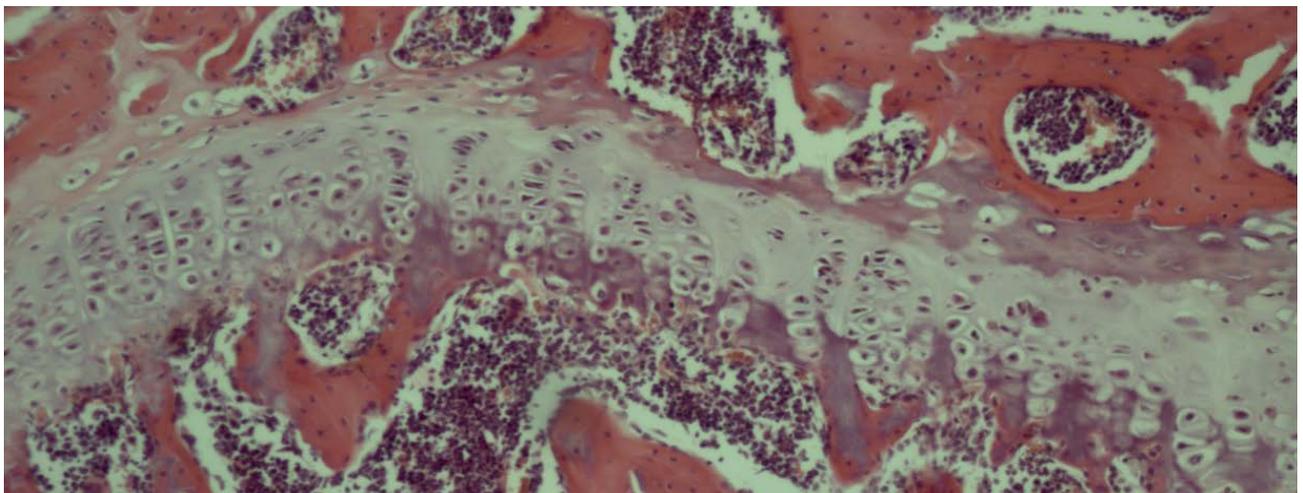




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Trabajo de tesis doctoral

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO ORAL CON INHIBIDORES DE
DIPEPTIDILPEPTIDASA-4 Y BIGUANIDAS SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO**

2014

Bioq. María Laura Sbaraglini

Director: Dr. Antonio D. McCarthy

Co-Director: Dra. Ma. Silvina Molinuevo

El presente trabajo de tesis ha sido desarrollado para acceder al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas bajo la dirección del Dr. Antonio Desmond McCarthy y la codirección de la Dra. María Silvina Molinuevo.

El mismo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM) de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, y fue posible gracias a las becas otorgadas por la Comisión de Investigaciones Científicas de La Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA).

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me acompañaron durante todos estos años y es muy difícil expresar con palabras lo inmensamente agradecida que me siento con todos.

Primero, quiero agradecerle a mis directores, Antonio y Silvina, por la paciencia durante todo este trayecto y ayudarme a culminar esta etapa. A Ana, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su presencia y por dirigir con ímpetu este grupo de trabajo. A Claudia y a León, por su buena predisposición y colaboración.

A mis compañeros y amigos del laboratorio. ¡GRACIAS! Gracias por hacerme sentir “como en casa” desde el primer día que llegué a esta ciudad, por aguantarme y sostenerme innumerables veces. Fueron muchas horas compartidas, muchos experimentos, muchas risas y alguna que otra lágrima. Gracias por su compañerismo, honestidad y energía. Me encantó compartir con ustedes todos estos años !!! GRACIAS....Vir, Juanma, Vero, Marix, Juani, Sara, Laurita, Gime, Anabella, Flor, Débora y Denise !!!

A mis papas y a mi hermano, por apoyarme en cada una de mis decisiones y confiar en mí. A mis abuelas, dos hermosas mujeres que me han transmitido su fuerza y energía!!! A mis primos, tíos y sobrinos!. A mi mamá, mi tía Cristina y a Roque, por ayudarme con el diseño de la tesis.

A mis AMIGOS! A cada uno de ellos le agradezco por ayudarme a crecer como persona, por estar siempre presente. Gracias por su escucha y compañía. Me siento muy afortunada de contar con todos ustedes, estoy inmensamente agradecida!!!. Gracias a mis amigos marplatenses, Ana, Bruno, Andy, Juli, Mechi, y a mis amigos sanjuaninos: Manu, Jose, Juli, Gordo, Gusti y Ariel. Gracias a Dani, Deb, Silvinita. A mis amigos platenses, Nico y Yamil!!!!. A Alan y Caro, gracias por alentarme tanto!!!.

A Luli, Mer y Marian, GRACIAS por su incondicionalidad!!!!.

Gracias...Pancho, Ju, Feli, Fer, Vero, Marix y Juani!!! Gracias por ser mi familia platense, GRACIAS por sostenerme todos estos años, por mimarme, acompañarme y ayudarme de manera ilimitada. Los quiero mucho!!!!.

A mis amigos acróbatas, por permitirme volar con ellos innumerables veces, GRACIAS!!!

A mis compañeros de la cátedra de Anatomía e Histología; Francisco, Yamil, Antonio, Juani, Virginia, Adriana, Silvina, Marinita, Sara, Jorge, Micaela, Vicky, Denise y Federico. Gracias por ayudarme a progresar como docente, y permitir que haga con libertad algo que disfruto enormemente.

A mis compañeros de la cátedra de Fisiología: Gustavo, Alejandro, Belén, Nicolás, Romina C., Romina A, Paola, Alejandro.

Quiero agradecerle también, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por el apoyo económico, y a la Facultad de Ciencias Exactas por brindarme el lugar para desarrollar este trabajo.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

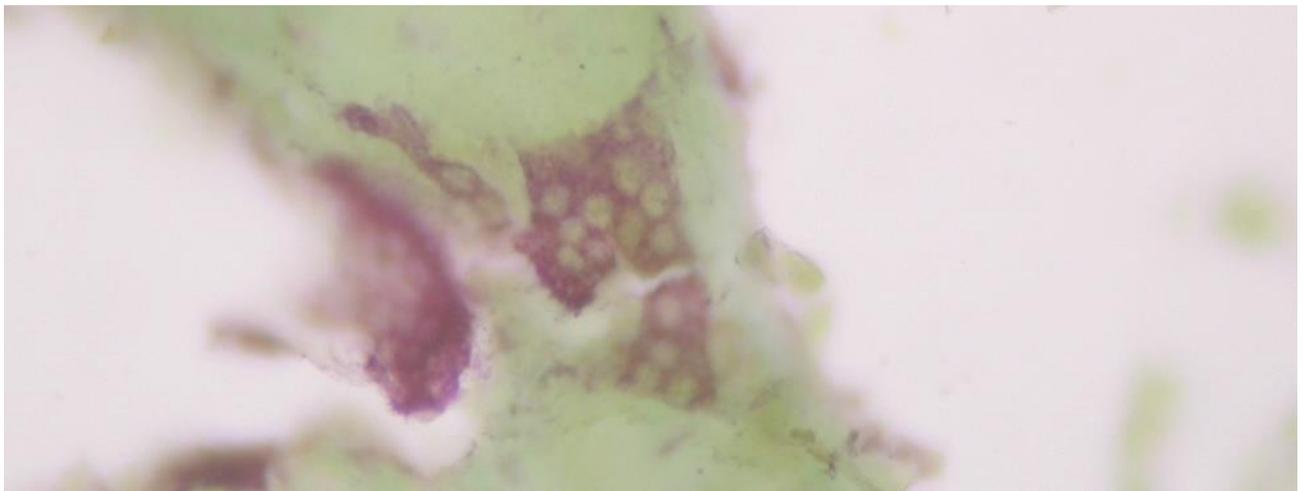
I. INTRODUCCIÓN TEÓRICA	02
I. 1. Tejido óseo	02
<i>I. 1. 1. Organización del tejido óseo</i>	02
I. 1. 1. 1. Estructura macroscópica	02
I. 1. 1. 2. Estructura microscópica	04
<i>I. 1. 2. Componentes del tejido óseo: matriz y células</i>	06
I. 1. 2. 1. Matriz ósea	06
I. 1. 2. 2. Células del tejido óseo	07
a. Células osteoprogenitoras de médula ósea	08
b. Osteoblastos	11
c. Osteocitos	12
d. Osteoclastos	14
e. Células de revestimiento óseo	17
<i>I. 1. 3. Mineralización de la matriz ósea</i>	17
<i>I. 1. 4. Formación ósea</i>	18
I. 1. 4. 1. Osificación intramembranosa	18
I. 1. 4. 2. Osificación endocondral	18
<i>I. 1. 5. Modelado y remodelado óseo</i>	21
<i>I. 1. 6. Fisiología del tejido óseo</i>	24
I. 2. Diabetes mellitus	28
<i>I. 2. 1. Definición y descripción de la enfermedad</i>	28
<i>I. 2. 2. Clasificación de la diabetes mellitus</i>	29
I. 2. 2. 1. Diabetes mellitus tipo 1	29
I. 2. 2. 2. Diabetes mellitus tipo 2	30
<i>I. 2. 3. Mecanismos patogénicos de la Diabetes mellitus tipo 2</i>	31
<i>I. 2. 4. Complicaciones de la Diabetes mellitus</i>	32
I. 2. 4. 1. Complicaciones agudas	32
I. 2. 4. 2. Complicaciones crónicas	33

<i>I. 2. 5. Metabolismo óseo y Diabetes mellitus</i>	34
I. 2. 5. 1. Generalidades	34
I. 2. 5. 2. Densidad mineral ósea	35
I. 2. 5. 3. Fisiopatología del mayor riesgo de fracturas en Diabetes mellitus tipo 2	36
<i>I. 2. 6. Posibles tratamientos de la Diabetes mellitus tipo 2</i>	37
I. 3. Saxagliptina	38
<i>I. 3. 1. Incretinas</i>	38
<i>I. 3. 2. Saxagliptina: mecanismo de acción</i>	40
<i>I. 3. 3. Farmacología</i>	41
<i>I. 3. 4. Efectos adversos</i>	41
I. 4. Metformina	42
<i>I. 4. 1. Aspectos generales</i>	42
<i>I. 4. 2. Mecanismo de acción</i>	42
<i>I. 4. 3. Farmacología</i>	43
<i>I. 4. 4. Efectos sobre el tejido óseo</i>	43
<i>I. 4. 5. Efectos adversos</i>	44
I. 5. Terapia de combinación: saxagliptina y metformina	45
I. 6. Modelos animales para el estudio de la Diabetes mellitus tipo 2	46
<i>I. 6. 1. Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina y nicotinamida(STZ-NA)</i>	47
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54
III. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	56
III. 1. Objetivo	56
III. 2. Diseño experimental	56

<i>III. 2. 1. Drogas y reactivos</i>	56
<i>III. 2. 2. Modelo animal de diabetes con déficit parcial de insulina.</i>	57
<i>III. 2. 3. Tratamientos farmacológicos</i>	57
<i>III. 2. 4. Parámetros bioquímicos determinados</i>	60
<i>III. 2. 5. Análisis histomorfométrico de los fémures</i>	60
a. Procesamiento de los fémures	60
b. Coloraciones histológicas	60
c. Parámetros histomorfométricos estáticos	63
<i>III. 2. 6. Análisis estadístico</i>	64
III. 3. Resultados de los estudios <i>in vivo</i>	65
<i>III. 3. 1. Determinación de parámetros bioquímicos</i>	65
<i>III. 3. 2. Estudio histomorfométrico de los fémures en las diferentes condiciones experimentales</i>	66
a. Volumen de hueso trabecular	68
b. Densidad de osteoblastos	69
c. Densidad de osteocitos	71
d. Densidad de adipocitos	73
e. Densidad de osteoclastos	74
f. Altura de la placa de crecimiento epifisaria	77
IV. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	79
IV. 1. Objetivos	79
IV. 2. Diseño experimental	79
<i>IV. 2. 1. Drogas y reactivos</i>	79
<i>IV. 2. 2. Modelos de cultivo celular empleados</i>	80
a. Preostoblastos MC3T3E1	80
b. Obtención de células progenitoras de médula ósea.	81
<i>IV. 2. 3. Protocolos experimentales</i>	81
IV. 2. 3. 1. Ensayo de proliferación celular	81

IV. 3. 2. 2. Ensayo de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico	82
a. Determinación de la producción de colágeno tipo I	83
b. Determinación de la producción de nódulos de mineral	83
IV. 2. 3. 3. Determinación de diferentes proteínas marcadoras por western blot	84
IV. 2. 4. <i>Análisis estadístico</i>	85
IV. 3. Resultados de los estudios <i>in vitro</i>	86
IV. 3. 1. <i>Efecto de la saxagliptina sobre la proliferación de células óseas en cultivo</i>	86
IV. 3. 2. <i>Efecto de la saxagliptina sobre la activación de quinasas reguladas extracelularmente (ERK)</i>	88
IV. 3. 3. <i>Efecto de la saxagliptina sobre la diferenciación osteoblástica de MC3T3E1 y CPMO</i>	90
a. Efecto de la saxagliptina sobre la producción de colágeno tipo I	90
b. Efecto de la saxagliptina sobre la producción de nódulos de mineralización	91
c. Efecto directo de la saxagliptina sobre la expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipogénicos en CPMO	92
IV. 3. 4. <i>Efecto de la combinación de saxagliptina con metformina sobre la diferenciación osteogénica MC3T3E1 y CPMO</i>	94
a. Efectos de la co-incubación con metformina sobre la proliferación celular de MC3T3E1 y CPMO	94
b. La metformina previene la inhibición causada por la saxagliptina sobre la diferenciación osteoblástica	95
c. Efecto del co-tratamiento saxagliptina-metformina sobre la expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipogénicos en CPMO	97

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	102
V. 1. Discusión	102
V. 2. Conclusiones	109
VI. BIBLIOGRAFÍA	111



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Tejido óseo.

El tejido óseo junto con el tejido cartilaginoso son los responsables de formar el esqueleto. Desde el punto de vista arquitectónico, el tejido óseo es único en cuanto a presentar gran dureza y fortaleza con el mínimo peso posible, y por otro lado poseer cierta elasticidad. Proporciona al esqueleto la fuerza necesaria para cumplir con su principal función, la de ser *órgano de sostén*, dado que actúa como sitio de inserción de los músculos y a la vez, brinda cierta rigidez al organismo. El esqueleto tiene importantes funciones protectoras al proporcionarle al cerebro y médula espinal un estuche óseo resistente, así como también lo hace con parte de los órganos del tórax y abdomen. Además, contiene el 99% de la reserva de calcio del organismo, siendo responsable del mantenimiento de la homeostasis del calcio y fósforo (Geneser, F., 2006).

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado, formado por células y una matriz ósea extracelular que posee componentes orgánicos e inorgánicos. Una particularidad de este tejido que hace a su función, es que los componentes extracelulares sufren calcificación, lo que les confiere dureza. El mineral es fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Estos cristales son pequeños y contienen numerosas impurezas tales como carbonato, magnesio y fosfatos ácidos. Las sales minerales se depositan por cristalización en el entramado formado por las fibras de colágeno durante el proceso de mineralización, como se detallará más adelante (Ross, M.H. y Pawlina, W., 2007).

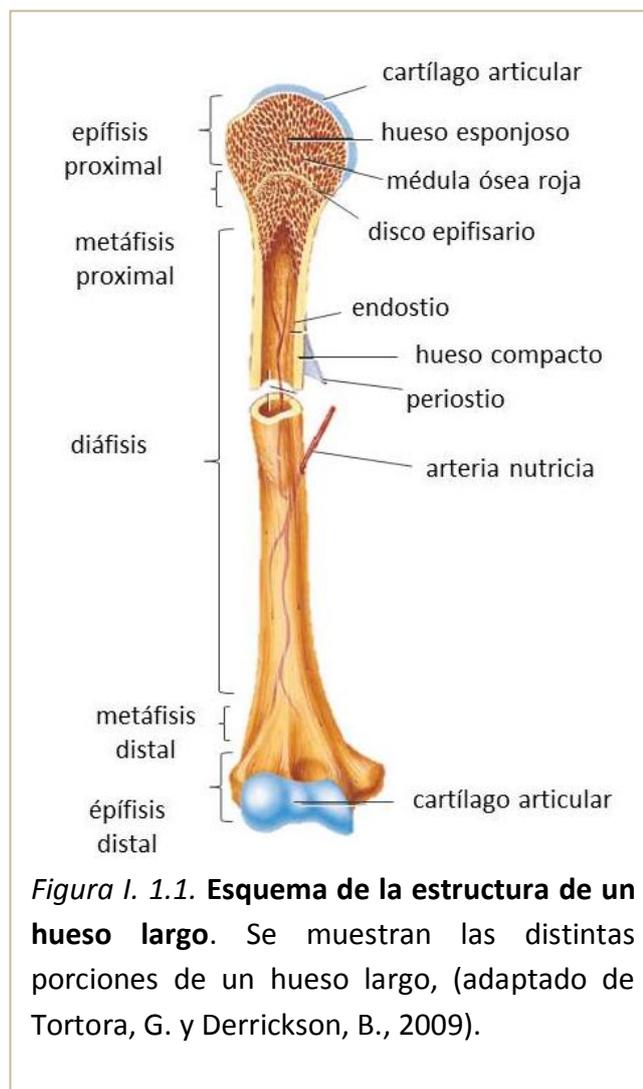
I. 1. 1. Organización del tejido óseo.

I. 1. 1. 1. Estructura macroscópica.

Los huesos son órganos dinámicos constituidos principalmente por tejido óseo (aunque también participan otros tejidos conectivos). Anatómicamente, se pueden clasificar según su forma en huesos **planos**, como los del cráneo; huesos **cortos**, como los que forman parte del esqueleto de los pies y de las manos; huesos **largos** como el fémur, la tibia y el húmero; y

huesos **irregulares**, como por ejemplo el sacro o las vértebras (Testut, L. y Latarjet, A., 1983). Se describirán con detalle los huesos largos, debido a que son de interés en el presente trabajo de tesis.

Los huesos largos presentan diferentes regiones anatómicas: la zona central o cuerpo se denomina **diáfisis**; los dos extremos ensanchados o terminaciones del hueso se llaman **epífisis**, y la región que se corresponde con la unión de la diáfisis y la epífisis, se denomina **metáfisis**. En los huesos que todavía no finalizaron su período de crecimiento, encontramos una zona denominada **disco epifisario o placa de crecimiento epifisaria**, formada por cartílago hialino. A partir de este cartílago, y mediante un complejo proceso de formación ósea llamado *osificación endocondral*, los huesos incrementan su largo. Una vez que culmina su crecimiento, el disco epifisario se cierra, dejando una delgada línea entre la metáfisis y la epífisis (*figura I. 1. 1.*).



Externamente, recubriendo la epífisis donde el hueso articula con otro hueso, se encuentra cartílago hialino dispuesto en una delgada capa denominada **cartílago articular**. La superficie del hueso no cubierta por cartílago está rodeada por el **periostio**, una membrana de tejido conectivo denso, esencial en el crecimiento óseo, su reparación y nutrición; además constituye la zona de inserción de músculos que permiten la locomoción y sostén del cuerpo. Internamente está la **cavidad medular**, un espacio ubicado en la parte central del hueso que contiene la médula ósea roja encargada de la hematopoyesis y tejido adiposo. El **endostio** es una delgada capa de células planas que recubren la cara interna del hueso cortical y se extiende hacia el hueso trabecular. Además, tapiza unos conductos que se encuentran en el interior del tejido, denominados conductos de Havers y de Volkmann (Geneser, F., 2006).

Desde el punto de vista macroscópico, el tejido óseo se organiza de dos formas diferentes: el tejido óseo **cortical (compacto o laminar)** y el tejido óseo **trabecular (o esponjoso)**. El tejido óseo cortical se aprecia, como una masa compacta; mientras que el segundo, está compuesto por finas láminas de tejido óseo, las trabéculas, que se entrecruzan en distintas direcciones estableciendo contacto en puntos discretos para formar un reticulado cuyos espacios son ocupados por la médula ósea. Todos los huesos se componen de tejido óseo cortical y trabecular, aunque en cantidad y distribución muy variable (Clarke, B., 2008).

I. 1. 1. 2. Estructura microscópica.

A una escala microscópica, tanto el hueso compacto como el esponjoso se arreglan en estructuras básicas denominadas **osteonas o sistema de Havers**. Una **osteona cortical** tiene forma de cilindro, y se compone de alrededor de 15 láminas de tejido óseo, que en un corte transversal, se visualizan como anillos concéntricos que rodean un conducto. Las láminas de tejido se forman en su mayor parte por fibras de colágeno tipo I que transcurren paralelas en cada lámina, pero con diferente dirección de las fibras de las láminas vecinas. Los osteocitos son células inmersas en la matriz ósea, y se disponen concéntricamente al conducto, denominado *conducto de Havers (figura I. 1. 2.)*. A través de estos conductos, transcurren vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas y tejido conectivo. Asimismo, se encuentran zonas irregulares de tejido óseo laminar denominadas *laminas intersticiales*, que son restos de

osteonas que fueron parcialmente degradadas. Existe otro sistema de canales conductores de vasos, los conductos de Volkmann, que comunican los conductos de Havers entre sí y con la superficie externa e interna del hueso. Éstos atraviesan el tejido óseo en sentido casi transversal, y permiten la comunicación de los vasos de los conductos de Havers con los vasos del periostio y endostio respectivamente (*figura I. 1. 2.*).

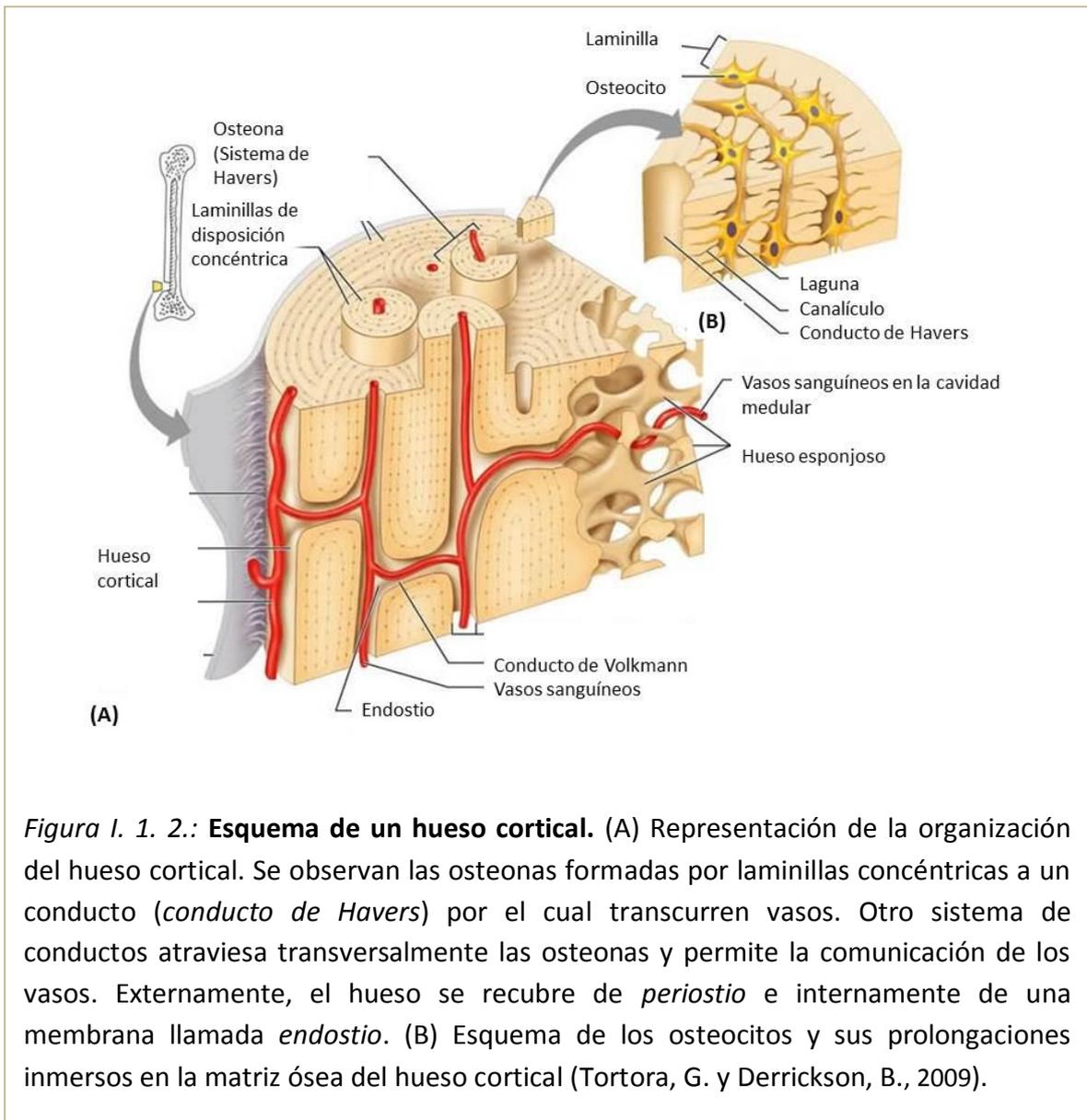
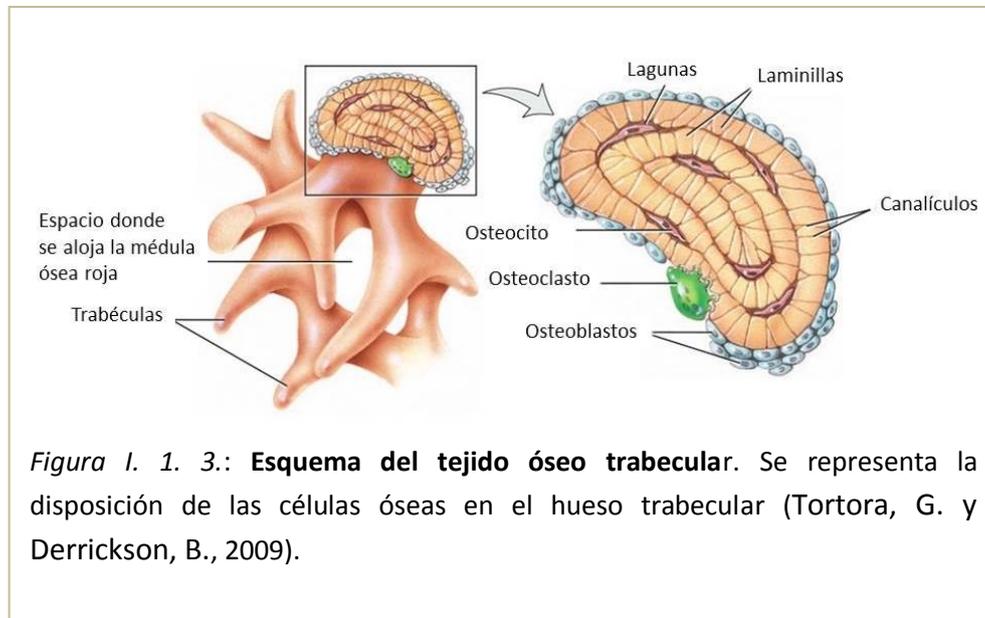


Figura I. 1. 2.: Esquema de un hueso cortical. (A) Representación de la organización del hueso cortical. Se observan las osteonas formadas por laminillas concéntricas a un conducto (*conducto de Havers*) por el cual transcurren vasos. Otro sistema de conductos atraviesa transversalmente las osteonas y permite la comunicación de los vasos. Externamente, el hueso se recubre de *periostio* e internamente de una membrana llamada *endostio*. (B) Esquema de los osteocitos y sus prolongaciones inmersos en la matriz ósea del hueso cortical (Tortora, G. y Derrickson, B., 2009).

El tejido óseo trabecular también está compuesto por láminas, pero no se observan conductos de Havers ni de Volkmann (*figura I. 1. 3.*). El elemento básico estructural del tejido óseo trabecular es la **osteona trabecular**. Esta estructura tiene forma de disco plano, de

espesor muy variable, pero por lo general no más de 0,2-0,4 mm para permitir la difusión de nutrientes (Geneser, F., 2006).



I. 1. 2. Componentes del tejido óseo: matriz y células.

I. 1. 2. 1. Matriz ósea

La matriz extracelular se compone de una *matriz orgánica* y *sales inorgánicas*. El componente *orgánico* del hueso constituye el 40% del peso seco y está compuesto de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, fosfolípidos y fosfoproteínas. La matriz *inorgánica*, compone el 60% restante del peso seco del hueso y se compone principalmente de hidroxiapatita de calcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). La dureza y la resistencia del tejido a la compresión se deben al contenido de sales inorgánicas, mientras que sus propiedades elásticas y de resistencia a la tracción dependen del colágeno.

La *matriz orgánica* está formada por fibras de colágeno y proteínas no colágenas incluidas en una sustancia fundamental, formada esencialmente por proteoglicanos. Esta matriz contiene principalmente fibras de colágeno tipo I y en menor medida, el colágeno de tipo V. Se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos III, XI y XIII. El colágeno representa aproximadamente el 90% de la matriz. El resto está constituido por las proteínas no

colágenas que son indispensables para el desarrollo, crecimiento y reparación del hueso. Son sintetizadas por las células óseas, y se pueden dividir en tres grupos (Ross, M.H. y Pawlina, W., 2007):

- Proteínas *glicosiladas*, como la fosfatasa alcalina, osteonectina, tetranectina, tenascina-C y tenascina-W.
- *Glucoproteínas multiadhesivas*, como la osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, vitronectina, fibrilina 1 y 2, entre otras.
- *Proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas*, que incluye a la **osteocalcina**, que captura el calcio desde la circulación, atrae y estimula los osteoclastos. Esta proteína, de 5 kDa conocida también como proteína Gla ósea (BGP), la producen células de la estirpe osteoblástica y se relaciona con el proceso de mineralización ósea. Posterior a su síntesis, la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso pero pequeñas cantidades se liberan a la circulación.

Adicionalmente, en la matriz ósea existen espacios de disposición concéntrica al conducto de Havers, denominados lagunas u osteoplastos. Allí están confinadas las células más abundantes de este tejido, los **osteocitos**.

1. 2. 2. Células del tejido óseo.

Las células principales del tejido óseo son los **osteoblastos**, los **osteocitos** y los **osteoclastos**; además se pueden encontrar **células de revestimiento óseo** tapizando las superficies óseas. Los *osteoblastos* son las células responsables de la formación de hueso (osteogénesis), mientras que los *osteoclastos* son las encargadas de la resorción ósea (Safadi, F.F. et al., 2009). Los *osteocitos* son células inmersas en la matriz ósea (Hekimsoy, Z., 2008). Con excepción del osteoclasto, cada una de estas células puede considerarse una forma diferenciada de las **células progenitoras**, como se representa en el siguiente esquema (*figura 1. 4.*):

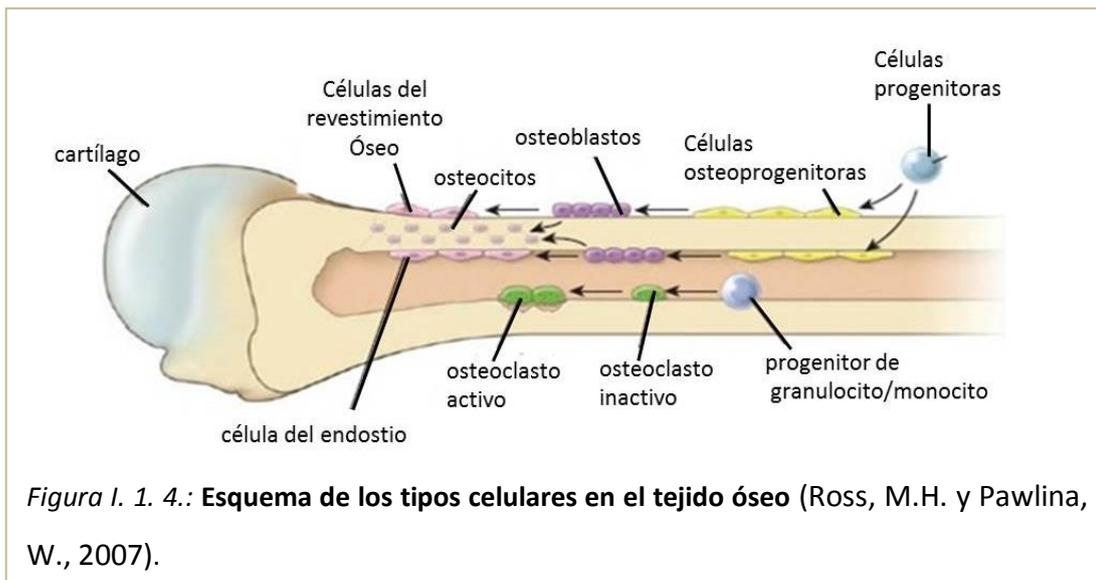
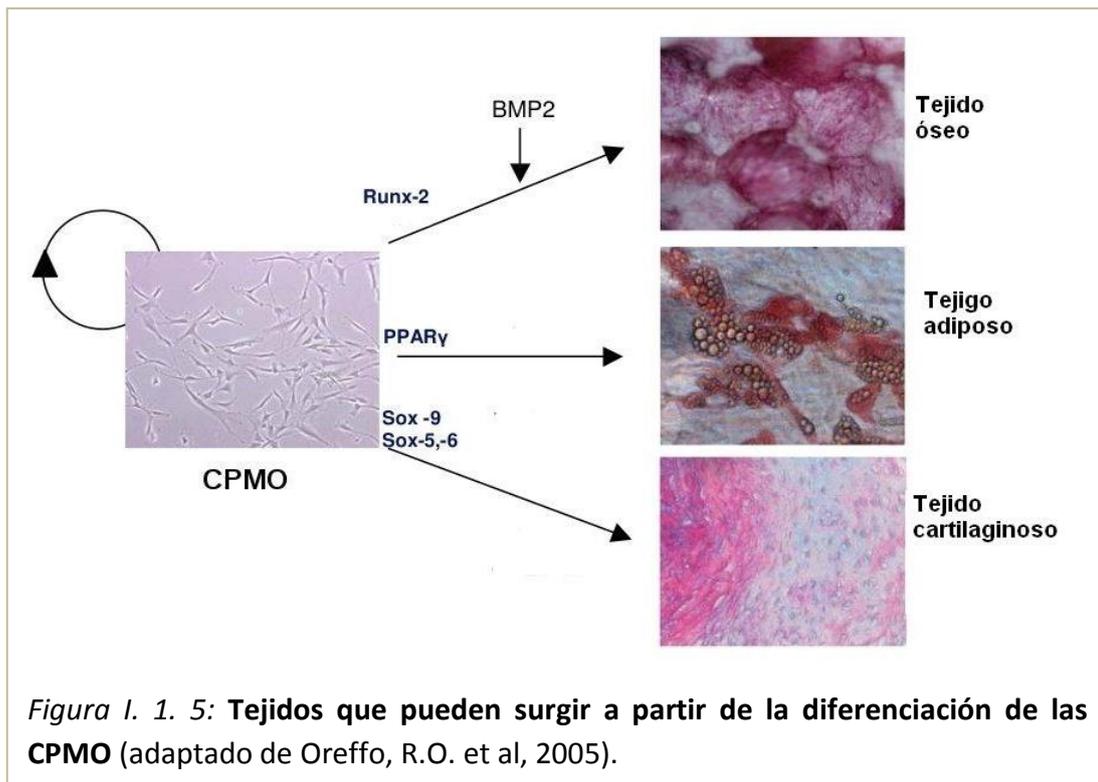


Figura I. 1. 4.: Esquema de los tipos celulares en el tejido óseo (Ross, M.H. y Pawlina, W., 2007).

a. Células progenitoras de médula ósea.

Se conoce con el nombre de células progenitoras de médula ósea (**CPMO**) a un grupo de células indiferenciadas que tienen un alto potencial proliferativo y que presentan dos características fundamentales: la habilidad de auto-renovarse, es decir de formar células idénticas a las células originales; y la capacidad de generar uno o más tipos celulares tales como el tejido cartilaginoso, óseo, y adiposo, que desempeñan funciones especializadas en el organismo (Spencer, N.D. et al., 2010).

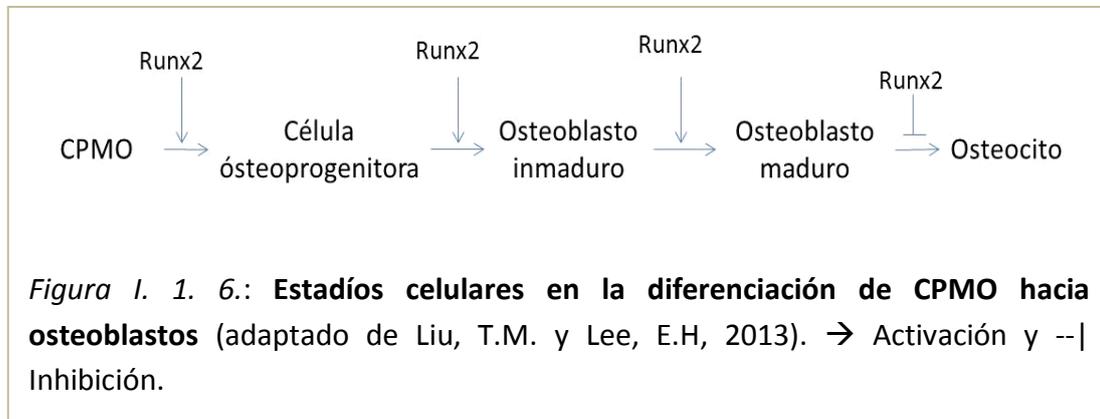
El compromiso de CPMO hacia un tipo celular u otro, depende de la acción de diferentes factores de transcripción así como también de señales extracelulares e intracelulares. Los inductores de la diferenciación hacia un linaje pueden inhibir la diferenciación de las células hacia un linaje alternativo (Viccica, G. et al, 2010), y dependiendo de tipo de factor expresado, el proceso de diferenciación tomará uno u otro camino (*figura I. 1. 5.*).



