverso es la acidosis láctica, aunque es raro y no ha podido verificarse claramente que la Metformina sea responsable de la misma (Lalau 1995). Dos mecanismos pueden contribuir a la generación de acidosis láctica: aumento de la producción de ácido láctico, y disminución de la eliminación de lactato como resultado de la supresión de la gluconeogénesis.

La fuente principal de lactato se cree que es el tracto gastrointestinal (Bailey 1995).

Otro efecto adverso de la terapia con Metformina es la alta incidencia de síntomas gastrointestinales, como por ejemplo, dolor abdominal, náuseas, diarrea y sabor metálico. Esto se puede disminuir bajando la dosis con la cual se inicia el tratamiento, de hecho comenzar con bajas dosis es una buena manera de minimizar la severidad y frecuencia de los síntomas gastrointestinales. La liberación de 5-hidroxitriptamina (5-

HT) y otros neuropéptidos están implicados en estos efectos (Cubeddu 2000). Un aumento en la 5-HT está implicado también en el síndrome del intestino irritable (Atkinson 2006).

Debido a que es un insulino-sensibilizador y que no afecta en forma directa a la secreción de insulina, la Metformina no está asociada con eventos de hipoglucemia, a diferencia de secretagogos (sulfonilureas y en menor medida repaglinida y nateglinida) o insulina.

### I 5.5 Eficacia

Entre las acciones de la Metformina se encuentran: disminución de la glucemia como resultado de una supresión de la gluconeogénesis hepática, reducción de la lipólisis y niveles circulantes de ácidos grasos libres, disminución en la producción de VLDL, reducción indirecta de los niveles de insulina (por mejorar la sensibilidad a la misma) (Wiernsperger 1999)

La especulación respecto a que la Metformina aumenta directamente el consumo periférico de glucosa (basada en estudios *in vitro*), no juega un rol importante en la clínica. Esto

ha sido confirmado por un estudio, que sugiere que la Metformina no mejora significativamente el consumo de glucosa por parte de los tejidos mediado por insulina comparada con tiazolidindionas, independientemente de los niveles de insulina. (Natali 2006).

El tratamiento con Metformina se asocia con una disminución del peso corporal, cuando se lo compara con un tratamiento con sulfonilureas (glibenclamida) (diferencias de 3kg aproximadamente), siendo la actividad antihiper glucemiente comparable entre ambas drogas (Johansen k 1999).

La Metformina usada como monoterapia se puede comparar favorablemente con otros agentes antihiper glucemiantes en términos de los efectos sobre la reducción en los niveles de hemoglobina glicada (HbA1c) (Standl 2003, Bailey 1996). Diversos marcadores de riesgo cardiovascular también son influenciados positivamente por esta droga: los niveles de triglicéridos disminuyen acerca de un 20-30%,

LDL-colesterol cerca de 10-20%, inhibidor del activador de plasminógeno alrededor de 20-25% y factor XIII un 15-20% (Nagi 1993, DeFronzo 1995, Grant 1996).

Un estudio multicéntrico denominado United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) recluto más de 5000 pacientes comenzando en el año 1977 y los resultados se publicaron a partir del año 1998. En el UKPDS 34 se reportaron resultados que demuestran que la Metformina es una droga efectiva para reducir muertes relacionadas con Diabetes, infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares (UKPDS 1998). A pesar de que los efectos de la Metformina sobre la disminución de la glucemia son comparables a la insulina o sulfonilureas, esta droga reduce la mortalidad asociada a infarto agudo de miocardio y accidentes cerebrovasculares más que los otros fármacos. Estos resultados sugieren que la disminución de la glucemia y la reducción del daño tisular asociado a la hiper glucemia por sí solos no pueden dar cuenta de los efectos

beneficiosos cardiovasculares adicionales que la Metformina confiere más allá de su acción antihiper glucemiante (Scarpello 2003). En un programa de prevención de enfermedades denominado U.K. Diabetic Prevention Programme (DPP), se reclutaron 3000 participantes con riesgo de desarrollar Diabetes mellitus tipo 2, y se les asignó al azar: intervención en el estilo de vida (asesoramiento intensivo tanto en la dieta como en el ejercicio; con la meta de reducir un 7% el peso corporal), o ingesta de Metformina de 850 mg dos veces al día o placebo. Los pacientes que tomaron Metformina o placebo recibieron información acerca de la dieta y el ejercicio, pero ningún asesoramiento intensivo de modificación de conducta fue previsto. Un cuarto grupo fue inicialmente tratado con troglitazona pero se discontinuó su uso luego de que esta droga fuera sacada del mercado debido a su hepatotoxicidad.

El riesgo de desarrollar Diabetes se redujo un 58% en el grupo de gente que modificó intensivamente el estilo de vida,

mientras que la Metformina lo redujo un 31%. La Metformina fue menos efectiva en pacientes de mayor edad (mayores de 45 años) y más efectiva en pacientes jóvenes (25-44 años) y con mayor índice de masa corporal ( $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ ) (Knowler 2002).

Un estudio de seguimiento luego de retirar la Metformina confirmó que las acciones farmacológicas de esta droga al menos retrasan la progresión desde un estado de tolerancia a la glucosa alterada a Diabetes mellitus (Diabetes Prevention Program Research Group 2003).

Comparada con otros agentes anti-hiperglucémicos orales, la Metformina continúa proporcionando niveles comparables de control de la glucemia. Inhibidores de la alfa-glucosidasa intestinal (ejemplos, acarbosa, miglitol) reducen la hidrólisis de disacáridos a monosacáridos reabsorbibles en el epitelio del intestino delgado proximal, y de esta manera se reduce y retrasa la absorción de carbohidratos. Un estudio reciente (Hoffmann 1997) demostró que no

hay diferencias anti-hiperglucemiantes entre bajas dosis de Metformina (850mg/día) y acarbosa.

Las tiazolidindionas (TZDs) fueron introducidas a mediados de la década del noventa basados en datos que sugerían una mejora en la sensibilidad a la insulina a través de un nuevo mecanismo. Ensayos de la más potente TZD, troglitazona, no obstante, no demostraron mayor eficacia que la Metformina (Kirk 1999, Inzucchi 1998). Del mismo modo, secretagogos como nateglinide o repaglinide, no mostraron superioridad sobre la Metformina (Horton 2000, Moses 1999). Otra nueva estrategia es aumentar la actividad del receptor del péptido tipo glucagon (GLP-1) para mejorar la respuesta secretoria de la insulina frente a la hiperglucemia. Agonistas de los receptores, como exenatide o liraglutide, o agentes que hagan más lenta la degradación de GLP-1 endógeno, como los inhibidores de la dipeptidil-petidasa-4 (sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina), han sido aprobados. Un estudio de liraglutide

en pacientes con Diabetes de tipo 2, indica que la Metformina podría tener igual eficacia en el control de la hiperglucemia (Feinglos 2005).

### I 5.6 Otros usos clínicos

En la actualidad, la Metformina sólo está aprobada para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2, aunque se ha estudiado su eficacia y seguridad para el tratamiento de otras patologías. El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) está caracterizado por oligomenorrea, hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico (hirsutismo, acné, niveles de testosterona elevados en plasma) y ovarios poliquísticos. Esta patología es relativamente frecuente, y afecta a un 10% de las mujeres en edad fértil (Knochenhauer 1998, Asunción 2000). El SOPQ es frecuentemente acompañado por obesidad, hiperinsulinemia, tolerancia a la glucosa alterada, Diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y dislipemia (Ben Haroush 2004, Legro 2001).

Es importante destacar que el SOPQ puede representar el 75% de los casos de infertilidad anovulatorios

particularmente en las pacientes que padecen sobrepeso (Laven 2002).

Además de la infertilidad, hiperandrogenismo y desórdenes metabólicos, el SOPQ puede predisponer al desarrollo de cáncer (Balen 2001, Riman 2004).

Uno de los objetivos principales del tratamiento del SOPQ es reestablecer el patrón normal de ovulación y por consiguiente la fertilidad, con este fin las mujeres que padecen SOPQ son tratadas con citrato de clomifeno, un inductor de la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) y la luteinizante (LH), las cuales provocan la ovulación. Mientras la dieta, el ejercicio y la administración de citrato de clomifeno siguen siendo la base del tratamiento de SOPQ, la Metformina es una droga que está siendo explorada por sus beneficios metabólicos, que pueden conducir a una reducción de los elevados niveles de insulina crónicos. En esta patología, se considera que los altos niveles de insulina impulsan la producción de esteroides en el ovario, glándulas adrenales y tejido adiposo,

y reducen la liberación hepática de globulina ligadora de esteroides sexuales (Brock 2005, Ibáñez 1999).

De este modo, reducir los niveles de insulina promete revertir algunos de los factores potencialmente patogénicos del SOPQ. Además, estudios recientes *in vitro* indican que la Metformina puede reducir la producción de esteroides de una manera directa vía su acción sobre AMPK (Tosca 2006). La terapia con Metformina mejora espontáneamente la inducción de la ovulación con citrato de clomifeno o gonadotropinas, así como las tasas de concepción en mujeres con SOPQ (Neveu 2007, Costello 2003).

Desafortunadamente alrededor del 50% de las mujeres con SOPQ tratadas con Metformina no responden a la droga, probablemente debido a la heterogeneidad de la patogénesis subyacente (La Marca 2005).

La eficacia de la Metformina en lo que respecta a la pérdida de peso en pacientes obesos sin Diabetes mellitus es discutida. Los beneficios clínicos de la Metformina usada como

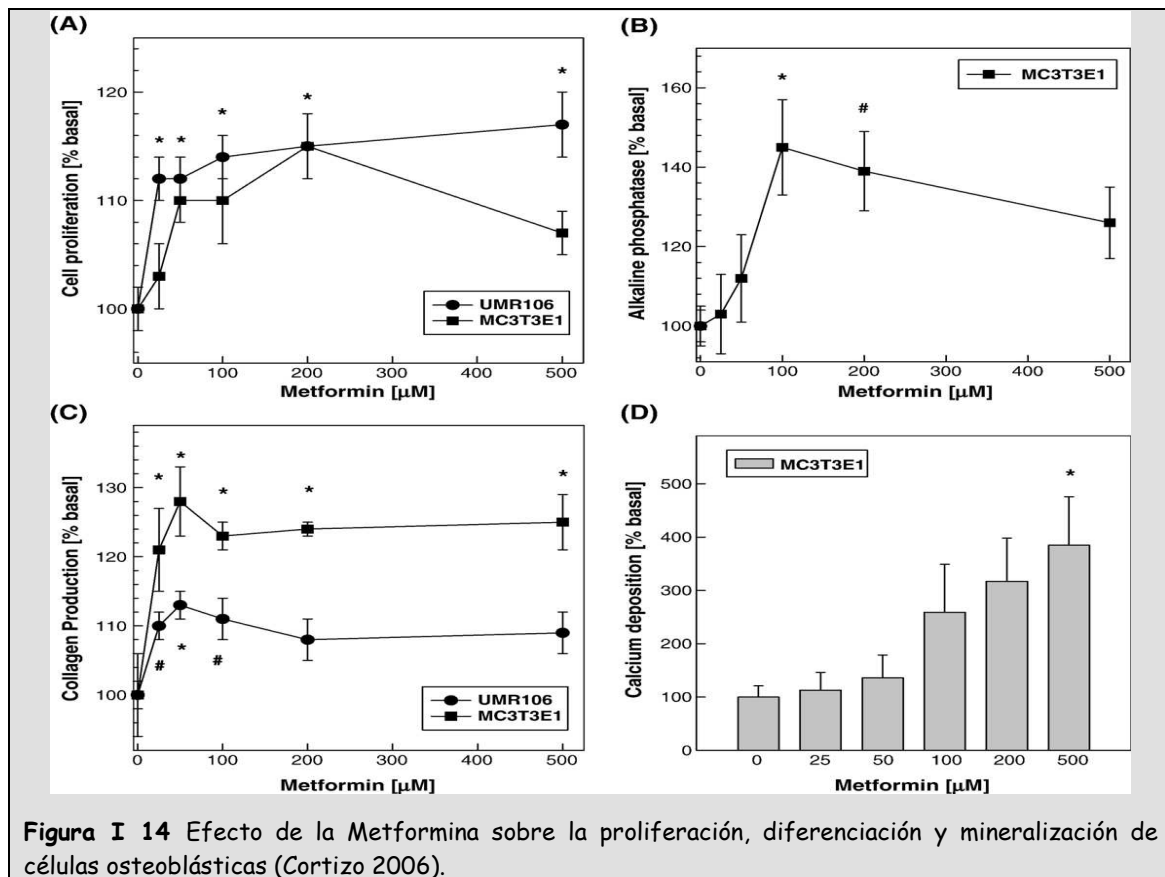
monoterapia han sido inconsistentes, modestos en magnitud y variables en lo que respecta a pérdida de peso en el corto plazo, desde 0.5 a 2.5 kg (Charles 2000). Se está estudiando la posibilidad de que la Metformina pueda ser utilizada en combinación con otras drogas para el manejo de la obesidad. En un ensayo piloto de 6 meses de duración, se estudió la combinación de fluoxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina) (20mg/día) y Metformina (500mg dos veces al día) en pacientes obesos no diabéticos, y se encontró una reducción del peso corporal de aproximadamente 8 kg comparado con 0.5 kg en el grupo control (Samaras 2007).

### I 5.7 Metformina y sus efectos sobre el tejido óseo

Ya se ha descrito en la sección I 4.4 los efectos beneficiosos

a nivel clínico que presenta el tratamiento con Metformina sobre el hueso en pacientes diabéticos, pero es interesante comentar los estudios previos realizados *in vitro* con esta droga sobre células óseas que sustentan los hallazgos clínicos.

En el año 2006, nuestro grupo demostró por primera vez que la Metformina ejerce acciones osteogénicas sobre osteoblastos en cultivo. En estudios *in vitro*, se encontró que la Metformina incrementa la proliferación celular en forma dosis-dependiente, promueve la diferenciación celular (aumenta la expresión y secreción de colágeno tipo I y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina), e incrementa la formación de nódulos de mineralización (Figura I 14).



Para dilucidar los posibles mecanismos de acción involucrados, se estudió la expresión de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y también de las dos isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (e/iNOS), encontrando que este fármaco induce la activación y redistribución de las ERK de manera transitoria y estimula la expresión de e/iNOS en forma dosis-dependiente (Cortizo 2006).

Habiendo estudiado los efectos de la Metformina sobre las células óseas y conociendo, por

estudios previos, realizados tanto por nuestro grupo (McCarthy 1997, McCarthy 2001a, McCarthy 2001b) en los cuales se demostró que los AGEs modulan el crecimiento y diferenciación de osteoblasto, como por Alikhani M y colaboradores (2006) que demostraron que las proteínas modificadas por AGEs inducen apoptosis en osteoblastos, es que surge la idea de estudiar el efecto de ambos agentes sobre las células óseas, dando origen a los estudios *in vitro* que se realizaron durante este trabajo de tesis y que

dieron origen a las siguientes publicaciones:

1) "Metformin, an anti-diabetic agent, inhibits advanced glycation end product(AGE)-induced deleterious effects in osteoblast-like cells by suppressing oxygen species generation, apoptosis and AGE-receptor upregulation". (Schurman 2008).

2) "Metformina bloquea los efectos deletéreos de los productos de glicación avanzada (AGEs) en osteoblastos en cultivo (McCarthy 2006).



## I 6 Hipótesis y Objetivos

La hipótesis de este trabajo de tesis es que tanto *in vitro* como *in vivo*, el tratamiento con Metformina podría proteger y/o bloquear los efectos deletéreos de los AGEs sobre el hueso.

### Objetivos Generales

Investigar los mecanismos patogénicos de los AGEs así como los efectos de la Metformina sobre el hueso, en un modelo *in vitro* de células óseas en cultivo y en un modelo *in vivo* en ratas diabéticas y controles.

### Objetivos Específicos

1) Analizar el efecto de los AGEs y la Metformina sobre el citoesqueleto de actina y la diferenciación de osteoblastos en cultivo.

2) Investigar los efectos pro- y anti-apoptóticos de los AGEs y la Metformina en osteoblastos en cultivo.

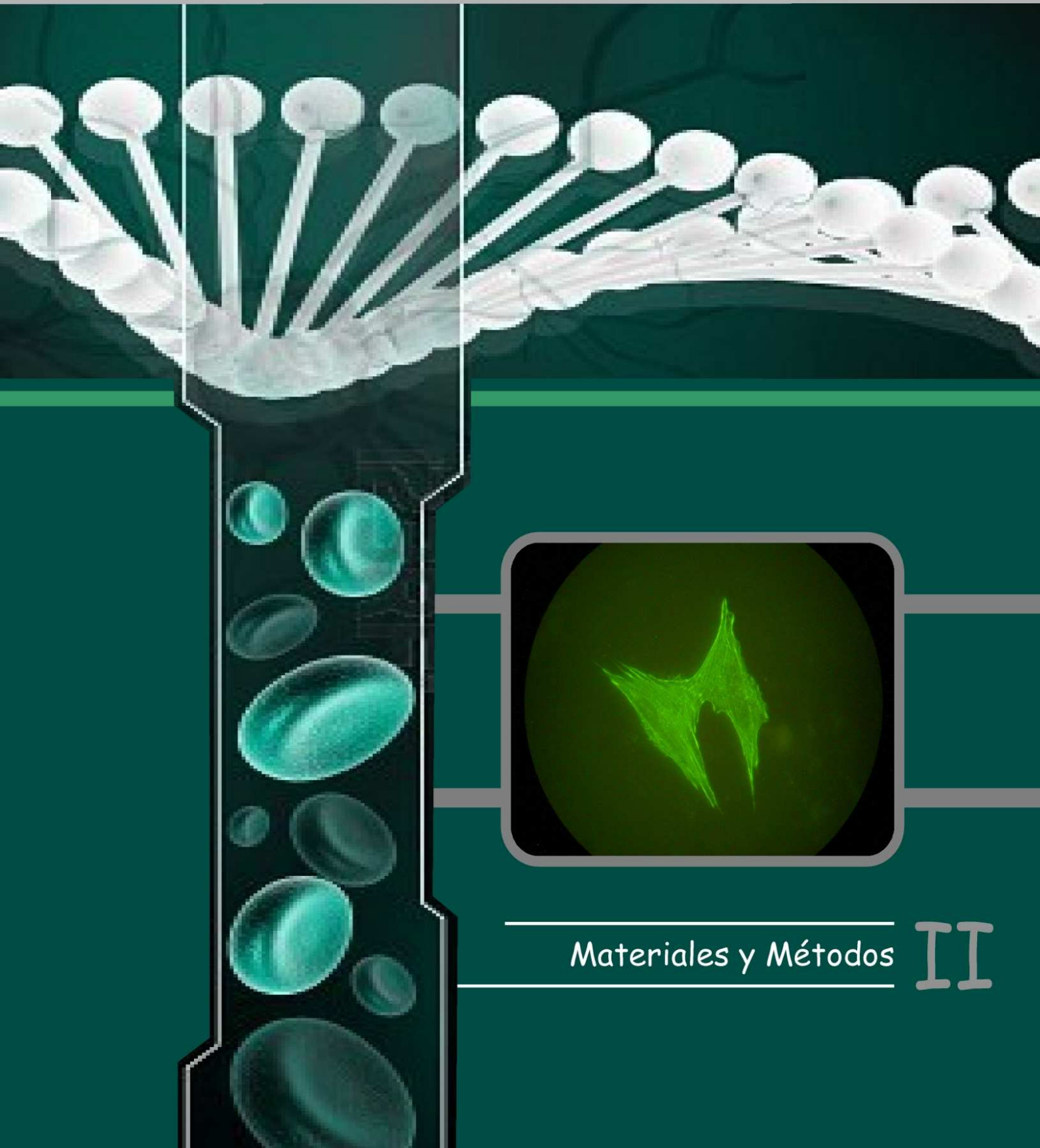
3) Estudiar el efecto de la Metformina sobre el estrés oxidativo inducido por los AGEs sobre osteoblastos en cultivo.

4) Determinar los mecanismos involucrados en la acción de AGEs y

Metformina sobre osteoblastos en cultivo.

5) Estudiar el efecto de la Metformina sobre osteoclastos en cultivo. Determinar los mecanismos de transducción de señales involucrados en su acción.

6) Investigar la formación/resorción ósea en ratas diabéticas o control, tratadas o no con Metformina. Estudiar el grado de reparación de heridas óseas, expuestas o no a la acción de la droga Metformina.



Materiales y Métodos

II

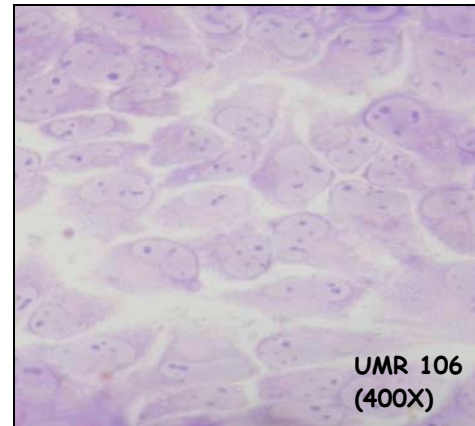
## II 1 Estudios *in vitro*

### II 1.1 Cultivos celulares

II 1.1 a) **UMR106**: es una línea celular derivada de un osteosarcoma de rata.

