



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

**“EFECTO DEL SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR UNA
DIETA RICA EN FRUCTOSA SOBRE EL TEJIDO ÓSEO”**

BIOQ. JUAN IGNACIO FELICE

DIRECTOR: DR. ANTONIO DESMOND MCCARTHY

CO-DIRECTORA: DRA. ANA MARÍA CORTIZO

2014

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

El mismo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM) de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, y fue posible gracias a las Becas Internas de Posgrado otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Programa Transitorio de Retención de Recursos Humanos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

A la Abuela Negra

A María José

A mi familia

Agradecimientos

A mis directores, Ana y Antonio, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por enseñarme como transitar este camino y por su paciencia.

A los compañeros y amigos del LIOMM que estuvieron a lo largo de todos estos años, por formar este lindo grupo de trabajo, y por darme una mano cuando lo necesité.

Al Dr. Ignacio Aguirre y al Dr. Thomas Wronski, por recibirme en su laboratorio de la Universidad de Florida, por ayudarme con los ensayos, enseñarme y aconsejarme.

A Claudia y León, por sus colaboraciones.

A Química Montpellier, por brindarme muy gentilmente la metformina.

A mis papás, por enseñarme la importancia de la honestidad y la responsabilidad, e inculcarme la dedicación al trabajo. A Flor, Walter y Luisi porque me acompañan y se preocupan por mí. A la Familia Tolosa-Tisera por su cariño, y por todo lo que me han ayudado.

A mis abuelos, tíos y primos que siempre se preocuparon por cómo avanzaba la tesis, me alentaron y ayudaron.

A los amigos de la secundaria, de la Facultad y de básquet.

A la familia Aguirre-Pérez Cabral por “adoptarme” por unos meses mientras estuve en Gainesville.

Al Dr. Sebastián García Einschlag por todo lo que me enseñó cuando realicé la pasantía como estudiante en el INIFTA.

A mis compañeros de la Cátedra de Anatomía e Histología.

Al CONICET y a la UNLP por el apoyo económico recibido.

A Marix, mi compañera de la vida, a quien tuve la suerte de tener también como compañera de trabajo en esta etapa, por ayudarme y apoyarme, siempre con mucho cariño.

A todos, ¡muchas gracias!

Índice

| | |
|---|----------|
| Resumen | |
| Lista de abreviaturas | |
| I. Introducción | 1 |
| I. 1. Tejido Óseo | 2 |
| I. 1. 1. Esqueleto | 2 |
| I. 1. 2. Estructura general de los huesos | 2 |
| I. 1. 3. Tejido óseo | 3 |
| I. 1. 3. A. Clasificación del tejido óseo | 3 |
| I. 1. 3. B. Composición del tejido óseo | 5 |
| I. 1. 3. B. i. Matriz extracelular | 5 |
| I. 1. 3. B. ii. Células | 6 |
| a. Células estromales mesenquimáticas | 7 |
| b. Células osteoprogenitoras | 7 |
| c. Osteoblastos | 8 |
| d. Osteocitos | 8 |
| e. Osteoclastos | 9 |
| f. Células de revestimiento | 11 |
| I. 1. 3. C. Proceso de mineralización de la matriz ósea | 12 |
| I. 1. 3. D. Modelado y Remodelado Óseo | 13 |
| I. 1. 4. Diferenciación de células estromales mesenquimáticas hacia el fenotipo osteoblástico y adipocítico | 15 |
| I. 1. 5. Reparación de lesiones óseas | 16 |
| I. 1. 6. Técnicas para la evaluación de la microarquitectura y masa ósea en modelos animales | 19 |
| I. 1. 6. A. Técnicas histológicas | 19 |
| I. 1. 6. B. Técnicas con imágenes | 20 |
| I. 2. Síndrome Metabólico (SM) | 22 |
| I. 2. 1. Definición | 22 |
| I. 2. 2. Criterios diagnósticos de SM | 22 |
| I. 2. 3. Prevalencia del SM | 24 |
| I. 2. 4. Complicaciones asociadas al SM | 24 |

| | |
|--|-----------|
| I. 2. 5. Fisiopatología del SM | 25 |
| I. 2. 5. A. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina | 25 |
| I. 2. 5. B. Almacenamiento de energía disfuncional y obesidad | 26 |
| I. 2. 6. Consumo de fructosa y SM | 26 |
| I. 2. 7. Metabolismo de la fructosa | 27 |
| I. 2. 8. Efectos del consumo sostenido de fructosa | 29 |
| I. 2. 8. A. Dislipidemia | 30 |
| I. 2. 8. B. Deposición ectópica de lípidos en hígado y músculo esquelético | 31 |
| I. 2. 8. C. Homeostasis de la glucosa alterada y resistencia a la insulina | 31 |
| I. 2. 8. D. Metabolismo del ácido úrico | 32 |
| I. 2. 8. E. Hipertensión arterial | 33 |
| I. 2. 9. Modelos animales utilizados en el estudio del SM | 33 |
| I. 2. 10. Estrategias terapéuticas para pacientes con SM | 36 |
| I. 2. 11. Metformina en el tratamiento del SM | 37 |
| I. 3. Síndrome Metabólico y hueso | 39 |
| I. 3. 1. Alteraciones en el metabolismo óseo asociadas al SM | 39 |
| I. 3. 1. A. Alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la insulina | 40 |
| I. 3. 2. B. Obesidad | 40 |
| I. 3. 3. C. Hipertensión | 41 |
| I. 3. 2. Metformina y metabolismo óseo | 43 |
| II. Hipótesis y Objetivos | 45 |
| II. Hipótesis y objetivos | 46 |
| III. Materiales y Métodos | 47 |
| III. 1. Estudios <i>in vivo</i> . | 48 |
| III. 1. 1. Diseño experimental N°1: Efecto del Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa sobre el metabolismo óseo | 48 |
| III. 1. 2. Diseño experimental N°2: Efecto de un tratamiento oral con metformina sobre las alteraciones en la microarquitectura ósea producidas por el Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa | 49 |
| III. 1. 3. Determinación de parámetros séricos | 51 |
| III. 1. 4. Modelo de lesión ósea | 51 |

| | |
|--|-----------|
| III. 1. 5. Protocolo de inyecciones de fluorocromos para determinación de superficies de mineralización activa | 51 |
| III. 1. 6. Estudio de parámetros estructurales óseos por Tomografía Computada Cuantitativa Periférica (pQCT) | 52 |
| III. 1. 6. A. Obtención de las muestras | 52 |
| III. 1. 6. B. Mediciones | 52 |
| III. 1. 6. C. Parámetros evaluados | 53 |
| III. 1. 7. Análisis Histomorfométrico | 53 |
| III. 1. 7. A. Obtención y procesamiento de las muestras | 53 |
| III. 1. 7. B. Tinciones realizadas | 54 |
| III. 1. 7. C. Evaluación de parámetros de histomorfometría estática | 57 |
| III. 1. 7. D. Evaluación de parámetros de histomorfometría dinámica | 61 |
| III. 3. Estudios <i>ex vivo</i> | 63 |
| III. 3. 1. Obtención e incubación de células estromales mesenquimáticas (MSC) | 63 |
| III. 3. 2. Diferenciación osteoblástica de MSC | 63 |
| III. 3. 2. A. Determinación de parámetros de diferenciación osteoblástica | 64 |
| III. 3. 3. Diferenciación adipogénica de MSC | 65 |
| III. 3. 4. Determinación de niveles de expresión de factores de transcripción por Western Blot | 66 |
| III. 4. Análisis Estadístico | 67 |
| IV. Resultados | 68 |
| IV. 1. Efectos del Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa sobre el metabolismo óseo | 69 |
| IV. 1. 1. Peso corporal y evaluación bioquímica de los grupos experimentales | 69 |
| IV. 1. 2. Análisis histomorfométrico estático de la microarquitectura metafisaria femoral proximal | 69 |
| IV. 1. 3. Análisis de la capacidad de regeneración ósea | 71 |
| IV. 1. 4. Evaluación del potencial osteogénico de MSC | 72 |
| IV. 1. 5. Evaluación del potencial adipogénico de MSC | 74 |
| IV. 1. 6. Expresión de factores de transcripción osteogénicos y adipogénicos | 75 |
| IV. 2. Efectos del tratamiento oral con metformina sobre las alteraciones en la microarquitectura ósea producidas por el Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica | 77 |

| | |
|--|------------|
| en fructosa | |
| IV. 2. 1. Peso corporal y evaluación bioquímica de los grupos experimentales | 77 |
| IV. 2. 2. Análisis de la longitud de huesos | 78 |
| IV. 2. 3. Análisis estructural por tomografía computada cuantitativa periférica | 79 |
| IV. 2. 4. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica de la metáfisis femoral distal | 80 |
| IV. 2. 5. Estudios de parámetros de histomorfometría estática de la metáfisis femoral distal | 81 |
| IV. 2. 6. Análisis histomorfométrico estático de la microarquitectura metafisaria femoral proximal | 84 |
| IV. 2. 7. Evaluación del potencial osteogénico de MSC | 85 |
| V. Discusión | 87 |
| Síndrome Metabólico y fructosa | 88 |
| Efectos del SM sobre el tejido óseo | 89 |
| MSC | 94 |
| Reparación de fracturas en el modelo de SM | 96 |
| Efectos de la metformina en nuestro modelo de SM | 97 |
| Metformina y tejido óseo en el modelo de SM | 97 |
| Metformina y MSC | 99 |
| VI. Conclusiones | 100 |
| Conclusiones | 101 |
| VII. Referencias | 102 |

Resumen

Introducción. El Síndrome Metabólico (SM) se define como un conjunto de anormalidades fisiológicas y metabólicas que incluyen obesidad central y global, tolerancia a la glucosa alterada con insulinoresistencia, dislipidemia e hipertensión. Desde su descripción en 1988, la incidencia del SM ha aumentado dramáticamente, y se ha reportado que se presenta en más del 20% de la población adulta en los países en desarrollo. La prevalencia del SM aumenta con la edad y se asocia con alto riesgo de Diabetes mellitus y sus consecuencias cardiovasculares más importantes.

Desde hace un tiempo se ha reconocido que existe una asociación entre la Diabetes mellitus y alteraciones esqueléticas, lo cual podría llevar a un mayor riesgo de fracturas en esta condición. Sin embargo, se conoce menos sobre el efecto del SM (o de sus componentes individuales) en la salud ósea. Algunos factores, como la obesidad y el sobrepeso protegerían de la excesiva pérdida ósea asociada con la edad. Otros, como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia y bajos niveles de HDL, muestran resultados contradictorios en su asociación con la densidad mineral ósea.

Existen estudios clínicos que intentan relacionar el SM con el estado de la densidad mineral ósea (DMO) y/o la predisposición a fracturas. Los resultados están lejos de ser concluyentes. En algunos trabajos se encuentran efectos nocivos del SM sobre ciertas regiones del esqueleto, mostrando DMO disminuida y/o mayor predisposición a fracturas, pero otros trabajos no llegan a las mismas conclusiones.

Existe una gran cantidad de evidencia en modelos animales y estudios en humanos, demostrando que un alto consumo de fructosa en la dieta es un factor nutricional importante en el desarrollo del SM. En el modelo de ratas alimentadas con dieta rica en fructosa, los animales manifiestan las características más importantes del SM: se inducen hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, disminuida sensibilidad insulínica y tolerancia a la glucosa alterada. Los productos de glicación avanzada (AGEs) que se asocian con la hiperglucemia, son producidos por reacción no enzimática de azúcares reductores con proteínas o lípidos. Indirectamente, los AGEs desencadenan inflamación y estrés oxidativo, lo cual también podría contribuir tanto a la progresión del SM como de osteoporosis. En ratas alimentadas con fructosa se ha reportado un incremento de AGEs en varios tejidos, así como en los niveles de metilgloxal, un intermediario del metabolismo de la fructosa y potente precursor de AGEs. Esto se asocia a su vez con un incremento en la resistencia insulínica y los triglicéridos plasmáticos. En nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que los AGEs ejercen efectos deletéreos directos

sobre osteoblastos en cultivo, reduciendo su capacidad de proliferación, diferenciación y mineralización.

La metformina es uno de los agentes más comúnmente usados en el tratamiento de estados patológicos asociados a insulinoresistencia como son la Diabetes mellitus tipo 2 y el SM. Esta droga es una biguanida que disminuye los niveles glucémicos sin afectar en forma directa la secreción de insulina. En nuestro grupo de trabajo se ha investigado el efecto de la metformina sobre osteoblastos en cultivo, encontrando que induce en forma directa un incremento en su proliferación, diferenciación y mineralización. Además, hemos demostrado que la administración oral de metformina induce efectos osteogénicos *in vivo* y *ex vivo* en animales de experimentación sin alteraciones metabólicas o en un modelo de diabetes con deficiencia parcial de insulina.

Hipótesis. La inducción de Síndrome Metabólico podría asociarse con alteraciones óseas, consecutivas a cambios en el recambio óseo y en el metabolismo de las células óseas o de sus progenitores, y consecuentemente, asociarse con un mayor riesgo de fracturas y/o disminuida capacidad de regeneración del tejido esquelético. Además, se postula que estas alteraciones óseas asociadas al Síndrome Metabólico, podrían ser prevenidas en forma parcial o total por la administración oral de metformina.

Objetivos. Se planteó el objetivo general de investigar la posible asociación entre el Síndrome Metabólico y las alteraciones del tejido óseo en ratas, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos: a) investigar *in vivo* las posibles alteraciones óseas, consecutivas a la inducción de resistencia insulínica, dislipidemia e hipertensión, en un modelo de ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa; b) investigar el efecto *ex vivo* del SM de este modelo sobre el potencial osteogénico o adipogénico de células estromales mesenquimáticas (MSC); c) investigar el efecto *in vivo* del SM inducido por fructosa, sobre la regeneración del tejido óseo; y d) evaluar la posible modulación de las alteraciones óseas consecutivas a un SM inducido por fructosa, mediante una administración oral de metformina.

Materiales y métodos. Los estudios se hicieron en ratas que recibieron solución de fructosa al 10% *ad libitum* (grupo DRF) para generar el SM. Como control (grupo C), se usaron ratas que recibieron agua corriente *ad libitum*. En los ensayos en los que se evaluaron los efectos de la metformina, esta se administró en el agua de bebida en una dosis de 100 mg/kg/día (grupos CM y DRFM). Se hicieron estudios de histomorfometría estática de la metáfisis femoral proximal y distal, estudios de histomorfometría dinámica de la metáfisis femoral distal, análisis por

tomografía computada cuantitativa periférica, y se estudió la capacidad de regeneración de una lesión ósea parietal. Además, se evaluó el potencial osteogénico y adipogénico de las células estromales mesenquimáticas, y se midió la expresión de factores de transcripción de cada linaje.

Resultados. La dieta rica en fructosa indujo un SM caracterizado por alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos. A través de estudios histomorfométricos estáticos se observó que el SM indujo una disminución significativa en la densidad de osteocitos y en la actividad TRAP de la metáfisis femoral. No se observaron cambios inducidos por el SM a través de estudios de histomorfometría dinámica y de pQCT. Las MSC derivadas de animales con SM presentaron un menor potencial osteogénico y una mayor predisposición hacia el linaje adipocítico, probablemente por modulación de la relación en la expresión de Runx2 y PPAR γ . El SM se asoció con una disminución de la reparación ósea en un modelo de lesión parietal mínima. Simultáneamente, redujo la densidad osteocítica y la actividad osteoclástica en el sitio de lesión, sugiriendo una disminución concertada de la formación y remodelado óseo. El tratamiento oral con metformina previno la disminución de la densidad osteocítica metafisaria inducida por el SM, sin alterar la actividad TRAP. La metformina previno total o parcialmente los efectos antiosteogénicos del SM sobre las MSC.

Conclusión. El Síndrome Metabólico se asocia con alteraciones leves en la microarquitectura metafisaria, con un menor potencial osteogénico en las células estromales mesenquimáticas y con una importante disminución en la regeneración ósea. El tratamiento oral con metformina fue capaz de prevenir total o parcialmente la mayoría de estas alteraciones óseas.

Listado de abreviaturas

| <u>Abreviatura</u> | <u>Significado</u> |
|--------------------|---|
| A.Tr/A.T | área trabecular relativa |
| AA | azul alcíán |
| ADA | Asociación americana de diabetes (<i>American diabetes association</i>) |
| AGEs | productos de glicación avanzados |
| AMP | adenosín monofostato |
| AMPK | <i>5' AMP-activated protein kinase</i> |
| ATP | adenosín trifosfato |
| BFR/BS | tasa de formación de hueso/superficie de hueso |
| BRU | unidad remodeladora ósea |
| BMP | proteína morfogénica ósea |
| BV/TV | volumen de hueso trabecular/volumen total |
| C | control |
| Cbfa1 | <i>core-binding factor alpha 1</i> |
| CFU-GM | unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos |
| CM | control + metformina |
| CMO | contenido mineral óseo |
| CPH | células progenitoras hematopoyéticas |
| dLS | superficie de hueso trabecular con marcación doble de fluorocromos |
| DMEM | medio esencial modificado por Dulbecco |
| DMO | densidad mineral ósea |
| DMT1 | diabetes mellitus tipo 1 |
| DMT2 | diabetes mellitus tipo 2 |
| DPP-4 | dipeptidil peptidasa 4 |
| DRF | dieta rica en fructosa |
| DRFM | dieta rica en fructosa + metformina |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| eNOS | óxido nítrico sintasa endotelial |
| ES/BS | superficie erosionada/superficie de hueso trabecular |
| FAL | fosfatasa alcalina |
| FGF | factor de crecimiento de fibroblastos |
| GLUT | transportador de glucosa |
| H&E | hematoxilina & eosina |
| HDL | lipoproteína de alta densidad |
| HFCS | jarabe de maíz de alta fructosa (<i>high fructose corn syrup</i>) |
| HOMA-IR | <i>homeostatic model assessment of insulin resistance</i> |
| HRP | peroxidasa de rabano |
| IBMX | 3-isobutil-1-metilxantina |
| IGF | factor de crecimiento insulinosimil |
| IL | interleuquina |
| IMC | índice de masa corporal |

| | |
|---------------|---|
| ITAM | <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| LDL | lipoproteína de baja densidad |
| LPR | receptor de lipoproteína |
| MAP | proteína activada por mitógenos |
| MAR | tasa de aposición de mineral |
| MCP-1 | proteína quemotáctica de monocitos 1 |
| M-CSF | factor estimulante de colonias macrofágicas |
| MS/BS | superficie de mineralización/superficie total de hueso |
| MSC | células estromales mesenquimáticas |
| NBF | formalina neutra tamponada |
| NCEP-ATP III | <i>National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel</i> |
| NHANES | <i>National Health and Nutrition Examination Survey</i> |
| NO | óxido nítrico |
| Ob | osteoblasto |
| Ob.S/BS | superficie de osteoblastos/superficie de hueso |
| Oc | osteoclasto |
| Oc.S/BS | superficie de osteoclastos/superficie de hueso |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| OPG | osteoprotegerina |
| OS/BS | superficie de osteoide/superficie de hueso trabecular |
| Ot | osteocito |
| OV/BV | volumen de osteoide/volumen de hueso trabecular |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PBS | buffer fosfato salino |
| pDEXA | absorciometría periférica con rayos X de doble energía |
| PDGF | factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PI-3K | fosfatidilinositol 3-quinasa |
| p-NP | p-nitrofenol |
| PPAR γ | <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i> |
| p-PNP | p-nitrofenilfosfato |
| pQCT | tomografía computada cuantitativa periférica |
| PTH | hormona paratiroidea |
| PVDF | polifluoruro de vinilideno |
| RANK | receptor activador del factor nuclear κ B |
| RANKL | ligando del receptor activador del factor nuclear κ B |
| RER | retículo endoplasmático rugoso |
| ROS | especies reactivas del oxígeno |
| rpm | revoluciones por minuto |
| Runx2 | <i>Runt related transcription factor 2</i> |
| RXR | receptor X de retinoides |
| SDS | dodecilsulfato de sodio |
| SER | <i>sterol response element</i> |
| SFB | suero fetal bovino |
| sLS | superficie de hueso trabecular con marcación simple de fluorocromos |

| | |
|---------------|--|
| SM | Síndrome Metabólico |
| SREBP | proteína de unión al elemento regulador de esteroides |
| Tb.Th | espesor de las trabéculas |
| TG | triglicéridos |
| TGF- β | factor de crecimiento transformante β |
| TNF- α | factor de necrosis tumoral α |
| Tr.N | número de trabéculas |
| Tr.S | separación entre trabéculas |
| TRAP | fosfatasa ácida tartratorresistente (<i>tartrate resistant acid phosphatase</i>) |
| UFAW | Universities Federation for Animal Welfare |
| UV | ultravioleta |
| VEGF | factor de crecimiento endotelial vascular |
| VLDL | lipoproteína de muy baja densidad |

Capítulo I

Introducción

I. 1. Tejido óseo

I. 1. 1. Esqueleto

El esqueleto está formado por huesos, cartílagos, ligamentos y tendones. Los primeros constituyen su parte mineralizada y los otros tres su parte no mineralizada [Llusá, 2006]. Tiene diversas funciones:

- sirve de soporte estructural para el resto del cuerpo ya que a él se unen los tejidos blandos;
- protege estructuras y órganos vitales internos;
- permite el movimiento y la locomoción al unirse a él los músculos esqueléticos;
- contribuye a mantener la homeostasis mineral y el equilibrio ácido base;
- sirve como reservorio de factores de crecimiento y citoquinas;
- provee el microambiente para la hematopoyesis en los espacios donde se aloja la médula ósea roja [Clarke, 2008; Tortora, 2011].

I. 1. 2. Estructura general de los huesos

Los huesos son órganos formados principalmente por tejido óseo aunque también se asocian a él otros tejidos: epitelios, tejido conectivo denso, cartílago, tejido nervioso y tejido adiposo [Tortora, 2011]. Se los puede clasificar, según su geometría, en cuatro categorías: *huesos largos* como el fémur, el húmero y la tibia, *huesos planos* como los huesos del cráneo y la mandíbula, *huesos cortos* como los huesos del carpo y del tarso, y *huesos irregulares* como las vértebras y el sacro [Testut, 1983; Clarke, 2008].

Anatómicamente, los huesos largos (Figura I. 1. 2. 1) pueden describirse formados por una parte media, llamada cuerpo o *diáfisis*, que por lo general es prismática y triangular o irregularmente cilíndrica, y dos extremos más voluminosos denominados *epífisis*. Entre la diáfisis y cada una de las epífisis existe una región dilatada con forma de cono denominada *metáfisis*. Si el hueso está en crecimiento, en esta región existe una capa de cartílago hialino encargada del crecimiento longitudinal del hueso denominada *placa epifisaria* o *cartílago de crecimiento*. Cuando finaliza el período de crecimiento del esqueleto, este cartílago es reemplazado por tejido óseo, dando lugar a la *línea epifisaria*.

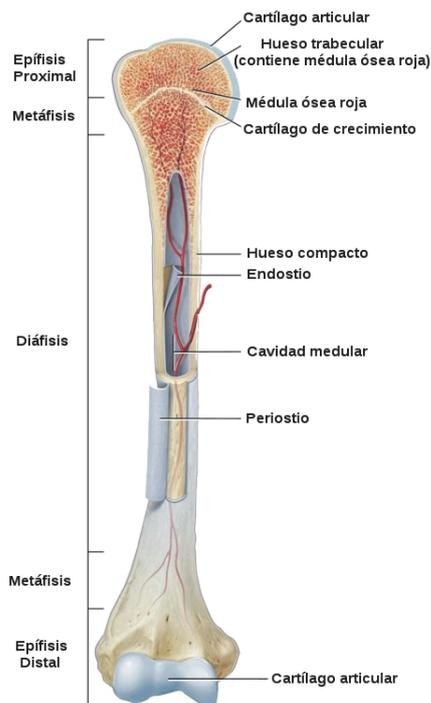


Figura I. 1. 2. 1 – Estructura general de un hueso largo. Adaptado de Tortora, 2011.

Las epífisis presentan en su superficie exterior una o varias regiones lisas que son puntos de articulación con otros huesos y están recubiertas por una fina capa de cartílago articular hialino que reduce la fricción y absorbe parcialmente los impactos en las articulaciones. La superficie externa del hueso está recubierta por una membrana denominada *periostio* con excepción de las zonas revestidas por cartílago articular.

En el interior del hueso existen cavidades: dentro de la diáfisis encontramos un espacio denominado *cavidad medular* y también existen espacios entre las láminas del hueso trabecular (Sección I. 1. 3. A). Todos ellos están revestidos por una membrana denominada *endostio*, y en ellos se aloja la médula ósea.

I. 1. 3. Tejido óseo

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo, siendo su característica saliente el poseer una matriz extracelular mineralizada. Es el principal componente de los huesos y les provee dureza, resistencia y cierta elasticidad [Geneser, 2006].

I. 1. 3. A. Clasificación del tejido óseo

El tejido óseo puede disponerse de dos formas distintas que reciben el nombre de *tejido óseo cortical* o *compacto* y *tejido óseo trabecular* o *esponjoso*. El esqueleto humano está compuesto en un 80% por hueso cortical y en un 20% por hueso trabecular, siendo la proporción de ellos diferente para cada hueso o incluso para distintas regiones dentro de un mismo hueso [Clarke, 2008].

- ✓ **Tejido óseo cortical o compacto:** es una estructura sin espacios apreciables a simple vista. Suele encontrarse en la parte externa de los huesos, por ejemplo formando la mayor parte de la diáfisis de huesos largos, el exterior de huesos planos y la parte más superficial

de las epífisis de huesos largos. Microscópicamente está formado por una serie de unidades cilíndricas con eje mayor paralelo al eje del hueso denominadas *osteonas corticales* o *sistemas de Havers* (Figura I. 1. 3. A. 1). Cada una de ellas posee un conducto central, el *conducto de Havers*, por el que transcurren vasos sanguíneos y nervios. Alrededor de él se disponen *laminillas concéntricas*, compuesta de matriz ósea. Los conductos de Havers se comunican entre sí a través de *conductos de Volkmann* por los que también circulan vasos sanguíneos y nervios. Estos se reconocen por ser perpendiculares a las osteonas y por no estar rodeados por laminillas concéntricas.

En las laminillas existen espacios denominados *lagunas* que alojan células denominadas *osteocitos* (Sección I. 1. 3. B. ii. d). Estas células poseen numerosas prolongaciones que se ubican en pequeños conductos de la matriz denominados *canalículos*. Los canalículos de una laguna se comunican con los de las lagunas vecinas y con conductos de Havers o Volkmann. Este sistema permite el intercambio de sustancias entre los osteocitos y los vasos sanguíneos.

Entre las osteonas hay zonas irregulares de tejido óseo denominadas *laminillas intersticiales*, que corresponden a restos de osteonas degradadas.

Rodeando las superficies externa e interna de la diáfisis de los huesos largos existen también laminillas llamadas *laminillas circunferenciales*.

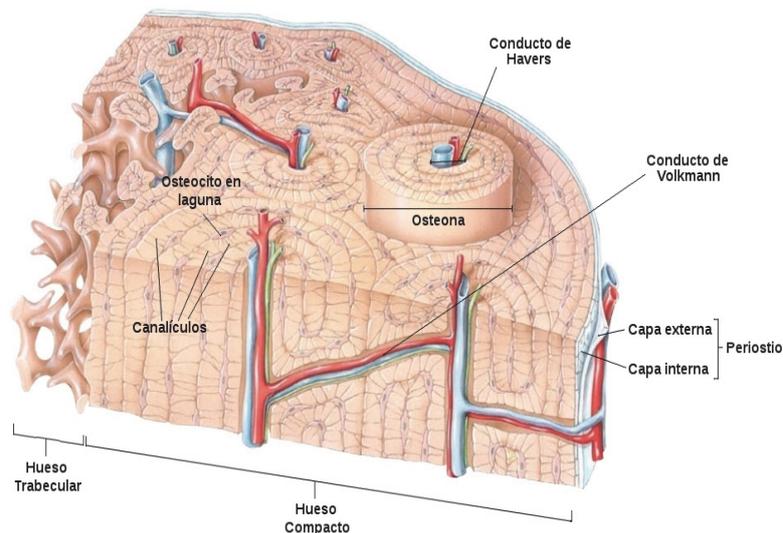


Figura I. 1. 3. A. 1 – Estructura histológica del hueso cortical o compacto [Tortora, 2011].

La tasa de recambio del hueso cortical es baja (2 – 3 % por año), pero es suficiente para mantener la fuerza biomecánica del hueso [Clarke, 2008].

- ✓ **Tejido óseo trabecular o esponjoso:** está formado por finas láminas, las *trabéculas* (trabéculas = pequeños rayos), que se entrecruzan formando un reticulado, y los huecos entre ellas están ocupados por la médula ósea. Siempre se encuentra en el interior del hueso recubierto por tejido óseo compacto, por ejemplo en el interior de huesos planos, cortos o irregulares y en la profundidad de las epífisis de huesos largos. La unidad estructural es la *osteona trabecular*, que tiene forma de disco plano y está formada por una serie de laminillas que transcurren paralelas a la superficie del disco (Figura I. 1. 3. A. 2). En huesos que soportan carga mecánica, como las vértebras, las trabéculas son más gruesas en la dirección de la carga.

La nutrición de los osteocitos se produce por difusión a partir de la superficie cubierta por endostio mediante un sistema de canaliculos comunicantes.

La tasa de recambio del hueso trabecular es mayor que la del cortical, y más que la necesaria para mantener la fuerza mecánica del hueso, indicando que el recambio de este tejido óseo es importante para el mantenimiento de la homeostasis mineral [Clarke, 2008].

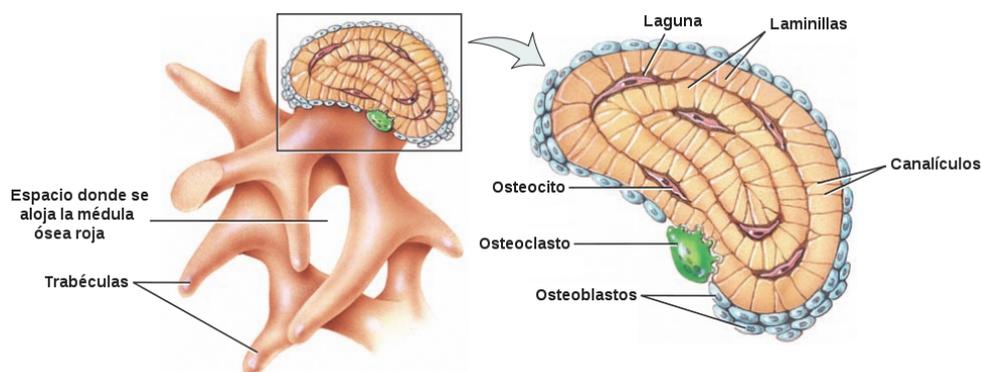


Figura I. 1. 3. A. 2 – Estructura histológica del hueso trabecular o esponjoso [Tortora, 2011].

I. 1. 3. B. Composición del tejido óseo

Como todos los tejidos conectivos, el tejido óseo está formado por células y matriz extracelular.

I. 1. 3. B. i. Matriz extracelular

La matriz ósea extracelular está compuesta por un componente orgánico y sales minerales. El componente mineral provee a los huesos la dureza y la resistencia a la

compresión, mientras que la matriz orgánica es la encargada de la flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tracción [Geneser, 2006; Clarke, 2008].

La matriz orgánica representa un 20 a 40% del hueso y se compone principalmente de fibras de colágeno incluidas en una sustancia fundamental. Las fibras de colágeno se componen de colágeno tipo I (90%), cantidades pequeñas de colágeno tipo V, y trazas de colágeno tipo XI y XIII. La sustancia fundamental posee proteoglicanos, en especial compuestos por condroitinsulfato, hialuronano y queratínsulfato, y otras proteínas no colágenas. Existen proteínas exógenas, como la albúmina sérica, la α_2 -SH-glicoproteína y factores de crecimiento, como los factores de crecimiento insulinosímiles (IGFs) y las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), implicados en los diferentes procesos que ocurren en el hueso (mineralización, actividad y proliferación celular, etc.). Otras proteínas sintetizadas por los osteoblastos pueden agruparse en varias categorías: *proteínas glicosiladas*, como la fosfatasa alcalina y la osteonectina, *proteínas γ -carboxiladas*, dependientes de la vitamina K como la osteocalcina, y *glicoproteínas adhesivas*, como la osteopontina y la sialoproteína ósea [Clarke, 2008].

El componente inorgánico representa del 50 al 70% del tejido óseo. Está formado principalmente por fosfato de calcio cristalino, con cristales casi idénticos a los del mineral hidroxiapatita, de fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Estos cristales poseen forma de varas finas y se disponen en forma paralela, en íntima relación con las fibras de colágeno [Geneser, 2006]. Además, hay una pequeña proporción de fosfato de calcio amorfo y también existen otros iones diferentes, como magnesio, potasio, sodio, carbonato y citrato, posiblemente adsorbidos. Metales como el estroncio, el plomo y otros metales pesados, pueden adsorberse o incorporarse en los cristales de hidroxiapatita [Geneser, 2006].

I. 1. 3. B. ii. Células

En esta sección se describirán cinco tipos de células presentes en el tejido óseo: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células de revestimiento, y un tipo celular presente en la médula ósea, las células estromales mesenquimáticas (Figura I. 1. 3. B. 1).

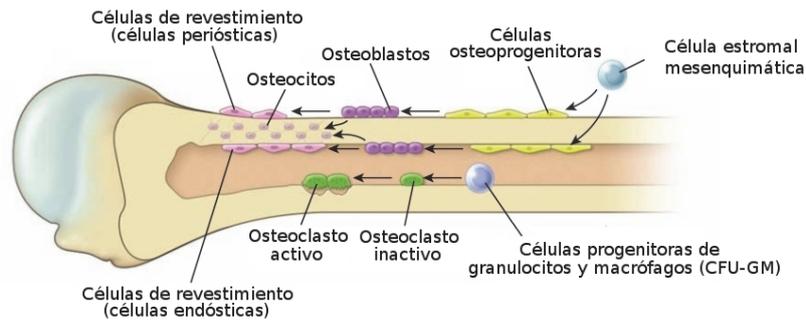


Figura I. 1. 3. B. 1 – Células del tejido óseo [Ross, 2007].

a. Células estromales mesenquimáticas

Existe un grupo de células indiferenciadas que posee un potencial proliferativo elevado, que tiene la capacidad de formar células idénticas a sí mismas (autorrenovación) y de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones específicas en el organismo (pluripotencialidad). Estas son las células progenitoras [Flores-Figueroa, 2006].

El oocito fertilizado es la célula con mayor potencialidad y es capaz de formar todas las células del embrión así como de la placenta, es decir, es totipotencial. Las células progenitoras embrionarias pueden diferenciarse a casi todos los tipos celulares que se generan de las tres capas del embrión. Las *células estromales mesenquimáticas* (MSC, siglas del inglés *mesenchymal stromal cells*) son células que derivan de tejidos mesenquimáticos (médula ósea, tejido adiposo), que son multipotentes y que pueden diferenciarse a varios tipos celulares como osteoblastos, adipocitos o condrocitos dependiendo del microentorno en el que se encuentren [Spencer, 2011].

En la médula ósea encontramos, además de las células estromales mesenquimáticas, a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH).

Los factores involucrados en la diferenciación selectiva de las células estromales mesenquimáticas hacia el fenotipo osteoblástico y adipogénico serán tratados en la Sección I. 1. 4.

b. Células osteoprogenitoras

Se originan por diferenciación de células estromales mesenquimáticas. Aparecen en el tejido mesenquimático fetal cerca de los centros de osificación, en el endostio y en el periostio profundo después del parto. Son morfológicamente parecidos a los fibroblastos. En la vida fetal y en la etapa de crecimiento, estas células se dividen y se diferencian a osteoblastos. En la edad adulta se las puede ver relacionadas con la reparación de fracturas [Geneser, 2006].

c. Osteoblastos

Los osteoblastos (Ob) son las células formadoras de hueso. Se originan a partir de células osteoprogenitoras que se diferencian a pre-osteoblastos para luego convertirse en osteoblastos maduros. Se encargan de secretar proteínas de la matriz extracelular ósea (osteocalcina, osteonectina, sialoproteína ósea, osteopontina) y están involucrados en el proceso de mineralización ya que producen fosfatasa alcalina. También regulan la osteoclastogénesis mediante contacto celular directo y mediante la secreción de citoquinas [Neve, 2011].

Se observan en las regiones donde se está sintetizando nueva matriz como una única capa de células cúbicas, con citoplasma bien basófilo debido a la presencia de abundante retículo endoplasmático rugoso, con el núcleo en la parte opuesta a la que corresponde a la síntesis. También poseen un aparato de Golgi bien desarrollado. Tienen prolongaciones que los comunican con los osteocitos vecinos [Ross, 2007].

Un osteoblasto puede seguir tres caminos: convertirse en un osteocito, en una célula de revestimiento o sufrir una muerte celular programada [Clarke, 2008].

d. Osteocitos

Los osteocitos (Ot) son las células que se encuentran dispuestas regularmente a lo largo de la matriz ósea. Derivan de los osteoblastos, luego de que quedan totalmente rodeados por osteoide o por matriz mineralizada, y representan aproximadamente el 90% de las células del hueso [Bellido, 2013]. Poseen vida media más larga que los osteoblastos, que viven semanas, y que los osteoclastos, que viven días [Hekimsoy, 2008].