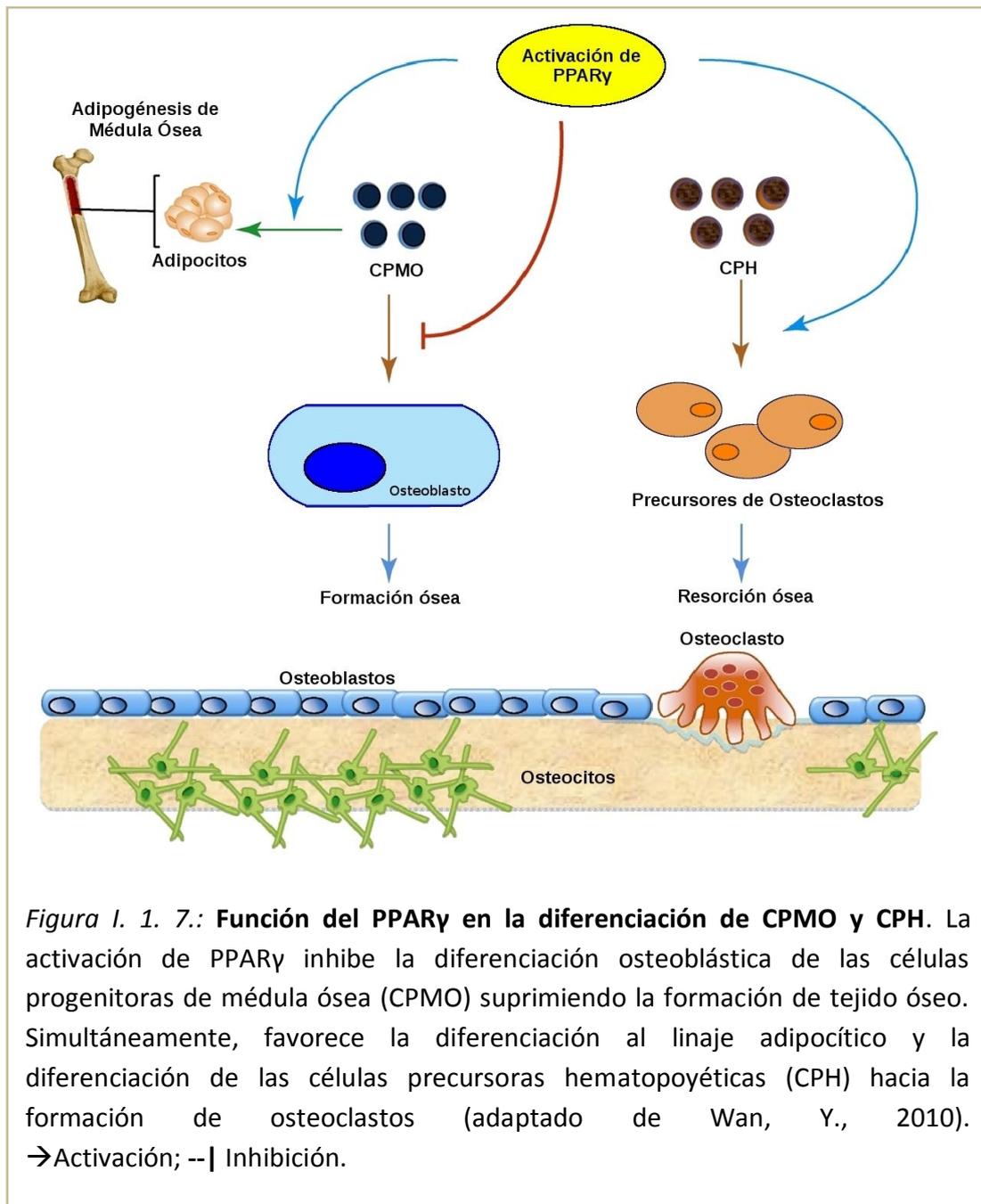
Diferenciación a osteoblastos.

La osteogénesis es el proceso de formación de tejido óseo nuevo. Este proceso requiere una población de células capaces de responder a estímulos moleculares que direccionen la diferenciación a células formadoras de hueso. El principal regulador de la maduración osteoblástica es el factor de unión nuclear alfa (**CBFA1**), también llamado **Runx-2**. Es un factor de transcripción que pertenece a la super-familia de proteínas con dominio homólogo Runt, contiene un dominio N-terminal rico en glutamina y alanina, y un dominio C-terminal rico en prolina/serina/treonina. Varios estudios han demostrado que el Runx-2 controla la expresión de la mayoría de los genes que codifican para las proteínas de la matriz ósea como por ejemplo: colágeno tipo I, osteopontina, sialoproteínas, osteocalcina y fibronectina, por lo tanto su expresión es indispensable para que las células progenitoras se desarrollen hacia el linaje osteoblástico (Franceschi, R. T. y Xiao, G., 2003; Dalle Carbonare, L. et al, 2012). Además, este factor interactúa con vías de señalización regulando fuertemente el proceso de diferenciación osteoblástica. En los seres humanos, la haploinsuficiencia de Runx-2 provoca retrasos en la osificación del cráneo y la formación de los huesos (Dalle Carbonare, L. et al., 2012). Sin

embargo, se ha encontrado que es suprimido en la maduración tardía de los osteocitos (*figura I. 1. 6*) (Liu, T.M. y Lee, E.H., 2013).



Contrariamente, el receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR γ), miembro de la superfamilia de receptores nucleares, es un factor que se considera como un interruptor metabólico para las células progenitoras tanto del linaje hematopoyético como del linaje mesenquimal. La activación de PPAR γ favorece la diferenciación de las células progenitoras hacia el linaje adipocítico, así como también el desarrollo osteoclástico estimulando las células precursoras de monocitos, como se esquematiza en la *figura I. 1. 7*. Participa regulando varios procesos fisiológicos como la adipogénesis, el metabolismo lipídico, la sensibilidad a la insulina y la inflamación. Se encuentra involucrado en diversas patologías como la diabetes, la obesidad y la aterosclerosis (Burgermeister, E. y Seger, R., 2008; Wan, Y., 2010).



b. Osteoblastos.

Los osteoblastos son células cúbicas, encargadas de formar tejido óseo. Se encuentran ubicadas en las superficies óseas de revestimiento de activa formación. Ultra-estructuralmente, son células productoras de proteínas, con un extenso desarrollo del retículo endoplasmático rugoso, un gran aparato de Golgi y numerosas mitocondrias.

Las características fenotípicas de los osteoblastos dependen de su etapa de diferenciación. Estas células formadoras de hueso sintetizan y secretan colágeno de tipo I así como también la mayoría de las proteínas de la matriz ósea y la sustancia fundamental. También están involucradas en la mineralización de esta matriz a través de la secreción de fosfatasa alcalina que favorece la deposición de fosfato de calcio siendo la actividad de esta enzima uno de los primeros marcadores del fenotipo osteoblástico (Safadi, F.F. et al., 2009).

Otra función clave de los **osteoblastos** es la producción de citoquinas y factores de crecimiento indispensables para la regulación de la formación y diferenciación de los **osteoclastos**, células encargadas de resorber hueso. Entre ellos encontramos al Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa (RANK-L), el factor estimulante de colonias (M-CSF), el TNF- α , interleuquinas y la osteoprotegerina (OPG) (Rosenberg, N. et al., 2012).

La osteoblastogénesis es estimulada principalmente por factores tanto sistémicos (estrógenos, hormona de crecimiento, PTH, insulina) como locales, sintetizados y secretados por los propios osteoblastos (*factor de crecimiento transformante* (TGF- β), *proteínas óseas morfogenéticas* (BMPs), *factores de crecimiento derivados de plaquetas* (PDGF), y *el factor de crecimiento similar insulina-1* (IGF-1) (Rosenberg, N. et al., 2012).

Un vez que finaliza la formación de hueso, los osteoblastos pueden incorporarse en su propio osteoide y continuar la diferenciación hacia osteocito (célula ósea madura); o transformarse en células de muy baja actividad (célula ósea de revestimiento óseo) o incluso continuar hacia el proceso de muerte celular programada.

c. **Osteocitos.**

Los osteocitos constituyen más del 90% de todas las células óseas en el esqueleto adulto. Se encuentran inmersos en la matriz ósea mineralizada y tienen una vida media muy larga (meses), a diferencia de los osteoblastos que solo duran semanas o los osteoclastos que lo hacen días (Hekimsoy, Z., 2008).

Los mecanismos por los cuales los osteoblastos son seleccionados para incorporarse a la matriz y madurar a osteocitos no se conocen completamente pero se encontró que entre un 10% y 20% de los osteoblastos se diferencian a osteocitos. Este proceso dura alrededor de 72 horas, e involucra modificaciones en las células: aumentan su tamaño al producir matriz

extracelular, se redistribuyen los componentes celulares, cambia la forma de la célula de cúbica a estrellada emitiendo prolongaciones en múltiples direcciones (también llamadas dendritas) (figura 1. 1. 8.) (Hekimsoy, Z., 2008). Cada osteocito tiene en promedio 50 prolongaciones citoplasmáticas, que transcurren por la matriz mineralizada en "túneles" delgados llamados canalículos. De esta manera, los osteocitos pueden comunicarse entre sí y con las células que se encuentran en la superficie del hueso (Bonewald, L.F., 2011).

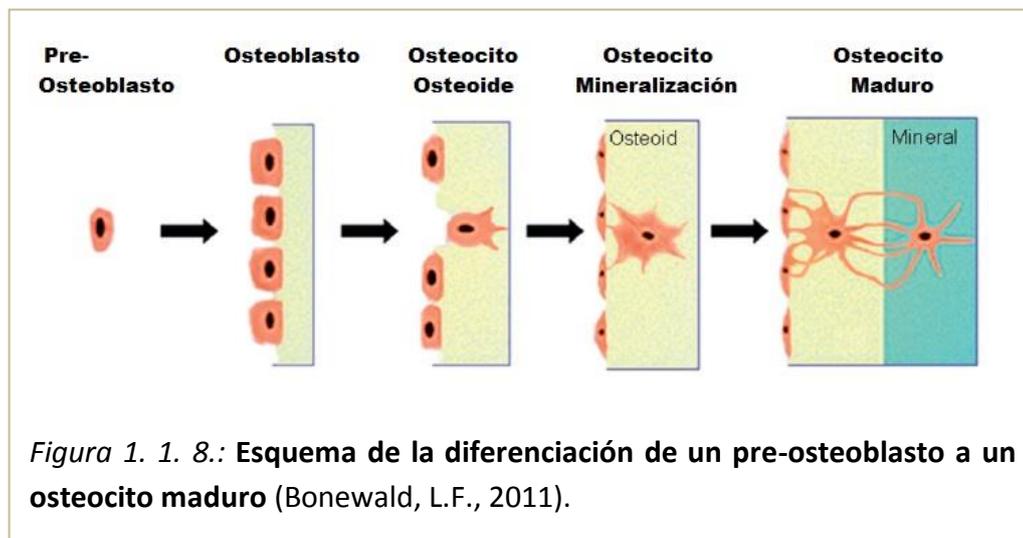


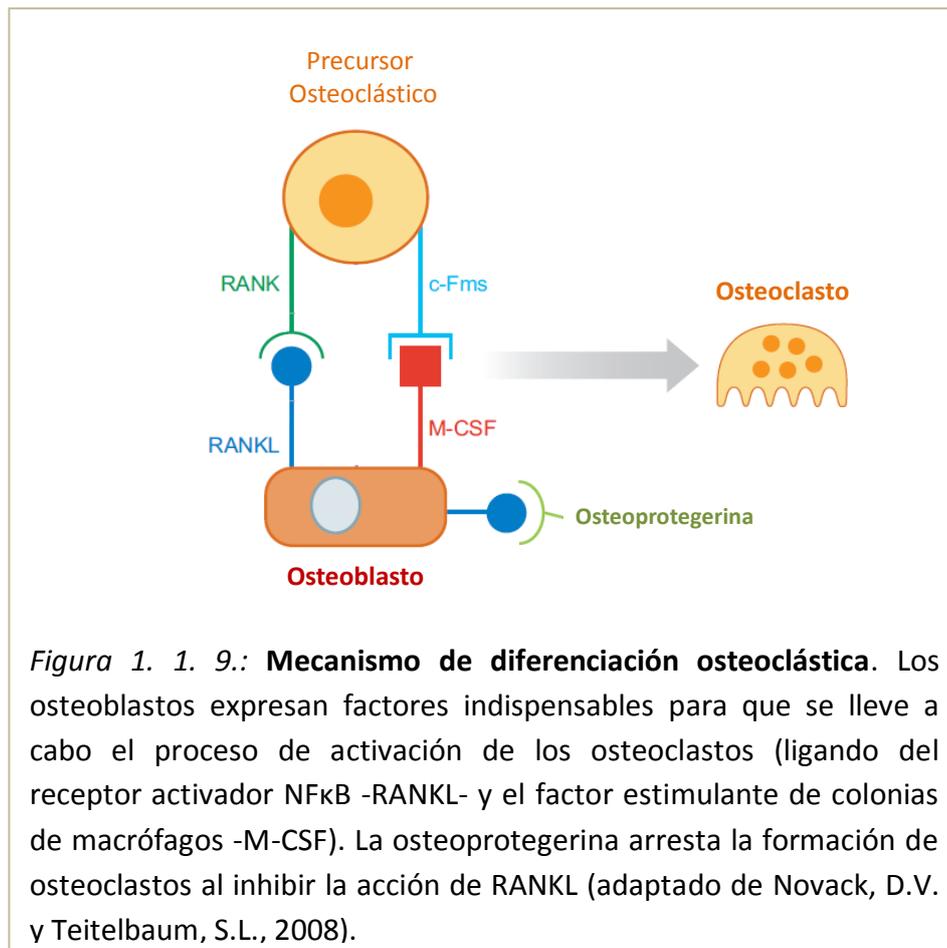
Figura 1. 1. 8.: Esquema de la diferenciación de un pre-osteoblasto a un osteocito maduro (Bonewald, L.F., 2011).

La red de osteocitos proporciona una organización funcional capaz de responder a los distintos estímulos de manera de mantener la homeostasis ósea (Dalle Carbonare, L. et al., 2012). Participan en la regulación del remodelado óseo a través regulación de los osteoclastos y la actividad de los osteoblastos así como también son fuente de factores solubles. Además, estas células tienen la capacidad de degradar la matriz que tienen a su alrededor por un proceso denominado *osteólisis osteocítica*, que juega un rol importante en el metabolismo del fosfato y la disponibilidad de calcio (Bonewald, L.F., 2011).

La apoptosis de osteocitos puede ocurrir por inmovilización, micro-daño, falta de estrógenos o aumento de citoquinas tales como TNF α . El daño en estas células provoca la liberación de factores que activan la resorción ósea (Knothe Tate, M.L. et al., 2004).

d. Osteoclastos.

Los osteoclastos son células provenientes del linaje monocítico, capaces de erosionar la superficie ósea. En un principio, las células predestinadas a formar osteoclastos expresan en su superficie una molécula receptora llamada Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa β (RANK). Este receptor interactúa con la molécula ligando de RANK (RANK-L) producida por los osteoblastos y sus precursores, como se esquematiza en la *figura 1. 1. 9*. Esta interacción, activa vías de señalización críticas en la diferenciación osteoclástica (MAPK, NF κ B, PI3K). Por su parte, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), también sintetizado por los osteoblastos, promueve la supervivencia y desarrollo de los precursores osteoclásticos, ejerciendo sus acciones a través de un receptor con actividad tirosina kinasa (c-Fms) (*figura 1. 1. 9*) (Novack, D.V. y Teitelbaum, S.L., 2008). El RANKL al unirse a su receptor RANK en la superficie de los precursores de osteoclastos activa señales, c-fos, y NFATc1 (factor nuclear activado por células 1) (Wan, Y., 2010) que inducen la diferenciación a osteoclastos.

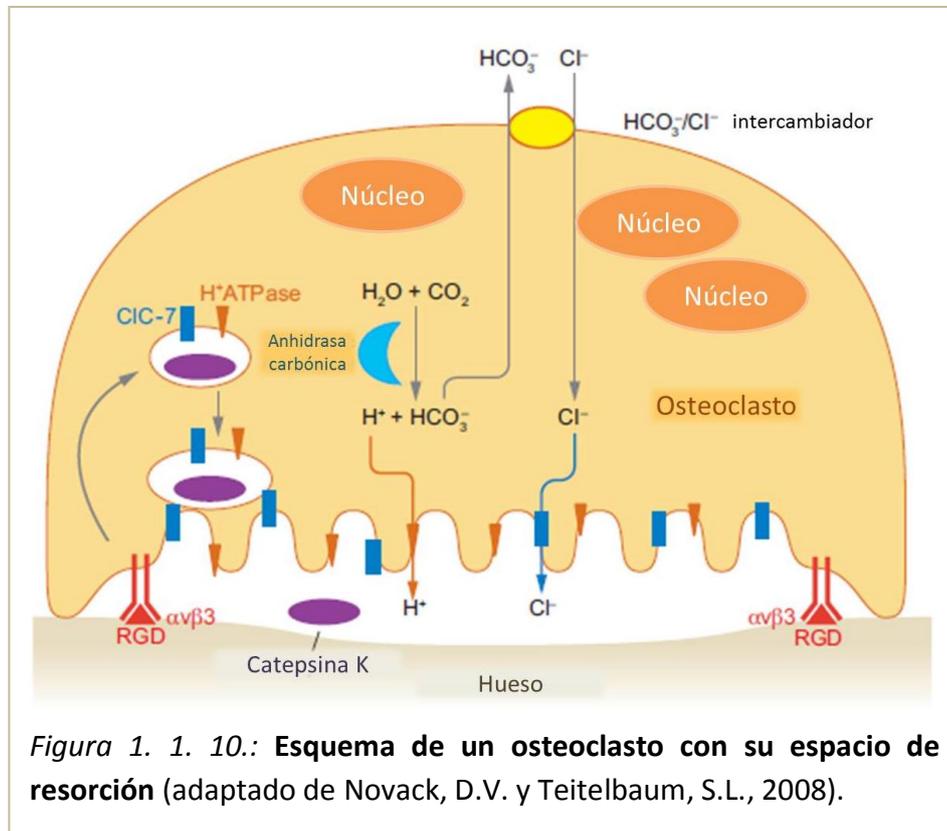


Un osteoclasto maduro es una célula multinucleada, que contiene generalmente de 3-25 núcleos por célula, rica en mitocondrias, de tamaño y forma muy variable. Una vez que esta célula se ancla al tejido óseo, su citoplasma se polariza, ubicando los núcleos en el polo opuesto a la superficie a resorber. El citoplasma tiene además, varios complejos de Golgi y suele contener abundantes vacuolas con enzimas lisosomales (Ross, M.H. y Pawlina, W., 2007).

Los osteoclastos son las únicas células del tejido óseo ricas en fosfatasa ácida tartrato resistente (**TRAP**). Esta particularidad es utilizada para la identificación de estas células tanto *in vitro* como *in vivo* (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I. et al., 2006).

Al microscopio electrónico se demostró que la superficie del osteoclasto que se orienta hacia el tejido óseo presenta un *borde festoneado*, compuesto por profundos plegamientos rodeado por una estructura conocida como anillo de actina, rica en actina fibrilar y otras proteínas de anclaje. Se crea así, un microambiente extracelular entre el hueso y la célula resortiva, que es esencial para que las enzimas secretadas ejerzan su función. En la *figura 1. 1.*

10. se esquematiza un osteoclasto, con su espacio de resorción asociado (Novack, D.V. y Teitelbaum, S.L., 2008).



El proceso de degradación del tejido óseo se inicia con la disolución del mineral de la matriz ósea por disminución del pH en el espacio de resorción. Para ello, la enzima anhidrasa carbónica es la responsable de generar los protones que son enviados, por transporte activo, al espacio de resorción (*figura 1. 1. 10.*). El balance de iones en el osteoclasto se conserva mediante el transporte de cloruros hacia el espacio de resorción y un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en la membrana basolateral (*figura 1. 1. 10.*). Al disolverse el mineral, queda expuesta la matriz orgánica de colágeno la cual es atacada por una enzima proteolítica, la cathepsina K. Durante la resorción ósea, los osteoclastos son capaces de fagocitar los osteocitos, el colágeno y el mineral. Tras la finalización del proceso se cierra la superficie ósea libre con una línea de cemento que se forma inmediatamente después, y el osteoclasto, con movimiento activo, se desplaza con rapidez por la superficie del hueso para comenzar una posible nueva resorción (Novack, D.V. y Teitelbaum, S.L., 2008).

e. Células de revestimiento óseo.

Estas células son aplanadas y se encuentran recubriendo las superficies óseas en zonas donde no hay hueso en formación. Son especialmente frecuentes en adultos y en zonas de envejecimiento óseo ya que corresponden a superficies óseas inactivas. Se consideran como osteoblastos quiescentes, ya que en ciertas condiciones pueden reactivarse para formar osteoblastos funcionales, como por ejemplo durante el remodelado, reparación de fracturas y en ciertos tipos de patologías óseas. Se cree las células de revestimiento 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 (Hekimsoy, Z. 2008).

l. 1. 3. Mineralización de la matriz ósea.

El componente mineral del hueso representa 65% de la masa ósea. Está formado por el calcio, fosfato y carbonato en forma de pequeños cristales de hidroxapatita y, en cantidades más pequeñas, de magnesio, de sodio, de potasio, de manganeso y de fluoruro (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I. et al., 2006).

En el tejido óseo la mineralización es inducida por los osteoblastos, y tiene lugar en pequeñas vesículas extracelulares que poseen muchas enzimas (fosfatasas) que incorporan Ca^{2+} y PO_4^{-3} . La calcificación comienza cuando los fosfatos de calcio cristalino que se encuentran nucleados en el interior de estas vesículas, crecen y, finalmente, rompen la membrana para salir de las mismas. Al microscopio, se observa que los fosfatos de calcio se disponen en estructuras esféricas denominadas "nódulos mineralizados" o "glóbulos calcificantes". Este proceso se denomina "la mineralización de vesículas de matriz". A partir de entonces, los nódulos mineralizados hacen contacto con las fibrillas de colágeno y continúan el proceso de mineralización a lo largo del eje longitudinal de estas fibrillas, proceso llamado "mineralización del colágeno". La mineralización de las de vesículas de matriz junto con la posterior mineralización de colágeno, se conocen como mineralización primaria asociada con la formación ósea.

I. 1. 4. Formación ósea.

La osificación implica formación de tejido óseo y siempre tiene lugar por síntesis y secreción de matriz ósea, que al poco tiempo sufre mineralización. Los huesos del esqueleto se originan por dos procesos: **osificación intramembranosa** u **osificación endocondral**. La principal diferencia entre estos dos tipos de formación ósea radica en la ausencia o presencia de tejido cartilaginoso como intermediario. En la osificación intramembranosa, el hueso es formado en ausencia de cartílago, mientras que el otro tipo de osificación requiere un molde de cartílago que luego es reemplazado por tejido óseo (Shapiro, F., 2008). A continuación, se expondrán brevemente algunas características de cada tipo de osificación.

I. 1. 4. 1. Osificación intramembranosa.

La denominación intramembranosa se debe a que la formación de los huesos comienza dentro de una densa placa membranosa de células del mesénquima. En ciertas zonas, un grupo de células se diferencia a osteoblastos, que poco después comienzan a secretar matriz orgánica para finalmente sufrir una rápida mineralización por depósitos de fosfato de calcio. Los huesos planos del cráneo, partes del maxilar inferior y la mayor parte de la clavícula se desarrollan por osificación intramembranosa (Shapiro, F., 2008).

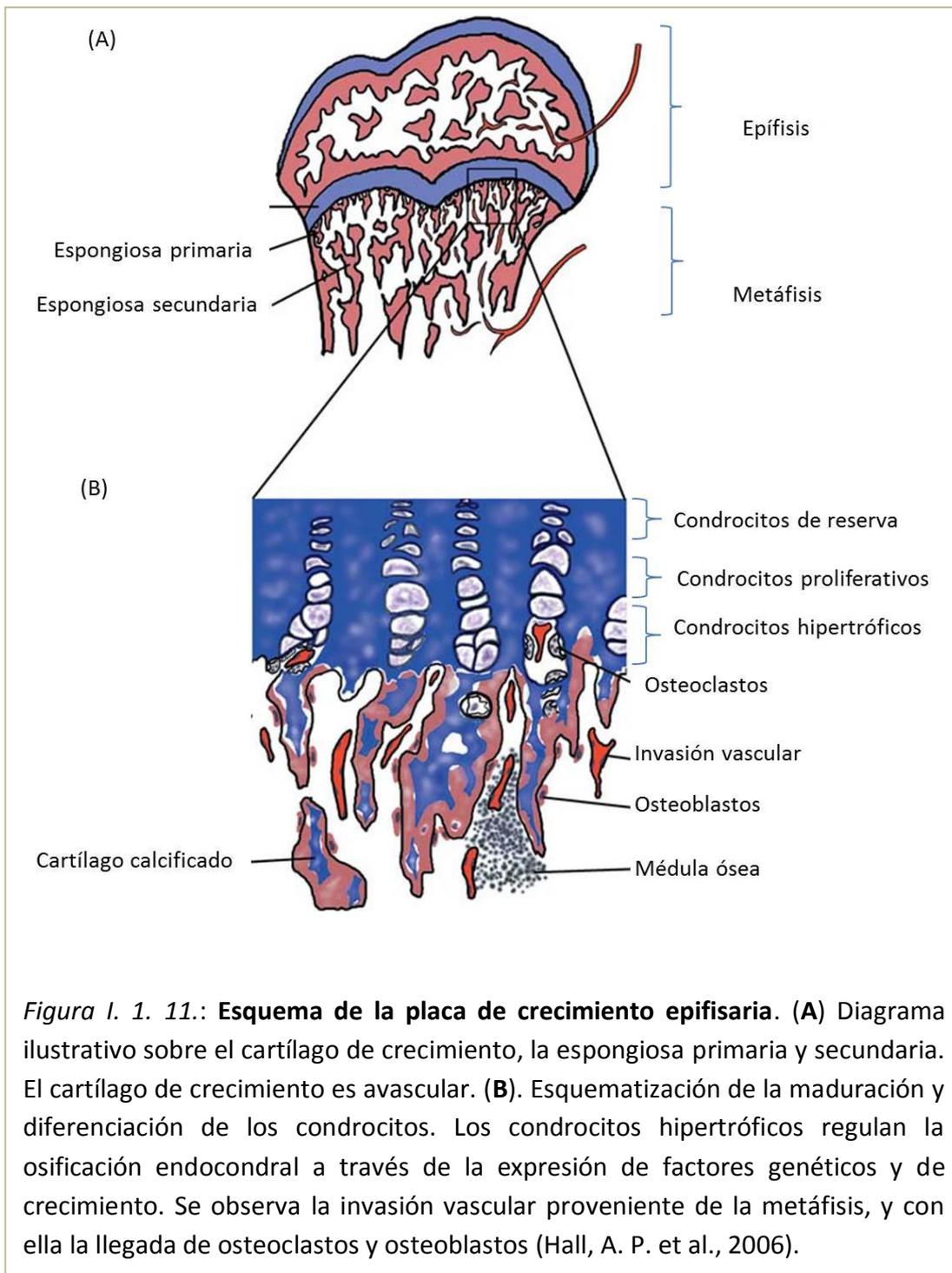
I. 1. 4. 2. Osificación endocondral.

La osificación endocondral es un mecanismo de formación ósea complejo que ocurre en la mayoría de los huesos del organismo. Antes de la formación de los huesos, éstos están representados por un molde de cartílago hialino (Shapiro, F., 2008).

El crecimiento en longitud de los huesos largos ocurre a través del proceso de osificación endocondral. Mientras dure la etapa de crecimiento, la placa de crecimiento epifisaria se mantiene constante mediante el acoplamiento regulado entre la formación de cartílago y la osificación. En el disco epifisario el cartílago hialino se encuentra bien estructurado. Los condrocitos se ordenan en columnas longitudinales, y en un corte transversal del disco se pueden distinguir 5 zonas, desde la epífisis hacia la diáfisis (Geneser, F., 2006):

- a. *Zona de condrocitos de reserva*: no hay proliferación celular ni producción de matriz.
- b. *Zona de condrocitos proliferativos*: los condrocitos sufren mitosis y sintetizan activamente matriz.
- c. *Zona de condrocitos hipertróficos*: los condrocitos aumentan de tamaño y son muy activos metabólicamente. En esta zona se inicia la invasión vascular.
- d. *Zona de calcificación del cartílago*: las células hipertróficas comienzan a degenerarse y la matriz se calcifica. El cartílago calcificado sirve como armazón inicial sobre el que se deposita el tejido óseo nuevo. Los condrocitos ubicados en la parte más proximal de esta zona sufren apoptosis.
- e. *Zona de resorción*: que es la zona más cercana a la diáfisis. El cartílago calcificado está en contacto directo con el tejido conectivo de la cavidad medular. Los vasos sanguíneos invasores dejan al cartílago calcificado en forma de espículas longitudinales.

Dentro de la placa de crecimiento epifisaria, los condrocitos son sometidos a un programa cuidadosamente coordinado de *proliferación*, con síntesis de la matriz, seguido por la *maduración*, la *hipertrofia*, la *calcificación* de la matriz del cartílago y en última instancia la *apoptosis* de condrocitos (como se esquematiza en la *figura I. 1. 11.*). Este proceso depende críticamente de la invasión vascular que se produce en la interfase cartílago-hueso. Los condrocitos hipertróficos depositan minerales y degradan parcialmente la matriz extracelular antes de su apoptosis. Las células que migran hacia la epífisis desde el espacio de la médula también contribuyen a la degradación de la matriz extracelular mediante la secreción de metaloproteinasas. La invasión vascular permite el acceso y diferenciación de otras células, en particular los osteoblastos y osteoclastos, que utilizan la matriz mineralizada de cartílago que dejaron los condrocitos apoptóticos como andamio para la formación ósea. Los osteoclastos degradan matriz calcificada que dejaron los condrocitos mientras que los osteoblastos se diferencian en las placas de cartílago mineralizado para establecer de tejido óseo inmaduro (Hall, A. P. et al., 2006).



En cualquiera de los procesos de osificación (intramembranoso o endocondral), primero se genera un hueso inmaduro, que luego por el mecanismo de **remodelado** óseo formará hueso maduro. El hueso primario (inmaduro) se caracteriza por una organización irregular de fibras de

colágeno y es mecánicamente débil. El hueso maduro, se identifica por una alineación regular paralela de colágeno en láminas (lamelas) y es mecánicamente fuerte.

I. 1. 5. *Modelado y remodelado óseo.*

Los huesos son esculpidos por un proceso llamado *modelado óseo* y a su vez están constantemente renovándose, mediante un proceso llamado *remodelado óseo*. Este último proceso ocurre durante toda la vida e involucra la resorción del hueso existente y la formación de hueso nuevo. Estos mecanismos son muy importantes por la carga y los esfuerzos a los cuales es sometido el esqueleto.

Modelado

El proceso de modelado óseo es responsable del crecimiento y de la adaptación del hueso al esfuerzo mecánico, requiere de la formación y la eliminación de hueso, y puede ocurrir en localizaciones anatómicas distintas (Raggatt, L. J. y Partridge, N.C., 2010). La modelación se caracteriza porque la formación y resorción son dos actividades *independientes* entre sí, con predominio de la primera. Esto conduce al incremento constante de masa ósea en el período de crecimiento hasta alcanzar un valor máximo entre los 20-25 años (Geneser, F., 2006).

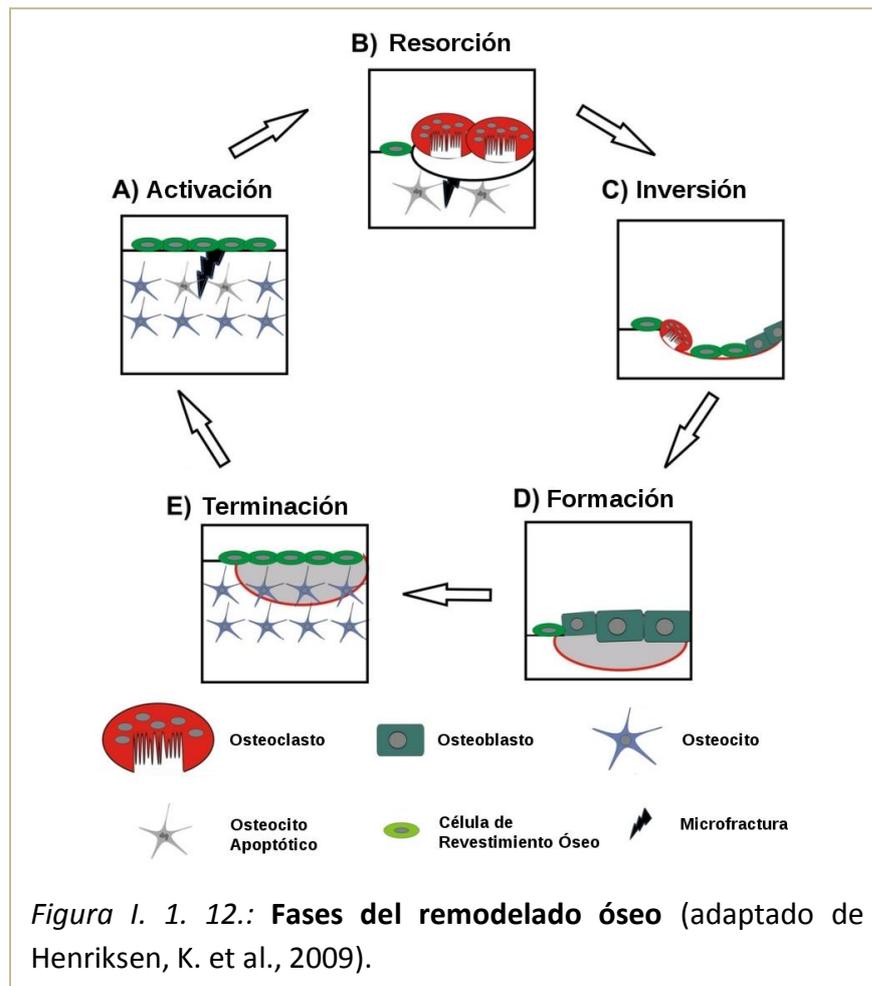
Remodelado

La remodelación comienza en la primera infancia y continúa durante toda la vida, por lo que tiene lugar de manera paralela a la modelación. La actividad de los osteoblastos y los osteoclastos está acoplada, trabajan en conjunto como una unidad, en donde la cantidad de tejido óseo que se resorbe es equivalente a la que se forma (Geneser, F., 2006).

Este evento se encuentra bien coordinado, y exige la sincronización de varias células para asegurar que la resorción ósea y la formación ocurran secuencialmente en la misma localización anatómica de manera de preservar la masa ósea (Raggatt, L.J. y Partridge, N.C., 2010). Los sitios de remodelado a veces son seleccionados al azar pero también son elegidos por áreas que

requieren reparación (Clarke, B., 2008). El proceso consta de cinco fases y se esquematiza en la *figura I. 1. 12.*:

- a. *Activación*: se produce el reclutamiento de los precursores mononucleados de osteoclastos, los cuales son estimulados y diferenciados a osteoclastos maduros activos.
 - b. *Resorción*: fase en la que tiene lugar la degradación del hueso por los osteoclastos.
 - c. *Inversión*: en esta etapa se produce el acoplamiento entre resorción y la reposición de hueso removido, mediante la adecuada señalización.
 - d. *Formación*: los osteoblastos sintetizan matriz orgánica y posteriormente regulan su mineralización. Cuando completan la formación de la matriz algunos quedan inmersos en ella (osteocitos), otros permanecen en la superficie como células óseas de revestimiento o mueren por apoptosis.
 - e. *Terminación*: todavía no se conoce bien como se regula esta etapa, pero se sabe que los osteocitos tienen un rol muy importante al secretar sclerostina, una molécula que impide la activación de la formación de hueso interviniendo con vías de señalización.
-



Las señales que inician la activación pueden ser debidas tanto al daño en la matriz ósea, como a hormonas. Por ejemplo, bajo condiciones basales los osteocitos secretan el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) el cual inhibe la osteoclastogénesis. Sin embargo, la apoptosis de los osteocitos por daño óseo o inmovilización puede disminuir los niveles circulantes de TGF- β y de esta forma favorecer la activación osteoclástica. Otra señal involucrada en la activación del remodelado óseo es el aumento de PTH debido a una disminución de la calcemia. La unión de esta hormona a su receptor en los osteoblastos activa cascadas de señalización las cuales producen y modulan la secreción de moléculas que reclutan precursores osteoclásticos, inducen su diferenciación y activación, para así iniciar la resorción ósea (Henriksen, K. et al., 2009).

Previamente se comentó la estrecha relación entre los osteoblastos y los precursores osteoclásticos. Tanto factores locales como sistémicos modulan el proceso. Las fases de activación y resorción están reguladas por la relación entre el RANKL, la osteoprotegerina

(OPG), IL-1, IL-6, M-CSF, PTH, 1,25-dihidroxi-vitamina D, calcitonina, contribuyendo también los niveles de estrógenos. Durante la fase de inversión, ocurre la transición entre la resorción y la formación. Cuando se completó la remoción, se reclutan a la cavidad preosteoblastos para la formación de hueso nuevo, dando origen a la fase de formación (Deschaseaux, F. et al., 2009).