Su morfología es epitelial; expresa varios marcadores de fenotipo osteoblástico: síntesis de colágeno tipo I, expresión de fosfatasa alcalina, y en respuesta a la PTH modula los niveles intracelulares de AMP cíclico (Partridge 1983). Estas células se cultivan en frascos de plástico de 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Microvet, Laboratorio Microvet S.A. Bs. As. Argentina) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GBO, GBO S.A. Bs. As. Argentina) penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Cuando las células alcanzan la subconfluencia, se despegan del frasco de crecimiento usando 0,25 % de tripsina (Gibco, Invitrogen, Bs. As. Argentina) en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) - 1mM

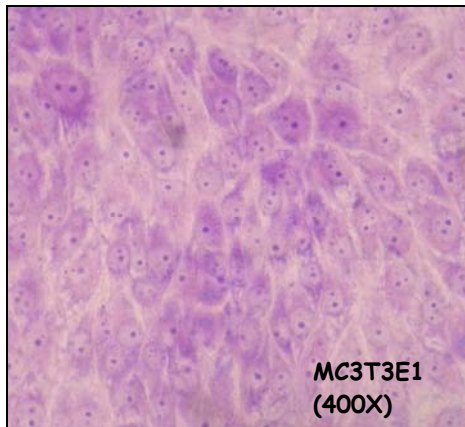
EDTA y se resuspenden en DMEM - 10 % SFB.



II 1.1 b) **MC3T3E1**: esta línea celular es derivada de calvaria de ratón.

La morfología de estas células es del tipo fibroblástico; presenta características fenotípicas del tipo pre-osteoblásticas cuando crecen en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Para inducir su diferenciación a osteoblastos que expresen marcadores de fenotipo osteoblástico como Osteocalcina, Fosfatasa alcalina y colágeno de tipo I, y que presenten la capacidad de mineralizar la matriz extracelular que sintetizaron, es necesario suplementar el medio de

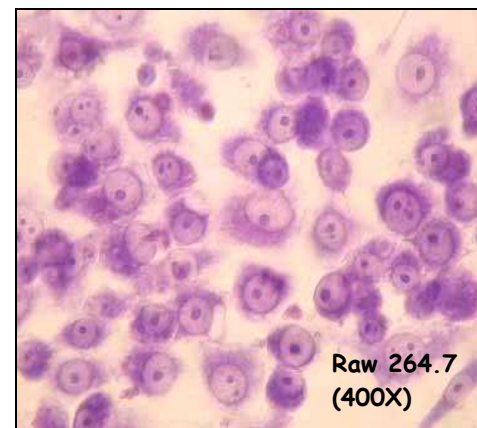
cultivo con 5mM de  $\beta$ -glicerofosfato y 25mg/ml de Acido Ascórbico (Quarles 1992). Los subcultivos se realizan de igual manera que para la línea UMR 106.



II 1.1 c) **Raw 264.7:** es una línea celular de características monocito/macrofágicas obtenida de un derrame peritoneal murino, a partir de un tumor inducido por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abselon.

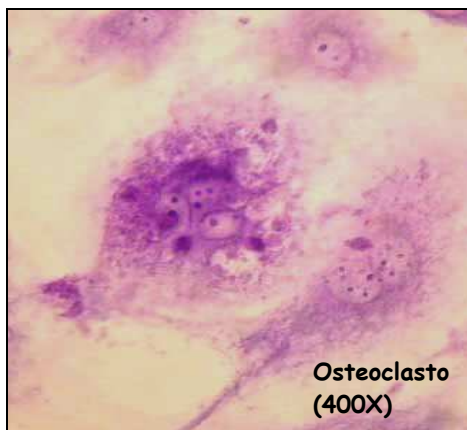
Las células Raw 264.7 presentan una morfología histiocítica. Tanto si se co-cultivan con osteoblastos, como si se tratan con RANKL (ligando para el receptor activador del factor de transcripción nuclear  $\kappa$  B) soluble, son capaces de diferenciarse a osteoclastos multinucleados capaces de resorber hueso (Hsu 1999).

Las células Raw 264.7 se cultivan en frascos de plástico de 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>, en medio DMEM suplementado con 5% de SFB, penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 $\mu$ g/mL). Para realizar los subcultivos, las células se despegan del frasco en el cual crecen, usando PBS - 1mM EDTA y se resuspenden en DMEM - 5 % SFB.



II 1.1 d) **Osteoclastos:** como modelo de osteoclastogénesis se usa la línea Raw 264.7 co-cultivada con la línea UMR 106 (Nicolin 2006). Raw 264.7 y UMR 106 se subcultivan en platos multipocillos en una relación 2:1 respectivamente en medio DMEM suplementado con 5% de SFB, penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 $\mu$ g/mL).

Los osteoclastos se observan en el cultivo luego del tercer día de co-incubación y muestran una morfología típica de células grandes y multinucleadas.



### II 1.2 Preparación de los productos de glicación avanzada (AGEs)

La glicación avanzada de la albúmina libre de ácidos grasos (BSA) (Sigma-Aldrich, Bs. As. Argentina) se produce por incubación de BSA (10 mg/ml) con D-glicolaldehído (33 mM) (Sigma-Aldrich, Bs. As. Argentina) en PBS 150mM, pH 7,4 a 37 °C durante 3 días (Unno 2004). Se incubó BSA en las mismas condiciones sin D-glicolaldehído a modo de control.

El D-glicolaldehído libre se remueve por centrifugación/filtración usando filtros Centricon (Amicon Inc. Beverly, Mass, USA) con

un punto de corte de 10 kDa. La concentración de proteínas se determina por el método de Bradford (Bradford 1976). La formación de AGEs se determina por sus características de emisión de fluorescencia. Se mide el espectro de emisión excitando a una longitud de onda de 370 nm, obteniendo el máximo a 450 nm. Se evalúa usando un espectrofluorómetro Fluorat-02-Panorama de Lumex, utilizando la fluorescencia característica de los AGEs. (Tesis doctoral, Gangoiti María Virginia 2011).

### II 1.3 Ensayos sobre Osteoblastos

#### II 1.3.1 Evaluación de la diferenciación osteoblástica

El grado de diferenciación osteoblástica se estima a través de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina ósea (FAL). Para esto, la monocapa de células se lava con PBS y se solubiliza en Tritón X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich, Bs. As. Argentina). La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente utilizando como sustrato 5 mM para-nitrofenilfosfato (p-NPP) (Sigma-

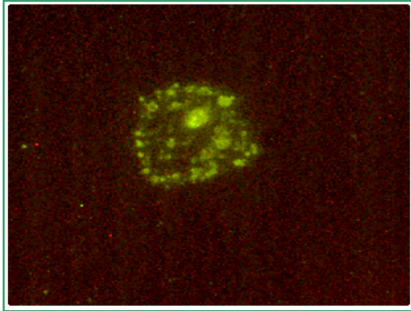
Aldrich, Bs. As. Argentina). El producto coloreado, p-nitofenol, se evalúa por absorbancia a 405 nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en buffer glicina pH 10,4 durante un tiempo determinado (Cortizo 1995). A una alícuota del extracto celular se la usa para dosar la cantidad de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976). Los resultados se expresan como nmol p-NP/ mg proteína\*min.

### II 1.3.2 Evaluación de la muerte celular

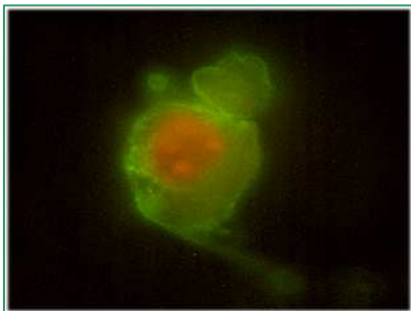
La fase temprana de la apoptosis se caracteriza por la externalización de la fosfatidilserina desde la capa interna a la externa de la bicapa lipídica que forma la membrana plasmática. De esta manera puede unirse a la Anexina V (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) marcada con fluoresceína y ser evidenciada por microscopía de fluorescencia (Varga 1999). La inducción de apoptosis se evalúa en células creciendo en monocapa sobre portaobjetos en diferentes condiciones experimentales, a través del ensayo de Anexina V-FITC (V)/

ioduro de propidio (IP) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Molinuevo 2004). Una célula apoptótica temprana aún no ha perdido la integridad de su membrana plasmática, pero en dicha membrana ya ha ocurrido una externalización de las moléculas de fosfatidil-serina, aumentando así la afinidad de su superficie externa por la anexina-V conjugada al fluorocromo FITC (anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>). Por otro lado, una célula necrótica ha perdido la integridad de su membrana plasmática, pudiendo entonces ingresar la molécula de ioduro de propidio al núcleo para unirse con gran afinidad al ADN (anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>).

Luego de lavar con PBS, las células se fijan con paraformaldehído 4% en PBS durante 10 minutos y se montan en portaobjetos. Se observan luego, utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon 5000). El porcentaje de células apoptóticas y necróticas se determina contando las células marcadas por campo utilizando un aumento de 400X en un total de 30 campos por condición experimental.



Célula apoptótica Anexina  
V- FITC (+)/IP (-)



Célula apoptótica Anexina  
V- FITC (+)/IP (+)

Los estadios tempranos de apoptosis se evidencian como Anexina V- FITC (+)/IP (-) mientras que estadios apoptóticos/ necróticos se caracterizan como Anexina V- FITC (+)/IP (+).

Para evaluar posibles mecanismos de acción involucrados en la muerte celular se mide la actividad de la enzima caspasa-3 (Plotkin 1999). La actividad de la enzima Caspasa-3 se evalúa determinando la degradación del sustrato fluorogénico DEVD-AFC (BIOMOL Internacional,

L.P. PA, USA) que contiene la secuencia aminoacídica que es clivada por la enzima caspasa-3. El producto fluorescente liberado (AFC) se determina utilizando un espectrofluorómetro (longitud de onda de excitación: 400nm, longitud de onda de emisión: 482nm).

Las células se incuban someténdolas a diferentes condiciones experimentales, luego se lisan y se determina la cantidad de proteína por medio del método de Bradford. Una alícuota del lisado celular (100  $\mu$ g proteína) se incuba con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC por el lapso de una hora a 37 °C. Posteriormente se evalúa la cantidad de producto liberado, como se indica previamente.

### II 1.3.3 Determinación de la producción intracelular de especies de oxígeno reactivas (ROS)

La generación intracelular de radicales libres se evalúa mediante la oxidación de dihidro-rodamina 123 (DHR) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) a rodamina (McCarthy 2001). La técnica se basa en que las especies altamente oxidantes como el OH\* y

ONOO\*/ ONOOH, son capaces de oxidar la DHR a rodamina, un compuesto fluorescente, de manera que puede ser detectada la emisión a una longitud de onda de 532 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 495 nm (Kooy 1994). Las monocapas celulares se cultivan en platos multipocillos bajo diferentes condiciones experimentales por el lapso de 24 horas, al cabo de este tiempo, el medio se reemplaza por DMEM libre de suero con DHR 10  $\mu$ M y se las incuban 4 horas más. Posteriormente, se lavan las células varias veces con PBS, seguido a esto, se lisan en Triton X- 100 al 0,1%. La concentración de producto oxidado (Rodamina) presente en el extracto celular se determina midiendo la intensidad de fluorescencia relativa con respecto a un estándar de Rodamina 123 (Cortizo 2000a). Una alícuota se usa para dosar proteínas totales por el método de Bradford.

II 1.3.4 Western Blot para el análisis de la expresión de dos receptores para AGE: RAGE y Galectina 3

La monocapa celular se lisa con buffer de Laemmli (Laemmli 1970) y el contenido de proteína se determina por Lowry (Lowry 1951). El lisado celular se calienta a 100°C durante 3 minutos y se emplea una alícuota conteniendo 40ug de proteína para realizar una electroforesis en gel de poliacríamida al 12,5% con dodecil sulfato de sodio (SDS). Las proteínas separadas se electro-transfieren a una membrana de PVDF. La membrana se bloquea con leche descremada al 3% en buffer Tris-salino durante 2hs a temperatura ambiente. Luego la membrana se incuban durante 24hs a 4°C con el primer anticuerpo policlonal, anti RAGE (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) o anti Galectina (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA), preparados en albumina serica bovina 0,5% en PBS a una dilución de 1: 1500. Luego de lavar la membrana con PBS / TWEEN-20 0,1%, se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente (1: 2000) (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) y las bandas se revelan por electroquimioluminiscencia (ECL). Se escanean las placas radiográficas



utilizando un scanner (Canoscan LIDE 100) y la intensidad de la banda se cuantifica mediante el programa IMAGEJ ([www.macbiophotonics.ca/imagej](http://www.macbiophotonics.ca/imagej)).

II 1.3.5 Estudios de inmunofluorescencia

### II 1.3.5 a) *Directa*

Se utiliza esta técnica para evaluar la disposición de las fibras de actina. Las células se plaquean sobre cubreobjetos de vidrio y se cultivan en DMEM con 10% de SFB bajo diferentes condiciones experimentales, luego se lavan con PBS, se fijan con paraformaldehído al 4% por 10 minutos. Se permeabilizan con metanol frío por 4 minutos y se bloquean con BSA al 1% en PBS. Posteriormente se incuban con paloidina-FITC (1:100) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) por 2 horas a temperatura ambiente, se montan en glicerol 80% en PBS, previo varios lavados en PBS. Se observan los preparados con un microscopio de fluorescencia Nikon 5000 y se toman imágenes fotográficas para su posterior evaluación (Cortizo 2000b).

### II 1.3.5 b) *Indirecta*

Se utiliza este ensayo para evaluar la expresión de RAGE. Las células se crecen hasta subconfluencia sobre cubreobjetos de vidrio bajo diversas condiciones experimentales. Una vez finalizado el cultivo, se lavan en PBS y se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de permeabilizarlas con metanol 100% durante 4 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  se lavan con PBS y se bloquea con BSA al 1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, con el fin de evitar uniones inespecíficas. Se incuba con el primer anticuerpo, anti RAGE (dilución de 1: 350 en BSA al 1% en PBS) una hora a temperatura ambiente. Previo varios lavados con PBS, se incuba con el segundo anticuerpo marcado con fluoresceína (dilución 1: 1000 en BSA al 1% en PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se lava con PBS y se monta en glicerol 80% en PBS. Se observan los preparados con un microscopio de fluorescencia Nikon 5000 y se toman fotografías para ser analizadas posteriormente.

### II 1.4 Ensayos sobre Osteoclastos

#### II 1.4.1 Cuantificación del número de células multinucleadas

Se co-cultivan las células Raw 264.7 con las UMR 106 para obtener osteoclastos como ha sido detallado en secciones previas, bajo diferentes condiciones experimentales. Al cabo de 7 días, se finaliza el cultivo y se tiñen las células mediante la técnica de Giemsa (Sálice 1999). Para esto, se fijan las células con metanol por 5 minutos, luego se colorea con Giemsa. Se observa con un microscopio invertido a un aumento de 400X y se cuenta la cantidad de células multinucleadas por campo, realizando esto en un total de 20 campos por condición.

#### II 1.4.2 Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)

Los cocultivos se lavan con PBS y se solubilizan en 250  $\mu$ l de Tritón X-100 0,1% (Valcourt 2007). Una alícuota del extracto celular se incuba con el buffer de reacción (412 mM ácido acético, 0,209 % Triton X-100, 412 mM NaCl, 4,12 mM EDTA, 10,6 mM ácido ascórbico, 10,1 mM p-

nitrofenilfosfato, 41,6 mM tartrato de sodio a pH = 5,5) durante 1 h a 37°C en la oscuridad (Vol. final: 1 ml). Luego se detiene la reacción agregando 200  $\mu$ l de NaOH 300 mM. Los cambios colorimétricos se miden por Absorbancia a 405 nm. Con otra alícuota del extracto se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se expresan los resultados como Actividad TRAP específica = nmol de p-NP/ mg de Prot. \* min.

#### II 1.4.3 Western blot para evaluar la expresión del RANKL

Se estudia la expresión de RANKL en las células UMR 106, incubándolas en DMEM libre de suero y con una concentración de Metformina de 300  $\mu$ M, por diferentes períodos de tiempo (24, 48 y 72 hs). Se levanta el extracto celular usando buffer de Laemmli y se realiza la técnica de Western Blot, como fue descrita previamente, aunque con un primer anticuerpo específico para RANKL (dilución 1: 2000 en BSA al 1% en PBS) (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA). Una vez reveladas las bandas, se

escanean y se analiza la intensidad de las mismas utilizando el programa Image J.

II 1.4.4 Evaluación de la expresión de la enzima P-AMPK por inmunofluorescencia indirecta

Se cultivan los osteoclastos en presencia o no de Metformina a dos concentraciones ( $300\mu\text{M}$  y  $500\mu\text{M}$ ). Luego se determina la presencia de P-AMPK por inmunofluorescencia indirecta siguiendo la técnica descrita en apartados anteriores, utilizando en este caso como primer anticuerpo anti-P-AMPK (dilución 1:350 en BSA al 1% en PBS) (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA). Se observan los preparados con un microscopio confocal (Leica TSC SP5 AOB5, perteneciente al consorcio conformado en la Fac. de Cs. Exactas de la UNLP) y se toman fotografías para analizarlas posteriormente.

### II 2 Estudios in vivo

#### II 2.1 Modelo de Diabetes tipo I en animales

Se utilizan ratas macho (Sprague-Dawley) de 190-210 g de peso. Los animales se mantienen en un bioterio con temperatura controlada a 23 °C con un ciclo fijo de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad, alimentadas de acuerdo a las normas Standard de laboratorio y bebiendo agua ad libitum. Todos los experimentos con animales han sido realizados en conformidad con la guía sobre Manejo y Entrenamiento de Animales de Laboratorio publicada por Universities Federation for Animals Welfare (1992).

En la mitad de los animales, se induce la patología diabética (Diabetes de tipo I) por inyección de estreptozotocina en una dosis de 55mg/kg disuelta en un buffer citrato (0,05 M, pH 4,5) (El-Batran, 2006). Después de 4 días, se determina el nivel de glucosa en sangre, y se verifica que a los animales que recibieron la inyección

de estreptozotocina, efectivamente presenten Diabetes.

Luego, los animales se dividen en 4 grupos de 10 ratas cada uno: ratas no diabéticas- controles (C) y diabéticas (D) que toman agua ad libitum; ratas tratadas con Metformina no diabéticas (M) y ratas diabéticas tratadas con Metformina (DM) que reciben 100mg/kg por día de Metformina (Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina) en el agua de bebida por el plazo de 2 semanas.

Se evalúa la glucosa en el suero, por medio del método de la glucosa-oxidasa; también en suero se determina el nivel de triglicéridos y colesterol, utilizando equipos comerciales (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina).

#### II 2.2 Modelo de reosificación ósea

El efecto de la Metformina sobre el proceso de reparación ósea se determina utilizando un modelo de reosificación (Santana 2003).

Los animales se dividen en 4 grupos como se detalló anteriormente. Antes de iniciar los tratamientos, los animales son

anestesiados de forma intraperitoneal / intramuscular inyectándoles 0,12 mL/100 gr de peso de ketamina clorhidrato (62,5 mg/mL) y xylacina (6,25 mg/mL) (Laboratorios Richmond, Buenos Aires, Argentina).

Se les realiza un defecto circular en el hueso parietal de 1 mm de diámetro utilizando un torno de baja velocidad con fresa de carburo (Sabilex 35000 RPM). Luego se cierra la herida quirúrgica, evaluándola para detectar posibles signos de inflamación.

A continuación los animales se mantienen en cuarto termostático durante los diferentes tratamientos, con ciclos de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad y alimentados con alimento comercial para ratas por el término de 15 días.

### II 2.3 Análisis histológico del hueso parietal

Las ratas reciben tratamiento con Metformina por 15 días, luego se sacrifican por dislocación cervical bajo anestesia y los huesos parietales se procesan para poder realizar el

análisis histológico y las medidas histomorfométricas cuantitativas de los mismos. Con este objetivo, se fijan los huesos parietales en formalina al 10% y se descalcifican en EDTA al 10%. Los huesos se deshidratan y embeben en parafina para obtener tacos que luego se cortan utilizando un micrótopo Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) en finas secciones de 5  $\mu$ m. Estas secciones se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E) ó fosfatasa ácido tartrato-resistente (TRAP) (Sigma, Louis, MO, USA) que es una tinción histoquímica específica que identifica osteoclastos (Schell 2006). Las fotografías se toman con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 en un microscopio óptico Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tokio, Japón). Posteriormente las imágenes son analizadas usando el programa Image J.

La reosificación de la lesión parietal se determina como la relación entre el área de hueso nuevo y el área de hueso total (H&E). La densidad osteoblástica se evalúa contando el número de osteoblastos por unidad de

superficie de reosificación. Por otro lado, la densidad de osteocitos se determina contando la cantidad de osteocitos por área de hueso nuevo reosificado, y la densidad osteoclástica se calcula como área TRAP positiva por  $\text{mm}^2$  del nuevo tejido óseo reosificado ( $\text{Oc}/\text{mm}^2$ ) (Schell 2006).

### II 2.3 a) Tinción con Hematoxilina & Eosina

La tinción de hematoxilina por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; el colorante eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como la mayoría de las proteínas al pH de la tinción.

Los cortes de preparados embebidos en parafina se sumergen en xilol para eliminar la parafina, luego se pasan por una serie de alcoholes ( $100^\circ$ ,  $96^\circ$  y  $70^\circ$ ) para rehidratarlos y se sumergen en hematoxilina por 5 minutos, se lavan con agua corriente y se introducen en eosina por 30 segundos, se lavan con

agua destilada. Posteriormente se pasan por una serie de alcoholes ( $70^\circ$ ,  $96^\circ$  y  $100^\circ$ ) para deshidratarlos, se los introducen en xilol y finalmente se montan con bálsamo de Canada.