Cada osteocito se encuentra ubicado en una laguna dentro de la matriz que se adapta a la forma de la célula. Son más pequeños que los osteoblastos por la menor cantidad de citoplasma que poseen. Tienen numerosas prolongaciones citoplasmáticas que se alojan en canalículos de la matriz a través de las cuales entran en contacto con osteocitos vecinos o células de las superficies. También se comunican en forma indirecta mediante distintas moléculas señal con osteoblastos, pericitos de vasos sanguíneos y otras células óseas distantes [Ross, 2007].

Los osteocitos no expresan fosfatasa alcalina, pero expresan osteocalcina, galectina 3 y CD44, un receptor para hialuronato que sirve para la adhesión celular [Clarke, 2008].

En la antigüedad se pensaba que los osteocitos eran células inactivas, pero hoy se sabe que son metabólicamente activas y multifuncionales. Las funciones que se les han asociado son [Hekimsoy, 2008]:

- **Sensor mecánico:** la carga mecánica que recibe el esqueleto regula la actividad de osteoblastos y osteoclastos. La posición que los osteocitos ocupan en la matriz sería la adecuada para registrar la presencia o ausencia de cargas mecánicas y transformarlas en señales bioquímicas para enviar a las células de la superficie ósea. El mecanismo propuesto para explicar este fenómeno es que la carga mecánica produciría un flujo de líquido intersticial entre la pared de los canalículos y la membrana de la célula y esto generaría una presión tangencial (*shear stress*) del fluido que deformaría el cuerpo de la célula en la laguna, las prolongaciones en los canalículos y los cilios presentes en la célula. La carga/descarga *in vivo* produce variaciones en la expresión de genes de osteocitos [Bonewald, 2011]. Una carga normal del esqueleto, provoca que los osteocitos envíen señales que inhiben la actividad de osteoclastos como óxido nítrico, prostaglandina E2, IGF, ATP y elevación del Ca^{2+} intracelular. También se activa la vía de la β -catenina. Cuando existe falta de carga, por ejemplo por inmovilización, hay señales para activar la resorción ósea: RANKL y M-CSF que promueven la formación de nuevos osteoclastos, y esclerostina que inhibe la actividad de osteoblastos.
- **Modificación de su matriz pericelular:** se ha descrito que los osteocitos son capaces de formar nueva matriz en la región confinada a su laguna o de remover la matriz presente en esta región, al menos en un grado limitado [Bonewald, 2011]. Este último fenómeno ha sido denominado *osteólisis osteocítica* y puede ser inducido por la hormona paratiroidea (PTH) o por una dieta con bajo contenido de calcio, dando lugar a un aumento de la concentración sérica de este ión.
- **Regulación del metabolismo mineral:** la esclerostina es un antagonista de un regulador positivo de la masa ósea, el receptor de lipoproteína 5 (LPR5), por lo que inhibe la actividad de los osteoblastos. Otras moléculas pueden regular la reabsorción de fosfatos en el riñón, por lo que se ha propuesto un carácter de estructura endócrina al sistema de lagunas y canalículos [Bonewald, 2011].

Los osteocitos pueden morir por senescencia, degeneración/necrosis, apoptosis o ser fagocitados por osteoclastos. La apoptosis puede ser ocasionada por inmovilización, microlesiones en el hueso, falta de estrógenos, o elevación de los niveles de ciertas citoquinas (como el $\text{TNF-}\alpha$). Los osteocitos dañados liberan RANKL y M-CSF, activando la formación de osteoclastos [Hekimsoy, 2008].

e. Osteoclastos

Los osteoclastos (Oc) son las células encargadas de la degradación (resorción) del

hueso y suelen encontrarse directamente sobre la superficie que está sufriendo este proceso.

Son células grandes (hasta 100 μm de diámetro) que por lo general tienen de 5 a 10 núcleos por célula, aunque puede haber hasta 50. Poseen un citoplasma bien acidófilo ya que están provistos de numerosas mitocondrias [Geneser, 2006]. Producen la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).

Su origen es distinto al del resto de las células del tejido óseo. A partir de las células madre de granulocitos y macrófagos (CFU-GM), alojadas en la médula ósea, se diferencian las células progenitoras de osteoclastos, que llegan al tejido óseo por el torrente sanguíneo o por migración directa, donde se ubican, proliferan y diferencian a pre-osteoclastos. Estas últimas células aún son mononucleares y se fusionan para formar osteoclastos maduros [Geneser, 2006].

Existe una serie de moléculas que se expresan en la membrana plasmática de los osteoblastos, que se unen a moléculas expresadas en la membrana de los precursores osteoclásticos, necesitando un contacto directo entre estas células para que se produzca la osteoclastogénesis (Figura I. 1. 3. B. 2). La primera molécula involucrada es el RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANK). RANKL es expresado en la membrana de los osteoblastos, e interactúa con el RANK expresado en la membrana de los precursores osteoclásticos [Ross, 2007]. El RANKL es miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y también tiene como blanco los osteoclastos maduros, estimulando su actividad resorptiva [Novack & Teitelbaum, 2008].

El segundo factor expresado por osteoblastos es el factor estimulante de colonias macrófagicas, M-CSF, una citoquina que promueve la proliferación y supervivencia de los precursores osteoclásticos. Este se une al receptor con actividad tirosinquinasa c-Fms expresado en la membrana de los pre-osteoclastos [Novack & Teitelbaum, 2008]. El M-CSF es producido por varias células, en particular el endotelio, pero en este contexto, la producción por parte de células del linaje osteoblástico es la más importante.

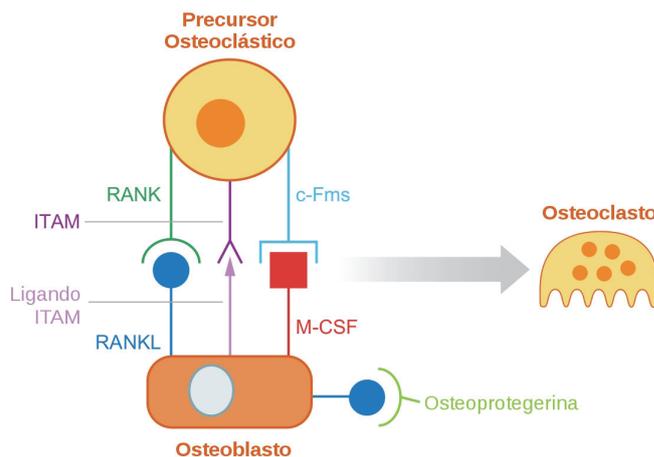


Figura I. 1. 3. B. 2 – Factores necesarios para la diferenciación osteoclástica [Novack & Teitelbaum, 2008].

El $\text{TNF-}\alpha$, elevado en situaciones inflamatorias, es capaz de actuar en forma sinérgica con el RANKL y estimular también la expresión de M-CSF [Novack & Teitelbaum, 2008].

Además de las moléculas nombradas, también existe coestimulación al interactuar receptores ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) expresados en la membrana de precursores osteoclásticos y sus

ligandos expresados en los osteoblastos [Novack & Teitelbaum, 2008].

La osteoprotegerina (OPG) es una proteína secretada por los osteoblastos y que se une a RANKL con alta afinidad impidiendo su unión a RANK y, por lo tanto, inhibiendo su acción [Clarke, 2008]. Su producción está influenciada por numerosos factores como interleuquina-1, TNF, $\text{TGF-}\beta$, vitamina D y prostaglandina E_2 [Ross, 2007].

El proceso de resorción implica que los osteoclastos se polaricen formando un borde festoneado hacia la superficie mineralizada, a la cual se adhieren. Se produce el sellado de una región, la *laguna de resorción*, mediante moléculas de adhesión célula-matriz que forman una zónula alrededor de la porción de tejido a resorber. Se liberan activamente H^+ que acidifican el medio y desmineralizan la matriz, y proteinasas que se encargan de degradar el componente orgánico de la matriz. Los componentes degradados son endocitados y liberados en vesículas por la membrana basolateral de los osteoclastos. Por último, la célula puede morir por apoptosis o volver a la forma no resorptiva. La superficie librada de células y componentes de matriz queda lista para la acción de los osteoblastos [Novack & Teitelbaum, 2008; Schindeler, 2008].

f. Células de revestimiento

Las células de revestimiento óseo provienen de osteoblastos que luego de la etapa de formación de hueso no formaron un osteocito ni sufrieron apoptosis, sino que redujeron su citoplasma y maquinaria de organelas convirtiéndose en células quiescentes [Teti, 2011].

Revisten las superficies externas e internas del hueso en las que no hay actividad de osteoblastos ni osteoclastos, es decir, en las zonas donde no se está llevando a cabo

remodelado óseo. Las que se ubican en las superficies externas se denominan *células periósticas*, y las que recubren las superficies internas se denominan *células endósticas*. Se evidencian como un epitelio plano simple sobre una capa delgada de matriz ósea no mineralizada [Geneser, 2006; Ross, 2007].

Poseen prolongaciones citoplasmáticas que se extienden dentro de la matriz contigua y se comunican con las prolongaciones de los osteocitos. Por eso se cree que intervienen en el mantenimiento y la nutrición de los osteocitos y que regulan el movimiento de calcio y fosfato desde la sangre hacia el hueso y viceversa [Ross, 2007].

I. 1. 3. C. Proceso de mineralización de la matriz ósea

Se conoce como *mineralización* o *calcificación* al depósito de minerales en la matriz orgánica del tejido óseo y del cartílago. La matriz ósea no mineralizada recibe el nombre de *osteóide*. En el hueso recién formado se deposita, al cabo de 3 ó 4 días aproximadamente, el 80% del mineral (*mineralización primaria*) mientras que la mineralización completa tiene lugar al cabo de los siguientes 3 ó 4 meses (*mineralización secundaria*) en los que los cristales de hidroxiapatita crecen en tamaño y reducen sus niveles de impurezas [Geneser, 2006; Clarke, 2008].

El mecanismo por el cual se produce la mineralización no es conocido aún con exactitud. En un inicio, el mineral sería depositado en “huecos” ubicados en los extremos de las fibras de colágeno. Para que se produzca el depósito de mineral, los niveles de calcio y fosfato deben superar un nivel umbral. Ciertas proteínas de la matriz, como la osteocalcina y la sialoproteína ósea, podrían secuestrar iones y así aumentar las concentraciones locales de calcio y fósforo. La fosfatasa alcalina producida por los osteoblastos también estaría implicada en regular el proceso de mineralización aumentando la concentración local de fósforo [Clarke, 2008].

En estas condiciones de concentraciones elevadas de estos iones, los osteoblastos producen unas *vesículas matriciales*, que sirven como microambientes en los que las concentraciones de calcio y fosfato pueden aumentar lo suficiente para precipitar y formar cristales [Ross, 2007]. Si bien ha sido propuesto que un depósito de fosfato de calcio amorfo precede a la formación de hidroxiapatita, no existe evidencia de esto [Clarke, 2008].

Si bien las vesículas no son dirigidas a los extremos de las fibrillas, allí se produce la precipitación.

I. 1. 3. D. Modelado y Remodelado Óseo

La *osificación* es el proceso por el cual se forma tejido óseo, y puede desarrollarse de dos formas. La *osificación intramembranosa* se produce en el tejido mesenquimático primitivo del feto en el que células mesenquimáticas se diferencian a osteoblastos, que pueden comenzar a secretar matriz. Los huesos que se originan por este mecanismo son los huesos planos del cráneo y parte de la mandíbula y clavícula. La *osificación endocondral* ocurre a partir de un molde de cartilago hialino embrionario. Este proceso ocurre en los demás huesos del cuerpo [Geneser, 2006].

Durante la vida los huesos crecen en largo y en ancho y además sufren los procesos de modelado y remodelado.

El *modelado* es el proceso por el cual los huesos cambian su forma, y permite que el esqueleto se adapte gradualmente a cambios fisiológicos o a fuerzas mecánicas [Clarke, 2008]. Se produce durante todo el período de desarrollo en paralelo con el crecimiento longitudinal de los huesos y es menos frecuente en los adultos. Se produce resorción del hueso en algunas regiones y formación en otras, y se caracteriza porque las funciones de osteoblastos y osteoclastos no están acopladas sino que son independientes entre sí [Geneser, 2006; Clarke, 2008]. En el período de crecimiento predomina la formación y esto lleva a que la masa ósea crezca continuamente, alcanzando un valor máximo a los 20 – 25 años (“masa ósea pico”), momento en el que el esqueleto adquiere su tamaño y forma definitivos [Geneser, 2006].

El *remodelado* es un proceso por el cual se reemplaza tejido óseo ya formado por tejido nuevo, y por el cual se mantiene la fuerza del hueso y la homeostasis mineral. Ocurre desde antes del nacimiento hasta la muerte y, por lo tanto, coexiste con el modelado en la etapa de crecimiento [Clarke, 2008]. Se caracteriza por que existe una actividad acoplada de osteoblastos y osteoclastos, que trabajan en conjunto formando una unidad remodeladora ósea (BRU).

El ciclo de remodelado se compone de cinco etapas secuenciales (Figura I. 1. 3. D):

1. **Activación:** consiste en el reclutamiento de los precursores osteoclasticos de la circulación, desprendimiento de las células de revestimiento del endostio y fusión de los precursores para formar osteoclastos maduros [Clarke, 2008]. Las señales que determinan las regiones en las que se inicia un ciclo de remodelado podrían estar dadas por la apoptosis de osteocitos en las zonas cercanas a microdaños [Henriksen, 2009] o ser en lugares aleatorios.
2. **Resorción:** los osteoclastos resorben el hueso, formando un “cono de corte” que se desplaza degradando una porción cilíndrica [Geneser, 2006]. La formación, activación y resorción de los

osteoclastos están reguladas por la relación RANKL/OPG, IL-1, IL-6, M-CSF, PTH, 1,25-dihidroxi vitamina D y calcitonina [Clarke, 2008].

3. Inversión: se produce la transición de la resorción a la formación. No se conocen los mecanismos subyacentes. La formación de hueso nuevo se produce solamente en las lagunas de resorción que han sido removidas de restos de colágeno, siendo esto último realizado por células de revestimiento óseo. Existirían señales entre osteoclastos y células de revestimiento mediadas por moléculas de la familia *ephrin* que iniciarían la diferenciación osteoblástica en esta fase [Henriksen, 2009].
4. Formación: los osteoblastos sintetizan nueva matriz orgánica y regulan su mineralización. Las señales implicadas en el inicio de esta etapa serían factores parácrinos secretados por los osteoclastos o moléculas liberadas durante la resorción reconocidos por los osteoblastos, como el TGF- β e IGF-1 [Henriksen, 2009].
5. Terminación: no se conocen aún los mecanismos involucrados en esta etapa, pero sería importante la producción de esclerostina por los osteocitos inmersos en la matriz mineralizada. Esta molécula estaría implicada en la regulación del balance entre osteoblastos formadores de nuevo hueso y células de revestimiento [Henriksen, 2009].

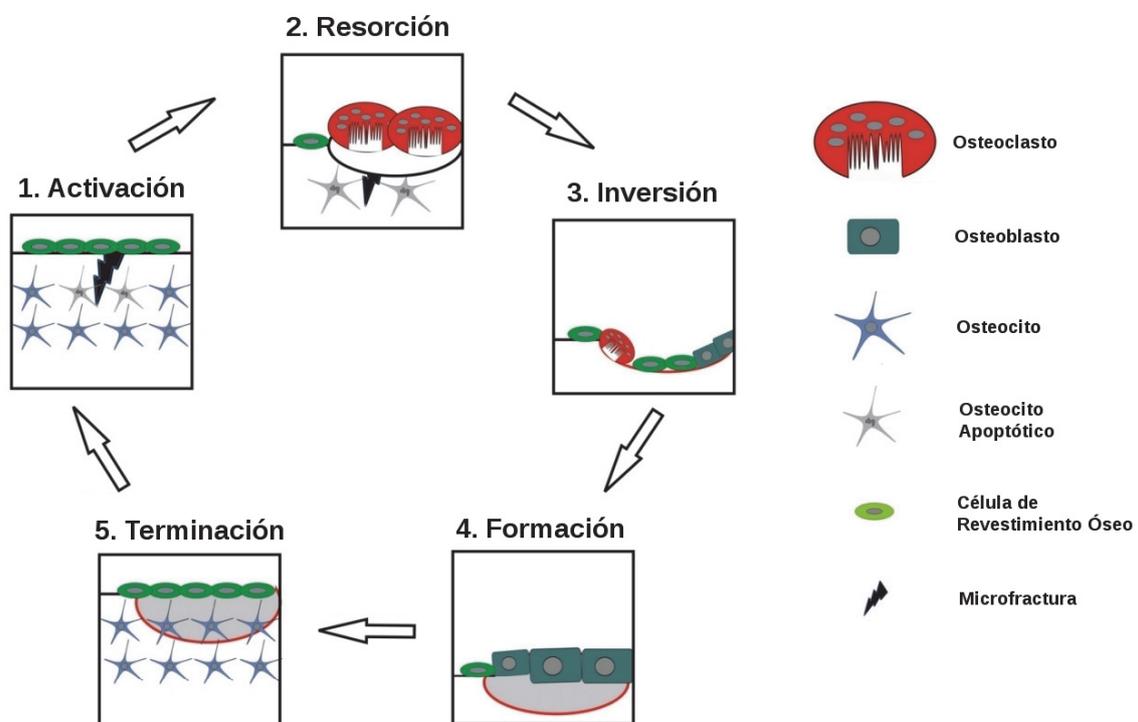


Figura I. 1. 3. D – Etapas del remodelado óseo (Adaptado de Henriksen, 2009).

I. 1. 4. Diferenciación de células estromales mesenquimáticas hacia el fenotipo osteoblástico y adipocítico

Como ya se mencionó anteriormente, las células estromales mesenquimáticas (MSC) presentes en la médula ósea son capaces de diferenciarse hacia distintos tipos celulares como osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Las condiciones en el microambiente al que se enfrentan determinarán la expresión de distintos genes que las comprometerán hacia algún tipo celular en particular.

La osteoblastogénesis implica que las MSC se diferencien a células osteoprogenitoras, que éstas se diferencien a pre-osteoblastos, y que estos últimos se conviertan en osteoblastos maduros. Estos procesos requieren principalmente de la expresión del factor de transcripción Runx2 (*Runt related transcription factor 2*) aunque otros factores como Osterix, también son necesarios [James, 2013].

El Runx2, también conocido como Cbfa1 (*core-binding factor alpha 1*) es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas con dominio de homología de runt. Se expresa en células del linaje osteoblástico, condrocitos hipertróficos, odontoblastos y ameloblastos. Es esencial para la diferenciación de osteoblastos, para la producción de matriz y para la mineralización ósea, ya que controla la expresión de genes que codifican para proteínas específicas del hueso como colágeno tipo 1, osteocalcina, osteopontina y sialoproteína ósea. No es esencial para mantener la expresión de los genes de la mayoría de las proteínas de la matriz en osteoblastos maduros, y debe ser suprimido para formar hueso maduro (Figura I. 1. 5) [Liu & Lee, 2013].



Figura I. 1. 5 – Rol del factor de transcripción Runx2 en la diferenciación del linaje osteoblástico (Adaptado de Liu & Lee, 2013).

La adipogénesis implica una serie de procesos que inicialmente compromete a las MSC hacia pre-adipocitos, que luego se diferencian a adipocitos, adquiriendo funciones como la síntesis y depósito de lípidos. Estos eventos implican múltiples cascadas de señales que finalmente convergen para activar el factor de transcripción PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) [James, 2013].

Los PPAR son proteínas miembros de la superfamilia de receptores nucleares asociados a factores de transcripción inducidos por ligandos. En mamíferos existen tres tipos de PPAR: PPAR α , PPAR β y PPAR γ . Estas moléculas se unen, como heterodímeros junto con el receptor X de retinoides (RXR), a elementos regulatorios y controlan la expresión de genes involucrados en la adipogénesis, el metabolismo lipídico, la inflamación y la homeostasis [Ahmadian, 2013].

Existen varios estudios *in vitro* que sugieren que existe una relación inversa entre osteoblastogénesis y adipogénesis. En ellos, la presencia de sustancias en el medio promueve la expresión de factores osteoblastogénicos y la inhibición de factores adipogénicos o viceversa. Existen vías de señalización que tienen acción proosteogénica/antiadipogénica como la vía de Wnt dependiente de β -catenina y la vía *Hedgehog*, aunque hay otras que tienen acción positiva tanto sobre la osteoblastogénesis como la adipogénesis, como las BMPs y los IGFs.

Por lo tanto, el microambiente presente en la médula ósea es determinante en el balance entre la formación ósea mediada por osteoblastos y la adipogénesis de la médula ósea. Muchos factores como tratamientos farmacológicos, dietas o condiciones metabólicas, pueden alterar este balance modificando la relación osteoblastos/adipocitos en la médula ósea [Nuttall, 2004].

I. 1. 5. Reparación de lesiones óseas

La reparación de una fractura es un proceso particular ya que se producen eventos en la vida postnatal que se asemejan a varios que tienen lugar en el embrión durante el desarrollo del esqueleto [Hilton, 2014]. El proceso implica la actividad en conjunto de células, matriz extracelular y factores de crecimiento.

En base a observaciones histológicas se ha elaborado un modelo dividido en cuatro etapas (Figura I. 1. 6, A), aunque esta división es simplemente con fines de la comprensión del proceso ya que las fases se superponen considerablemente. Las etapas propuestas son [Schindeler, 2008]:

1. *Inflamación*: al producirse una fractura, se altera la integridad de los tejidos blandos, se dañan los vasos sanguíneos presentes en él y también la arquitectura de la médula ósea, por lo que se activan mecanismos de reparación de lesiones inespecíficos. La sangre se extravasa y queda contenida en los tejidos circundantes generando un hematoma el cual es invadido por plaquetas, macrófagos, granulocitos, linfocitos y monocitos. Estas células serán las encargadas de combatir posibles infecciones y de secretar citoquinas y factores de crecimiento (TGF- β , PDGF, FGF-2, VEGF, M-CSF, IL-1, IL-6, BMPs, TNF- α) que coordinan las

respuestas celulares. Los restos de células y de matriz extracelular son eliminados por las células fagocíticas. Los factores mencionados reclutarán más células inflamatorias (retroalimentación positiva) y facilitarán la llegada de MSCs multipotentes, provenientes del periostio, de la médula ósea, de la circulación o de tejidos adyacentes, a la zona.

2. *Formación de callo blando*: en las fracturas que poseen cierto grado de inestabilidad, como por ejemplo una fractura de algún hueso largo de los miembros, los condrocitos y los fibroblastos son los encargados de producir un *callo blando* semirrígido que provee soporte mecánico y sirve de molde para el callo duro que se formará posteriormente (mecanismo de osificación endocondral). La proliferación de estas células se debe a la expresión coordinada de factores de crecimiento que incluyen TGF- β 2, TGF- β 3, PDGF, FGF-1, IGF, y BMP-2, -4, -5 y -6. Los condrocitos comienzan a formar pequeñas placas de cartílago, que crecen y se fusionan unas con otras generando el callo que une todos los fragmentos óseos, reemplazando todo el tejido conectivo inicial. Si alguna zona queda sin cartílago, los fibroblastos producen tejido conectivo denso en ellas. En los últimos momentos de la formación del callo, los condrocitos se hipertrofian y mineralizan la matriz para luego morir por apoptosis. La etapa inicial del callo es avascular, pero después se reemplaza por hueso inmaduro que conlleva invasión vascular. La angiogénesis está dada por ciertos factores proangiogénicos, algunos de los cuales dependen de la expresión del gen *Cbfa1/Runx2* típico de la diferenciación osteoblástica que no se expresa en las etapas iniciales en el tejido inflamatorio.
3. *Formación de callo duro*: también se conoce como *formación ósea primaria* y en esta etapa se forma matriz ósea mineralizada en áreas estables del callo inicial. El callo blando es removido gradualmente y se produce revascularización. Células osteoprogenitoras se diferencian a osteoblastos maduros por la presencia de factores osteogénicos, siendo la familia de las BMPs los más importantes. La existencia de vasos sanguíneos aumenta la presión local de oxígeno, también necesario para la diferenciación osteoblástica. El hueso inmaduro inicial posee proteínas y mineral, pero es irregular y no ha sido remodelado. La fuente de células osteoprogenitoras es variada, y pueden provenir del periostio, de la médula ósea, de la circulación, de los vasos sanguíneos o de tejidos locales.
4. *Remodelación ósea*: también se conoce como *formación ósea secundaria* y consiste en la remodelación del callo duro para recuperar la configuración de hueso cortical o trabecular que existía antes de la fractura. El proceso implica la actividad coordinada de osteoclastos y osteoblastos, como se describió en la Sección I. 1. 3. D. Hay otros factores de crecimiento y citoquinas presentes en la zona de la fractura que promueven la osteoclastogénesis:

interleuquinas, TNF- α , BMPs y TGF- β . También continúa en esta etapa la neovascularización del tejido.

En fracturas de huesos con alta estabilidad mecánica y que no soportan un peso importante (por ejemplo los huesos del cráneo), predomina la formación por osificación intramembranosa de un callo duro sin la presencia de un callo blando cartilaginoso previo (etapa 2). Esto también ocurre en el crecimiento por aposición del hueso, donde el tejido óseo se forma directamente adyacente a una superficie mineral preexistente.

Como ya se mencionó, existe una superposición importante en las etapas de este modelo, e incluso varios procesos fundamentales como la proliferación celular, diferenciación o síntesis de la matriz, no están limitados a una sola fase. Es por eso que se ha planteado otro modelo, el **modelo anabólico/catabólico**, en el cual se postula que la reparación de una fractura será el resultado del balance de las respuestas anabólicas y catabólicas. Como se mencionó anteriormente, algunos procesos que ocurren en la reparación de fracturas no son específicos del hueso, y se los ha denominado anabolismo y catabolismo no específicos. Los procesos que sí son propios del tejido óseo han sido denominados anabolismo y catabolismo específicos. La distribución de los distintos procesos se esquematiza en la Figura I. 1. 6, B. Schindeler y colaboradores proponen que la velocidad de la reparación de una lesión ósea se debe a los procesos no específicos y la fuerza de la reparación se debe a los específicos del hueso.

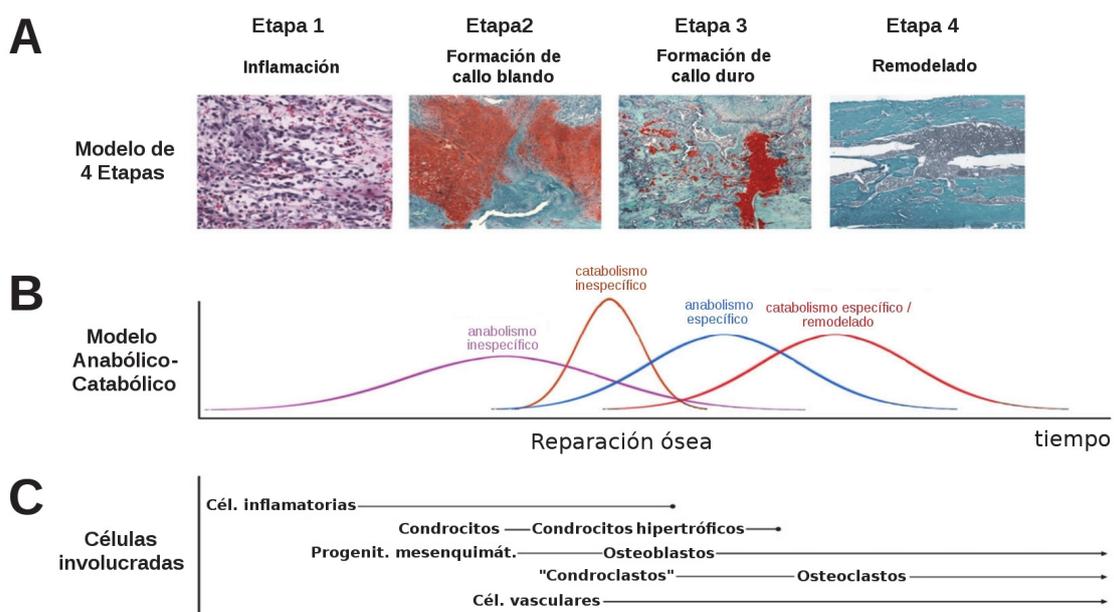


Figura I. 1. 6 – Reparación de fracturas. (A) Modelo de reparación en cuatro etapas. (B) Modelo anabólico / catabólico de reparación. (C) Poblaciones celulares involucradas en los distintos momentos del proceso [Schindeler, 2008].

I. 1. 6. Técnicas para la evaluación de la microarquitectura y masa ósea en modelos animales

I. 1. 6. A. Técnicas histológicas

Han sido el estándar en el análisis de la arquitectura del hueso trabecular y cortical. Proveen información del estado de las células del hueso y pueden utilizarse para evaluar índices dinámicos del proceso de remodelación ósea. En cuanto a la información de la microarquitectura, los parámetros estructurales se calculan realizando análisis estereológicos [Rosen, 2008].

Para el análisis histológico del hueso, pueden utilizarse muestras calcificadas o descalcificadas. En el primer caso, las muestras se incluyen en resinas (metilmetacrilato, glicolmetacrilato, por ejemplo) que solidifican, y luego se realizan las secciones con micrótomos provistos de una cuchilla de carburo de tungsteno dada la dureza del tejido. En el caso de muestras descalcificadas, inicialmente se utilizan agentes quelantes (EDTA, el más utilizado) o soluciones acuosas de ácidos fuertes (HCl, HNO₃) o débiles (ácido fórmico) para remover el mineral de la matriz ósea. Luego se las incluye en parafina y se realizan secciones con micrótomos convencionales.

Las secciones son posteriormente utilizadas para tinciones de rutina y análisis histomorfométrico: Hematoxilina & Eosina, Fosfatasa ácida tartrato resistente, Azul Alcán, von Kossa con Tetrachrome como contracolorante, etc.

Utilización de fluorocromos para determinación de superficies de mineralización activa

Los fluorocromos que se utilizan para realizar marcaciones en el hueso son sustancias que poseen la capacidad de quelar Ca²⁺. Como también son capaces de emitir fluorescencia al ser excitados con luz UV, se pueden observar los nuevos sitios de mineralización en los preparados histológicos.

Luego de la administración, oral o parenteral, los compuestos ingresan al torrente sanguíneo y se unen específicamente e irreversiblemente al frente de mineralización de las superficies de huesos (o dientes) que están en proceso de mineralización. Se cree que la razón por la cual esta quelación es específica de superficies nuevas y no de sitios viejos de mineralización en el tejido óseo, dentina, esmalte y el cemento podría ser el menor tamaño de los cristales de apatita durante las etapas iniciales de este proceso [An, 2003].

Entre los compuestos más utilizados para estos estudios encontramos las tetraciclinas,

las fluoresceínas y las alizarinas. Entre las tetraciclinas, las más utilizadas son la demeclociclina, la clortetraciclina y la oxitetraciclina, y entre las fluoresceínas, la calceína y la calceína azul. Utilizando fluorocromos con distintos colores puede verse la incorporación de las diferentes marcas en el tiempo.

Debido a que estas sustancias se unen a los tejidos mencionados como complejos de calcio, es un requisito que estos estudios se realicen en muestras sin descalcificar. La descalcificación produce una pérdida total o casi total de los fluorocromos [An, 2003].

I. 1. 6. B. Técnicas con imágenes

Las técnicas que utilizan imágenes son útiles para estudiar los efectos sobre el esqueleto de diversos procesos como el envejecimiento, patologías o cambios registrados por terapias génicas, farmacológicas, alimenticias o mecánicas. Entre las más utilizadas se encuentran las siguientes:

Radiografías: Un haz de rayos X transilumina a la muestra y dependiendo de la densidad de los tejidos se obtendrán regiones más claras u oscura en la placa reveladora colocada detrás. En las zonas donde los rayos X alcanzan la placa, se obtendrán zonas oscuras. Tejidos densos, como el hueso compacto, absorben más radiación que otros menos densos como el hueso trabecular o tejidos blandos, dando zonas blancas en el revelado. Las sustancias densas se denominan *radiopacas* y las de menos densidad *radiotransparentes*. Las radiografías pueden utilizarse para evaluar aspectos groseros de la morfología esquelética. Tienen la ventaja de ser rápidas y baratas, aunque se limitan a evaluaciones cualitativas en dos dimensiones.

Absorciometría periférica con rayos X de doble energía (pDEXA): Utiliza una fuente compacta de rayos X para exponer la muestra a dos rayos X con diferentes niveles de energía. Esto permite diferenciar el hueso de los tejidos blandos. Se usa para medir el contenido mineral óseo (CMO), la densidad mineral ósea (DMO) y el porcentaje de grasa y tejido magro. Se obtienen medidas reproducibles de la masa ósea y de la composición corporal. Las desventajas que posee son la poca resolución espacial que tiene, que mide DMO por unidad de área en vez de por unidad de volumen y que no puede distinguir hueso cortical de trabecular.

Tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT): Se utiliza un haz de rayos X que rota en un plano alrededor de la muestra, y los detectores se ubican en el extremo opuesto

de la fuente. En cada una de las posiciones se hacen registros (que varían según la cantidad de hueso, agua, grasa, etc. que exista), que pueden integrarse para formar imágenes del elemento de volumen analizado. Se utiliza para la determinación *in vivo* o *ex vivo* de la geometría ósea tridimensional, CMO y DMO volumétrica. La resolución que poseen los equipos comerciales no permite tener una visión detallada de la arquitectura trabecular, pero han sido ampliamente utilizados en ratas para monitorear cambios en la geometría del hueso cortical y la DMO del hueso cortical y trabecular luego de tratamientos farmacológicos o mecánicos o para monitorear una fractura. Además, los valores de momento de inercia transversal que pueden medirse pueden utilizarse para estimar la fuerza de huesos largos [Rosen, 2008].

Tomografía microcomputarizada (μ CT): Se ha convertido en el estándar de oro para evaluar *ex vivo* la morfología y microarquitectura de muestras de animales de experimentación. Utiliza múltiples rayos X que inciden a distintos ángulos para reconstruir una representación tridimensional de la muestra. Posee una resolución mucho mayor que la pQCT, por lo que permite calcular parámetros del hueso trabecular como el espesor de las trabéculas o la separación entre ellas [Rosen, 2008].

I. 2. Síndrome Metabólico

I. 2. 1. Definición

La palabra *síndrome* hace referencia a un conjunto de síntomas y/o hallazgos físicos o bioquímicos reconocibles, de los cuales no se conoce una causa directa. En un síndrome, los componentes coexisten con mayor frecuencia que lo que se esperaría simplemente por azar. Cuando se identifican los mecanismos que los causan, el síndrome pasa a considerarse una enfermedad [Alberti, 2006].

El Síndrome Metabólico (SM) es un desorden heterogéneo y multifactorial asociado con riesgo cardiovascular elevado [Alberti, 2006] definido inicialmente como Síndrome X en el año 1988 por Reaven [Márquez-Sandoval, 2011]. Los hallazgos clínicos más comúnmente encontrados en pacientes con SM incluyen resistencia a la insulina, dislipidemia (en particular hipertrigliceridemia y bajos niveles de HDL), obesidad central, hipertensión, tolerancia a la glucosa alterada o Diabetes mellitus y tasas elevadas de enfermedad aterosclerótica [Miranda, 2005a].

I. 2. 2. Criterios diagnósticos de SM

Existen varios criterios para identificar pacientes con SM. Todos ellos implican la presencia de ciertas manifestaciones, que por lo general son las mismas entre definiciones pero que difieren en la importancia que se les asigna en cada una [Márquez-Sandoval, 2011]. Los más utilizados son los elaborados por:

- American Diabetes Association (ADA) [American Diabetes Association, 1998]: reconoce que el “síndrome de resistencia a la insulina” reúne una serie de hallazgos clínicos o de laboratorio que incluyen: intolerancia a la glucosa, obesidad central, dislipidemia (triglicéridos elevados, HDL disminuido, LDL pequeñas y densas elevadas), hipertensión, aumento de factores protrombóticos y antifibrinolíticos, y propensión a enfermedad vascular aterosclerótica. No se establecen valores de corte ni jerarquías para los distintos parámetros [Miranda, 2005a].
- Organización Mundial de la Salud (OMS) [Alberti and Zimmet, 1998]: debe existir una alteración del metabolismo de la glucosa/insulina (Diabetes mellitus tipo 2, tolerancia a la glucosa alterada, o tolerancia a la glucosa normal con insulinorresistencia –definido como

el cuartil más alto del $HOMA_{IR}$). Acompañando esta alteración, deben existir al menos dos de los siguientes componentes: hipertensión bajo medicación o $>140/90$ mmHg sin tratamiento; dislipidemia con triglicéridos plasmáticos elevados (>150 mg/dL) y/o bajos niveles de HDL (<35 mg/dL en hombres, <39 mg/dL en mujeres); obesidad con índice de masa corporal (IMC) >30 kg/m² o adiposidad central (relación cintura:cadera $>0,90$ en hombres, $>0,85$ en mujeres); y microalbuminuria (excreción urinaria de albúmina >20 µg/min o relación albumina:creatinina >30 mg/g). Este criterio asume que la resistencia a la insulina es una de las principales causas del SM [Alberti, 2006].