Las señales de acoplamiento que unen la resorción ósea con el comienzo de la formación de hueso, no se conocen completamente. Las moléculas que podrían estar implicadas en este proceso son: factores derivados de la matriz del hueso tales como TGF- β , IGF-1, IGF-2, BMP o factor de crecimiento de fibroblastos. La formación de hueso toma aproximadamente de 4 a 6 meses en completarse; durante este proceso los osteoblastos sintetizan nueva matriz orgánica de colágeno y regulan la mineralización de la matriz. Cuando la cantidad de hueso resorbido es equivalente a la de hueso nuevo, el ciclo de remodelado concluye. El balance óseo es el equilibrio entre la cantidad de hueso viejo resorbido y la cantidad de hueso nuevo formado. El proceso de remodelación es esencialmente el mismo en el hueso cortical y trabecular. La tasa de recambio óseo cortical en adultos es relativamente baja (2 al 3% por año) pero es suficiente para mantener la resistencia biomecánica del hueso; mientras que en el hueso trabecular es más alta de lo necesario para el mantenimiento de la resistencia mecánica, sugiriendo que el recambio óseo trabecular es más importante para el metabolismo mineral (Clarke, B., 2008; Raggatt, L. J. y Partridge, N.C., 2010).

I. 1. 6. Fisiología del tejido óseo.

La formación de hueso depende de un conjunto de factores locales y sistémicos que actúan de manera coordinada para lograr la correcta proliferación, diferenciación, síntesis y mineralización de la matriz.

Como ya se mencionó, muchos de los factores locales son sintetizados por los osteoblastos (TGFs, BMPs, IGFs), sin embargo, algunos pueden ser secretados en otros tejidos y llegar al hueso a través de la circulación. De esta manera, las variaciones en la expresión de estos factores o de sus receptores pueden ocurrir en respuesta a hormonas sistémicas (McCarthy, T.L. et al., 2000).

Las principales hormonas que regulan el metabolismo óseo son: la hormona de crecimiento, la PTH, calcitonina, estrógenos, glucocorticoides, las hormonas tiroideas y la

insulina. A continuación se desarrollan los efectos de la *insulina* y del *IGF-1* sobre el tejido óseo debido a la implicancia en el presente trabajo de tesis.

Efectos de la insulina sobre el tejido óseo.

La insulina es una hormona anabólica, secretada por las células β del páncreas que tiene acción en la mayoría de los tejidos del organismo. Es la responsable de aumentar la absorción de glucosa en tejido muscular y en el tejido adiposo, e inhibir la producción de glucosa hepática, es por ello que es el principal regulador de la concentración de glucosa en sangre (Saltiel, A. R. y Kahn, C. R., 2001).

La evidencia *in vitro* sugiere que la insulina ejerce efectos anabólicos directos sobre las células óseas. Se sabe que los osteoblastos expresan en la superficie celular un número significativo de receptores de insulina (IRs) con alta capacidad de unión a la hormona. En respuesta a dosis fisiológicas de insulina, los osteoblastos en cultivo muestran una mayor tasa de proliferación, un aumento en la síntesis de colágeno tipo I y de la actividad de la fosfatasa alcalina (Thraillkill, K. et al., 2005).

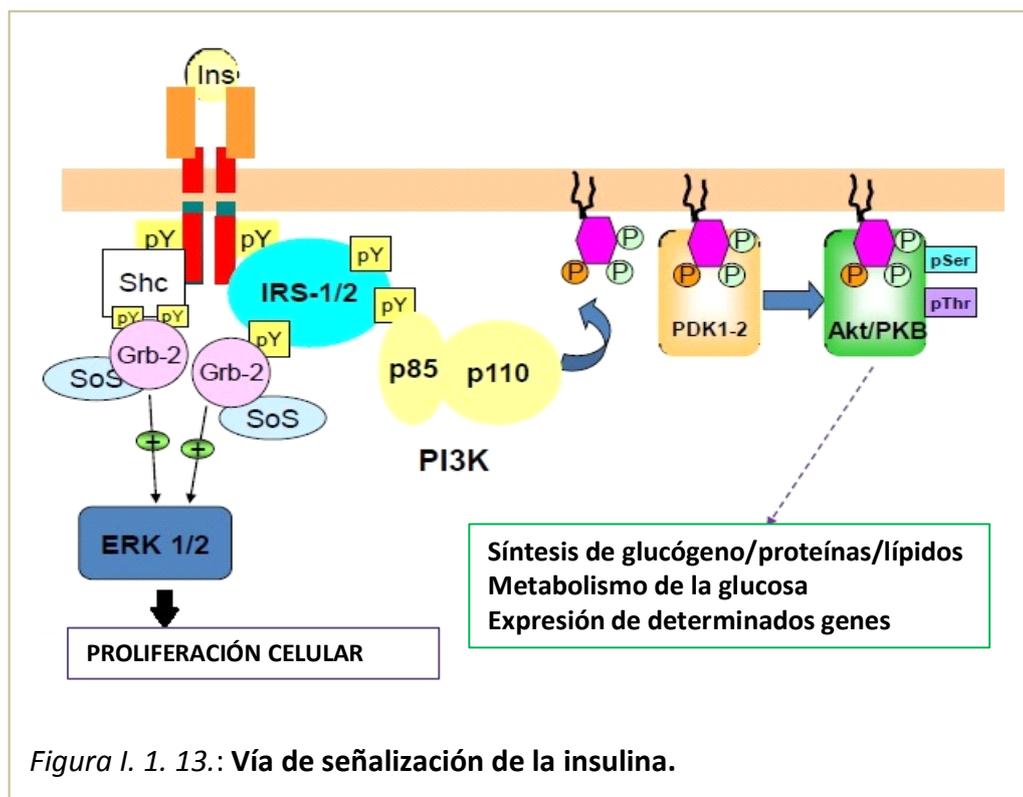
Además de los efectos directos, esta hormona puede tener efectos sinérgicos con otros agentes anabólicos en el tejido óseo, tales como el factor de crecimiento similar-insulina-1 (IGF-1) y la hormona paratiroidea (PTH). La insulina es capaz de disminuir las *proteínas de unión de IGF-1* (IGFBP-1) permitiendo que las células del hueso sean más sensibles a los niveles de IGF-1 del entorno extracelular (Thraillkill, K. et al., 2005).

Los efectos de la insulina son mediados a través de la unión de la hormona a su receptor, que pertenece a una subfamilia de receptores (que involucra también al receptor de IGF-1), formados por dos subunidades α y dos β , con actividad tirosina-quinasa. Los sustratos se unen a la subunidad α , lo que conduce a la des-represión de la actividad quinasa en la subunidad β , seguido por trans-fosforilación de las subunidades β y un cambio conformacional que aumenta aún más la actividad quinasa (Saltiel, A. R. y Kahn, C. R., 2001; Fulzele, K. y Clemens, T. L., 2012). La unión de insulina a la porción extracelular del receptor activa la fosforilación de residuos específicos de tirosina, lo que permite que varias proteínas, principalmente los sustratos del receptor de insulina (IRs), se fosforilen. Los IRs tienen varios dominios de interacción para reclutar otras moléculas señalizadoras, como la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) que tiene un

papel fundamental en el metabolismo ya que interacciona con otras proteínas que finalmente median los efectos de la insulina sobre el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, la síntesis de proteínas y la lipogénesis (*figura I. 1. 13.*) (Yang, J. et al., 2010).

Asimismo, los IRSs fosforilados actúan con proteínas adaptadoras (Grb2 y SOS), activando a Ras. La activación de Ras requiere además, de la estimulación de la tirosina-fosfatasa SHP2. La proteína Ras funciona como un interruptor molecular, estimulando una cascada serina-quinasa a través de la activación (fosforilación) consecutiva de Raf, MEK y ERK (*figura I. 1. 13.*). Esta última proteína activada (p-ERK), transloca al núcleo donde cataliza la fosforilación de factores de transcripción relacionados con la proliferación y diferenciación celular (Saltiel, A. R. y Kahn, C. R., 2001; Yang, J. et al., 2010).

En síntesis, al unirse la insulina a su receptor, ocurren una serie de cambios conformacionales que finalmente derivan en la activación de dos vías principales de señalización: la vía de la PI3K y la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (*figura I. 1. 13.*) (Yang, J. et al., 2010).



Efectos del IGF-1 sobre el tejido óseo.

El *factor de crecimiento simil-insulina 1 (IGF-1)* juega un papel muy importante en la formación de los huesos y el mantenimiento del esqueleto. Durante el período prepuberal, la hormona de crecimiento (GH) y el IGF-1 son determinantes del crecimiento longitudinal del hueso, la maduración esquelética, y la adquisición de la masa ósea. En los adultos también cumplen funciones importantes en el remodelado óseo y en el mantenimiento de la masa ósea (Giustina, A. et al., 2008; Tahimic, C. G. et al., 2013).

La fisiología del IGF-1 es compleja ya que actúa como hormona circulante y como factor de crecimiento local. El IGF-1 **sistémico** se sintetiza principalmente en el hígado y su síntesis es dependiente de GH. A nivel **local**, los osteoblastos son los responsables de sintetizar y secretar IGF-1, que se encuentra fundamentalmente bajo el control de la PTH. A su vez, la disponibilidad y la actividad de IGF-I es modulada, tanto a nivel sistémico como local, por interacciones complejas entre el IGF-I y sus proteínas de unión (IGFBP) (Giustina, A. et al., 2008).

En los osteoblastos el papel fundamental de IGF-I es la estimulación de la proliferación y función osteoblástica. Este factor regula la transcripción de colágeno de tipo I y disminuye la síntesis de proteasas que degradan el colágeno. Esta acción dual es importante para mantener niveles apropiados de la matriz ósea (Giustina, A. et al., 2008; Tahimic, C. et al., 2013).

Las acciones celulares de IGF-1 están mediadas por la activación de PI3K (que activa a Akt) así como también de las MAPK, que activan la p38, la kinasas Jun-N-terminales, y las ERK (Giustina A. et al, 2008). El número de receptores para IGF-1 (IGF-1R) y su afinidad, son modulados por hormonas y factores de crecimiento. Estudios *in vivo* en ratones con delección en el receptor de IGF-1 mostraron una reducción en el espesor del hueso cortical así como también defectos en la formación ósea (Kubota, T. et al., 2013).

Por lo tanto la activación de la vía de señalización en los osteoblastos puede tener lugar tanto por la insulina como por IGF-1, sin embargo, en animales diabéticos los niveles de IGF-I, de receptores de IGF-I, y el IRS se encuentran reducidos (Thraillkill, K. et al., 2005).

I. 2. Diabetes mellitus.

I. 2. 1. Definición y descripción de la enfermedad.

La Diabetes mellitus (DM) 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). En el año 2000, aproximadamente 171 millones de personas en el mundo padecían DM, y las cifras se duplicarán para el año 2030.

La DM es una enfermedad crónica, no transmisible, que cuando no se trata precoz y adecuadamente genera complicaciones microvasculares y macrovasculares, responsables de su elevada morbi-mortalidad y carga socioeconómica, es por eso que las políticas de salud tienen un rol muy importante en la prevención de esta enfermedad. La hiperglucemia crónica está asociada con el daño, la disfunción y la falla de diferentes órganos, especialmente a nivel cardíaco, ocular, renal, nervioso, y vascular.

Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la DM, desde destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consecuente deficiencia en los niveles de insulina hasta anormalidades que resultan en resistencia a la acción de esta hormona. Alteraciones en la secreción de insulina y deficiencias en su acción frecuentemente coexisten en el mismo paciente, y a menudo es incierto cual anormalidad es la causa primaria de la hiperglucemia. Los síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa. La hiperglucemia crónica a veces afecta el crecimiento y aumenta la susceptibilidad a ciertas infecciones. Algunas complicaciones como 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.

La mayoría de los casos de DM están representados por alguno de estos dos tipos: Diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1) o Diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2), ambas resultan de la combinación de factores genéticos y ambientales. Existen otros tipos de DM como consecuencia de defectos genéticos, de la acción de drogas o tóxicos, o por causa de una infección. Sin embargo estos tipos de DM son muy poco frecuentes.

A continuación se expondrán brevemente las características de los tipos de diabetes más frecuentes. (Expert Committee, 2011).

1. 2. 2. *Clasificación de la Diabetes mellitus.*

1. 2. 2. 1. Diabetes mellitus tipo I.

La DM tipo 1 afecta aproximadamente al 10% de la población diabética. Los individuos presentan destrucción de las células β del páncreas, y por consiguiente requieren de insulina exógena en su tratamiento. Este tipo de DM puede clasificarse de dos maneras: **inmunomediada** o **idiopática**.

En la primera, los pacientes diabéticos presentan destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Dentro de los marcadores de destrucción autoinmune están incluidos auto-anticuerpos contra células del islote pancreático, contra la insulina y/o enzimas como la decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) o tirosina-fosfatasa IA-2 y IA-2 β . Al menos uno, y usualmente más de uno de estos auto-anticuerpos, están presentes en la mayoría de los individuos cuando la hiperglucemia en ayunas es detectada. En esta forma de DM tipo 1, la tasa de destrucción de las células β 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 la cetoacidosis (acumulación de subproductos del metabolismo de las grasas, como consecuencia de su utilización para la obtención de energía). Otros, tienen una leve hiperglucemia en ayunas que puede variar rápidamente a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis ante la presencia de algún tipo de estrés. La DM inmunomediada 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 DM raramente padecen obesidad, aunque no es incompatible con el diagnóstico.

Algunas formas de la DM tipo 1 tienen etiologías desconocidas y son las que consideramos dentro del grupo de las **idiopáticas**. Los pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a sufrir cetoacidosis, pero no hay evidencia de destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Esta forma de DM es hereditaria.

I. 2. 2. 2. Diabetes mellitus tipo 2.

La DM tipo 2 es la forma más frecuente de la diabetes mellitus (90-95% de los casos), y su prevalencia a nivel mundial muestra un crecimiento continuo. La mayor velocidad de crecimiento se observa en regiones con bajos ingresos (África, América Latina, Sudeste Asiático y Pacífico Oeste), donde además su tasa de morbi-mortalidad es más elevada y los recursos sanitarios disponibles más limitados. Este fenómeno se ha atribuido al aumento en la expectativa de vida y a la adquisición de hábitos de vida no saludables (sedentarismo y planes de alimentación inadecuada), que han conducido a la llamada “epidemia” de obesidad y diabetes. Se estima que en el año 2012, habrían 371 millones de personas en el mundo con DM (prevalencia estimada de 8.3%), lo que representa un incremento de 125 millones en los últimos cinco años. En particular, en Argentina, la cifra estimada fue de 1.426.000 personas con DM tipo 2 en el año 2000, previéndose que llegarán a 2.457.000 pacientes con DM tipo 2 en el año 2030 (Gagliardino, J.J. et al., 2013).

Los pacientes con DM tipo 2 presentan *resistencia a la acción de la insulina* y por lo general tienen una deficiencia relativa de esta hormona. Inicialmente, y a menudo a lo largo de toda la vida, estos pacientes no requieren ser tratados con insulina, a diferencia de los sujetos que padecen DM tipo 1. Existen muchas causas diferentes para este tipo de DM, y aunque la etiología específica no se conoce se sabe que no hay destrucción autoinmune de las células β del páncreas.

La mayoría de los pacientes con DM tipo 2 presentan *obesidad*, enfermedad que por sí misma causa resistencia a la insulina. En general, estos pacientes no cursan con episodios de cetoacidosis, pero en el caso de padecerla suele deberse al estrés ocasionado por otra enfermedad. La DM tipo 2 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, los individuos que padecen esta enfermedad tienen un alto riesgo de sufrir complicaciones macro- y microvasculares. Durante el 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 variar a lo largo del tiempo, dependiendo del avance de la enfermedad subyacente. En algunos individuos

con DM tipo 2, el control adecuado de la glucemia puede ser logrado con reducción del peso corporal, ejercicio y/o fármacos adecuados. Otros pacientes tienen una secreción residual de insulina que resulta insuficiente y por lo tanto requieren del aporte de insulina exógena.

La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción del peso corporal y/o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia. El riesgo de desarrollar esta enfermedad aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. La frecuencia de la DM tipo 2 a menudo, está asociada a factores ambientales y a una gran predisposición genética, no obstante la genética de este tipo de DM es compleja y no está claramente definida.

1. 2. 3. Mecanismos patogénicos de la Diabetes mellitus tipo 2.

La DM tipo 2 es una patología multifactorial. La resistencia a la acción de la insulina en el músculo y en el hígado junto con el deterioro de las células β del páncreas, representan los defectos fisiopatológicos fundamentales de la DM tipo 2. Se han propuesto múltiples mecanismos que llevan a un aumento de la glucosa en sangre, entre los que se pueden mencionar: la *disminución paulatina en la secreción de insulina por las células β del páncreas*; el incremento en la secreción de glucagón por las células α del páncreas; el incremento de la gluconeogénesis por el hígado; el incremento de la lipólisis; la disminución de la captación de glucosa por el músculo; la disminución del efecto de incretinas y el incremento en la reabsorción tubular de glucosa en el riñón.

El mayor riesgo de la DM son los elevados niveles de glucosa en sangre, ya que estudios como el DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) y UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) han identificado a la hiperglucemia como uno de los mayores factores de riesgo involucrado en el desarrollo de complicaciones vasculares. Existen varias hipótesis para explicar el origen de dichas complicaciones.

- la hipótesis de los productos de glicación avanzada (AGE, advanced glycation endproducts);
 - la hipótesis de la vía de los polioles;
 - el estrés oxidativo;
 - el estrés reductor o pseudohipoxia;
 - la hipoxia verdadera;
-

- el estrés carbonílico,
- las alteraciones en el metabolismo de las proteínas;
- el aumento de la actividad de la proteína-quinasa C (PKC);
- las modificaciones en la actividad de factores de crecimiento o citoquinas;
- la vía de las hexosaminas.

Como era de esperarse, estas hipótesis se superponen unas con otras, siendo denominadores comunes de AGEs y el estrés oxidativo, que alteran las estructuras de las macromoléculas provocando disfunción celular (McCarthy, A.D., 2000).

1. 2. 4. Complicaciones de la Diabetes mellitus.

1. 2. 4. 1. Complicaciones agudas.

Los pacientes con DM tipo 1 son vulnerables a sufrir descompensaciones metabólicas hiperglucémicas graves (cetoacidosis) y episodios hipoglucémicos (por el tratamiento con insulina). La cetoacidosis se encuentra favorecida por la deficiencia de insulina, el incremento de la secreción de glucagón y la hiperglucemia. Además, el aumento de la lipólisis aumenta la oferta de ácidos grasos libres al hígado para su oxidación a cuerpos cetónicos (ácido acetoacético, β -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 la célula para oxidarlos, y por lo tanto su acumulación en la sangre desencadena acidosis y agravamiento de la hiperosmolaridad.

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

I. 2. 4. 2. Complicaciones Crónicas.

Las complicaciones a largo plazo son similares para la DM tipo 1 y tipo 2, y se corresponden con las principales causas de morbilidad y mortalidad de la enfermedad. En la mayoría de los pacientes, estas las complicaciones tardías pueden comprometer la pared de los grandes vasos (*macroangiopatías*), o al endotelio y/o membrana basal de los pequeños vasos (*microangiopatía*). En este último caso, se puede afectar la microcirculación de diversos órganos como los riñones (nefropatía diabética), la retina (retinopatía), los nervios (neuropatía), entre otros. Además, existen complicaciones mixtas como el pie diabético, las **alteraciones óseas** y articulares. A la relación entre la diabetes y el metabolismo óseo se le dedica una sección particular, debido a que se relaciona directamente con el tema del presente trabajo de tesis doctoral.

Macroangiopatías.

Se denomina de esta manera al daño que la DM va produciendo en los vasos de mediano y grueso calibre. En la DM se producen una serie de trastornos que, de diferentes maneras van dañando el endotelio vascular y llegan a producir una placa de ateroma (depósito de colesterol en la túnica íntima de los vasos sanguíneos, 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, 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.

Microangiopatía.

En la DM se produce un engrosamiento de la membrana basal de los capilares, con o sin alteraciones del endotelio y/o pérdida de pericitos que ocasiona la microangiopatía. Los capilares diabéticos son más permeables a las proteínas plasmáticas. La microangiopatía

diabética afecta de manera precoz y específica a la retina (retinopatía), es la base para el desarrollo de la nefropatía diabética y de algunas de las formas de la neuropatía diabética, donde se ve afectado tanto el sistema nervioso central como el periférico, comprometiendo en este último caso, a los miembros inferiores principalmente.

I. 2. 5. *Metabolismo óseo y diabetes mellitus.*

I. 2. 5.1. Generalidades.

La diabetes mellitus y la osteoporosis son dos patologías muy frecuentes, cuyo riesgo de padecerlas aumenta con la edad. La osteoporosis está caracterizada por una disminución en la fortaleza y un incremento de fracturas causadas por traumas mínimos asociada a una mayor morbilidad, mortalidad y reducción de la calidad de vida (van Staa, T.P. et al., 2001; Manolagas, S.C., 2000). Hace unos años, estas patologías eran estudiadas como enfermedades aisladas, pero numerosas investigaciones han demostrado que hay una asociación entre la DM y el incremento en el riesgo de fracturas no traumáticas concluyendo que la primera es un factor de riesgo de la segunda (Janghorbani, M. et al., 2007; Montagnani, A. y Gonnelli, S., 2013).

En la DM tipo 1 y en la DM tipo 2 el hueso presenta alteraciones en su microarquitectura y en su homeostasis, lo cual se traduce en una *menor calidad ósea* dando como resultado un mayor riesgo de fracturas (Schwartz, A.V., 2003; Janghorbani, M. et al., 2007; Silva M.J, et al., 2009). Son múltiples los factores que influyen en el riesgo de fractura, entre los que se pueden mencionar: la obesidad; los cambios en los niveles de insulina; las altas concentraciones de productos de glicación avanzada (AGEs) sobre proteínas de matriz extracelular y proteínas intracelulares; la alta excreción urinaria de calcio junto con mala absorción intestinal; la respuesta inapropiada a la secreción de hormona paratiroidea (PTH); las alteraciones en la regulación de la vitamina D; los bajos niveles del factor de crecimiento similar a la insulina; las microangiopatías y la inflamación (Isidro, M.L. y Ruano, B., 2010).

I. 2. 5. 2. Densidad mineral ósea.

La densidad mineral ósea (DMO) es una herramienta que se utiliza como predictor del riesgo de fractura. Se realiza mediante la técnica de absorción de rayos X de energía dual (DEXA), que si bien es muy útil, no permite analizar todos los aspectos de la calidad ósea. En la DM tipo 1 es frecuente encontrar pacientes con densidad mineral ósea (DMO) disminuida, mientras que en pacientes con DM tipo 2 este parámetro no se modifica o incluso puede encontrarse aumentado (Räkel, A. et al., 2008).

Desde hace más de veinte años, varios estudios han demostrado que la osteopenia y la osteoporosis son complicaciones frecuentes en pacientes con DM tipo 1, tanto en niños como en adultos. Un 50-60% de los pacientes con DM tipo 1 presentan osteopenia, mientras que alrededor de un 14-20% de dichos pacientes padecen osteoporosis (Kayath, M.J. et al., 1998; Kemink, S.A. et al., 2000). Diversos autores proponen que la terapia con insulina y el logro de un buen control metabólico son determinantes para el 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, R. et al., 1997).

Contrariamente, la DMO en pacientes con DM tipo 2 se encuentra aumentada (o sin modificaciones) respecto a la de individuos no diabéticos, aun luego de la corrección por índice de masa corporal (Strotmeyer, E.S. et al., 2004; De Liefde, I.I. et al., 2005). La mayoría de los estudios han reportado una disminución en el recambio óseo en pacientes con DM tipo 2, debido a una reducción tanto en la formación como en la resorción ósea. Esto resulta en un incremento en el contenido de mineral, pero a la vez, en una mayor acumulación de imperfecciones que generan un hueso más propenso a fracturarse. Si bien la determinación de la DMO ha sido la forma más efectiva de evaluar el riesgo de fracturas en mujeres con osteoporosis postmenopáusica, no resulta útil para la predicción del riesgo de fracturas en pacientes diabéticos. Se han propuesto otros marcadores de diagnóstico, como la pentosidina (un producto de glicación avanzada), pues varios estudios han revelado que la cantidad de pentosidina presente en hueso cortical o trabecular proveniente de pacientes diabéticos con fractura de cuello femoral aumenta respecto a individuos controles de la misma edad (Saito, M. et al., 2006). La desventaja de este marcador radica en que su determinación requiere de procedimientos invasivos, sin embargo, Odetti y colaboradores revelaron que el contenido de

pentosidina en plasma se puede correlacionar linealmente con el contenido de este marcador en el hueso cortical (Odetti, P. et al., 2005).

I. 2. 5. 3. Fisiopatología del mayor riesgo de fracturas en Diabetes mellitus tipo 2.

La DM se caracteriza por hiperglucemia, que se conoce que tiene efectos tanto directos como indirectos en las células del hueso a través de la formación de *productos de glicación avanzada (AGEs)* y del aumento del *estrés oxidativo*.

Nuestro grupo ha estudiado el efecto que los AGEs provocan en cultivos de células óseas (McCarthy, A.D. et al., 2013) Se ha encontrado que la acumulación de AGEs sobre la matriz extracelular, así como el agregado de proteínas solubles modificadas por AGEs a cultivos de osteoblastos, inhiben a largo plazo, expresión de la fosfatasa alcalina (FAL) y la secreción de colágeno tipo I en forma dependiente de la dosis (McCarthy, A.D. et al., 2001). Por otro lado, la glicación de la FAL induce la inhibición de su actividad. Asimismo, el colágeno modificado por los AGEs es capaz de afectar la proliferación y diferenciación de los osteoblastos inhibiendo la actividad de FAL y la formación de nódulos de mineralización (McCarthy, A.D. et al., 1999). También se ha demostrado que la acumulación de AGEs sobre el colágeno altera las interacciones celulares con la matriz extracelular mediada por integrinas (McCarthy, A.D. et al., 2004).

Los enlaces cruzados de las moléculas de colágeno, juegan un rol crítico en la determinación de la resistencia ósea. Los entrecruzamientos fisiológicos (enzimáticos) fortalecen los vínculos entre las fibras de colágeno y confieren así resistencia ósea (Wang, X. et al., 2002; Saito, M. et al., 2010). Los altos niveles de AGEs inducen la formación espontánea de entrecruzamientos no enzimáticos entre las moléculas de colágeno que otorgan fragilidad a las fibras de colágeno, disminuyendo su resistencia (Garnero, P. et al., 2006).

Algunos estudios han señalado que la osteocalcina también puede ser glicada, lo que provoca alteraciones en su afinidad por la hidroxapatita contribuyendo a la patogénesis de la osteoporosis y osteopenia presente en la diabetes (Gundberg, C.M. et al., 1986)

Tanto los niveles elevados de glucosa como los AGEs son una fuente de generación de radicales libres, que aumenta el daño en las macromoléculas provocando disrupción en la funciones celulares (Blakytyn, R. et al., 2011).

I. 2. 6. Posibles tratamientos de la Diabetes mellitus tipo 2.

El incremento en el conocimiento respecto a la fisiopatología de la DM tipo 2 ha contribuido al desarrollo de nuevos tratamientos para esta enfermedad. El principal objetivo en la terapia de la DM tipo 2 es generar un control glucémico estable retrasando, e incluso previniendo, las complicaciones agudas y crónicas de la enfermedad.

La Sociedad Argentina de Diabetes y la Asociación Americana de Diabetes coinciden en que la primera medida que se debe tomar frente al diagnóstico de la DM tipo 2 involucra cambios en el estilo de vida (dieta y ejercicio). En general, cuando estas modificaciones no son suficientes para controlar la glucemia, se debe incluir la terapia farmacológica. Normalmente, un 50% de los pacientes que cursan con DM tipo 2, requieren a largo plazo, más de un agente hipoglucemiante para regular la glucemia (Jonas, D. et al., 2001)

Los primeros fármacos de administración oral que se utilizaron fueron las *sulfonilureas* y *biguanidas*. Más tarde, aparecieron las *glitazonas*, *me glitinidas* e *inhibidores de la enzima α -glucosidasa*. En los últimos años, el tratamiento para la DM tipo 2 se ha focalizado en el desarrollo de fármacos que se relacionan con las incretinas (hormonas insulínótropas) a saber: *análogos de GLP-1* e *inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa-4*.

Previamente, hemos mencionado que el metabolismo óseo se encuentra vinculado con el metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina. De hecho, comparten muchos de los factores reguladores como la insulina, PPAR γ , hormonas gastrointestinales. De esta superposición de mecanismos surge la posibilidad de que ciertas terapias antidiabéticas puedan afectar al hueso (Lecka-Czernik, B., 2013).

Para llevar a cabo el presente trabajo de tesis se ensayaron dos anti-hiperglucemiantes orales tanto *in vivo* o como *in vitro*, a saber: un inhibidor de la enzima dipeptidilpeptidasa-4, la **saxagliptina**; y una biguanida, la **metformina**. En las próximas secciones se desarrollan las características de estas drogas.

I. 3. Saxagliptina.

La saxagliptina pertenece a una clase de agentes anti-hiperglucemiantes que en conjunto se denominan *inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa 4* (DPP-4) y están indicados para tratar la DM tipo 2. El primer inhibidor de la DPP-4 en aprobarse por la FDA fue la Sitagliptina (Januvia®, Merck). A continuación aparecieron otros inhibidores de la enzima como la Vildagliptina (Galvus®, Novartis) y la Saxagliptina (Onglyza®, Astra Zeneca y Bristol-Myers Squibb) (Gallwitz, B., 2010; Shubrook, J. et al., 2011; Labuzek, K. et al., 2013).

Todos son fármacos de administración oral, cuya acción involucra el aumento de la vida media de las hormonas gastrointestinales, llamadas *incretinas*, que se traduce en una mayor síntesis y liberación de insulina (Scheen, A.J., 2010).

Se realizará una breve descripción de las incretinas y de la DPP-4, enzima responsable de la inactivación de las mismas, para luego detallar las características de la droga.

I. 3. 1. Incretinas.

Un complejo conjunto de reacciones fisiológicas se activa luego de la ingesta de alimentos, provocando señales tanto endócrinas como nerviosas que regulan la digestión, absorción y asimilación de los nutrientes. Una de las respuestas es la secreción de las *incretinas* a nivel del intestino. Estas hormonas estimulan la síntesis y secreción de, al menos, el 50% de la insulina liberada posprandial (Kim, W. y Egan, J.M., 2008).

Las dos incretinas principales son: el *péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP)*, caracterizado en la década del '70 y *péptido simil glucagón-1 (GLP-1)*, que se identificó casi una década después.

El péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (**GIP**) es un péptido de 42 aminoácidos producido por las células enteroendócrinas K que se encuentran en la mucosa del duodeno y del yeyuno (Drucker, D.J., 2006). En condiciones fisiológicas actúa como una hormona insulino-trópica, sin embargo frente a la hiperglucemia de la DM su actividad se encuentra muy disminuida (Gallwitz, B., 2010).

El **GLP-1**, péptido simil-glucagón, se produce a partir del pro-glucagón en las células enteroendócrinas L de la mucosa del íleon y del colon, también en respuesta a los nutrientes de

la dieta, en especial a la glucosa y ácidos grasos. El GLP-1 es una hormona muy potente que además de actuar sobre las células β del páncreas tiene acciones sobre la motilidad gástrica, disminuye la concentración de glucagón en plasma, promueve la sensación de saciedad y estimula los depósitos de glucosa en los tejidos periféricos independientemente de la acción de la insulina (Hein, G. et al., 2013).

En condiciones fisiológicas, los niveles de estos péptidos aumentan unos minutos después de la ingesta de alimentos, pero su vida media es muy corta (pocos minutos) debido a que son excelentes sustratos para la enzima dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4) (*figura 1. 3. 1*) (Drucker, DJ., 2006). La enzima DPP-4, también conocida como antígeno de superficie **CD26**, pertenece a una familia de glicoproteínas transmembrana con actividad de serina exopeptidasa. Es responsable de catalizar el clivaje de todos los péptidos con una penúltima alanina o prolina en la posición N-terminal. Se expresa en la superficie de muchas células y sus funciones fisiológicas no son del todo conocidas (Matteucci, E. y Giampietro, O., 2009).

El hecho de que el GLP-1 induce tanto secreción como la producción de insulina, y que sus actividades son principalmente dependientes de la glucosa, indica que esta hormona puede tener ventajas únicas en el tratamiento de la DM tipo 2. Debido a la breve vida media del GLP-1, se han desarrollado dos clases de fármacos antidiabéticos relacionados con esta hormona: los *análogos de GLP-1*, resistentes a la degradación de la DPP-4 y los *inhibidores de la enzima DPP-4* (Drucker, D.J. y Nauck, M.A., 2006; Scheen, A.J., 2010).

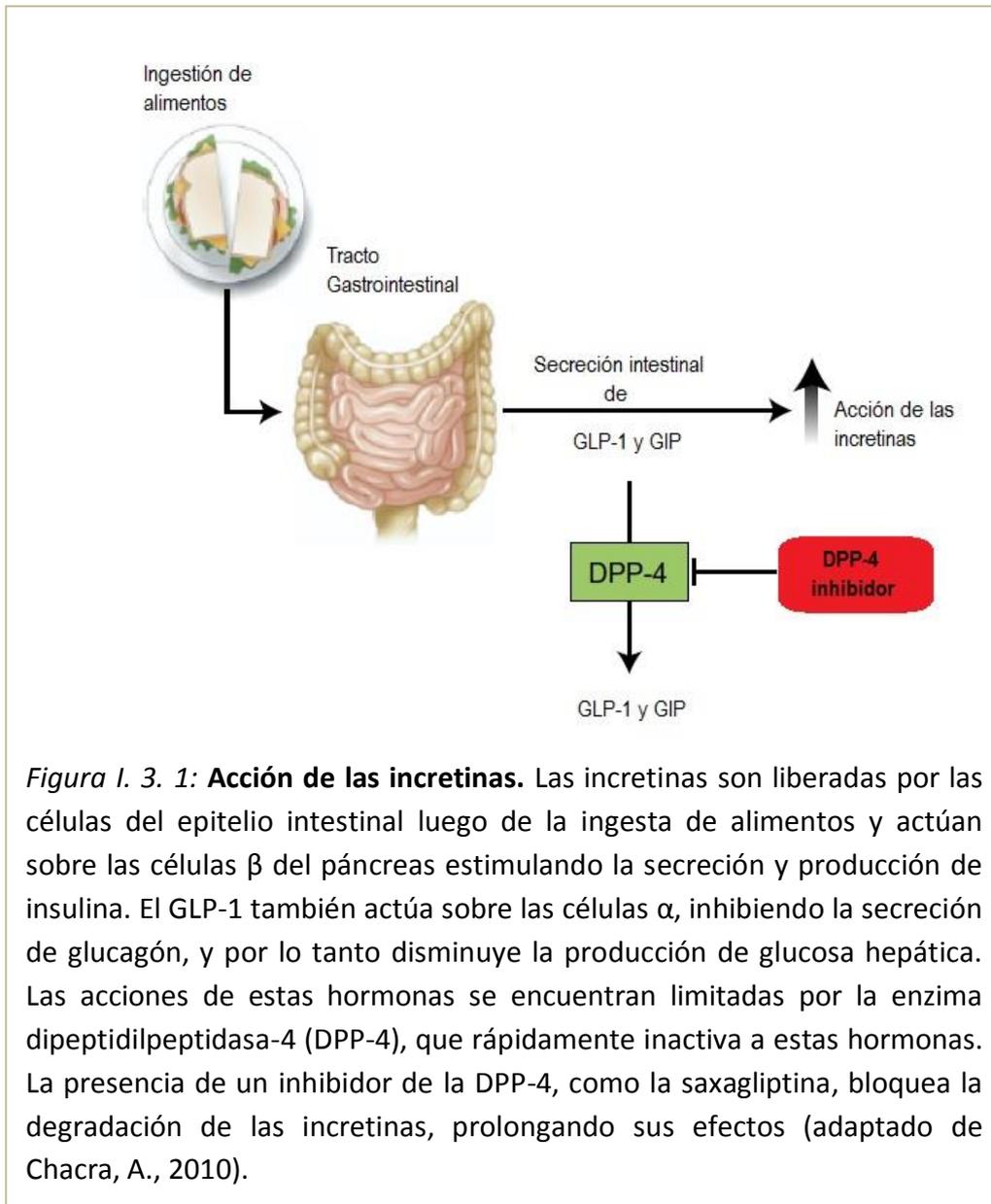


Figura 1. 3. 1: Acción de las incretinas. Las incretinas son liberadas por las células del epitelio intestinal luego de la ingesta de alimentos y actúan sobre las células β del páncreas estimulando la secreción y producción de insulina. El GLP-1 también actúa sobre las células α , inhibiendo la secreción de glucagón, y por lo tanto disminuye la producción de glucosa hepática. Las acciones de estas hormonas se encuentran limitadas por la enzima dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4), que rápidamente inactiva a estas hormonas. La presencia de un inhibidor de la DPP-4, como la saxagliptina, bloquea la degradación de las incretinas, prolongando sus efectos (adaptado de Chacra, A., 2010).

1. 3.2. Saxagliptina: mecanismo de acción.

La saxagliptina (Onglyza®) es un potente y selectivo inhibidor de la enzima DPP-4 que previene la inactivación de las incretinas, y como resultado los niveles de las incretinas en circulación aumentan hasta en un 75% (Shubrook, J. et al., 2011). La inhibición de la enzima por la saxagliptina es reversible pero fuerte, con un $t_{1/2}$ de 50 minutos, lo cual ayuda a explicar el tiempo de acción prolongado que ofrece la droga (Chacra, A., 2010; Minze, M.G. et al., 2013).

1. 3. 3. Farmacología.

El nombre químico (IUPAC) de la saxagliptina es (1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2-amino-2-(3-hydroxyadamantan-1-il) acetil)-2-azabicyclo (3.1.0) hexano-hidrato de 3-carbonitrilo.

Su fórmula molecular corresponde a $C_{18}H_{25}N_3O_2 \cdot H_2O$, y su estructura se encuentra esquematizada en la *figura 1. 3. 2.* La sustancia es soluble en agua, principalmente a bajo pH (Onglyza[®], 2013).