### II 2.3 b) Tinción histoquímica para fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP)

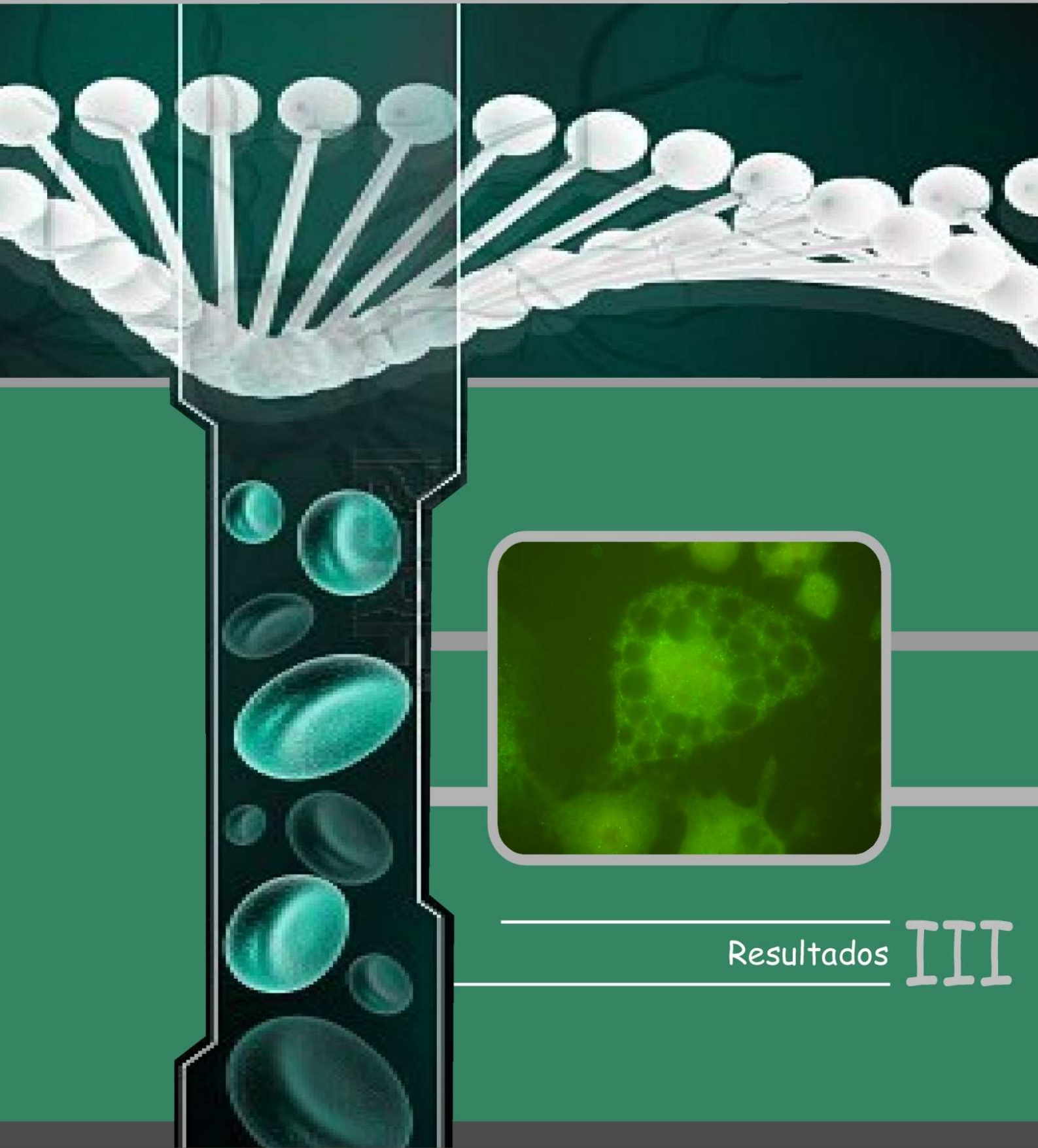
En los cortes histológicos se determina la presencia de osteoclastos, mediante la determinación de la actividad TRAP utilizando un kit comercial (Sigma Aldrich, Bs. As. Argentina). La reacción involucra una diazotación en la cual se forma un precipitado violáceo en las células que presentan actividad TRAP. Para ello los cortes se lavan con PBS y se fijan 30 segundos con una solución que contiene citrato, acetona y formaldehído 37%. Luego se lava con abundante agua destilada. Se incuba una hora a  $37^\circ\text{C}$  al resguardo de la luz con una solución de  $\text{pH} = 5.5$  con tatrato que contiene naftol AS-Bi fosfato y sal de Fast Garnet GBC (como agente copulador). Este compuesto de diazonio se acopla rápidamente a pH ácido, formando

depósitos altamente insolubles. El ácido tartárico se utiliza para demostrar la presencia de fosfatasa ácida tartrato-resistente. El naftol AS-BI, liberado por la hidrólisis enzimática, se acopla inmediatamente con la sal de Fast Garnet GBC, formando depósitos de color castaño insolubles en los puntos de actividad.

un p valor < 0.05 para todos los análisis estadísticos.

### **II 3 Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM y se obtienen a partir de al menos tres experimentos independientes que se realizan por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecen mediante Oneway ANOVA con test Tukey post-hoc. Para datos con distribución no normal se utiliza el test no paramétrico Kruskal Wallis con test de Dunn post-hoc, usando el programa estadístico GraphPad In Stat version 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Se considera significativo



Resultados III



En el presente capítulo se exponen los resultados ordenados en tres secciones.

En la primera de ellas se aborda el estudio del efecto de la Metformina y/o los productos de glicación avanzada (AGEs) *in vitro* sobre osteoblastos en cultivo.

En la segunda sección se describen ensayos que evalúan el efecto de la Metformina sobre osteoclastos en cultivo.

En la última sección se muestran los resultados obtenidos *in vivo* en un modelo de lesión ósea realizado en ratas a las cuales se les induce Diabetes por destrucción total de las células  $\beta$  pancreáticas y en ratas controles, ambos grupos de ratas tratadas o no con Metformina en el agua de bebida.

### **III 1 Resultados *In Vitro* sobre Osteoblastos**

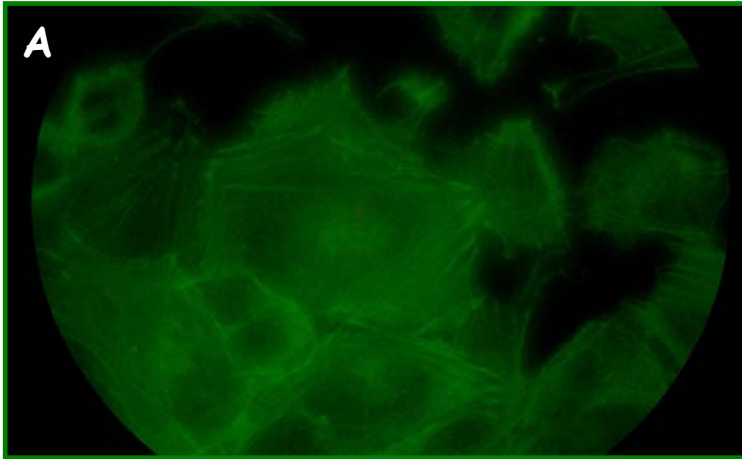
Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron dos líneas celulares, las células UMR 106 y la línea pre-osteoblástica MC3T3E1.

#### III 1.1 Efecto de la Metformina y los AGEs sobre las fibras de Actina

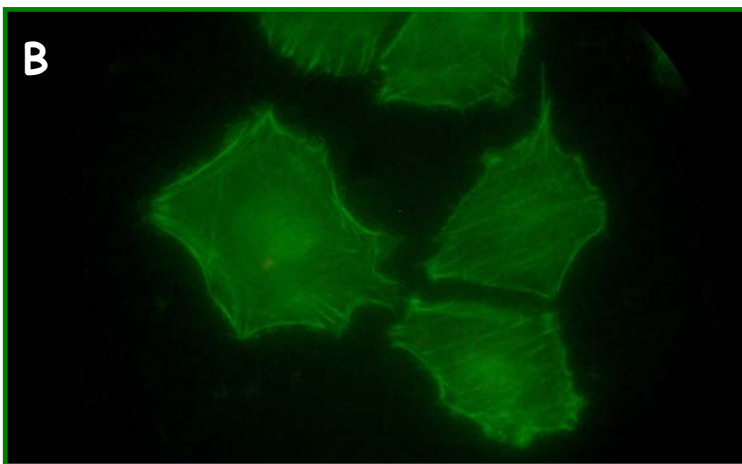
Para evaluar el efecto de estos compuestos sobre la morfología del citoesqueleto, se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa incubando las células UMR 106 con paloidina-FITC. Se ensayaron tres condiciones:

- A) BSA (200 $\mu$ g/ml)
- B) AGEs-BSA (200 $\mu$ g/ml)
- C) AGEs-BSA (200 $\mu$ g/ml) + Metformina (500 $\mu$ M)

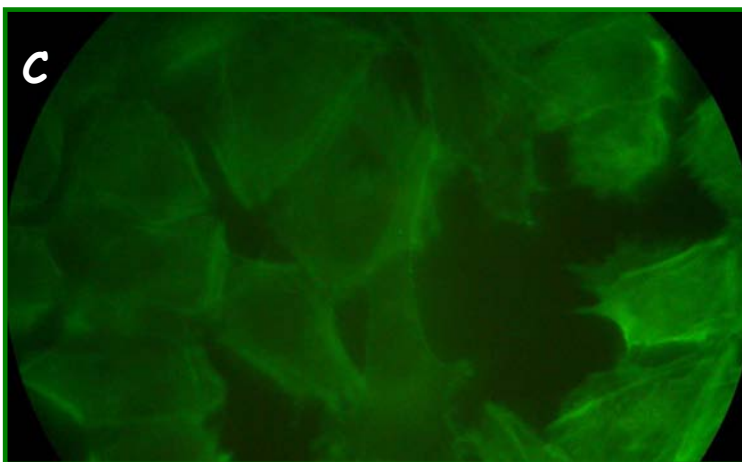
Los osteoblastos en presencia de BSA mostraron una clara distribución de la actina polimerizada formando fibras de estrés (figura III 1 A). La incubación con AGEs indujo un reordenamiento de estas fibras, distribuidas de forma desorganizada con la actina concentrada en puntos de adhesión focal (figura III 1 B). Al co-incubar con Metformina (500  $\mu$ M) se revirtió el efecto inducido por los AGEs (figura III 1 C).



**BSA**



**AGEs**



**AGEs+Metf**

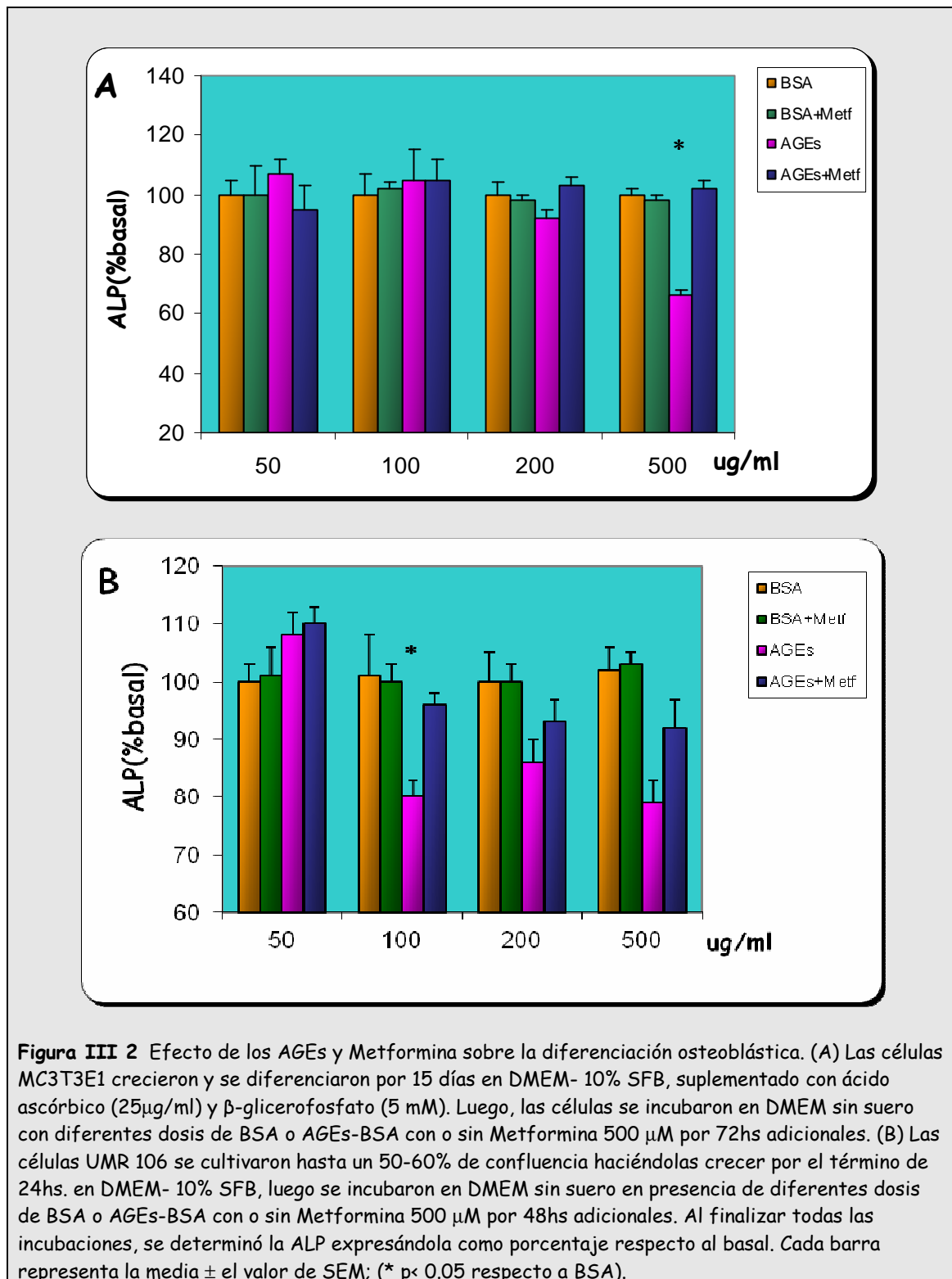
**Figura III 1** Efecto de la Metformina y los AGEs sobre las fibras del citoesqueleto de actina. Las células UMR 106 se cultivaron sobre cubreobjetos en platos multipocillos, en DMEM libre de suero con el agregado de BSA o AGEs-BSA (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) con o sin Metformina 500 $\mu\text{M}$  durante 24 hs. La morfología del citoesqueleto se evaluó mediante la técnica de inmunofluorescencia directa. Los preparados se observaron con un microscopio de fluorescencia y se fotografiaron (objetivo 40X)

III 1.2 Efecto de la Metformina y los AGEs sobre la diferenciación celular

Con el objetivo de estudiar el efecto de la Metformina y los AGEs sobre la diferenciación osteoblástica, se evaluó la actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina (ALP).

Las células MC3T3E1 se diferenciaron en presencia de ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato por el término de dos semanas. Luego las células MC3T3E1 diferenciadas o las UMR 106 (que se comportan basalmente como osteoblastos

diferenciados) se incubaron con diferentes dosis de BSA o AGEs-BSA con y sin Metformina 500  $\mu$ M por 72hs. La actividad de ALP en las células MC3T3E1 sin agregado de AGEs o Metformina luego de 15 días de diferenciación fue de  $5.3 \pm 0.4$  nmol PNP/min/mg proteína, mientras que la actividad basal de las células UMR106 fue de  $518 \pm 85$  nmol PNP/min/mg proteína



La figura III 2 muestra que 500 µg/ml de AGEs-BSA indujo una inhibición estadísticamente significativa en la expresión de ALP

en las células MC3T3E1 diferenciadas a osteoblastos. En el caso de las células UMR 106, 100 µg/ml de AGEs-BSA provocó una inhibición

significativa de la ALP, mientras que a mayores concentraciones de AGEs-BSA se mantuvo una tendencia a la inhibición, pero no se evidenció un efecto dependiente de la dosis. La co-incubación de ambas líneas celulares con AGEs y Metformina (500  $\mu$ M) previno total- o parcialmente la disminución de la ALP inducida por AGEs.

### III 1.3 Efecto de la Metformina y los AGEs sobre la muerte celular

Con la finalidad de evaluar el efecto de la Metformina y los AGEs sobre la muerte celular se realizó un ensayo utilizando Anexina V-FITC (V) / ioduro de propidio (IP). Este ensayo

permite determinar la proporción de células apoptóticas y/o necróticas.

Luego de 24hs. de incubación con AGEs-BSA en dosis de 100  $\mu$ g/ml y 200  $\mu$ g/ml se indujo un incremento en el número de células apoptóticas (Tabla III 1), como así también en el número de células necróticas (Tabla III 2), tanto en las células UMR 106 como en las MC3T3E1.

El efecto fue dosis-dependiente en el caso de muerte celular tardía (células apoptóticas / necróticas). La co-incubación con Metformina 500  $\mu$ M por 24hs bloqueó la muerte celular inducida por AGEs en osteoblastos en cultivo.

**Tabla III 1** Efecto de los AGEs y Metformina sobre la apoptosis osteoblástica. Las células se incubaron con BSA o AGEs-BSA con o sin Metformina (500  $\mu$ M) por 24horas, y luego se evaluó la muerte celular usando Anexina V-FITC / ioduro de propidio. Los estadios tempranos de apoptosis fueron caracterizados como Anexina V- FITC (+)/IP (-).

Dosis(mg/ml)	BSA	BSA+Metf	AGEs	AGEs+Metf
MC3T3E1				
100	100 $\pm$ 16	178 $\pm$ 6	134 $\pm$ 15*	109 $\pm$ 13
200	100 $\pm$ 14	76 $\pm$ 6	125 $\pm$ 16*	75 $\pm$ 12
UMR 106				
100	100 $\pm$ 11	82 $\pm$ 19	144 $\pm$ 11*	103 $\pm$ 10
200	100 $\pm$ 9	109 $\pm$ 13	131 $\pm$ 10*	75 $\pm$ 8

Metf: 500 $\mu$ M Metformina. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al basal (media  $\pm$  SEM). (\*p< 0, 05 respecto a BSA)

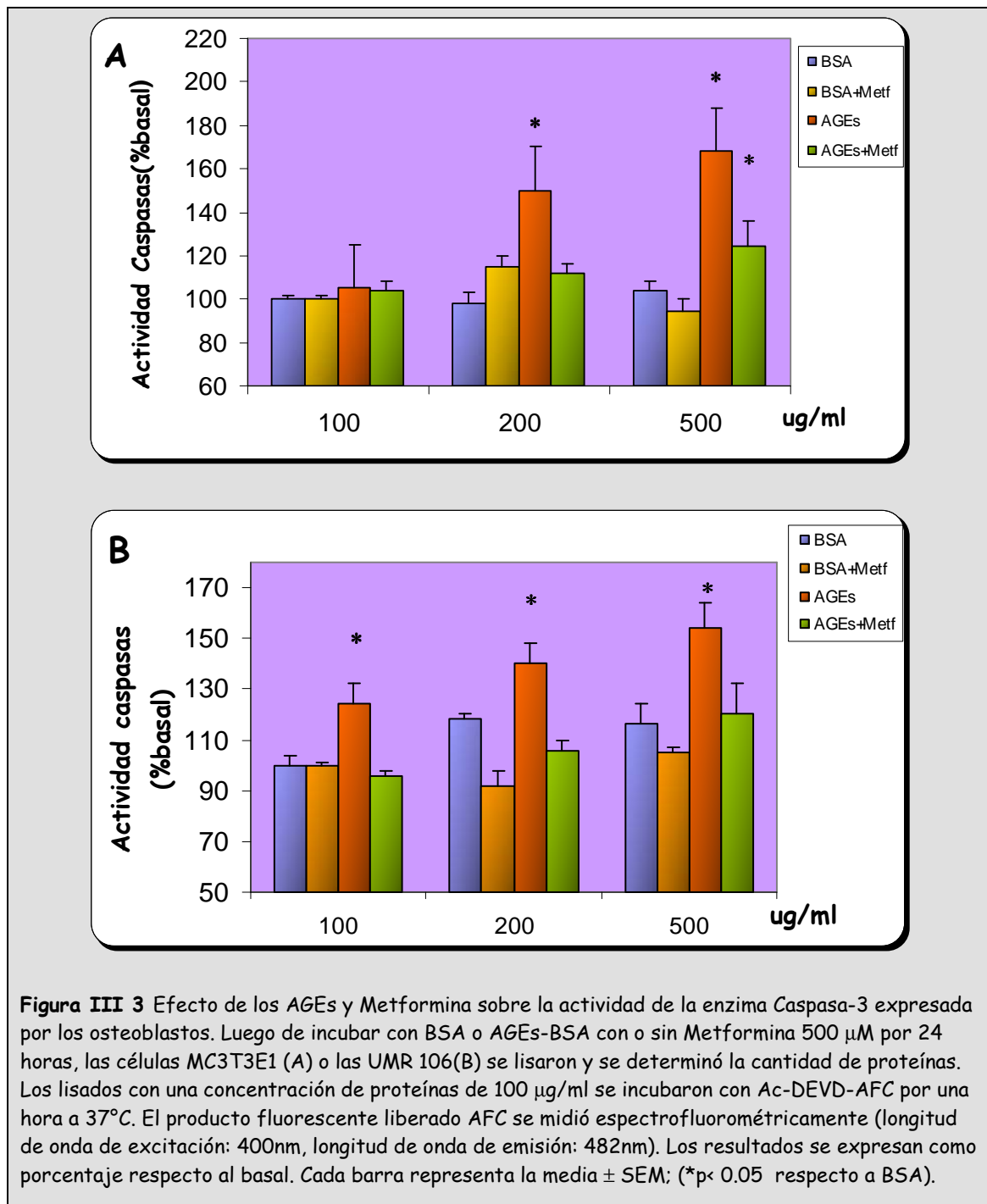
**Tabla III 2** Efecto de los AGEs y Metformina sobre la apoptosis tardía/ necrosis de células osteoblásticas. Las células se cultivaron en DMEM con BSA o AGEs-BSA con o sin Metformina (500  $\mu$ M) por 24 horas, y luego se evaluó la muerte celular usando Anexina V-FITC/ ioduro de propidio. Los estadios apoptóticos/necróticos fueron caracterizados como Anexina V-FITC (+)/IP (+).