- American College of Endocrinology/American Association of Clinical Endocrinologists (ACE/AACE) [Miranda, 2005a]: se establece una serie de factores de riesgo para el desarrollo de SM, que incluye las siguientes manifestaciones: sobrepeso u obesidad, haciendo hincapié en la obesidad abdominal (IMC ≥ 25 kg/m², circunferencia de cintura >102 cm en hombres o >88 cm en mujeres); triglicéridos elevados o cerca del valor máximo (≥ 150 mg/dL); HDL colesterol bajo (<40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres); hipertensión moderada o importante ($\geq 130/85$ mmHg); y tolerancia a la glucosa alterada (>140 mmHg 2 hs luego de una carga de 75g de glucosa) o glucosa plasmática en ayunas alterada (110 – 125 mg/dL). También se reconocen otros factores de riesgo como síndrome de ovario poliquístico, diabetes gestacional, estilo de vida sedentario, edad, raza, e historia familiar de Diabetes mellitus tipo 2, hipertensión o enfermedad cardiovascular. No se especifica cuántos factores deben existir para diagnosticar el síndrome, pero sí que será más probable su desarrollo a medida que el número aumente.
- National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel (NCEP–ATP III) [NCEP-ATPIII, 2001]: se necesitan al menos tres de los siguientes indicadores para establecer que un paciente posee SM: obesidad abdominal (circunferencia de cintura >102 cm en hombres, >88 cm en mujeres); triglicéridos plasmáticos >150 mg/dL; colesterol HDL <40 mg/dL en hombres o <50 mg/dL en mujeres; presión arterial $>130/85$ mmHg; y glucosa plasmática en ayunas entre 110 y 125 mg/dL. Es de remarcar que esta definición no incluye medidas de la resistencia insulínica sino que se basa en la medición de la glucemia en ayunas más que en la determinación de la tolerancia a la glucosa. A diferencia del criterio de la OMS, el del NCEP establece que el SM es un precursor de la Diabetes mellitus tipo 2 mientras que el primero considera que ambos se solapan en el diagnóstico [Miranda, 2005a]. Esta clasificación no establece niveles jerárquicos de los cinco componentes [Márquez-Sandoval, 2011].

I. 2. 3. Prevalencia del SM

El SM se está convirtiendo en una epidemia como resultado del aumento en la prevalencia de obesidad y de los estilos de vida sedentarios [Yamaoka, 2012].

En el año 2011, Márquez-Sandoval y colaboradores realizaron una recopilación y análisis de los trabajos publicados hasta esa fecha que evaluaban los niveles de prevalencia del SM en países de Latinoamérica. Analizaron once estudios transversales en los que se había realizado el diagnóstico de SM utilizando el criterio establecido por el NCEP-ATP III.

Encontraron que la prevalencia en general en países latinoamericanos fue de aproximadamente 25% (rango entre 18,8% y 43,3%), que el SM fue ligeramente más frecuente en mujeres (25,3%) que en hombres (23,2%) y que el grupo etario con la mayor prevalencia correspondía a personas mayores de 50 años.

También analizaron la frecuencia de los componentes del SM y hallaron que los más encontrados eran la presencia de valores disminuidos de colesterol HDL (62,9%) y la presencia de obesidad abdominal (45,8%).

En un estudio transversal (CARMELA), se encontraron resultados similares, registrándose un rango de prevalencia global en Latinoamérica de entre 14% y 27%, siendo mayor en mujeres (22% vs 20% en hombres) en la mayoría de las ciudades donde se llevó a cabo el estudio. También encontraron que la prevalencia de SM aumentaba con la edad [Escobedo, 2009].

En Europa se han encontrado valores similares de prevalencia [Scuteri, 2014] y lo mismo ocurre en EEUU [Ford, 2002]. Incluso valores más elevados fueron observados en ciertos grupos étnicos alrededor del mundo [Ford, 2002].

La prevalencia del SM se correlaciona con el incremento en la prevalencia de obesidad, con la edad y se asocia con elevado riesgo de desarrollar Diabetes mellitus con sus complicaciones cardiovasculares asociadas [James, 2008].

I. 2. 4. Complicaciones asociadas al SM

Son varias las alteraciones que produce el SM a nivel sistémico (Figura I. 2. 4). Se encuentra aumentada la incidencia de complicaciones del aparato cardiovascular como enfermedad coronaria, infarto de miocardio y sus consecuencias cardíacas, y también la prevalencia de Diabetes tipo 2. Pacientes con SM evidencian problemas hepáticos, como esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis y cirrosis, y problemas renales como

microalbuminuria, hipofiltración e hiperfiltración glomerular. Además, existe evidencia de la correlación entre SM y cambios funcionales en los pulmones, cáncer de mama, páncreas, vejiga y próstata [Panchal, 2011; Kaur, 2014].

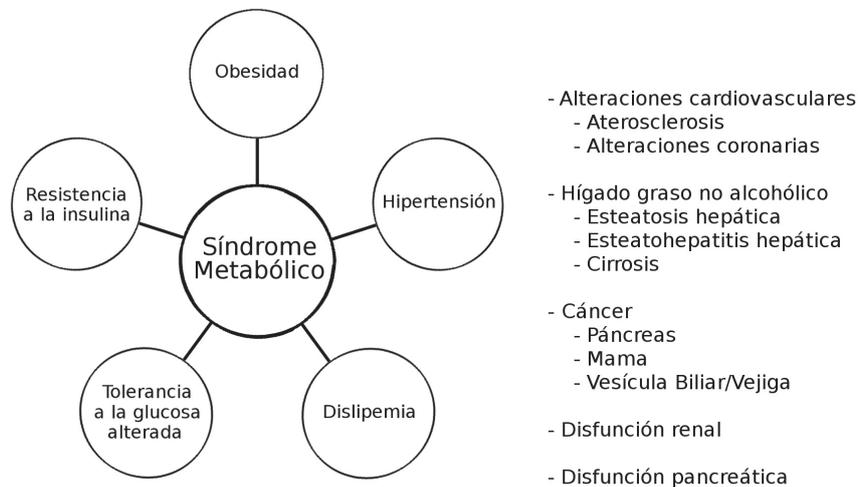


Figura I. 2. 4 – Complicaciones asociadas al SM (Adaptado de Panchal, 2011).

I. 2. 5. Fisiopatología del SM

No se conoce el mecanismo preciso por el cual se produce el SM, pero parecería que la resistencia a la insulina y la adiposidad abdominal están en el centro de la patofisiología de este síndrome y de sus componentes [Cornier, 2008].

I. 2. 5. A. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina

El SM se asocia a resistencia insulínica, pero no es una consecuencia solamente de la resistencia a esta hormona y tampoco es una consecuencia directa de la falta de acción de la misma [Miranda, 2005a].

Los mecanismos propuestos para explicar el efecto de la resistencia a la insulina son tres: los efectos de la hiperglucemia leve a moderada, los efectos de la hiperinsulinemia compensatoria y los efectos en el desbalance en las distintas vías de la acción de la insulina.

La hiperglucemia, principalmente posprandial y por debajo de los niveles de un paciente diabético, podría acelerar la aterogénesis por formación de productos de glicación avanzados principalmente sobre el colágeno de las paredes vasculares [Miranda, 2005a].

Hoy en día se postula que las distintas vías mediante las cuales actúa la insulina dentro de una célula podrían diferir en su respuesta a esta hormona. En el SM y en la Diabetes mellitus

tipo 2 la vía que lleva a la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K), una de las vías encargadas de los efectos metabólicos de la insulina, está bloqueada, y la vía de la MAP quinasa, que interviene en los efectos mitogénicos y proinflamatorios de la acción de la insulina permanece activa y hasta podría estar hipersensibilizada [Cusi, 2000].

I. 2. 5. B. Almacenamiento de energía disfuncional y obesidad

Algunos investigadores consideran que el almacenamiento disfuncional de energía es la característica principal del SM y que la resistencia a la insulina aparecería por anomalías en el procesamiento y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos. En muchos pacientes, la anomalía principal es simplemente la presencia de un exceso de triglicéridos o grasa corporal, es decir, obesidad.

El cuerpo almacena triglicéridos en adipocitos periféricos pequeños. Si se excede la capacidad de estas células, los triglicéridos pueden acumularse en hepatocitos, células musculares esqueléticas y adipocitos viscerales. Esto último puede llevar a resistencia insulínica a nivel hepático y muscular. Esto se conoce como “hipótesis del desborde”.

I. 2. 6. Consumo de fructosa y SM

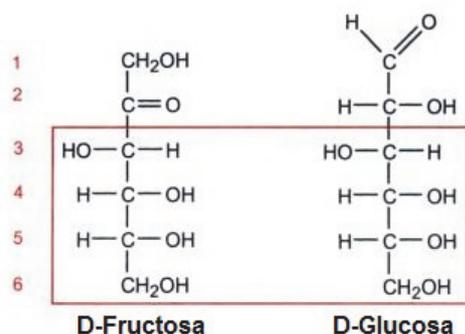


Figura I. 2. 6 – Estructuras químicas de la fructosa y de la glucosa.

La fructosa es una hexosa de fórmula química idéntica a la de la glucosa (C₆H₁₂O₆) pero difieren en que la fructosa posee un grupo cetona en la posición 2 (cetohexosa), y la glucosa posee un grupo aldehído en el carbono 1 (aldohexosa) (Figura I. 2. 6).

Naturalmente, la fructosa se encuentra en frutas y en la miel y es el más dulce de todos los azúcares. Puede obtenerse por hidrólisis de la sacarosa, un disacárido compuesto de una molécula de glucosa y otra de fructosa, presente en la caña de azúcar o en la remolacha azucarera. Comercialmente se obtiene de la hidrólisis de inulina (un polisacárido de fructosa) o por hidrólisis del almidón [Metha, 2005].

En las últimas décadas ha aumentado el número de calorías incorporado diariamente (dietas occidentales), calculándose un aumento aproximado del 24%. De acuerdo con reportes de la *USDA Nationwide Food Consumption Survey*, el consumo de fructosa en EEUU era de 37

g/día en 1977-1978. Los refrescos azucarados no alcohólicos (*soft drinks*), como las gaseosas, aparecían como la principal fuente de fructosa y los adolescentes y adultos jóvenes (19 a 22 años) de ambos sexos eran los principales consumidores [Tappy, 2010]. Estas bebidas poseen grandes cantidades de azúcares refinadas, por lo que implican una carga de hidratos de carbono importante aunque no generen sensación de saciedad. Por ello, se las asocia con aumento de peso, SM y resistencia a la insulina [Basu, 2013]. Datos más recientes del estudio de NHANES 1999-2004, estimaron un consumo promedio de fructosa de 49 g/día, que corresponde a un incremento del 30% en la ingesta diaria. Otra vez las gaseosas aparecían como la principal fuente de fructosa y los adolescentes y adultos jóvenes como los principales consumidores [Tappy, 2010].

En cuanto al consumo mundial, se calcula que el consumo de azúcar promedio *per cápita* se ha incrementado en un 16% en los últimos 20 años, pasando de 56 g/día en 1986 a 65 g/día en 2007. Sudamérica y Oceanía son los mayores consumidores de azúcar. El mayor aumento relativo en el consumo se ha observado en Asia, registrándose un aumento del 50%.

El consumo de gaseosas se ha incrementado en los últimos años, calculándose un aumento mundial aproximado del 20% desde el año 1997 al 2010. Si bien en los países con mayores ingresos se ingiere más cantidad, el grado de aumento en el consumo en los últimos años ha sido mayor en los países de ingresos bajos y medianos. Este aumento de consumo se ha asociado con sobrepeso, obesidad y diabetes. Además, se prevé que en los próximos años el consumo siga aumentando así como las alteraciones mencionadas anteriormente, lo que representa un problema de la salud pública [Basu, 2013].

Los efectos de la ingesta prolongada de fructosa serán descritos en la Sección I. 2. 8.

I. 2. 7. Metabolismo de la fructosa.

La fructosa se absorbe en el intestino delgado. Ingresa a los enterocitos a través de un transportador específico, el GLUT5, ubicado en la membrana apical de estas células. Este proceso, a diferencia de lo que ocurre en la absorción de la glucosa, no requiere hidrólisis de ATP y es independiente de la absorción de sodio [Tappy, 2010]. La absorción de fructosa podría ser dependiente de la edad y estar modulada por otros constituyentes no carbohidratos de la dieta. El paso a la circulación sanguínea se produce a través de transportadores GLUT2 ubicados en la membrana basolateral de los enterocitos. Así, la fructosa absorbida llega a la vena porta hepática para ingresar en el hígado.

La captación de fructosa por parte de los hepatocitos se realiza por el transportador de

glucosa GLUT2, y es casi del 100% en el primer paso por el hígado, por lo que las concentraciones sanguíneas de fructosa no son mayores de 50-500 μM luego de la ingesta de una carga de este azúcar. El metabolismo de fructosa casi no ocurre en tejidos extrahepáticos en condiciones fisiológicas [Tappy, 2010].

Dentro de este órgano (Figura I. 2. 7. 1), se produce rápidamente la fosforilación a fructosa 1-fosfato por acción de la enzima fructoquinasa, altamente específica para fructosa. La fructosa 1-fosfato se transforma en dos triosas, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído por acción de la fructosa 1-fosfato aldolasa. La dihidroxiacetona fosfato es convertida en gliceraldehído 3-fosfato por la enzima triosa fosfato isomerasa y el gliceraldehído es fosforilado por la triosaquinasa. Así, las triosas que se formaron por la hidrólisis de la fructosa ingresan en la vía glucolítica [Lehninger, 2001].

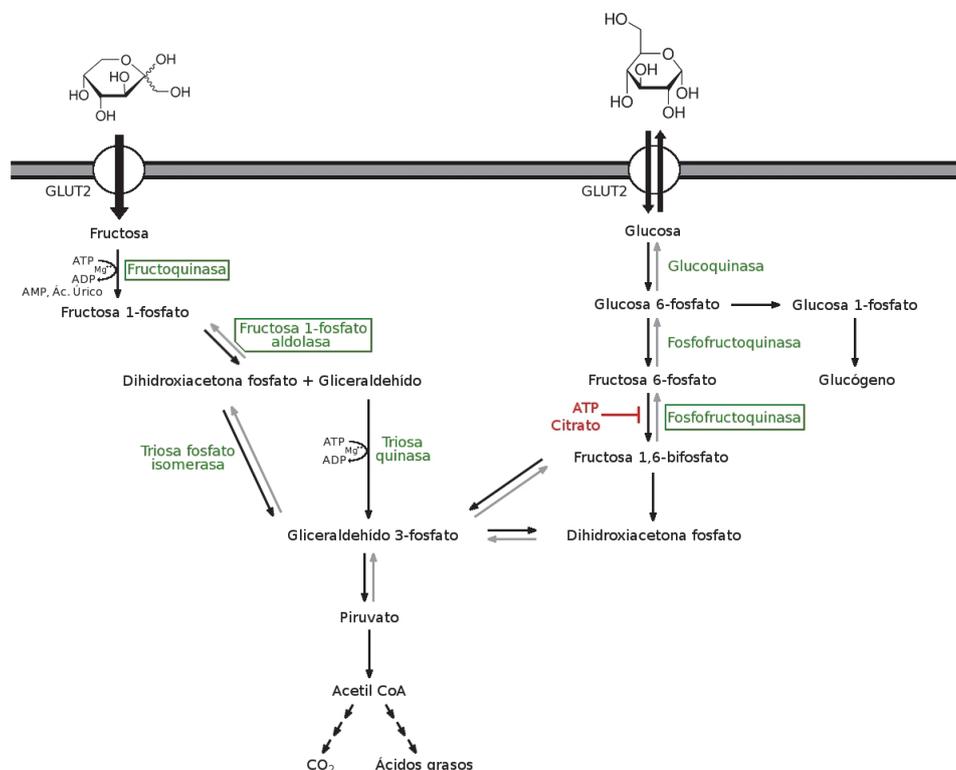


Figura I. 2. 7. 1 – Metabolismo hepático de la fructosa y comparación con el metabolismo de la glucosa.

Cabe destacar que el metabolismo hepático de la fructosa carece de etapas de control como sí se observan en el metabolismo de la glucosa. La enzima glucoquinasa es la encargada de controlar el ingreso de la glucosa en la vía glucolítica. Como esta enzima tiene poca afinidad por su sustrato, la tasa de fosforilación de la glucosa varía con la concentración portal de este azúcar. Los pasos siguientes de esta vía (conversión de glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato y de esta última a fructosa 1,6-bisfosfato) están catalizados por la fosfofructoquinasa, cuya actividad

se regula en base al nivel energético de la célula. Es inhibida por ATP, que no solo es su sustrato sino también el producto final de la vía glucolítica. Niveles altos de esta molécula indican que la célula la está produciendo más rápido de lo que la consume, por lo que el exceso inhibe a la enzima. El citrato es un intermediario clave en la oxidación aeróbica del piruvato, y una concentración alta aumenta el efecto inhibitorio del ATP [Lehninger, 2001].

Al saltar estas etapas de control, la fructosa puede entrar en la glucólisis continuamente y producir glucosa, glucógeno, lactato y piruvato, y proveer el glicerol y los ácidos grasos libres para la producción de triglicéridos [Basciano, 2005].

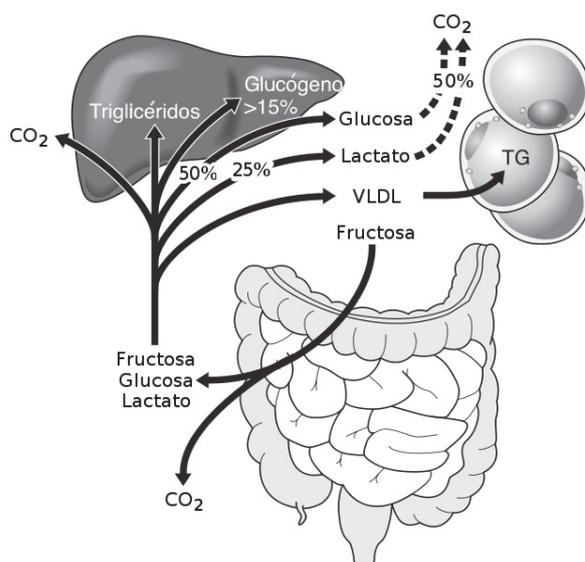


Figura I. 2. 7. 2 – Destino de una carga oral de fructosa [Tappy, 2010].

En el hígado, aproximadamente el 50% de la carga de fructosa ingerida se transforma en glucosa que será liberada para ser utilizada en otros órganos, aproximadamente 25% de la carga se transforma en lactato y 17% se almacena como glucógeno. Parte de la carga se convierte en ácidos grasos, por el proceso de síntesis *de novo*. Esto último sumado a que la fructosa inhibe la oxidación lipídica hepática favorece a la reesterificación de los ácidos grasos y a la síntesis de VLDL (Figura I. 2. 7. 2) [Tappy, 2010].

La fructosa no produce una elevación importante de los niveles plasmáticos de insulina, pero como el tejido adiposo es muy sensible a la acción de esta hormona, este aumento es suficiente para inhibir la hidrólisis de triglicéridos y la liberación de ácidos grasos libres.

I. 2. 8. Efectos del consumo sostenido de fructosa

La fructosa posee un índice glucémico bajo, y su consumo no provoca alteraciones importantes en los niveles plasmáticos de insulina (Figura I. 2. 8) por lo que en un principio se pensó que podría ser utilizada por personas diabéticas como sustituto de la glucosa [Basciano, 2005].

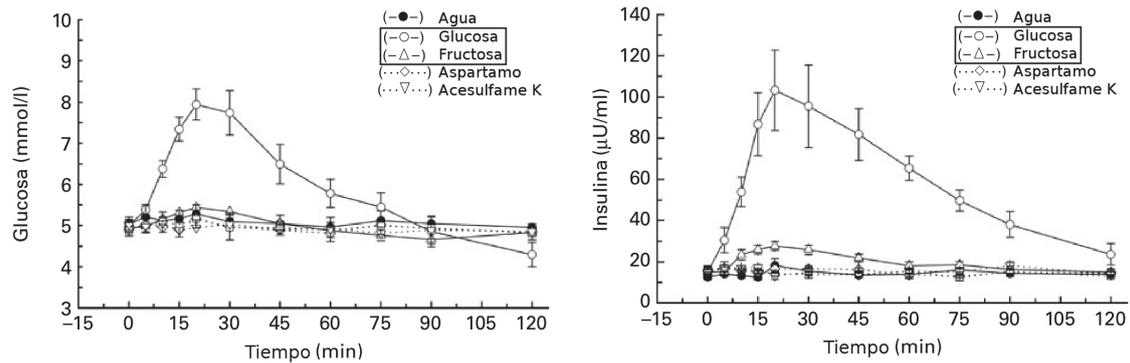


Figura I. 2. 8 - (A) Niveles plasmáticos de glucosa y **(B)** concentraciones plasmáticas de insulina en respuesta a una carga intragástrica de diversas sustancias [Steinert, 2011].

Sin embargo, el consumo prolongado de fructosa está asociado con distintas alteraciones metabólicas. Entre ellas tenemos:

I. 2. 8. A. Dislipidemia

Debido a que la fructosa provee grandes cantidades de triosas fosfato que pueden proveer el glicerol o los ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos, se la considera una molécula altamente lipogénica.

Además, la fructosa puede aumentar la expresión de enzimas clave del metabolismo lipídico en el hígado. La proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP, sus siglas del inglés *sterol regulatory element binding protein*) es un factor de transcripción que regula la síntesis de colesterol y ácidos grasos. Esta proteína se une al elemento de respuesta a esteroides (SRE, sus siglas del inglés *sterol response element*) presente en muchos genes y promueve la expresión de enzimas involucrada en la síntesis de colesterol.

La expresión de SREBP es potenciada por insulina en los principales tejidos blanco de esta hormona (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo) mediante la vía de las MAP quinasas. Sin embargo, se encontró que en ratones cuyas células β fueron destruidas por inyección de estreptozotocina, la alimentación con fructosa, glucosa o sacarosa inducía la expresión de la isoforma hepática SREBP-1c, siendo mayor el aumento cuando se alimentaban con fructosa. Por lo tanto, la lipogénesis podría ser independiente de insulina si existe acceso a estos carbohidratos [Matsuzaka, 2004].

I. 2. 8. B. Deposición ectópica de lípidos en hígado y músculo esquelético

El depósito de triglicéridos en el citoplasma de células que no son adipocitos, en especial hepatocitos y células musculares esqueléticas, está asociado a la resistencia insulínica específica de estos tejidos. En roedores, este efecto de la fructosa podría deberse a una estimulación de la síntesis *de novo* de lípidos, a una oxidación de lípidos reducida y a una expresión aumentada de genes lipogénicos [Tappy, 2010]. En humanos esto ha sido menos documentado.

I. 2. 8. C. Homeostasis de la glucosa alterada y resistencia a la insulina

La mayoría de los hallazgos que relacionan el consumo de fructosa con resistencia a la insulina han sido en modelos animales y los resultados en humanos no son tan claros. Los mecanismos propuestos son varios y se resumen en la Figura I. 2. 8. C.

Modelos de roedores con dietas ricas en fructosa o sacarosa muestran, en un comienzo, aumento del contenido hepático de triglicéridos acompañado de un impedimento de suprimir la producción hepática endógena de glucosa. Estos hallazgos muestran resistencia hepática a la insulina. Con el tiempo aparece hiperinsulinemia en ayunas, lo que evidencia resistencia a la insulina sistémica. A nivel molecular, esto se debería a alteraciones en la vía de señalización post-receptor [Tappy, 2010].

El tejido adiposo es un órgano secretor que produce citoquinas que actúan a nivel local o a nivel sistémico. En personas con ingesta elevada de nutrientes, los adipocitos cambian su morfología (son más grandes) y también su patrón de secreción hacia uno pro-inflamatorio: secretan resistina, TNF- α , IL-6 y MCP-1 (del inglés *monocyte chemotactic protein 1*). Esto produce migración de macrófagos hacia el tejido adiposo que secretan más citoquinas pro-inflamatorias [Powell, 2007], generando un estado de inflamación crónico sistémico que produce alteraciones sobre la cascada de señales mediante las que actúa la insulina y, por lo tanto, resistencia a la acción de la misma [Chen, 2006].

El estrés del retículo endoplasmático rugoso (RER) es un desbalance que se produce cuando la demanda de proteínas que necesitan ser plegadas sobrepasa la capacidad del RER, dando lugar a la acumulación de proteínas plegadas incorrectamente y con función anormal. La pérdida de la homeostasis del RER desencadena un mecanismo adaptativo que tiene como objetivo aumentar la cantidad de RER y su capacidad de procesamiento de proteínas en respuesta a este estrés. La obesidad aumenta la demanda de la maquinaria de síntesis en

muchos órganos, generando en ellos la respuesta mencionada. El estrés del RER en el hígado se asocia a desarrollo de esteatosis y resistencia a la insulina. En hipotálamo y tejido adiposo contribuye a la inflamación y resistencia a la leptina. Estrés del RER crónico produce alteraciones en la síntesis de insulina y produce apoptosis de células β pancreáticas. Por lo tanto, algunos autores consideran que el mecanismo que relaciona la obesidad con la resistencia a la insulina y la Diabetes tipo 2 es el estrés del RER [Özcan, 2004; Cnop, 2012].

El consumo de fructosa se ha relacionado con cambios en la permeabilidad intestinal y alteraciones en la flora normal que produce aumento en la concentración plasmática de endotoxinas. Esto activaría vías inflamatorias que alteran la acción de la insulina [Tappy, 2010].

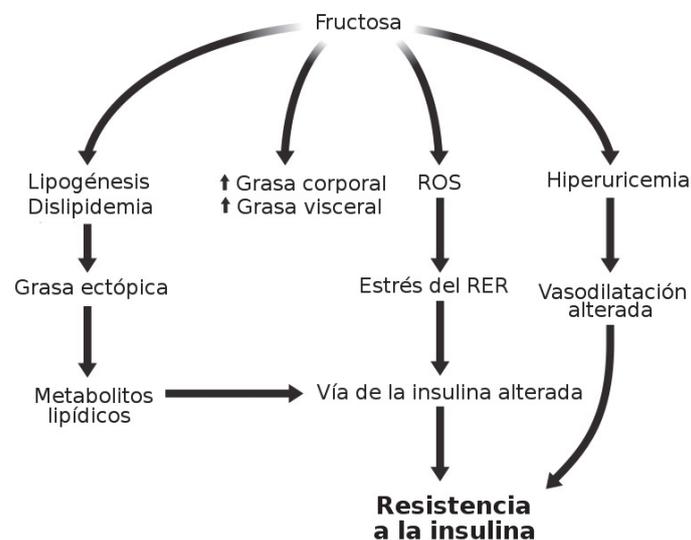


Figura I. 2. 8. C – Resumen de los posibles mecanismos involucrados en la resistencia a la insulina inducida por fructosa [Tappy, 2010].

I. 2. 8. D. Metabolismo del ácido úrico

Como se vio en la Sección I. 2. 7, la fructosa es rápidamente fosforilada a fructosa 1-fosfato en el hígado. Este proceso consume ATP y genera una consecuente elevación de la concentración de AMP que lleva a un aumento en la síntesis de ácido úrico. El consumo de dietas con alto contenido de fructosa se ha relacionado con concentraciones elevadas de ácido úrico en sangre y, más aún, se las ha relacionado con patologías del metabolismo del ácido úrico (gota y cálculos renales) [Tappy, 2010].

Existe también una hipótesis para explicar la asociación entre ingesta de fructosa, hiperuricemia y resistencia a la insulina. Se basa en el hecho de que la utilización de glucosa por el músculo esquelético no solo implica la activación de ciertas vías dentro de las células, sino

que también requiere un aumento en el flujo sanguíneo en este tejido. Esto se produce ya que la insulina activa la enzima endotelial óxido nítrico sintasa (eNOS). En personas obesas, esta vasodilatación en músculo está alterada y esto contribuye a la resistencia a la insulina “pre-receptor”. Debido a que el ácido úrico inhibe potentemente a la eNOS, la hiperuricemia producida por la ingesta elevada de fructosa podría contribuir en parte a la resistencia a la insulina (Figura I. 2. 8. C) [Tappy, 2010].

I. 2. 8. E. Hipertensión arterial

En ratas, se ha encontrado que la alimentación con altas concentraciones de fructosa produce hipertensión [Hwang 1987; Tran, 2009] y se han propuesto numerosos posibles mecanismos. La resistencia a la insulina generada por la dieta rica en fructosa produce niveles elevados de esta hormona en sangre, y esta hiperinsulinemia produce elevación de la presión arterial posiblemente por un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático. La hiperinsulinemia también aumenta la absorción renal de sodio pudiendo así aumentar la presión arterial. Por último, el metabolismo celular de la fructosa produce altas cantidades de gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato que pueden ser convertidos en metilglioxal, una molécula muy reactiva que puede reaccionar con grupos sulfhidrilo de proteínas alterando su función. Entre las moléculas alteradas se encuentran canales L de calcio que llevan a un aumento de la concentración intracelular de este ion en células de músculo liso de vasos sanguíneos, aumentando la resistencia vascular [Tappy, 2010].

En humanos la relación entre ingesta de fructosa y aumento de presión arterial parecería también ser indirecta, habiendo poca evidencia del efecto *per se* de la fructosa. La conexión estaría en que la ingesta de fructosa produce aumento de las calorías ingeridas, aumento de peso corporal y resistencia a la insulina estando todos estos hechos relacionados con presión sanguínea elevada. Además, la ingesta de fructosa no produce una mayor actividad del sistema nervioso simpático, como sí ocurre por ejemplo con la glucosa [Tappy, 2010].

I. 2. 9. Modelos animales utilizados en el estudio del SM

Un modelo animal es un organismo vivo que posee un proceso patológico heredado, adquirido naturalmente o inducido que en uno o varios aspectos reproduce algún fenómeno que ocurre en el hombre. Por lo tanto, no se debe esperar que los modelos animales sean ideales ni que puedan ser utilizados en cualquier situación [Varga, 2010].

Podemos dividir a los modelos animales usados en general para evaluar patologías como el Síndrome Metabólico, la Diabetes mellitus, etc. en dos categorías que tienen en cuenta el mecanismo de producción: modelos espontáneos y modelos inducidos. Dentro de cada uno de estos grupos, existen algunos que tratan de simular la enfermedad humana, los llamados modelos análogos, y otros que no tratan de imitarla sino que intentan reproducir algún aspecto específico de la misma. Esta última división suele ser más útil en los modelos espontáneos [Arias-Díaz, 2007].

- Modelos espontáneos: se han usado varios modelos con alteraciones genéticas (monogénicas o poligénicas) que evidencian características presentes en el SM humano, principalmente obesidad y Diabetes tipo 2. Suelen ser útiles para evaluar mecanismos moleculares específicos implicados en el desarrollo de la obesidad en roedores, pero se sabe que el SM no es una alteración monogénica [Panchal, 2011]. Entre ellos encontramos:
Ratón ob/ob (C57BL/6J-ob/ob): poseen una mutación autosómica recesiva en el gen que codifica para la leptina, por lo que estos ratones presentan un déficit de esta hormona. Esto hace que presenten hiperfagia y gasto de energía reducido, lo que lleva a obesidad severa. Estos ratones muestran también hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hiperglucemia en ayunas [Fellmann, 2013]. También se ha observado que desarrollan hipertrofia del ventrículo izquierdo, fibrosis cardíaca y esteatosis e inflamación hepática. A diferencia del SM en humanos, estos ratones no desarrollan hipertensión arterial [Panchal, 2011].
Ratón db/db (C57BL/Ks-db/db): poseen una mutación autosómica recesiva en el gen que codifica para el receptor de leptina, lo que genera un receptor defectuoso con un dominio intracelular truncado que puede unir leptina pero la transducción de señales no es funcional [Fellmann, 2013]. Estos ratones desarrollan hiperfagia y obesidad. Presentan hiperglucemia en ayunas y niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres elevados, sumados a una relación HDL/LDL reducida. También presentan hiperinsulinemia y tolerancia a la glucosa alterada. Se ha registrado infiltración con células inflamatorias y fibrosis en el corazón, disfunción endotelial y esteatosis hepática. No presentan hipertensión ni fibrosis o inflamación hepática [Pachal, 2011].
Rata Zucker: Estas ratas poseen una mutación en el gen que codifica para el receptor de leptina, produciendo proteínas con su dominio extracelular modificado, dando lugar a receptores con menor afinidad por esta hormona. Por lo tanto, se necesitan mayores dosis de leptina que en ratas normales para producir un efecto similar (resistencia a la leptina). Estas ratas poseen un consumo de alimento elevado y obesidad. Los niveles plasmáticos de

triglicéridos y colesterol aumentan con la edad. Son insulinoresistentes, pero no llegan a exhibir hiperglucemia en ayunas. Con la edad también desarrollan hipertensión [Fellmann, 2013].

- Modelos inducidos: suelen utilizarse modelos con cambios en la alimentación o animales modificados genéticamente. Las dietas modernas, sobre todo las de los países occidentales, son hipercalóricas, ricas en hidratos de carbono como la fructosa y la sacarosa, y en grasas saturadas y se las asocia con complicaciones como el SM y enfermedades cardiovasculares. Con la intención de reproducir signos y síntomas del SM humano, se han hecho combinaciones de dietas ricas en hidratos de carbonos y grasas [Panchal, 2001]. Las dietas empleadas comúnmente son:

Dieta rica en fructosa: La forma de administrar la fructosa puede ser en el alimento sólido o en el agua de bebida y se han usado distintas concentraciones del monosacárido durante diversos periodos de tiempo. Ratas sometidas a esta dieta desarrollan síntomas de SM: hipertensión, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada y dislipidemia (triglicéridos elevados, colesterol normal). También se registran niveles elevados de ácido úrico. A nivel cardíaco se ha observado dilatación e hipertrofia ventricular, disminución de la fuerza contráctil e infiltración inflamatoria. A nivel hepático se ha observado esteatosis con fibrosis periportal e inflamación. A nivel renal se observa deposición de colágeno entre los túbulos con infiltración de macrófagos y alteraciones tubulares como hiperplasia de túbulos proximales. Se ha observado resistencia a la leptina, pero sin cambios en el peso corporal o la adiposidad. Algunos autores describen que existe obesidad, pero esto no ha sido confirmado [Panchal, 2011].

Dieta rica en grasas: Si bien no existe un valor exacto que defina qué es una dieta con alto o bajo contenido en grasas para animales, por lo general las dietas tradicionales tiene aproximadamente un 10% de la energía proveniente de las grasas. Las dietas con alto contenido en grasa poseen 30 – 50 % y las dietas con muy alto contenido en grasa poseen más de 50%. El suplemento con grasa animal es más efectivo que el suplemento con aceites vegetales porque contiene más ácidos grasos saturados [Fellman, 2013]. Estas dietas producen aumento del peso corporal, hiperglucemia y tolerancia a la glucosa alterada. Los ratones alimentados con estas dietas muestran hipertensión sistólica y disfunción endotelial, acompañadas de fibrosis e hipertrofia cardíaca. También muestran alteraciones renales como albuminuria, acumulación de lípidos, deposición de colágeno en los glomérulos e infiltración de macrófagos en la médula [Panchal, 2011]. La efectividad del tratamiento depende de la

cepa utilizada. La mayoría de las cepas de ratones muestran obesidad, pero puede haber variaciones entre cepas en las alteraciones de peso, en la tolerancia a la glucosa, en la resistencia a la insulina y en la dislipidemia. En ratas, puede no ser uniforme la respuesta a este tipo de dietas [Fellman, 2013]. Si bien esta dieta es capaz de reproducir los componentes del SM humano, las dietas humanas que causan complicaciones son más complejas [Panchal, 2011].

I. 2. 10. Estrategias terapéuticas para pacientes con SM

Los tratamientos del Síndrome Metabólico implican el abordaje de sus distintos componentes mediante modificaciones en el estilo de vida para disminuir el peso corporal, y/o terapia farmacológica.

Con el objetivo de lograr un descenso de peso, se pueden implementar dietas deficientes en calorías, aumentar la actividad física y, en los casos que estas opciones no den resultado (pacientes con índice de masa corporal muy elevado), utilizar terapia farmacológica. Si bien la pérdida de peso no es un objetivo fácil de alcanzar, el simple hecho de realizar ejercicio y cambiar la dieta puede lograr descensos de la presión arterial y mejorar los niveles de lípidos, lo que mejorará la resistencia a la insulina aun si no se registra descenso de peso [Kaur, 2014]. El análisis de varios estudios aleatorios controlados informados por varios autores [Yamaoka, 2012] mostró que la implementación de cambios en el estilo de vida produjo una resolución del SM dos veces mayor que en pacientes controles, lográndose reducciones en las presiones sistólica y diastólica, en los triglicéridos, en el perímetro de la cintura y en los niveles de glucemia en ayunas. Sin embargo, no se evidenciaron cambios en los niveles de HDL-C.

En pacientes que no mejoran con los cambios en el estilo de vida, suele recurrirse a terapia farmacológica para tratar individualmente los componentes del SM. Los fármacos que suelen usarse más comúnmente son los destinados a tratar la resistencia a la insulina, y los más empleados son la metformina y las tiazolidinedionas. No suelen utilizarse secretagogos de insulina ni terapia con esta hormona [Miranda, 2005b]. Para tratar la dislipidemia, suelen utilizarse estatinas (combinadas o no con fibratos y niacina) ya que poseen mínimas interacciones con otras drogas y efectos secundarios. Para controlar la hipertensión la mayoría de los pacientes puede necesitar más de un compuesto, pero se recomienda que los primeros agentes utilizados sean inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueantes del receptor de angiotensina. Otros autores proponen la utilización de diuréticos o β -bloqueantes [Kaur, 2014].