La saxagliptina posee buena absorción por vía oral, alcanza su pico máximo en plasma luego de dos horas de administrada y no se une a proteínas plasmáticas. Se metaboliza en los riñones y en el hígado. Aproximadamente, el 75% del fármaco tiene excreción urinaria y el 25% restante a través de las heces. El metabolismo de la droga es vía citocromo p450 (CYP3A4/5) (Chacra, A., 2010; Shubrook, J. et al., 2011).

La saxagliptina es eficaz en la reducción de la HbA_{1c}, de la glucemia en ayunas y de la glucemia postprandial, ya sea en monoterapia o en combinación con otros agentes orales como la metformina (DeFronzo, R. et al., 2009; Chacra, A., 2010; Aschner, P.J., 2010).

*1. 3. 4. Efectos adversos.*

Los inhibidores de la enzima DPP-4 se asocian con bajo riesgo de hipoglucemia y ganancia de peso así como también bajo riesgo de diarrea y trastornos gastrointestinales. Los efectos adversos más comunes reportados son dolores de cabeza, nasofaringitis, e infecciones en el tracto urinario y respiratorio (Cobble, M.E. y Frederich, R., 2012). A pesar de que los estudios sobre el metabolismo óseo de los inhibidores de DPP-4 son escasos, el inserto provisto por el fabricante de la saxagliptina advierte una incidencia de fracturas de 1,0 para la droga versus 0,6 para el control por cada 100 pacientes diabéticos por año (Onglyza[®], 2013).

I. 4. Metformina.*I. 4. 1. Aspectos generales*

La metformina es un compuesto de la familia de las biguanidas, como la fenformina y buformina (estas dos últimas retiradas del mercado). Tiene su origen histórico en la planta *Galega officinalis* conocida desde hace siglos en la medicina popular por su capacidad de reducir los efectos de la Diabetes mellitus (Witters, L.A., 2001). Fue recién en 1950 cuando Stern y colaboradores descubrieron la utilidad clínica de metformina, donde observaron su capacidad para reducir la glucosa plasmática, así como su baja toxicidad (aún en altas dosis) (Rojas, L.B. y Gomes, M.B., 2013).

La eficacia de la metformina en el control de la glucemia, su perfil de seguridad, los efectos beneficiosos a nivel cardiovascular, y su capacidad para ser asociada con otros agentes antidiabéticos hace que este fármaco sea la primera elección en el tratamiento de pacientes con DM tipo 2 (Rojas, L.B. y Gomes, M.B., 2013).

I. 4. 2. Mecanismo de acción.

La metformina actúa en el hígado reduciendo la liberación de glucosa y aumentando la captación de la misma en los tejidos periféricos. Estos efectos están mediados por la activación de quinasas reguladoras, involucradas en la síntesis de glucosa hepática (El-Mir, M.Y. et al., 2000; Zhou, G. et al., 2001).

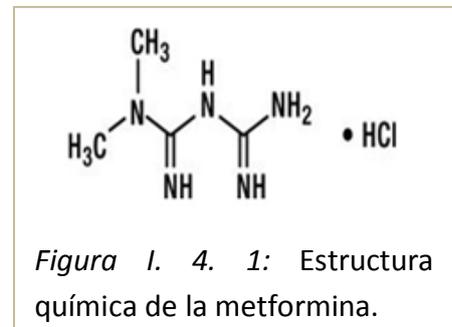
El mecanismo molecular por el cual la metformina ejerce sus acciones sobre el metabolismo energético comenzó a elucidarse cuando se demostró el efecto inhibitorio del fármaco a nivel del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. La metformina es un catión, por lo que se acumula en las mitocondrias debido al gradiente eléctrico a través de la membrana interna. A pesar de su mala permeabilidad en la membrana plasmática, su absorción en muchas células, es mediada por un transportador de cationes orgánicos (OCT1) (Hardie, D.G., 2013). En la mitocondria, la metformina inhibe la síntesis de ATP, aumentando de esta manera la relación ADP:ATP y AMP:ATP. Este efecto dispara la activación de la proteína kinasa dependiente de AMP (AMPK) (Zhou, G. et al., 2001). Asimismo, se ha propuesto que la

metformina inhibe a la enzima adenilato ciclasa al aumentar los niveles de AMP, lo que lleva a una reducción en la formación de AMP cíclico provocados por esta enzima como respuesta al glucagón. Ambos mecanismos sugieren que la activación de AMPK y la inhibición de la adenilato ciclasa están mediados por el aumento de AMP (Hardie, D.G., 2013).

El aumento de la activación de AMPK es responsable de la mayoría de los efectos en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Por un lado, se inhibe la lipogénesis y aumenta la oxidación de los ácidos grasos, estos efectos pueden evidenciarse *in vivo* por la capacidad de la metformina para reducir triglicéridos. Además, la AMPK promueve la captación de glucosa en el músculo esquelético a través de la translocación del transportador GLUT4 desde las vesículas de almacenamiento intracelular a la membrana plasmática, y a largo plazo, regula la expresión de los genes que codifican para dicho transportador (Zhou, G. et al., 2001; Hardie, D.G., 2013).

I. 4. 3. Farmacología.

El nombre IUPAC de la metformina es 3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina, y su fórmula química es $C_4H_{11}N_5$ (figura I. 4. 1.). Es una droga hidrofílica, por esta razón es altamente soluble en agua pero muy poco permeable a las membranas celulares. La biodisponibilidad de la metformina va desde 50% a 60%. No es metabolizada por el hígado y se excreta inalterada por orina (Dunn, C.J.; Peters, D.H., 1995; Goodman y Gilman, 2007).



I. 4. 4. Efectos sobre el tejido óseo

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 incrementa la proliferación celular en forma dosis-dependiente, promueve la diferenciación osteoblástica (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 (Cortizo, A.M. et al., 2006). Estudios en animales con diabetes mellitus por deficiencia parcial en la secreción de la

insulina indicaron que la metformina previene los efectos deletéreos de la enfermedad sobre la microarquitectura ósea femoral (Tolosa, M.J. et al., 2013).

Asimismo, otros autores mostraron que la metformina tiene efectos positivos en la diferenciación osteoblástica incrementando la actividad de Runx-2, y efectos negativos en la diferenciación osteoclástica, disminuyendo los niveles de RANKL y aumentando los de OPG en ratas ovariectomizadas (Mai, Q. et al., 2011). Estudios clínicos realizados en pacientes diabéticos señalaron que la metformina en monoterapia se asocia con una disminución en el riesgo de fracturas (Vestergaard, P. et al., 2005; Melton, L.J. et al., 2008)

1. 4. 5. Efectos adversos.

Los efectos adversos más comunes de la metformina incluyen efectos gastrointestinales, que van desde la diarrea hasta el estreñimiento, náuseas, vómitos, además de malestar abdominal, flatulencia, indigestión y ardor de estómago. Se encuentra contraindicada en pacientes con insuficiencia renal severa. Los episodios de hipoglucemia ocurren raramente cuando se usa la metformina en monoterapia (Minze, M.G. et al., 2013).

I. 5. Terapia de combinación: saxagliptina con metformina.

Las nuevas terapias para la DM tipo 2 se han enfocado en la combinación de mecanismos de acción de los fármacos antidiabéticos con el fin de lograr nuevos tratamientos para aquellos pacientes que no pueden alcanzar el control glucémico con la monoterapia. La combinación saxagliptina/metformina proporciona una opción terapéutica basada en una droga de primera línea utilizada para el tratamiento de esta enfermedad (metformina) cuyo blanco es la insulino-resistencia; con una gliptina (saxagliptina) que permite la reducción postprandial de la hiperglucemia (Minze, M.G. et al., 2013).

En un estudio de 24 semanas, doble ciego (1306 pacientes), se comparó el efecto de la monoterapia con metformina o saxagliptina, con una terapia de combinación de saxagliptina-metformina. Los autores encontraron que el uso de saxagliptina (5 mg o 10 mg) en combinación con metformina (500 mg) redujo significativamente la HbA_{1c} (2,5% combinación vs. 1,7% monoterapia, $p < 0,0001$). También encontraron disminuida la glucosa plasmática en ayunas en comparación con cualquiera de los fármacos en monoterapia (Minze, M.G. et al., 2013).

DeFronzo y colaboradores efectuaron un ensayo en pacientes diabéticos tratados con metformina pero con insuficiencia en el control de la glucemia. El estudio incluyó 743 pacientes, entre 18-77 años de edad con HbA_{1c} entre 7% y 10%. Todos los pacientes se encontraban en tratamiento con metformina (1500 mg - 2550 mg) previo al inicio del estudio. Luego de 24 semanas de tratamiento con 2,5 mg, 5 mg o 10 mg de saxagliptina en combinación con metformina, los grupos que recibieron la combinación de las drogas mostraron una reducción significativa respecto al placebo de la HbA_{1c} (0,73% para 2,5 mg saxagliptina; 0,83% para 5 mg saxagliptina y 0,72% para 10 mg saxagliptina , $p < 0,0001$). Los autores reportaron disminuciones en la glucosa en ayunas y postprandial (DeFronzo, R. et al., 2009).

I. 6. Modelos animales para el estudio de la Diabetes mellitus tipo 2.

I. 6. 1. Aspectos generales de los modelos animales en la DM tipo 2.

Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los acontecimientos que dan lugar a la disfunción de las células β del páncreas, tanto a nivel fisiológico como molecular. La comprensión de estos mecanismos es imprescindible para el avance en la prevención y tratamiento de la DM tipo 2, que afecta a millones de personas en todo el mundo (Arias-Díaz, J. y Balibrea, J., 2007).

Existen multitud de modelos experimentales potencialmente útiles para el estudio de los diversos aspectos de la DM tipo 2 y la decisión acerca del modelo a utilizar en un experimento es multifactorial. En cualquier caso, es necesario comprender que *ningún modelo animal refleja totalmente la complejidad de la DM tipo 2 humana*. No obstante, las ventajas inherentes a la experimentación animal han permitido obtener información muy valiosa acerca de la patogénesis de esta enfermedad.

Los modelos animales de DM tipo 2 son tan complejos y heterogéneos como lo es la propia patología en humanos. En algunos modelos, predomina la resistencia a la insulina mientras que en otros la principal disfunción se encuentra en las células β del páncreas, provocando alteraciones en la secreción de insulina (Arias-Díaz, J. y Balibrea, J., 2007). Estos modelos se pueden clasificar según el mecanismo de generación de la enfermedad en **modelos espontáneos** o **inducidos**. Los primeros son aquellos en donde se seleccionan los animales que espontáneamente desarrollan diabetes. En **modelos inducidos** se puede reproducir una o más de las manifestaciones clínicas de la DM tipo 2 humana en animales de laboratorio a través de diferentes estrategias como por ejemplo través de dietas específicas o por la administración de fármacos, que comparativamente, son modelos fáciles de desarrollar y mantener.

El modelo utilizado en este trabajo de tesis corresponde a un *modelo de diabetes inducida por estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA)*, y se desarrolla a continuación.

1. 6. 2. *Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA).*

Este modelo se fundamenta en la inducción de diabetes mediante la destrucción parcial de las células β del páncreas por la administración sucesiva de dos compuestos: la nicotinamida (NA) y la estreptozotocina (STZ). La STZ es un potente agente inductor de la diabetes al ejercer acciones citotóxicas en la células β del páncreas, mientras que la NA juega un rol protector de estas células frente a la acción de la STZ (Tahara, A., et al., 2008; Szkudelski, T., 2012).

Es importante tener en cuenta que este modelo depende de la dosis de NA y STZ que se utilicen. Bajas dosis de NA no logran proteger lo suficiente a las células β , así como altas dosis de NA proveen una protección total. De la misma forma, los animales más jóvenes son menos sensibles a la STZ y se encuentran mejor protegidos por la NA. Asimismo, la edad de los animales, la vía de administración y la relación de tiempo de administración entre NA y STZ también afectan la eficacia del modelo. La mayoría de los estudios que describen este modelo recomiendan que las inyecciones entre las drogas se encuentren espaciadas por un período de 15 minutos (Tahara, A., et al., 2008; Szkudelski, T., 2012).

Este modelo se utiliza frecuentemente para testear agentes insulino-trópicos debido a que no hay depleción total de secreción de la insulina (Tahara, A. et al., 2008). Los animales tratados con la combinación STZ-NA exhiben hiperglucemia moderada asociada con pérdida de la fase temprana de la secreción de insulina posprandial. A continuación se exponen algunas características del modelo:

- *Tolerancia a la glucosa y niveles de insulina:* en las primeras etapas de la DM tipo 2 en humanos, la glucemia se encuentra normal o moderadamente aumentada, y la insulinemia se incrementa, debido a la hipersecreción compensatoria. Sin embargo, a lo largo del tiempo, la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y la insulina en sangre disminuye. La prueba de tolerancia a la glucosa revela intolerancia a la glucosa en ratas con diabetes inducida por STZ-NA. En estos animales se observa una disminución de la glucemia muy lenta luego de una carga de glucosa respecto a lo ocurrido en animales control. Estos efectos se deben a que la respuesta en la secreción de insulina a la carga de glucosa se encuentra alterada en ratas diabéticas (inducidas por STZ-NA) en comparación con la respuesta fisiológica observada en
-

animales control. La intolerancia a la glucosa observada es debida, principalmente, al deterioro de la secreción de la insulina en los animales que fueron tratados con STZ-NA.

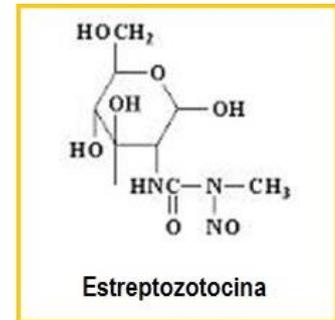
- *Efecto sobre las células β* : las células secretoras de insulina de ratas con diabetes inducida por STZ-NA se caracterizan por poseer numerosas anormalidades (atrofia, vacuolización, disminución del número de islotes y gránulos secretores) en comparación con las células β de los animales no diabéticos. La secreción total de insulina se reduce significativamente en el caso de islotes derivados de ratas tratadas con STZ-NA. Sin embargo, la magnitud de estos cambios depende de las dosis de STZ y NA administrados.
- *Secreción de insulina*: en la DM tipo 2 de los humanos, la resistencia a la insulina se compensa inicialmente por el aumento de la secreción de insulina para mantener la normogluceemia. Este mecanismo de compensación se cree que implica una mayor función secretora de las células β así como también un aumento de la masa de células β . Sin embargo, con el tiempo, la secreción exacerbada de insulina conduce a la insuficiencia de estas células, provocando apoptosis y consecuentemente una reducción de la masa de células β . En este contexto, las ratas con diabetes inducida por STZ-NA se corresponden con la etapa de la diabetes tipo 2 en los seres humanos, cuando la masa de células β se encuentra reducida.
- *Estrés oxidativo*: estudios recientes han demostrado un deterioro en el sistema de defensa en ratas tratadas con STZ-NA. Se encontraron aumentados los niveles del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquinas, factor nuclear κ B (NF- κ B) y NO en comparación con los animales control.

A continuación se describen los mecanismos de acción de la STZ y NA, así como también la acción conjunta.

Acción citotóxica de la STZ.

La estreptozotocina (2-deoxy-2(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa) es una nitrosourea ampliamente utilizada para inducir diabetes en animales de experimentación.

La gran capacidad diabetogénica de este compuesto se debe a que causa daño en las células β del páncreas, que son la única fuente de insulina del organismo. La porción glucosídica de su estructura le permite a la STZ utilizar el transportador GLUT2 en estas células, y el motivo de nitrosamida (metilnitrosourea) es responsable de la toxicidad del compuesto. La exposición a este compuesto produce



daños en el DNA de las células (ej, la alquilación) generando su fragmentación. Como consecuencia, la célula pone en marcha una serie de mecanismos de reparación del DNA, principalmente el que involucra a la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Esta enzima cataliza la síntesis de poli (ADP-ribosa) dependiente de NAD^+ (figura 1. 6. 1.). La STZ lleva a la hiperactividad de PARP-1 que resulta perjudicial para las células β ya que se produce una depleción importante del factor NAD^+ . Esta molécula es muy importante en el metabolismo energético, y una disminución de la misma, conlleva a un déficit de ATP (pues la biosíntesis de NAD^+ es ATP-dependiente). La deficiencia de ATP no solo ocurre por un aumento de la actividad de PARP-1 sino también porque la STZ provoca disfunción mitocondrial disminuyendo el consumo de oxígeno, la actividad de la enzima aconitasa y el potencial de membrana (figura 1. 6. 1.). Adicionalmente a estos efectos, la STZ produce cantidades pequeñas de especies reactivas del oxígeno en la células β del páncreas que contribuyen al daño celular (Szkudelsky, T., 2012).

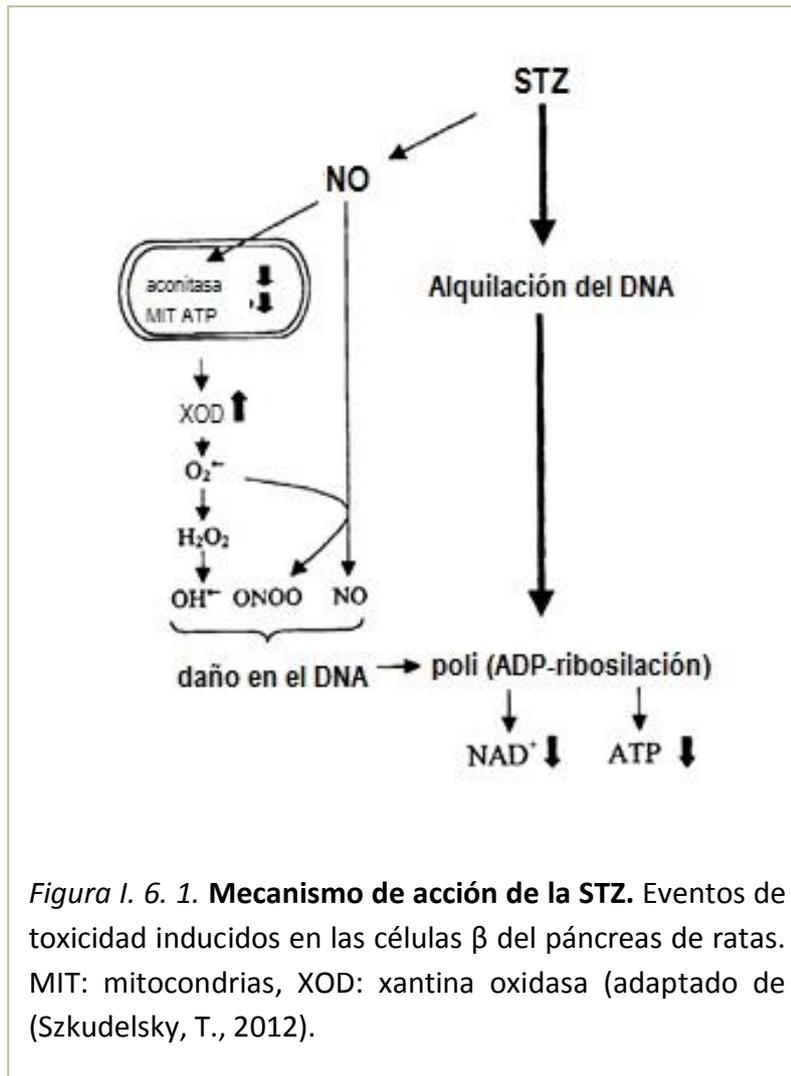
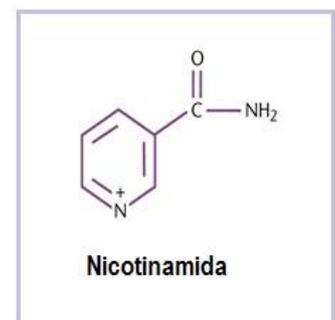


Figura I. 6. 1. Mecanismo de acción de la STZ. Eventos de toxicidad inducidos en las células β del páncreas de ratas. MIT: mitocondrias, XOD: xantina oxidasa (adaptado de (Szkudelsky, T., 2012).

Acción protectora del Nicotinamida

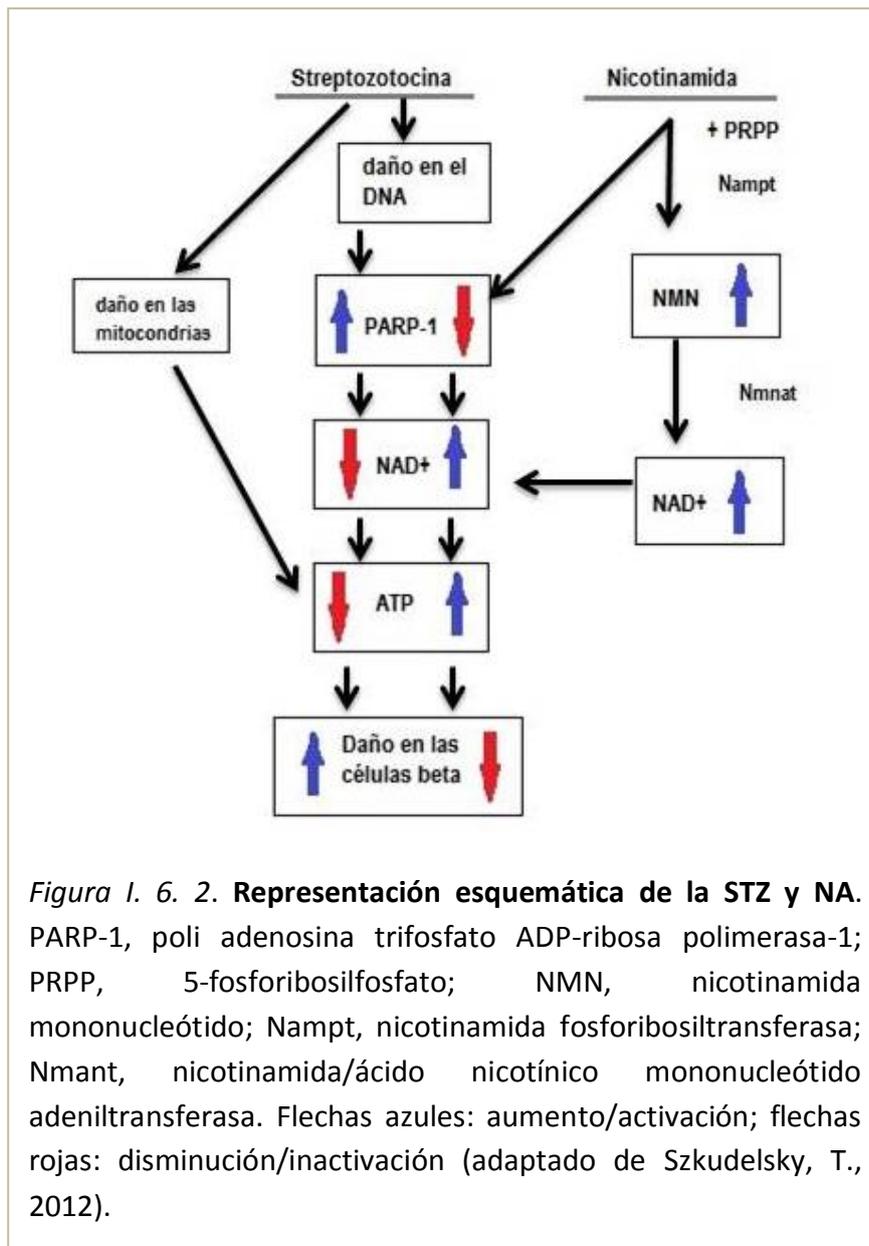
La nicotinamida (NA) (pyridina-3-carboxiamida) es la forma amida de la vitamina B3 (niacina). Su ácido correspondiente, el ácido nicotínico, actúa en el organismo como constituyente de dos coenzimas: NAD (Co-deshidrogenasa I) y NADP (Co-deshidrogenasa II). Estas coenzimas participan en procesos de óxido reducción como aceptores de hidrógenos, por lo cual juegan un papel fundamental en el metabolismo (Portela, M.L., 2003).



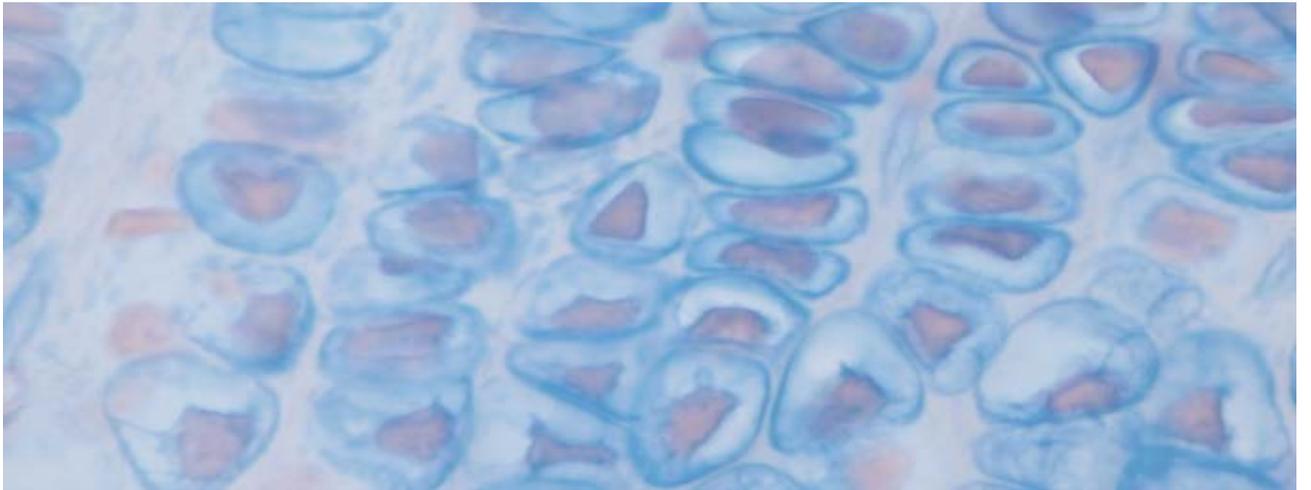
La NA inhibe la acción de la enzima PARP-1 al bloquear el sitio de acción catalítica de manera competitiva en su dominio C-terminal, donde une NAD^+ . Además de la inhibición de PARP-1, la acción protectora de la NA consiste en ser una fuente de NAD^+ .

En los mamíferos, la fuente de NAD^+ es proporcionada por la nicotinamida, y su formación es catalizada por dos enzimas: la nicotinamida-transferiltransferasa (Nampt) y la nicotinamida/ácido nicotínico mononucleótido adenil-transferasa (Nmnat). El primer paso de la generación de NAD^+ es catalizado por la Nampt, en donde la nicotinamida y el 5-fosforribosilpírofosfato (PRPP) forman mononucleótido de nicotinamida (NMN). Luego, el NMN mediante la acción de la Nmat, forma NAD^+ (*figura 1. 6. 2.*) (Szkudelsky, T., 2012).

Resumiendo, el mecanismo de la NA para proteger los efectos inducidos por la STZ involucra dos acciones principales: la inhibición de la enzima PARP-1 y la provisión de NAD^+ . A continuación se muestra una representación esquemática de la acción de la estreptozotocina y de la nicotinamida en las células β (*figura 1. 6. 2.*).



En síntesis, las ratas con diabetes inducida por la combinación STZ-NA tienen niveles de glucemias menores que los animales con diabetes inducida solo por STZ, así como también una disminución moderada de la masa de células β . Además, se caracterizan por conservar la respuesta secretora de insulina a la glucosa y algunos otros estímulos. Es importante destacar que, puesto que la gravedad de la diabetes en los animales puede ser leve, moderada o grave, dependiendo de la dosis de STZ y NA, este modelo experimental se puede utilizar para el estudio de la patología así como también de sus complicaciones de diversa gravedad.



CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS.

Se propone como **hipótesis** que la monoterapia con saxagliptina induce efectos deletéreos sobre el hueso, y que dichos efectos pueden prevenirse por el co-tratamiento con saxagliptina y metformina.

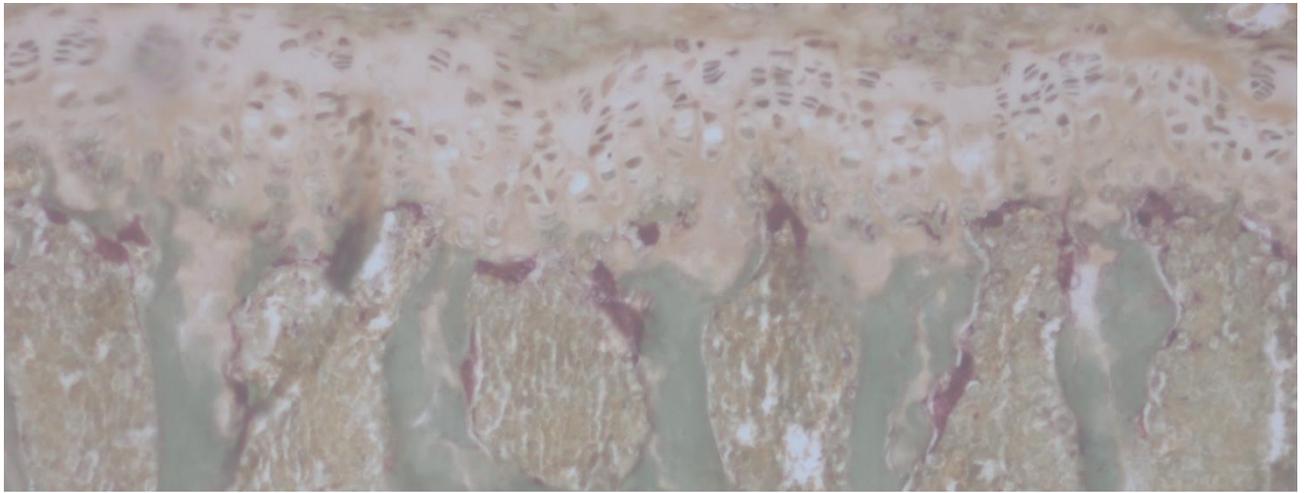
OBJETIVOS.

Objetivo general.

Investigar los efectos in vitro e in vivo de saxagliptina y/o metformina sobre el metabolismo óseo.

Objetivos Específicos.

1. Investigar los posibles efectos directos e indirectos de la saxagliptina sobre osteoblastos y células estromales de médula ósea en cultivo.
 2. Estudiar la posible modulación de dichas acciones de la saxagliptina, por co-incubación con metformina.
 3. Evaluar posibles mecanismos de acción involucrados en estos efectos *in vitro*.
 4. Investigar el efecto de un tratamiento oral con saxagliptina con o sin metformina, sobre la micro-arquitectura de huesos largos en ratas controles y diabéticas.
-



CAPÍTULO III

ESTUDIOS *IN VIVO*

III. ESTUDIOS *IN VIVO***III. 1. Objetivo.**

Investigar el efecto de un tratamiento oral con saxagliptina, con o sin metformina, sobre la micro-arquitectura de huesos largos en ratas controles y diabéticas.

III. 2. Diseño experimental.*III. 2. 1. Drogas y reactivos.*

- Saxagliptina, Bristol-Myers Squibb Company, USA.
- Metformina, Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina.
- Estreptozotocina, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- Nicotinamida, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- Fructosamina Kit colorimétrico, BioSystems S.A., Barcelona, España.
- Insulina de rata Kit ELISA, ALPCO, USA.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Biopack, Buenos Aires, Argentina.
- Hematoxilina Activada, Biopur, Rosario, Argentina.
- Eosina, Biopur, Rosario, Argentina.
- Fast Garnet GBC Base, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- α -Naftol AS-BI fosfato, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- Nitrito de Sodio, Biopack, Buenos Aires, Argentina.
- Tartrato de Sodio, Mallinckrodt, USA.
- Bálsamo sintético de montaje, Álwick, Buenos Aires, Argentina.

Todos los otros productos químicos y reactivos se adquirieron de fuentes comerciales y son de grado analítico.

III. 2. 2. Modelo animal de diabetes con déficit parcial de insulina.

Para llevar a cabo el objetivo de esta sección, empleamos un modelo animal de ratas con hiperglucemia generada por deficiencia en la producción y secreción de insulina, como consecuencia de la destrucción parcial de las células β del páncreas, como se detalló en la introducción (sección I. 6. 2.). Este modelo se obtiene realizando inyecciones intra-peritoneales consecutivas de nicotinamida (NA), 50 mg/kg, y de estreptozotocina (STZ), 60 mg/kg a ratas macho jóvenes Sprague-Dawley (3 meses de edad, 190-210 g de peso) (Tahara, A. et al., 2008). De este modo, la NA protege a las células β de la acción citotóxica de la STZ por reducción del estrés oxidativo intracelular.

Transcurridos 5 días a partir de las inyecciones de las drogas, se confirmó el estado diabético verificando la presencia de hiperglucemia en muestras de sangre de la vena de la cola utilizando un medidor de glucemia comercial (Accu-Check®). Las ratas inyectadas que no mostraron hiperglucemia fueron descartadas del ensayo.

III. 2. 3. Tratamientos farmacológicos.

Se utilizaron 32 animales que fueron inicialmente divididos en dos grupos: DIABÉTICOS, que recibieron inyecciones de STZ y NA como se detalló anteriormente; y CONTROLES (no diabéticos).

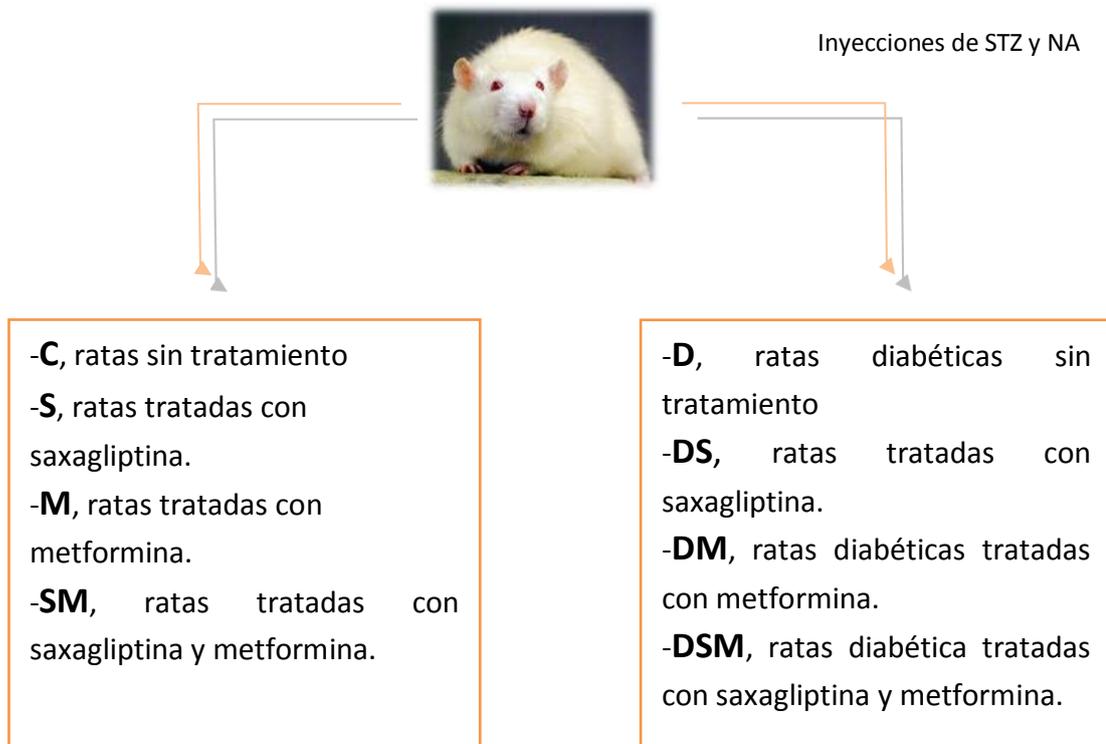
A su vez, cada grupo se dividió en cuatro sub-grupos con cuatro (4) animales cada uno, en función del tratamiento o no con **saxagliptina** (2 mg/kg/día, Bristol-Myers Squibb Company, USA) (Tahara, A. et al., 2009; Fura, A. et al, 2009) y/o **metformina** (100 mg/kg/día, Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina) (Molinuevo, M.S. et al., 2010). Las drogas fueron administradas diariamente en el *agua de bebida*, y los animales tomaron agua *ad libitum*. Todos los tratamientos farmacológicos se realizaron por un período de 21 días. Los 8 sub-grupos así definidos fueron:

- (1) Controles (no diabéticas) **sin tratamiento(C)**.
 - (2) No diabéticas tratadas con **saxagliptina (S)**.
 - (3) No diabéticas tratadas con **metformina (M)**.
 - (4) No diabéticas tratadas con **saxagliptina y metformina (SM)**.
-

- (5) Diabéticas **sin tratamiento (D)**.
- (6) Diabéticas tratadas con **saxagliptina (DS)**.
- (7) Diabéticas tratadas con **metformina (DM)**.
- (8) Diabéticas tratadas con **saxagliptina y metformina (DSM)**.

Al final de todos los tratamientos, los animales fueron anestesiados con éter para la obtención de muestras de sangre por punción de la vena cava inferior, con obtención y separación del suero de la manera habitual. A continuación, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Los huesos largos de las extremidades posteriores se disecaron y colocaron inmediatamente en una solución fijadora de formalina neutra tamponada 10%. Los huesos se procesaron para su posterior análisis, como se describirá más adelante.

Durante los experimentos los animales se mantuvieron en un bioterio con temperatura controlada (23 °C), con ciclos fijos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, alimentados de acuerdo a las normas estándar de laboratorio y bebiendo agua *ad libitum*. Todos los ensayos con animales se realizaron en conformidad con la guía de Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio (Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, 2011, 8va Edición), bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales - Disposición ANMAT 5330/97 - e internacionales - Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones. La aprobación de los estudios en animales se obtuvo del comité de acreditación institucional 112 (Garantía de Bienestar Animal de INIBIOLP N° A5647-01).

Esquema del diseño experimental in vivo.