Dosis(mg/ml)	BSA	BSA+Metf	AGEs	AGEs+Metf
MC3T3E1				
100	100 $\pm$ 26	51 $\pm$ 10	161 $\pm$ 37*	60 $\pm$ 15
200	100 $\pm$ 24	82 $\pm$ 14	251 $\pm$ 33*	73 $\pm$ 17
UMR 106				
100	100 $\pm$ 12	111 $\pm$ 31	118 $\pm$ 12*	65 $\pm$ 8
200	100 $\pm$ 15	86 $\pm$ 29	213 $\pm$ 32*	122 $\pm$ 26

Metf: 500 $\mu$ M Metformina. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al basal (media  $\pm$  SEM). (\*p< 0, 05 respecto a BSA)

A modo de confirmar estos resultados y estudiar posibles mecanismos de acción involucrados en la muerte celular osteoblástica se

llevó a cabo un ensayo fluorogénico para medir la actividad de la enzima caspasa-3 en diferentes condiciones experimentales



En la figura III 3 se puede observar que la presencia de AGEs-BSA indujo un incremento en la actividad de caspasa-3 en forma dependiente de la dosis en ambas líneas celulares. Este efecto pro-apoptótico fue totalmente revertido

por Metformina 500  $\mu$ M en las células UMR106, así como en las células MC3T3E1 tratadas con 200  $\mu$ g/ml de AGEs-BSA. A dosis de AGEs-BSA de 500  $\mu$ g/ml, la Metformina revirtió parcialmente el efecto pro-apoptótico

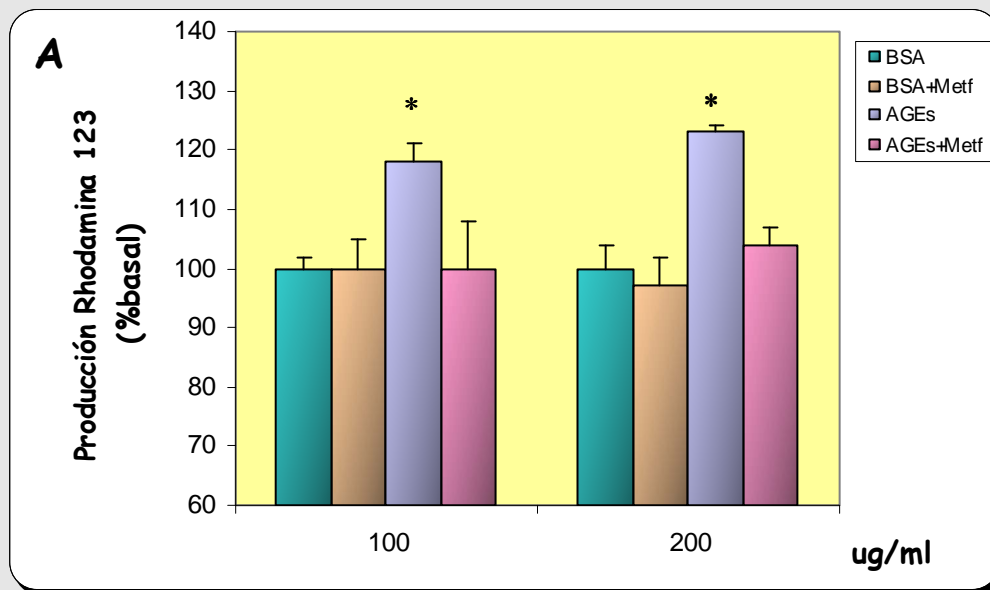
de los AGEs en el caso de las células MC3T3E1.

### III 1.4 Efecto de la Metformina sobre el estrés oxidativo inducido por AGEs

Se sabe que la apoptosis puede originarse por varios mecanismos, entre los cuales se incluyen: defectos en la actividad de las mitocondrias y aumento del estrés oxidativo intracelular. Por otro lado, una de las vías de transducción de señales más importante de los AGEs es la

generación de ROS (especies de oxígeno reactivas) intracelulares. Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que el exceso de AGEs en contacto con los osteoblastos podría inducir su apoptosis por incremento en la generación de ROS. Para investigar esta hipótesis se realizó el ensayo fluorogénico de dihidrorodamina 123 (DHR 123), que permite evaluar la inducción de estrés oxidativo intracelular.



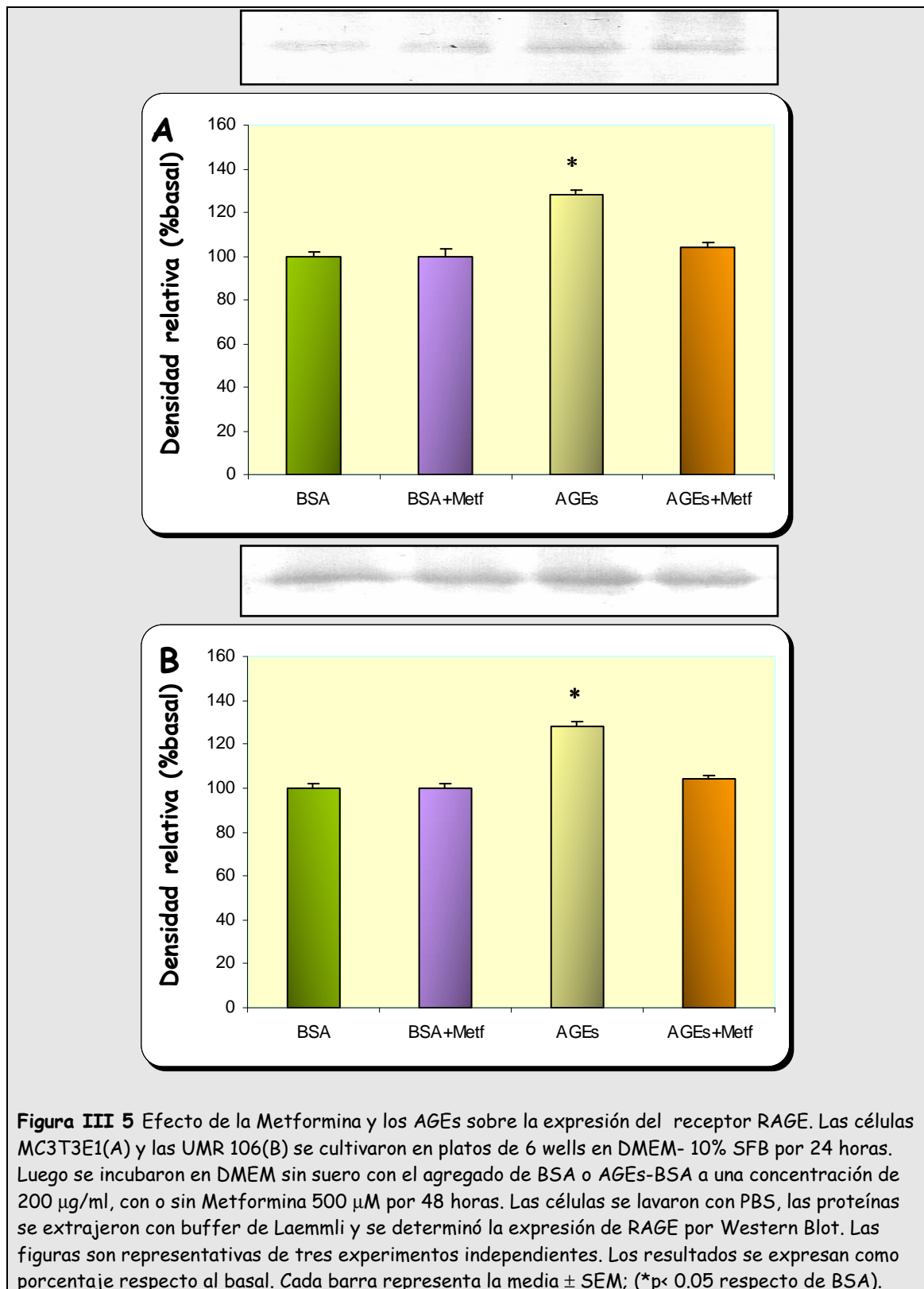


**Figura III 4** Efecto de los AGEs y Metformina sobre el estrés oxidativo intracelular. Las células UMR 106 se cultivaron al 70-80% de confluencia en platos de 24 pocillos. Posteriormente se incubaron en DMEM sin suero con diferentes dosis de BSA o AGEs-BSA con o sin Metformina 500  $\mu$ M. Luego de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM libre de rojo de fenol con dihidro-rhodamina 10  $\mu$ M, y las células se cultivaron por un tiempo adicional de 4 hs. Al término de este período de incubación la monocapa celular se lavó con PBS y se lisó con Triton X-100 al 0,1%. Los niveles del producto de oxidación rodamina se midieron en los lisados por determinación de la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 495nm, longitud de onda de emisión: 532nm). Los resultados se expresan como porcentaje respecto al basal. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM; (\* $p$  < 0.05 respecto de BSA).

La incubación durante 24hs con AGEs-BSA aumento la fluorescencia asociada a rodamina (figura III 4). Cuando se incubaron las células en presencia de 100-200  $\mu$ g/ml de AGEs-BSA y 500  $\mu$ M de Metformina, esta droga anuló el efecto inducido por los AGEs sobre el estrés oxidativo intracelular.

### III 1.5 Efecto de AGEs y Metformina sobre la expresión del receptor para AGEs (RAGE)

Este estudio se realizó por medio de las técnicas de Western Blot e inmunofluorescencia indirecta, usando anticuerpos específicos anti-RAGE. La figura 6 muestra que 48hs de tratamiento con AGEs-BSA (200  $\mu$ g/ml) aumentó la expresión de la proteína RAGE medida por Western Blot, en ambos tipos celulares. La co-incubación con Metformina 500  $\mu$ M, previno la regulación positiva del receptor RAGE inducida por su ligando AGEs (figura III 5).



**Figura III 5** Efecto de la Metformina y los AGEs sobre la expresión del receptor RAGE. Las células MC3T3E1(A) y las UMR 106(B) se cultivaron en platos de 6 wells en DMEM- 10% SFB por 24 horas. Luego se incubaron en DMEM sin suero con el agregado de BSA o AGEs-BSA a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ , con o sin Metformina 500  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Las células se lavaron con PBS, las proteínas se extrajeron con buffer de Laemmli y se determinó la expresión de RAGE por Western Blot. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al basal. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM; (\* $p < 0.05$  respecto de BSA).

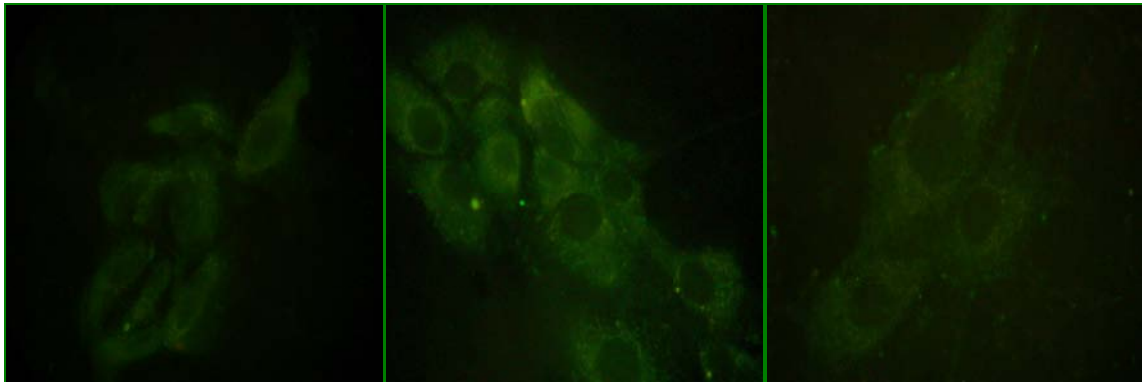
El tratamiento de las células osteoblásticas con Metformina en presencia de BSA no afectó la expresión de RAGE.

Respecto a los ensayos de inmunofluorescencia, se observó fluorescencia asociada a RAGE en ambos tipos celulares con un patrón

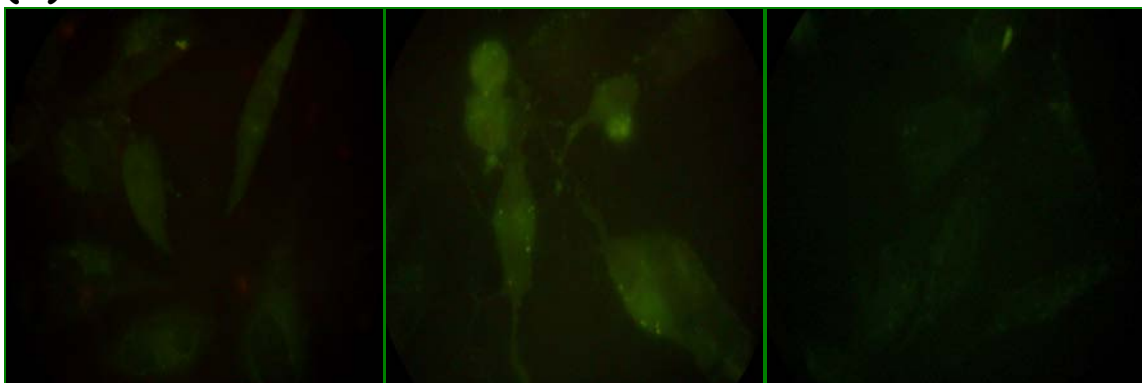
difuso (figura III 6 A y B). Ambos tipos celulares expuestos a AGEs-BSA, mostraron un incremento de fluorescencia asociada a RAGE en la

superficie celular, cuando se los comparó con osteoblastos incubados con BSA o AGEs-BSA + Metformina.

(A)



(B)



BSA

AGEs

AGEs+METF

**Figura III 6** Efecto de la Metformina y los AGEs sobre la expresión de RAGE evaluada por inmunofluorescencia indirecta. Las células MC3T3E1 (A) y UMR 106 (B) se cultivaron sobre cubreobjetos en platos multipocillos en DMEM libre de suero con el agregado de 200 µg/ml de BSA o AGEs-BSA con o sin Metformina 500 µM por 48 horas. Luego las células se fijaron e incubaron con el primer anticuerpo anti-RAGE seguido del segundo anticuerpo conjugado con FITC. Posteriormente las células se examinaron con un microscopio de fluorescencia (Objetivo 100X)

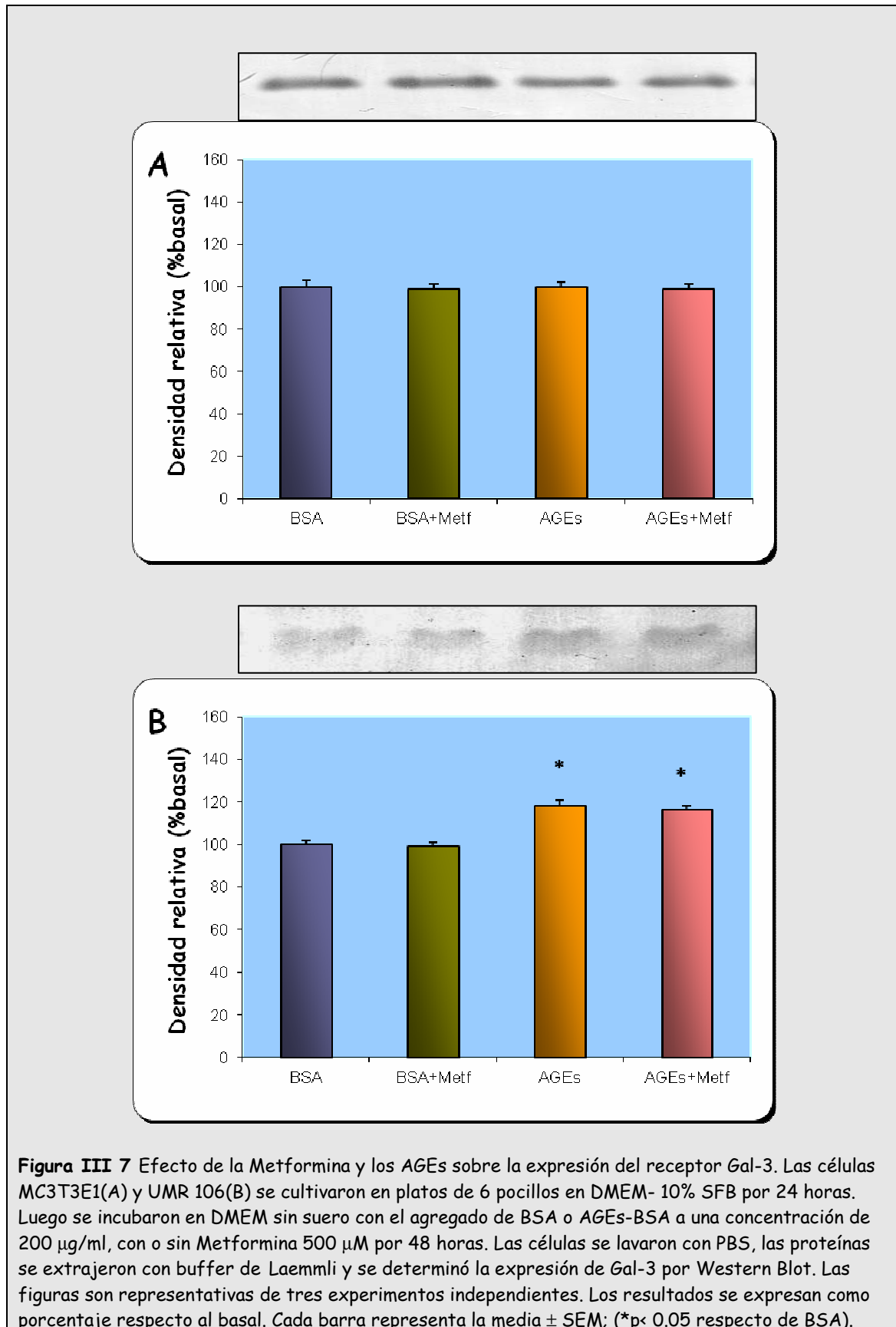
Estas observaciones aportan más evidencia aún a la idea de que la Metformina previene la regulación positiva de RAGE inducida por el tratamiento con AGEs.

### III 1.6 Efecto de AGEs y Metformina sobre la expresión del receptor Galectina -3

Se estudió la expresión del receptor Galectina- 3 (Gal-3) por

medio de la técnica de Western Blot, usando anticuerpos específicos anti-Gal-3. La figura III 7 muestra que la incubación con AGEs- BSA (200 $\mu$ g/ml) durante 48 hs. en el caso de las células MC3T3E1 no tuvo efecto sobre la expresión del

receptor Gal-3; mientras que dicha incubación sobre las células UMR 106 aumentó la expresión de la proteína Gal-3. Al co-incubar con AGEs y Metformina 500 $\mu$ M no se observó una reversión de la regulación positiva de los receptores inducida por los AGEs.