I. 2. 11. Metformina en el tratamiento del SM

La metformina es una de las drogas que más se prescribe en el mundo y es el agente oral de primera línea utilizado para tratar la Diabetes mellitus tipo 2, aunque también es recetada a pacientes con SM o con síndrome de ovario poliquístico. Químicamente es una biguanida que se forma por la combinación de dos grupos guanidino con pérdida de amoníaco (Figura I. 2. 11). Para Diabetes mellitus, suele administrarse en monoterapia o combinada con otros agentes antidiabéticos, como sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidores de la DPP-4 o insulina [Gong, 2012].

La metformina disminuye los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas y posprandiales, principalmente por inhibir la producción hepática de glucosa excesiva a través de una reducción de la gluconeogénesis. Otros potenciales efectos sobre el hígado serían aumento en la captación de glucosa, aumento en las señales intracelulares desencadenadas por la insulina, disminución en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, y un aumento en la β -oxidación de ácidos grasos. También podría aumentar la utilización de glucosa en tejidos periféricos y podría reducir el apetito y la absorción intestinal de glucosa [Gong, 2012].

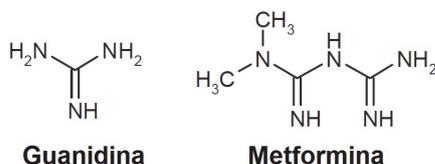


Figura I. 2. 11 – Estructura química de la guanidina y la metformina, una biguanida.

Como no estimula la secreción de insulina, no causa hipoglucemia o hiperinsulinemia, como ocurre comúnmente con otras terapias antidiabéticas. Es bien tolerada por la mayoría de los pacientes y existe cierta variabilidad en la respuesta glucémica.

En cuanto a su farmacocinética, la droga se absorbe en el intestino delgado y se distribuye ampliamente por el organismo. No es metabolizada y se excreta sin modificaciones en la orina.

Los mecanismos moleculares mediante los que actúa la metformina no se conocen con precisión. Se sabe que estimula la enzima AMPK (del inglés *5' AMP-activated protein kinase*), un sensor energético celular y regulador de la homeostasis energética, y que esto produce inhibición de la producción de glucosa, disminuye la síntesis de lípidos y aumenta la oxidación de ácidos grasos libres en hepatocitos. También hay otros efectos que son independientes de AMPK [Rena, 2013]. Por ejemplo, la regulación del balance energético, caída en ATP y aumento en AMP podrían modular la gluconeogénesis independientemente de la acción de AMPK [Gong, 2012].

En el estudio prospectivo de diabetes del Reino Unido (*UK Prospective Diabetes Study*, UKPDS) se evaluó el tratamiento con metformina (y otros antidiabéticos) en pacientes obesos

que recientemente habían sido diagnosticados con Diabetes y que no poseían síntomas de hiperglucemia. El grupo tratado con metformina mostró reducción en infarto de miocardio y mortalidad asociada con la Diabetes [Miranda, 2005b].

Existen estudios clínicos que comparan la eficacia terapéutica de un cambio en el estilo de vida con un cambio en el estilo de vida suplementado con metformina. Harden y colaboradores [Harden, 2007] realizaron un estudio en adolescentes, en el que encontraron que ambos tratamientos producían pérdida de peso aunque los pacientes que recibían metformina disminuyeron un poco más su masa corporal. Sin embargo, este descenso no fue estadísticamente significativo. Encontraron que la metformina podría también disminuir la presión sistólica.

I. 3. Síndrome Metabólico y hueso

I. 3. 1. Alteraciones en el metabolismo óseo asociadas al SM

Se han llevado a cabo varios ensayos para registrar la asociación entre el SM, la densidad mineral ósea (DMO) y la incidencia de fracturas, pero los resultados obtenidos no son concluyentes.

En el estudio Rancho Bernardo [von Muhlen, 2007] se midió la DMO de cadera, de cuello femoral y de columna en la región lumbar. Se observó que pacientes con SM poseían mayores valores de DMO, pero que si los datos se ajustaban por índice de masa corporal (IMC), esta tendencia se revertía y en el cuello femoral existía una disminución de DMO significativa. Atribuyeron este “efecto protector” observado, previo al ajuste por IMC, al mayor peso corporal de los pacientes con SM. Además, encontraron mayores valores en la incidencia de fracturas osteoporóticas no vertebrales en personas con SM, siendo significativo el aumento de fracturas en mujeres.

En concordancia con estos hallazgos, Yaturu y colaboradores reportaron disminuciones en la DMO de cadera y mayores niveles de osteoporosis y osteopenia en hombres de edad avanzada con SM. Sin embargo, los valores que obtuvieron en columna vertebral no evidenciaron alteraciones óseas [Yaturu, 2009]. Hwang y Choi midiendo valores de DMO en columna vertebral y ajustando los resultados teniendo en cuenta edad, sexo, IMC y algunos hábitos, concluyeron que las mujeres con SM estudiadas presentaban menor DMO que el grupo control y que, además, la DMO era menor a medida que aumentaba el número de componentes del SM presentes [Hwang and Choi, 2010]. Si bien en estos dos trabajos no se estudió la incidencia de fracturas, ambos remarcan al SM como un factor de riesgo para osteoporosis y las fracturas asociadas.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la encuesta NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*) mostraron que personas con SM tenían disminución de la DMO de cuello femoral, pero que si los valores se ajustaban por IMC, resultaban similares a los del grupo control. Más aún, al aumentar el número de componentes del SM presentes, los valores de DMO del cuello femoral aumentaban [Kinjo, 2007]. En este estudio no se analizó la incidencia de fracturas. En el estudio MINOS, se encontró que hombres con SM poseían menores valores de DMO pero una menor incidencia de fracturas [Szulc, 2010].

Como se observa, los resultados obtenidos en los diversos ensayos son heterogéneos y no son concluyentes, por lo que es necesario realizar más estudios longitudinales como el de

Rancho Bernardo para llegar a nuevas conclusiones [Sun, 2014]. Frente a este escenario, los mecanismos subyacentes a las posibles alteraciones tampoco han podido dilucidarse.

Algunos autores consideran que de existir alteraciones en el hueso o aumento en la incidencia de fracturas en el SM, estos podrían deberse a la presencia de alguno de sus componentes, más que al síndrome en conjunto. Remarcan que se dispone de varios criterios para hacer el diagnóstico de SM y que, como ellos implican la presencia de un cierto número de signos clínicos dentro de un conjunto, los pacientes representan un grupo heterogéneo. En base a esto, postulan que sería más apropiado evaluar el efecto de los componentes individuales del SM sobre la DMO y el riesgo de fracturas [Sun, 2014].

I. 3. 1. A. Alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la insulina

Los pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) muestran, en la mayoría de los estudios, una reducción de la DMO tanto en columna lumbar como en fémur, y los pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) por lo general poseen valores elevados o iguales que pacientes control. Tanto personas con DMT1 como DMT2 presentan una mayor incidencia de fracturas no traumáticas, mostrando que si bien la DMO suele utilizarse para predecir el riesgo de fracturas, no refleja la calidad ósea [Montagnani, 2013].

Todavía no ha sido determinada con precisión la relación entre resistencia a la insulina y masa ósea. En teoría, como la insulina es una hormona anabólica, la presencia de hiperinsulinemia debería aumentar la masa ósea. También afectaría negativamente sobre la globulina que une hormonas sexuales, aumentando los niveles de hormonas sexuales libres que poseen funciones protectoras contra la pérdida ósea. Sin embargo, los estudios realizados no han podido encontrar una relación positiva e incluso algunos muestran una relación negativa entre resistencia a la insulina y masa ósea, mostrando que la vía por la cual éstas se encuentran vinculadas no es directa [Shin, 2014].

I. 3. 1. B. Obesidad

El esqueleto es capaz de adaptarse a los cambios registrados en el peso corporal, ajustando la masa de tejido óseo a la cantidad necesaria para dar soporte a los tejidos blandos existentes (sin ser más de la necesaria). Existe, por lo tanto, una correlación positiva entre el peso corporal y la densidad mineral ósea (DMO) y varios autores concuerdan que la masa de tejido adiposo es el principal responsable de esta observación [Naot, 2014].

Un peso corporal por debajo de lo normal predispone a fracturas, por lo que siempre se sostuvo que el exceso de peso tendría un efecto benéfico sobre la masa ósea. Sin embargo, existen ensayos que muestran que pacientes obesos poseen mayor predisposición a fracturas y que el riesgo de fracturas depende de la zona de cuerpo (relación inversa con el IMC en cadera, columna y muñeca; relación positiva con el peso en tobillo) y de la edad [Naot, 2014].

Existen varios mecanismos por los cuales el tejido adiposo podría considerarse protector frente a fracturas traumáticas y osteoporóticas y otros que lo harían perjudicial:

| Protector | Perjudicial |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• El aumento de peso incrementa la masa ósea.• Almohadilla protectora frente a fracturas traumáticas (por caídas).• Niveles elevados de leptina tienen efectos anabólicos directos sobre el hueso.• Mayores niveles de estrógenos disminuyen la resorción ósea por inhibición de RANKL. | <ul style="list-style-type: none">• Se producen citoquinas pro-inflamatorias (TNF-α, IL-1, IL-6) que alteran la formación ósea y aumentan su resorción.• Los ácidos grasos libres estimulan la resorción ósea.• Niveles elevados de leptina podrían tener efectos adversos sobre el hueso al activar el sistema nervioso simpático.• La hiperglucemia altera la formación ósea.• Se activa el factor de transcripción PPARγ, que inhibe la formación y estimula la resorción ósea.• Personas obesas suelen poseer déficit de vitamina D con hiperparatiroidismo secundario. |

Tabla I. 3. 2 – Mecanismos por los cuales el tejido adiposo puede ser protector o perjudicial en la incidencia de fracturas [Rosen & Bouxsein, 2006; Compston, 2013; Naot, 2014].

I. 3. 1. C. Hipertensión

La hipertensión arterial se relaciona negativamente con la DMO. Los principales mecanismos fisiopatológicos que describen la relación entre hipertensión y disminución de la masa ósea son: incorporación y niveles disminuidos de calcio, deficiencia de vitaminas D y K, ingesta elevada de sodio y niveles bajos de óxido nítrico [Ilić, 2013].

Personas con hipertensión poseen una capacidad de absorción intestinal de calcio

reducida y un aumento en la eliminación urinaria de calcio. Esto da lugar a una reducción en la concentración plasmática de este ión. Este descenso produce secreción de hormona paratiroidea por parte de las glándulas paratiroides y como consecuencia de ello se activa la resorción ósea. Además, cuando los niveles séricos de calcio son bajos, los niveles de calcio en células musculares lisas de la pared de vasos sanguíneos son elevados, lo que produce resistencia vascular y vasoconstricción [Ilić, 2013]. Estudios clínicos muestran que, en mujeres, al aumentar la presión arterial sistólica, se incrementa la velocidad de pérdida de masa ósea en el cuello femoral [Cappuccio, 1999], y que en hombres también existe una relación positiva entre hipertensión y la pérdida de masa ósea [Metz, 1999].

La vitamina D regula la absorción de calcio y fósforo en el intestino delgado y aumenta la reabsorción de calcio en los túbulos renales. En cuanto al metabolismo óseo, estimula la síntesis de osteocalcina, reduce la síntesis de colágeno y estimula la activación y maduración de osteoclastos indirectamente. Además, inhibe la proliferación de células musculares lisas en vasos sanguíneos, inhibe la calcificación vascular y modula el sistema renina-angiotensina. Varios estudios epidemiológicos mostraron una asociación entre niveles bajos de vitamina D y falla cardíaca, hipertensión e hiperparatiroidismo. También se ha encontrado una correlación positiva entre niveles de 25 hidroxivitamina D y 1,25 dihidroxivitamina D con los niveles de dilatación de vasos producida por el flujo sanguíneo [Ilić, 2013].

La vitamina K actúa como coenzima de la γ -glutamyl carboxilasa, enzima necesaria para la formación de proteínas γ -carboxiladas, como la osteocalcina. Un déficit de esta vitamina produce formas de osteocalcina con menos grupos carboxilo, que las vuelve menos afines hacia la hidroxiapatita y por lo tanto una menor cantidad de calcio se incorpora a los huesos y la DMO disminuye [Ilić, 2013].

Una ingesta elevada de sodio produce aumento del volumen del intersticio renal, promoviendo una mayor filtración glomerular y una consecuente mayor excreción de calcio. Como el sodio y el calcio compiten por la reabsorción, la reabsorción renal de calcio se ve disminuida. Esto lleva a una disminución del calcio plasmático y movilización de este ión desde el hueso, con consecuente disminución de la DMO.

El óxido nítrico (NO) produce vasodilatación y contribuye a la regulación de la presión sanguínea. El efecto directo sobre el tejido óseo no es tan concluyente, y algunos estudios clínicos encuentran que la administración de fármacos dadores de NO producen un aumento de la DMO y una disminución en la incidencia de fracturas [Ilić, 2013].

I. 3. 2. Metformina y metabolismo óseo

En la sección I. 2. 11 se describieron los efectos de la metformina sobre el Síndrome Metabólico. Mejorando alguno de los componentes que pudieran tener efecto negativo sobre el hueso, la metformina mejoraría en forma indirecta la condición ósea. Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la metformina posee efectos directos sobre células óseas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. En esta sección se enumerarán los efectos de la metformina sobre el tejido y metabolismo óseo.

Estudios *in vitro* muestran que la metformina tiene efectos directos sobre cultivos de células del linaje osteoblástico. El tratamiento de células UMR106 y MC3T3E1 con metformina aumenta la proliferación celular en forma dosis dependiente. Además, en las células MC3T3E1 la droga induce un aumento en la diferenciación osteoblástica, mostrando mayor producción de colágeno tipo 1, mayor actividad de fosfatasa alcalina y mayor formación de nódulos extracelulares de mineralización [Cortizo, 2006]. También se ha encontrado que la metformina produce un aumento en la expresión de OPG y una disminución de la expresión de RANKL en osteoblastos primarios y en osteoblastos MC3T3E1, y que sobrenadantes de estos cultivos originan menor cantidad de células TRAP positivas cuando se agregan a cultivos de células Raw264.7 [Mai, 2011].

Cultivos de osteoblastos expuestos a productos de glicación avanzados (AGEs) por períodos prolongados muestran alteraciones en la proliferación, diferenciación y mineralización, siendo estos efectos prevenidos por el agregado de metformina en el medio de cultivo [Schurman, 2008].

En cuanto a ensayos *in vivo*, ratas ovariectomizadas (un modelo de osteoporosis) mostraron una DMO elevada en el grupo que recibió metformina y menor cantidad de células TRAP positivas en la tibia proximal [Mai, 2011]. Células estromales mesenquimáticas (MSC) aisladas de la médula ósea de ratas que recibieron metformina en el agua de bebida mostraron una mayor predisposición a ser diferenciadas a osteoblastos, mostrando mayores niveles de marcadores como actividad de fosfatasa alcalina, producción de colágeno tipo 1 y osteocalcina, y depósitos extracelulares de calcio, acompañado de una elevada expresión del factor de transcripción Runx2 [Molinuevo, 2010]. En este último ensayo, la metformina también mejoró la reparación de una lesión ósea practicada tanto en ratas controles como diabéticas.

En un modelo de ratas con deficiencia parcial de insulina, la metformina previno las alteraciones en la microarquitectura ósea de la metafisis femoral proximal producidas por la Diabetes (disminución en la cantidad de hueso trabecular, reducción en la densidad osteocítica,

reducción en el espesor del cartílago de crecimiento y de la actividad TRAP en la esponjosa primaria). Además, MSC provenientes de estas ratas mostraban una relación Runx2/PPAR γ disminuida indicativa de una predisposición para diferenciarse a adipocitos, lo que fue también prevenido al administrar metformina [Tolosa, 2013].

En contraposición con estos resultados que muestran efectos pro-osteogénicos de la metformina, otro estudio mostró que en un modelo de ratones ovariectomizados y en ratas Wistar de tres meses, la administración de metformina no fue capaz de prevenir las alteraciones inducidas por el déficit de estrógenos en la arquitectura del hueso cortical ni trabecular, ni en la reparación de fracturas en este modelo de osteoporosis post-menopáusica [Jeyabalan, 2013]. Estos resultados indicarían que la metformina no debe ser considerada un fármaco anti-osteoporótico, sino que es esencialmente un agente que mejora el metabolismo de la glucosa y la acción de la insulina, y que secundariamente posee efectos beneficiosos sobre la densidad y calidad ósea.

En general, la mayoría de los resultados indican que la metformina posee efectos benéficos sobre el metabolismo óseo, actuando en forma directa sobre las células presentes en este tejido y también por vía indirecta, mejorando la condición metabólica sistémica. Por lo tanto, sería interesante evaluar si esto mismo se reproduce teniendo al SM como patología de base.

Capítulo II

Hipótesis y Objetivos

Se propone la *hipótesis* que la inducción de Síndrome Metabólico podría asociarse con alteraciones óseas, consecutivas a cambios en el recambio óseo y en el metabolismo de las células óseas o de sus progenitores, y consecuentemente, asociarse con un mayor riesgo de fracturas y/o disminuida capacidad de regeneración del tejido esquelético. Además, se postula que estas alteraciones óseas asociadas al Síndrome Metabólico, podrían ser prevenidas en forma parcial o total por la administración oral de metformina.

Para comprobar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Investigar la posible asociación entre el Síndrome Metabólico y las alteraciones del tejido óseo en ratas.

Objetivos específicos:

1. Investigar *in vivo* las posibles alteraciones óseas, consecutivas a la inducción de Síndrome Metabólico en un modelo de ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa.
2. Investigar el efecto *ex vivo* del Síndrome Metabólico, inducido en ratas por una dieta rica en fructosa, sobre el potencial osteogénico o adipogénico de células estromales mesenquimáticas (MSC).
3. Investigar el efecto *in vivo* del Síndrome Metabólico inducido por fructosa, sobre la regeneración del tejido óseo.
4. Evaluar la posible modulación de las alteraciones óseas consecutivas a un Síndrome Metabólico inducido por fructosa, mediante la administración oral de metformina.

Capítulo III

Materiales y Métodos

III. 1. Estudios *in vivo*

III. 1. 1. Diseño experimental N°1: Efecto del Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa sobre el metabolismo óseo

Para evaluar el posible efecto de un Síndrome Metabólico inducido por una ingesta sostenida de una cantidad elevada de fructosa sobre el metabolismo óseo, se utilizaron dos grupos experimentales llamados *Control* (C) y *Dieta Rica en Fructosa* (DRF). Cada uno estuvo compuesto por 6 ratas Sprague-Dawley machos adultos jóvenes con un peso inicial de 200 a 220 g. Los animales fueron mantenidos en un bioterio (Cátedra de Histología B, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP) con temperatura controlada en 23°C con ciclos de luz – oscuridad de 12 horas. El grupo C recibió alimento balanceado estándar (Asociación de Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina) y agua corriente *ad libitum*, mientras que el grupo DRF recibió el mismo alimento balanceado y solución de fructosa 10% p/v (Biopack, Buenos Aires, Argentina) *ad libitum* [Peredo, 2006; Rebolledo, 2008].

Los ensayos se llevaron a cabo teniendo en cuenta la Guía de Manejo y Entrenamiento de Animales de Laboratorio publicada por la UFAW (*Universities Federation for Animal Welfare*) [2011]. La evaluación y aprobación de los ensayos animales fue obtenida del comité de acreditación institucional (Certificado de Bienestar Animal No A5647-01 - INIBIOLP).

A los 14 días de iniciado el tratamiento se realizó una lesión en el parietal derecho (Sección III. 1. 4.). Los animales se mantuvieron en las condiciones mencionadas previamente otros 14 días para permitir la regeneración del tejido lesionado.

Luego de 28 días totales de tratamiento, los animales fueron pesados y posteriormente sacrificados bajo anestesia por dislocación cervical. Se obtuvieron muestras para realizar los siguientes análisis:

- Evaluación de parámetros séricos (Sección III. 1. 3)
- Análisis histomorfométrico de la metáfisis femoral proximal (hueso descalcificado) (Sección III. 1. 7)
- Evaluación del proceso de reparación de una lesión ósea (Sección III. 1. 4)
- Obtención de células estromales mesenquimáticas y su diferenciación a osteoblastos y adipocitos. Evaluación de marcadores y expresión de factores de transcripción (Sección III. 3)

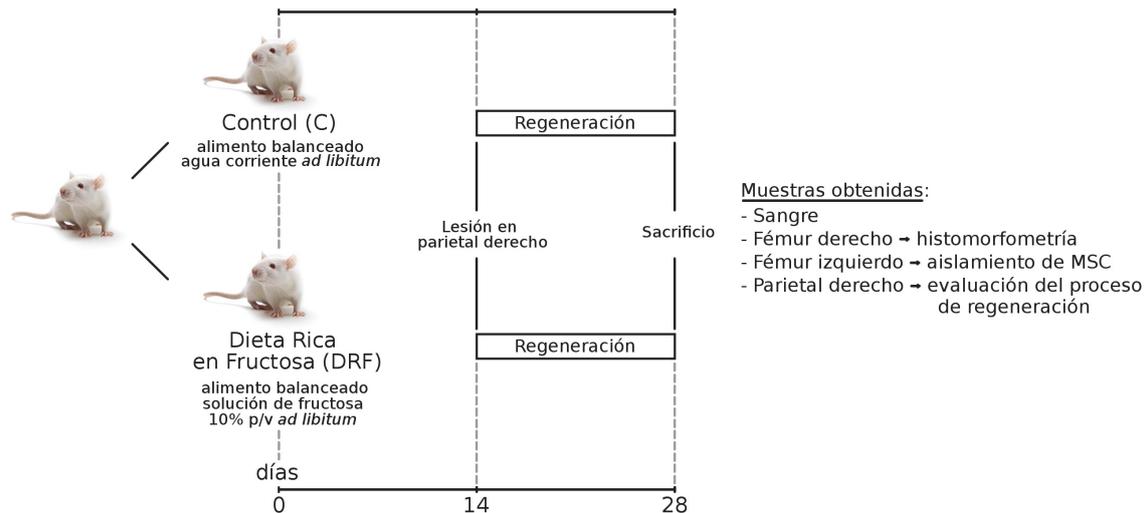


Figura III. 1 - Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto del Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa sobre el metabolismo óseo.

III. 1. 2. Diseño experimental N°2: Efecto de un tratamiento oral con metformina sobre las alteraciones en la microarquitectura ósea producidas por el Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa

Posteriormente se procedió a evaluar si el tratamiento oral con metformina podía prevenir las alteraciones del tejido óseo ocasionadas por la dieta rica en fructosa. Para ello se utilizaron ratas machos adultos jóvenes Wistar con un peso inicial de 200 a 220g. Los animales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Veterinaria, UNLP y trasladados al bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Una vez en este bioterio, se permitió la aclimatación de los animales durante 2 días. Se los mantuvo en un ambiente con temperatura controlada en 23°C, con ciclos de luz – oscuridad de 12 horas. Los ensayos se llevaron a cabo teniendo en cuenta la Guía de Manejo y Entrenamiento de Animales de Laboratorio publicada por la UFAW [UFAW, 2011].

Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de dieciséis ratas cada uno. Un grupo recibió solución de fructosa 10% p/v (Biopack, Buenos Aires, Argentina) *ad libitum* y el otro grupo recibió agua corriente estéril *ad libitum*. Ambos grupos recibieron alimento balanceado estándar (Asociación de Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina). Luego de 14 días de tratamiento, a la mitad de cada grupo se le adicionó metformina (100 mg/kg/día) en el agua de bebida y se continuó el tratamiento por otros 21 días. Quedaron conformados, entonces, cuatro grupos experimentales con ocho animales cada uno: *Control (C)*, *Control + Metformina (CM)*, *Dieta Rica en Fructosa (DRF)* y *Dieta Rica en Fructosa + Metformina (DRFM)*. La razón de la

elección de este tiempo de tratamiento con la droga se debe a que previamente nuestro grupo de investigación ha descrito que la administración oral de Metformina durante al menos dos semanas induce cambios significativos en parámetros osteogénicos *in vivo* e *in vitro* [Tolosa, 2013; Cortizo, 2006; Molinuevo, 2010].

La mitad de los animales de cada grupo recibió una inyección de dos fluorocromos con el objetivo de reconocer los sitios de mineralización activa (Sección III. 1. 5).

Luego de 35 días totales de tratamiento, los animales fueron pesados y sacrificados bajo anestesia por dislocación cervical. Se obtuvieron muestras para realizar los siguientes análisis:

- Evaluación de parámetros séricos (Sección III. 1. 3)
- Estudios de tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT) (Sección III. 1. 6)
- Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica de la metáfisis femoral distal (hueso calcificado) (Sección III. 1. 7)
- Estudio de parámetros de histomorfometría estática de la metáfisis femoral distal (hueso calcificado) (Sección III. 1. 7.)
- Estudio de parámetros de histomorfometría estática de la metáfisis femoral proximal (hueso descalcificado) (Sección III. 1. 7.)
- Obtención de células estromales mesenquimáticas y diferenciación a osteoblastos. Evaluación de marcadores del linaje osteoblástico (Sección III. 3)

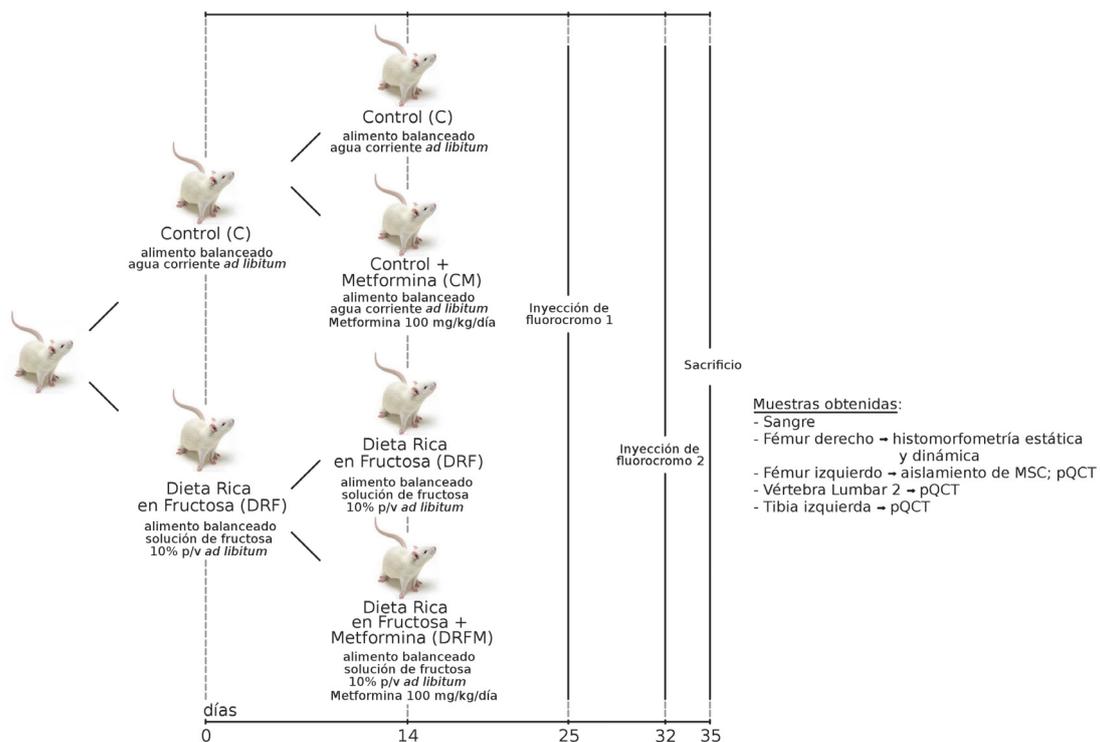


Figura III. 2 - Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto del tratamiento oral con metformina sobre las alteraciones en la microarquitectura ósea producidas por el Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa.

III. 1. 3. Determinación de parámetros séricos

Con el objetivo de evaluar el estado metabólico de los animales, previo al sacrificio se obtuvieron muestras de sangre posprandial. La sangre fue centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos para separar el suero del paquete celular.

Los valores de glucemia, triglicéridos y colesterol fueron medidos utilizando kits comerciales (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina) con un analizador químico automatizado Metrolab 2300 plus (Metrolab, Argentina). Los niveles de insulina se determinaron con un kit ELISA específico para rata (ALPCO, New Hampshire, USA) y los valores de fructosamina fueron medidos con un kit colorimétrico (Biosystems, Barcelona, Spain).

III. 1. 4. Modelo de lesión ósea

Con el objetivo de evaluar los posibles efectos del Síndrome Metabólico inducido por fructosa sobre el proceso de reparación ósea, se utilizó un modelo de lesión mínima en el hueso parietal, previamente descrito por Santana *et al* [Santana, 2003].

Los animales fueron anestesiados con inyecciones sucesivas de xilacina (intramuscular, 0,75 mg/100 g peso corporal) y ketamina (intraperitoneal, 7,5 mg/100 g peso corporal) (Laboratorios Richmond, Buenos Aires, Argentina). Se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm en la piel que está por encima del hueso parietal derecho hasta exponer el periostio, y se lo seccionó para descubrir el hueso. Se realizó un defecto circular de 1,0 mm en el parietal derecho utilizando un torno de baja velocidad provisto de una mecha de carburo (Sabilex 35000RPM). Se suturó la lesión y se continuó con el protocolo experimental.

III. 1. 5. Protocolo de inyecciones de fluorocromos para determinación de superficies de mineralización activa

Se realizó la administración sucesiva de dos fluorocromos por vía subcutánea. Diez días previos al sacrificio, los animales recibieron cloruro de demeclociclina (15 mg/kg peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) y tres días previos al sacrificio recibieron calceína (15 mg/kg peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) [Aguirre, 2009]. Las soluciones fueron preparadas en solución fisiológica 1 hora antes de ser administradas y fueron esterilizadas por filtración [An, 2003].

III. 1. 6. Estudio de parámetros estructurales óseos por Tomografía Computada Cuantitativa Periférica (pQCT)

III. 1. 6. A. Obtención de las muestras

Se utilizaron fémures izquierdos, tibias izquierdas y segundas vértebras lumbares. Luego del sacrificio los huesos fueron disecados, despojados de músculos y colocados en etanol 70%. Las muestras fueron mantenidas en esta solución a 4°C hasta su análisis.

III. 1. 6. B. Mediciones

Estos estudios se realizaron en el Laboratorio del Dr. Ignacio Aguirre en la Universidad de Florida, EEUU, en el marco de un proyecto cooperativo y a través de un subsidio para viajes de la UNLP. Se utilizó un tomógrafo Stratec XCT Research M (Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI, EEUU) equipado con el software correspondiente, versión 6.20. En los huesos largos se hicieron dos medidas, una a nivel de la metáfisis distal (fémur) o proximal (tibia) y en la mitad de la diáfisis (*midshaft*). En las vértebras se realizó una sola medida en la mitad del cuerpo vertebral (Figura III. 3). El sitio del hueso donde se realizaron las medidas fue determinado usando el escaneo previo (*scout scan*) que realiza el equipo, siendo aproximadamente el 20% de la longitud de los huesos largos para las metáfisis y 50% para la *midshaft*. Para las vértebras, la medida se realizó al 50% de la longitud del cuerpo en sentido cefálico-caudal [Aguirre, 2009].

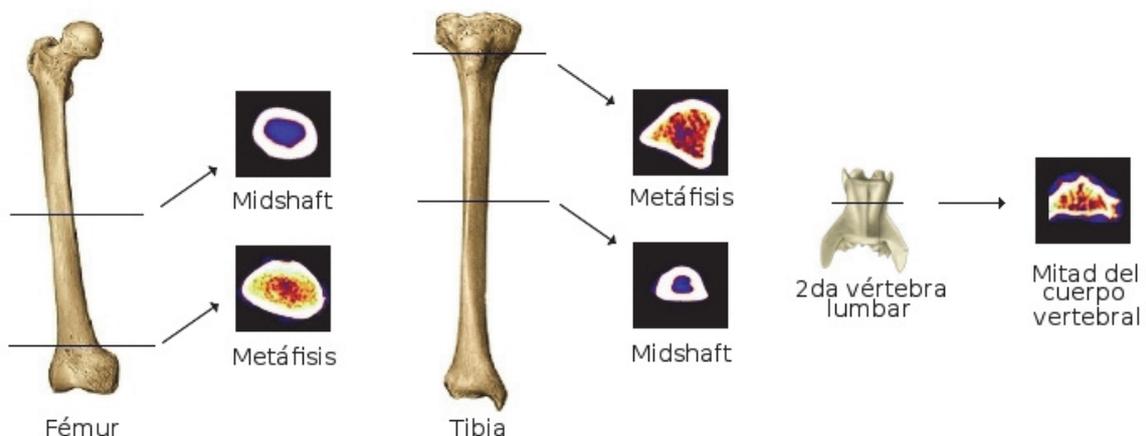


Figura III. 3 - Regiones analizadas por tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT) en los huesos evaluados.

III. 1. 6. C. Parámetros evaluados

Para evaluar el estado del tejido óseo en las metáfisis de los huesos largos y en el cuerpo vertebral, se midieron los siguientes parámetros:

- contenido mineral óseo total (CMO_{tot}), [mg/mm]
- densidad mineral ósea total (DMO_{tot}), [mg/cm³]
- contenido mineral óseo trabecular (CMO_{trab}), [mg/mm]
- densidad mineral ósea del hueso trabecular (DMO_{trab}), [mg/cm³]

Los parámetros evaluados a nivel de la diáfisis de los huesos largos fueron:

- contenido mineral óseo cortical (CMO_{cort}), [mg/mm]
- densidad mineral ósea cortical (DMO_{cort}), [mg/cm³]
- espesor del hueso cortical, [mm]
- circunferencia del periostio, [mm]
- circunferencia del endostio, [mm]

III. 1. 7. Análisis histomorfométrico

III. 1. 7. A. Obtención y procesamiento de las muestras

- **Metáfisis femoral proximal (hueso descalcificado)**

Luego del sacrificio, los fémures fueron disecados y despojados de músculos. Se midieron las longitudes con un calibre Vernier.

Los huesos se fijaron 72hs en Formalina Neutra Tamponada (NBF, *neutral buffered formalin*) y luego fueron descalcificados por inmersiones sucesivas en soluciones de EDTA 10% (Biopack, Buenos Aires, Argentina), pH = 7,0. Luego de la descalcificación las muestras fueron deshidratadas por inmersión en soluciones con concentraciones crecientes de etanol (70%, 96% y 100%), xileno y finalmente fueron orientadas e incluidas en parafina de bajo punto de fusión.

Se realizaron cortes de 5 μ m de espesor utilizando un micrótopo Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A dichas secciones se les eliminó la parafina y se las rehidrató para poder realizar tinciones histológicas. Esto se logró sumergiéndolas sucesivamente en xileno y soluciones de etanol de concentración decreciente (100%, 96% y 70%).

- **Parietal derecho (hueso descalcificado)**

Luego del sacrificio, se disecaron los huesos parietales derechos para evaluar por técnicas histológicas la reparación de la lesión mínima descrita previamente.

Los huesos fueron fijados en NBF por 48hs y luego descalcificados por inmersiones sucesivas en soluciones de EDTA 10% (Biopack, Buenos Aires, Argentina), pH = 7,0. Luego de la descalcificación las muestras fueron deshidratadas por inmersión en soluciones con concentraciones crecientes de etanol (70%, 96% y 100%), xileno y finalmente fueron incluidas en parafina de bajo punto de fusión.

Se realizaron cortes longitudinales de la lesión de 5 μm de espesor, utilizando un micrótopo Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), que luego fueron desparafinados y rehidratados con el objetivo de poder realizar tinciones histológicas. Esto se logró sumergiéndolos sucesivamente en xileno y soluciones de etanol de concentración decreciente (100%, 96% y 70%).

- **Metáfisis femoral distal (hueso calcificado)**

Los fémures fueron disecados, despojados de músculos y medidos con un calibre digital. Se fijaron 24hs en NBF, luego de lo cual fueron sumergidos en alcohol 70% y conservados a 4°C hasta su transporte a la Universidad de Florida.

Los huesos fueron deshidratados colocándolos sucesivamente en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%) y xileno. Las muestras se orientaron y luego se utilizaron soluciones de composición variable de metilmetacrilato, dibutil (n-butyl) ftalato y peróxido de benzoilo hasta quedar las muestras incluidas en la resina sólida resultante. Se realizaron cortes de 8 μm de espesor utilizando un micrótopo rotatorio Leica RM 2025 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), que se mantuvieron sin teñir con el fin de evaluar parámetros de histomorfometría dinámica, y cortes de 4 μm de espesor que fueron deplastificados con 2-metoxietil acetato para realizar la tinción de von Kossa con Tetrachrome como contracoloreante.