Agua ad libitum

*saxagliptina 2 mg/kg/día
metformina 100 mg/kg/día
21 días*

✓ Determinación de parámetros bioquímicos

✓ Histomorfometría

- Volumen trabecular
- Densidad de osteocitos
- Densidad de osteoblastos
- Densidad de adipocitos
- Superficie osteoclástica
- Altura de la placa de crecimiento

III. 2. 4. Parámetros bioquímicos determinados.

En las muestras de suero obtenidas post-tratamiento de todas las ratas (no en ayunas), se determinaron un conjunto de parámetros bioquímicos que permitieron evaluar el estado metabólico de los animales. Los parámetros medidos fueron: **Glucosa, Triglicéridos, Colesterol, Alanina Amino Transferasa (ALT), Urea y Fosfatasa Alcalina (ALP)**. Para confirmar el déficit de insulina como causa de Diabetes, en algunos animales diabéticos y no diabéticos se dosaron los niveles de insulinemia mediante un kit de ELISA específico para rata (ALPCO, USA.). En los mismos animales y para evaluar el grado de descompensación del metabolismo hidrocarbonado inducido por la Diabetes, se determinó la concentración de Fructosamina sérica con un kit colorimétrico (BioSystems S.A., Barcelona, España).

Para todas estas determinaciones se usaron kits comerciales (Laboratorios Wiener, Argentina) con un Analizador Químico automático 2300 Plus (Metrolab, Argentina). Se cuantificó también en cada muestra el nivel de **insulina** mediante un kit de ELISA específico para rata (ALPCO, USA.), así como el nivel de **fructosamina** sérica con un kit colorimétrico (BioSystems S.A., Barcelona, España).

*III. 2. 5. Análisis histomorfométrico de los fémures.**a. Procesamiento de los fémures.*

Los fémures de las ratas de los 8 grupos de experimentación fueron disecados y se colocaron inmediatamente en una solución fijadora de formalina neutra tamponada al 10% durante 24 horas.

Posteriormente, las muestras fijadas fueron decalcificadas con una solución de ácido etilen-diamino-tetraacético al 10% (EDTA) pH=7, durante 25 días, a temperatura ambiente. A continuación, los huesos se deshidrataron utilizando solventes orgánicos con distinto grado de polaridad. El proceso se inició con soluciones de alcohol con decreciente grado de hidratación (70 °, 96 ° y 100 °), xileno y finalmente se incluyeron los huesos en parafina fundida a 56 °C. Se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor con un micrótopo Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los cortes se recogieron en un baño termostático de

flotación y fueron secados en estufa durante 2 horas a 50 °C (SanJor, Buenos Aires, Argentina). Las secciones se procesaron para su análisis histológico y morfométrico estático.

b. Coloraciones histológicas.

Los cortes histológicos se sumergieron en xileno para eliminar la parafina, luego se rehidrataron usando el tren de hidratación (alcoholes con grado creciente de hidratación: 100°, 96° y 70°), y finalmente se colorearon. Se emplearon las siguientes tinciones: **hematoxilina y eosina (H-E)** para las determinaciones de rutina del tejido óseo (volumen trabecular, densidad de osteocitos, densidad de osteoblastos y de adipocitos), la reacción histoquímica de la **fosfatasa ácido tartrato resistente (TRAP)** para identificar osteoclastos (Schell, H. et al., 2006); y **Azul Alcian pH 2,5 (AA)** para evaluar la placa de crecimiento epifisaria. Los cortes coloreados fueron fotografiados con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 acoplada a un microscopio óptico Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tokio, Japón) y posteriormente analizados usando el programa Image J (www.macbiophotonics.ca/imagej).

A continuación se detalla la técnica de las coloraciones realizadas.

Hematoxilina-eosina (H-E).

Los cortes hidratados, se tiñeron con hematoxilina (1 minuto), se lavaron con agua corriente (5 minutos) y se sumergieron en eosina (30 segundos). Finalmente, se enjuagaron con agua destilada, se deshidrataron utilizando solventes cada vez menos polares (alcohol 70°, 96°, 100°, xileno) y se montaron con bálsamo sintético. Se observaron con un microscopio óptico y fotografiaron.

Histoquímica para fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).

Esta técnica histoquímica se realiza a pH ácido y en presencia de tartrato de sodio para poner en evidencia la actividad de fosfatasas ácidas que no se inhiben por tartrato. En estas condiciones el naftol AS-BI es liberado por hidrólisis enzimática a partir de α -naftil fosfato ASBI, y se acopla inmediatamente con Fast Garnet formando depósitos de color púrpura / violeta en las células (osteoclastos) que presentan actividad TRAP POSITIVA (TRAP+).

Los cortes desparafinados e hidratados se sumergieron en una solución con buffer citrato (pH 4,9), α -Naftol AS-BI fosfato (0,017%) y tartrato de sodio (0,15%) que se termostató en un baño a 37 °C. Previamente, el Fast Garnet GBC debe ser diazotado, para lo cual se disolvió el Fast Garnet GBC (0,015%) en 1 ml de metilglicol y 2 ml de ácido clorhídrico 0,1N. A esta última solución, se le agregó paulatinamente nitrito de sodio (0,01%) disuelto en 1 ml de agua destilada. Se mezcló por inversión 30 segundos y se dejó reposar la mezcla de reacción durante 3 minutos para permitir la diazotación. Inmediatamente se combinaron ambas soluciones y se sumergieron los cortes histológicos permitiendo que la reacción ocurra durante 1 hora en la oscuridad, a 37 °C. Los cortes se contra-colorearon con una solución de Verde Claro (1%); se montaron en glicerina, se observaron al microscopio óptico y se fotografiaron para su cuantificación posterior con el programa de análisis de imágenes.



Figura III. 2. 2.: Histoquímica de TRAP. Fotos de cortes histológicos teñidos con TRAP, las flechas indican actividad TRAP positiva. Aumento: **(A)** 40x **(B)** 100x **(C)** 400x.

Azul Alcian, pH 2,5.

El colorante Azul Alcian a pH 2,5 tiñe de color azul a las mucinas altamente sulfatadas sintetizadas por los condrocitos de la placa de crecimiento epifisaria.

Los cortes fueron hidratados y sumergidos en una solución acuosa de Azul Alcian (2%) en ácido acético pH 2,5 durante 5 horas. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, se contra colorearon con eosina (30 segundos) y se deshidrataron para su posterior montaje con bálsamo sintético. Se observaron al microscopio óptico y se fotografiaron para su cuantificación con un programa de análisis de imágenes.

c. Parámetros histomorfométricos estáticos evaluados.

Se evaluaron los siguientes parámetros histomorfométricos de acuerdo a criterios establecidos por la *American Society for Bone and Mineral Research* (Dempster, D.W. et al., 2013). Se consideró a la esponjosa primaria la franja de la metáfisis femoral ubicada entre la placa de crecimiento y los primeros 250 μm hacia la diáfisis. La esponjosa secundaria involucró una región delimitada entre 250 μm y 500 μm hacia la diáfisis. Los parámetros evaluados fueron:

- Volumen de hueso trabecular: se determinó como la razón entre el volumen ocupado por hueso trabecular y el volumen total (hueso trabecular más cavidades medulares) en la esponjosa secundaria en cortes coloreados con H-E.
 - Densidad de osteocitos: se cuantificó el número de osteocitos presentes por unidad de área de hueso trabecular en cortes coloreados con H-E. Los resultados se determinaron como número de osteocitos/ mm^2 de hueso trabecular.
 - Densidad de osteoblastos: se determinó el número de osteoblastos por milímetro de superficie lineal de hueso trabecular (interfase hueso/cavidad medular).
 - Densidad de adipocitos: se determinó el número de adipocitos por unidad de área de la cavidad medular, tanto en la esponjosa primaria como en la secundaria en cortes coloreados con H-E. Los resultados se expresan como número de adipocitos/ mm^2 de médula ósea.
 - Superficie osteoclástica: en secciones teñidas con la reacción histoquímica de TRAP y en los 250 μm proximales de la esponjosa primaria, se cuantificó el área TRAP positiva por unidad de área de hueso trabecular. Los resultados se expresan como porcentaje de la condición basal.
 - Altura de la placa de crecimiento: se determinó la altura de la placa epifisaria (de crecimiento) en los cortes teñidos con Azul Alcian. Se tomaron 3 determinaciones de la altura de la placa en la zona central de cada sección. Los resultados se expresan como altura promedio (μm) de la placa de crecimiento para cada condición.
-

III. 2. 6. *Análisis estadístico.*

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Se analizaron 6 secciones de cada fémur de cada animal. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA con test Tukey post-hoc. Para datos con distribución no normal se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis con test de Dunn post-hoc, usando el programa estadístico GraphPad In Statversion 3.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Se consideró significativo un $p < 0,05$ para todos los análisis estadísticos.

III. 3. Resultados de los estudios *in vivo*.*III. 3. 1. Determinación de parámetros bioquímicos.*

Con el fin de conocer el estado general y el control metabólico de los animales en las diferentes condiciones experimentales realizamos la determinación de diferentes parámetros bioquímicos que se muestran en la **Tabla Nº 1**. En los animales no diabéticos, la monoterapia con saxagliptina y/o metformina durante 21 días, no indujo cambios significativos en los parámetros determinados.

Los animales que fueron inyectados con STZ y NA mostraron un aumento significativo de los niveles de glucosa (Tabla Nº 1); bajos niveles de insulinemia, control ($1,26 \pm 0,17$) ng/L y diabético ($0,2 \pm 0,09$) ng/L; y elevados de fructosamina, control (147 ± 26) umol/L y diabético (239 ± 12) umol/L. Estos valores son consistentes con nuestro modelo de diabetes insulino-pénica, en el cual se induce farmacológicamente la destrucción parcial de las células β del páncreas. Los animales diabéticos que recibieron saxagliptina (DS) en el agua de bebida no mostraron diferencias significativas en sus parámetros bioquímicos respecto a las ratas diabéticas sin tratamiento (D). Se observó también que la monoterapia con metformina en los animales diabéticos (DM) produjo una corrección parcial de la glucemia (grupo DM $p < 0,05$ vs. D) y trigliceridemia (grupo DM $p < 0,01$ vs. D). Por último, el co-tratamiento con saxagliptina y metformina en ratas diabéticas (grupo DSM) generó una reducción parcial de los valores de triglicéridos respecto al grupo DS ($p < 0,01$) mientras que no indujo diferencias significativas respecto del grupo sin tratamiento (D) en el resto de los parámetros evaluados.

Tabla Nº 1: Parámetros bioquímicos determinados en sangre.

	Glucemia (mg/L)	Triglicéridos (mg/L)	Colesterol (mg/L)	TGP (UI/L)	Urea (mg/L)	ALP (UI/L)
C	180±20	51±4	51±6	44±6	52±2	731±49
S	201±15	72±5	46±1	27±3	42±1	545±36
M	181±9	46±8	44±2	42±4	50±2	655±28
SM	187±14	30±8	46±1	16±2	43±3	500±29
D	453 ±40 *	210 ±32 *	48 ±3	128 ±31	43 ±3	1084 ±129
DS	432 ±81	302 ±27	65 ±5	130 ±35	45 ±6	956 ±114
DM	309 ±21 ^{###}	91 ±26 ^{##}	49 ±3	82 ±11	53 ±4	850 ±121
DSM	580 ±47 ^Δ	136 ±25 ^{φφ}	78 ±8	147 ±54	64 ±14	1002 ±134

Parámetros sanguíneos postprandiales. Se indujo un estado diabético con deficiencia parcial en la secreción de insulina mediante la inyección de NA y STZ. Los resultados se expresan como la media ± SEM. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,05$, vs. D; φ $p < 0,001$, φφ $p < 0,01$ vs. DS; Δ $p < 0,001$ vs. DM.

III. 3. 2. Estudio histomorfométrico de los fémures en las diferentes condiciones experimentales.

El efecto de la saxagliptina y/o metformina oral sobre la microarquitectura ósea de animales diabéticos y no diabéticos se evaluó mediante histomorfometría estática utilizando las coloraciones y los parámetros previamente mencionados (sección III. 2. 5. b.).

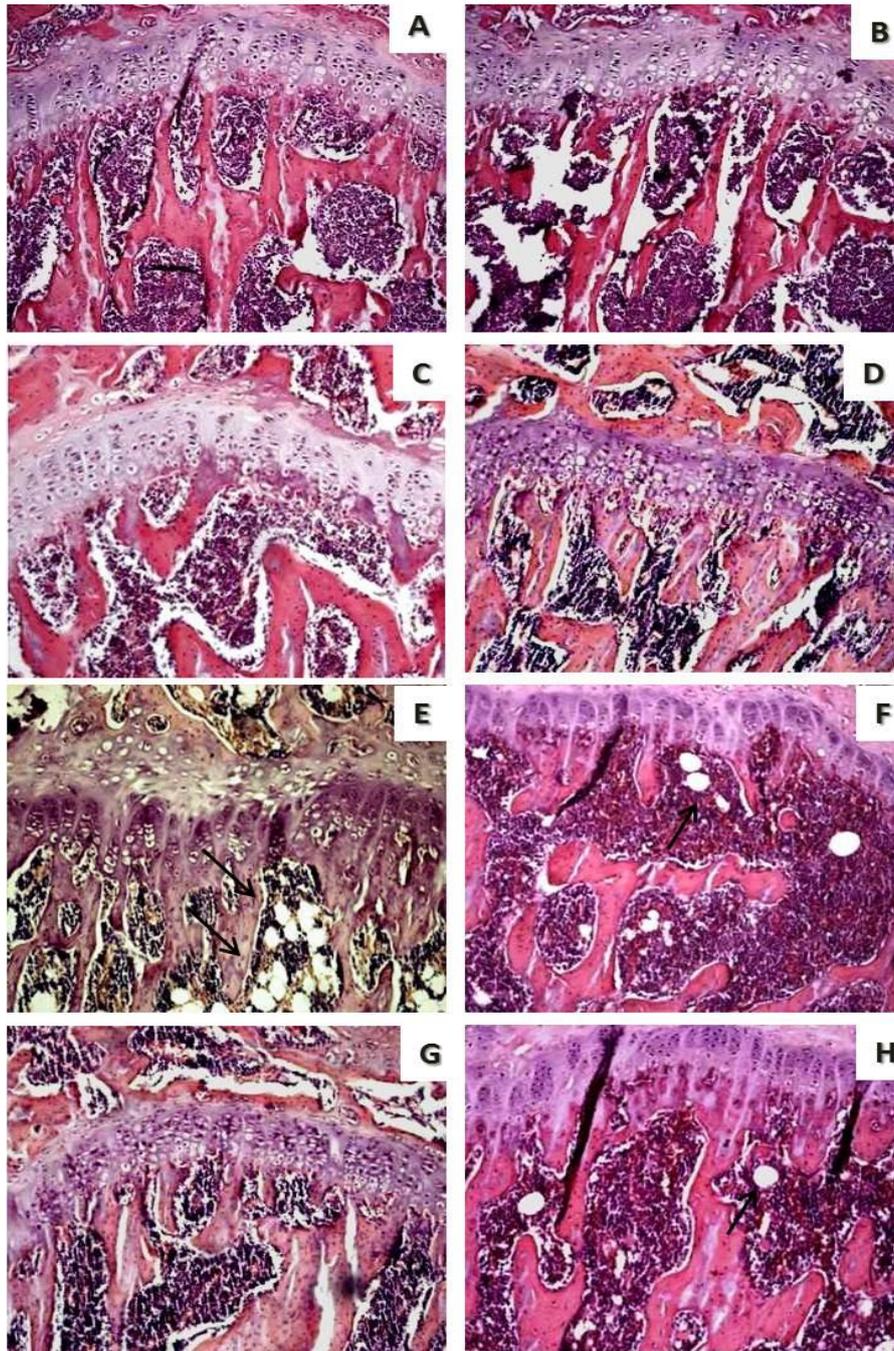
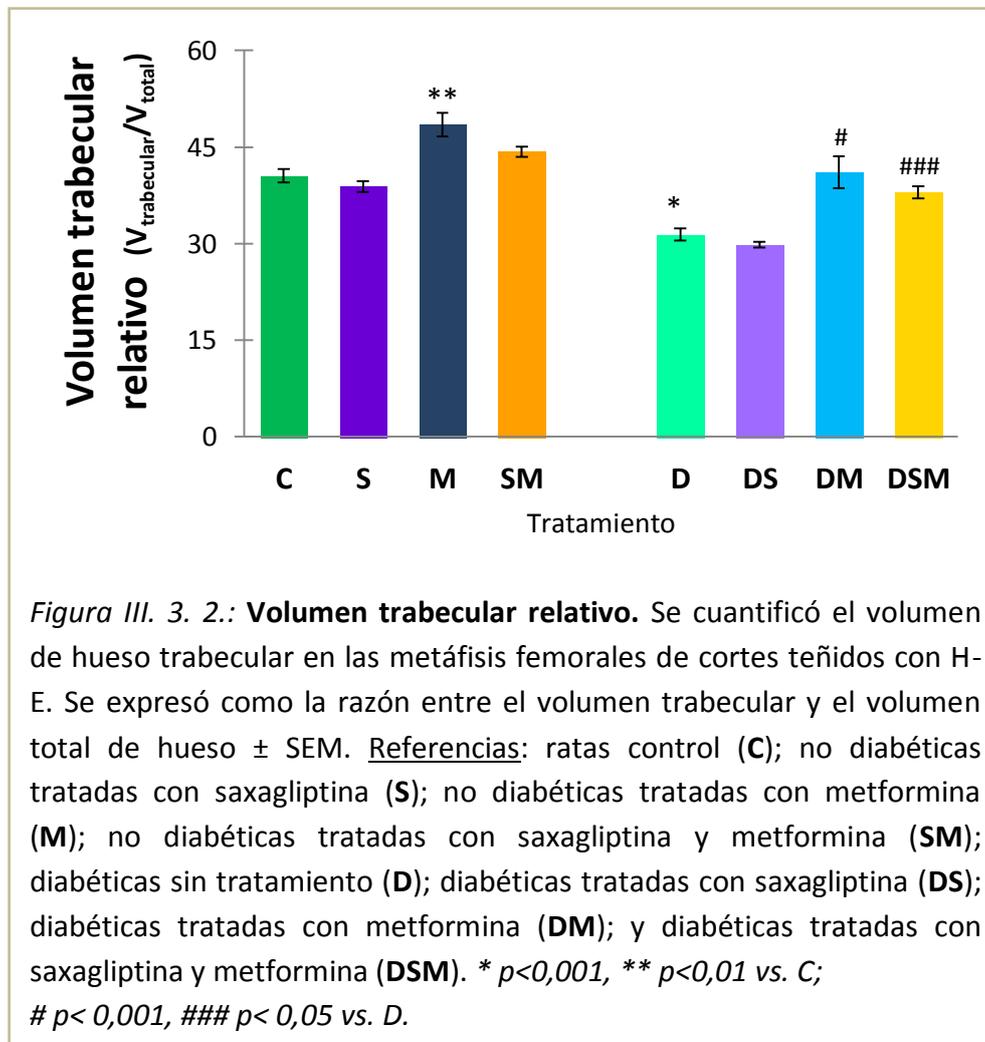


Figura III. 3. 1.: Efecto de la saxagliptina y metformina sobre la microarquitectura ósea femoral de ratas. Fotos de cortes histológicos representativos de fémures de: (A) ratas control; (B) no diabéticas tratadas con saxagliptina; (C) no diabéticas tratadas con metformina; (D) no diabéticas tratadas con saxagliptina y metformina; (E) diabéticas sin tratamiento; (F) diabéticas tratadas con saxagliptina; (G) diabéticas tratadas con metformina; y (H) diabéticas tratadas con saxagliptina y metformina. Las flechas señalan adipocitos en la médula ósea. Las dobles flechas indican la altura de la placa de crecimiento. Aumento 100x.

a. Volumen de hueso trabecular.

Encontramos que los animales no diabéticos que recibieron el inhibidor de DPP-4 (saxagliptina) en el agua de bebida no presentaron diferencias significativas en los volúmenes relativos de hueso trabecular de las metáfisis proximales de los fémures respecto de los animales control (no diabéticos, sin tratamiento) (figura III. 3. 1. **A** y **B** y figura III. 3. 2.). Las ratas no diabéticas a las que se les administró metformina (M) mostraron un aumento del 20% en el volumen trabecular relativo respecto del control ($p < 0,01$), que no fue observado en el co-tratamiento con saxagliptina y metformina (figura III. 3. 1. **C** y **D**; figura III. 3. 2.).



Por otro lado, la inducción de diabetes (grupo D) generó una disminución del 25% en el volumen trabecular relativo ($p < 0,001$ vs. D, *figura III. 3. 1. E y figura III. 3. 2.*) que no se vio alterado por la monoterapia con saxagliptina (grupo DS, *figura III. 3. 1. F y figura III. 3. 2.*). Sin embargo, el tratamiento con metformina previno completamente la disminución del volumen trabecular relativo inducido por la diabetes (grupo DM, $p < 0,001$ vs. D, *figura III. 3. 1. G y figura III. 3. 2.*). Los animales diabéticos que fueron tratados con saxagliptina y metformina (grupo DSM) mostraron efectos similares a los encontrados con la monoterapia con metformina (grupo DSM, $p < 0,05$ vs. D, *figura III. 3. 1. H y figura III. 3. 2.*).

A continuación, analizamos el efecto del tratamiento farmacológico sobre la celularidad del tejido óseo. Para ello, cuantificamos la densidad de osteoblastos, de osteocitos y la superficie osteoclástica (representada por el área TRAP).

b. Densidad de osteoblastos.

Los osteoblastos son células cúbicas que revisten las trabécula ósea (*Figura III. 3. 3.*). La densidad osteoblástica (n° de osteoblastos por unidad de interfase trabécula/médula ósea) se cuantificó en las metáfisis femorales proximales para los 8 grupos experimentales.

En los animales no diabéticos, la monoterapia con saxagliptina indujo una disminución de un 30% en la densidad de los osteoblastos (grupo S, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 4.*) mientras que la monoterapia con metformina aumentó significativamente este parámetro (grupo M, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 4.*). En el co-tratamiento, la metformina fue capaz de prevenir parcialmente el efecto deletéreo de la saxagliptina (grupo SM, $p < 0,001$ vs. S, *figura III. 3. 4.*).

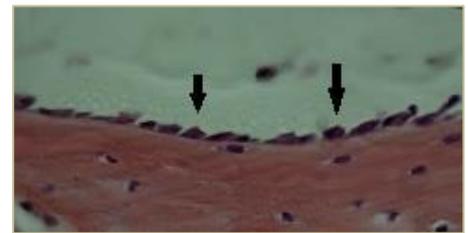
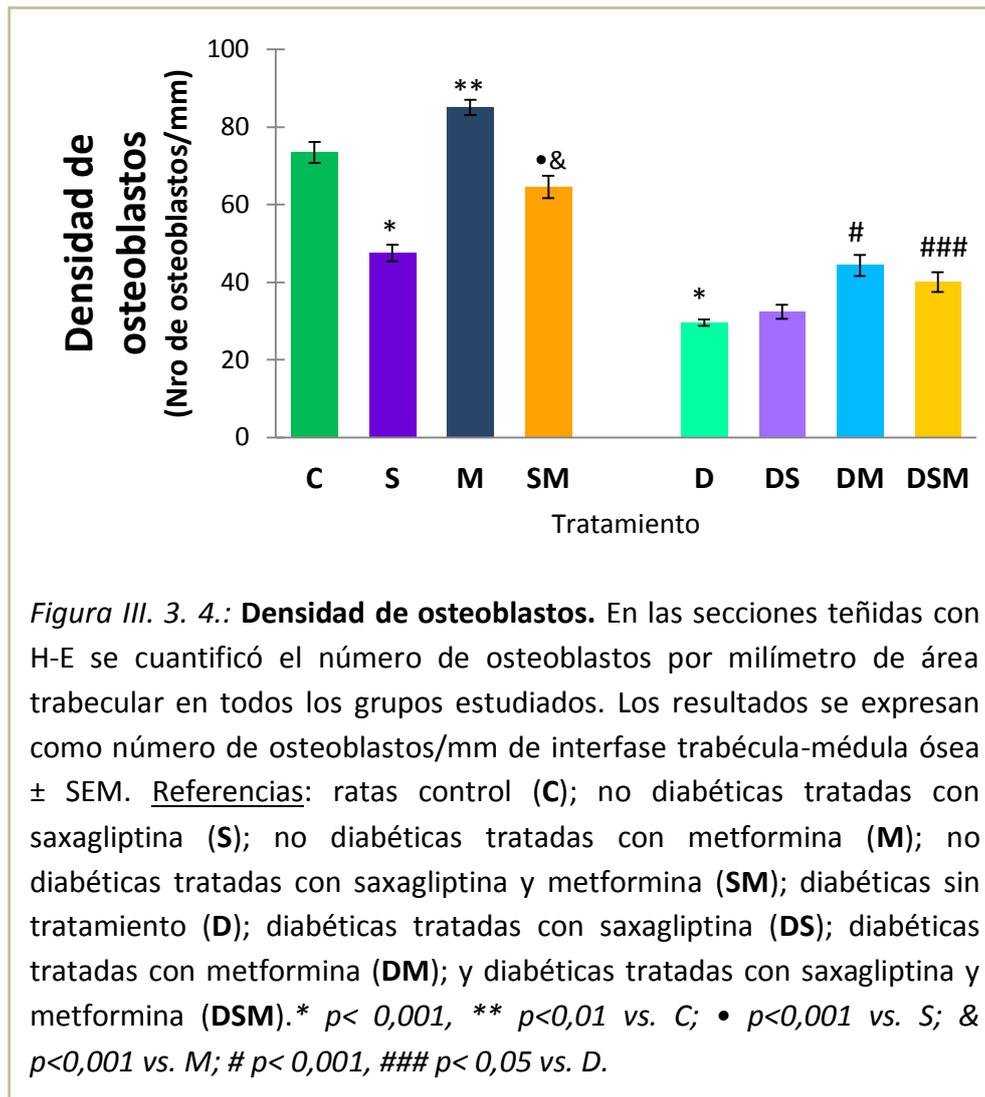


Figura III. 3. 3.: Interfase entre una trabécula y la médula ósea. Se observan osteoblastos (señalados con flechas) revistiendo la cara endóstica. Aumento 400x.



Por otro lado, la inducción de diabetes provocó una disminución del 60% en la densidad osteoblástica luego de 21 días (grupo D, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 4.*), que no fue modificado por el tratamiento oral con saxagliptina (grupo DS, *figura III. 3. 4.*); mientras que la monoterapia con metformina previno parcialmente el efecto deletéreo de la diabetes (grupo DM, $p < 0,001$ vs. D, *figura III. 3. 4.*). Un efecto similar se observó con el co-tratamiento saxagliptina-metformina (grupo DSM, *figura III. 3. 4.*).

c. Densidad de osteocitos.

La densidad de osteocitos (nº de osteocitos por unidad de área de hueso trabecular) fue evaluada, al igual que el volumen trabecular y el número de osteoblastos, en la esponjosa secundaria de las metáfisis proximales de los fémures de todos los grupos experimentales. En la *figura III. 3. 5.* se pueden observar osteocitos inmersos en la matriz extracelular (originalmente calcificada) de trabéculas óseas coloreadas con H-E, correspondientes a metáfisis femorales de un animal no diabético sin tratamiento (izquierda) o tratado con saxagliptina (derecha).

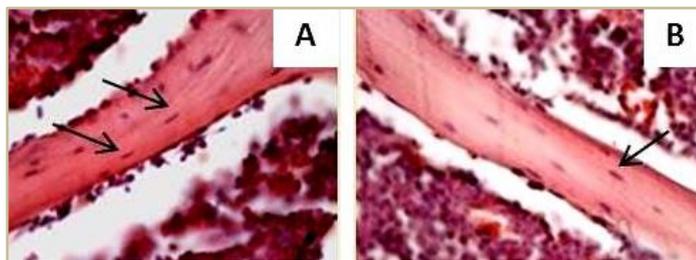
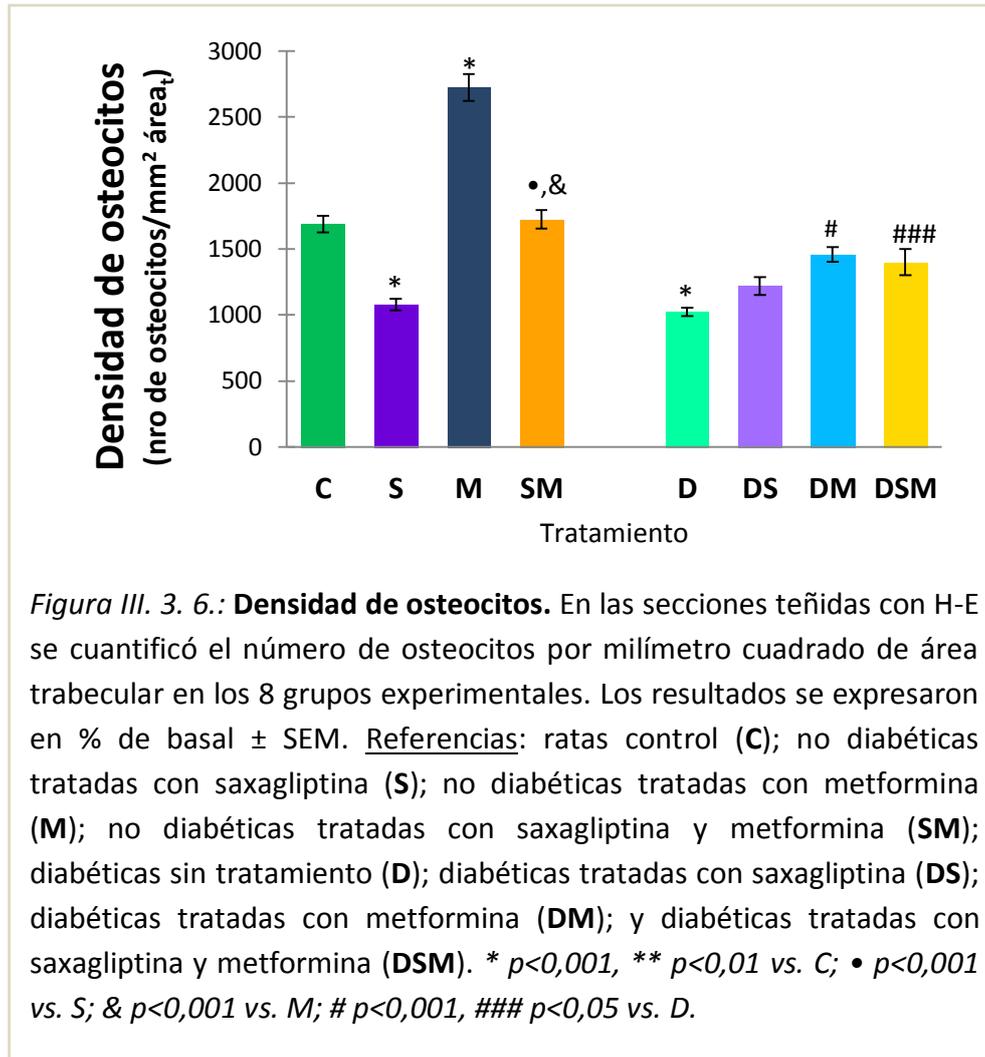


Figura III. 3. 5.: Trabécula ósea. Cortes histológicos coloreados con H-E de fémures de ratas no diabéticas: **(A) control**, y **(B)** tratadas con **saxagliptina**. Las flechas indican los osteocitos inmersos en la matriz. Aumento 400x.

En los animales no diabéticos, la monoterapia con saxagliptina indujo una disminución de un 35% en la densidad de osteocitos (grupo S, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 6.*). Por otro lado, la monoterapia con metformina aumentó en un 60% este parámetro histomorfométrico (grupo M, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 6.*). Asimismo, en el co-tratamiento la metformina fue capaz de prevenir el efecto deletéreo de la saxagliptina sobre la densidad de los osteocitos (grupo SM, $p < 0,001$ vs. S, *figura III. 3. 6.*).

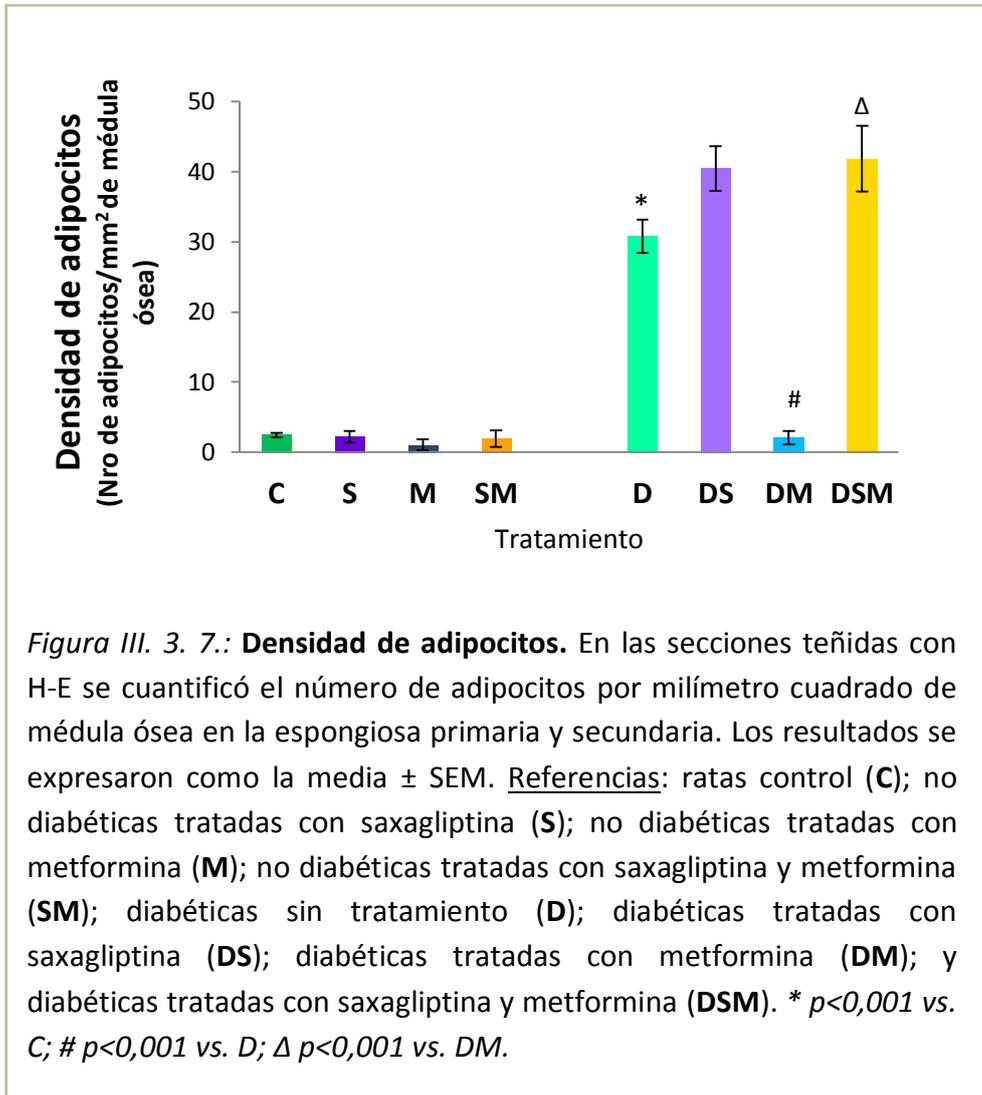


Luego de 21 días de inducción de la diabetes, se observó una disminución de un 40% en la densidad de osteocitos respecto del grupo control no diabético (grupo D, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 6.*); efecto que no fue alterado por el tratamiento con saxagliptina (grupo DS, *figura III. 3. 6.*). Por otro lado, la monoterapia con metformina previno el efecto deletéreo de la diabetes en este parámetro (grupo DM, $p < 0,001$ vs. D, *figura III. 3. 6.*); un efecto similar se observó con el co-tratamiento (grupo DSM, $p < 0,05$ vs. D, *figura III. 3. 6.*).

d. Densidad de adipocitos

En cortes coloreados con H-E, se determinó para los 8 grupos experimentales el número de adipocitos uniloculares por unidad de área de la médula ósea femoral (densidad de adipocitos), tanto a nivel de la esponjosa primaria como de la secundaria.

Los animales no diabéticos (tratados o no) no evidenciaron diferencias significativas en la adiposidad medular (*figura III. 3. 1. y en la figura III. 3. 7.*). Sin embargo, la inducción de diabetes *per se* incrementó significativamente el número de adipocitos en la médula ósea (grupo D, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 7. y figura III. 3. 1.*). Este efecto fue completamente prevenido por la monoterapia con metformina (grupo DM, $p < 0,001$ vs. D); mientras que no sufrió modificaciones por el tratamiento con saxagliptina (grupo DS) (*figura III. 3. 1. y III. 3. 7.*). La saxagliptina fue capaz de neutralizar el efecto beneficioso de la metformina sobre este parámetro (grupo DSM, $p < 0,001$ vs. DM, *figura III. 3. 7.*).



e. Densidad de osteoclastos.

Los osteoclastos son las únicas células del tejido óseo que expresan la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) en niveles elevados. Para identificar y semi-cuantificar estas células de manera selectiva en las secciones histológicas, pusimos en evidencia esta actividad enzimática mediante una reacción histoquímica para TRAP que empleamos de rutina en nuestro laboratorio. Se analizaron de esta manera secciones correspondientes a metáfisis femorales de animales de los 8 grupos experimentales.