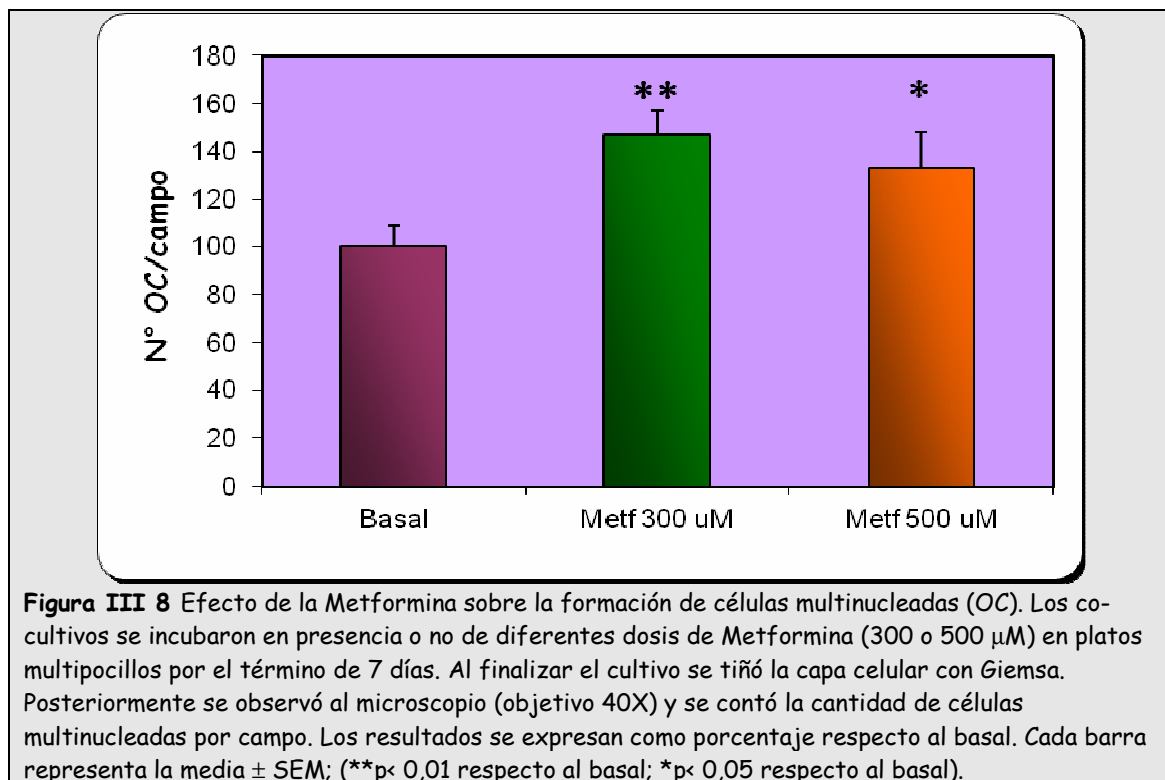


### III 2 Resultados *In Vitro* sobre Osteoclastos (OC)

#### III 2.1 Efecto de la Metformina sobre la cantidad de células multinucleadas

Para realizar estos ensayos se co-cultivaron las células macrofágicas Raw 264.7 con los osteoblastos UMR 106 en DMEM-5% SFB en platos

multipocillos, con o sin el agregado de Metformina (300 o 500  $\mu\text{M}$ ) por el término de 7 días. Una vez finalizado el cultivo la monocapa celular se fijó y coloreó con Giemsa para observar al microscopio y así poder contar el número de células multinucleadas desarrolladas. Se contaron células con 3 o más núcleos en 50 campos por condición a un aumento total de 400X.



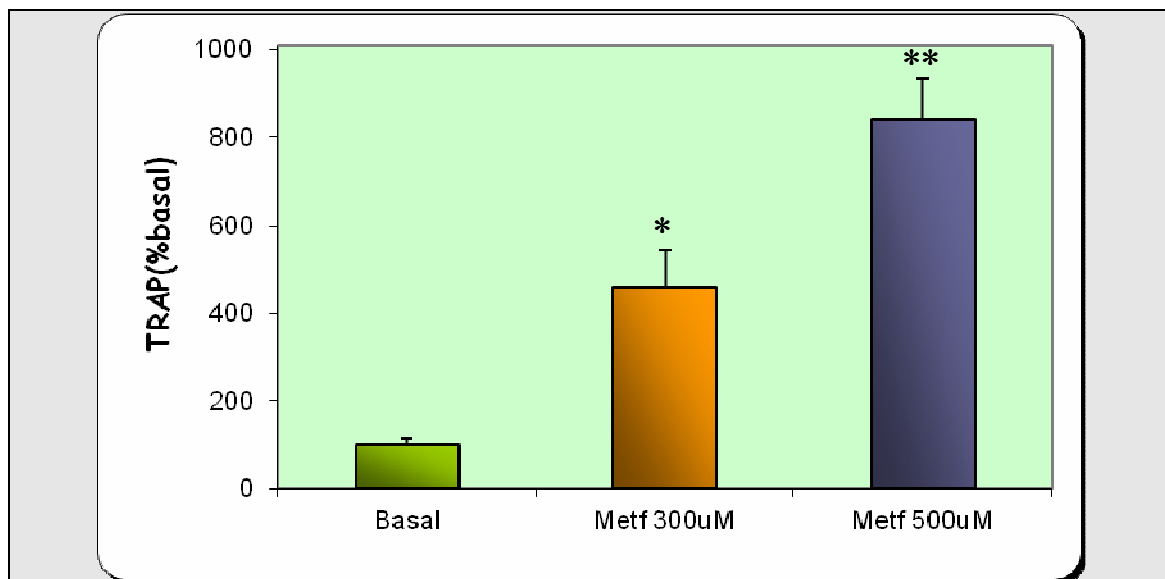
En presencia de Metformina, la cantidad de células multinucleadas se incrementó significativamente (figura III 8) respecto a la condición basal.

No se observó un efecto dosis-dependiente de la Metformina sobre el efecto estudiado.

### III 2.2 Efecto de la Metformina sobre la diferenciación osteoclástica

Con la finalidad de estudiar el efecto de la Metformina sobre la diferenciación osteoclástica se evaluó la actividad de la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).

Las células Raw 264.7 se co-cultivaron con las UMR 106 en DMEM-5% SFB con o sin el agregado de Metformina (300 o 500  $\mu\text{M}$ ) en platos multipocillos por el término de 7 días. Finalizado el cultivo, se determinó la actividad TRAP por medio de un ensayo colorimétrico.

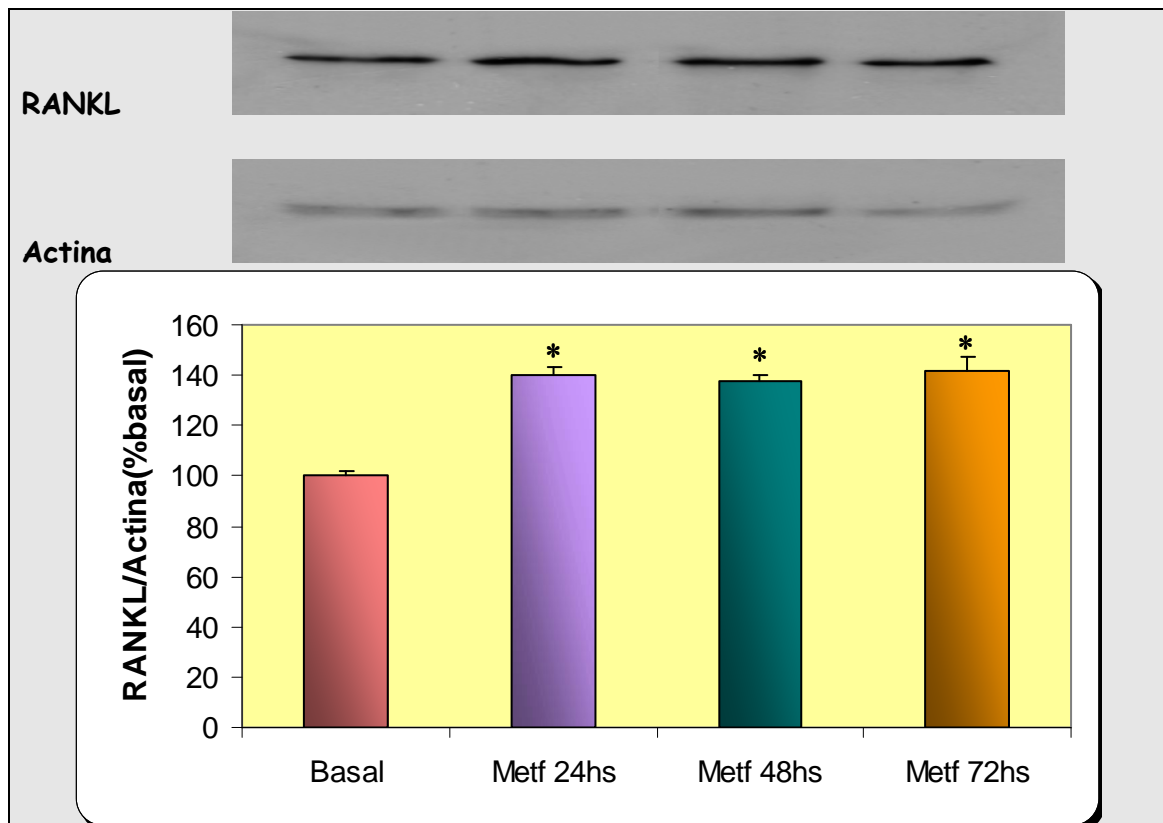


**Figura III 9** Efecto de la Metformina sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP). Las células Raw 264.7 se co-cultivaron con las células UMR 106 con o sin el agregado de diferentes dosis de Metformina (300 o 500  $\mu\text{M}$ ) en platos multipocillos por el término de 7 días. Al finalizar el cultivo, se realizó un extracto celular, lisando la monocapa celular con Triton X-100 al 0,1%. Luego se determinó la actividad TRAP y se la expresó como porcentaje respecto al basal. Cada barra representa la media  $\pm$  el valor de SEM. (\* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$  respecto al basal).

En la figura III 9 se puede observar que la Metformina induce un aumento estadísticamente significativo en la actividad TRAP respecto a la condición basal, y que este aumento es dependiente de la dosis.

### III 2.3 Efecto de la Metformina sobre la expresión de RANKL en los osteoblastos UMR 106

Este estudio se realizó por medio de la técnica de Western Blot, usando anticuerpos específicos anti-RANKL. Se utilizaron anticuerpos anti-actina con la finalidad de normalizar el valor de RANKL obtenido.



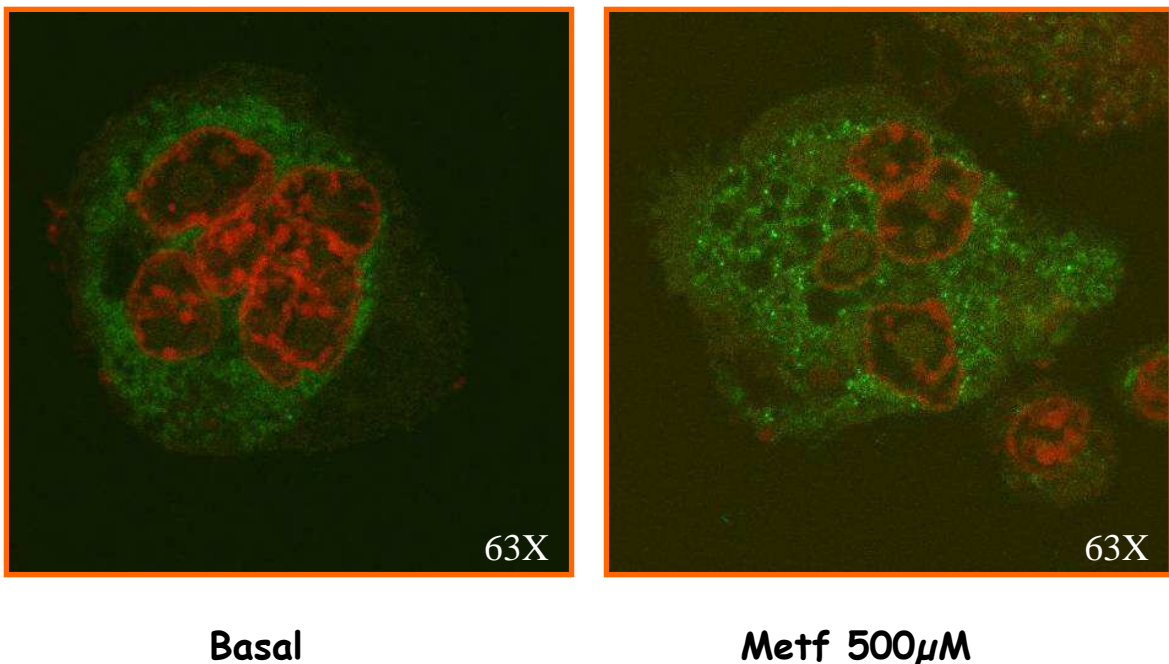
**Figura III 10** Efecto de la Metformina sobre la expresión de la proteína RANKL en los osteoblastos UMR 106. Se cultivaron las células UMR 106 en platos de 6 pocillos en DMEM-10% SFB por 24 horas. Luego se incubaron en DMEM sin suero con el agregado o no de Metformina 300  $\mu$ M por diferentes períodos de tiempo (24, 48 y 72 hs). Las células se lavaron con PBS, las proteínas se extrajeron con buffer de Laemmli y se determinó la expresión de RANKL y actina por Western Blot. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al basal. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM; (\* $p$  < 0,01 respecto al basal).

El tratamiento de los osteoblastos con Metformina 300  $\mu$ M provocó un aumento en la expresión de RANKL luego de 24 hs de incubación con la droga. Dicho aumento se sostuvo a lo largo del tiempo estudiado (figura III 10).

#### III 2.4 Evaluación del efecto de la Metformina sobre la fosforilación de la enzima AMPK (p-AMPK)

Se estudió la fosforilación y distribución sub-celular de la enzima AMPK en los co-cultivos, con el fin de dilucidar los mecanismos de acción involucrados en los efectos que la metformina causa sobre la diferenciación osteoclástica. Es conocido que la metformina activa a la enzima AMPK fosforilándola. Este fenómeno se estudió por inmunofluorescencia indirecta con un microscopio confocal.





**Figura III 11** Efecto de la Metformina sobre la expresión y distribución sub-celular de p-AMPK en células multinucleadas. Las células Raw 264.7 se co-cultivaron con las células UMR 106 con o sin el agregado de Metformina 500  $\mu$ M en platos multipocillos por el término de 7 días. Luego las células se fijaron e incubaron con el primer anticuerpo anti-p-AMPK seguido del segundo anticuerpo conjugado con FITC. Posteriormente las células se examinaron con un microscopio confocal (Objetivo 63X)

En la condición basal, se observó la fluorescencia asociada a p-AMPK principalmente en el citoplasma de células multinucleadas, con una distribución homogénea y con una intensidad leve (figura III 11). Con el agregado de Metformina la fluorescencia se observó con mayor

intensidad en el citoplasma que en el núcleo y en esta localización presentó una distribución puntillada. Ya sea en el núcleo o en el citoplasma, la intensidad de fluorescencia fue mayor cuando los co-cultivos se realizaron con el agregado de Metformina.

### III 3 Resultados *In Vivo*

#### III 3.1 Efecto de la Metformina sobre la reparación ósea en ratas diabéticas y no diabéticas

Se utilizó un modelo de reosificación ósea para evaluar el efecto de la administración oral *in vivo* de Metformina sobre la regeneración del tejido óseo. Para ello, se realizó un defecto mínimo circular en el hueso parietal de cada rata (descrito en materiales y métodos), y luego de 15 días se sacrificaron los animales para evaluar el grado de reparación ósea.

Para realizar los experimentos se utilizaron ratas controles (no diabéticas) y ratas con Diabetes

inducida con estreptozotocina (D). El estado metabólico de los animales se evaluó mediante parámetros bioquímicos (tabla III 3). Al momento del sacrificio, los animales diabéticos (tratados o no con Metformina, [M]) mostraron una disminución en su peso corporal del 15%. Los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas, de los grupos D y DM fueron significativamente mayores que los controles. Además de estos parámetros, los animales diabéticos presentaron niveles de triglicéridos y colesterol elevados comparados con los controles no diabéticos y con los animales (diabéticos o no) tratados con Metformina.

**Tabla III 3:** Perfil plasmático y peso de ratas no diabéticas y diabéticas, luego de 15 días de tratamiento o no con Metformina 100 mg/kg/día.

Grupo	Peso (grs.)	Glucosa (mg/dL.)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
Control	190±9	110±10	43±4	45±4
Control+Metformina	187±6	103±5	36±1	37±3
Diabética	160±7*	257±30*	59±2*.#	62±5*.#
Diabética+Metformina	155±8*.#	213±23*.#	35±3	48±4

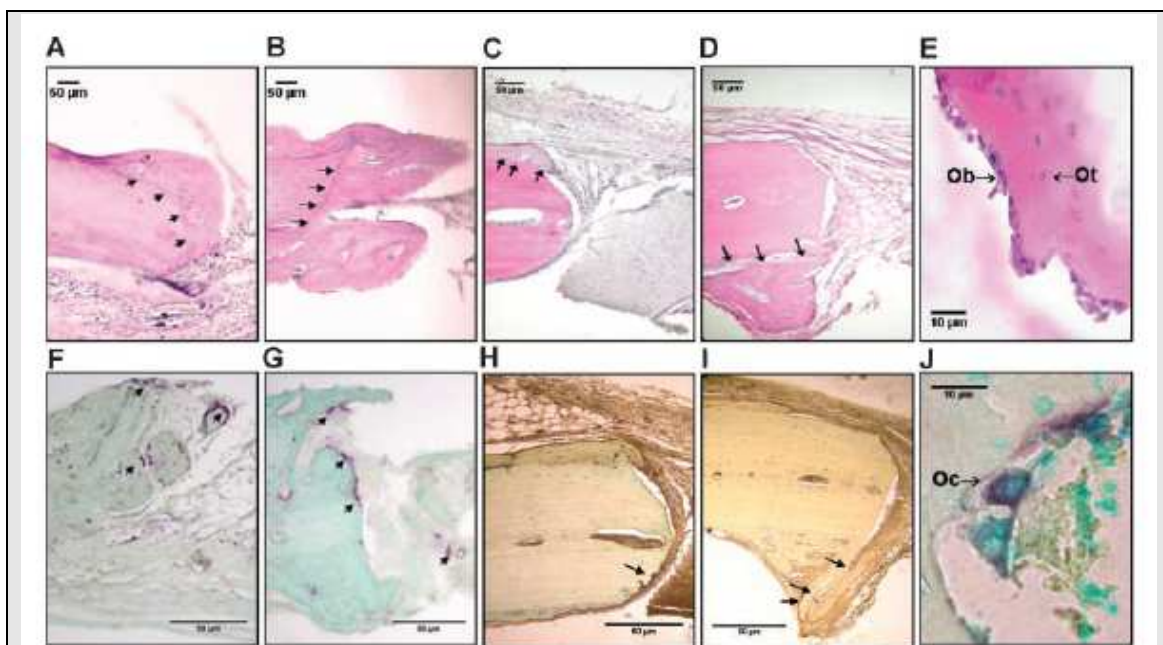
Los valores se expresan como la media ± SEM, n= 10 por grupo.

\*p< 0.05 vs. Grupo C;

#p< 0.05 vs. Grupo C+M

Los huesos parietales se disecaron, descalcificaron, incluyeron en parafina, y se obtuvieron secciones de 5µm de espesor con un micrótopo. Las secciones de tejido óseo se tiñeron con hematoxilina y eosina con la finalidad de analizar histomorfométricamente los siguientes parámetros: proporción de

hueso reosificado (figuras III 12 A-D), densidad de osteocitos en el tejido óseo reosificado (ver figura III 12 E). Además, se realizó la tinción histoquímica de TRAP para cuantificar la actividad osteoclástica en el hueso reosificado (ver figuras III 12 F-J).



**Figura III 12** Reparación de hueso en un modelo de reosificación post-lesión mínima. Se realizó bajo anestesia un defecto circular de 1 mm en el hueso parietal de ratas controles no diabéticas (A, F), ratas no diabéticas tratadas con Metformina oral (100mg/kg/día) (B, G), ratas con Diabetes por estreptozotocina (C, H) o ratas diabéticas tratadas con Metformina (D, I). Luego de 15 días, todos los animales se sacrificaron, se disecaron los huesos parietales y se examinaron por medio de procedimientos histológicos (Hematoxilina -Eosina, paneles A-E) e histoquímicas (actividad TRAP, paneles F-J). Se evaluó la formación de hueso nuevo (flechas), como así también la densidad de osteocitos (Ot, panel E), osteoblastos (Ob, panel E) y osteoclastos (Oc, panel J). Los paneles E y J (ratas controles) son imágenes representativas de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

El análisis histomorfométrico del hueso reosificado se muestra en la tabla III 4. En las ratas diabéticas se observó una disminución en el espesor y área reosificada, así como

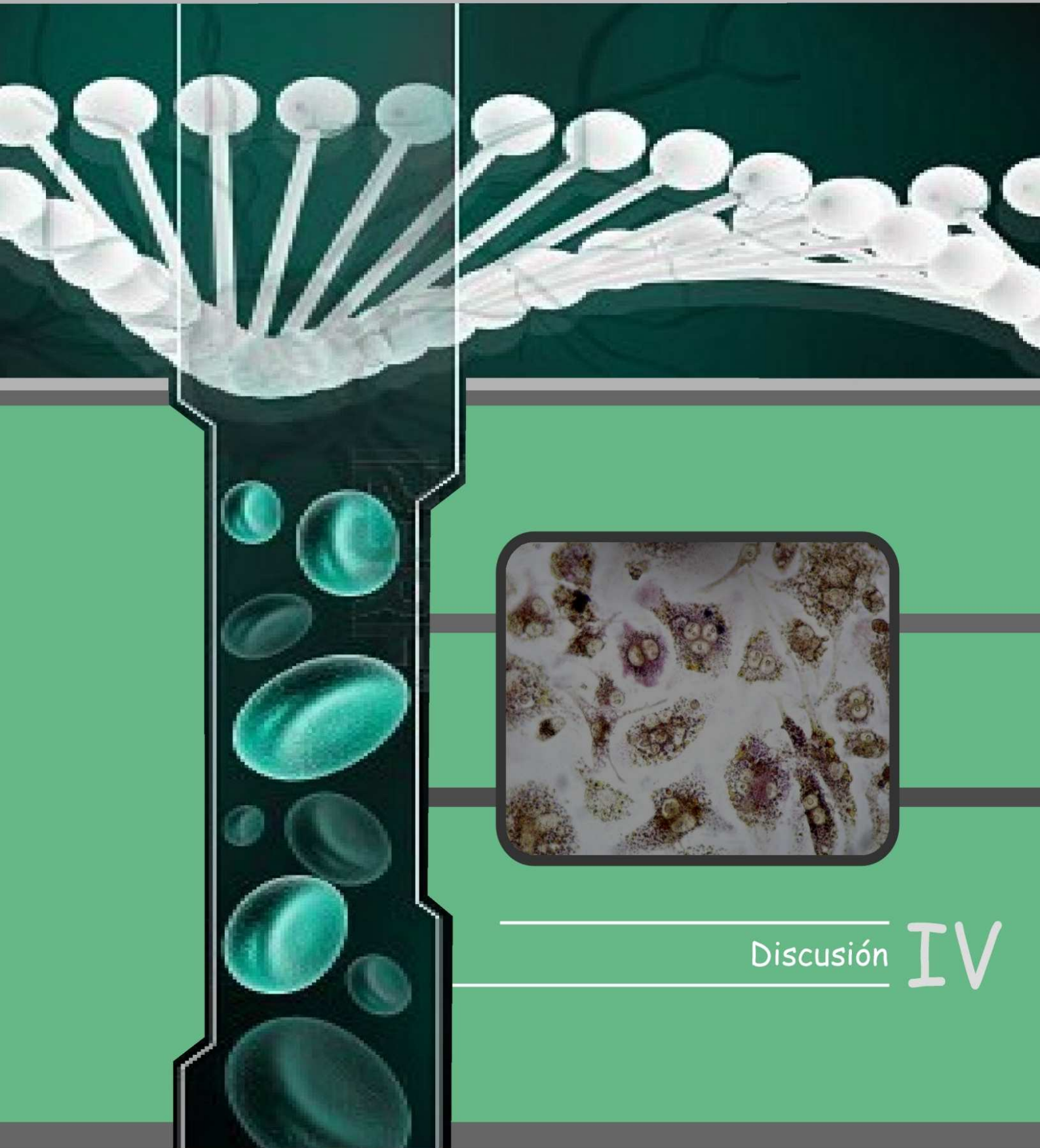
en la densidad de osteocitos y osteoblastos, cuando se lo comparó con ratas no diabéticas.