III. 1. 7. B. Tinciones realizadas.

Con el fin de evaluar distintos aspectos de la histomorfometría ósea, se realizaron las siguientes tinciones:

Hematoxilina & Eosina (H&E): la técnica utiliza dos colorantes, uno básico o catiónico, la hematoxilina, y otro ácido o aniónico, la eosina. Estos colorantes se unen por interacción electrostática a los distintos componentes celulares o de la matriz extracelular que poseen carga. La hematoxilina se une a estructuras que poseen carga negativa al pH que se realiza la tinción y les imparte un color azul-violáceo (estructura basófila). La eosina se une a componentes que poseen carga positiva al pH que se realiza la tinción y les imparte un color rosado (estructura acidófila o eosinófila) (Figura III. 4, Panel A). Son ejemplos de estructuras basófilas los ácidos nucleicos y de estructuras eosinófilas las proteínas.

Los cortes descalcificados, desparafinados e hidratados fueron colocados en hematoxilina por 5 minutos y luego fueron lavados en agua corriente. Posteriormente se colocaron en eosina durante 30 segundos y se lavaron con agua destilada. Los preparados teñidos fueron deshidratados utilizando soluciones de etanol de concentración creciente y luego xileno para poder ser montados con bálsamo sintético (Biopur, Rosario, Argentina).

Tinción histoquímica para fosfatasa ácida tartratorresistente (TRAP): esta tinción se realizó para identificar específicamente osteoclastos [Burstone, 1959]. El método empleado utiliza un sustrato, inicialmente incoloro, que luego de ser hidrolizado enzimáticamente sufre un reordenamiento molecular debido a la reacción con una sal de diazonio [Galvão, 2011]. Esto da lugar a un producto final insoluble coloreado que permite la detección de las regiones donde se produjo la reacción, es decir, aquellas en las que existía la enzima encargada de la hidrólisis mencionada.

Se disolvió Fast Garnet GBC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en metilglicol y se agregó HCl para dar el pH necesario para la reacción de diazotación. Se agregó paulatinamente una solución de nitrito de sodio 0,1% y se dejó reposar por 3 minutos para que se llevara a cabo la reacción.

La mezcla de reacción específica para TRAP se compone de buffer citrato pH=4,9 al que se le adiciona tartrato de sodio para inhibir a las fosfatasas que no son tartratorresistentes y se termostatiza a 37°C. Se agrega la solución de α -Naftol AS-BI fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y luego se adiciona el Fast Garnet diazotado previamente. Se colocan los preparados descalcificados, desparafinados e hidratados y se incuban durante 1 hora en oscuridad.

La hidrólisis del α -Naftol AS-BI fosfato a cargo de la fosfatasa ácida tartratorresistente da lugar a α -naftol que se acopla inmediatamente con la sal de diazonio formada a partir del Fast

Garnet. Esto produce un precipitado insoluble color violeta en las células que poseen actividad de la enzima TRAP (zonas TRAP positivas). Los cortes se contracoloraron con Fast Green y fueron montados con glicerina (Figura III. 4, Panel B).

Azul Alcían (pH=2,5): la tinción se realiza a un pH en el cual el azul alcían (AA) tiñe mucinas altamente sulfatadas, las cuales se verán de color azul [Lefebvre & Bhattaram, 2010]. En este trabajo de tesis la tinción se utilizó para evidenciar la matriz extracelular sintetizada por los condrocitos presentes en el cartílago de crecimiento (Figura III. 4, Panel C).

Los cortes de 5 μm descalcificados, desparafinados e hidratados se sumergieron en la solución de azul alcían 2% en ácido acético durante 4 horas y luego se lavaron con agua destilada por 10 minutos. Finalmente, los preparados se contracoloraron con eosina y se deshidrataron para realizar el montaje con bálsamo sintético (Biopur, Rosario, Argentina).

von Kossa con Tetrachrome como contracolorante: Esta tinción se utiliza para detectar el componente mineral del hueso (fosfato de calcio). Es una tinción negativa para el osteoide y suelen usarse distintos contracolorantes (Tetrachrome en este caso) para diferenciarlo del material mineralizado [Bancroft, 2013].

Se utilizaron cortes de hueso calcificado de 4 μm de espesor previamente deplastificados e hidratados. Los cortes fueron colocados por 15 minutos en solución de nitrato de plata 5% (Fischer Chemical, Fischer Scientific, EEUU) en oscuridad. Se lavaron con agua destilada y luego se colocaron en solución de carbonato de sodio 5% (Fischer Chemical, Fischer Scientific, EEUU) en formaldehído:agua destilada (1:3) por 2 minutos. Luego de lavar con agua destilada, los cortes se colocaron durante 20 segundos en reductor de Farmer, que contiene tiosulfato de sodio 9,5% y ferricianuro de potasio 0,5%. Los preparados se lavaron con agua corriente por 20 minutos y finalmente se tiñeron con la solución de Tetrachrome 2,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante 7 minutos [Hilton, 2014]. Los cortes se deshidrataron y fueron montados con Permount® (Fischer Chemical, Fischer Scientific, EEUU).

La Figura III. 4, Panel D, muestra un preparado teñido con esta tinción. La reducción del catión Ag^+ presente en el nitrato de plata produce un depósito negro en donde existe componente mineral. Por lo tanto, el hueso y el cartílago mineralizado se verán negros. El osteoide se verá de color cian, los núcleos celulares se verán azul oscuro, los citoplasmas azul más claro y el cartílago aparecerá de color azul-violáceo.

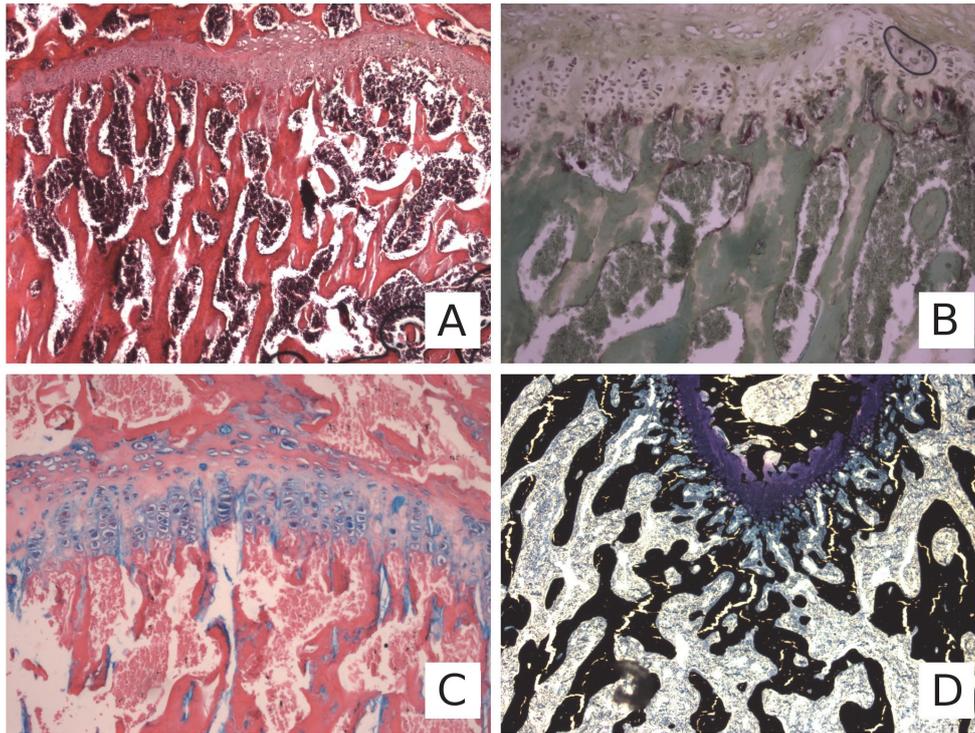


Figura III. 4 – Fotos de preparados teñidos con las distintas tinciones empleadas. (A) Hematoxilina & Eosina; (B) Azul Alcian; (C) Histoquímica para la enzima fosfatasa ácida tartratorresistente; (D) von Kossa con Tetrachrome como contracolorante.

III. 1. 7. C. Evaluación de parámetros de histomorfometría estática.

• Metáfisis femoral proximal

Los cortes fueron fotografiados con un sistema fotográfico Micrometrics 519CU adaptado a un Microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej>) [Molinuevo, 2010].

Con los cortes teñidos con H&E se determinaron los siguientes parámetros:

- *Área trabecular relativa* ($A.Tr/A.T$), [%], definida como la relación entre el área ocupada por el hueso trabecular y el área total de tejido (hueso trabecular + médula ósea).
- *Densidad osteocítica*, [#/ mm^2], definida como el número de osteocitos por mm^2 de hueso trabecular.

Ambos parámetros fueron determinados en la metáfisis femoral proximal (Figura III. 5).

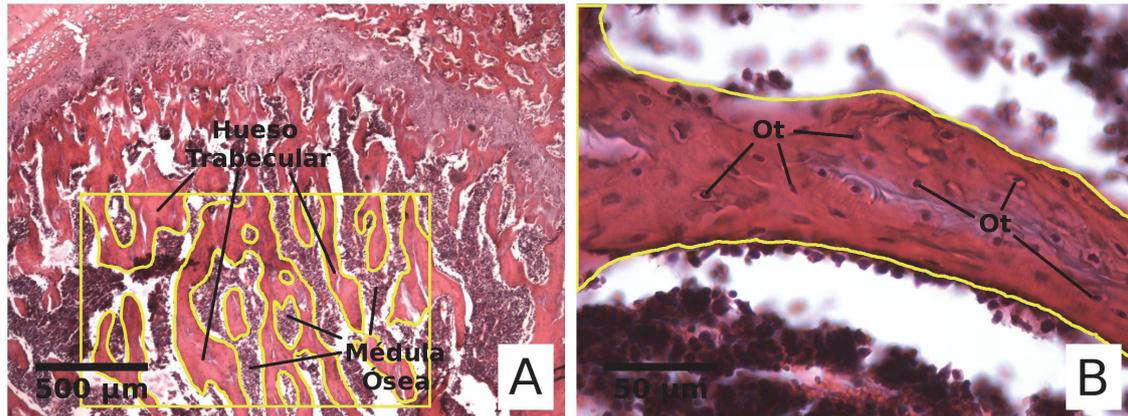


Figura III. 5 - Determinación del porcentaje de hueso trabecular y la densidad osteocítica en la metáfisis femoral proximal en cortes teñidos con Hematoxilina & Eosina. (A) Determinación del porcentaje de área que corresponde a hueso trabecular en un área total (rectángulo) que contiene hueso trabecular y espacios ocupados por médula ósea; (B) número de osteocitos por mm^2 de hueso trabecular.

Las muestras teñidas con AA se utilizaron para determinar la altura media del cartílago de crecimiento femoral proximal (Figura III. 6). Las medidas fueron realizadas paralelo a las columnas de condrocitos en los dos tercios centrales del cartílago [Weise, 2001].

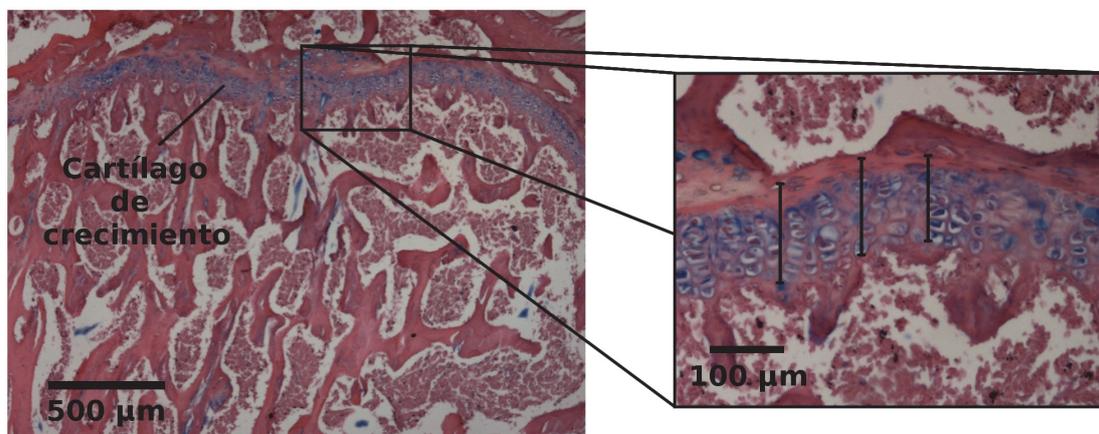


Figura III. 6 - Evaluación del espesor del cartílago de crecimiento utilizando cortes histológicos teñidos con Azul Alcían. La primera sección muestra la ubicación del cartílago de crecimiento en la metáfisis femoral proximal. Luego se muestra una ampliación de la zona y la forma en que se midió el espesor de dicha estructura (segmentos).

La histoquímica para TRAP se realizó para identificar osteoclastos en forma precisa [Burstone, 1959]. La densidad osteoclástica en la esponjosa primaria fue evaluada como área TRAP positiva por mm^2 (Figura III. 7).

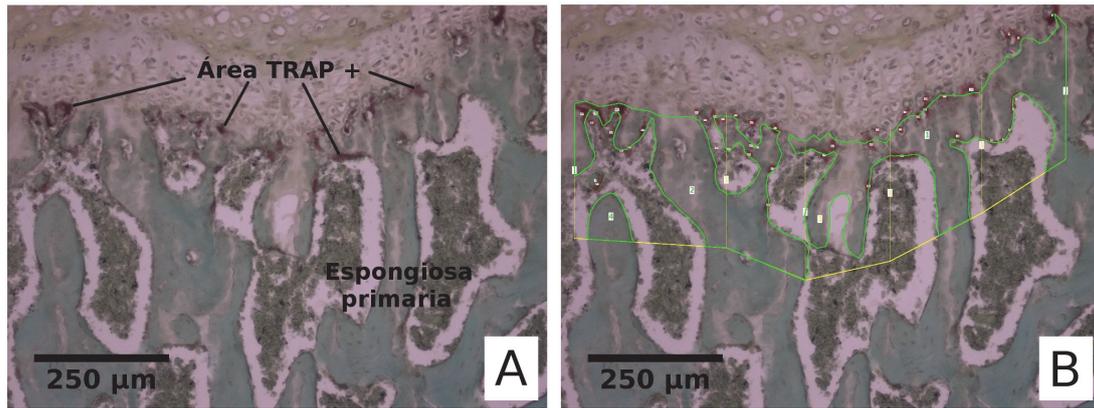


Figura III. 7 - Evaluación de la presencia de zonas con tinción positiva utilizando histoquímica para la enzima fosfatasa ácida tartratorresistente. (A) Se muestra la espongiosa primaria y las áreas TRAP positivas (regiones violeta). (B) Ejemplo de cómo se realiza la determinación del área TRAP positiva por mm².

- **Parietal derecho**

Los cortes fueron fotografiados con un sistema fotográfico Micrometrics 519CU adaptado a un Microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej>) [Molinuevo, 2010].

La tinción con H&E se utilizó para determinar los siguientes parámetros (Figura III. 8, panel A):

- *Área de reosificación*, [μm^2]: cantidad de hueso nuevo formado dentro del defecto parietal.
- *Número de osteocitos/área de reosificación*, [$\#/\text{mm}^2$]: número de osteocitos por mm² de hueso nuevo formado.

La coloración histoquímica de TRAP se usó para evaluar la *densidad osteoclástica*, calculada como el área TRAP positiva por micrómetro de perímetro de lesión [μm] (Figura III. 8, panel B).

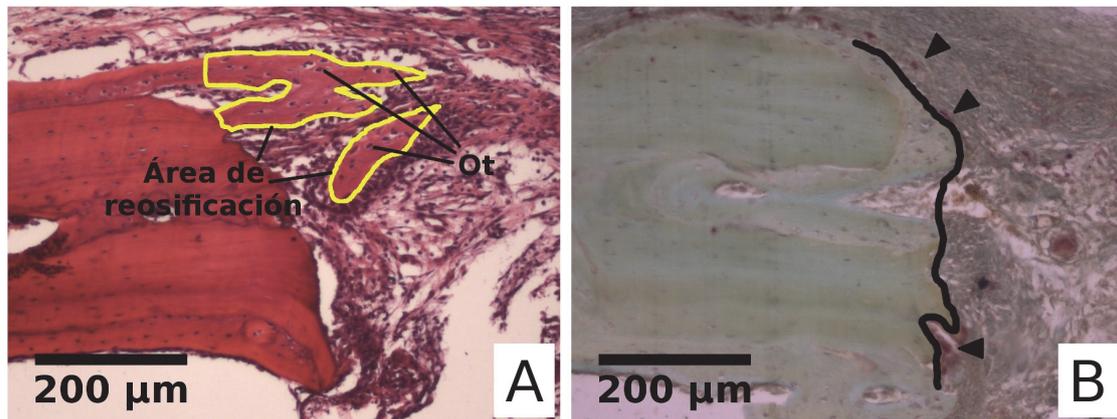


Figura III. 8 - Determinación de parámetros para la evaluación de la capacidad de regeneración de una lesión ósea practicada. (A) Cálculo de la cantidad de área de hueso regenerado en la lesión y número de osteocitos (Ot) en este hueso; H&E. (B) Evaluación del área TRAP positiva (flechas) en el perímetro de la lesión (línea remarcada).

• Metáfisis femoral distal

Las medidas de los parámetros fueron realizados con el software Osteomeasure (Osteometrics Inc., Decatur, GA, EEUU). Se utilizaron cortes de 4 μm de espesor de hueso calcificado previamente teñidos con von Kossa y contracolorados con Tetrachrome (Figura III. 9). El programa permite medir la cantidad de osteoide, osteoblastos, osteoclastos, etc., asociados a superficies óseas, y a partir de ellos calcular los siguientes parámetros:

- ✓ *Volumen de hueso trabecular/volumen total (BV/TV), [%]:* porcentaje del área total del corte analizado que corresponde a hueso trabecular.
- ✓ *Volumen de osteoide/volumen de hueso trabecular (OV/BV), [%]:* porcentaje del volumen total del corte analizado que corresponde a osteoide.
- ✓ *Superficie de osteoide/superficie de hueso trabecular (OS/BS), [%]:* porcentaje del total de la superficie ósea del corte analizado que corresponde a osteoide.
- ✓ *Número de trabéculas (Tr.N), [#/mm]*
- ✓ *Espesor de las trabéculas (Tb.Th), [μm]*
- ✓ *Separación entre trabéculas (Tr.S), [μm]*
- ✓ *Superficie de osteoblastos/superficie de hueso trabecular (Ob.S/BS), [%]:* porcentaje de la superficie del hueso trabecular ocupado por osteoblastos.
- ✓ *Superficie de osteoclastos/superficie de hueso trabecular (Oc.S/BS), [%]:* porcentaje de la superficie del hueso trabecular ocupado por osteoclastos.
- ✓ *Superficie erosionada/superficie de hueso trabecular (ES/BS), [%]:* porcentaje de la superficie del hueso trabecular que ha sido erosionada por osteoclastos.

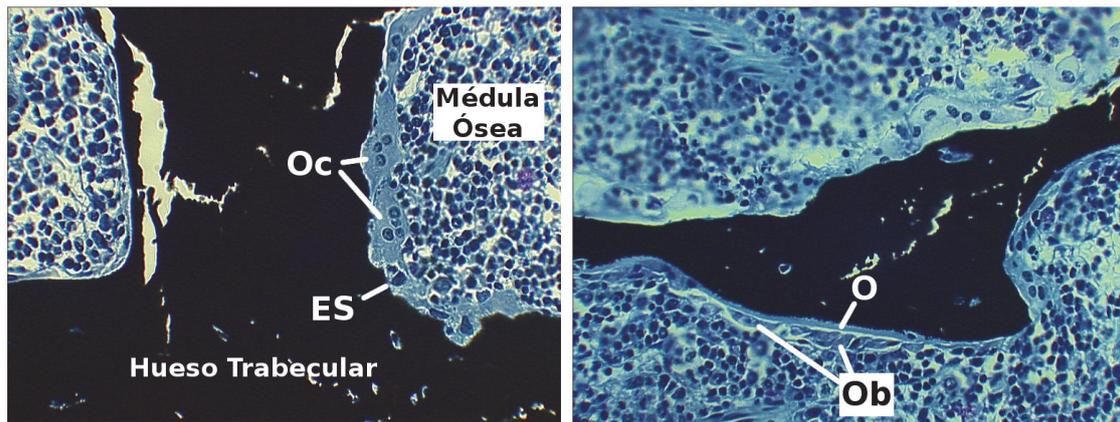


Figura III. 9 – Fotos de cortes de metáfisis femoral distal teñidos con la tinción de von Kossa y contracolorados con Tetrachrome. O: osteoide; ES: superficie erosionada; Oc: osteoclastos; Ob: osteoblastos.

III. 1. 7. D. Evaluación de parámetros de histomorfometría dinámica.

- **Metáfisis femoral distal**

Los parámetros fueron medidos con el software Osteomeasure (Osteometrics Inc., Decatur, GA, EEUU). Se utilizaron cortes de 8 μm de espesor de hueso calcificado que fueron observados en un microscopio (Nikon Labophot-2, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EEUU) utilizando luz UV. Esto pone en evidencia las zonas de la superficie ósea que captaron los fluorocromos inyectados (Figura III. 10). Las longitudes de onda de excitación y emisión son, respectivamente, 470 nm y 509 nm para la calceína (datos del fabricante del reactivo), y 458 nm y 535 nm para el cloruro de demeclociclina [Pautke, 2010].

El software utilizado para el análisis permite delimitar las superficies de hueso trabecular donde existe una marcación doble (dLS) o una marcación simple (sLS). A partir de estas medidas, e ingresando el tiempo (en días) que existió entre las marcas, el software calcula los siguientes parámetros:

- ✓ *Superficie de mineralización/superficie total de hueso trabecular (MS/BS), [%]:* porcentaje de la superficie del hueso trabecular donde existía marcación. El algoritmo que utiliza el software es $MS/BS = dLS + 1/2sLS$.
- ✓ *Tasa de aposición de mineral (MAR), [$\mu\text{m}/\text{d}$]:* es calculado por el programa teniendo en cuenta el tiempo que existió entre las inyecciones de los dos fluorocromos y la distancia media entre ambas marcas fluorescentes.

- ✓ Tasa de formación de hueso/superficie de hueso (BFR/BS), [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{día}$]: se obtiene realizando el producto entre los dos parámetros anteriores.

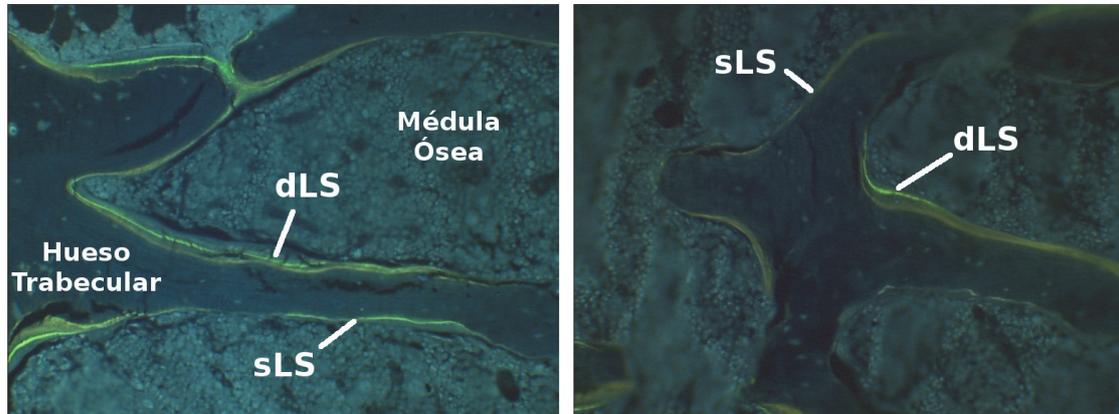


Figura III. 10 – Fotos de cortes de metáfisis femoral distal, observados en un microscopio provisto con luz UV para observar los fluorocromos incorporados en el hueso trabecular en crecimiento. dLS: superficie con doble marcación; sLS: superficie con simple marcación.

Otro parámetro calculado utilizando las marcas observadas fue la tasa de crecimiento longitudinal del hueso [$\mu\text{m}/\text{día}$]. Para ello se determinó la distancia entre la segunda marca en la esponjosa primaria y el límite entre condrocitos hipertróficos y proliferativos del cartilago de crecimiento. Ingresando en el programa el tiempo desde la última marca y el sacrificio (3 días en nuestro esquema experimental) se puede calcular la cantidad de μm que el hueso creció por día.

III. 3. Estudios ex vivo

III. 3. 1. Obtención e incubación de células estromales mesenquimáticas (MSC) de rata

Las células estromales mesenquimáticas (MSC, por sus siglas en inglés) fueron obtenidas del canal medular diafisario femoral. Inmediatamente luego del sacrificio, se seccionaron las epífisis de un fémur y se inyectó medio de cultivo esencial modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified essential medium*, Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) a través del canal medular en condiciones de esterilidad [Tropel, 2004].

La suspensión obtenida fue incubada en frascos de cultivo de 25 cm² con el mismo medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Natocor, Córdoba, Argentina), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ y 95% de aire. Luego de 24hs de incubación, se procedió a cambiar el medio de cultivo y de esta forma se descartaron las células que no se habían adherido al plástico [Molinuevo, 2010].

Cuando las células alcanzaron confluencia (luego de 10 a 15 días), la monocapa celular fue despegada utilizando una solución 0,025% de tripsina (GIBCO, Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) en PBS – EDTA 1mM. Las células se resuspendieron en DMEM con SFB 10% y fueron repicadas en frascos de 75 cm² o en platos de cultivo multipocillo.

III. 3. 2 Diferenciación osteoblástica de MSC

Las células previamente obtenidas fueron plaqueadas a una densidad de 5x10⁴ células/pocillo en platos de 24 pocillos y fueron incubadas en DMEM suplementado con SFB 10% y antibióticos, a 37°C, en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Cuando los cultivos alcanzaron 70-80% de confluencia, se comenzó la diferenciación osteoblástica mediante el agregado de medio osteogénico. Dicho medio estaba compuesto por DMEM – SFB 10% y antibióticos, al que se le adicionó ácido ascórbico (25 µg/ml) y β-glicerol-fosfato de sodio (5 mM) y fue cambiado 3 veces por semana. El tratamiento fue mantenido por 15 y 21 días [Molinuevo, 2010].

Antes de iniciar la diferenciación osteoblástica y luego de los 15 días de incubación se midieron los niveles de fosfatasa alcalina (FAL) y producción de colágeno tipo 1, parámetros característicos de diferenciación hacia ese linaje. Luego de 21 días de diferenciación se midió la

producción de depósitos extracelulares de calcio. Las técnicas empleadas se describen en la siguiente sección.

Los dos compuestos agregados al medio de cultivo son los responsables de la expresión fenotípica osteoblástica. El ácido ascórbico es necesario para la producción de colágeno secretado a la matriz extracelular y para inducir la actividad de fosfatasa alcalina. El β -glicerofosfato es un donador de fosfatos que tiene una actividad sinérgica con el ácido ascórbico en promover la expresión del fenotipo osteoblástico (actividad de fosfatasa alcalina y acumulación de la matriz de colágeno), y es necesario para la mineralización de la matriz extracelular [Quarles, 1992].

III. 3. 2. A. Determinación de parámetros de diferenciación osteoblástica

Actividad de Fosfatasa Alcalina (FAL)

Para obtener el extracto celular a partir del cual se hicieron las determinaciones, previo a la diferenciación o luego de 15 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénico, se lavó la monocapa celular con PBS y se lisó con 200 μ L de solución de Tritón X-100 0,1%. Una alícuota del extracto celular obtenido se utilizó para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford [Bradford, 1976]. Otra alícuota fue utilizada para evaluar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina se determinó por un método colorimétrico cinético en el cual se evalúa la producción de p-nitrofenol (p-NP) a partir de la hidrólisis del sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP). La reacción se lleva a cabo a 37°C, pH = 10,40 y durante un tiempo determinado. El p-NP es un compuesto coloreado por lo que se registra su producción espectrofotométricamente a 405 nm [Cortizo, 1995].

Los resultados calculados como nmoles de p-NP/mg de proteína/minuto se expresaron como porcentaje (%) del control.

Producción de colágeno tipo 1

Las células crecidas en los pocillos fueron fijadas con solución de Bouin (compuesta por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial en proporción 15:5:1) durante 1 hora. Luego se lavaron los pocillos con HCl 0,1 N y se tiñeron con solución del colorante Sirius Red por 1 hora. El colorante retenido se extrajo en 1 mL de NaOH 0,1 N y se registró la absorbancia a 550 nm

[Tullberg-Reinert & Jundt, 1999]. Se realizó en paralelo una curva de calibración utilizando colágeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). La cantidad de proteínas fue determinada por el método de Bradford [Bradford, 1976].

Los resultados calculados como μg de colágeno/100 μg de proteína se expresaron como porcentaje (%) del control.

Producción de depósitos extracelulares de calcio (nódulos de mineralización)

La evaluación se realizó por un método colorimétrico [Ueno, 2001]. Luego de 21 días de diferenciación osteogénica, las monocapas celulares se fijaron con formalina y se tiñeron con Rojo de Alizarina. El colorante adherido a los depósitos de calcio se extrajo con 1 mL de solución de NaOH 0,1 N y se evaluó la absorbancia a 548 nm.

Los resultados se expresaron como porcentaje (%) del control.

III. 3. 3. Diferenciación adipogénica de MSC

Las MSC obtenidas fueron plaqueadas a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en platos de 24 pocillos y fueron incubadas en DMEM suplementado con SFB 10% y antibióticos, a 37°C, en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Cuando los cultivos alcanzaron confluencia, se comenzó la diferenciación adipogénica con el agregado de un medio compuesto por DMEM – SFB 10% suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 μM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), dexametasona 1 μM (Decadrón, Sidus, Argentina) e insulina 200 nM (Lilly, Buenos Aires, Argentina). La incubación se realizó por 10 días y se cambió el medio de cultivo 3 veces por semana.

Muchos de los agentes utilizados para inducir diferenciación adipocítica *in vitro* se han obtenido empíricamente. Se cree que la dexametasona actúa activando al receptor de glucocorticoides (GR), que es un receptor nuclear de hormonas (de la misma superfamilia que el PPAR γ). Induce el factor de transcripción C/EBP δ (CCAAT/enhancer binding protein δ), que podría ser responsable de cierta actividad adipogénica. Además, reduce la expresión de pref-1 (*preadipocyte factor -1*), un regulador negativo de la adipogénesis [Rosen and Spiegelman, 2000].

La insulina aumenta el porcentaje de células que se diferencian hacia adipocitos, y también incrementa la cantidad de lípidos que se acumulan en cada una de estas células. Activa

diferentes vías de señalización que podrían mediar los efectos adipogénicos de esta hormona. También posee actividad antiapoptótica [Rosen and Spiegelman, 2000].

El IBMX se une y activa a PPAR γ , factor de transcripción clave para la diferenciación adipocítica y para el mantenimiento del fenotipo adipocítico.

Luego del período de diferenciación, las células fueron lisadas con 100 μ L de solución de Tritón X-100 0,1% y se determinaron los depósitos intracelulares de triglicéridos (TG) utilizando un kit enzimático colorimétrico comercial (Wiener, Rosario, Argentina). Los lisados fueron incubados en el buffer de reacción (de acuerdo a las instrucciones del fabricante) y se midió la absorbancia a 505 nm. También se determinó el contenido de proteínas de los lisados por el método de Bradford [Bradford, 1976]. Los resultados se expresaron como g de TG/L/mg de proteína.

III. 3. 4. Determinación de niveles de expresión de factores de transcripción por Western Blot

Las MSC aisladas fueron cultivadas en platos de 6 pocillos en DMEM – SFB 10% hasta alcanzar confluencia y luego fueron diferenciados a osteoblastos o adipocitos por los períodos descritos previamente. Se obtuvieron lisados de las células diferenciadas y de las células previo a la diferenciación utilizando buffer de Laemmli [Laemmli, 1970]. Los lisados fueron calentados a 100°C durante 1 minuto y se sembraron 30 μ g de proteína en un gel de 10% de poliacrilamida-bisacrilamida desnaturalizante (con SDS). Las proteínas fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE y fueron transferidas a membranas de PVDF. Se realizó el bloqueo con solución de leche al 5% en PBS-T. Luego las membranas fueron incubadas durante la noche a 4°C con un anticuerpo primario contra Runx2/Cbfa1 1:5.000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) para evaluación de osteoblastogénesis o contra PPAR γ 1:7.000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) para evaluación de adipogénesis. Luego de lavar las membranas, se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente en concentraciones que variaron entre 1:10.000 y 1:15.000. Con el objetivo de normalizar los resultados, se realizó otra electroforesis con los lisados para determinar la cantidad de α -actina (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA).

Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia y la intensidad de las bandas correspondientes fue cuantificada por densitometría, luego del escaneo de las placas fotográficas, utilizando un *plugin* del programa ImageJ (<http://www.macbiophotonics.ca>)

[Molinuevo, 2010].

III. 4. Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para comparar dos grupos experimentales, se utilizó el test t de Student. Para analizar más de dos grupos experimentales se utilizó el test de ANOVA con Tukey como post test. En ambos casos se utilizó el programa InStat Graph Pad 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Capítulo IV

Resultados

IV. 1. Efectos del Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa sobre el metabolismo óseo

IV. 1. 1. Peso corporal y evaluación bioquímica de los grupos experimentales

La evaluación de los pesos corporales luego del período de tratamiento no mostró diferencias significativas, siendo $253,3 \pm 10,2$ g para el grupo control (C) y $252,0 \pm 10,2$ g para el grupo de dieta rica en fructosa (DRF).

La Tabla IV. 1 muestra los perfiles bioquímicos postprandiales registrados en los animales provenientes de los dos grupos experimentales.

| | Glucosa [mg/dL] | Insulina [ng/mL] | Triglicéridos [mg/dL] | Fructosamina [μ mol/L] | Colesterol [mg/dL] |
|-----|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| C | 164 ± 6 | $1,26 \pm 0,17$ | $71,5 \pm 6,3$ | 147 ± 26 | $47,9 \pm 1,7$ |
| DRF | 250 ± 19^b | $5,22 \pm 1,35^c$ | $148,4 \pm 11,2^a$ | 229 ± 20^c | $49,3 \pm 1,1$ |

Tabla IV. 1. Perfiles séricos postprandiales de los animales luego de 28 días de recibir o no fructosa en el agua de bebida. Diferencias con respecto al grupo C: ^a $p < 0,0001$, ^b $p < 0,002$, ^c $p < 0,05$.

El grupo de ratas que recibió la sobrecarga de fructosa en el agua de bebida mostró hiperglucemia (52% mayor que el grupo C), hiperinsulinemia (313% mayor que C), hipertrigliceridemia (108% mayor que C) y valores elevados de fructosamina (56% mayor que C). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en los valores de colesterol. Este perfil es compatible con un estado metabólico asociado a un Síndrome Metabólico.

IV. 1. 2. Análisis histomorfométrico estático de la microarquitectura metafisaria femoral proximal

El análisis de la longitud femoral no mostró diferencias significativas entre los grupos C y DRF registrándose un largo de $32,5 \pm 0,5$ mm para el primero y un largo de $31,3 \pm 0,8$ mm para el segundo.

En la Figura IV. 1. 2. 1 se muestran imágenes de preparados teñidos con Hematoxilina & Eosina y los resultados obtenidos al evaluar el porcentaje de hueso trabecular y la densidad de osteocitos. El grupo DRF mostró un descenso significativo en el número de osteocitos/mm² de

hueso trabecular (reducción del 19% versus C) y si bien el área trabecular también mostró una tendencia a la disminución (C: $44,0 \pm 4,8$ % vs. DRF: $39,5 \pm 4,5$ %), esta no resultó estadísticamente significativa.

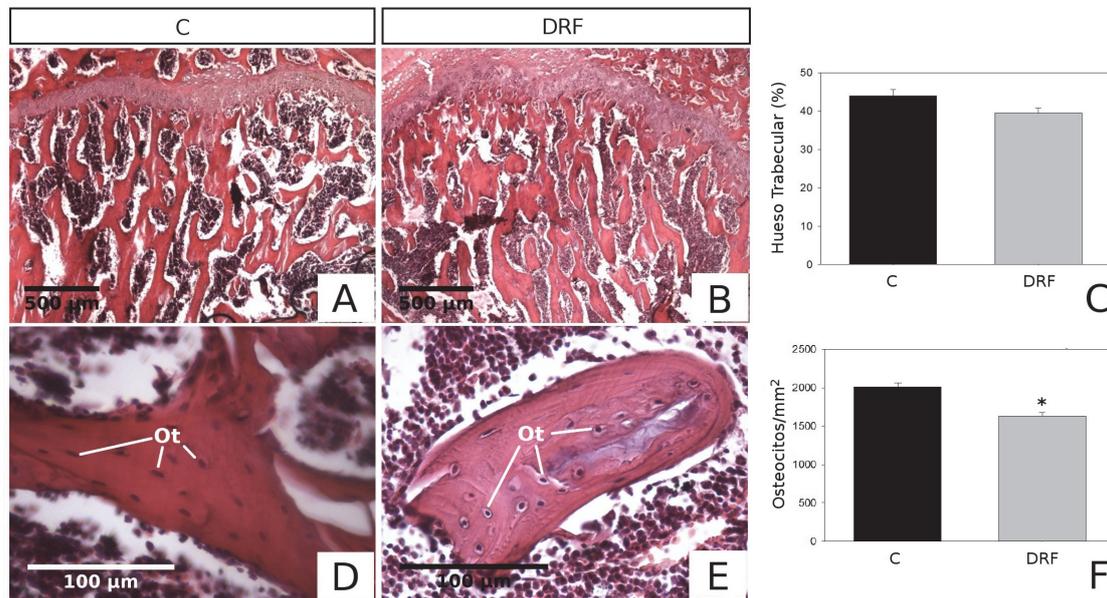


Figura IV. 1. 2. 1. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre la microarquitectura femoral proximal. Fotografías representativas de cortes histológicos de la metáfisis femoral proximal teñidos con Hematoxilina & Eosina provenientes de ratas controles (A y D) y DRF (B y E). Los paneles C y F muestran la cuantificación de los parámetros histomorfométricos. Ot: osteocitos. Diferencias: * $p < 0,0001$ versus C.