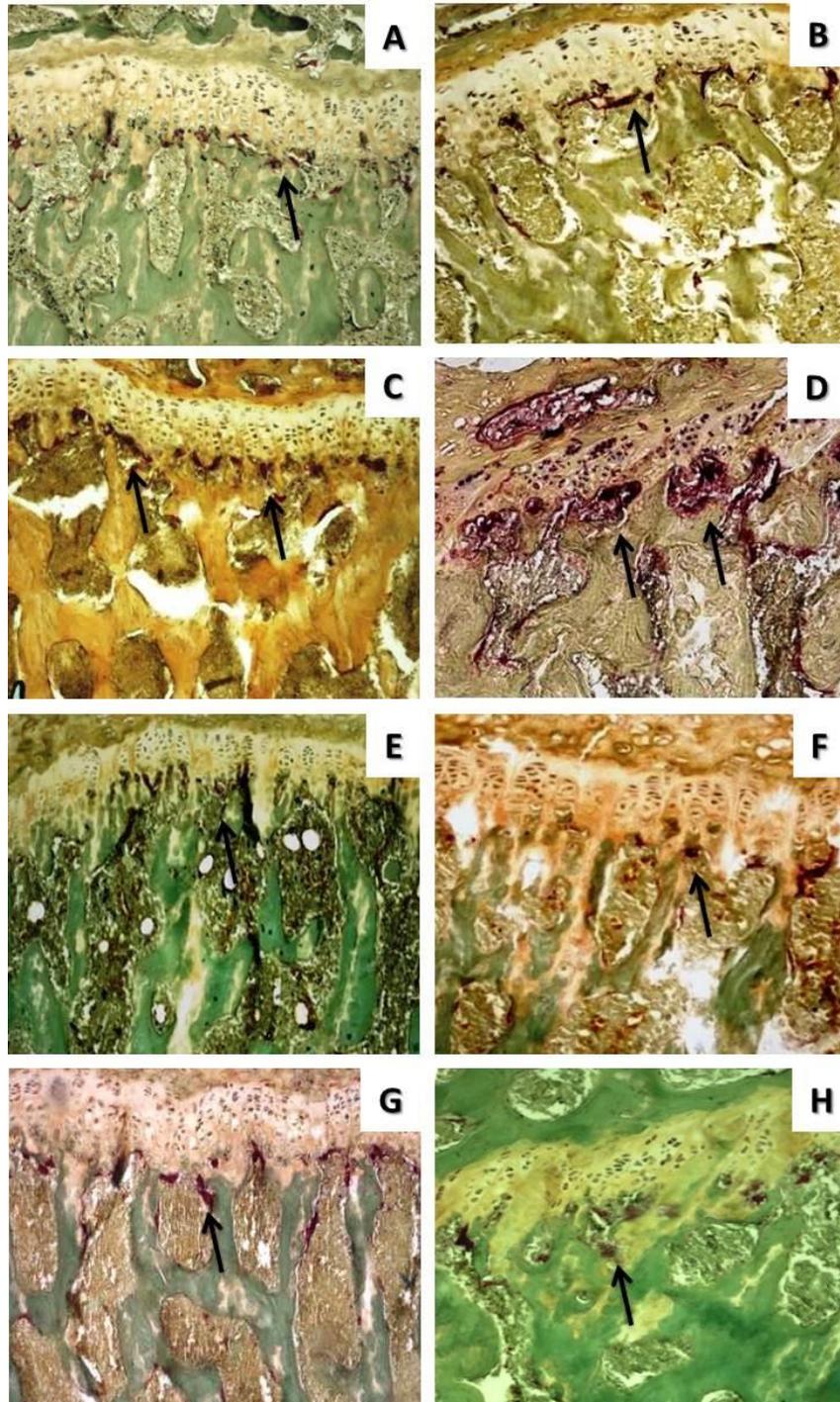
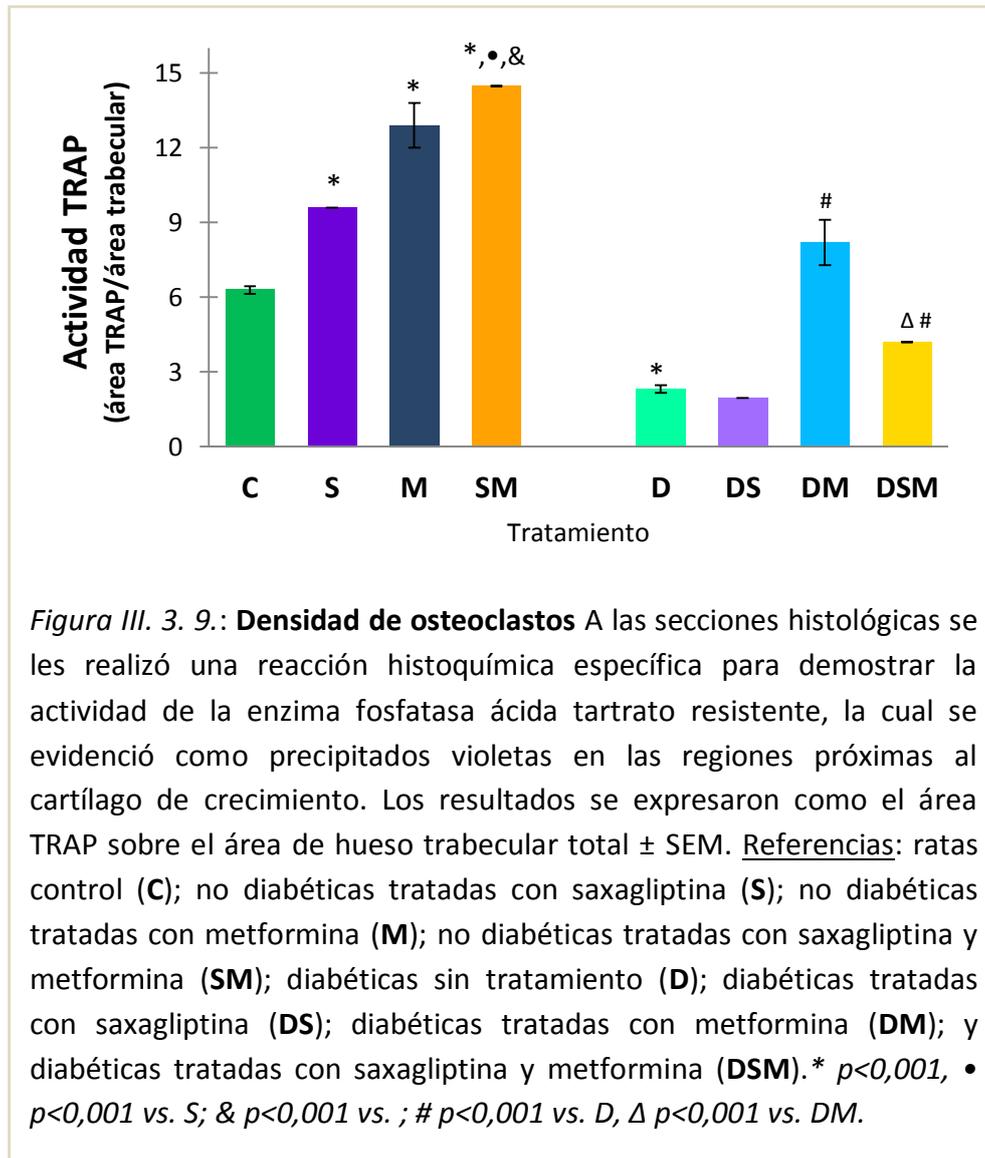


Figura III. 3. 8.: Actividad TRAP. La actividad de los osteoclastos se evaluó en las metáfisis femorales de los grupos experimentales mediante la reacción histoquímica de TRAP, **(A)** ratas control; **(B)** no diabéticas tratadas con saxagliptina; **(C)** no diabéticas tratadas con metformina; **(D)** no diabéticas tratadas con saxagliptina y metformina; **(E)** diabéticas sin tratamiento; **(F)** diabéticas tratadas con saxagliptina; **(G)** diabéticas tratadas con metformina; y **(H)** diabéticas tratadas con saxagliptina y metformina. Las flechas señalan actividad TRAP positiva (depósitos violetas). Aumento 100x.

En las ratas no diabéticas todos los tratamientos farmacológicos (monoterapia con saxagliptina, monoterapia con metformina o tratamiento combinado) incrementaron significativamente la densidad osteoclástica en la esponjosa primaria respecto del control (grupos S, M y SM; $p < 0,001$ vs. C, figura III. 3. 8. **B, C, D** y III. 3. 9.).

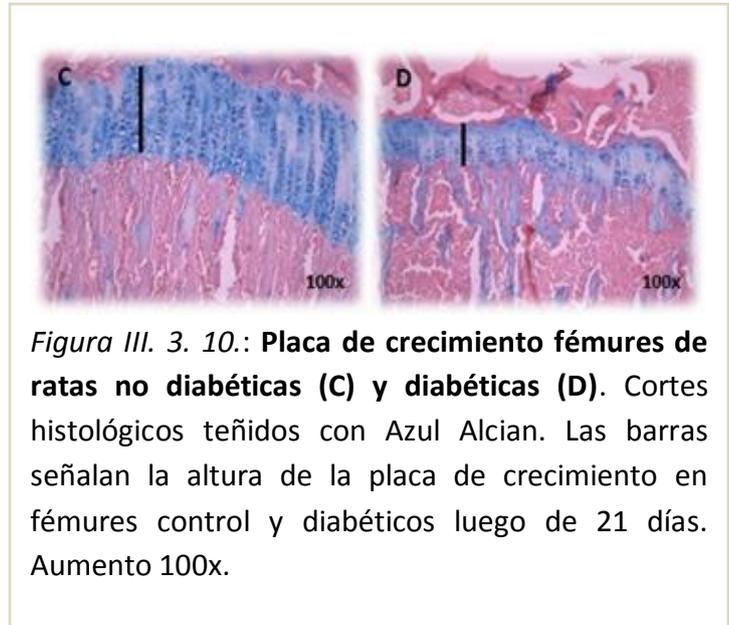


Por otro lado, la inducción de diabetes *per se* se asoció con un 60% de reducción en la densidad osteoclástica de la esponjosa primaria (grupo D, $p < 0,001$ vs. C, figura III. 3. 8. **E** y figura III. 3. 9.), mientras que la monoterapia con saxagliptina (grupo DS) no generó cambios adicionales en este parámetro óseo. Sin embargo, el tratamiento con metformina pudo prevenir completamente la disminución del área TRAP relativa inducida por la diabetes (grupo

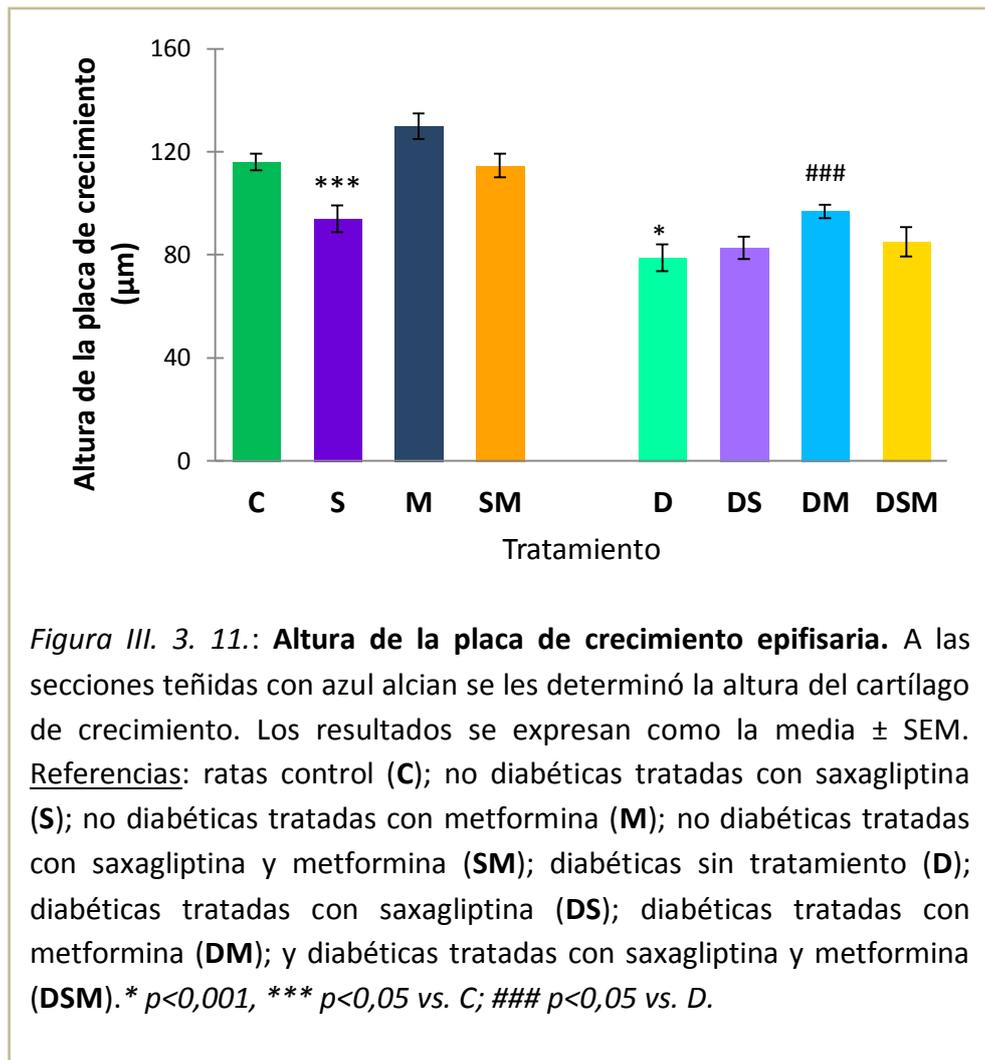
DM, $p < 0,001$ vs. D, *figura III. 3. 8. G y figura III. 3. 9*), y fue parcial para el caso de la terapia combinada con saxagliptina (grupo DSM, $p < 0,001$ vs. D, *figura III. 3. 8. H y figura III. 3. 9*).

f. Altura de la placa de crecimiento epifisaria.

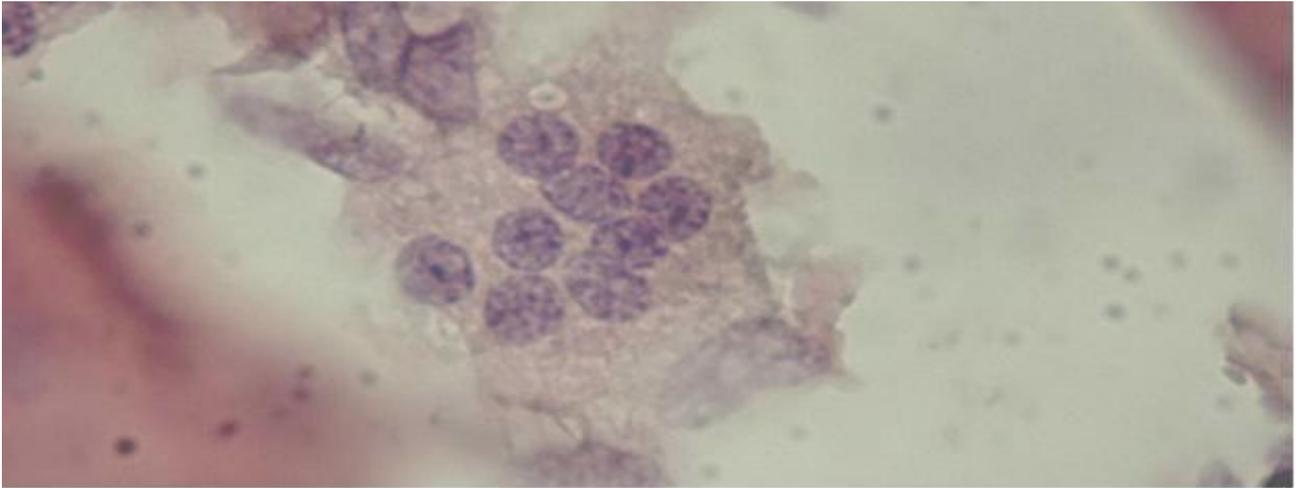
La placa epifisaria, constituida principalmente por cartílago hialino, es un componente crucial para el crecimiento longitudinal del hueso. Su altura depende de fenómenos complejos y contrapuestos, dado que aumenta con una mayor proliferación e hipertrofia de los condrocitos, pero disminuye con un aumento de la actividad de los osteoclastos (*Figura III. 3. 10*).



En secciones histológicas coloreadas con Azul Alcian, se determinaron las alturas medias de las placas epifisarias femorales correspondientes a los 8 grupos experimentales. En los animales no diabéticos, la monoterapia con saxagliptina indujo una reducción significativa en la altura de la placa de crecimiento (grupo S, $p < 0,05$ vs. C, *figura III. 3. 10. y III. 3. 11*). El efecto de la metformina fue opuesto: en monoterapia (grupo M), este fármaco mostró una tendencia no significativa a aumentar dicha altura; mientras que en el tratamiento combinado, la metformina indicó una predisposición a evitar la reducción en la altura de la placa inducida por la saxagliptina.



La inducción de diabetes *per se* provocó una reducción de un 30% en la altura de la placa epifisaria (grupo D, $p < 0,001$ vs. C, *figura III. 3. 11.*). La monoterapia con metformina previno parcialmente este efecto (grupo DM, $p < 0,05$ vs. D). Sin embargo, en las ratas tratadas con saxagliptina (en monoterapia o terapia combinada) no se observaron diferencias en este parámetro respecto de los animales diabéticos sin tratamiento farmacológico.



CAPÍTULO IV

ESTUDIOS *IN VITRO*

IV. ESTUDIOS *IN VITRO***IV. 1. Objetivos.**

- a. *Investigar los posibles efectos directos e indirectos de la saxagliptina sobre osteoblastos y células progenitoras de médula ósea en cultivo.*
- b. *Estudiar la posible modulación de dichas acciones de la saxagliptina, por co-incubación con metformina.*
- c. *Evaluar posibles mecanismos de acción involucrados en estos efectos in vitro.*

IV. 2. Diseño experimental.

En esta sección se detallarán los reactivos y procedimientos experimentales utilizados para llevar a cabo los objetivos propuestos para estos estudios *in vitro*.

IV. 2. 1. Drogas y reactivos.

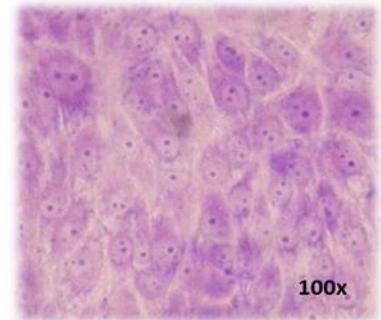
- Medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Laboratorio Microvet S.A., Buenos Aires, Argentina).
 - Tripsina – EDTA, Gibco (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).
 - Suero Fetal Bovino, Natacor (Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina).
 - Material de cultivo celular, Nunc (Elessar Científica, CABA, Argentina).
 - Glicerol fosfato de sodio, Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).
 - Ácido-L-ascórbico, Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).
 - Sirius Red, Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).
 - Alizarin S Red (ICN).
 - Anticuerpo anti- p-ERK (E-4), sc-7383 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA).
 - Anticuerpo anti- RUNX-2 (27-K), sc-101145(Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA).
 - Anticuerpo anti- PPAR γ (I-18), sc-6285(Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA).
 - Anticuerpo anti- β -Actin NB600-503 (Novus Biological).
-

- Anticuerpo anti- p-AMPK α 1/2 (Thr 172), sc-33524 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA).
- Anticuerpo anti- AMPK α 1 (C-20), sc-19128 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA).
- Anticuerpo anti- Osteocalcin (FL-100), sc-30044 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA).
- Insulina humana Betalin H U-100, Laboratorios Beta S.A. (CABA, Argentina).

IV. 2. 2. Modelos de cultivo celular empleados.

a. Preosteoblastos MC3T3E1.

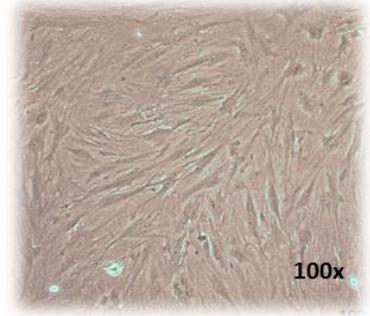
Las células preosteoblásticas MC3T3E1 son una línea celular establecida, derivada de calvaria de ratón, cuya morfología es del tipo fibroblástico (foto derecha). Es un modelo aceptado y ampliamente empleado para el estudio del desarrollo y maduración de osteoblastos *in vitro*.



Las células se cultivaron en frascos de plástico de 75 cm² a 37°C en atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂, con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Microvet, Laboratorio Microvet S.A. Bs. As. Argentina) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GBO S.A. Bs. As. Argentina), penicilina (100 UI/mL) y estreptomina (100 µg/mL). Cuando las células alcanzaron la sub-confluencia, se despegaron 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 re-suspendieron en DMEM-10% SFB. Para los diferentes experimentos las células fueron subcultivadas en platos multipocillo de cultivo celular (6, 24 o 48 pocillos), y se mantuvieron a 37 °C, en atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂.

b. Obtención de células progenitoras de médula ósea (CPMO).

Las CPMO fueron obtenidas de animales no diabéticos (machos jóvenes Sprague Dawley – 3 meses edad), los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia. Se disecaron los fémures y las tibias, y luego de un lavado con alcohol 70° se cortaron las epífisis en condiciones de esterilidad a fin de exponer el canal medular por el cual se hizo fluir DMEM suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 UI/l) y estreptomina (100 mg/l). La suspensión obtenida se plaqueó en frascos de 25 cm² manteniéndose en una estufa termostaticada a 37 °C, con una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Luego de 24 horas, las células no adheridas fueron removidas aspirando el medio de cultivo, el cual se renovó dos veces por semana hasta que las células llegaron a confluencia, como se muestra en la fotografía (aproximadamente 10 días). A continuación la monocapa celular fue despegada usando 0,12% de tripsina en buffer salino fosfato (PBS) con 1 mM de EDTA. Para los diferentes experimentos las células fueron subcultivadas en platos multipocillo de cultivo celular y mantenidas en las mismas condiciones (Molinuevo, M.S. et al., 2010).

*IV. 2. 3. Protocolos experimentales.*

El efecto directo de la saxagliptina y su combinación con la metformina en la línea celular preosteoblástica MC3T3E1 y en células progenitoras de médula ósea (CPMO) se estudió mediante ensayos de proliferación celular y de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico en diferentes condiciones experimentales.

IV. 2. 3. 1. Ensayo de proliferación celular.

Para evaluar el efecto directo de la saxagliptina y/o la metformina sobre la proliferación celular, las células fueron plaqueadas en platos de 48 pocillos. Al alcanzar un 80% de confluencia se ayunaron de suero fetal bovino (SFB) durante 12 horas. Posteriormente, se

incubaron con saxagliptina en diferentes concentraciones (1,5 μM y 15 μM) y/o metformina (200 μM), en presencia y ausencia de mitógenos -SFB (1%), Insulina (5 ng/mL) o IGF (10^{-8}M)-durante 24 horas. Las concentraciones de insulina e IGF-1 seleccionadas se asemejan a las concentraciones plasmáticas; asimismo, las concentraciones de saxagliptina empleadas corresponden a la concentración plasmática alcanzada en ratas bajo tratamiento oral (Fura, A. et al., 2009; Tahara, A. et al., 2009) y a una concentración diez veces superior para evaluar posible toxicidad. En el caso de la metformina se utilizó una concentración de 200 μM que previamente hemos demostrado no induce toxicidad en los sistemas celulares empleados. Se determinó el efecto directo de las drogas utilizando el ensayo colorimétrico de cristal violeta, en el cual las células se fijaron con glutaraldehído al 5% en PBS y se colorearon con una solución de cristal violeta (0,5 g cristal violeta en 25% metanol) durante 10 minutos, se lavaron con agua, y finalmente el colorante fue removido con buffer glicina-metanol pH=3 (0,7 g de glicina en 30 % metanol). Se determinó la absorbancia a 540nm (Cortizo, A.M. et al., 2006).

IV. 2. 3. 2. Ensayo de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico.

En un microambiente adecuado, tanto las células progenitoras de médula ósea como la línea preosteoblástica MC3T3E1, pueden diferenciarse hacia un fenotipo osteoblástico incrementando la producción de colágeno tipo I y finalmente mineralizando la matriz extracelular generada.

Para estos estudios las CPMO y las MC3T3E1 fueron plaqueadas en platos de 24 pocillos con una densidad de 5×10^4 células por pocillo, en DMEM suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 UI/l) y estreptomycin (100 mg/l) e incubadas a 37 °C – 5% CO₂. Una vez que alcanzaron un 80% de confluencia, las células se incubaron durante 15 o 21 días en un medio de diferenciación osteogénico (DMEM–10% SFB, 25 mg/mL ácido ascórbico y 5 mM β -glicerol-fosfato de sodio) en presencia/ausencia de 1,5 μM o 15 μM de saxagliptina y/o 10 μM metformina (concentración de metformina similar a la plasmática).

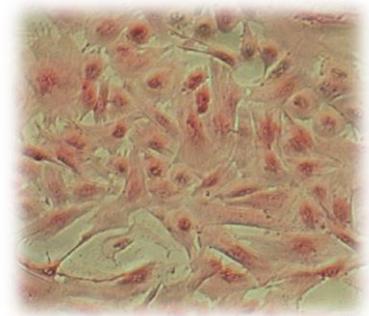
Para inducir la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico el medio de cultivo (DMEM–10% SFB) se suplementó con 25 mg/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β -glicerofosfato, que son esenciales para la expresión fenotípica de osteoblastos. El primero es un cofactor para la

síntesis del colágeno; mientras que el β -glicerofosfato actúa como sustrato de la fosfatasa alcalina para producir los depósitos de fosfato (Quarles, L.D. et al., 1992).

La diferenciación osteoblástica se evaluó a través de la determinación de la *producción de colágeno tipo I*, mediante el ensayo colorimétrico con Sirius red; y la *producción de nódulos de mineralización*, mediante la coloración con Rojo de alizarina. De manera complementaria, se determinó la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica (Runx-2 y osteocalcina) mediante Western blot. A continuación se detallan todas las metodologías empleadas.

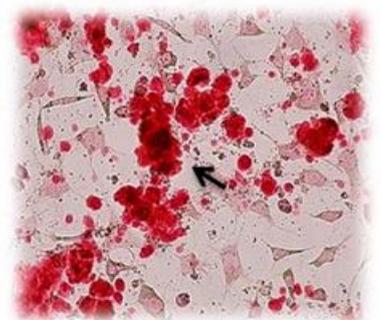
a. Determinación de la producción de colágeno tipo I.

Luego de 15 días de diferenciación osteoblástica, la monocapa fue lavada con PBS y fijada con solución de Bouin (ácido pícrico en solución acuosa saturada/formaldehído 35%/ácido acético glacial, 15:5:1) durante 1 hora, se lavó con ácido clorhídrico 0.1N durante 30 min y se coloreó con Sirius Red (Sigma) (100 mg/100ml ácido pícrico saturado) durante 1 hora. En la fotografía se muestra la monocapa celular, con su colágeno asociado teñido con este colorante. El colorante fue removido de los pocillos con 0,1N de hidróxido de sodio, y se determinó la absorbancia a 550nm (Tullberg-Reinert, H. y Jundt, G., 1999).



b. Determinación de la producción de nódulos de mineralización.

A los 21 días de diferenciación se evaluaron los depósitos extracelulares de calcio utilizando la coloración con Rojo de alizarina (Ueno, A. et al., 2001). La monocapa de células se fijó con formaldehído al 10% en PBS durante 10 minutos, se lavó con agua destilada y se coloreó con una solución de rojo de alizarina 2% en agua destilada (pH 4,4). El colorante se extrajo con 0,1N de hidróxido de sodio, la absorbancia se determinó a 548nm. Se observa una fotografía representativa, previo a la etapa de extracción del colorante.



IV. 2. 3. 3. Determinación de diferentes proteínas marcadoras por Western blot.

Para evaluar el efecto de la saxagliptina sobre la activación de vías de señalización mitogénicas, las células CPMO y MC3T3E1 fueron ayunadas toda la noche e incubadas con diferentes mitógenos - SFB (1%) o IGF (10^{-8} M) o Insulina (5 ng/ml) - en presencia o ausencia de saxagliptina y/o metformina durante 1 hora, luego las monocapas celulares fueron lisadas con buffer de Laemmli y sometidas a calentamiento a 100 °C durante 1 minuto. Las muestras se separaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% e incubadas con un anticuerpo primario anti-pERK (Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA). Los resultados se normalizaron con β -actina (Novus Biological).

Asimismo, se evaluó la expresión de factores de diferenciación osteogénica luego de 15 o 21 días de diferenciación, mediante Western blot. Las células cultivadas en medio osteogénico durante 15 o 21 días, en presencia o ausencia de saxagliptina y/o metformina, se lisaron con buffer de Laemmli. Las proteínas celulares fueron separadas en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%, e incubadas toda la noche con el primer anticuerpo anti-Cbfa1/Runx-2 o anti-osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA). Adicionalmente, se determinó la expresión de PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology Inc, CS USA), un marcador de linaje adipocítico. Todas las membranas fueron sometidas a stripping y re analizadas con un anticuerpo anti- β actina (Novus Biologicals) empleado como *housekeeping*. Por otro lado, estudiamos la activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) la cual interviene en la señalización mediada por la metformina, para ello analizamos las isoformas de AMPK total y fosforilada a fin de determinar la relación pAMPK/AMPK.

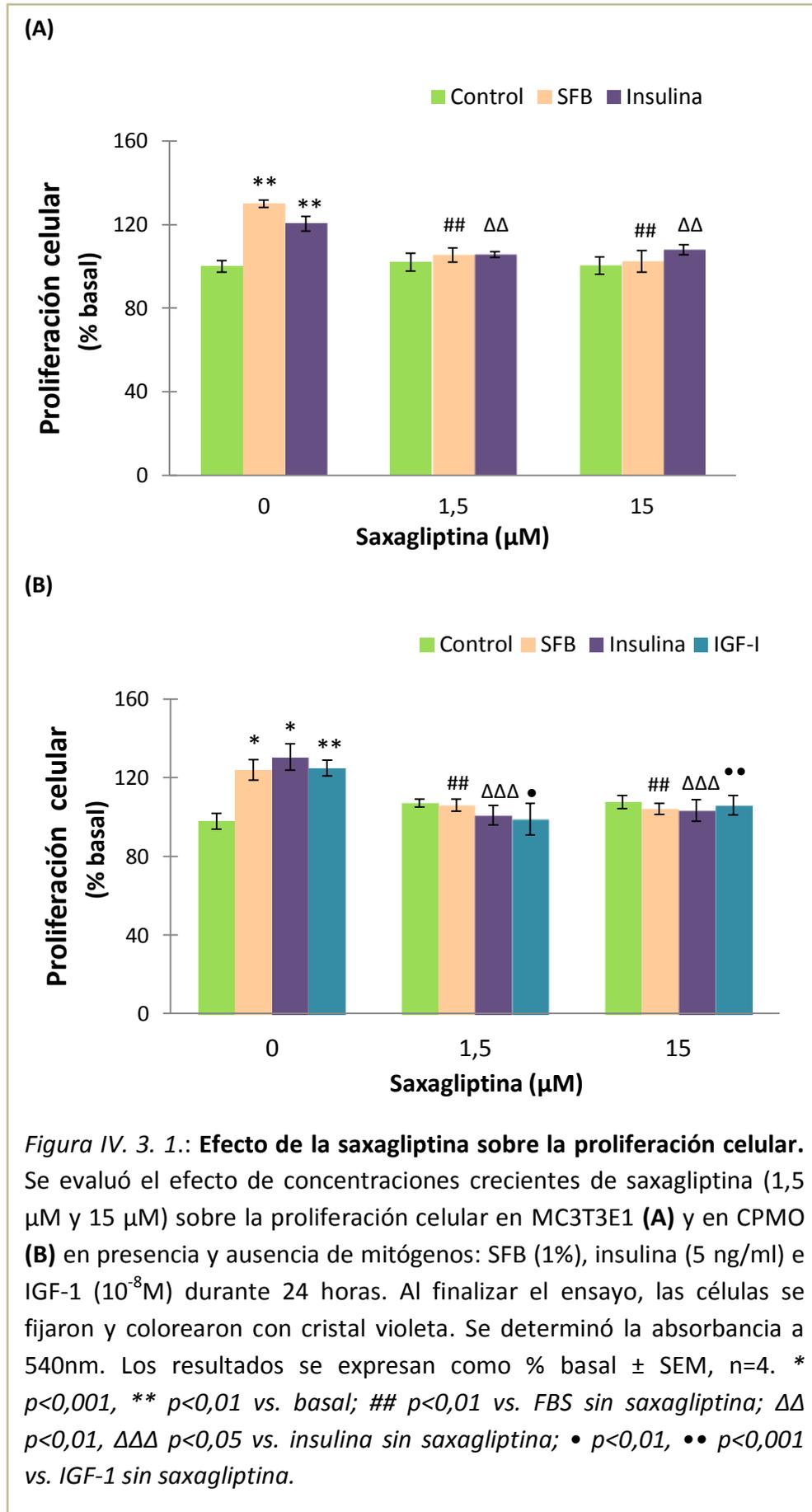
Todas las membranas fueron reveladas por el método de quimioluminiscencia. Las placas radiográficas (Agfa) fueron escaneadas y la intensidad de las bandas específicas se cuantificó utilizando el plugin para geles del programa Image J.

IV. 2. 4. *Análisis estadístico.*

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey post hoc. Para datos con distribución no normal se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis empleando el test de Dunn post-hoc, usando el programa estadístico GraphPad InStat version 3.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Se consideró significativo un $p < 0,05$ para todos los análisis estadísticos.

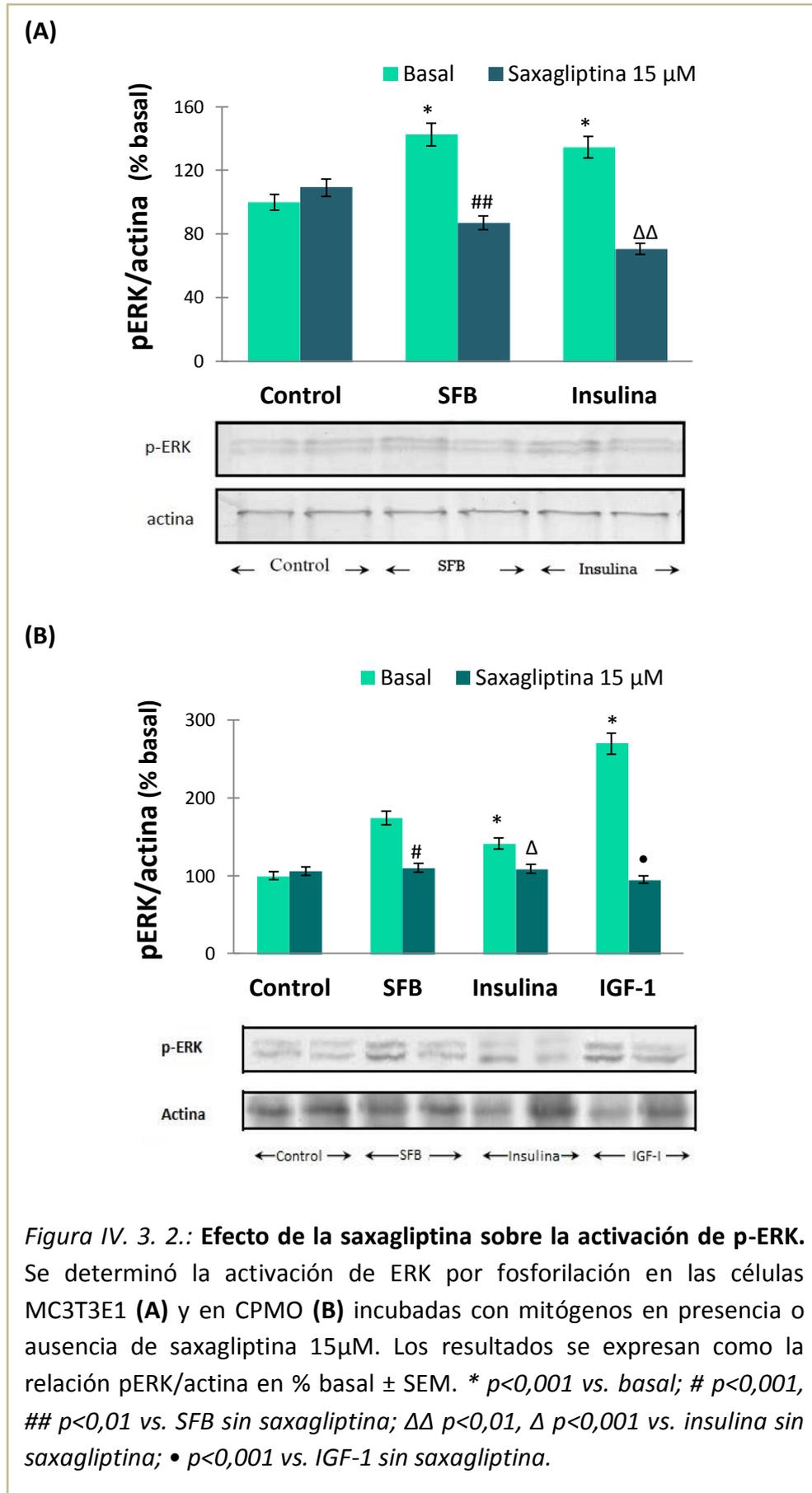
IV. 3. Resultados de los estudios *in vitro***IV. 3.1. Efecto de la saxagliptina sobre la proliferación de células óseas en cultivo.**

Para investigar si los efectos del tratamiento con saxagliptina observados *in vivo* se debían a su acción directa sobre las células óseas, diseñamos una serie de experimentos *in vitro* con células precursoras de osteoblastos (CPMO) y preosteoblastos (MC3T3E1) en cultivo. En primer lugar, evaluamos el efecto directo incubando las células en DMEM sin SFB con 1,5 μM y 15 μM de saxagliptina durante 24 horas. En estas condiciones, el inhibidor de DPP-4 no afectó la proliferación ni en las MC3T3E1 ni en las CPMO (*figura IV. 3. 1., A y B, barra verde*). Posteriormente estudiamos el efecto de la adición de saxagliptina sobre el crecimiento celular inducido por mitógenos establecidos: 1% de SFB, 10^{-8}M de IGF-1, 5 ng/ml de insulina. Los mitógenos *per se* estimularon la proliferación de ambas líneas celulares (FBS 20% vs. basal, $p < 0,01$; insulina 30% vs. basal, $p < 0,001$; e IGF-1 20% vs. Basal $p < 0,01$). Este efecto fue completamente inhibido al incubar con 1,5 μM y 15 μM de saxagliptina, en ambos tipos celulares (*figura IV. 3. 1., A y B respectivamente*).