El tratamiento con Metformina indujo un aumento significativo en el

espesor y área del hueso reosificado tanto en ratas control como en ratas diabéticas, sin afectar la densidad de osteocitos y osteoblastos. Es interesante observar que la actividad

TRAP en las ratas controles no diabéticas después de 15 días de tratamiento con Metformina, aumentó 3,8 veces respecto del control.

	Control	Control+Metformina	Diabéticas	Diabéticas+Metformina
<b>Tabla III 4</b> Análisis cuantitativo histomorfométrico de secciones de la lesión de los huesos parietales. Las secciones de hueso se descalcificaron y se tiñeron con H-E o TRAP (para osteoclastos) y se cuantificaron con el programa Image J.				
<b>Espesor reosificado/ espesor parietal (%)</b>	30±1	46±3*	19±1* <sup>#</sup>	43±4* <sup>#°</sup>
<b>Área reosificada/ espesor parietal (mm)</b>	69±9	143±11*	16±4* <sup>#</sup>	160±10* <sup>°</sup>
<b>Número de osteocitos/ área reosificada (mm<sup>-2</sup>)</b>	2440±194	2943±226	993±132* <sup>#</sup>	854±103* <sup>#</sup>
<b>Número de osteoblastos/ longitud reosificada (mm<sup>-1</sup>)</b>	145±11	156±16	60±6* <sup>#</sup>	49±9* <sup>#</sup>
<b>Área TRAP/ área reosificada (%)</b>	2,3±0,4	8,8±1,7*	2,9±0,1 <sup>#</sup>	2,4±0,9 <sup>#</sup>
Los valores se expresan como la media ± SEM				
*p<0.05 vs. Grupo C;				
<sup>#</sup> p<0.05 vs. Grupo C+M;				
<sup>°</sup> p<0.05 vs. Grupo D.				



Discusión **IV**

Desde hace varios años es conocida la relación existente entre Diabetes y enfermedad ósea con el consecuente aumento del riesgo de fracturas en los pacientes diabéticos (Schwartz 2003).

Mientras que en la Diabetes mellitus tipo 1 se observa una disminución en la densidad mineral ósea (DMO), en la Diabetes mellitus tipo 2 se ha reportado la existencia de un aumento moderado en la DMO en algunos pacientes, siendo normal en otros (Räkel 2008).

A pesar de las discrepancias en la DMO, los estudios clínicos apoyan la idea que sostiene que tanto la formación de hueso nuevo, como la microarquitectura y por ende la calidad ósea esta alterada en ambos tipos de Diabetes.

La patología diabética aumenta el riesgo de fracturas, esto se da por factores que dependen directamente del esqueleto óseo (alteración de la calidad ósea) y por factores independientes del tejido óseo (riesgo aumentado de caídas debido a la alteración de la visión o por episodios de hipoglucemia).

Uno de los posibles factores que altera la calidad ósea en la Diabetes es la presencia de AGEs. Los AGEs se acumulan con la edad, pero se encuentran incrementados en esta patología. Las moléculas de colágeno en el hueso tienen una vida media larga, haciéndolas susceptibles a la modificación por AGEs, por lo que la generación y acumulación de AGEs en el hueso puede ser la razón del deterioro de la calidad ósea (aumento de rigidez). Esta acumulación de AGEs en el hueso afecta también la proliferación celular en gran medida.

Odetti P y colaboradores (2005) evaluaron la concentración de pentosidina en hueso cortical y trabecular en individuos no diabéticos y encontraron que existe un aumento de pentosidina con la edad y que dicho aumento se correlaciona negativamente con la densidad ósea y la mineralización del hueso.

Alikhani M y colaboradores (2006) demostraron que las proteínas modificadas por AGEs inducen apoptosis en osteoblastos. Por otro lado, Kume S y colaboradores (2005)

encontraron un efecto similar sobre células madres mesenquimales.

Nuestro grupo demostró que los AGEs inhiben el crecimiento de células osteoblásticas en cultivo, (McCarthy 1997, McCarthy 2001a), como así también alteran la diferenciación de los osteoblastos, reduciendo la síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I. Estos efectos podrían estar mediados a través de la activación de receptores para AGEs, como RAGE y galectina-3 (Cortizo 2003, McCarthy 1999, Mercer 2007).

Si bien es conocido y claro el efecto de los AGEs sobre los osteoblastos, no ocurre lo mismo con el efecto de los AGEs sobre los osteoclastos, ya que existen controversias al respecto. Por un lado Miyata T y colaboradores (1997) encontraron un aumento en la actividad de los osteoclastos en presencia de AGEs. En contraposición Valcourt U y colaboradores (2007) demostraron que el proceso de resorción es inhibido en presencia de AGEs, efecto que probablemente refleje una disminución de la

solubilidad de las moléculas de colágeno glicadas.

No es posible asociar la acumulación de AGEs con la tasa de recambio óseo, ya que Saito y Marumo (2010) demostraron que el aumento de AGEs en el hueso se produce tanto en situaciones de bajo recambio óseo (ejemplo: Diabetes) como de elevado recambio óseo (ejemplo: osteoporosis).

La Metformina es una droga insulino-sensibilizante ampliamente utilizada para el tratamiento de la Diabetes y síndrome metabólico entre otras patologías. A nivel clínico, el tratamiento con esta droga se asocia con una disminución en el riesgo de fracturas (Vestergaard 2005).

En nuestro grupo se estudió el efecto de la Metformina sobre osteoblastos en cultivo y se demostró que este agente aumenta la proliferación celular y promueve la diferenciación, incrementando también la formación de nódulos de mineralización (Cortizo 2006).

En base a los efectos que inducen los AGEs sobre el hueso y al efecto protector que confiere la

Metformina es que surge la hipótesis del presente trabajo de tesis, que propone estudiar el posible efecto bloqueador o preventivo de la Metformina sobre los efectos deletéreos de los AGEs en el metabolismo óseo.

Como parte de los estudios *in vitro* sobre osteoblastos nos propusimos evaluar el efecto de los AGEs y la Metformina sobre la actina que es la proteína base de los microfilamentos que forman parte del citoesqueleto. Los elementos del citoesqueleto son importantes para la morfología celular, la transducción de señales, la movilidad, el transporte intracelular y la diferenciación. Están compuestos por microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios.

En el presente trabajo, se estudió en las células UMR 106, la distribución de las fibras de actina por inmunofluorescencia en diferentes condiciones de cultivo. Al incubar las células con BSA se observó una clara distribución de la actina polimerizada formando fibras de estrés, mientras que en presencia

de AGEs, la actina se encontró desorganizada, perdiendo su patrón de distribución normal. Al co-incubar con Metformina, se recuperó la organización de las fibras de actina, adquiriendo un aspecto similar a la condición basal.

Las fibras de estrés le permiten a la célula anclarse al sustrato mediante diferenciaciones típicas llamadas adhesiones focales. Al perderse el patrón de distribución normal de la actina, las células pierden la adhesión al sustrato, se despegan y mueren por falta de adhesión.

Previamente en nuestro grupo, Mc Carthy A y colaboradores (2004) demostraron que la acumulación de AGEs sobre una matriz de colágeno tipo I, inhibe la adhesión de osteoblastos mediada por integrinas. Por otro lado, Howard E y colaboradores (1996) demostraron que el entrecruzamiento de las fibrillas de colágeno producido por la glicosilación no enzimática provoca cambios en las propiedades físicas de la matriz extracelular que alteran a las células modificando la



organización del citoesqueleto de actina.

Se sabe también que los AGEs afectan la permeabilidad de células endoteliales dado que inducen la activación de la proteína Rho. El receptor RAGE y la proteína Rho forman un complejo que induce la formación de gap intercelulares, y reorganización de las fibras de estrés de actina (Hirose 2010).

La proteína Rho pertenece a la familia de pequeñas proteínas de unión a GTP y actúa controlando una gran variedad de vías de transducción de señal, muchas de las cuales regulan el remodelado del citoesqueleto de actina en diversos tipos celulares.

No solo es afectada la organización de las fibras de actina por la activación de Rho, sino que los AGEs modifican también la red de actina mediante la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (ERK y p38) (Guo 2006).

Si bien no hay nada descripto acerca de la acción que ejerce la Metformina sobre las fibras de actina, sí se conoce el papel que juega sobre la proteína tau. La proteína tau

está asociada a los microtúbulos del citoesqueleto neuronal y su hiperfosforilación provoca su desestabilización y la alteración del transporte axonal. La hiperfosforilación de la proteína tau es un proceso anómalo presente en varias enfermedades neurodegenerativas denominadas en su conjunto tauopatías, tales como la enfermedad de Alzheimer.

Kickstein E y colaboradores (2010) demostraron que la Metformina interfiere directamente con la actividad de la enzima PP2A fosfatasa, inhibiendo su degradación e impidiendo así la hiperfosforilación de la proteína tau. La regulación de proteínas RhoA y/o proteínas quinasas asociadas a Rho (ROCK) por acción de la metformina podría estar afectando la organización del citoesqueleto de actina (Kim 2012). Son necesarios estudios más profundos sobre esta posible acción de la metformina en las células óseas.

También decidimos estudiar el efecto *in vitro* de los AGEs y la Metformina sobre la diferenciación osteoblástica evaluando la expresión

del marcador específico fosfatasa alcalina (ALP). Luego de 72 hs. de incubación los AGEs inhibieron la expresión de ALP tanto en las células MC3T3E1 como en las UMR 106, aunque se necesitaron dosis más altas de AGEs para inducir un efecto significativo en el caso de los osteoblastos no transformados MC3T3E1. Esta diferencia de sensibilidad refleja probablemente la diferencia que existe en la expresión de ALP por parte de las células osteoblásticas transformadas versus las no transformadas, ya que las células UMR 106 tienen una expresión basal alta de ALP. No obstante, la Metformina fue capaz de suprimir el efecto de los AGEs sobre la ALP en ambos tipos celulares. Nuestro grupo también demostró previamente que la Metformina no afecta la actividad de ALP en las células UMR 106 pero estimula a este marcador luego de 24 hs. de incubación en las células MC3T3E1 diferenciadas (Cortizo 2006). Jang W y colaboradores (2011) reportaron que la Metformina incrementa significativamente la expresión de genes osteogénicos

como el gen que codifica para la fosfatasa alcalina y esto lo hace mediante la activación de Runx2 vía fosforilación de la enzima AMPK en células MC3T3E1.

En conjunto, el efecto neto observado fue la reversión de la actividad de ALP a niveles basales, por la Metformina en ambas líneas celulares.

Al analizar el efecto de los AGEs sobre la muerte celular encontramos que los AGEs aumentan la muerte celular en osteoblastos por mecanismos tanto de apoptosis como de necrosis. Por otro lado, al evaluar la expresión de caspasa-3 confirmamos que los mecanismos de muerte celular evaluados involucran la activación de dicha enzima. Frank S y colaboradores (2011) reportaron resultados similares: estos autores demostraron que en presencia de AGEs se produce un aumento en la cantidad de osteoblastos humanos necróticos, no obstante en este trabajo no encontraron alteraciones en la apoptosis celular.

En presencia de Metformina la apoptosis y necrosis inducida por los

AGEs fue prevenida, estos resultados concuerdan con un reporte previo realizado por nuestro grupo, en el cual Cortizo (2006) encontró que utilizando 500  $\mu\text{M}$  de Metformina se estimula la proliferación osteoblástica sin inducir muerte celular.

En base a los efectos deletéreos ocasionados por los AGEs sobre las células óseas nos propusimos evaluar la expresión de especies de oxígeno reactivas (ROS), dado que tanto nuestro grupo como otros investigadores demostraron previamente que los AGEs inducen eventos celulares asociados con el estrés oxidativo y la generación de ROS intracelulares. Sería así plausible asociar la alteración que encontramos en las fibras de actina en presencia de AGEs, con un aumento en la producción de ROS.

La actina se encuentra en forma abundante en las células, haciéndola un sustrato blanco para la oxidación por parte de los ROS, alterando la organización de los microfilamentos, con la consecuente falla en la polimerización (Lassing

2007). También los efectos sobre la diferenciación y muerte celular se pueden relacionar con el estrés oxidativo. Se ha confirmado mediante estudios *in vitro* que el estrés oxidativo inhibe la diferenciación osteoblástica e induce apoptosis en los osteoblastos (Hamada 2009).

Para evaluar el estrés oxidativo realizamos el ensayo de DHR que mide la generación de ROS intracelulares. Encontramos que en las células UMR 106 se produjo un aumento de la producción de ROS en presencia de AGEs, estos resultados indican que los AGEs inducen un aumento del estrés oxidativo. La co-incubación con Metformina previno las alteraciones en el estrés oxidativo inducido por los AGEs.

Así el aumento en la producción de ROS podría estar asociado con los efectos nocivos de los AGEs sobre la disposición de las fibras de actina, la diferenciación y muerte celular en los osteoblastos. La reversión de dichos efectos en presencia de Metformina se correlaciona con la prevención que

ejerce la Metformina sobre el estrés oxidativo inducido por AGEs.

Los AGEs se unen específicamente a receptores como RAGE y galectina-3 (Bierhaus 2005, Bierhaus 2006). Existe evidencia considerable que sugiere que la unión de los AGEs a su receptor RAGE es disparadora de varios de los efectos deletéreos de los AGEs (Kaji 2003, Mukherjee 2005). La interacción AGEs-RAGE puede inducir la activación de la MAPK, la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, y la subsecuente inducción de genes de respuesta a NF- $\kappa$ B específicos de cada tipo celular (Haslbeck 2005).

Ouslimani N y colaboradores (2007) demostraron que la Metformina ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de RAGE en células endoteliales.

Basándonos en estas evidencias, en estudios previos realizados en nuestro grupo sobre células osteoblásticas, se demostró que los AGEs regulan de forma positiva la expresión de RAGE y galectina-3 (para el receptor

galectina-3 se observó un aumento en la expresión tanto a nivel de la proteína como del correspondiente RNA mensajero) (Cortizo 2003, Mercer 2004, Mercer 2007). En base a las observaciones sobre la habilidad que tiene la Metformina para prevenir los efectos de los AGEs sobre los osteoblastos, surgió la hipótesis de que la Metformina podría reducir los efectos deletéreos de los AGEs regulando la expresión de sus receptores.

Los resultados expuestos en el presente trabajo indican que el tratamiento de los osteoblastos con AGEs incrementa la expresión de la proteína RAGE (evaluada por técnicas de Western Blot e inmunofluorescencia). Esta modulación del RAGE se debe probablemente a cambios en su expresión génica, dado que el promotor de RAGE posee un elemento de respuesta a NF- $\kappa$ B, y ha sido demostrado que es regulado positivamente por los AGEs y otros agentes como TNF- $\alpha$  (Marx 2004, Tanaka 2000) en varios tipos celulares. La Metformina es capaz de

prevenir esta regulación positiva, confirmando la hipótesis de que dicha droga podría reducir los efectos nocivos de los AGEs sobre los osteoblastos a través de este mecanismo.

Al estudiar el efecto sobre galectina-3 encontramos que la Metformina no pudo bloquear la regulación positiva de galectina-3 inducida por los AGEs ni en las células MC3T3E1, ni en las UMR 106. Estos resultados sugieren que este receptor no participa en el efecto protector de la Metformina sobre los osteoblastos expuestos a AGEs.

Respecto a los efectos de los AGEs y la Metformina sobre los osteoblastos *in vitro*, se concluye que la Metformina es capaz de prevenir las alteraciones en las fibras de estrés, la inhibición de la diferenciación, el incremento en la apoptosis, producción de caspasas-3 y el aumento del estrés oxidativo intracelular, inducidas por los AGEs. De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo de tesis, uno de los mecanismos por medio del cual la Metformina ejerce su efecto,

es la modulación de la interacción AGEs-RAGE en el crecimiento y diferenciación de osteoblastos.

Tal como se ha discutido hasta ahora, nuestro grupo ha demostrado, y otros autores han corroborado, los diversos efectos osteogénicos que ejerce la Metformina sobre los osteoblastos (Cortizo 2006, Kanazawa 2008, Bak 2010), pero hay relativamente pocos estudios hechos sobre la acción que ejerce esta droga sobre los osteoclastos.

Para poder analizar el efecto de la Metformina sobre los osteoclastos, se utilizó un método de obtención de osteoclastos que consiste en realizar co-cultivos de la línea monocítica-macrofágica Raw 264.7 con la línea osteoblástica UMR 106. En este modelo de generación de osteoclastos, las células Raw 264.7, que expresan el receptor RANK, tienen la capacidad de diferenciarse a células del linaje osteoclástico en presencia de RANKL, y la fuente de RANKL proviene de las células osteoblásticas UMR 106.

Lo que observamos acerca del efecto directo de la Metformina

sobre los osteoclastos fue que esta droga indujo un aumento en el número de osteoclastos, incrementando también la actividad de la enzima TRAP.

Nuestros resultados se contraponen con los encontrados por Lee YS y colaboradores (2010). Estos autores encontraron que el número de células multinucleadas TRAP positivas se redujo en presencia de Metformina, utilizando un modelo de osteoclastos obtenidos a partir de células madre de tibia y fémur, en las cuales se indujo la osteoclastogénesis por agregado de M-CSF y RANKL solubles. Mai QG y colaboradores (2011) también encontraron una disminución en el número de osteoclastos en presencia de Metformina, en un modelo de co-cultivo en el cual osteoblastos obtenidos de calvaria de ratón se crecieron en presencia de Metformina y Vitamina D3, y el sobrenadante de estos cultivos fue agregado a las células Raw 264.7 para inducir su diferenciación osteoclástica.

Es probable que esta diferencia encontrada en cuanto a los efectos de la Metformina sobre los osteoclastos se deba a la diferencia en los modelos de osteoclastos utilizados.

Nos propusimos evaluar la expresión de la molécula RANKL en las células osteoblásticas UMR 106 dado que para que se produzca la diferenciación y maduración de los osteoclastos es indispensable la interacción del receptor RANK, presente en las células pre-osteoclasticas y la molécula RANKL, expresada por los osteoblastos. Al analizar la expresión de esta proteína por Western-Blot encontramos que se produjo un aumento en la expresión de RANKL en presencia de Metformina a las 24 hs de incubación, efecto que se sostuvo a lo largo del tiempo estudiado. Sin embargo Mai QG y colaboradores (2011) encontraron que la expresión de RANKL en osteoblastos primarios disminuyó en presencia de Metformina. Es posible que la diferencia respecto a la expresión por parte de los osteoblastos de

RANKL en presencia de Metformina radica en que nosotros utilizamos células de una línea celular clonada, mientras que estos autores usaron osteoblastos primarios obtenidos a partir de calvaria de ratón.

Otros autores y nuestro grupo han demostrado que la activación (fosforilación) de la enzima AMPK es un mecanismo de acción relevante de la Metformina sobre las células óseas (Jang 2011, Kanazawa 2008, Shah 2010, Sedlinsky et al 2011). En particular Jang y colaboradores, encontraron que la Metformina puede estimular la diferenciación de los osteoblastos MC3T3E1 a través de la activación de Runx2, vía una cascada regulatoria que involucra AMPK. Por esto nos propusimos evaluar la expresión de la enzima p-AMPK en los co-cultivos. Se encontró que en presencia de Metformina aumenta la expresión de p-AMPK, y se produce un cambio en su distribución, evaluada por inmunofluorescencia. Lee YS y colaboradores (2010) también encontraron un aumento en los niveles de p-AMPK en los cultivos de osteoclastos en presencia de

Metformina. Este resultado de la Metformina sobre la enzima p-AMPK en los osteoclastos podría estar indicando que los efectos de la droga sobre los mismos estaría mediada por activación de la AMPK.