La evaluación de la altura de la placa de crecimiento (cartílago epifisario) en los cortes teñidos con Azul Alcán no mostró diferencias entre los grupos (Figura IV. 1. 2. 2, paneles A-C).

El análisis de la histoquímica para TRAP mostró que en las ratas pertenecientes al grupo DRF, existía una reducción en la densidad osteoclástica de la esponjosa primaria femoral (30% de disminución versus C, Figura IV. 1. 2. 2, paneles D-F). No se encontraron diferencias en la adiposidad de la médula ósea (datos no mostrados).

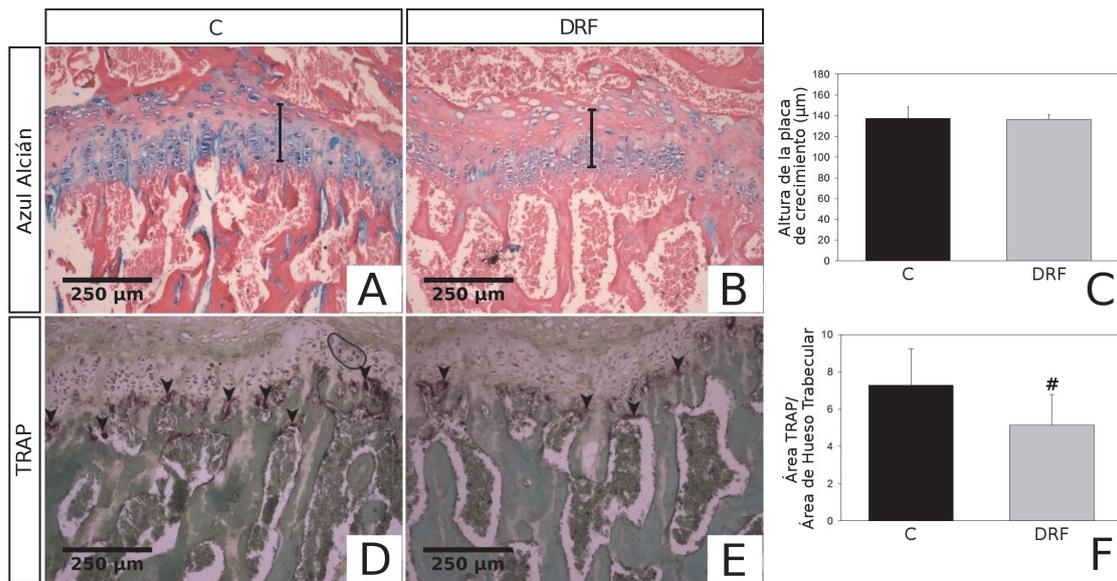


Figura IV. 1. 2. 2. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre la microarquitectura femoral proximal. Fotografías representativas de cortes histológicos de la metáfisis femoral proximal de ratas controles (A y D) y DRF (B y E) teñidos con Azul Alcian (A y B) o histoquímica para TRAP (D y E). Los paneles C y F muestran la cuantificación de los parámetros histomorfométricos. Flechas: área TRAP positiva. Diferencias: # $p < 0,05$ versus C.

IV. 3. Análisis de la capacidad de regeneración ósea

En la Figura IV. 1. 3. 1 se muestran cortes representativos de la lesión practicada en el parietal derecho de ratas pertenecientes al grupo control (A, D y G) y DRF (B, E, H). Los gráficos de los paneles C, F e I representan las cuantificaciones de los parámetros medidos para evaluar la capacidad de regenerar el hueso en la zona de la lesión practicada.

El grupo DRF registró una disminución en la cantidad de tejido óseo neoformado en la lesión (40% del área de reosificación del grupo C, Figura IV. 1. 3. 1, panel C). Se observó que en este nuevo hueso existía una menor cantidad de osteocitos por unidad de área (88% del grupo C, Figura IV. 1. 3. 1, panel F). Además, las ratas pertenecientes al grupo DRF mostraron una menor superficie de osteoclastos cubriendo el perímetro de la lesión, evidenciado a través de la tinción histoquímica para TRAP (66% del grupo C, Figura IV. 1. 3. 1, panel I).

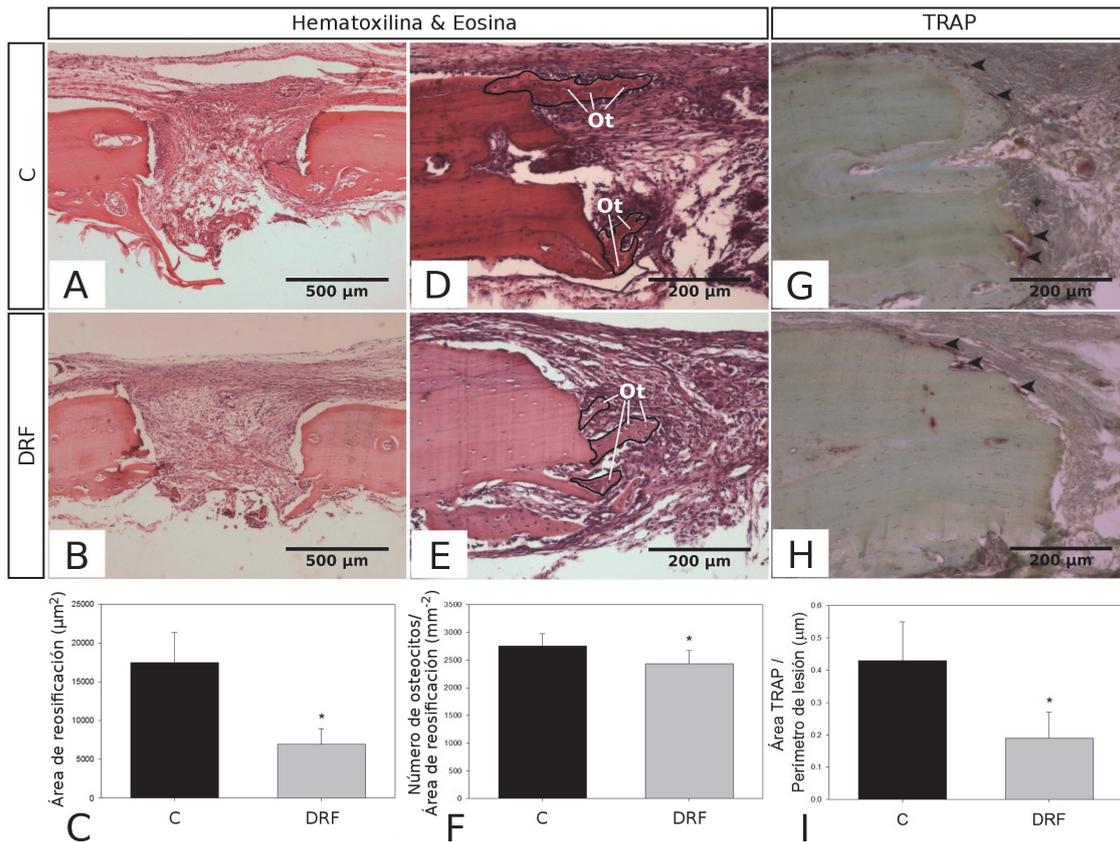


Figura IV. 1. 3. 1. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre la reparación de una lesión en el hueso parietal. Fotografías representativas de cortes histológicos de la lesión en el parietal derecho de ratas controles (A, D y G) y DRF (B, E y H), teñidos con Hematoxilina & Eosina (A, B, D y E) o histoquímica para TRAP (G y H). La cuantificación de los parámetros se muestra en los paneles C, F e I. Ot: osteocitos. Diferencias versus C: * $p < 0,01$.

IV. 1. 4. Evaluación del potencial osteogénico de MSC

En estos experimentos se investigó también el efecto de la inducción de Síndrome Metabólico por una dieta rica en fructosa, sobre el potencial osteogénico de células estromales de medula ósea. Para ello se aislaron células de la cavidad medular presente en la diáfisis de uno de los fémures de cada rata de ambos grupos experimentales, se las cultivó durante diferentes periodos de tiempo y se determinaron parámetros de diferenciación osteogénica previo a la diferenciación hacia este fenotipo (valores basales). Las células provenientes del grupo DRF mostraron una actividad de fosfatasa alcalina menor (FAL, disminución del 28%) y una reducida producción de colágeno tipo 1 (disminución del 32%) cuando se los comparaba con los valores obtenidos en las células provenientes de ratas control (Figura IV. 1. 4. 1).

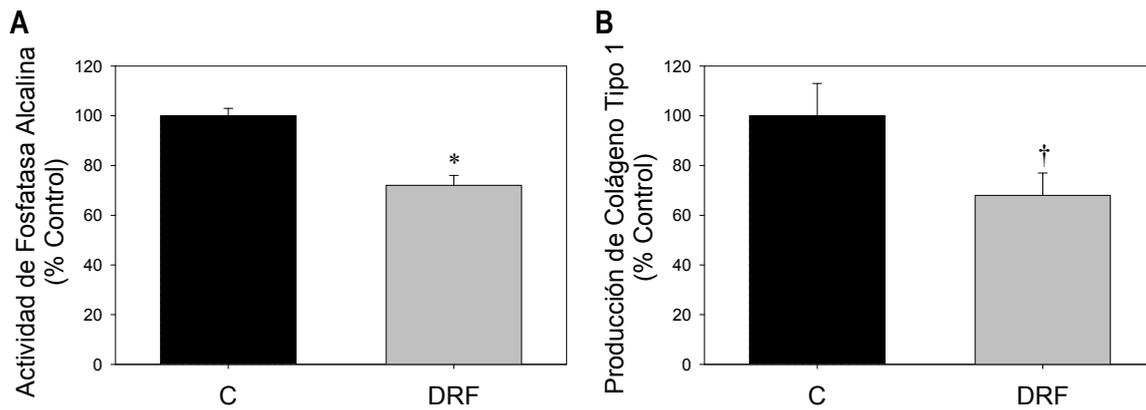


Figura IV. 1. 4. 1. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre el potencial osteogénico de las MSC - Niveles Basales de marcadores osteogénicos. Previo a la inducción osteogénica, se evaluó (A) la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) y (B) la producción de colágeno tipo 1. Diferencias versus C: * $p < 0,05$, † $p < 0,02$.

Luego de 15 días de diferenciación osteogénica, las MSC provenientes de las ratas del grupo DRF expresaron niveles más bajos de FAL (disminución del 37%) y produjeron una menor cantidad de colágeno tipo 1 (disminución del 25%) cuando se compararon con los parámetros de las ratas controles (Figura IV. 1. 4. 2).

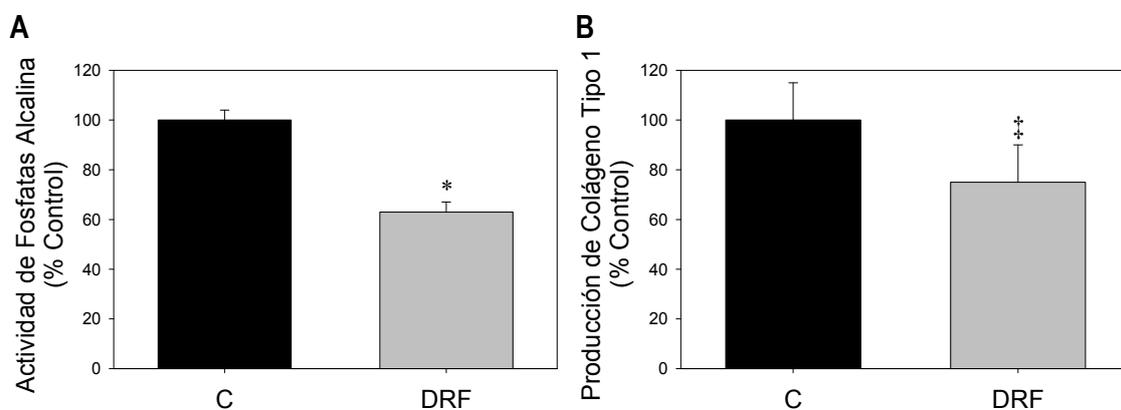


Figura IV. 1. 4. 2. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre el potencial osteogénico de las MSC - Niveles de marcadores osteogénicos luego de 15 días de inducción osteogénica. Las MSC aisladas de ambos grupos experimentales fueron sometidas a inducción osteogénica por 15 días. Luego se evaluó (A) la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) y (B) la producción de colágeno tipo 1. Diferencias versus C: * $p < 0,05$, ‡ $p < 0,01$.

Luego de 21 días de inducción osteogénica, las MSC provenientes de ratas con SM inducido por fructosa produjeron una cantidad significativamente menor de nódulos extracelulares de mineralización (Figura IV. 1. 4. 3).

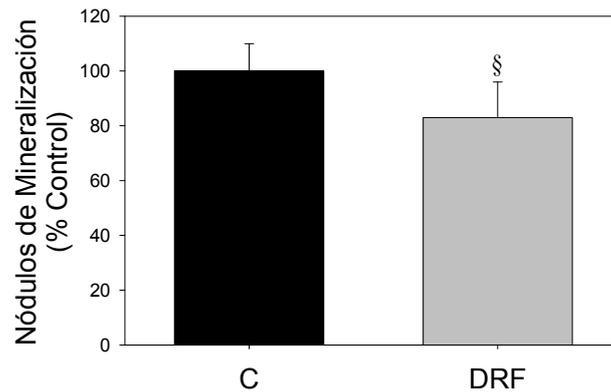


Figura IV. 1. 4. 3. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre el potencial osteogénico de las MSC – Producción de depósitos extracelulares de calcio. Las MSC aisladas de ambos grupos experimentales fueron sometidas a inducción osteogénica por 21 días. Luego se evaluó la formación de nódulos de mineralización. Diferencias: § $p < 0,001$ versus C.

IV. 1. 5. Evaluación del potencial adipogénico de MSC

A continuación, se investigó la capacidad de las MSC para diferenciarse al fenotipo adipocítico. Previo a la diferenciación hacia este linaje, las células provenientes del grupo DRF ya mostraron una mayor acumulación de triglicéridos intracelulares que las células provenientes de ratas controles. Luego de 10 días de inducción adipogénica, las células provenientes de ambos grupos experimentales incrementaron la cantidad de triglicéridos intracelulares, pero el grupo DRF lo hizo en mayor proporción que el grupo C (Figura IV. 1. 5. 1).

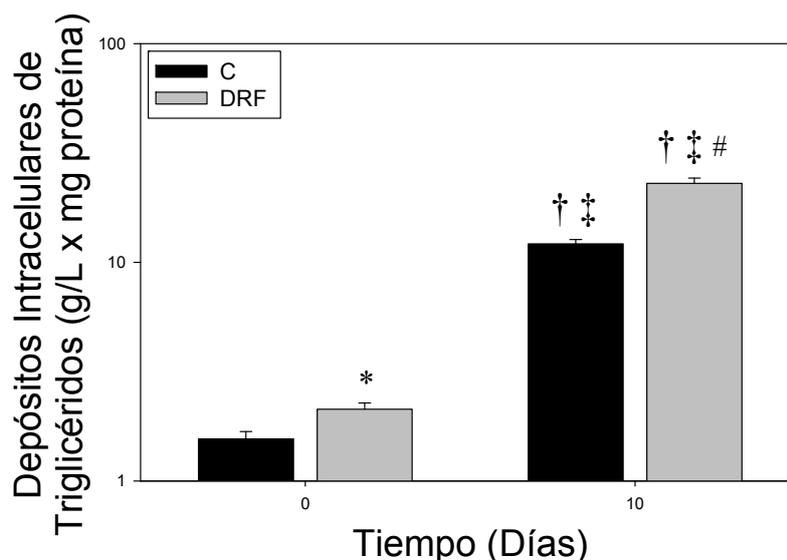


Figura IV. 1. 5. 1. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre el potencial adipogénico de las MSC. Las MSC aisladas de ambos grupos experimentales fueron sometidas (o no) a una inducción adipogénica. Luego se evaluaron los niveles intracelulares de triglicéridos. Diferencias: * $p < 0,05$ vs C0d, † $p < 0,001$ vs C0d, ‡ $p < 0,001$ vs DRF0d, # $p < 0,001$ vs C10d.

IV. 1. 6. Expresión de factores de transcripción osteogénicos y adipogénicos

A continuación se evaluaron posibles efectos del Síndrome Metabólico inducido por fructosa sobre la expresión de Cbfa1/Runx2, un marcador de osteoblastogénesis, y de PPAR γ , un marcador de adipogénesis, por Western Immunoblotting. Para esto se utilizaron extractos celulares obtenidos de cultivos diferenciados hacia alguno de los dos fenotipos mencionados (Sección III. 3).

Previo a la diferenciación osteogénica, la expresión de Cbfa1/Rux2 era mayor en las células controles cuando se las comparaba con los valores hallados en las células del grupo DRF. Como era de esperar, luego de la inducción hacia el fenotipo osteoblástico ambos grupos elevaron la expresión de este marcador, aunque el grupo C lo hizo en mayor proporción (40% para C y 24% para DRF) aumentando la diferencia entre ambos grupos (Figura IV. 1. 6. 1).

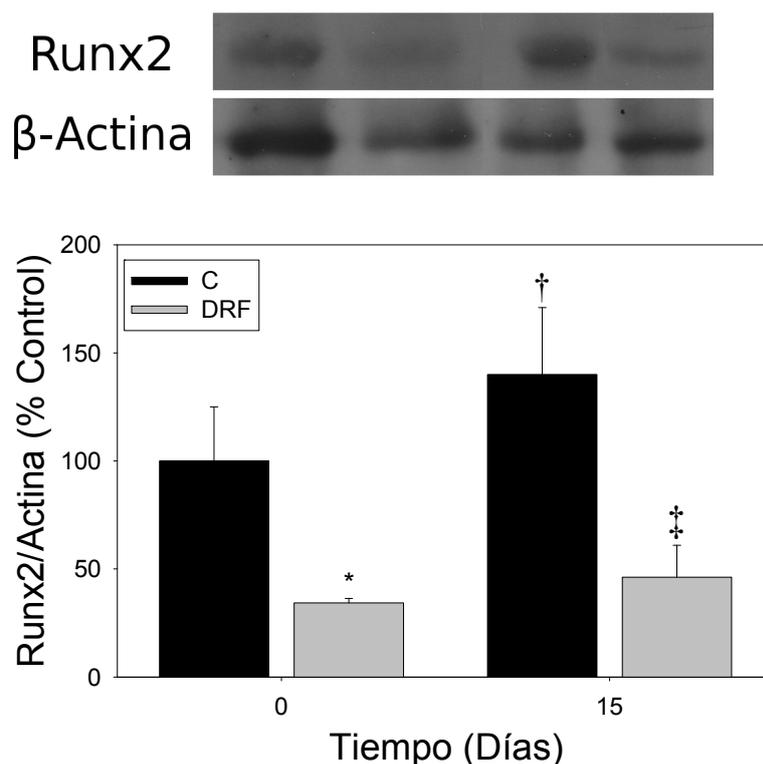


Figura IV. 1. 6. 1. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre la expresión de Runx2 en MSC. Las MSC aisladas de ambos grupos experimentales fueron sometidas (o no) a una inducción osteogénica. Se obtuvieron lisados celulares y se evaluó la expresión del factor de transcripción osteoblástico Runx2 por Western Blot. Diferencias: * $p < 0,05$ vs C0d, † $p < 0,001$ vs DRF0d, ‡ $p < 0,001$ vs C15d.

Por otro lado, previo a la diferenciación adipocítica, las células provenientes del grupo DRF mostraron una mayor expresión de PPAR γ que las del grupo C. Luego de los 10 días de

diferenciación hacia adipocitos, las células del grupo control elevaron su expresión de PPAR γ mientras que las del grupo DRF no incrementaron en gran medida los valores ya elevados en el estado basal (Figura IV. 1. 6. 2).

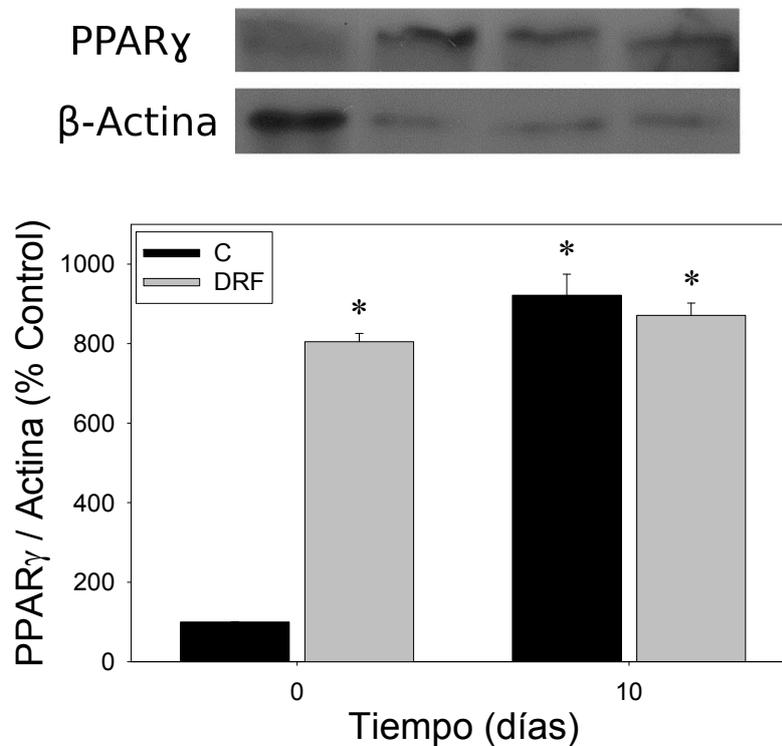


Figura IV. 1. 6. 2. Efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre la expresión de PPAR γ en MSC. Las MSC aisladas de ambos grupos experimentales fueron sometidas (o no) a una inducción adipogénica. Se obtuvieron lisados celulares y se evaluó la expresión del factor de transcripción adipogénico PPAR γ por Western Blot. Diferencias: * $p < 0,001$ vs C0d.

El cálculo de la relación Runx2/PPAR γ (Tabla IV. 2) mostró que, en el estado previo a la diferenciación osteogénica o adipogénica, las células provenientes del grupo DRF mostraron un compromiso mayor hacia el fenotipo adipocítico, siendo el valor de esta relación 25 veces menor que el calculado para las células provenientes del grupo control.

| | C | DRF |
|---------------------|---|-------|
| Runx2/PPAR γ | 1 | 0,043 |

Tabla IV. 2. Relación entre los niveles de expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipocíticos en las células extraídas de ambos grupos experimentales previo a su diferenciación (estado basal).

IV. 2. Efectos del tratamiento oral con metformina sobre las alteraciones en la microarquitectura ósea producidas por el Síndrome Metabólico inducido por una dieta rica en fructosa

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al analizar los efectos del SM inducido por fructosa sobre el metabolismo óseo, se procedió a evaluar si se podían prevenir las alteraciones encontradas con una terapia oral con metformina. Se utilizó el esquema experimental descrito en la Sección III. 1. 2.

IV. 2. 1. Peso corporal y evaluación bioquímica de los grupos experimentales

No se observaron diferencias significativas en los pesos corporales entre los distintos grupos experimentales al finalizar el tratamiento ($284,0 \pm 14,3$ g para C, $279,0 \pm 14,0$ g para CM, $286,7 \pm 15,8$ g para DRF y $289,0 \pm 12,2$ g para DRFM).

La Tabla IV. 3 resume los resultados obtenidos al evaluar los perfiles bioquímicos postprandiales de los distintos grupos experimentales.

| | C | CM | DRF | DRFM |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Glucosa [mg/dL] | $170,0 \pm 8,3$ | $160,8 \pm 8,6$ | $214,6 \pm 12,3$ ^{a e} | $194,7 \pm 9,9$ |
| Insulina [ng/mL] | $1,18 \pm 0,75$ | $1,09 \pm 0,30$ | $5,89 \pm 0,98$ ^{a d} | $4,02 \pm 3,10$ |
| Triglicéridos [mg/dL] | $70,0 \pm 6,1$ | $58,4 \pm 4,7$ | $130,1 \pm 7,8$ ^{c f} | $115,8 \pm 7,3$ ^{c f} |
| Fructosamina [μ mol/L] | 130 ± 21 | 190 ± 13 | 218 ± 19 ^a | 239 ± 16 ^b |
| Colesterol [mg/dL] | $46,9 \pm 1,5$ | $47,9 \pm 0,7$ | $51,1 \pm 1,4$ | $45,9 \pm 1,9$ |

Tabla IV. 3. Perfiles séricos postprandiales luego de 35 días de tratamiento. Diferencias: ^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,02$ vs C; ^c $p < 0,001$ vs C; ^d $p < 0,05$ vs CM; ^e $p < 0,01$ vs CM; ^f $p < 0,001$ vs CM.

Los valores de glucemia muestran una elevación en el grupo de ratas que ingirió fructosa (26% mayor que el grupo control). El valor registrado en el grupo que recibió el tratamiento con

fructosa y metformina muestra una normalización de dicho valor luego de dos semanas de administración de la droga (sin diferencia significativa con respecto a los animales controles). El grupo que recibió metformina solamente, tampoco mostró cambios en los valores de glucemia, lo cual concuerda con la acción normoglucemiante de este fármaco.

Los valores de insulinemia registrados en el grupo DRF fueron elevados con respecto al grupo control. La administración oral de metformina no modificó significativamente la insulinemia (CM versus C; y DRFM versus DRF).

Los triglicéridos plasmáticos también mostraron un aumento marcado en el grupo de ratas que recibieron la dieta rica en fructosa (85% mayor que el grupo control). Este efecto fue prevenido parcialmente por la metformina (65% mayor que el control; 11% menor que el grupo DRF).

Los valores de fructosamina se incrementaron significativamente en el grupo DRF con respecto al control. La administración oral de metformina por dos semanas no fue capaz de prevenir estos efectos observados.

No se observaron diferencias significativas en los valores de colesterol en sangre.

Por lo tanto, la dieta rica en fructosa induce alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico compatibles con el desarrollo de un Síndrome Metabólico, y estos cambios son prevenidos parcialmente por un tratamiento oral con metformina.

IV. 2. 2. Análisis de la longitud de huesos

Los valores registrados al medir la longitud de los fémures no mostraron diferencias significativas, registrándose una longitud de $32,58 \pm 0,19$ mm para el grupo C, $32,20 \pm 0,19$ mm para el grupo CM, $32,12 \pm 0,21$ mm para el grupo DRF y $32,20 \pm 0,16$ mm para el grupo DRFM.

Tampoco se vieron diferencias en las tibias, obteniéndose longitudes de $37,61 \pm 0,27$ mm para el grupo C, $37,03 \pm 0,08$ mm para el grupo CM, $36,99 \pm 0,25$ mm para el grupo DRF y $37,50 \pm 0,23$ mm para el grupo DRFM.

Esta misma tendencia se vio en la longitud de los cuerpos vertebrales de la primera vértebra lumbar, registrándose longitudes similares para los cuatro grupos experimentales ($6,09 \pm 0,02$ mm para el grupo C, $6,51 \pm 0,26$ mm para el grupo CM, $6,43 \pm 0,10$ mm para el grupo DRF y $6,30 \pm 0,19$ mm para el grupo DRFM).

IV. 2. 3. Análisis estructural por tomografía computada cuantitativa periférica

El análisis del estado del hueso trabecular en la metáfisis femoral distal, en la metáfisis tibial proximal y en el cuerpo vertebral no mostró diferencias significativas entre grupos (Tabla IV. 4), no registrándose cambios en el contenido ni en la densidad mineral del hueso total y trabecular (CMO trabecular y total; DMO trabecular y total).

| | CTRL | CTRL + METF | DRF | DRF+METF |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Metáfisis femoral distal | | | | |
| CMO Total [mg/cm] | 11,31 ± 1,46 | 10,34 ± 0,94 | 10,35 ± 1,07 | 10,71 ± 0,72 |
| DMO Total [mg/cm ³] | 660,30 ± 57,74 | 625,25 ± 27,42 | 645,68 ± 10,35 | 659,45 ± 18,28 |
| CMO Trabecular [mg/cm] | 1,71 ± 0,48 | 1,42 ± 0,33 | 1,47 ± 0,40 | 1,48 ± 0,22 |
| DMO Trabecular [mg/cm ³] | 331,10 ± 79,28 | 284,45 ± 48,80 | 302,83 ± 53,11 | 303,80 ± 33,93 |
| Metáfisis tibial proximal | | | | |
| CMO Total [mg/cm] | 7,29 ± 0,38 | 7,05 ± 0,57 | 7,26 ± 0,51 | 7,31 ± 0,40 |
| DMO Total [mg/cm ³] | 629,83 ± 21,51 | 593,30 ± 12,11 | 630,33 ± 13,18 | 616,98 ± 27,38 |
| CMO Trabecular [mg/cm] | 0,71 ± 0,14 | 0,61 ± 0,08 | 0,62 ± 0,14 | 0,60 ± 0,13 |
| DMO Trabecular [mg/cm ³] | 202,70 ± 37,80 | 169,03 ± 20,44 | 179,18 ± 24,58 | 166,35 ± 24,65 |
| Cuerpo de la 2da vértebra lumbar | | | | |
| CMO Total [mg/cm] | 3,17 ± 0,33 | 3,40 ± 0,16 | 3,40 ± 0,55 | 3,29 ± 0,40 |
| DMO Total [mg/cm ³] | 567,15 ± 30,35 | 559,60 ± 3,64 | 574,65 ± 18,83 | 574,70 ± 41,16 |
| CMO Trabecular [mg/cm] | 0,59 ± 0,10 | 0,58 ± 0,04 | 0,61 ± 0,11 | 0,61 ± 0,09 |
| DMO Trabecular [mg/cm ³] | 349,88 ± 41,65 | 323,75 ± 23,81 | 340,98 ± 26,60 | 356,33 ± 33,22 |

Tabla IV. 4. Análisis estructural por pQCT a nivel de la metáfisis femoral distal, metáfisis tibial proximal y mitad del cuerpo de la segunda vértebra lumbar. Los resultados están expresados como la media ± DS.

Al analizar el hueso cortical en la mitad de la diáfisis de fémur y tibia, no se vieron diferencias entre grupos para el contenido y densidad de mineral, el espesor del hueso cortical y el perímetro del periostio y del endostio (Tabla IV. 5).

| | CTRL | CTRL+METF | DRF | DRF+METF |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Mitad de la diáfisis Femoral | | | | |
| CMO Cortical [mg/cm] | 8,15 ± 0,24 | 8,03 ± 0,34 | 8,06 ± 0,59 | 8,12 ± 0,74 |
| DMO Cortical [mg/cm ³] | 1233,85 ± 14,19 | 1223,33 ± 26,35 | 1247,03 ± 11,32 | 1252,03 ± 14,42 |
| Espesor Cortical [mm] | 0,76 ± 0,02 | 0,76 ± 0,01 | 0,75 ± 0,04 | 0,76 ± 0,03 |
| Perímetro del Periostio [mm] | 11,05 ± 0,15 | 11,05 ± 0,31 | 10,96 ± 0,38 | 10,93 ± 0,55 |
| Perímetro Endocortical [mm] | 6,26 ± 0,14 | 6,29 ± 0,31 | 6,24 ± 0,29 | 6,18 ± 0,42 |

| | CTRL | CTRL+METF | DRF | DRF+METF |
|------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Mitad de la diáfisis Tibial | | | | |
| CMO Cortical [mg/cm] | 6,22 ± 0,18 | 6,14 ± 0,29 | 6,27 ± 0,57 | 6,28 ± 0,55 |
| DMO Cortical [mg/cm ³] | 1215,68 ± 10,23 | 1206,60 ± 8,53 | 1216,95 ± 12,99 | 1206,00 ± 11,56 |
| Espesor Cortical [mm] | 0,81 ± 0,02 | 0,80 ± 0,03 | 0,83 ± 0,07 | 0,82 ± 0,04 |
| Perímetro del Periostio [mm] | 8,88 ± 0,05 | 8,89 ± 0,19 | 8,82 ± 0,34 | 8,91 ± 0,35 |
| Perímetro Endocortical [mm] | 3,80 ± 0,09 | 3,88 ± 0,17 | 3,61 ± 0,19 | 3,76 ± 0,18 |

Tabla IV. 5. Análisis estructural por pQCT en la mitad de la diáfisis (midshaft) del fémur y de la tibia. Los resultados están expresados como la media ± DS.

IV. 2. 4. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica de la metáfisis femoral distal

La evaluación de las marcas registradas en los huesos como consecuencia de la inyección de fluorocromos reveló que tanto la superficie activa de mineralización, como la tasa de aposición de mineral no presentaron diferencias significativas en las distintas condiciones experimentales (Figura IV. 2. 4, paneles A y B). Como consecuencia, el producto de estos dos parámetros, la tasa de formación ósea, tampoco registró cambios con respecto al control para los diferentes tratamientos (Figura IV. 2. 4, panel C). Es decir, que los parámetros de histomorfometría dinámica no variaron entre grupos en la metáfisis femoral distal.

Los resultados obtenidos por histomorfometría dinámica respecto del crecimiento longitudinal del fémur no mostraron diferencias significativas entre grupos (Figura IV. 2. 4, panel D), lo que concuerda con lo expuesto previamente en referencia a las longitudes de los fémures medidos (Sección IV. 2. 2).

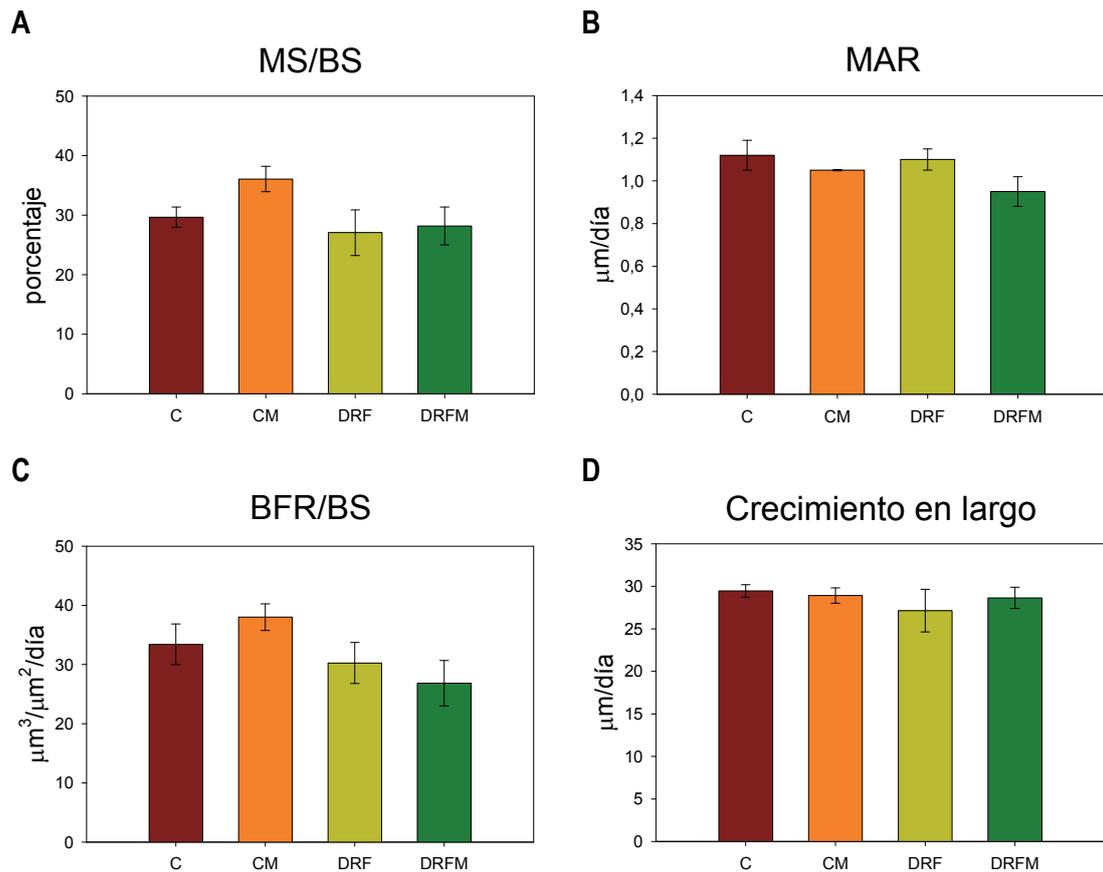


Figura IV. 2. 4. Parámetros femorales de histomorfometría dinámica. (A) Superficie de mineralización activa (MS/BS). (B) Tasa de aposición de mineral (MAR). (C) Tasa de formación ósea (BFR/BS). (D) Crecimiento en largo del hueso. Los parámetros fueron evaluados en la metáfisis femoral distal.