IV. 3. 2. Efecto de la saxagliptina sobre la activación de quinasas reguladas extracelularmente (ERK).

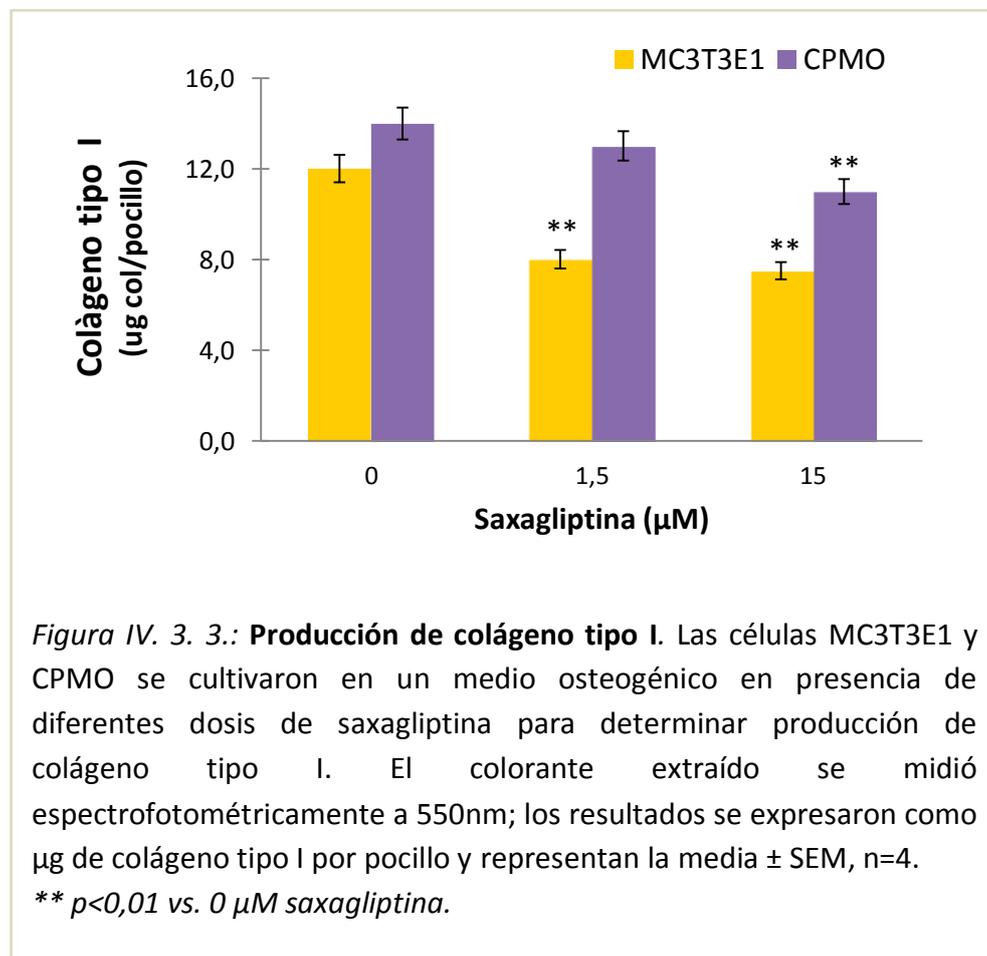
Para evaluar el mecanismo por el cual la saxagliptina bloquea la acción mitogénica del SFB, la insulina o el IGF investigamos la activación por fosforilación de las quinasas reguladas por mitógenos extracelulares (ERK), las cuales juegan un rol clave en la vía de señalización de estos factores de crecimiento. Para ello, las células fueron incubadas en presencia de los diferentes mitógenos con o sin el agregado de 15 μ M de saxagliptina durante 1 hora. Las muestras fueron procesadas como se indica en la *sección IV. 2. 3. 3*. Encontramos que en condiciones basales (sin agregado de mitógenos) la saxagliptina no modifica los niveles de pERK respecto al control; sin embargo, bloquea completamente la fosforilación inducida por mitógenos tanto en las células MC3T3E1 como en las CPMO (*figura IV. 3. 2. A y B*, respectivamente).



IV. 3. 3. Efecto de la saxagliptina sobre la diferenciación osteoblástica de MC3T3E1 y CPMO.

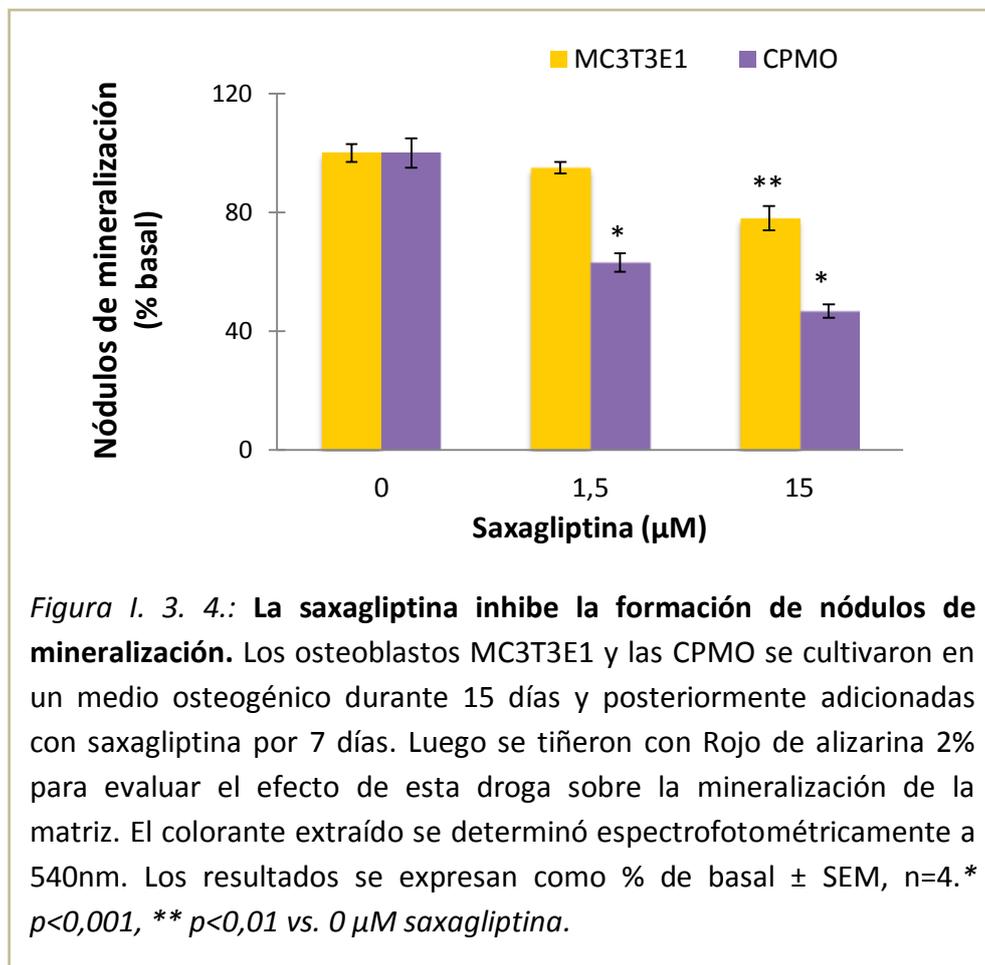
a. Efecto de la saxagliptina sobre la producción de colágeno tipo I.

El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz orgánica extracelular del hueso, y es sintetizado por los osteoblastos. Las células se cultivaron durante 7 días en un medio osteogénico (ver sección IV. 2. 3. 2. a), el cual incluye 10% de SFB. Luego, se suplementó este medio osteogénico con saxagliptina (1,5 μM o 15 μM) durante 7 días más. Al finalizar el ensayo, se determinó espectrofotométricamente la producción de colágeno de tipo I empleando la tinción con Sirius red. Encontramos que la saxagliptina, en los preosteoblastos MC3T3E1 inhibió la producción de colágeno en todas las dosis empleadas con mayor potencia que a las CPMO, en donde la inhibición ocurrió a 15 μM (figura IV. 3. 3., $p < 0,01$).



b. Efecto de la saxagliptina sobre la producción de nódulos de mineralización.

La presencia de depósitos extracelulares de calcio se determinó mediante la coloración con Rojo de alizarina (descrita en sección IV. 2. 3. 2. b) luego de 21 días de diferenciación. Para ello, las células fueron diferenciadas en un medio osteogénico durante 15 días y luego tratadas adicionalmente con 1,5 μM o 15 μM saxagliptina durante 7 días. Encontramos que la saxagliptina inhibe significativamente, y en forma dependiente de la dosis, la formación de nódulos de mineralización en las CPMO (*figura IV. 3. 4., $p < 0,001$*), mientras que este efecto fue significativo en las MC3T3E1 a 15 μM (*figura IV. 3. 4., $p < 0,01$*).



c. Efecto directo de la saxagliptina sobre la expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipogénicos en CPMO.

Para investigar el efecto de la saxagliptina sobre factores de transcripción osteogénicos se estudió la expresión de los marcadores osteoblásticos Runx-2 y osteocalcina por Western blot en las CPMO. El primero es un marcador de diferenciación temprana de osteoblastogénesis, mientras que la osteocalcina es un marcador de maduración osteoblástica. Por otro lado, para evaluar si la saxagliptina afecta el compromiso adipogénico de las CPMO se investigó la expresión de PPAR γ , un marcador de linaje adipocítico. Las células fueron cultivadas durante 15 días en un medio osteogénico, y posteriormente 7 días más en presencia o ausencia de saxagliptina 1,5 μ M y 15 μ M. Luego, se analizaron los extractos celulares por Western blot.

Encontramos que 15 μ M de saxagliptina inhibió significativamente la expresión de Runx-2 (*figura IV. 3. 5. A*, $p < 0,001$); mientras que la expresión de osteocalcina se vio inhibida a partir de 1.5 μ M de la droga sin presentar dependencia con la concentración empleada en el estudio (*figura IV. 3. 5. B*, $p < 0,01$). En contrapartida, encontramos que en presencia de saxagliptina se produjo un incremento significativo dependiente de la dosis en la expresión de PPAR γ (*figura IV. 3. 5. C*, $p < 0,01$). Como se puede apreciar en la *figura IV. 3. 5.*, a 15 μ M se indujo una disminución significativa en la expresión de los marcadores de diferenciación a osteoblastos (A y B) y un aumento significativo en la expresión de PPAR γ (C), marcador de diferenciación adipogénico.

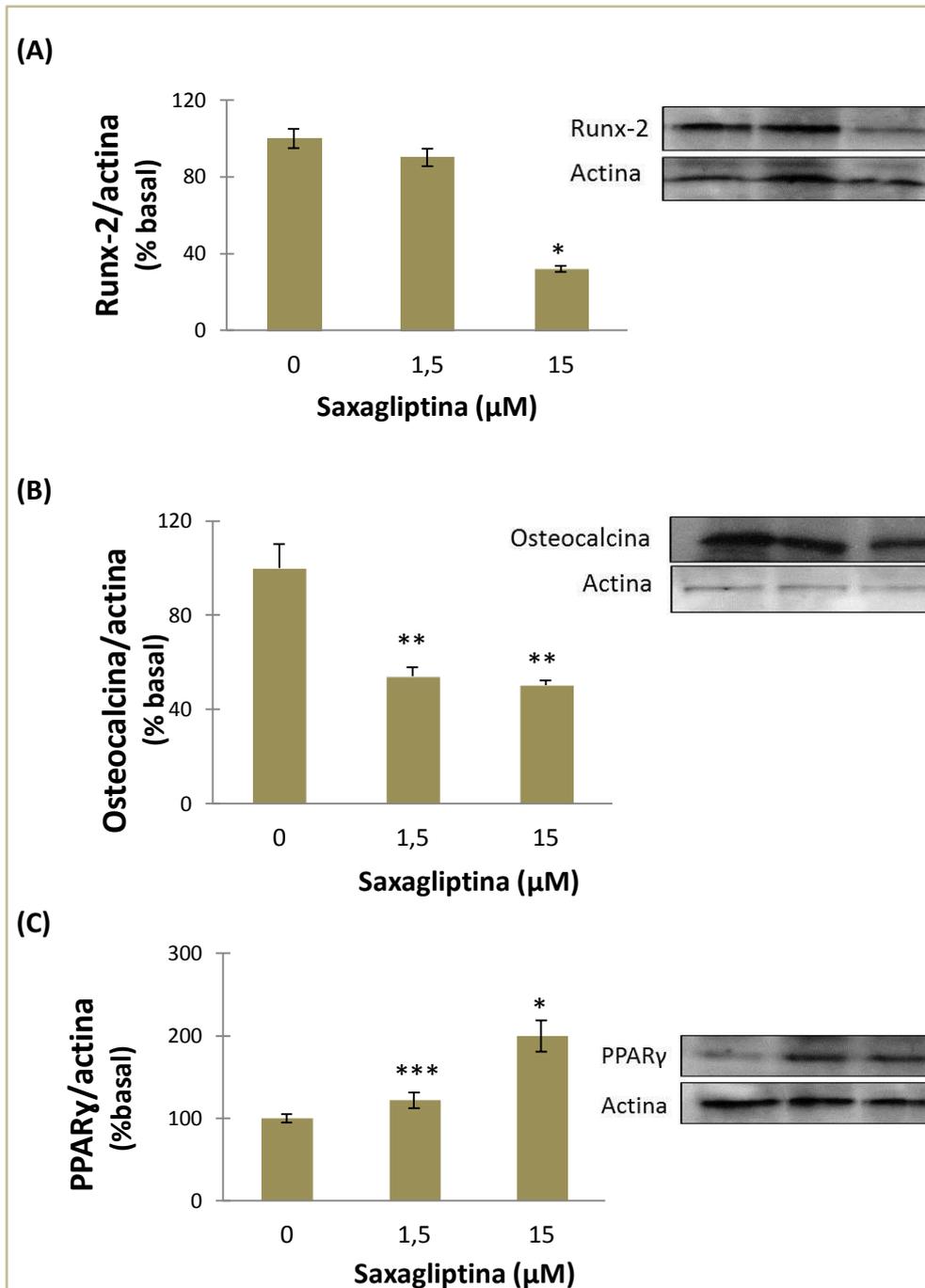


Figura IV. 3. 5.: Efecto de la saxagliptina sobre la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica y adipogénica. Las CPMO se cultivaron en un medio osteogénico durante 15 días (posteriormente adicionadas con saxagliptina por 7 días) Se evaluaron los marcadores de diferenciación osteogénicos Runx-2 y osteocalcina, así como el factor de diferenciación adipogénico PPAR γ . Los resultados se normalizaron respecto de actina y se expresan como % basal \pm SEM. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ vs. $0 \mu\text{M}$ saxagliptina.

IV. 3.4. *Efecto de la combinación de saxagliptina con metformina sobre la diferenciación osteogénica MC3T3E1 y CPMO.*

Desde hace unos años se empezó a recurrir a la combinación de metformina con saxagliptina para lograr un mejor control glucémico en pacientes con DM tipo 2 (DeFronzo, R. et al., 2009; Barnett, A.H. et al., 2013). Previamente, hemos demostrado que la metformina es una droga que favorece la proliferación y la diferenciación osteogénica (Cortizo, A.M. et al., 2006; Molinuevo, M.S. et al., 2010). Basados en estos resultados previos, se decidió investigar si la metformina era capaz de prevenir los efectos deletéreos de la saxagliptina sobre las células óseas.

a. Efectos de la co-incubación con metformina sobre la proliferación celular de MC3T3E1 y CPMO.

Se evaluó el efecto directo incubando las células en medio de cultivo sin SFB con 15 μM de saxagliptina y 200 μM de metformina durante 24 horas. El inhibidor de DPP-4 no afectó la proliferación en ningún tipo celular cuando se incubó solo. La metformina incrementó la proliferación de ambos tipos celulares ($p < 0,01$ vs. C) como era predecible. Se observó una tendencia de la saxagliptina a bloquear el efecto de la metformina sobre este parámetro en preosteoblastos MC3T3E1, sin embargo en las CPMO, 15 μM de saxagliptina inhibió significativamente el efecto sobre la proliferación celular inducido por la metformina ($p < 0,01$ vs. M) (*figura IV. 3. 6.*).

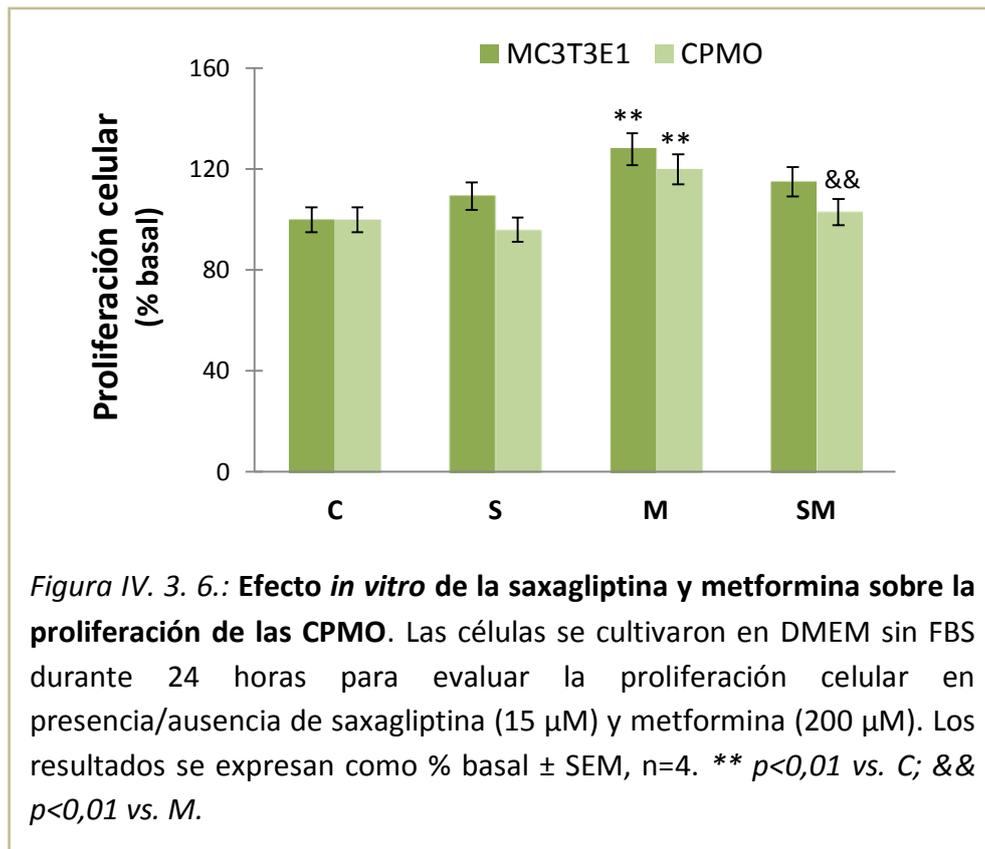
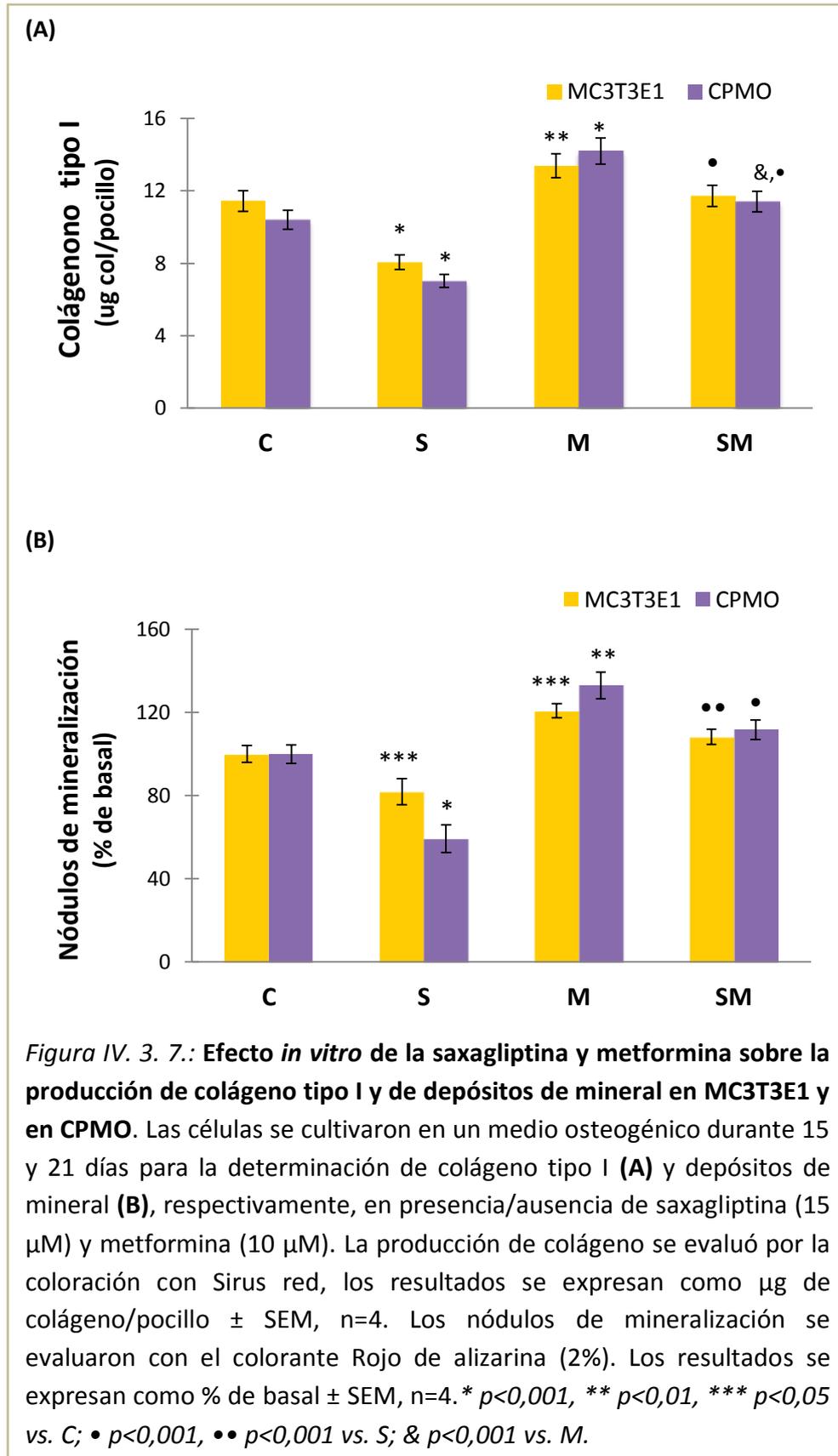


Figura IV. 3. 6.: Efecto *in vitro* de la saxagliptina y metformina sobre la proliferación de las CPMO. Las células se cultivaron en DMEM sin FBS durante 24 horas para evaluar la proliferación celular en presencia/ausencia de saxagliptina (15 μ M) y metformina (200 μ M). Los resultados se expresan como % basal \pm SEM, n=4. ** $p < 0,01$ vs. C; && $p < 0,01$ vs. M.

b. La metformina previene la inhibición causada por la saxagliptina sobre la diferenciación osteoblástica.

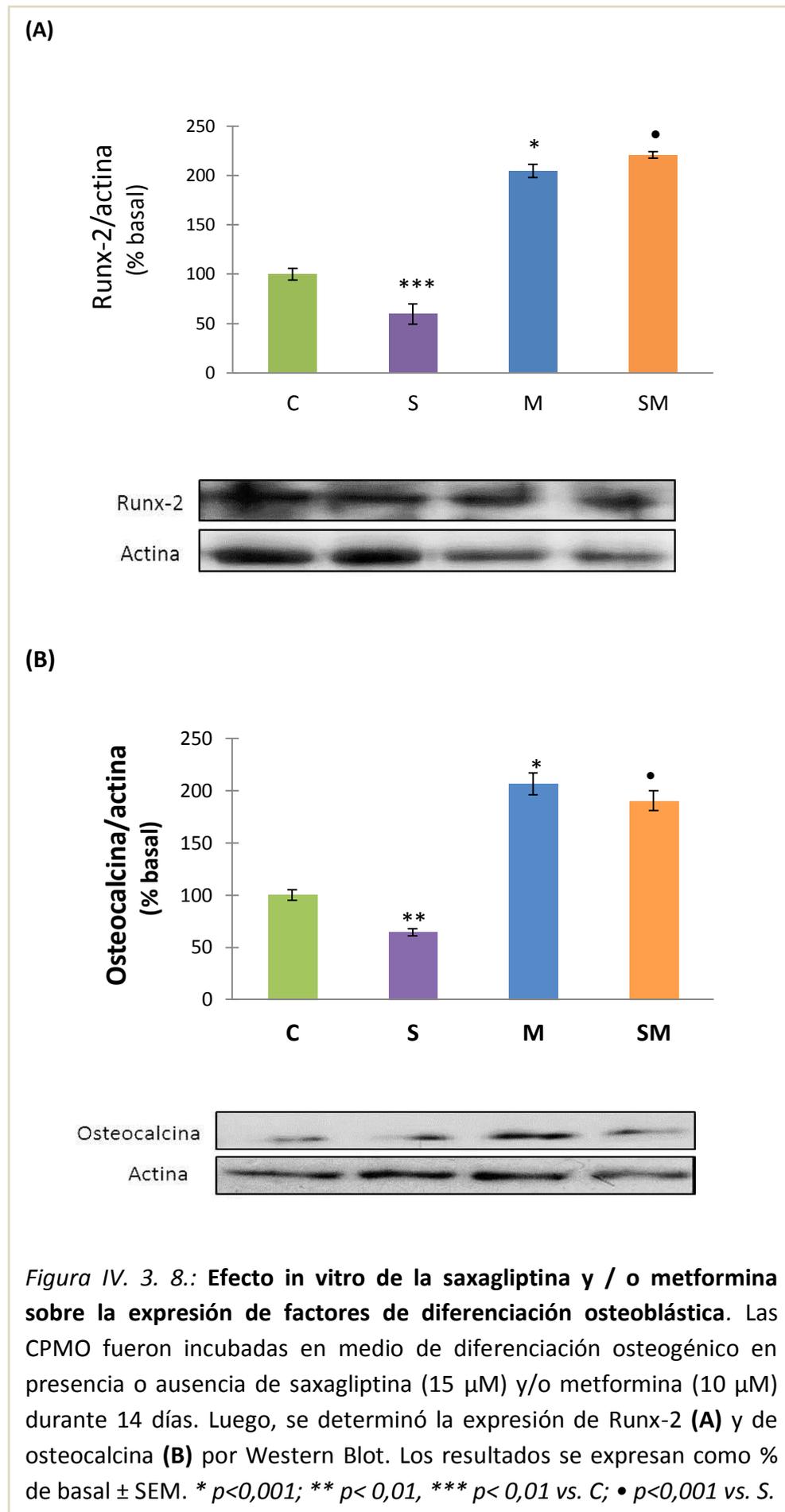
En base a los resultados descritos en la sección IV. 3. 1. 3., y sabiendo que la metformina tiene un efecto positivo sobre diferenciación osteoblástica (Molinuevo, M.S. et al., 2010; Zhen, D. et al., 2010; Mai, Q. et al., 2011; Tolosa, M.J. et al., 2013), se decidió estudiar el efecto *in vitro* de la saxagliptina en combinación con la metformina sobre la diferenciación osteoblástica de CPMO y MC3T3E1.

Se encontró que la metformina previene la inhibición en la producción de colágeno tipo I y la mineralización causada por el tratamiento con 15 μ M de saxagliptina en ambos tipos celulares (figura IV. 3. 7, A y B, $p < 0,001$ vs. S).

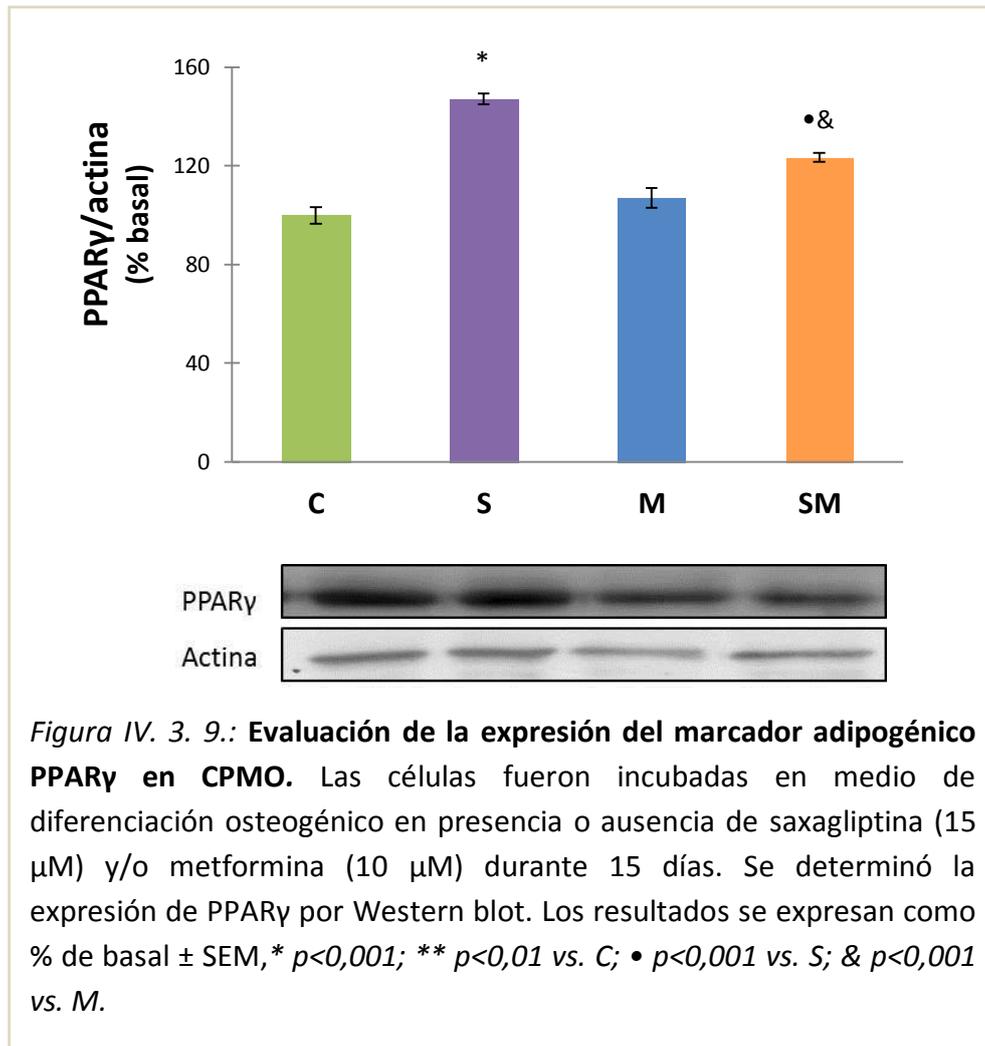


c. Efecto del co-tratamiento saxagliptina-metformina sobre la expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipogénicos en CPMO.

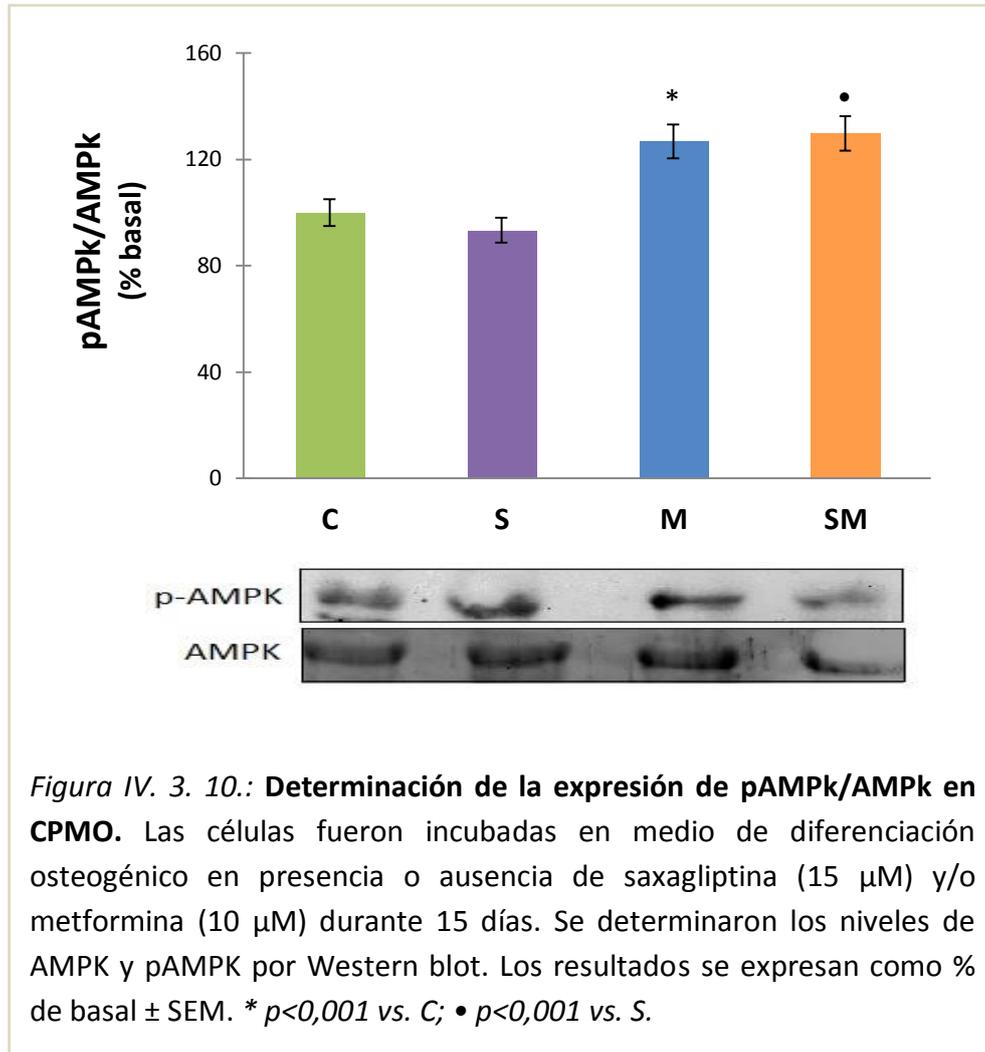
Como se describió previamente, 15 μM de saxagliptina inhibió significativamente la expresión de Runx-2 y osteocalcina en CPMO (*figura IV. 3. 8. A y B*, $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente); mientras que la co-incubación con 10 μM de metformina previno completamente este efecto, como se muestra en las *figura IV. 3. 8. A y B*. Aún más, los niveles de expresión de ambas proteínas fueron similares a los inducidos por la monoterapia con metformina.

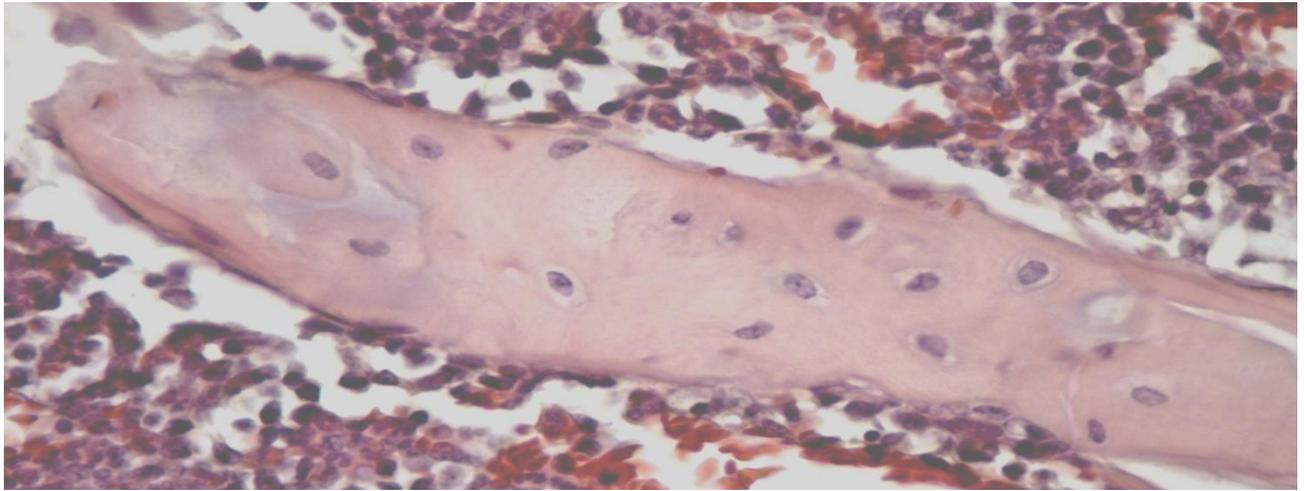


La expresión del factor adipogénico PPAR γ también fue modulada por el co-tratamiento. La saxagliptina aumenta la expresión de este factor de transcripción adipogénico (*figura IV. 3. 9.*); mientras que la metformina por si sola ejerce un efecto opuesto, y el co-tratamiento previno parcialmente el aumento en la expresión de PPAR γ inducido por la saxagliptina (*figura IV. 3. 9.*).



Para elucidar el posible mecanismo por el cual la metformina previene el efecto de la saxagliptina, se evaluó la activación por fosforilación de la AMPK (relación pAMPK/AMPK). Se encontró que la saxagliptina *per se* no modifica los niveles relativos de pAMPK (*figura IV. 3. 10.*); así como tampoco afecta el incremento en la pAMPK inducido por la metformina (*figura IV. 3. 10.*).





CAPÍTULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

V. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.