En resumen, en nuestro modelo de co-cultivo la Metformina causa un aumento *in vitro* tanto en la cantidad de osteoclastos como en la actividad de la enzima TRAP expresada por los mismos. Este incremento podría deberse a la mayor cantidad de RANKL expresada por los osteoblastos en presencia de la droga, ya que al unirse este factor a su receptor RANK presente en los precursores osteoclásticos, se induce la formación y se promueve la diferenciación de los osteoclastos (Schoppet 2002).

Según nuestros resultados, podríamos sugerir que uno de los mecanismos por medio del cual la Metformina ejerce su efecto, es a través del aumento en la expresión y el cambio en la distribución celular de la enzima p-AMPK.

Por último analizaremos los resultados obtenidos *in vivo* sobre la

reparación de lesiones óseas en ratas diabéticas que tomaron Metformina en el agua de bebida. Como modelo de lesión ósea se realizó un defecto circular en el hueso parietal (Santana 2003). La Diabetes fue inducida mediante inyección de estreptozotocina, que provoca la destrucción total de las células beta pancreáticas. Tomasek J y colaboradores (1994) usando el mismo modelo de inducción de Diabetes, demostraron que el entrecruzamiento no enzimático de las moléculas de colágeno, como resultado de la formación de AGEs, se encontraba incrementado en el hueso cortical de las ratas diabéticas.

Utilizando un modelo de inducción de Diabetes generado por administración de alloxano se comprobó que la fluorescencia asociada a AGEs estaba aumentada en tendones y aortas de ratas diabéticas (Yamamoto 1981). El alloxano genera Diabetes por un mecanismo similar al de la estreptozotocina.

En base a lo descripto por estos autores, es razonable considerar que los huesos de las ratas

diabéticas en nuestro modelo están expuestos a elevadas concentraciones de AGEs.

Al evaluar el grado de reparación ósea vimos que hubo una disminución en el mismo en las ratas diabéticas respecto a las no diabéticas. Estos resultados concuerdan con reportes previos realizados por Santana Y y colaboradores (Santana 2003) en los que encontraron que el grado de reparación de la lesión ósea se redujo un 40% respecto a los animales no diabéticos. Diniz S y colaboradores (2008) demostraron que existe una menor cantidad de cartílago y mayor acumulación de fibras de tejido conectivo en la zona fracturada, en un modelo de lesión ósea realizada en tibias de ratas diabéticas comparadas con las controles, lo que provoca un retraso en la consolidación de la fractura. Waddington R y colaboradores (2011) confirmaron que existe un retraso en la reparación ósea de ratas diabéticas a las cuales se les colocó un implante en la mandíbula, también demostraron un ligero aumento de marcadores de



estrés oxidativo en la zona del implante.

En nuestros estudios *in vivo* observamos también una disminución en el número de osteoblastos en el sitio de la lesión en las ratas diabéticas. Tanto la disminución en la reparación del hueso como la alteración en el número de osteoblastos puede deberse a la acumulación de AGEs en el hueso de los animales diabéticos. La calidad ósea se encuentra alterada en animales diabéticos producto de una disminución de los enlaces entrecruzados de colágeno formados enzimáticamente y el incremento en los enlaces entrecruzados por AGEs (Saito 2006a).

Cuando estudiamos la reparación ósea en el sitio de la lesión, en ratas tanto diabéticas como no diabéticas que recibieron Metformina, observamos que la droga causó un incremento de la misma. Estos resultados, así como estudios previos realizados en nuestro grupo sobre células osteoblásticas (Cortizo 2006) sugieren fuertemente que la Metformina tiene un efecto

osteogénico directo sobre las células óseas.

Recientemente en nuestro grupo se estudió la capacidad osteogénica de células madres provenientes de médula ósea de ratas a las que se les indujo Diabetes, como así también de ratas diabéticas que recibieron Metformina en el agua de bebida. Estas células se cultivaron en un medio osteogénico por el término de 15 días. Se observó que hubo una inhibición de la diferenciación, expresión de fosfatasa alcalina y producción de nódulos de mineralización en el caso de las células provenientes de animales diabéticos. Por otro lado, en las ratas que tomaron Metformina estos parámetros se encontraron incrementados, inclusive comparados con los obtenidos a partir de ratas no diabéticas sin el tratamiento con dicha droga. (Tolosa MJ 2012).

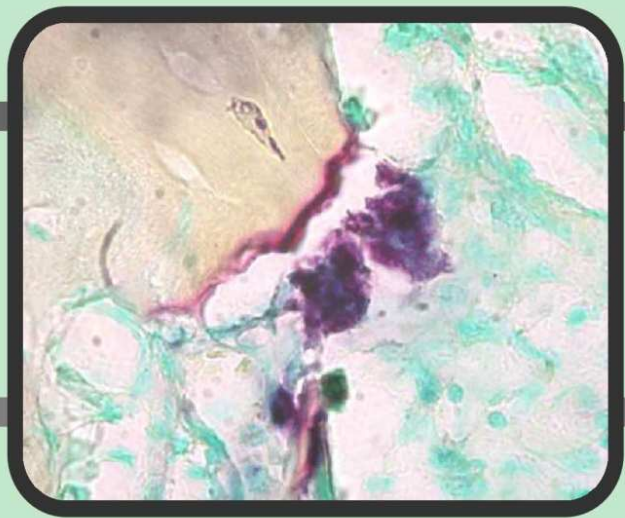
Los resultados obtenidos *in vivo* estarían en concordancia con lo que observamos *in vitro*, ya que en estos estudios vimos que los AGEs afectan negativamente a los osteoblastos y que la Metformina es

capaz de revertir los efectos nocivos generados por los AGEs.

En presencia de Metformina hubo un aumento en la actividad osteoclástica (expresión de TRAP) en la lesión del hueso en animales no diabéticos. En nuestro grupo, Sedlinsky C y colaboradores (2011) encontraron que la actividad TRAP a nivel de la placa de crecimiento en la metáfisis femoral se encontraba aumentada en ratas bajo tratamiento con Metformina. Al relacionar estos resultados con los obtenidos *in vitro* sobre los osteoclastos, vemos que están en concordancia dado que el número de osteoclastos y la actividad TRAP aumentaron en presencia de Metformina.

La reparación del defecto óseo usado en este estudio ocurre en un periodo de tiempo corto (15 días), y el proceso de reosificación es intramembranoso, lo que implica que la reparación no incluye la formación de un callo blando, como en el caso de la reparación endocondral, pero involucra la unión de la lesión por la formación de callo duro, el cual es posteriormente remodelado a hueso

maduro por la acción combinada de osteoclastos y osteoblastos (Schindeler 2008). En este modelo de reparación ósea la Metformina incrementó la reosificación y la actividad osteoclástica en el sitio lesionado, sugiriendo un aumento concertado en la formación ósea y remodelado en el sitio de la lesión en un proceso finamente regulado que involucra localización acoplada de osteoclastos con osteoblastos (Schell 2006, Horowitz 2001). Un mayor reclutamiento y actividad de osteoclastos podría contribuir, en las primeras etapas de la reparación ósea, a acelerar la preparación de la superficie ósea lesionada para la futura acción osteogénica de los osteoblastos.



Conclusiones



Respecto a los estudios *in vitro* se concluye que:

- ❖ La Metformina es capaz de revertir la inhibición causada por los AGEs sobre la diferenciación osteoblástica, como así también prevenir las alteraciones en las fibras de actina ocasionadas por estos productos.

- ❖ Los AGEs presentan características pro-apoptóticas, mientras que la Metformina además de tener características anti-apoptóticas es capaz de revertir la muerte celular de los osteoblastos inducida por los AGEs.

- ❖ El estrés oxidativo generado por los AGEs provoca los efectos nocivos previamente descritos, la Metformina al inhibir la generación de estrés oxidativo inducido por AGEs, previene a los osteoblastos de la acción negativa de estos compuestos.

- ❖ Los AGEs ejercen sus efectos en los osteoblastos a través de la unión a sus receptores RAGE y Galectina-3, además aumentan la expresión de los mismos. La Metformina es capaz de inhibir la

regulación positiva de los AGEs sobre el RAGE indicando que esta inhibición esta involucrada en el efecto protector de la misma sobre los osteoblastos. Esta droga no tiene la habilidad de inhibir dicha regulación en el caso del receptor galectina-3 por lo que se puede inferir que este receptor no participa en los efectos preventivos de la droga.

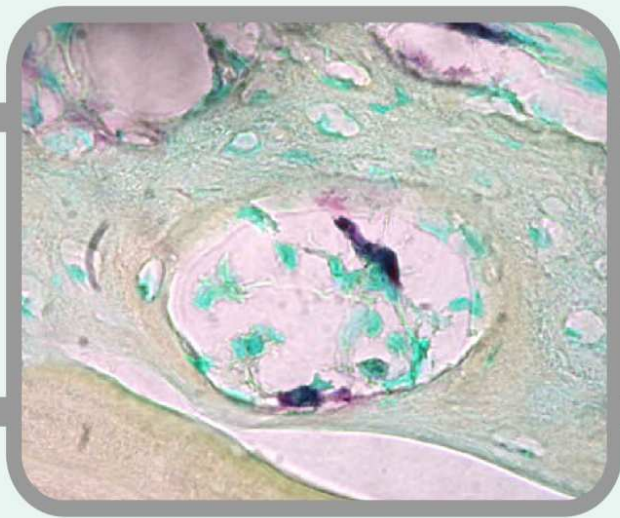
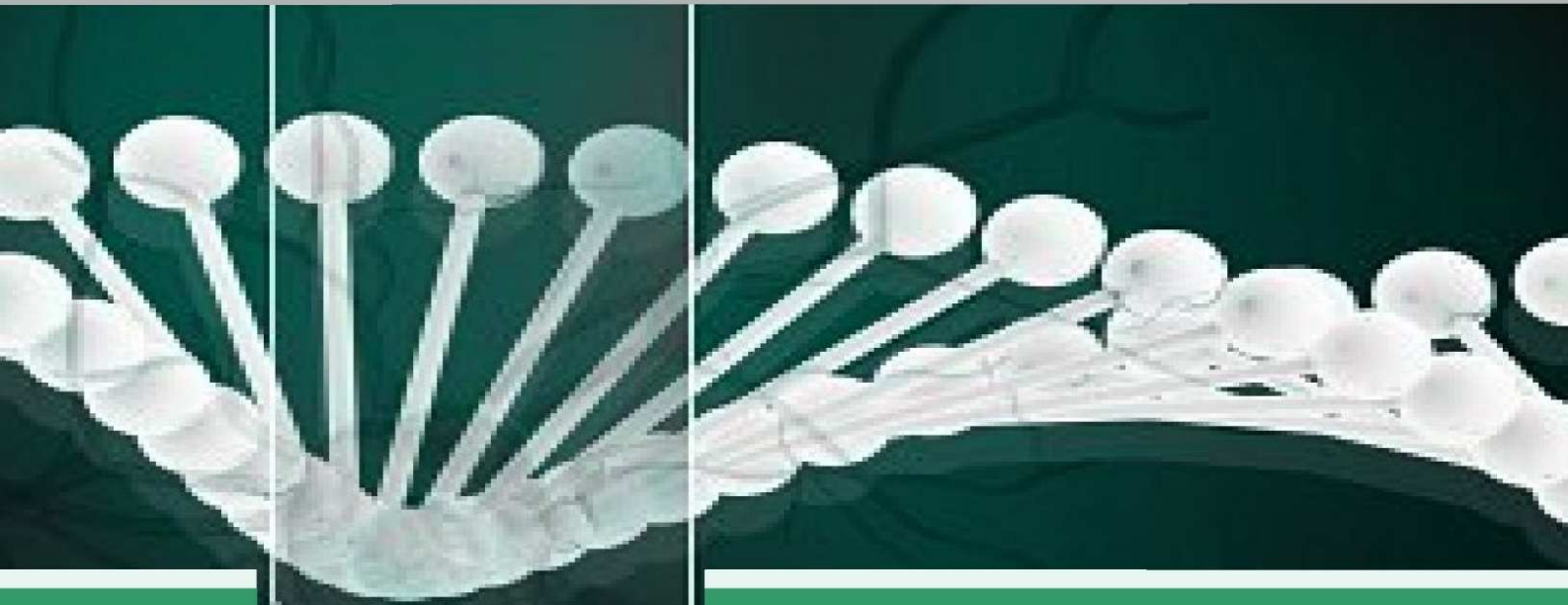
- ❖ La Metformina incrementa tanto el número de osteoclastos como la actividad TRAP. Efecto que puede deberse al aumento de la expresión de RANKL en osteoblastos expuestos a la droga. El mecanismo de acción puesto en juego en estos efectos, involucra la activación de la enzima p-AMPK.

Respecto a los estudios realizados *in vivo* se concluye que:

- ❖ La reparación ósea se encuentra inhibida en ratas diabéticas.

- ❖ La Metformina incrementa el grado de reparación ósea tanto en animales diabéticos como en los controles.

❖ El aumento de la actividad TRAP en la zona lesionada de las ratas controles que tomaron Metformina, estaría indicando un aumento en la resorción ósea. De esta manera el proceso de reparación se acelera, ya que los osteoclastos ejercen su acción degradando el hueso afectado en la lesión para poder ser reemplazado por hueso nuevo.



Bibliografía VI

### A

Achemlal L, Tellal S, Rkiouak F, et al. Bone metabolism in male patients with type 2 diabetes. *Clin Rheumatol*. 2005, 24, 493-496

Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. . 2005, 67, 3-21

Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, Pischon N, Trackman PC, Gerstenfeld L, Graves DT. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 2006, 40(2), 345-353

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995, 12(3), 413-420

Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Gödecke A, Helfrisch MH, Reid DM, Ralston SH. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 2001, 142, 760-766

Asunción M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale, HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85(7), 2434-2438

Atkinson W, Lockhart W, Whorwell PJ, Keevil B, Houghton LA. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation-and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2006, 130(1), 34-43

### B

Bak EJ, Park HG, Kim M, Kim SW, Kim S, Choi SH, Cha JH, Yoo YJ. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: A pilot study. *J Periodontol* 2010, 81, 412-419

Bailey CJ. Metformin and intestinal glucose handling. *Diabetes Metab Rev* 1995, 11(1), S23-32

Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med* 1996, 334(9), 574-579

Balen A. Polycystic ovary syndrome and cancer. *Hum Reprod Update* 2001, 7(6),522-525

- Banse X, Sims TJ, Bailey AJ (2002) Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res*, 2002, 17, 1621-1628
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991, 40, 405-412
- Ben Haroush A, Yogev Y, Fisch B. Insulin resistance and metformin in polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004, 115(2),25-33
- Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Jhonsen T, Bucala R, Vlassara H. Formation of immunochemical advanced glycation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* 1995, 44, 824-829
- Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwegold BS. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999, 48(1), 198-202
- Bierhaus A, Hofman MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. 1998, 37, 586-600
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for Advanced Glycation End Products . *J Mol Med* 2005, 83, 876-886
- Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. RAGE in inflammation - a new therapeutic target? *Curr Opin Invest Drugs* 2006, 74, 985-991
- Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005, 289, 645-659
- Bonfanti R, Mora S, Prinster C, et al. Bone modeling indexes at onset and during the first year of follow-Up in insulin-dependent diabetic children. *Calcif Tissue Int*. 1997, 60, 397-400



Borges JL, Bilezikian JP, Jones-Leone AR, Acosta AP, Ambery PD, Nino AJ, Grosse M, Fitzpatrick LA, Cobitz AR. A Randomized, Parallel Group, Double-blind, Multicentre Study Comparing the Efficacy and Safety of Avandamet (Rosiglitazone/Metformin) and Metformin on Long-term Glycaemic Control and Bone Mineral Density after 80 Weeks of Treatment in Drug-naive Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Diabetes Obes Metab* 2011

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 72, 248-254

Brock B, Smidt K, Ovesen P, Schmitz O, Rungby J. Is metformin therapy for polycystic ovary syndrome safe during pregnancy? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005, 96(6), 410-412

Brownlee M. Glycation of macromolecules. *International textbook of diabetes mellitus*. 1997, 745-755

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001, 414, 813-820

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005, 54, 1615-1625

Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation end products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest*. 1991, 87, 432-438

Bucala R, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation endproducts. Post-translational modifications of proteins. 1992, 53-79

Burdon T, Smith A, Savatier P. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*. 2002, 12, 432-438

### C

Cameron NE, Cotter MA. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1997, 46(2), S31-S37

Campbell I. Metformin—life begins at 50: A symposium held on the occasion of the 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Amsterdam, The Netherlands. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 2007, 7, 247-252

Charles MA, Eschwege E, Grandmottet P. Treatment with metformin of non-diabetic men with hypertension, hypertriglyceridaemia and central fat distribution: The BIGPRO 1.2 trial. *Diabetes Metab Res Rev* 2000, 16(1), 2-7

Chen JR, Plotkin LI, Aguirre JI, Han L, Jilka RL, Kousteni S, Bellido T, Manolagas SC. Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti- versus pro-apoptotic effects of estrogens. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 4632-4638

Cortizo AM, Bruzzone L, Molinuevo S, Etcheverry SB. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology.* 2000a, 147, 89-99

Cortizo AM, Etcheverry SB. Vanadium derivatives act as growth factor--mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol Cell Biochem.* 1995, 145, 97-102

Cortizo AM, Kreda S. Vanadium induced alterations in cytoskeleton and protein tyrosinephosphorilation in osteoblast cell lines. *Metal Ions in Biology and Medicine.* 2000b, 6, 714-716

Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA, Mercer N, Etcheverry SB, McCarthy AD. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK). *Mol. Cell Biochem.* 2003, 250, 1-10

Cortizo AM, Sedlinsky C, MacCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol* 2006, 536, 38-46

Costello MF, Eden JA. A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003, 79(1), 1-13

Cubeddu LX, Bonissch H, Gothert M. Effects of Metformin on intestinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) release and on 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000, 361(1), 85-91

Cullum NA, Mahon J, Stringer K, McLean WG. Glycation of rat sciatic nerve tubulin in experimental diabetes mellitus. *Diabetologia* 1991, 34, 387-389

### D

Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem.* 1994, 223, 351-357

Dawes GS, Molt JC. Circulatory and respiratory reflexes caused by aromatic guanidines. *Br J Pharmacol Chemother.* 1950, 5(1), 65-76

DeFronzo R, Goodman A. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med* 1995, 333(9),541-549

De Liefde II, van der Klift M, de Laet CEDH, van Daele PLA, Hofman A, Pols HAP. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporos Int.* 2005, 16, 1713-1720

Deora AA, Win T, Vanhaesebroeck B, Lander HM. A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress. *J Biol Chem.* 1998, 273, 29923-29928

Deschaseaux, F.; Sensébé, L. & Heymann, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med.* 2009, 15, 417-429

Diabetes Prevention Program Research Group. Effects of withdrawal from metformin on the development of diabetes in the diabetes prevention program. *Diabetes Care.* 2003, 26(4), 977-980

Diniz SF, Amorim FP, Cavalcante-Neto , Bocca AL, Batista AC, Simm GE, Silva TA. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2008, 41, 373-379

Dobnig H, Piswanger-Sölkner JC, Roth M, et al. Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover, bone mass, and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91, 3355-3363

Dominguez LJ, Davidoff AJ, Srinivas PR, Standley PR, Walsh MF, Sowers JR. Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology.* 1996, 137(1), 113-121

Dunn CJ, Peters DH. Metformin: A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs* 1995, 49(5), 721-749

Dyck PJ, Giannini C, Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996, 55, 1181-1193

### E

El-Batran SA, Abdel-Salam OME, Nofal SM, Baiuomy AR. Effect of rosiglitazone and nateglinide on serum glucose and lipid profile alone or in combination with the biguanide metformin in diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2006, 53, 69-74

El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Haberte N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory Caín complex I. *J Biol Chem* 2000, 275(1), 223- 228

Esposito C, Gerlach, H, Brett J, Stern D, Vlassara, H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med*, 1989, 170, 1387-1407

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care* 2011, 34(1), 562-569

### F

Feinglos MN, Saad MF, Pi-Sunyer FX, An B, Santiago O. Effects of liraglutide (NN2211), a long-acting GLP-1 analogue, on glycaemic control and bodyweight in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2005, 22(8), 1016-1023

Forbes JM, Soldatos G, Thomas MC. Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? Clin Biochem Rev. 2005, 26, 123-134

Franke S, Rüster C, Pester J, Hofmann G, Oelzner P, Wolf G. Advanced glycation end products affect growth and function of osteoblasts. Clin Exp Rheumatol. 2011, 29(4), 650-660

### G

Gangoiti MV. Tesis: "Efecto de AGEs (Productos de Glicación Avanzada) y drogas anti-resortivas sobre células de hueso en cultivo". Facultad de Cs. Exactas. UNLP. 2011

Garber A, DeFronzo RA, Ferranini E, Keen H, Zimmet P. International Textbook of Diabetes Mellitus. Third edition. John Wiley & Sons. 2004, 851-865

Garcia EY. Fluamine, a new synthetic analgesic and anti-infl drug. J Philippine Med Assoc. 1950, 26, 287-93

Garnero P, Borel O, Gineyts E, Duboeuf F, Solberg H, Bouxsein ML, Christiansen C, Delmas PD. Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. Bone 2006, 38, 300-309

Geneser F. Histología. Sobre bases moleculares. Tercera edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2007.