IV. 2. 5. Estudios de parámetros de histomorfometría estática de la metáfisis femoral distal.

El volumen de hueso trabecular (BV/TV) no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales. Al evaluar la cantidad de osteoide presente, ya sea como volumen con respecto al volumen total (OV/TV) o como superficie con respecto a la superficie de hueso trabecular (OS/BS), se vio que si bien existía una disminución en las tasas pertenecientes al grupo DRF con respecto al control, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Las ratas que recibieron la dieta rica en fructosa y fueron tratadas con metformina (grupo DRFM) mostraron resultados similares. El tratamiento de ratas controles con metformina (grupo CM) produjo un aumento significativo de osteoide con respecto al control y a los demás grupos experimentales. Todos estos resultados se muestran en la Figura IV. 2. 5. 1.

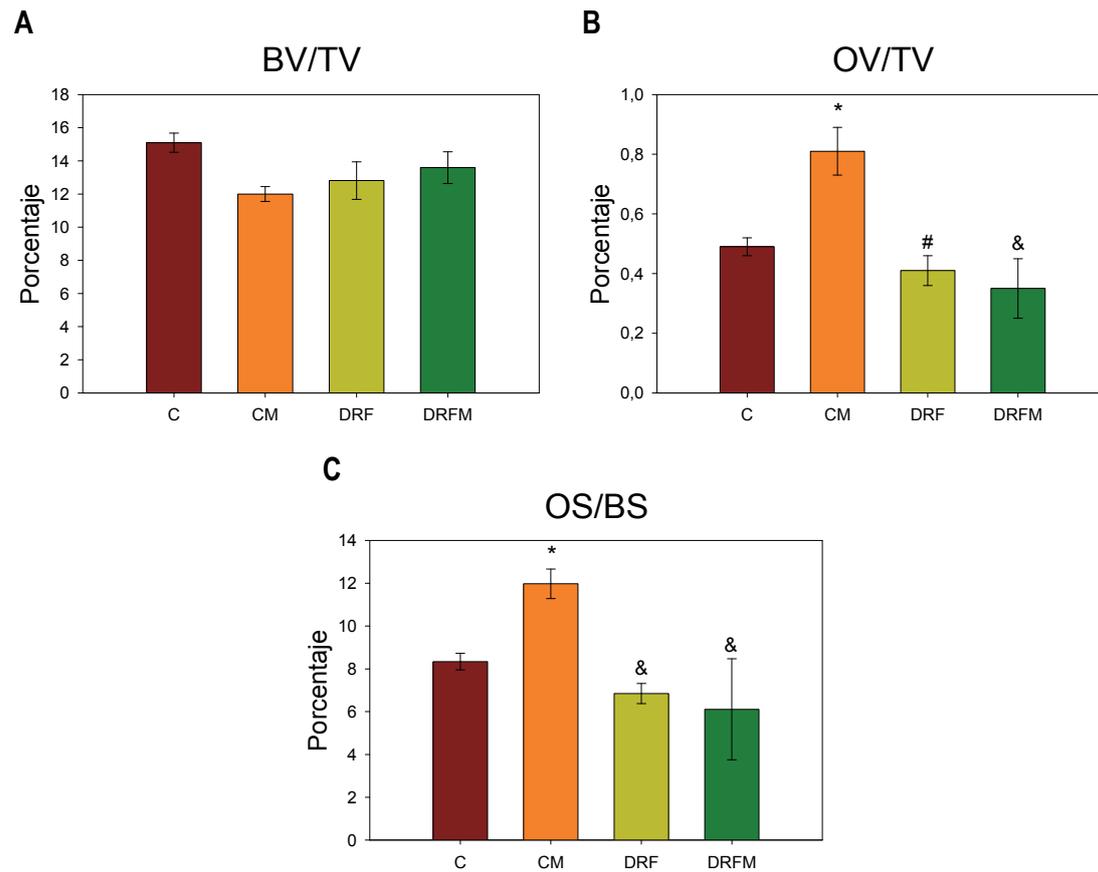


Figura IV. 2. 5. 1. Parámetros estructurales de la metáfisis femoral distal. (A) Volumen de hueso trabecular/volumen total (BV/VT). (B) Volumen de osteoide/volumen de hueso trabecular (OV/BV). (C) superficie de osteoide/superficie de hueso trabecular (OS/BS). Diferencias: * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs CM, & $p < 0,01$ vs CM.

Al evaluar los parámetros estructurales del hueso trabecular, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en el número de trabéculas, su espesor o su separación (Figura IV. 2. 5. 2).

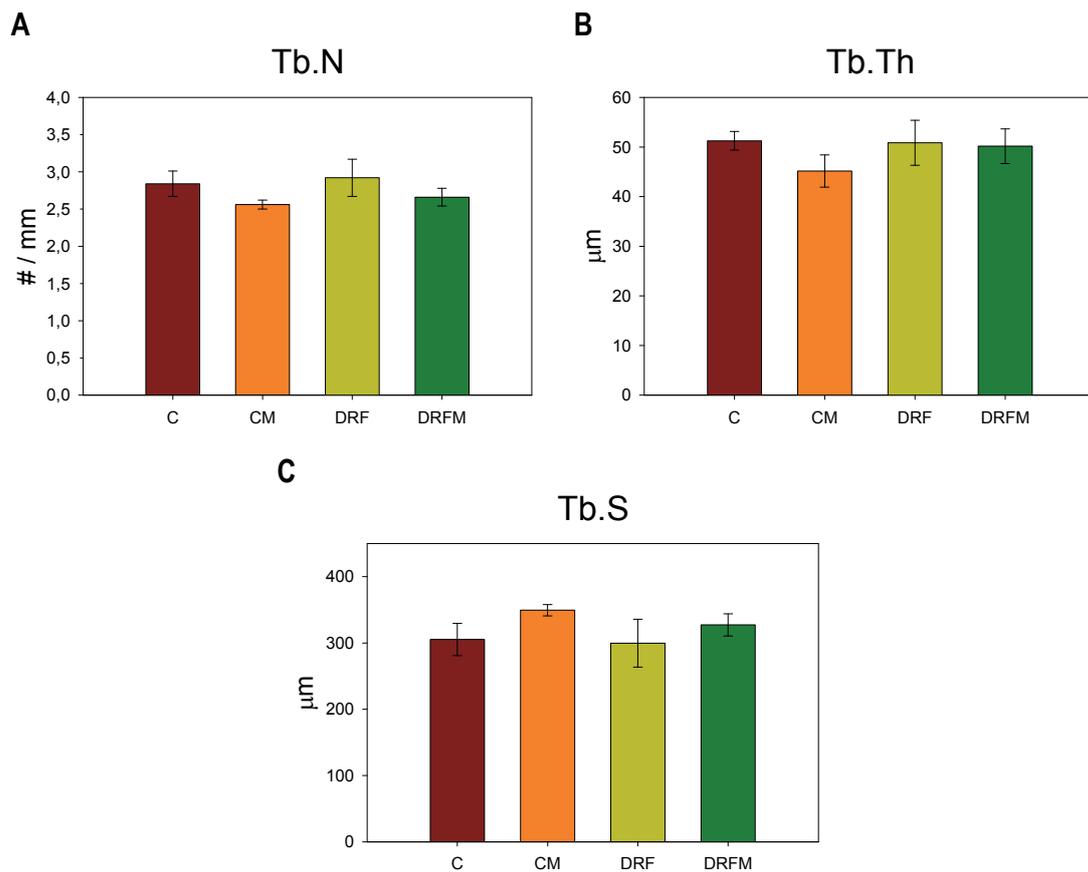


Figura IV. 2. 5. 2. Parámetros estructurales de la metáfisis femoral distal. (A) Número de Trabéculas (Tb.N). (B) Espesor de las trabéculas (Tb.Th). (C) Separación entre trabéculas (Tb.S).

Al cuantificar las regiones del hueso trabecular de la metáfisis distal que estaban revestidas por osteoblastos (Ob) y osteoclastos (Oc), se encontró que la superficie de hueso trabecular cubierta por osteoblastos (Ob.S/BS) presentaba una leve disminución (13%) en el grupo DRF cuando se comparaba con los valores obtenidos en el grupo C, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. El tratamiento oral con metformina (grupo DRFM) no modificó este parámetro (Figura IV. 2. 5. 3, panel A).

No se observaron diferencias entre los grupos experimentales al evaluar la superficie de hueso cubierta por osteoclastos (Oc.S/BS, Figura IV. 2. 5. 3, panel B) y tampoco hubo diferencias significativas en el porcentaje de superficie de hueso erosionada como consecuencia de la acción de estas células (ES/BS, Figura IV. 2. 5. 3, panel C). Por lo tanto se podría concluir que la actividad de estas células fue aproximadamente igual en los cuatro grupos experimentales. Este último hallazgo contrasta con lo encontrado en la esponjosa primaria, donde el grupo DRF mostró menor densidad de osteoclastos (evidenciada como área TRAP positiva), lo que podría estar implicado en el crecimiento en largo del hueso (Sección IV. 1. 2).

Estos resultados mostrarían que las células involucradas en el remodelado del hueso

trabecular de la metáfisis femoral distal no cambiarían significativamente en los grupos experimentales. Si bien el grupo DRF mostró un descenso no significativo en las células encargadas de sintetizar tejido óseo (Ob), tiempos mayores en presencia de esta condición metabólica podrían desembocar en una disminución significativa en su actividad y un desbalance entre resorción/formación llevando a una formación menor de hueso.

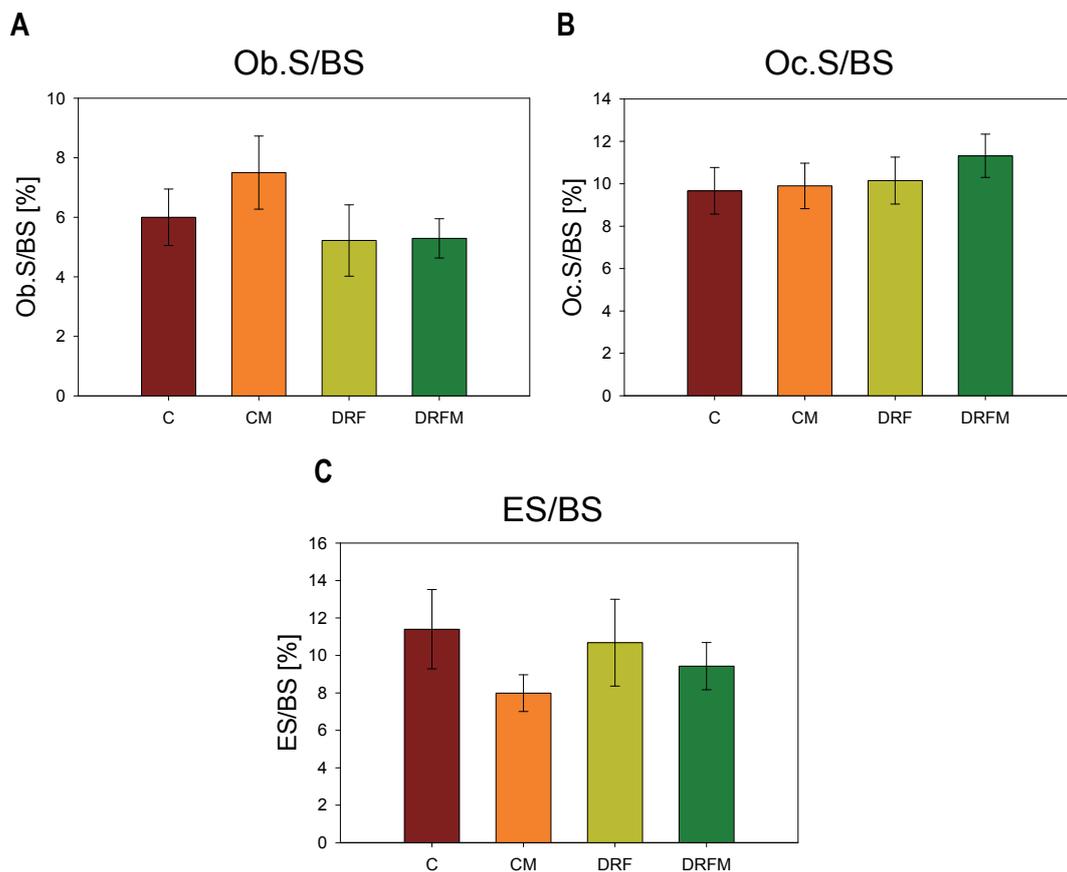


Figura IV. 2. 5. 3. Parámetros celulares de la metáfisis femoral distal. (A) Superficie de hueso trabecular cubierta por osteoblastos (Ob.S/BS). (B) Superficie de hueso trabecular cubierta por osteoclastos (Oc.S/BS). (C) Superficie de hueso trabecular resorbida (ES/BS).

IV. 2. 6. Análisis histomorfométrico estático de la microarquitectura metafisaria femoral proximal.

En cortes de fémur descalcificado teñidos con Hematoxilina & Eosina, el análisis del porcentaje de hueso trabecular en la metáfisis femoral proximal reveló que no existieron cambios en los distintos grupos experimentales. Si bien el grupo DRF mostró un leve descenso en la media de los valores, no fue significativamente diferente del grupo control (Figura IV. 2. 6, panel A).

El número de osteocitos por unidad de área de hueso trabecular sufrió un descenso al

someter a los animales a la sobrecarga de fructosa (grupo DRF, 86 % del control), mientras que el tratamiento con metformina (grupo DRFM) llevó los valores a los del grupo control (Figura IV. 2. 6, panel B).

La administración de metformina a ratas normales (grupo CM) produjo un aumento en ambos parámetros, siendo estos aumentos no significativos con respecto al control.

El análisis de la histoquímica para TRAP (Figura IV. 2. 6, panel C) mostró que las ratas pertenecientes al grupo DRF tuvieron una menor densidad de osteoclastos en la esponjosa primaria femoral (30% de disminución versus C), y que el tratamiento oral con metformina (grupo DRFM) no fue capaz de prevenir este efecto. La administración de metformina a ratas controles (grupo CM) mostró un leve aumento con respecto al grupo control.

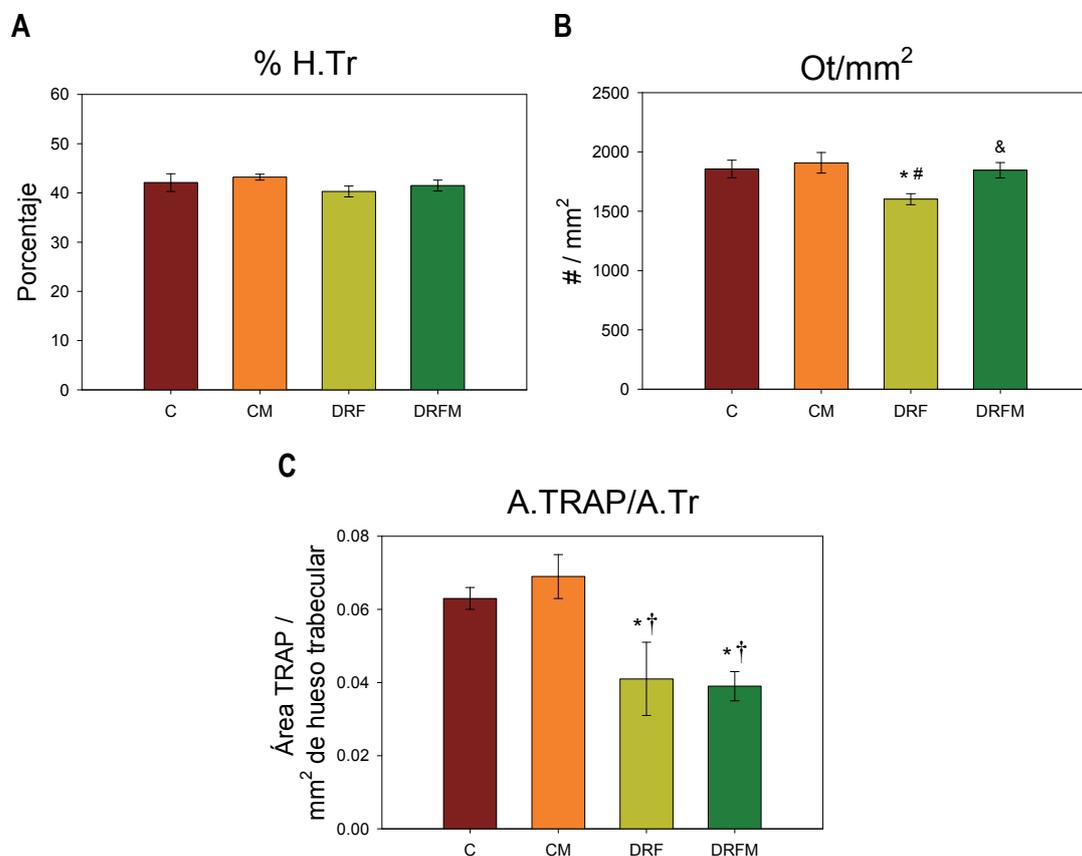


Figura IV. 2. 6. Parámetros estructurales de la metáfisis femoral proximal. (A) Porcentaje de hueso trabecular (% H.Tr). (B) Densidad de osteocitos (Ot/mm²). (C) Área TRAP positiva/área de hueso trabecular en la esponjosa primaria (A.TRAP/A.Tr). Diferencias: * p < 0,05 vs C, † p < 0,05 vs CM, # p < 0,01 vs CM, & p < 0,01 vs DRF.

IV. 2. 7. Evaluación del potencial osteogénico de MSC

Para evaluar si el tratamiento oral con metformina podía prevenir los efectos deletéreos del Síndrome Metabólico inducido por fructosa sobre la diferenciación osteogénica *in vitro* de las

MSC, se aislaron células de los cuatro grupos experimentales a partir de uno de los fémures de cada rata al finalizar el tiempo total del protocolo experimental (35 días). Luego de 15 días de diferenciación osteogénica *in vitro*, las células provenientes del grupo DRF mostraron una producción de colágeno tipo 1 menor (disminución del 38%) y una reducida actividad de FAL (disminución del 18%) cuando se los comparaba con los valores obtenidos en las células provenientes de ratas control. La administración oral de metformina (grupo DRFM) produjo una prevención parcial del efecto, mostrando valores mayores que el grupo DRF pero menores que el grupo C. Estos resultados se muestran en los gráficos A y B de la Figura IV. 2. 7.

Luego de 21 días de diferenciación osteogénica, se observó que las células provenientes del grupo DRF tenían menor capacidad de producir nódulos extracelulares de mineral, y que el tratamiento oral con metformina (grupo DRFM) previno este efecto, llevando los valores de mineralización a los del control.

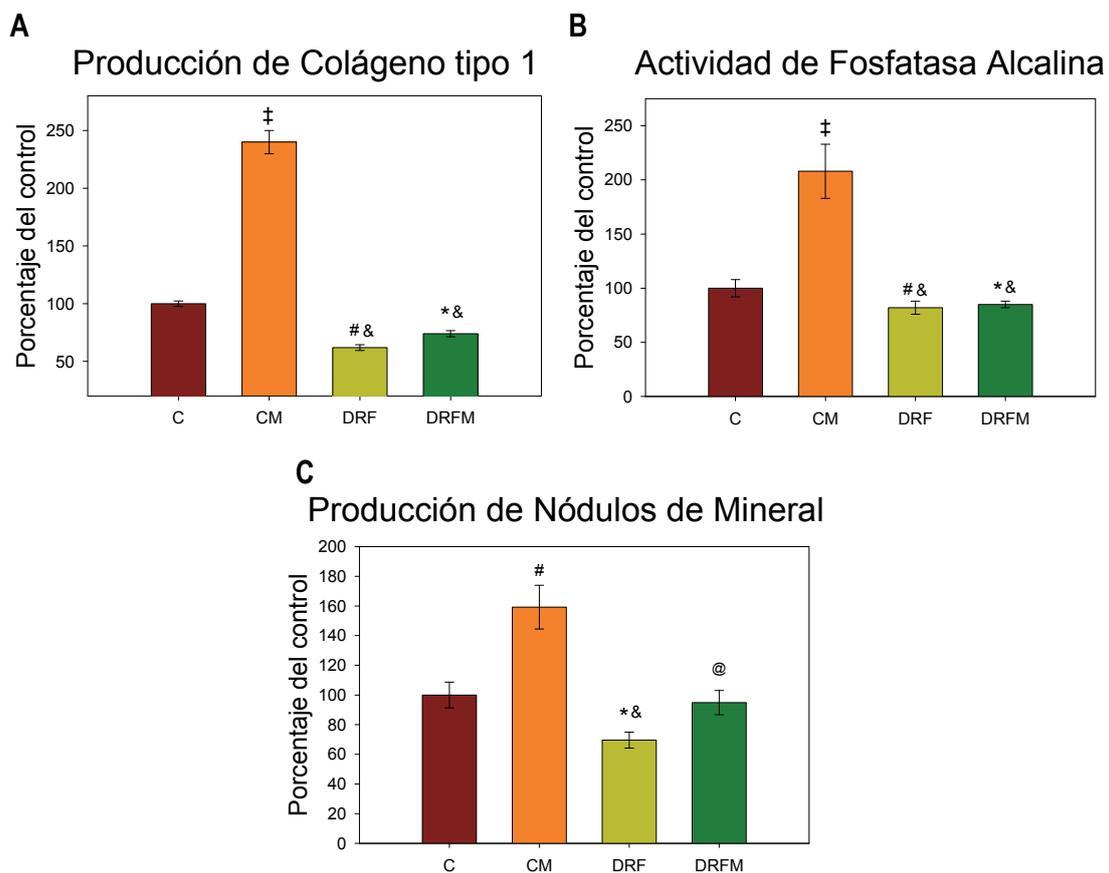


Figura IV. 2. 7. Efectos del tratamiento oral con metformina sobre la diferenciación de MSC de ratas con SM. (A) Producción de colágeno tipo 1. (B) Actividad de la enzima fosfatasa alcalina. (C) Producción de nódulos extracelulares de mineral. Diferencias: * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,01$ vs C, ‡ $p < 0,001$ vs C, @ $p < 0,01$ vs CM, & $p < 0,001$ vs CM.

Capítulo V

Discusión

Síndrome Metabólico y fructosa

En los últimos años ha crecido la preocupación por el aumento de la obesidad, patología que ha ido incrementando en la mayoría de los países del mundo desde el año 1980 aproximadamente y declarada epidemia por la Organización Mundial de la Salud en el año 1997 [James, 2008].

Las dietas que se consumen actualmente, sobre todo en los países occidentales, son ricas en grasas saturadas y en azúcares refinados como la fructosa, la sacarosa o el jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS), habiendo registrado el consumo de estos hidratos de carbono un aumento importante en los últimos años. En Sudamérica, por ejemplo, el consumo de azúcares *per cápita* ha aumentado un 22% desde 1986 a 2006 [Tappy, 2010]. Esta ingesta elevada de calorías, sumada a estilos de vida cada vez más sedentarios, ha producido un aumento en la prevalencia de patologías como la obesidad y el Síndrome Metabólico (SM). De hecho, se ha encontrado una fuerte correlación entre el aumento en el consumo de fructosa y la mayor prevalencia de obesidad y SM [Tappy, 2010]. Este último puede predisponer a condiciones crónicas como la Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y enfermedad cardiovascular [Miranda, 2005a].

La fructosa es un monosacárido que posee un índice glucémico bajo y su ingesta aguda no produce una elevación importante de la concentración plasmática de insulina [Steinert, 2011]. Sin embargo, se sabe que la ingesta prolongada de este azúcar conduce a múltiples alteraciones, entre las que encontramos hipertensión, dislipidemia, deposición ectópica de lípidos, alteración en el metabolismo del ácido úrico, alteración en el metabolismo de la glucosa y resistencia a la insulina [Tappy, 2010].

Se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos para explicar las alteraciones producidas por el consumo elevado de fructosa aunque no se conocen con exactitud. Por ejemplo, la resistencia a la insulina y la obesidad mediadas por fructosa implicarían la presencia de estrés oxidativo y la producción de citoquinas inflamatorias [Rutledge, 2007]. Se entiende por estrés oxidativo a la mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por ej. anión superóxido) que se originan de la cadena respiratoria u otros complejos enzimáticos [Wauquier, 2009]. El consumo sostenido de fructosa puede generar hiperglucemia, que promueve el estrés oxidativo y la generación de ROS [Alhaider, 2011]. La fructosa es considerada una molécula altamente lipogénica, y la acumulación excesiva de triglicéridos induce la generación de radicales libres y favorece daños oxidativos en el tejido adiposo [Furukawa, 2004]. A este estado de mayor producción de especies oxidantes se suma la disminución en los mecanismos antioxidantes (actividad de enzimas como la superóxido dismutasa y niveles de moléculas como

retinil ésteres, vitamina C, vitamina E y varios carotenoides) [Ford, 2003; Palmieri, 2006; Wauquier, 2009; Lee, 2011].

Hoy en día se acepta que el SM se desarrolla en humanos por causa de factores ambientales que influyen sobre personas con predisposición genética [Oron-Herman, 2008]. Los modelos animales que se someten a dietas con altos contenidos de hidratos de carbono, grasas, o ambos, son capaces de reproducir uno o varios componentes del SM. Simulan el efecto del ambiente en el desarrollo del síndrome y son más representativos de la patología que los que se generan por alteraciones monogénicas.

El modelo animal empleado en este trabajo de tesis es ampliamente utilizado y posee características metabólicas que correlacionan muy bien con el fenotipo humano de SM. Los animales sometidos a una sobrecarga de hidratos de carbono, y en especial de fructosa, muestran insulinoresistencia, dislipidemia, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y, en ocasiones, obesidad [Hwang, 1987; Thorburn, 1989; Bezerra, 2000; Thresher, 2000; Basciano, 2005; Peredo, 2006; Oron-Herman 2008; Maiztegui, 2009].

Efectivamente, los parámetros bioquímicos observados en las ratas sometidas a la dieta rica en fructosa (grupo DRF), reflejan una condición metabólica con características similares al SM en humanos (Tabla IV. 1 y Tabla IV. 3): hiperglucemia e hiperinsulinemia (que sugieren resistencia a la insulina), hipertrigliceridemia y niveles elevados de fructosamina (marcador de glicación no enzimática). No se encontró una ganancia de peso mayor en este grupo que la observada en los animales control.

Efectos del SM sobre el tejido óseo

En cuanto a la presencia de alteraciones óseas en el SM, existen estudios clínicos que intentan relacionar esta patología con el estado de la densidad mineral ósea (DMO) y/o la predisposición a fracturas. Los resultados están lejos de ser concluyentes. En algunos trabajos se encuentran efectos nocivos del SM sobre ciertas regiones del esqueleto, mostrando DMO disminuida y/o mayor predisposición a fracturas [von Mulhen, 2007; Yaturu, 2009; Hwang and Choi, 2010], pero otros trabajos no llegan a las mismas conclusiones [Kinjo, 2007]. Cabe mencionar que existe variedad entre las poblaciones incluidas en cada uno de los estudios (en cuanto a franja etaria, sexo, etc.) y los datos que se obtienen suelen ser ajustados (o no) teniendo en cuenta distintos parámetros, que no siempre son los mismos entre trabajos. Entre ellos tenemos edad, sexo, IMC, hábitos como fumar, consumo de ciertos medicamentos, etc. Por lo tanto, los estudios difieren considerablemente en cuanto a su diseño y esto hace difícil la

comparación entre ellos.

También existe controversia en si es correcto evaluar los efectos sobre el hueso del SM como un todo o si debería evaluarse la relación entre sus distintos componentes y el estado del tejido óseo [Sun, 2014]. Esto se basa en el hecho de que los pacientes con SM representan un grupo heterogéneo, donde no todos tienen las mismas manifestaciones e incluso pueden haber sido diagnosticados usando las distintas clasificaciones que existen.

Por lo tanto en este trabajo de tesis uno de los objetivos planteados fue contribuir a la evaluación del estado de tejido óseo utilizando el modelo animal de SM mencionado previamente. Se eligió estudiar el hueso trabecular porque su tasa de recambio es mayor que la del hueso cortical [Clarke, 2008] y con la premisa de que, de existir alteraciones, éstas se evidenciarían antes en este tipo de hueso que en el cortical. Se eligieron regiones con alta proporción de hueso esponjoso como son las metáfisis de huesos largos y el cuerpo de vértebras.

Se encaró el estudio a distintos niveles: a nivel de la microarquitectura, evaluando la cantidad de hueso trabecular y el estado de las células que contribuyen a mantenerlo, y también a nivel de las células estromales mesenquimáticas (MSC), viendo su potencial osteogénico/adipogénico y la expresión de factores de transcripción de estos dos linajes. Cabe recordar que a partir de estas últimas, se forman la mayoría de las células presentes en el tejido óseo [Geneser, 2006]. También se utilizó un modelo de lesión ósea para evidenciar posibles alteraciones en el proceso de regeneración. Por último, se evaluaron los posibles efectos beneficiosos del tratamiento oral con metformina sobre algunas de las alteraciones observadas.

La cantidad de hueso trabecular en la metáfisis femoral proximal de las ratas del grupo DRF no mostró una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo control (Figura IV. 1. 2. 1 y Figura IV. 2. 6). También se pudo medir, por tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT), la cantidad y densidad del hueso total y trabecular en la metáfisis femoral distal, en la metáfisis tibial proximal y en el cuerpo de la segunda vértebra lumbar. Tampoco se hallaron alteraciones en los parámetros mencionados en las tres regiones estudiadas para el grupo DRF (Tabla IV. 4).

Estos resultados están en concordancia con los hallados por histomorfometría de la metáfisis femoral distal usando muestras sin descalcificar (Figura IV. 2. 5. 1 y Figura IV. 2. 5. 2.). Al evaluar parámetros estructurales como son el volumen de hueso trabecular (BV/TV), el número de trabéculas (Tb.N), el espesor de las mismas (Tb.Th) y la separación entre ellas (Tb.S), se obtuvieron valores similares para el grupo DRF y para el grupo control. Se observó

una pequeña disminución en la cantidad de osteoide presente en el grupo DRF, aunque no fue estadísticamente significativa.

El hecho de que no existan diferencias en el contenido mineral o su densidad no implica, en principio, que no existan alteraciones en la calidad del tejido óseo y un consecuente aumento en su fragilidad. Si bien la DMO suele utilizarse para estimar probabilidad de fracturas, no siempre es buen predictor ya que evalúa la cantidad más que la calidad del hueso. Por ejemplo, pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 muestran DMO normal o aumentada, aunque registran un mayor índice de fracturas [Lipscombe, 2007].

En patologías como el SM, la Diabetes y el envejecimiento se encuentra acelerada la glicosilación no enzimática, que origina productos de glicación avanzada (AGEs). Esta reacción ocurre entre grupos amino de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos y azúcares reductores o intermediarios carbonílicos. Las proteínas de vida media larga como el colágeno tipo 1, principal componente de la matriz extracelular del tejido óseo, son propensas a sufrir este proceso, sobre todo en condiciones metabólicas con presencia de niveles elevados prolongados de glucosa en sangre. Esto genera entrecruzamientos patológicos que producen pérdida en la flexibilidad y elasticidad del hueso, dando lugar a un aumento en su fragilidad [Mikulíková, 2008; McCarthy, 2013].

Si bien se mencionó que no existía una disminución significativa en la cantidad de hueso trabecular en la metáfisis femoral proximal del grupo DRF, se observó una menor densidad de osteocitos por unidad de área (Figura IV. 1. 2. 1 y Figura IV. 2. 6). Los osteocitos son las células encargadas de sensar las cargas mecánicas que actúan sobre el hueso y son capaces de mantener la integridad del entorno de la laguna donde se alojan [Bonewald, 2011; Schaffler, 2012]. Un descenso en el número de estas células, podría implicar una menor capacidad del tejido óseo de reparar microdaños, los que se acumularían y generarían un aumento de la fragilidad del hueso.

Pueden ser varias las causas que produzcan una reducción en la densidad de osteocitos. Podría existir un aumento en la apoptosis de estas células, y/o una menor formación a partir de sus precursores, los osteoblastos. Tanto una situación como la otra podría ocurrir como consecuencia del estrés oxidativo generado por patologías como el SM o la Diabetes [Matsuzawa-Nagata, 2008; Erejuwa, 2011] o el envejecimiento [Manolagas, 2010]. Los AGEs también tienen efectos nocivos sobre el desarrollo y diferenciación de las células del tejido óseo [Schurman, 2008; Franke, 2011]. Modelos de ratas con deficiencia parcial de insulina muestran una reducción aún mayor de la densidad de osteocitos [Tolosa, 2013], evidenciando que la severidad de la patología de base determinaría la magnitud de las alteraciones.

Siguiendo con el análisis del estado de las células del tejido óseo, ahora en la metáfisis femoral distal, el grupo DRF mostró una menor superficie de hueso trabecular cubierta por osteoblastos aunque no fue una disminución estadísticamente significativa. Los parámetros relacionados con la actividad de osteoclastos (superficie de hueso trabecular cubierta por estas células y superficie erosionada) no mostraron diferencias entre estos dos grupos. Ambas células actúan en forma coordinada en el proceso de remodelado óseo. Una menor actividad de los osteoblastos sumada a una actividad similar de osteoclastos puede llevar a un desbalance de este proceso y, en tiempos mayores a los analizados en este trabajo, generar una menor cantidad neta de hueso. Las ROS afectan los dos tipos celulares. Por un lado, estimulan la producción de RANKL en la membrana de los osteoblastos, lo que da lugar a un aumento en la formación y en la actividad de osteoclastos. Por otro lado, producen disminución en la diferenciación y actividad de los osteoblastos y también pueden inducir su apoptosis [Wauquier, 2009]. Ambos efectos estarían llevando a una menor formación de hueso acompañada por una mayor resorción, con una consecuente menor cantidad de tejido óseo.

En conjunto se ve que las alteraciones observadas en el hueso trabecular son leves para el grupo DRF. Se observan alteraciones a nivel celular que pueden influir, en plazos mayores, al remodelado o al mantenimiento del hueso trabecular, aunque en los tiempos evaluados en este trabajo de tesis no se traducen en una disminución significativa de la cantidad o densidad del tejido óseo trabecular.

Al analizar el estado del tejido óseo, es muy útil utilizar fluorocromos quelantes de calcio que permiten evaluar parámetros de histomorfometría dinámicos como son la superficie activa de mineralización (MS/BS), la tasa de aposición de mineral (MAR), la tasa de formación ósea (BFR/BS) y el crecimiento longitudinal del fémur. En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la MS/BS ni la MAR en el grupo DRF, por lo que su producto, la BFR/BS, tampoco mostró diferencias significativas (Figura IV. 2. 4, paneles A-C) indicando que la tasa de formación de hueso no se vio alterada en este modelo de SM. También se obtuvieron valores equivalentes entre grupos al analizar el crecimiento longitudinal del fémur lo que concuerda con las medidas de la longitud de este hueso y los otros analizados.

El cartílago de crecimiento ubicado en cada metáfisis de los huesos largos es el responsable de su crecimiento longitudinal mediante el proceso de osificación endocondral. En él, los condrocitos dispuestos en esta estructura reciben distintas señales que los llevan a proliferar, hipertrofiar, mineralizar y luego morir por apoptosis dejando una matriz de cartílago mineralizado que será reemplazada por tejido óseo. Esto implica la invasión vascular y el reclutamiento de osteoclastos y células osteoprogenitoras que resorberán y formarán hueso

reemplazando el molde cartilaginoso [Xie, 2014]. Nuestros ensayos mostraron que el SM inducido por una dieta rica en fructosa no produjo alteraciones en el espesor del cartílago de crecimiento (Figura IV. 1. 2. 2, paneles A-C), por lo que se podría pensar que el tratamiento no produjo alteraciones en las células presentes en esta estructura. Sin embargo, en el grupo DRF existió una menor actividad TRAP en la esponjosa primaria (Figura IV. 1. 2. 2, paneles D-F), lo que estaría mostrando una menor actividad de osteoclastos en esa región y un consecuente menor reemplazo del cartílago por tejido óseo. Esto podría implicar alteraciones en el crecimiento longitudinal del hueso, aunque esto no llegó a manifestarse en el tiempo de estudio empleado en esta tesis y por lo tanto no se registraron diferencias en las longitudes de los huesos estudiados como ya se ha mencionado (Sección IV. 1. 2 y Sección IV. 2. 2).

Resultados concordantes fueron encontrados en ratas con deficiencia parcial de insulina en los que se registró una disminución en el área TRAP en la esponjosa primaria asociada con una reducción en el espesor del cartílago de crecimiento [Tolosa, 2013]. Ratas con un modelo de Diabetes tipo 1 también mostraron una disminución en el espesor del cartílago de crecimiento de la metáfisis proximal de la tibia [Silva, 2009]. Estos resultados también podrían indicar que la severidad de la disfunción metabólica determinaría la magnitud de las alteraciones óseas.

Para estudiar las propiedades mecánicas de los huesos largos suelen realizarse pruebas, como el ensayo de flexión a tres puntos, que tienen como objetivo medir directamente la resistencia de los huesos a la flexión. Alteraciones en la estructura de la matriz, así como de las células que la mantienen, podrían implicar una disminución en la calidad ósea y esto se vería reflejado en su mayor fragilidad. Por ejemplo, el colágeno, que es encargado de brindarle elasticidad a los huesos puede ser dañado por la acumulación de AGEs [Manolagas, 2010] alterando las propiedades de los huesos. También se ha propuesto que pueden realizarse estimaciones de las propiedades biomecánicas de los huesos a partir de parámetros obtenidos en los análisis por pQCT. Se puede calcular un índice de fuerza ósea (BSI, *bone strength index*), que correlaciona bien con los valores obtenidos por pruebas mecánicas, realizando el producto entre el momento de inercia transversal y la densidad mineral cortical volumétrica [Ferretti, 1996].