V. 1. Discusión.

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado diseñado para resistir fuerzas mecánicas, cumplir funciones de soporte y locomoción. Es dinámico y constantemente se encuentra sujeto al proceso de remodelado óseo, que le permite renovarse así como responder a las necesidades mecánicas y metabólicas del organismo. El remodelado se basa en el acoplamiento entre la resorción, mediada por los osteoclastos, y la formación, mediada por los osteoblastos. Existe un balance entre estos dos mecanismos que es regulado por diferentes factores interrelacionados, dentro de los que se pueden mencionar factores genéticos, mecánicos, hormonales y locales (Datta, H.K. et al., 2008). Adicionalmente, la activación y regulación de estos procesos puede ser alterada por diferentes patologías, como por ejemplo la Diabetes mellitus, así como también por el tratamiento con fármacos. El efecto de los fármacos sobre el metabolismo óseo puede ser directo (por ejemplo para el caso de drogas anti-osteoporóticas), o puede ser indirecto y a veces inesperado. En este último sentido, se destacan los efectos óseos secundarios de algunos medicamentos anti-hiperglucemiantes utilizados para el tratamiento de pacientes con Diabetes mellitus tipo 2, como las tiazolidindionas (que por mecanismos mediados por PPAR γ , promueven la adipogénesis de la médula ósea en detrimento de la osteogénesis) y la metformina (que vía activación de la AMPK genera un efecto opuesto, es decir pro-osteogénico). Otra familia de drogas antidiabéticas que pudieran poseer efectos secundarios sobre el hueso son los inhibidores de DPP-4, como la Sitagliptina, Vildagliptina y Saxagliptina.

Uno de los objetivos propuestos en el presente trabajo consistió en investigar el efecto *in vivo* de un tratamiento oral con saxagliptina en ratas jóvenes no diabéticas. El análisis histomorfométrico de los animales que fueron tratados con el inhibidor de la enzima dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4) no mostró diferencias significativas en el volumen trabecular respecto a los animales control (*figura III. 3. 2.*). No obstante, se observó que la saxagliptina disminuyó significativamente la densidad de los osteoblastos y de los osteocitos (*figura III. 3. 4. y III. 3. 6.*).

Inicialmente, este hallazgo fue paradójico ya que se conoce que los inhibidores de DPP-4 aumentan la vida media de las incretinas (GIP y GLP-1), y a su vez, las incretinas son las principales responsables de la liberación de insulina posprandial. En consecuencia, se esperaría que el aumento de insulina causado por la saxagliptina ejerza un efecto beneficioso sobre el tejido óseo. Sin embargo, lo que se observa en la práctica clínica es contradictorio. En un estudio reciente se asoció a los inhibidores de la DPP-4 con la reducción en la incidencia de fracturas óseas (Monami, M. et al., 2011). No obstante, en este trabajo no se discriminó entre los diferentes inhibidores de DPP-4 ni se realizó una estratificación adecuada de los pacientes (sexo, mujeres pre-pos menopáusicas) para el estudio de este tejido. Contrariamente, otros autores han encontrado un aumento en las fracturas óseas de pacientes diabéticos tratados con saxagliptina, respecto a los diabéticos sin tratamiento (Hirshberg, B. et al., 2013). Resulta importante destacar que aunque todos fármacos de este grupo comparten un mecanismo de acción común (aumentan la vida media de las incretinas a través de la inhibición de la enzima), muestran heterogeneidad estructural, que se evidencia fisiológicamente en la metabolización y forma de excreción (Gerich, J., 2010). Esto podría explicar parcialmente las diferencias encontradas sobre el metabolismo óseo en los inhibidores de DPP-4.

Continuando con el análisis histomorfométrico de los animales no diabéticos, se encontró que la administración oral de saxagliptina aumentó significativamente la superficie osteoclástica en la esponjosa primaria femoral (representada por el área TRAP), y disminuyó la altura media de la placa de crecimiento del cartílago proximal de los fémures respecto a los animales control. La altura de este cartílago depende de dos procesos antagónicos. Por un lado la proliferación e hipertrofia de los condrocitos aumenta su altura; mientras que la invasión vascular y subsecuente sustitución de cartílago calcificado por tejido óseo la disminuye. Este último proceso requiere de la actividad osteoclástica y osteoblástica. Los osteoclastos de la esponjosa primaria preparan la zona para que los osteoblastos depositen allí la matriz ósea nueva. Es posible que el aumento en la actividad osteoclástica (no compensado por un incremento en la proliferación de condrocitos) haya causado la reducción de la placa epifisaria en los animales tratados con saxagliptina. A pesar de estos hallazgos, es importante destacar que el efecto de la saxagliptina sobre la placa de crecimiento epifisaria no debería ser un problema en la práctica clínica debido a que este fármaco no está indicado en pacientes pediátricos. No obstante, estos efectos sobre la osificación endocondral resultan interesantes

pues el tratamiento con saxagliptina podría interferir en la reparación de fracturas óseas (que ocurre por un mecanismo que requiere de la formación de un molde de cartílago hialino). Una perspectiva a futuro involucraría la investigación de los efectos de la saxagliptina en un modelo de lesión ósea en huesos de formación endocondral y así evaluar la posible modulación de la droga en la reparación de las mismas.

Dados los efectos deletéreos de la monoterapia con saxagliptina sobre la microarquitectura ósea, y teniendo en cuenta los resultados previos que demuestran un efecto pro-osteogénico de la metformina (Cortizo, A.M et al., 2006; Molinuevo, M.S. et al., 2010; Tolosa, M.J. et al., 2013) se planteó evaluar si la combinación de la saxagliptina con metformina podía prevenir los efectos sobre la histomorfometría femoral en animales no diabéticos. Se encontró que el co-tratamiento previno completamente las alteraciones de la celularidad del tejido óseo (*densidad osteoblástica, figura III. 3. 4. y densidad osteocítica, figura III. 3. 6.*) y altura de la placa de crecimiento epifisaria (*figura III. 3. 11.*) inducidas por la saxagliptina en monoterapia.

En función de los resultados deletéreos del tratamiento oral con saxagliptina sobre la micro-arquitectura ósea, hipotetizamos que éstos podrían deberse a efectos adversos directos o indirectos de la droga sobre los osteoblastos y/o las CPMO (es decir, sus progenitores medulares).

En estudios *in vitro*, se evaluó primero el posible efecto de distintas dosis de saxagliptina (1,5 μM y 15 μM) sobre la proliferación de CPMO obtenidas a partir de ratas no diabéticas, así como de osteoblastos MC3T3E1, ayunadas de suero. En estos estudios *in vitro* no se pudo encontrar efectos directos de la saxagliptina (*figura IV. 3. 1.*), por lo cual se repitieron los ensayos agregando suero fetal bovino (SFB) al medio de cultivo. Dado que en estas condiciones de cultivo la saxagliptina inhibió significativamente el efecto mitogénico del suero (*figura IV. 3. 1.*), se repitieron los estudios sustituyendo al suero por dosis fisiológicas de insulina (5 ng/mL) o IGF-1 (10^{-8}M), dos factores de crecimiento para osteoblastos encontrados en el suero. Asimismo, como ambos mitógenos comparten la vía de señalización intracelular de las ERK, luego de incubaciones a corto término (1 hora) evaluamos el estado de activación (fosforilación) de esta vía. De esta manera, encontramos que la saxagliptina inhibió la proliferación celular mediada por ambos mitógenos luego de 24 horas (*figura IV. 3. 1.*), efecto que puede explicarse a través de una disminución en la fosforilación de la proteína ERK (*figura IV. 3. 2.*).

Estos resultados *in vitro* sobre la proliferación de osteoblastos y CPMO están en concordancia con lo descrito por otros autores para fibroblastos y linfocitos T, quienes han encontrado que la actividad de DPP-4 es esencial tanto para su proliferación como para la producción de matriz extracelular (Kähne, T. et al., 2000; Thielitz, A. et al., 2008). En el tejido óseo la insulina y el IGF-1 juegan un rol fisiológico esencial para la adquisición de la masa ósea, aumentando la proliferación de osteoblastos así como también la expresión de marcadores del linaje osteoblástico. La unión de estos factores de crecimiento a sus receptores específicos estimula la fosforilación de ERK mediada por MAPK. Luego, ERK activada es translocada al núcleo donde regula la fosforilación de factores de transcripción relacionados con la proliferación y diferenciación celular (Saltiel, A.R. y Kahn, C.R., 2001; Taniguchi, C.M. et al., 2006; Yang, J. et al., 2010). Así, la modulación de esta vía de señalización que se encontró por parte de la saxagliptina, cobra importancia en perspectiva y abre la posibilidad de futuros trabajos para determinar específicamente cuales son los mecanismos mediante los cuales este inhibidor de DPP-4 logra inhibir en CPMO y osteoblastos la activación de ERK.

En experimentos sub-siguientes *in vitro*, se evaluó el posible efecto de la saxagliptina sobre la inducción osteogénica de CPMO y de pre-osteoblastos MC3T3E1. Dado que esta inducción se logra mediante una incubación de 2-3 semanas con un medio de cultivo que contiene SFB, no fue posible discriminar en estos ensayos entre un posible efecto directo de la saxagliptina sobre la diferenciación osteoblástica, o una modulación de las acciones pro-osteogénicas de factores de crecimiento presentes en el SFB. En presencia de saxagliptina, tanto la producción de colágeno de tipo I como la formación de nódulos de mineralización estuvieron significativamente disminuidos (*figura IV. 3. 3. y IV. 3. 4.*).

Asimismo, se encontró que la saxagliptina disminuye la expresión de los factores pro-osteogénicos, Runx-2 y osteocalcina, así como aumenta los niveles de PPAR γ , un factor de transcripción pro-adipogénico (*figura IV. 3. 5.*). En este contexto, es interesante remarcar que otros autores han demostrado que la ERK activada puede fosforilar a PPAR γ , lo cual reduce su funcionalidad (Wu, L. et al., 2010; Burgermeister, E. y Seger, R., 2008; Diradourian, C. et al., 2005). Así, la reducción que se observó en la fosforilación de ERK, inducida por la saxagliptina podría explicar el incremento en los niveles de PPAR γ . Estos resultados podrían estar indicando

un efecto *in vitro* pro-adipogénico inducido por la saxagliptina, evidenciado por un aumento en la relación PPAR γ /Runx-2.

En otra serie de experimentos *in vitro*, se evaluó si la metformina (en co-incubación) podía prevenir los efectos anti-osteogénicos hallados para la saxagliptina. Se encontró que la incubación con ambos fármacos favoreció el compromiso hacia el linaje osteoblástico aumentando la producción de colágeno tipo I y nódulos de mineralización (*figura IV. 3. 7.*), así como también la expresión de marcadores osteogénicos respecto de la incubación solo con saxagliptina (*figura IV. 3. 8.*). Estos resultados concuerdan con lo observado *in vivo* sobre la micro-arquitectura femoral de las ratas no diabéticas que fueron tratadas con la combinación saxagliptina-metformina.

En vista del efecto preventivo de la metformina, evaluamos la expresión de la enzima AMPK (proteína quinasa activada por AMP), enzima involucrada en el metabolismo energético y responsable de muchas de las acciones de la metformina en diversos tejidos incluido el óseo (Zhou, G. et al., 2001; Molinuevo, M.S. et al.; 2010). Luego de cultivar las CPMO durante 2 semanas en un medio osteogénico, encontramos que las células incubadas solo con saxagliptina no modificaron la activación (fosforilación) de la AMPK respecto a las células control. En concordancia con lo que hemos reportado previamente (Molinuevo, M.S. et al., 2010) la incubación con metformina aumentó significativamente la expresión de la p-AMPK, la cual no fue modificada por la co-incubación. Estos resultados predicen que la saxagliptina no interfiere con la vía de señalización de la metformina (mediada por la activación de AMPK), permitiendo que ésta última ejerza en forma independiente sus efectos pro-osteogénicos que fueron evidenciados en los ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Como se ha indicado, el metabolismo óseo puede verse alterado en personas con Diabetes mellitus quienes poseen *per se* un incremento en la incidencia de fracturas osteoporóticas, y este incremento podría aumentar más aún en los pacientes diabéticos en tratamiento con saxagliptina (Hirshberg, B. et al., 2013). En este contexto cobra importancia evaluar el efecto de un tratamiento oral con saxagliptina en animales con Diabetes. Para ello utilizamos un modelo de ratas diabéticas con destrucción parcial de las células β pancreáticas (Tahara, A. et al., 2009; Szkudelski, T., 2012). Los animales diabéticos se trataron o no con

saxagliptina y/o metformina oral durante 21 días, para luego evaluar el posible efecto de estos tratamientos sobre la micro-arquitectura femoral.

En nuestras condiciones de trabajo, los animales diabéticos mostraron una severa descompensación del metabolismo hidrocarbonado y lipídico, con insulinemias de aproximadamente un 15% respecto de los animales no diabéticos. Aunque nosotros no dosamos IGF-1, otros autores han demostrado que en animales con Diabetes insulínopénica inducida por estreptozotocina, los niveles séricos de IGF-1 se encuentran significativamente disminuidos (Ganey, E. et al., 2002).

Tal como hemos reportado previamente (Tolosa, M.J. et al., 2013), la inducción de Diabetes generó una reducción significativa en el volumen trabecular relativo, en la densidad de osteocitos y en el número de osteoblastos, así como un gran aumento en la adiposidad de la médula ósea y todos estos efectos deletéreos fueron prevenidos por un tratamiento con metformina como monoterapia (*figuras III. 3. 2., III. 3. 4., III. 3. 6. y III. 3. 7.*). El tratamiento con saxagliptina de los animales diabéticos no generó cambios adicionales significativos ni en el volumen trabecular relativo ni en las densidades osteocítica y osteoblástica (más allá de los efectos inducidos por la diabetes y por el tratamiento con metformina). La ausencia de diferencias significativas observadas en la mayoría de los parámetros histomorfométricos estáticos entre los animales tratados con la combinación (DSM) y los tratados solo con metformina (DM), concuerda con lo discutido previamente en relación a la vía de señalización de la metformina (AMPK), la cual no es alterada por la saxagliptina (*figura IV. 3. 10.*).

Interesantemente, en nuestro presente modelo observamos que aunque el tratamiento con metformina como monoterapia prevenía completamente el aumento de la adiposidad medular inducido por la Diabetes, este efecto protector se veía completamente bloqueado en las ratas co-tratadas con saxagliptina y metformina (*figura III. 3. 7.*). Esta acción *in vivo* de la saxagliptina puede correlacionarse con sus efectos *in vitro*: en CPMO, la expresión del factor de transcripción pro-adipogénico PPAR γ fue significativamente mayor para el co-tratamiento saxagliptina / metformina que para la monoterapia con metformina (*figura IV. 3. 9.*).

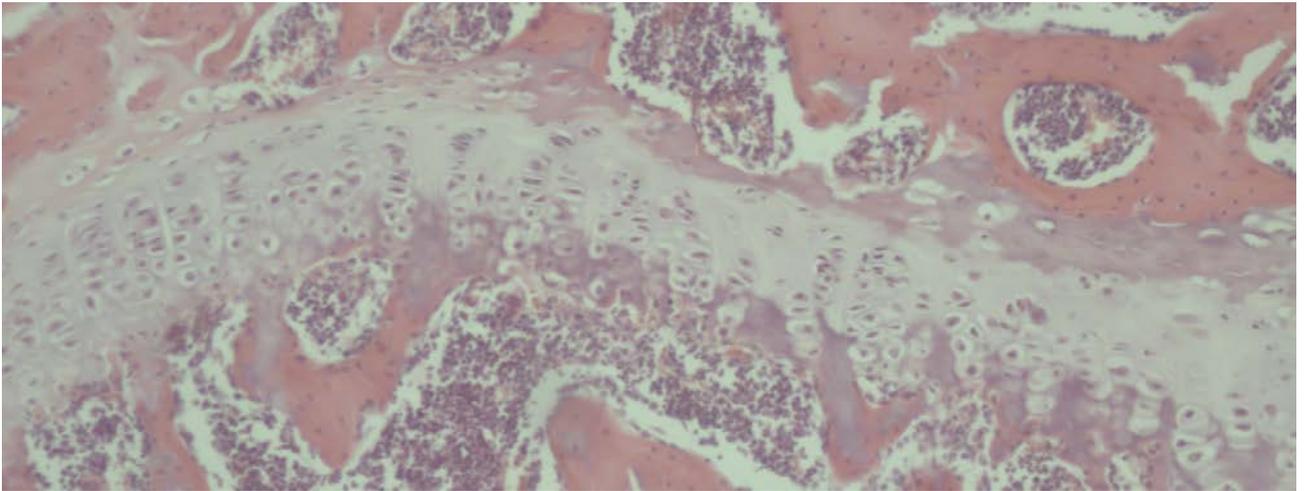
Por otra parte, la falta de efectos óseos en la micro-arquitectura femoral inducidos por un tratamiento oral con saxagliptina en nuestro modelo de diabetes podría explicarse por la severa insulinopenia observada en dichos animales. Estas observaciones son acordes con mecanismo de acción propuesto de la saxagliptina mediado por mitógenos. En estudios futuros, y para

corroborar estos resultados, se propone estudiar los efectos de la saxagliptina en un modelo animal de diabetes generada por resistencia periférica a la acción de la insulina. De esta manera sería probable observar los efectos deletéreos de la droga.

En conclusión, nuestros estudios *in vitro* permiten postular que la saxagliptina disminuye el potencial osteogénico de las células progenitoras de médula ósea en forma indirecta (por inhibición de la vía común de señalización para la insulina y el IGF-1 dependiente de la fosforilación de ERK), y que ese efecto deletéreo sobre el potencial osteogénico inducido por la saxagliptina puede ser prevenido por co-tratamiento con metformina. Estos hallazgos *in vitro* correlacionan con nuestros resultados *in vivo* para animales no diabéticos, en los cuales encontramos que la saxagliptina induce efectos deletéreos sobre la micro-arquitectura femoral, que pueden prevenirse cuando la saxagliptina se combina con metformina. En nuestro modelo de Diabetes *per se*, probablemente por la severa insulinopenia que presentaron los animales utilizados.

V. 2. Conclusiones.

- La saxagliptina genera cambios deletéreos en la micro-arquitectura femoral de ratas no diabéticas, y dichos efectos son completamente prevenidos por un co-tratamiento con metformina.
 - La saxagliptina no afecta en forma directa la proliferación de células progenitoras de médula ósea (CPMO) y de pre-osteoblastos MC3T3E1. Sin embargo, inhibe el efecto mitogénico del suero fetal bovino, insulina e IGF-1 mediante una disminución de la activación de ERK.
 - La saxagliptina compromete el potencial osteogénico de las CPMO disminuyendo su expresión de Runx-2 y osteocalcina, e incrementando PPAR γ .
 - Los efectos inducidos por la saxagliptina sobre la proliferación y diferenciación de las CPMO se pueden prevenir al co-incubar las células con saxagliptina y metformina.
 - En nuestro modelo de Diabetes por destrucción parcial de las células β del páncreas, el tratamiento con saxagliptina no generó alteraciones óseas adicionales a los de la Diabetes *per se*. Esto probablemente se deba a la severa insulinopenia que presentaron los animales diabéticos.
 - Nuestros resultados *in vitro e in vivo* podrían explicar el aumento en la incidencia de fracturas óseas observada en pacientes diabéticos bajo tratamiento con saxagliptina. Este efecto podría ser prevenido mediante un co-tratamiento con metformina.
-



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

Arias-Díaz J.; Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp*, **2007**, 22(2):160-68.

Aschner, P.J. The role for saxagliptin within the management of type 2 diabetes mellitus: an update from the 2010 European Association for the Study of Diabetes (EASD) 46th annual meeting and the American Diabetes Association (ADA) 70th scientific session. *Diabetol Metab Syndr*, **2010**, 2:69.

B

Barnett, A.H; Charbonnel, B.; Li, J.; Donovan, M.; Fleming, D.; Iqbal, N. Saxagliptin add-on therapy to insulin with or without metformin for type 2 diabetes mellitus: 52-week safety and efficacy. *Clin Drug Investig*, **2013**, 33(10):707-17.

Blakytyn, R.; Spraul M.; Jude, E.B. The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds.*, **2011**, 10 (1):16-32.

Bonewald, L.F. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res.*, **2011**, Vol. 26, No. 2, pp 229–238.

Bonfanti, R.; Mora, S.; Prinster, C.; Bognetti, E.; Meschi, F.; Puzzovio, M.; Proverbio, M.C.; Chiumello, G. Bone modeling indexes at onset and during the first year of follow-Up in insulin-independent diabetic children. *Calcif Tissue Int.*, **1997**, 60(5):397-400.

Burgermeister, E.; Seger, R. PPAR γ and MEK Interactions in Cancer. *PPAR Res.*, **2008**, 2008:309469.

C

Chacra, A. Saxagliptin for type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*, **2010**, 3:325-35.

Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, **2008**, 3:S131-9.

Cobble, M.E.; Frederich, R. Saxagliptin for the treatment of type 2 diabetes mellitus: assessing cardiovascular data. *Cardiovasc Diabetol*, **2012**, 11:6

Cortizo, A.M.; Sedlinsky, C.; McCarthy, A.D.; Blanco, A.; Schurman, L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol*, **2006**, 536, 38–46.

D

Dalle Carbonare, L.; Innamorati, G.; Valenti, M.T. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev*, **2012**, 8(3):891-7.

Datta, H.K.; Ng, W.F.; Walker, J.A.; Tuck, S.P.; Varanasi, S.S. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*, **2008**, 61(5):577-87.

DeFronzo, R.; Hissa, M.; Garber, A.; Gross, J.; Duan R. Y.; Ravichandran, S. Chen, R. The Efficacy and Safety of Saxagliptin When Added to Metformin Therapy in Patients With Inadequately Controlled Type 2 Diabetes With Metformin Alone. *Diabetes Care*, **2009** 32:1649–1655.

De Liefde, I.I.; van der Klift, M.; de Laet, C.E.D.H.; van Daele, P.L.A.; Hofman, A.; Pols, H.A.P. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporos Int*, **2005**, 16: 1713-1720.

Dempster, D.W.; Compston, J.E.; Drezner, M.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A.; Malluche, H.; Meunier, P.; Ott, S.M.; Recker, R.; Parfitt, A. M. Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, **2013**, 28(1):2-17.

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

Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, **1993**, 329:977-986.

Diradoudian, C.; Girard, J.; Pégrier, J.P. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie*, **2005**, 87(1):33-8.

Drucker, DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*, **2006**, 153-65.

Drucker, D.J, Nauck, M.A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, **2006**, 11;368 (9548):1696-705.

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

E

El-Mir, M.Y.; 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.

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

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I.; Alobera Gracia, M.A.; del Canto Pingarrón, M.; Blanco Jerez, L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, **2006**, 11(1):E47-51.

Franceschi, R.T.; Xiao, G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem*, **2003**, 88(3):446-54.

Fulzele, K.; Clemens, T.L. Novel functions for insulin in bone. *Bone*, **2012**, 50(2):452-6.

Fura, A.; Khanna, A.; Vyas, V.; Koplowitz, B.; Chang, S.Y.; Caporuscio, C.; Boulton, D.W.; Christopher, L.J.; Chadwick, K.D.; Hamann, L.G.; Humphreys, W.G.; Kirby, M. Pharmacokinetics of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor saxagliptin in rats, dogs, and monkeys and clinical projections. *Drug Metab Dispos*, **2009**, 37(6):1164-71.

G

Gagliardino, J.J.; Costa Gil, M.; Faingold M.; Litwak, L.; Fuente, G. Insulina y control de la diabetes en la argentina. *Medicina*, **2013**, 73: 520-528.

Gallwitz, B. The evolving place of incretin-based therapies in type 2 diabetes. *Pediatr Nephrol*, **2010**, 25(7):1207-17.

Garnero, P.; Borel, O.; Gineyts, E.; Duboeuf, F.; Solberg, H.; Bouxsein, M.L.; Christiansen, C.; Delmas, P.D. Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. *Bone*, **2006**, 38(3):300-9.

Geneser, F. Histología sobre bases biomoleculares. 3ra edición, 6ta reimpresión. Editorial: Médica Panamericana. **2006**.

Gerich, J. DPP-4 inhibitors: what may be the clinical differentiators? *Diabetes Res Clin Pract*, **2010**, 90(2):131-40.

Giustina, A.; Mazziotti, G.; Canalis, E. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocr Rev*, **2008**, 29(5):535-59.

Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Editorial: Mc Graw Hill. **2007**.

Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, vol 8th Edition. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research; Division on Earth and Life Studies, National Research Council of The National Academies; The National Academic Press, Washington, D.C.2011.

Gundberg, C.M.; Anderson, M.; Dickson, I.; Gallop, P.M. "Glycated" osteocalcin in human and bovine bone. The effect of age. *J Biol Chem*, **1986**, 261(31):14557-61.

Guney, E.; Kisakol, G.; Oge, A.; Yilmaz, C.; Kabalak, T. Effects of insulin and sulphonylureas on insulin-like growth factor-I levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuro Endocrinol Lett*, **2002**, 23(5-6):437-9.

H

Hall, A.P.; Westwood, F.R.; Wadsworth, P.F. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. *Toxicol Pathol*, **2006**, 34(2):131-47.

Hardie, D.G. AMPK: A Target for Drugs and Natural Products with Effects on Both Diabetes and Cancer. *Diabetes*, **2013**, 62(7):2164-72.

Hein, G.; Baker, C.; Hsieh, J.; Farr, S.; Adeli, K. GLP-1 and GLP-2 as Yin and Yang of Intestinal Lipoprotein Production Evidence for Predominance of GLP-2–Stimulated Postprandial Lipemia in Normal and Insulin-Resistant States. *Diabetes*, **2013**, 62(2):373-81.

Hekimsoy Zeliha. Osteocytes-The Known and unknown. *Turk Jem*, **2008**; 12: 23-7.

Henriksen, K.; Neutzsky-Wulff, A.V.; Bonewald, L.F.; Karsdal, M.A. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*, **2009**, 44(6):1026-33.

Hirshberg, B.; Parker, A.; Edelberg, H.; Donovan, M.; Iqbal, N. Safety of saxagliptin: events of special interest in 9156 patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, **2013**, doi: 10.1002/dmrr.2502. [Epub ahead of print].

I

Isidro, M.L.; Ruano, B. Bone disease and Diabetes. *Curr Diabetes Rev*, **2010**, 6(3):144-55.

J

Janghorbani, M.; van Dam, R.M.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*, **2007**, 166(5):495-505.

Jonas D, Van Scoyoc E, Gerrald K, Wines R, Amick H, Triplette M, Runge T. Drug Class Review: Newer Diabetes Medications, TZDs, and Combinations: Final Original Report [Internet]. Drug Class Review. **2011**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0009777/>

K

Kähne, T.; Reinhold, D.; Neubert, K.; Born, I.; Faust, J.; Ansorge, S. Signal transduction events induced or affected by inhibition of the catalytic activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV, CD26). *Adv Exp Med Biol*, **2000**, 477:131-137.

Kayath, M.J.; Tavares, E.F.; Dib, S.A.; Vieira, J.G. Prospective bone mineral density evaluation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, **1998**, 12(3):133-9.

Kemink, S.A.; Hermus, A.R.; Swinkels, L.M.; Lutterman, J.K.; Smals, A.G. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest*, **2000**, 23(5):295-303.

Kim, W.; Egan, J.M. The Role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*, **2008**, 60(4):470-512.

Knothe Tate, M.L.; Adamson, J.R.; Tami, A.E.; Bauer, T.W. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol*, **2004**, 36(1):1-8.

Kubota, T.; Elalieh, H.Z.; Saless, N.; Fong C.; Wang, Y.; Babey, M.; Cheng, Z.; Bikle, D.D. Insulin-like growth factor-1 receptor in mature osteoblasts is required for periosteal bone formation induced by reloading. *Acta Astronaut*, **2013**, 92(1):73-78.

L

Labuzek, K.; Kozłowski, M.; Szkudłapski, D.; Sikorska, P.; Kozłowska, M.; Okopień B. Incretin-based therapies in the treatment of type 2 diabetes - more than meets the eye? *Eur J Intern Med*, **2013**, 24(3):207-12.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227(5259):680-5.

Lecka-Czernik, B. Safety of Antidiabetic Therapies on Bone. *Clin Rev Bone Min Metab*, **2013**, 11(1):49-58.

Leslie, W.D.; Rubin, M.R.; Schwartz, A.V.; Kanis, J.A. Type 2 Diabetes and Bone. *J Bone Miner Res*, **2012**, 27(11):2231-7

Liu, T.M.; Lee, E.H. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*, **2013**, 19(3):254-63.

M

Mai, Q.; Zhang, Z.M.; 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. *J Cell Biochem*, **2011**, 112(10):2902-9.

Manolagas, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, **2000**, 21(2):115-37.

Matteucci, E.; Giampietro, O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr Med Chem*, **2009**, 16(23):2943-51.

McCarthy, A.D.; Etcheverry, S.B.; Cortizo, A.M. Advanced glycation endproduct specific receptors in rat and mouse osteoblast-like cells: regulation with stages of differentiation. *Acta Diabetol*, **1999**, 36(1-2):45-52.

McCarthy, A.D. Glycation, glycooxidation and carbonyl stress: role in the vascular complications of Diabetes mellitus. *Rev Arg Endocrinol Metab*, **2000**, 37:141-163.

McCarthy, A.D.; Etcheverry, S.B.; Cortizo, A.M. Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetol*, **2001**, 38(3):113-22.

McCarthy, A.D.; Uemura, T.; Etcheverry, S.B.; Cortizo, A.M. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *Int J Biochem Cell Biol*, **2004**, 36, 840-848.

McCarthy, A.D., Molinuevo, M.S., Cortizo, A.M. Ages and Bone Ageing in Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab*, **2013**, 4: 276.

McCarthy, T.L.; Ji, C.; Centrella, M. Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. *Crit Rev Oral Biol Med*, **2000**, 11(4):409-22.

Melton, L.J. 3rd; Leibson, C.L.; Achenbach, S.J.; Therneau, T.M.; Khosla, S. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res*, **2008**, 23(8):1334-42.

Merlotti, D.; Gennari, L.; Dotta, F.; Lauro, D.; Nuti, R. Mechanisms of impaired bone strength in type 1 and 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **2010**, 20(9):683-90.

Minze, M.G.; Klein, M.S.; Terrell, B.T. Saxagliptin and Metformin in Fixed Combination for the Treatment of Type 2 Diabetes in Adults. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*, **2013**, 6:15-24.

Molinuevo, M.S.; Schurman, L.; McCarthy, A.D.; Cortizo, A.M.; Tolosa, M.J.; Gangoiti, M.V.; Arnol, V.; Sedlinsky, C. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res*, **2010**, 25(2):211-21.

Monami, M.; Dicembrini, I.; Antenore, A.; Mannucci, E.; Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care*, **2011**, 34(11):2474-6.

Montagnani, A.; Gonnelli, S. Antidiabetic therapy effects on bone metabolism and fracture risk. *Diabetes Obes Metab*, **2013**, 15(9):784-91.

N

Novack, D.V.; Teitelbaum, S.L. The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol*, **2008**, 3:457-84.

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 N Y Acad Sci*, **2005**, 1043:710-7.

Oreffo, R.O.; Cooper, C.; Mason, C.; Clements, M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev*, **2005**, 1(2):169-78.

Onglyza® spiDB-MS. Onglyza® (saxagliptin) package insert. **2013** Dec. Bristol-Myers Squibb (packageinserts.bms.com/pi/pi_onglyza.pdf)

P

Portela, M.L. Vitaminas y minerales en nutrición. **2003**. Segunda Edición. La prensa médica Argentina.

Q

Quarles, L.D.; Yohay, D.A.; Lever, L.W.; Caton, R.; Wenstrup, R.J. 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(6):683-92.

R

Räkel, A.; Sheehy, O.; Rahme, E.; LeLorier, J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, **2008**, 34(3):193-205.

Raggatt, L.J.; Partridge, N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, **2010**, 285(33):25103-8.

Rojas, L.B.; Gomes, M.B. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*, **2013**, 5(1):6.

Rosenberg, N.; Rosenberg, O.; Soudry, M. Osteoblasts in Bone Physiology. *Rambam Maimonides Med J*, **2012**, 3(2):e0013.

Ross, M.H.; Pawlina, W. Histología: Texto y Atlas Color con Biología Molecular y Celular. **2007**. 5ta Ed., Editorial Médica Panamericana.

S

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 Int*, **2006**, 17(7):986-95.

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**, 21(2):195-214.

Safadi, F.F.; Barbe, M.F.; Abdelmagid, S.M; Rico, M.C.; Aswad, R.A.; Litvin, J.; Popoff, S.N. Bone Pathology, Capítulo I: Bone Structure, Development and Bone Biology. **2009**. Ed Human Press.

Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **2001**, 414(6865):799-806.

Scheen, A.J. Dipeptidylpeptitase-4 Inhibitors (gliptins) focus on drug-drug Interactions. *Clin Pharmacokinet*, **2010**, 49(9):573-88.

Schell, H.; Lienau, J.; Epari, D.R.; Seebeck, P.; Exner, C.; Muchow, S.; Bragulla, H.; Haas, N.P.; Duda, G.N. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone*, **2006**, 38(4):547-54.

Schwartz, A.V. Diabetes Mellitus: Does it affect bone? *Calcif Tissue Int*, **2003**, 73(6):515-9.

Sedlinsky, C.; Molinuevo, M.S.; Cortizo, A.M.; Tolosa, M.J.; Felice, J.I.; Sbaraglini, M.L.; Schurman, L.; McCarthy, A.D. Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol*, **2011**, 668(3):477-85.

Shapiro, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*, **2008**, 15:53-76.

Shubrook, J.; Colucci, R.; Guo, A.; Schwartz, F. Saxagliptin: A Selective DPP-4 Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*, **2011**, 4:1-12.

Silva, M.J.; Brodt, M.D.; Lynch, M.A.; McKenzie, J.A.; Tanouye, K.M.; Nyman, J.S.; Wang, X. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. *J Bone Miner Res*, **2009**, 24(9):1618-27.

Spencer, N.D.; Gimble, J.M.; Lopez, M.J. Mesenchymal Stromal Cells: Past, Present, and Future. *Vet Surg*, **2011**, 40(2):129-39.

Starup-Linde, J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2013**, 4:21.

Strotmeyer, E.S.; Cauley, J.A.; Schwartz, A.V.; Nevitt, M.C.; Resnick, H.E.; Zmuda, J.M.; Bauer, D.C.; Tylavsky, F.A.; de Rekeneire, N.; Harris, T.B.; Newman, A.B.; 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(7):1084-91.

Szkudelski, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med*, **2012**, 237(5):481-90.

T

Tahara, A.; Matsuyama-Yokono, A.; Nakano, R.; Someya, Y.; Shibasaki, M. Hypoglycaemic effects of antidiabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **2008**, 103(6):560-8.

Tahara, A.; Matsuyama-Yokono, A.; Nakano, R.; Someya, Y.; Hayakawa, M.; Shibasaki, M. Antihyperglycemic effects of ASP8497 in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: comparison with other dipeptidyl peptidase-IV inhibitors. *Pharmacol Rep*, **2009**, 61(5):899-908.

Tahimic, C.G.; Wang Y.; Bikle, D.D. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2013**, 4:6.

Taniguchi, C.L., Emanuelli, B.; Kahn, C.R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2006**, 7:85-96

Testut, L.; Latarjet, A. Tratado de Anatomía Humana. **1983**. 9^{na} edición. Editorial Salvat.

Thielitz, A.; Vetter, R.W.; Schultze, B.; Wrenger, S.; Simeoni, L.; Ansorge, S.; Neubert, K.; Faust, J.; Lindenlaub, P.; Gollnick, H.P.; Reinhold, D. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV-like activity mediate antifibrotic effects in normal and keloid-derived skin fibroblasts. *J Invest Dermatol*, **2008**, 128(4):855-66.

Thrailkill, K.M.; Lumpkin C.K. Jr.; Bunn, R. C.; Kemp, S.F.; Fowlkes, J.L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2005**, 289(5):E735-45.

Tolosa, M.J.; Chuguransky, S.R.; Sedlinsky, C.; Schurman, L.; McCarthy, A.D.; Molinuevo, M.S.; Cortizo, A.M. Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: preventive effects of metformin. *Diabetes Res Clin Pract*, **2013**, 101(2):177-86.

Tortora, G.; Derrickson, B. Principles of Anatomy and Physiology. **2009**. 12th Edition. John Wiley & Sons, Inc.

Tullberg-Reinert, H.; Jundt, G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol*, **1999**, 112(4):271-6.

U

Ueno, A.; Kitase, Y.; Moriyama, K.; Inoue, H. MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biol*, **2001**, 20(5-6):347-55.

UKPDS. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ*, **1998**, 317:703-713.

V

van Staa, T.P.; Dennison, E.M.; Leufkens, H.G.; Cooper, C. Epidemiology of fractures in England and Wales, *Bone*, **2001**, 29(6):517-22.

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(7):1292-9.

Viccica, G.; Francucci, C.M.; Marcocci, C. The role of PPAR γ for the osteoblastic differentiation. *J Endocrinol Invest*, **2010**, 33(7 Suppl):9-12.

W

Wan, Y. PPAR γ in bone homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, **2010**, 21(12):722-8.

Wang, X.; Shen, X.; Li, X.; Agrawal, C.M. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, **2002**, 31(1):1-7.

Witters, L.A. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest*, **2001**, 108(8):1105-7.

Wu, L.; Cai X.; Dong H.; Jing, W.; Huang, Y.; Yang X.; Wu Y.; Lin Y. Serum regulates adipogenesis of mesenchymal stem cells *via* MEK/ERK-dependent PPAR γ expression and phosphorylation. *J Cell Mol Med*, **2010**, 14(4): 922-932

Y

Yang, J.; Zhang, X.; Wang, W.; Liu, J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochem Funct*, **2010**, 28(4):334-41.

Z

Zhen, D.; Chen, Y.; Tang, X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications*, **2010**, 24(5):334-44.

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