Goh SY, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes Clin Endocrinol Metab. 2008, 93(4), 1143-1152

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation 2006, 114, 597-605

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. Plast Reconstr Surg 2000, 106, 360-371

Grant P. The effects of high- and medium-dose metformin therapy on cardiovascular risk factors in patients with type II diabetes. Diabetes Care 1996, 19(1), 64-66

- Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, Reid IR. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92, 1305-1310
- Gugliucci A. Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglucemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev Med Uruguay* 2000, 16, 58-75
- Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, Ogata H, Hermo R, Schulze J, Kimura S. "Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance". *Clin. Chim. Acta* 2007, 377, 213-220
- Guidelines on the handling and training of laboratory animals. In: The Biological Council of Animal Research and Welfare Panel. Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW). 1992
- Guigas B, Bertrand L, Taleux N. 5-Aminoimidazoline-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and Metformin inhibit hepatic glucosa phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* 2006, 55(5), 865-874
- Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996, 84, 345-357
- Gundberg CM, Anderson M, Dickson I, Gallop PM. "Glycated" osteocalcin in human and bovine bone. The effect of age. *J Biol Chem*. 1986, 261, 14557-14561
- Guo XH, Huang QB, Chen B, Wang SY, Li Q, Zhu YJ, Hou FF, Fu N, Brunk UT, Zhao M. Advanced glycation end products induce actin rearrangement and subsequent hyperpermeability of endothelial cells. *APMIS* 2006, 114, 874-883
- H**
- Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder *Bone* 2009, 45, 35-38
- Hardie DG, The AMP-activated protein kinase cascade. The key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 2003, 144(12), 5179-5183

- Haslbeck KM, Schleicher E, Bierhaus A, Nawroth P, Haslbeck KM, Neundörfer B, Heuss D. The AGE/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway may contribute to the pathogenesis of polyneuropathy in impaired glucose tolerance (IGT). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005, 113, 288-291
- Heap J, Murray MA, Miller SC, Jalili T, Moyer-Mileur LJ. Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr*. 2004, 144, 56-62
- Hernandez CJ, Tang SY, Baumbach BM, Hwu PB, Sakkee AN, van der Ham F, DeGroot J, Bank RA, Keaveny TM. Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone* 2005, 37, 825-832
- Hirose A, Tanikawa T, Mori H, Okada Y, Tanaka Y. 2010. Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS Letters* 2010, 584, 61-66
- Hoffmann J, Spengler M. Efficacy of 24-week monotherapy with acarbose, metformin, or placebo in dietary-treated NIDDM patients: The Essen-II study. *Am J Med* 1997, 103(6), 491-497
- Holland W, Morrison T, Chang Y, Wiernesperger N, Stith BJ. Metformin (Glucophage) inhibits tyrosine phosphatase activity to stimulate the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochem Pharmacol*. 2004, 67(11), 2081, 2091
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001, 12, 9-18
- Horton ES, Clinkingbeard C, Gatlin M, Foley J, Mallows S, Shen S. Nateglinide alone or in combination with metformin improves glycemic control by reducing mealtime glucose levels in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000, 23(11), 1660-1665
- Hotta N. New approaches for treatment in diabetes: aldose reductase inhibitors. *Biomed Pharmacoter*. 1995, 49, 232-243
- Howard E, Ahern-Moore R, Tomasek J. Cellular Contraction of Collagen Lattices Is Inhibited by Nonenzymatic Glycation. *Experimental Cell Research* 1996, 228, 132-137

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96, 3540-3545

### I

Ibáñez L, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Exaggerated adrenarche and hyperinsulinism in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(12), 4739-4741

Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1998, 338(13), 867-872

Ishii H, Daisuke K, King JL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med*. 1998, 76, 21-31

Isidro ML, Ruano B. Bone disease and Diabetes. *Current Diabetes Reviews*. 2010, 6 (3), 144-155

Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, Schönbeck U, Libby P. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006, 26, 611-617

### J

Jang WG, Kim EJ, Bae IH, Lee KN, Kim YD, Kim DK, Kim SH, Lee CH, Franceschi RT, Choi HS. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone* 2011, 48, 885-893

Janghorbani M, van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 2007, 166, 495-505

Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med* 2006, 40, 183-192

Johansen K. Efficacy of metformin in the treatment of NIDDM. *Diabetes Care* 1999, 22(1), 33-37



## K

Kaji Y, Amano S, Usui T, Oshika T, Yamashiro K, Ishida S, Suzuki K, Tanaka S, Adamis AP, Nagai R, Horiuchi S. Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44, 521-528

Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 375, 414-419

Kashiwagura T, Deutsch CJ, Taylor J, Erecińska M, Wilson DF. Dependence of gluconeogenesis, urea synthesis, and energy metabolism of hepatocytes on intracellular pH. *J Biol Chem*. 1984, 259, 237-243

Kayath MJ, Tavares EF, Dib SA, Vieira JGH. Prospective bone mineral density evaluation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 1998, 12, 133

Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JK, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest*. 2000, 23, 295-303

Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, Williamson R, Fuchs M, Köhler A, Glossmann H, Schneider R, Sutherland C, Schweiger S. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 2010, 14, 107(50), 21830-21835

Kim MJ, Kim S, Kim Y, Jin EJ, Sonn JK. Inhibition of RhoA but not ROCK induces chondrogenesis of chick limb mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 418(3), 500-505

Kirk JK, Pearce KA, Michielutte R, Summerson JH. Troglitazone or metformin in combination with sulfonylureas for patients with type 2 diabetes. *J Fam Pract* 1999, 48(11), 879-882

Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest*. 1992, 90, 439-446

- Kleinschmidt J, Hollinger JO. Animals models in bone research, in *Bone Grafts and Bone Substitutes* (Habal M and Reddi AH eds), 1992, 113-147
- Knochenhauer ES, Key T., Kahsar-Miller, M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83(9), 3078-3082
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with life style intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002, 346(6), 393-403
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1998, 101(1), 160-169
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1994, 16, 149-156
- Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. 1995. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 44: 775-782
- Kume S, Kato S, Yamagishi S-I, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, Okawa T, Kojiro M, Nagata K. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage and bone. *J. Bone Miner. Res.* 2005,20, 1647-1658
- L**
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685
- Lalau JD, Lacroix C, Compagnon P. Role of metformin accumulation in metformin associated lactic acidosis. *Diabetes Care* 1995, 18(6), 779-784
- La Marca A, Artensio AC, Stabile G, Volpe A. Metformin treatment of PCOS during adolescence and the reproductive period. *Eur J Obstet Gynecol* 2005, 121, 3-7

- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem.* 1997, 272, 17810-17814
- Lassing, I; Schmitzberger, F; Björnstedt, M; Holmgren, A; Nordlund, P; Schutt, C. E. & Lindberg, U. Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. *J Mol Biol, Department of Microbiology.* 2007, 370, 331-348
- Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstet Gynecol Surv* 2002, 57(11), 755-767
- Lee YS, Kim YS, Lee SY, Kim GH, Kim BJ, Lee SH, Lee KU, Kim GS, Kim SW, Koh JM. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone* 2010, 47, 926-937
- Legro RS. Diabetes prevalence and risk factors in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001, 28(1), 99-109
- Leverve XM, Guigas B, Detaille D, Batandier C, Koceir EA, Chauvin C, Fontaine E, Wiernsperger NF. Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes Metab.* 2003, 29, 6S88-6S94
- Lin L. RAGE on the toll road? *Cell Mol Immunol.* 2006, 3, 351-358
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem,* 1951, 193, 265-275
- Luna V, Casauban L, Sajan MP. Metformin improves atypical protein kinase C activation by insulin and phosphatidylinositol 3,4,5-(PO4)3 in muscle of diabetic subjects. *Diabetología* 2006, 49(2), 375-382
- Lutz TA, Estermann A, Haag S, Scharrer E. Depolarization of the liver cell membrane by metformin. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1513, 176-184
- Lyons TJ, Jenkins AJ. Glycation, oxidation and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev.* 1997, 5, 365-391

## M

Mai Q, Zhang Z, Xu S, Lu M, Zhou R, Zhao L, Jia C, Wen Z, Jin D, Bai X. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011, 112, 2902-2909

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000, 21, 115-137

Marx N, Walcher D, Ivanova N, Rautzenberg K, Jung A, Friedl R, Hombach V, Caterina R de, Basta G, Wautiers JL . Thiazolidinediones reduce endothelial expression of receptors for advanced glycation end products . *Diabetes* 2004, 53, 2662-2668

McCarthy AD, Cortizo AM, Giménez Segura G, Bruzzone L, Etcheverry SB. Non-enzymatic glycosylation of alkaline phosphatase alters its biological properties. *Mol Cell Biochem.* 1998, 181(1-2), 63-69

McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol.* 2001a, 2, 16

McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Cortizo A.M. Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast like cells. *Mol. Cell Biochem.* 1997, 170, 43-51

McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM. Advanced glycation endproduct specific receptors in rat and mouse osteoblast-like cells: regulation with stages of differentiation. *Acta Diabetol.* 1999, 36, 45-52

McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM.. Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetol.* 2001b, 38, 113-122

McCarthy AD; Sedlinsky C, Gangoiti MV, Arnol V, Verónica; Cortizo AM, Schurman L. Metformina bloquea los efectos deletéreos de los productos de glicación avanzada (AGEs) en osteoblastos en cultivo. *SAO Revista de la Sociedad Argentina de Osteología.* 2006, 5(6), 38-43

McCarthy AD, Uemura T, Etcheverry SB, Cortizo AM. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004, 36, 840-848

McLean WG. The role of axonal cytoskeleton in diabetic neuropathy. *Neurochem Res* 1997, 22, 951-956

McRobert EA, Gallicchio M, Jerums G, Cooper ME, Bach LA. The amino-terminal domains of the ezrin, radixin, and moesin (ERM) proteins bind advanced glycation end products, an interaction that may play a role in the development of diabetic complications. *J Biol Chem.* 2003, 278, 25783-25789

McVeigh GE, Brennan GM, Johnston JD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992, 35, 771-776

Mercer N, Ahmed H, Etcheverry SB, Vasta GR, Cortizo AM. Regulation of advanced glycation end product (AGE) receptors and apoptosis by AGEs in osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem.* 2007, 306, 87-94

Mercer N, Ahmed H, McCarthy AD, Etcheverry SB, Vasta GR, Cortizo AM. AGE-R3/galectin-3 expression in osteoblast-like cells: regulation by AGEs. *Mol Cell Biochem.* 2004, 266, 17-24

Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, Taketomi S. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997, 8, 260-270

Molinuevo MS, Barrio DA, Cortizo AM, Etcheverry SB. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004, 53, 163-172

Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1995, 748, 562-570

Moses R, Slobodniuk R, Boyages S. Effect of repaglinide addition to metformin monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999, 22(1), 119-124

Mott JD, Khalifah RG, Nagase H, Shield CF, 3rd, Hudson JK, Hudson BG. Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int.* 1997;52, 1302-1312

Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. The role of reactive oxygen species in TNF $\alpha$ -dependent expression of the receptor for advanced glycation end products in human umbilical vein endothelial cells . *Biochim Biophys Acta* 2005, 1744, 213-223

### N

Nagi D, Yudkin J. Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects: A study of two ethnic groups. *Diabetes Care* 1993, 16(4), 621-629

Nakamura S, Tobita K, Tachikawa T, Akamatsu S, Ohno Y, Kan A, Katsuragawa M, Yasumura K, Miyazaki S, Sakai S, Morita T, Hirashawa Y, Niwa T. Immunohistochemical detection of an AGE, a ligand of macrophage receptor, in peritoneum of CAPD patients. *Kidney Int.* 2003, 84, S152-157

Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake on type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetologia* 2006, 49(3), 434-441

Neveu N, Granger L, St-Michel P, Lavoie HB. Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction and achievement of pregnancy in 154 women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2007, 87(1), 113-120

Nicolin V, Baldini G, Bareggi R, Zweyer M, Zauli G, Vaccarezza M, Narducci P. Morphological features of osteoclasts derived from a co-culture system. *J Mol Histo.* 2006, 37, 171-177

### O

Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Cirnigliaro M, Federici M, Federici A. Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1043: 710-717

Ouslimani N, Mahrouf M, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Cosson C, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin reduces endothelial cell expression of both the receptor for advanced glycation end products and lectinlike oxidized receptor 1 . *Metabolism* 2007, 56, 308-313

### P

Partridge N.C, Alcorn D, Michelangeli VP, Ryan G, Martin, TJ. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Res.* 1983, 43, 4308-4314

Pfeiffer A, Schatz H. Diabetic microvascular complications and growth factors. *ExpClinEndocrinolDiabetes.* 1995, 103, 7-14

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, 1363-1374

Pugliese G, Pricci F, Romeo G, Pugliese F, Mené P, Giannini S, Cresci B, Galli G, Rotella CM, Vlassara H, Di Mario U. Upregulation of mesangial growth factor and extracellular matrix synthesis by advanced glycation end products via a receptor-mediated mechanism. *Diabetes.* 1997, 46(11), 1881-1887

### Q

Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 1992, 7, 683-692

### R

Räkel A, Sheehy O, Rahme E, LeLorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* . 2008, 34, 193-205

Riman T, Nilsson S, Persson IR. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004, 83(9), 783-795

Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas con biología celular y molecular- 5º ed.* Médica Panamericana 2007

## S

Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos* 2006a, 17, 1514-1523

Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 2006c, 79, 160-168

Saito M, Fujii K, Soshi S, Tanaka T. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos* 2006b, 17, 986-995

Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2010, (2), 195-214

Sálice VC, Cortizo AM, Dumm CLG, Etcheverry SB. Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. *Mol Cell Biochem, gica.* 1999, 198, 119-128

Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J.* 1998, 334, 177-187

Samaras K, Wand H, Law M, Emery S, Cooper D, Carr A. Prevalence of metabolic syndrome in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy using International Diabetes Foundation and Adult Treatment Panel III Criteria: Associations with insulin resistance, disturbed body fat compartmentalization, elevated C-reactive protein, and hypoadiponectinemia. *Diabetes Care* 2007, 30(1), 113-119

Sambol NC, Brookes LG, Chiang J. Food intake and dosage level, but not tablet vs solution dosage form, affect the absorption of metformin HCl in man. *Br J Clin Pharmacol* 1996, 42(4), 510-512

Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003, 52, 1502-1510



Scarpello JH. Improving survival with metformin: Evidence base today. *Diabetes Metab.* 2003, 29(4), 6536-65 43

Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinetics* 1996, 30(5), 359-371

Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone.* 2006, 38, 547-554

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2008, 19, 459-466

Schinder SL, Khon RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and non-enzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Invest.* 1981, 67, 1630-1635

Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 1, 22(4), 549-553

Schurman L, McCarthy AD, Sedlinsky C, Gangoiti MV, Arnol V, Cortizo AM. Metformin, an anti-diabetic agent, inhibits advanced glycation end product(AGE)-induced deleterious effects in osteoblast-like cells by suppressing oxygen species generation, apoptosis and AGE-receptor upregulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116, 333-340

Schuyler MR, Niewoehner DE, Inkley SR, Khon RR. Abnormal lung elasticity in juvenile diabetes mellitus. *Am Rev Resp Dis.* 1976, 113, 37-41

Schwartz AV. Diabetes Mellitus: Does it affect bone? *Calcif Tissue Int* 2003, 73, 515-519

Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, Palermo L, Lecka-Czernik B, Feingold KR, Strotmeyer ES, Resnick HE, Carbone L, Beamer BA, Park SW, Lane NE, Harris TB, Cummings SR. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91, 3349-3355

Sedlinsky C, Molinuevo MS, Cortizo AM, Tolosa MJ, Felice JI, Sbaraglini ML, Schurman L, McCarthy AD. Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011, 668(3), 477-485

Shah M, Kola B, Bataveljic A, Arnett TR, Viollet B, Saxon L, Korbonits M, Chenu C. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass. *Bone* 2010, 47, 309-319

Sharma K, Ziyadeth FN. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *SemNephrol.* 1997, 17, 80-92

Sharp PS, Rainbow S, Mukherjee S. Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med.* 2003, 20, 575-579

Silbiger S, Crowley S, Shan Z, Brownlee M, Satriano J, Schlondorff D. Nonenzymatic elevated glucose reduces collagen synthesis and proteoglycan charge. *Kidney Int.* 1993;43, 853-864

Simó R, Hernandez C. Treatment of diabetes mellitus: general goals, and clinical practice management. *Rev Esp Cardiol.* 2002, 55, 845-860

Skolnik E Y, Yang Z, Makita Z, Radoff S, Kirstein M, Vlassara H. Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodelling and diabetic nephropathy. *J Exp Med.* 1991, 174, 931-939

Slotta K, Tschesche R. *Ber.* 1927, 60, 301

Standl E, Füchtenbusch M. The role of oral antidiabetic agents: Why and when to use an early-phase insulin secretion agent in Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2003, 46(1), 30-36

Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev* 2002, 1, 1-15

Strotmeyer ES, Cauley JA, Schwartz AV, et al. Health ABC Study. Diabetes is associated independently of body composition with BMD and bone volume in older white and black men and women: The Health, Aging, and Body Composition Study. *J Bone Miner Res.* 2004, 19, 1084-1091

### T

Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem* 2000, 275, 25781-25790

Tolosa MJ, Chuguransky SR, Schurman L, Sedlinsky C, Cortizo AM, McCarthy AD, Molinuevo MS. La diabetes altera el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea. Efecto del tratamiento con Metformina. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 2012. Enviado

Tomasek JJ, Meyers SW, Basinger JB, Green T, Shew RL. Diabetic and age-related enhancement of collagen-linked fluorescence in cortical bone of rats. *Life science* 1994, 55(11), 855-861

Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, Dupont J. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: Possible involvement of adenosine-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod* 2006, 76(3), 368-378

Towler MC, Hardie G. AMP- activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*. 2007, 100(3), 328-341

Townley R, Shapiro L. Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science* 2007, 315, 1726-1729

Tsuji H, Iehara N, Masegi T, Imura M, Ohkawa J, Arai H, Ishii K, Kita T, Doi T. Ribozyme targeting of receptor for advanced glycation end products in mouse mesangial cells. *Biochem Biophys Res*. 1998, 245, 583-588

Tucker GH, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol* 1981, 12(2), 235-246

Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Rönnemaa T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1999, 22, 1196-1200

### U

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effects of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *Lancet* 1998, 352(9131), 854-865

Unno Y, Sakai M, Sakamoto YI, Kuniyasu A, Nakayama H, Nagai R, Horiuchi S. Advanced glycation end products-modified proteins and oxidized LDL mediate down-regulation of leptin in mouse adipocytes via CD36. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 325, 151-156

### V

Valcourt U, Merle B, Gineyts E, Viguet-Carrin S, Delmas PD, Garnero P. Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. *J Biol Chem.* 2007, 282, 5691-5703

Van't Hof RJ, Ralston S. Nitric oxide and bone. *Immunology* ., 2001, 103, 255-261

Varga F, Luegmayr E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Ellinger A, Prinz D, Rumpler M, Klaushofer K. Tri-iodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by promoting apoptosis. *J Endocrinol.* 1999, 160, 57-65

Vashishth D. The role of the collagen matrix in skeletal fragility. *Curr Osteoporos Rep* 2007, 5, 62-66

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia* 2005, 48, 1292-1299

Viguet-Carrin S, Roux JP, Arlot ME, Merabet Z, Leeming DJ, Byrjalsen I, Delmas PD, Buxsein ML. Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. *Bone* 2006, 39, 1073-1079

Vlassara H . Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med* 1996, 28, 419-426

Vlassara H. Recent progress in advanced glycation endproducts and diabetic complications. *Diabetes.* 1997, 46(2), S19-S25

Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 1998, 240, 1546-1548

### W

Waddington RJ, Alraies A, Colombo JS, Sloan AJ, Okazaki J, Moseley R. Characterization of oxidative stress status during diabetic bone healing. *Cells Tissues Organs.* 2011, 194(2-4), 307-312

Wautier J, Schmidt AM. Protein Glycation: A Firm Link to Endothelial Cell Dysfunction *Circ. Res.* 2004, 95, 233-238

Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 2002, 31, 1-7

Werner E, Bell J. The preparation of methylguanidine, and of  $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J Chem Soc.* 1921, 121, 1790-1795

Wiernsperger NF. Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab.* 1999, 25, 110-127

Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycemic effect of metformin: Therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs* 1999, 58(1), 31-39

Wilcok C, Bailey CJ. Accumulation of Metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica* 1994, 24(1), 49-57

WilliamsonJR, Chang K, Frangos M. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes.* 1993, 42, 801-813

Witters L. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest.* 2001, 108, 1105-1107

Witztum JL. Role of modified lipoproteins in diabetic macroangiopathy. *Diabetes.* 1997, 46 (2), S112-S114

### X

Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogenactivated protein kinase signalling pathways are required for osteoblastspecific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* 2002, 17, 101-110

### Y

Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and Poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981, 294(5838), 284-286

Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994, 269, 9889-9897

Yan SF, Ramasamy R, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Hudson BI, Stern DM, Lalla E, DU Yan S, Rong LL, Naka Y, Schmidt AM. RAGE and its ligands: a lasting memory in diabetic complications? *Diab Vasc Dis Res.* 2004, 1, 10-20

Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci.* 2005, 97, (3), 305-311

### Z

Zhou G, Myers R, Y. Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001, 108, 1167-1174

Zhou Z, Xiong W. RAGE and its ligands in bone metabolism. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011, 1;3, 768-776