En este trabajo de tesis no se hicieron medidas directas de las propiedades biomecánicas del hueso. Se estudió por pQCT el tejido cortical presente en la diáfisis del fémur y la tibia y no se encontraron alteraciones en el grupo DRF (Tabla IV. 5). Los datos de DMO fueron similares, y los valores de momento de inercia también (datos no mostrados) por lo que su producto, el BSI, estaría estimando que los huesos provenientes del grupo DRF y del grupo control se comportarían de manera similar frente a un estudio de pruebas mecánicas. Esto estaría en concordancia con lo hallado por Tszani y colaboradores que luego de 12 semanas de

administración de dieta rica en fructosa (13% en el agua de bebida) no encontraron cambios en las propiedades mecánicas de fémur y tibia [Tsanzi, 2008]. También puede señalarse que la mayoría de las fracturas osteoporóticas ocurren en regiones como el cuello femoral, vértebras lumbares, etc. y estas pruebas mencionadas evalúan lo que ocurre a nivel de la diáfisis.

Todos estos hallazgos discutidos hasta este momento muestran que el SM inducido por una dieta rica en fructosa produce alteraciones leves en la microarquitectura ósea, que no son medibles a nivel macroscópico. Sin embargo, la administración de esta dieta por tiempos mayores a los utilizados en esta tesis podría llevar a la disminución en la cantidad de tejido óseo y/o a una acumulación de defectos microscópicos que, a largo plazo, podrían reducir la calidad ósea al punto de aumentar la frecuencia de fracturas. Sin embargo, se debería aclarar un aspecto relacionado con la aplicación de tiempos más prolongados de dietas con alto contenido de nutrientes. La resistencia a la insulina presente en este modelo genera hiperglucemia. Esto produce, a modo compensatorio, una hiperestimulación de las células β del páncreas con el objetivo de secretar mayores cantidades de insulina y así intentar disminuir los valores de glucemia (hiperinsulinemia compensatoria). El mantenimiento de esta condición por tiempo prolongado puede llevar al agotamiento de las células β o incluso a su muerte, con una consecuente disminución en la masa o funcionalidad de estas células y el desarrollo de Diabetes [Ampudia-Blasco, 2003; Halban, 2014]. Esto ya cambiaría las perspectivas del estudio, porque pasaríamos de estar estudiando un modelo con resistencia a la insulina a otro con defectos al menos parciales en la secreción de esta hormona.

MSC

Con excepción de los osteoclastos, las células del tejido óseo se forman por diferenciación sucesiva a partir de células estromales mesenquimáticas (MSC). Modificaciones en el microambiente al que se exponen estas células pueden hacer que se diferencien hacia algún fenotipo en particular. En el SM, la presencia de ROS, citoquinas proinflamatorias o AGEs podrían hacer que las MSC disminuyeran su potencial osteogénico en pos de algún otro tipo celular.

Para evaluar esta hipótesis, se hicieron cultivos de MSC provenientes del grupo DRF y del control. Se midieron niveles basales de marcadores osteoblásticos (actividad de fosfatasa alcalina -FAL-, producción de colágeno tipo 1 y producción de nódulos de mineralización) y adipocíticos (depósitos intracelulares de TG), y se volvieron a medir luego de diferenciar las células hacia cada fenotipo.

En el estado basal, las células provenientes del grupo DRF, poseían menor actividad de fosfatasa alcalina, menor producción de colágeno tipo 1 y mayor acumulación de triglicéridos intracelulares. Esto indicaría que el microambiente medular al que estuvieron sometidas las células del grupo DRF *in vivo* predispuso a las MSC hacia el fenotipo adipocítico en detrimento del fenotipo osteoblástico. Estudios *in vitro* sugieren que existe una relación inversa entre osteoblastogénesis y adipogénesis [Bethel, 2013].

Luego se diferenciaron las células hacia los dos fenotipos y se midieron los marcadores propios de cada uno. Las células provenientes del grupo DRF expresaron niveles más bajos de los marcadores osteoblásticos cuando fueron diferenciadas a este linaje. Al diferenciarlas a adipocitos, las células provenientes de ambos grupos incrementaron la cantidad de triglicéridos intracelulares, pero el grupo DRF lo hizo en mayor proporción que el grupo C. Estos resultados muestran que frente a condiciones que promueven la diferenciación osteoblástica, las células del grupo DRF presentaban alguna alteración que les impidió alcanzar los niveles de diferenciación que lograron las células control, y que frente a condiciones que promueven la diferenciación adipocítica ambos grupos celulares aumentaron los marcadores de este fenotipo, aunque las células del grupo DRF ya poseían una cierta predisposición por las condiciones a las que estuvieron sometidas *in vivo*.

Estos resultados fueron confirmados midiendo la expresión de factores de transcripción osteogénicos (Cbfa1/Runx2) y adipogénicos (PPAR γ). En el estado basal, los niveles de Cbfa1/Runx2 fueron menores en células del grupo DRF mientras que sus niveles de PPAR γ fueron mayores. Se puede calcular la relación entre estos dos marcadores como un índice de la predisposición de las MSC a diferenciarse hacia los dos tipos celulares. En el estado basal, Runx2/PPAR γ fue 25 veces menor en el grupo DRF, indicando un menor compromiso hacia el linaje osteoblástico. Luego de la inducción al fenotipo osteoblástico los dos grupos elevaron la expresión de Cbfa1/Runx2, siendo este incremento mayor en el grupo control. Luego de la diferenciación adipocítica, las células del grupo control aumentaron su expresión de PPAR γ , mientras que las del grupo DRF no aumentaron los niveles que ya se encontraban elevados en el estado basal.

Existen estudios que, utilizando modelos de Diabetes en ratas, encuentran resultados que concuerdan con los presentados en esta tesis. Por un lado, MSC obtenidas de ratas con Diabetes tipo 1 mostraron una menor capacidad de proliferación y diferenciación hacia el linaje osteoblástico [Stolzing, 2010]. Por otro lado, en un modelo de Diabetes con deficiencia parcial de insulina (sin resistencia a esta hormona) se encontró que las MSC provenientes de este grupo

experimental poseían una menor capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteoblástico, expresaban niveles menores de Runx2 y expresaban niveles mayores de PPAR γ [Tolosa, 2013]. Si bien la condición metabólica es más severa en estos casos, comparten características como niveles elevados de ROS, AGEs y/o citoquinas proinflamatorias [Stolzing, 2010] que podrían ser la causa, al menos en parte, de las observaciones.

Reparación de fracturas en el modelo de SM

Se han hecho estudios en roedores para evaluar el efecto de alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la insulina sobre la reparación de fracturas. Ratas que espontáneamente desarrollan Diabetes mellitus tipo 1 poseen regeneración ósea alterada [Sood, 2013]. Ratones que recibieron una dieta rica en grasas y desarrollaron hiperglucemia, resistencia a la insulina y obesidad, mostraron un retraso en la reparación de una lesión practicada en la tibia [Brown, 2014].

En esta tesis se evaluaron posibles alteraciones en la regeneración del tejido óseo en el modelo de SM mencionado. El protocolo de lesión utilizado consistió en un defecto circular realizado en el hueso parietal derecho, con una posterior regeneración durante 14 días [Molinuevo, 2010]. Cabe resaltar que este modelo se hizo sobre un hueso que no soporta carga mecánica, y que en la reparación no se forma un callo blando, sino que se genera tejido óseo inmaduro que luego es remodelado.

La cantidad de hueso nuevo formado en la zona de la lesión fue menor en el grupo DRF y este hueso poseía menor cantidad de osteocitos por mm². Además, en el perímetro del hueso lesionado existía una menor área TRAP (Figura IV. 1. 3. 1). Estos resultados indican una disminución en la formación ósea y en su remodelado, probablemente debido a los efectos sistémicos de la resistencia a la insulina y/o metabolismo de la glucosa alterado.

En nuestro grupo de trabajo se utilizó el mismo modelo de lesión en ratas con Diabetes inducida por estreptozotocina y se encontró una menor cantidad de hueso regenerado, con una menor densidad osteocítica en las ratas diabéticas, siendo estos descensos más marcados que en el modelo empleado en esta tesis [Molinuevo, 2010]. En ese último trabajo, se observó un aumento en la actividad TRAP, por lo que la deficiencia de insulina (presente en ese estudio) y la resistencia a esta hormona (presente en el modelo de SM de esta tesis) podrían implicar distintos mecanismos en la alteración de la reparación de fracturas. Teniendo en cuenta el concepto de que durante la reparación de una fractura están involucrados procesos inespecíficos y específicos del hueso [Schindeler, 2008], cualquiera de estos pasos podrían estar alterados en

mayor o menor medida en las diferentes condiciones metabólicas.

Efectos de la metformina en nuestro modelo de SM

La metformina es una biguanida insulino-sensibilizante que es ampliamente recetada en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 o con SM, tanto en monoterapia como asociada a otras drogas. El efecto principal de la metformina es inhibir la producción hepática de glucosa y también mejoraría la captación de este azúcar por los tejidos periféricos.

En este trabajo, la administración de metformina en el agua de bebida mostró efectos benéficos sobre las alteraciones en los parámetros bioquímicos registrados en el grupo DRF (Tabla IV. 3). Por un lado, los valores de glucemia se vieron normalizados en las ratas con SM que recibieron la droga (grupo DRFM) y también se evidenció una disminución parcial en los valores de triglicéridos plasmáticos. Por otro lado, la administración de metformina no produjo alteraciones sobre los niveles de insulinemia ni de fructosamina sérica. Esto último podría indicar que la administración del fármaco no produce un control metabólico completamente eficiente en el periodo de tiempo estudiado, y también podría estar mostrando que los niveles altos de glucemia generados durante las primeras dos semanas del esquema experimental de las ratas del grupo DRFM, hayan sido suficientes para inducir un incremento en la glicosilación no enzimática de proteínas séricas [Schalkwijk, 2004; Mikulíková, 2008].

Metformina y tejido óseo en el modelo de SM

Se han reportados efectos benéficos de la metformina sobre manifestaciones del SM [Miranda, 2005b; Harden, 2007] que están correlacionadas en forma negativa con la calidad ósea. Por lo tanto, esta droga podría mejorar la calidad del hueso en forma indirecta al mejorar las características mencionadas. Por ejemplo, la metformina previene la formación de especies reactivas del oxígeno, evitando así las alteraciones ocasionadas por el estrés oxidativo en varios tejidos y tipos celulares incluyendo los osteoblastos [Schurman, 2008; Erejuwa, 2011; Sena 2011], por mecanismos aún no totalmente dilucidados. También se han encontrado efectos directos de la metformina sobre células del linaje osteoblástico [Cortizo, 2006; Jang, 2011], por lo que la droga podría actuar tanto en forma directa como indirecta sobre el hueso.

Teniendo en cuenta estos hechos, se procedió a investigar los posibles efectos de una terapia oral con metformina sobre el metabolismo óseo en el modelo de SM elegido para este trabajo de tesis.

Los valores de histomorfometría encontrados en la metáfisis femoral proximal muestran que el grupo que recibió fructosa y metformina (grupo DRFM) tuvo una cantidad de hueso trabecular y una densidad de osteocitos similares a los del control, por lo que la metformina previno las alteraciones en la densidad osteocítica observadas en el grupo DRF. En las ratas controles que recibieron metformina (grupo CM), se obtuvieron valores un poco mayores que los del grupo C, aunque no hubo diferencias significativas (Figura IV. 2. 6). Una densidad normal de osteocitos podría, como se mencionó anteriormente, lograr un mantenimiento más efectivo de la estructura ósea, evitando la acumulación de microdaños. Se han realizados estudios *in vivo* que muestran que la metformina mejora la calidad del hueso en ratas diabéticas [Mai, 2011; Tolosa, 2013] o en ratas normales [Sedlinsky, 2011], aunque otro estudio muestra que no produce efecto alguno [Jeyabalan, 2013].

Los análisis por pQCT no mostraron mayor cantidad o densidad de hueso trabecular en los grupos que recibieron metformina (CM y DRFM), comparados con sus equivalentes que no recibieron el tratamiento (C y DRF respectivamente). Tampoco hubo variaciones en los parámetros estructurales (BV/TV, Tb.N, Tb.Th, y Tb.S). En cuanto a la cantidad de osteoide, el grupo DRFM tuvo una cantidad similar a la del grupo DRF, que fue un poco menor, aunque no estadísticamente significativa, que el grupo C. El grupo CM mostró valores elevados de cantidad de osteoide. Cabe recordar que la cantidad de osteoide es uno de los parámetros de histomorfometría estática que, junto con la superficie de hueso cubierta por osteoblastos, reflejan formación ósea [Ma, 2011]. Por lo tanto, se podría pensar que una mayor o menor formación de osteoide es el primer paso para una mayor o menor formación de hueso (que se formará luego del proceso de mineralización).

El tratamiento con metformina no modificó los índices de las células encargadas del remodelado (Ob.S/BS, Oc.S/BS y ES/BS), los que fueron estadísticamente equivalentes a los del grupo DRF (Figura IV. 2. 5. 3). Esto indicaría que el tiempo de tratamiento con metformina no fue suficiente para que se normalizaran las alteraciones leves en los actores del remodelado que se evidenciaron en el grupo DRF.

Los parámetros de histomorfometría dinámica no se modificaron con la administración de la droga por lo que no hubo cambios en la tasa de formación ósea ni en el crecimiento longitudinal del hueso (Figura IV. 2. 4). Esto concuerda con las medidas de los huesos (Sección IV. 2. 2). La terapia con metformina tampoco fue capaz de prevenir las alteraciones observadas en la actividad TRAP de la esponjosa primaria.

En cuanto a la estimación de las propiedades biomecánicas del fémur y la tibia utilizando parámetros obtenidos del análisis por pQCT, dado que no se encontraron diferencias para los

grupos CM y DRFM cuando se compararon con los grupos C y DRF respectivamente, se podrían estimar propiedades similares para los cuatro grupos experimentales.

Metformina y MSC

Se han encontrado efectos directos *ex vivo* de la metformina sobre las células estromales mesenquimáticas, predisponiéndolas a diferenciarse al fenotipo osteoblástico en detrimento del adipocítico [Molinuevo, 2010]. Incluso se han observado efectos similares sobre células provenientes de ratas con deficiencia parcial de insulina [Tolosa, 2013]. Se podría esperar que esto, en principio, conlleve a una mayor cantidad de células osteogénicas y por ende de tejido óseo. Los resultados encontrados en esta tesis concuerdan con los mencionados, en los que se vio que los descensos de los marcadores osteogénicos que poseía el grupo DRF fueron prevenidos parcial o totalmente por el tratamiento oral con metformina. En particular, la producción de colágeno tipo 1 y la actividad de fosfatasa alcalina mostraron valores un poco mayores que los del grupo DRF, aunque no llegaron a los valores del control. La producción de nódulos de mineralización sí mostró valores para el grupo DRFM similares a los del grupo C.

De esta forma, la metformina podría mejorar la diferenciación osteoblástica de las MSC, llevando a una mayor formación de las células presentes en el tejido óseo.

Capítulo VI

Conclusiones

- La dieta rica en fructosa indujo un Síndrome Metabólico (SM) caracterizado por alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos.
- A través de estudios histomorfométricos estáticos se observó que el SM indujo una disminución significativa en la densidad de osteocitos y en la actividad TRAP de la metafisis femoral.
- No se observaron cambios inducidos por el SM a través de estudios de histomorfometría dinámica y de pQCT.
- Las células estromales mesenquimáticas (MSC) derivadas de animales con SM presentaron un menor potencial osteogénico y una mayor predisposición hacia el linaje adipocítico, probablemente por modulación de la relación en la expresión de Runx2 y PPAR γ .
- El SM se asoció con una disminución de la reparación ósea en un modelo de lesión parietal mínima. Simultáneamente, redujo la densidad osteocítica y la actividad osteoclástica en el sitio de lesión, sugiriendo una disminución concertada de la formación y remodelado óseo.
- El tratamiento oral con metformina previno la disminución de la densidad osteocítica metafisaria inducida por el SM, sin alterar la actividad TRAP.
- La metformina previno total o parcialmente los efectos antiosteogénicos del SM sobre las MSC.

El **Síndrome Metabólico** se asocia con alteraciones leves en la microarquitectura metafisaria, con un menor potencial osteogénico en las células estromales mesenquimáticas y con una importante disminución en la regeneración ósea. El tratamiento oral con **metformina** fue capaz de prevenir total o parcialmente la mayoría de estas alteraciones óseas.

Capítulo VII

Referencias

A

Aguirre, J. I.; Franz, S. E.; Altman, M. K.; Stabley, J. N.; Lin, X.; Zamora, P. O. & Wronski, T. J. Skeletal effects of fibroblast growth factor mimetic (F2A) in ovariectomized rats. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*, **2009**, 9, 38-43.

Ahmadian, M.; Suh, J. M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A. R.; Downes, M. & Evans, R. M. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, **2013**, 19, 557-566.

Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, **1998**, 15, 539-553.

Alberti, K. G. M. M.; Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*, **2006**, 23, 469-480.

Alhaidar, A. A.; Korashy, H. M.; Sayed-Ahmed, M. M.; Mobark, M.; Kfoury, H. & Mansour, M. A. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chem Biol Interact*, **2011**

American Diabetes Association. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. *Diabetes Care*, **1998**, 21, 310-314

Ampudia-Blasco, F. Fallo celular beta y progresión de la diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinol Nutr*, **2003**, 50(7), 274-9.

An Y. H.; Martin K. L. Histology Methods for Bone and Cartilage. Humana Press Inc. **2003**.

Arias-Díaz, J. & Balibrea, J. [Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes]. *Nutr Hosp*, **2007**, 22, 160-168.

B

Bancroft, J.D.; Layton, C.; Suvarna, S.K. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7th Edition, Elsevier, **2013**.

Basciano, H.; Federico, L. & Adeli, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*, **2005**, 2, 5.

Basu, S.; McKee, M.; Galea, G. & Stuckler, D. Relationship of soft drink consumption to global overweight, obesity, and diabetes: a cross-national analysis of 75 countries. *Am J Public Health*, **2013**, 103, 2071-2077.

Bellido, T. Osteocytes and their role in bone remodeling. *Actual Osteol*, **2013**, 9(1): 56-64.

Bethel, M.; Chitteti, B. R.; Srour, E. F. & Kacena, M. A. The changing balance between osteoblastogenesis and adipogenesis in aging and its impact on hematopoiesis. *Curr Osteoporos Rep*, **2013**, 11, 99-106.

Bezerra, R. M.; Ueno, M.; Silva, M. S.; Tavares, D. Q.; Carvalho, C. R. & Saad, M. J. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr*, **2000**, 130, 1531-1535.

Bonewald, L. F. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, **2011**, 26, 229-238.

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

Brown, M. L.; Yukata, K.; Farnsworth, C. W.; Chen, D.-G.; Awad, H.; Hilton, M. J.; O'Keefe, R. J.; Xing, L.; Mooney, R. A. & Zuscik, M. J. Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*, **2014**, 9, e99656.

Burstone, M. S. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *J Histochem Cytochem*, **1959**, 7, 39-41.

C

Cappuccio, F. P.; Meilahn, E.; Zmuda, J. M. & Cauley, J. A. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*, **1999**, 354, 971-975.

Chen, H. Cellular inflammatory responses: novel insights for obesity and insulin resistance. *Pharmacol Res*, **2006**, 53, 469-477.

Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, **2008**, 3 Suppl 3, S131-S139.

Cnop, M.; Foufelle, F. & Velloso, L. A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*, **2012**, 18, 59-68.

Compston, J. Obesity and bone. *Curr Osteoporos Rep*, **2013**, 11, 30-35.

Cornier, M.-A.; Dabelea, D.; Hernandez, T. L.; Lindstrom, R. C.; Steig, A. J.; Stob, N. R.; Pelt, R. E. V.; Wang, H. & Eckel, R. H. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*, **2008**, 29, 777-822.

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

Cortizo, 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.

Cusi, K.; Maezono, K.; Osman, A.; Pendergrass, M.; Patti, M. E.; Pratipanawat, T.; DeFronzo, R. A.; Kahn, C. R. & Mandarino, L. J. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*, **2000**, 105, 311-320.

E

Escobedo, J.; Schargrodsky, H.; Champagne, B.; Silva, H.; Boissonnet, C. P.; Vinueza, R.; Torres, M.; Hernandez, R. & Wilson, E. Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association

with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol*, **2009**, 8, 52.

Erejuwa, O. O.; Sulaiman, S. A.; Wahab, M. S. A.; Salam, S. K. N.; Salleh, M. S. M. & Gurtu, S. Comparison of antioxidant effects of honey, glibenclamide, metformin, and their combinations in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci*, **2011**, 12, 829-843

F

Fellmann, L.; Nascimento, A. R.; Tibiriça, E. & Bousquet, P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther*, **2013**, 137, 331-340.

Ferretti, J. L.; Capozza, R. F. & Zanchetta, J. R. Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. *Bone*, **1996**, 18, 97-102.

Flores-Figueroa, E.; Montesinos, J. J. & Mayani, H. Células Troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica (Mexico)*, **2006**, 58, 498-511.

Ford, E. S.; Giles, W. H. & Dietz, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*, **2002**, 287, 356-359.

Ford, E. S.; Mokdad, A. H.; Giles, W. H. & Brown, D. W. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*, **2003**, 52, 2346-2352.

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

Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M. & Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **2004**, 114, 1752-1761

G

Galvão, M. J.; Santos, A.; Ribeiro, M. D.; Ferreira, A. & Nolasco, F. Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method. *Eur J Histochem*, **2011**, 55, e1.

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

Gong, L.; Goswami, S.; Giacomini, K. M.; Altman, R. B. & Klein, T. E. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*, **2012**, 22, 820-827.

H

Halban, P. A.; Polonsky, K. S.; Bowden, D. W.; Hawkins, M. A.; Ling, C.; Mather, K. J.; Powers, A. C.; Rhodes, C. J.; Sussel, L. & Weir, G. C. β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, **2014**, 99, 1983-1992.

Harden, K. A.; Cowan, P. A.; Velasquez-Mieyer, P. & Patton, S. B. Effects of lifestyle intervention and metformin on weight management and markers of metabolic syndrome in obese adolescents. *J Am Acad Nurse Pract*, **2007**, 19, 368-377.

Hekimsoy, Z. 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, 1026-1033.

Hilton, M.J. Skeletal Development and Repair, in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, **2014**.

Hwang, I. S.; Ho, H.; Hoffman, B. B. & Reaven, G. M. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, **1987**, 10, 512-516.

Hwang, D.-K. & Choi, H.-J. The relationship between low bone mass and metabolic syndrome in Korean women. *Osteoporos Int*, **2010**, 21, 425-431.

I

Ilić, K.; Obradović, N. & Vujasinović-Stupar, N. The relationship among hypertension, antihypertensive medications, and osteoporosis: a narrative review. *Calcif Tissue Int*, **2013**, 92, 217-227.

J

James, A. W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*, **2013**, 2013, 684736.

James, W. P. T. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med*, **2008**, 263, 336-352.

Jang, W. G.; Kim, E. J.; Bae, I.-H.; Lee, K.-N.; Kim, Y. D.; Kim, D.-K.; Kim, S.-H.; Lee, C.-H.; Franceschi, R. T.; Choi, H.-S. & Koh, J.-T. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone*, **2011**, 48, 885-893

Jeyabalan, J.; Viollet, B.; Smitham, P.; Ellis, S. A.; Zaman, G.; Bardin, C.; Goodship, A.; Roux, J. P.; Pierre, M. & Chenu, C. The anti-diabetic drug metformin does not affect bone mass in vivo or fracture healing. *Osteoporos Int*, **2013**.

K

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

Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*, **2014**, 943162.

Kinjo, M.; Setoguchi, S. & Solomon, D. H. Bone mineral density in adults with the metabolic syndrome: analysis in a population-based U.S. sample. *J Clin Endocrinol Metab*, **2007**, 92, 4161-4164.

L

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-685.

Lee, Y.; Kim, M.; Choi, K.; Kim, J.; Bae, W.; Kim, S. & Sohn, C. Relationship between inflammation biomarkers, antioxidant vitamins, and bone mineral density in patients with metabolic syndrome. *Nutr Res Pract*, **2011**, 5, 150-156

Lefebvre, V. & Bhattaram, P. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol*, **2010**, 90, 291-317

Lehninger, A. L. Principios de Bioquímica. 3era Edición, **2001**.

Lipscombe, L. L.; Jamal, S. A.; Booth, G. L. & Hawker, G. A. The risk of hip fractures in older individuals with diabetes: a population-based study. *Diabetes Care*, **2007**, 30, 835-841.

Liu, T. M. & Lee, E. H. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*, **2013**, 19, 254-263.

Llusá, M.; Meri, A.; Ruano, D. Manual y Atlas Fotográfico de Anatomía del Aparato Locomotor. Editorial Médica Panamericana, **2006**.

M

Ma, Y. L.; Zeng, Q. Q.; Porras, L. L.; Harvey, A.; Moore, T. L.; Shelbourn, T. L.; Dalsky, G. P.; Wronski, T. J.; Aguirre, J. I.; Bryant, H. U. & et al. Teriparatide [rhPTH (1-34)], But Not Strontium Ranelate, Demonstrated Bone Anabolic Efficacy in Mature, Osteopenic, Ovariectomized Rats *Endocrinology*, **2011**, 152, 1767-1778.

Mai, Q.-G.; Zhang, Z.-M.; Xu, S.; Lu, M.; Zhou, R.-P.; Zhao, L.; Jia, C.-H.; Wen, Z.-H.; Jin, D.-D. & Bai, X.-C. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, **2011**, 112, 2902-2909.

Maiztegui, B.; Borelli, M. I.; Raschia, M. A.; Zotto, H. D. & Gagliardino, J. J. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol*, **2009**, 200, 139-149.

Manolagas, S. C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev*, **2010**, 31, 266-300

Márquez-Sandoval, F.; Macedo-Ojeda, G.; Viramontes-Hörner, D.; Ballart, J. F.; Salvadó, J. S. & Vizmanos, B. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr*, **2011**, 1-12.

Matsuzaka, T.; Shimano, H.; Yahagi, N.; Amemiya-Kudo, M.; Okazaki, H.; Tamura, Y.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Tomita, S.; Sekiya, M.; Hastay, A.; Nakagawa, Y.; Sone, H.; Toyoshima, H.; Ishibashi, S.; Osuga, J.-I. & Yamada, N. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*, **2004**, 53, 560-569.

Matsuzawa-Nagata, N.; Takamura, T.; Ando, H.; Nakamura, S.; Kurita, S.; Misu, H.; Ota, T.; Yokoyama, M.; Honda, M.; Miyamoto, K.-i. & Kaneko, S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*, **2008**, 57, 1071-1077.

McCarthy, A.D.; Molinuevo, M.S.; Cortizo, A.M. AGEs and Bone Ageing in Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab*, **2013**, 4: 276. doi:10.4172/2155-6156.1000276.

Metha, B., Metha, M. Organic Chemistry. Prentice-Hall of India Pvt. Ltd., **2005**.

Metz, J. A.; Morris, C. D.; Roberts, L. A.; McClung, M. R. & McCarron, D. A. Blood pressure and calcium intake are related to bone density in adult males. *Br J Nutr*, **1999**, 81, 383-388.

Mikulíková, K.; Eckhardt, A.; Kunes, J.; Zicha, J. & Miksík, I. Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Physiol Res*, **2008**, 57, 89-94

Miranda, P. J.; DeFronzo, R. A.; Califf, R. M. & Guyton, J. R. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J*, **2005a**, 149, 33-45.

Miranda, P. J.; DeFronzo, R. A.; Califf, R. M. & Guyton, J. R. Metabolic syndrome: evaluation of pathological and therapeutic outcomes. *Am Heart J*, **2005b**, 149, 20-32.

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, 211-221.

Montagnani, A. & Gonnelli, S. Antidiabetic therapy effects on bone metabolism and fracture risk. *Diabetes Obes Metab*, **2013**, 15, 784-791.

N

Naot, D. & Cornish, J. Cytokines and Hormones That Contribute to the Positive Association between Fat and Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2014**, 5, 70.

NCEP-ATPIII. Expert Panel on Detection, E. & of High Blood Cholesterol in Adults, T. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, **2001**, 285, 2486-2497.

Neve, A.; Corrado, A. & Cantatore, F. P. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res*, **2011**, 343, 289-302.

Novack, D. V. & Teitelbaum, S. L. The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol*, **2008**, 3, 457-484.

Nuttall, M. E. & Gimble, J. M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol*, **2004**, 4, 290-294.

O

Oron-Herman, M.; Kamari, Y.; Grossman, E.; Yeger, G.; Peleg, E.; Shabtay, Z.; Shamiss, A. & Sharabi, Y. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens*, **2008**, 21, 1018-1022.

Özcan, U.; Cao, Q.; Yilmaz, E.; Lee, A.-H.; Iwakoshi, N. N.; Ozdelen, E.; Tuncman, G.; Görgün,

C.; Glimcher, L. H. & Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, **2004**, 306, 457-461.

P

Palmieri, V. O.; Grattagliano, I.; Portincasa, P. & Palasciano, G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr*, **2006**, 136, 3022-3026

Panchal, S. K. & Brown, L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol*, **2011**, 351982

Pautke, C.; Vogt, S.; Kreutzer, K.; Haczek, C.; Wexel, G.; Kolk, A.; Imhoff, A. B.; Zitzelsberger, H.; Milz, S. & Tischer, T. Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. *J Anat*, **2010**, 217, 76-82.

Peredo, H. A.; Mayer, M. A.; Fermepin, M. R.; Grinson, D. & Puyó, A. M. Oral treatment and in vitro incubation with fructose modify vascular prostanoid production in the rat. *Auton Autacoid Pharmacol*, **2006**, 26, 15-20.

Powell, K. Obesity: the two faces of fat. *Nature*, **2007**, 447, 525-527.

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. *Journal of Bone and Mineral Research*, **1992**, 7, 683-692.

R

Rebolledo, O. R.; Marra, C. A.; Raschia, A.; Rodriguez, S. & Gagliardino, J. J. Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet. *Horm Metab Res*, **2008**, 40, 794-800.

Rena, G.; Pearson, E. R. & Sakamoto, K. Molecular mechanism of action of metformin: old or

new insights? *Diabetologia*, **2013**, 56, 1898-1906.

Rosen C. J. (Editor in chief). Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 7th Edition. American Society for Bone and Mineral Research, **2008**.

Rosen, C. J. & Bouxsein, M. L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol*, **2006**, 2, 35-43.

Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **2000**, 16, 145-171.

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

Rutledge, A. C. & Adeli, K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev*, **2007**, 65, S13-S23

S

Santana, R. B.; Xu, L.; Chase, H. B.; Amar, S.; Graves, D. T. & Trackman, P. C. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*, **2003**, 52, 1502-1510.

Schaffler, M. B. & Kennedy, O. D. Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep*, **2012**, 10, 118-125.

Schalkwijk, C. G.; Stehouwer, C. D. A. & van Hinsbergh, V. W. M. Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev*, **2004**, 20, 369-382.

Schindeler, A.; McDonald, M. M.; Bokko, P. & Little, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*, **2008**, 19, 459-466.

Schurman, L.; McCarthy, A. D.; Sedlinsky, C.; Gangoiti, M. V.; Arnol, V.; Bruzzone, L. & Cortizo, A.

M. Metformin reverts deleterious effects of advanced glycation end-products (AGEs) on osteoblastic cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **2008**, 116, 333-340.

Scuteri, A.; Laurent, S.; Cucca, F.; Cockcroft, J.; Cunha, P. G.; Mañas, L. R.; Raso, F. U. M.; Muiesan, M. L.; Rylis̆kyte, L.; Rietzschel, E.; Strait, J.; Vlachopoulos, C.; Völzke, H.; Lakatta, E. G.; Nilsson, P. M.; null, f. t. M. S. & Consortium, A. R. (M. Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. *Eur J Prev Cardiol*, **2014**.

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, 477-485.

Sena, C. M.; Matafome, P.; Louro, T.; Nunes, E.; Fernandes, R. & Seiça, R. M. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol*, **2011**, 163, 424-437.

Shin, D.; Kim, S.; Kim, K. H.; Lee, K. & Park, S. M. Association between insulin resistance and bone mass in men. *J Clin Endocrinol Metab*, **2014**, 99, 988-995.

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, 1618-1627.

Sood, A.; Cunningham, C. & Lin, S. The BB Wistar Rat as a Diabetic Model for Fracture Healing. *ISRN Endocrinol*, **2013**, 2013, 349604

Spencer, N. D.; Gimble, J. M. & Lopez, M. J. Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. *Vet Surg*, **2011**, 40, 129-139

Steinert, R. E.; Frey, F.; Töpfer, A.; Drewe, J. & Beglinger, C. Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *Br J Nutr*, **2011**, 105, 1320-1328.

Stolzing, A.; Sellers, D.; Llewelyn, O. & Scutt, A. Diabetes induced changes in rat mesenchymal

stem cells. *Cells Tissues Organs*, **2010**, 191, 453-465.

Sun, K.; Liu, J.; Lu, N.; Sun, H. & Ning, G. Association between metabolic syndrome and bone fractures: a meta-analysis of observational studies. *BMC Endocr Disord*, **2014**, 14, 13.

Szulc, P.; Varennes, A.; Delmas, P. D.; Goudable, J. & Chapurlat, R. Men with metabolic syndrome have lower bone mineral density but lower fracture risk--the MINOS study. *J Bone Miner Res*, **2010**, 25, 1446-1454.

T

Tappy, L. & Lê, K.-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*, **2010**, 90, 23-46.

Testut, L.; Latarjet, A. Tratado de anatomía humana. 9na edición, **1983**.

Teti, A. Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep*, **2011**, 9, 264-273.

Thorburn, A. W.; Storlien, L. H.; Jenkins, A. B.; Khouri, S. & Kraegen, E. W. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr*, **1989**, 49, 1155-1163.

Thresher, J. S.; Podolin, D. A.; Wei, Y.; Mazzeo, R. S. & Pagliassotti, M. J. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **2000**, 279, R1334-R1340.

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, 177-186.

Tortora, G. J.; Derrickson, B. Principios de Anatomía y Fisiología. 11va Ed. Editorial Médica Panamericana; **2011**.

Tran, L. T.; Yuen, V. G. & McNeill, J. H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*, **2009**, 332, 145-159.

Tropel, P.; Noël, D.; Platet, N.; Legrand, P.; Benabid, A.-L. & Berger, F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*, **2004**, 295, 395-406.

Tsanzi, E.; Light, H. R. & Tou, J. C. The effect of feeding different sugar-sweetened beverages to growing female Sprague-Dawley rats on bone mass and strength. *Bone*, **2008**, 42, 960-968

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 beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol*, **1999**, 112, 271-276.

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, 347-355.

Universities Federation for Animal Welfare (UFAW). Guidelines on Handling and Training of Laboratory Animals. In: Purl UFA, editor. The Biological Council of Animal Research, Welfare Panel. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington D.C.: The National Academies Press; **2011**.

V

Varga, O.; Harangi, M.; Olsson, I. A. S. & Hansen, A. K. Contribution of animal models to the understanding of the metabolic syndrome: a systematic overview. *Obes Rev*, **2010**, 11, 792-807.

von Muhlen, D.; Safii, S.; Jassal, S. K.; Svartberg, J. & Barrett-Connor, E. Associations between the metabolic syndrome and bone health in older men and women: the Rancho Bernardo Study. *Osteoporos Int*, **2007**, 18, 1337-1344

W

Wauquier, F.; Leotoing, L.; Coxam, V.; Guicheux, J. & Wittrant, Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med*, **2009**, 15, 468-477.

Weise, M.; De-Levi, S.; Barnes, K. M.; Gafni, R. I.; Abad, V. & Baron, J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 98, 6871-6876.

X

Xie, Y.; Zhou, S.; Chen, H.; Du, X. & Chen, L. RECENT RESEARCH ON THE GROWTH PLATE: Advances in fibroblast growth factor signaling in growth plate development and disorders. *J Mol Endocrinol*, **2014**, 53, T11-T34.

Y

Yamaoka, K. & Tango, T. Effects of lifestyle modification on metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*, **2012**, 10, 138.

Yaturu, S.; Humphrey, S.; Landry, C. & Jain, S. K. Decreased bone mineral density in men with metabolic syndrome alone and with type 2 diabetes. *Med Sci Monit*, **2009**, 15, CR5-CR9.

Los resultados obtenidos durante este trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas con referato:

Felice, J. I., Cortizo A. M., Sedlinsky C., Schurman L., McCarthy A. D. Efectos "*in vivo*" de Metformina sobre las alteraciones de la microarquitectura ósea asociadas al Síndrome Metabólico inducido por fructosa en ratas. *Rev Argent Endocrinol Metab*, **2011**, 48: 193-199.

Felice, J. I.; Gangoiti, M. V.; Molinuevo, M. S.; McCarthy, A. D. & Cortizo, A. M. Effects of a metabolic syndrome induced by a fructose-rich diet on bone metabolism in rats. *Metabolism*, **2013**, 63, 296-305.

