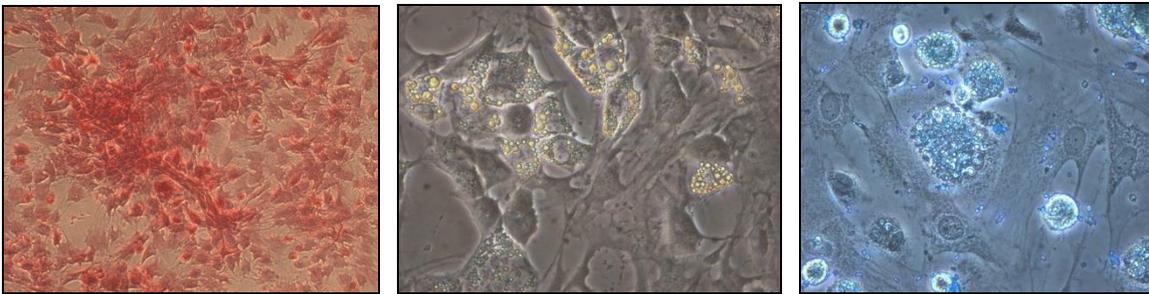




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Trabajo de tesis doctoral

“Alteraciones óseas asociadas con Diabetes mellitus: mecanismos patogénicos y estrategias de tratamiento con Alendronato”

2016

Lic. Sara Rocío Chuguransky

Director: Dra. Ana María Cortizo

Co-director: Dr. Antonio Desmond McCarthy

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

El mismo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM) de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, y fue posible gracias a las becas doctorales otorgadas por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Agradecimientos

Estos años de doctorado fueron largos pero se pasaron rápido, la verdad que no puedo creer que ya esté en esta instancia. Conocí muchas personas, he tenido muchas experiencias, muchas buenas y otras no tanto, pero que pude pasarlas y asimilarlas gracias a las personas que me acompañaron siempre.

Quiero agradecer, en primer lugar, a mi familia, por educarme y darme la posibilidad de estudiar para poder estar hoy en día en este lugar. Particularmente quiero agradecer a mi mamá, que no está físicamente pero siempre confió en mí y me apoyó para lograr mis objetivos y formarme como persona. Su recuerdo siempre presente me dio fuerzas para seguir esforzándome y no bajar los brazos. Agradezco los valores de esfuerzo y trabajo que me transmitieron mis padres, tíos, primas y hermanos. Desde muy chica aprendí que con honestidad y perseverancia es posible cumplir nuestros objetivos.

A mis directores, Ana y Antonio, pero haberme dado esta oportunidad y haber confiado en mí para realizar este trabajo de tesis. Gracias por haberme formado y enseñado desde técnicas y diseño experimentales, hasta redacción de artículos. Gracias por haberme presentado un grupo humano muy rico donde conocí grandes personas y donde hice amigos.

A mis compañeros Liommeses, Sil, Agustina, Juanma, Gimena, Vero, Vir, Juani, Malala, Marix, Luz, Lucas, Laurita, Anabela, Pao, Débora, por hacer los días más divertidos compartiendo mates, charlas y trabajo. Quiero agradecer especialmente a Vero, Vir, Malala, Marix, Juani, Laurita, Luz y Lucas con los que tuve mayor afinidad y compartimos más que mates y trabajo.

A mis amigas de toda la vida, Euge, Lau, Dani, Iva, Ceci, Mariela, Pame, Vero, con las que compartimos muchísimas cosas, hemos llorado y reído muchas veces, nos aconsejamos y también retado cuando fue necesario, siendo un pilar muy importante para mí todo este tiempo.

A los “chicos de Casares” también, Fede, Seba, Coco, Jorge, Mariano, Guille, Maxi, que nos conocemos de muy chicos y también, pasamos muchos momentos, muchas salidas, historias y risas...

A los catedráticos, en mis comienzos en Bioquímica Patológica con Ana Laura y Gustavo, mi paso fugaz en Fisiología con Rinaldi, Alejandro Rebolledo, Pao, Romi, Belén y Nico pero mi estadía docente fue mayormente en Anatomía e histología donde aprendí desde temas académicos, docencia hasta cosas de la vida misma que me nutrieron desde otro lugar. Gracias a Francisco, Adriana, Vicky, Mica, Jorge, Vir, Malala, Juani, Ivanna por la paciencia, contención y aliento que me han dado.

A mis amigos de la Facu, Guille, Meli, Paz, Roma, Colo, Lauri, María, con los que compartimos cursadas, mates, comidas, salidas, las recibidas!!!

A Damián, por haberme acompañado en este proceso, alentándome y haciéndome ver todo más simple, teniéndome mucha paciencia... A su familia, Ana, María, Celina, Euse, Lucas y Quique que me hacen sentir parte y también me han acompañado y alentado para terminar esta etapa.

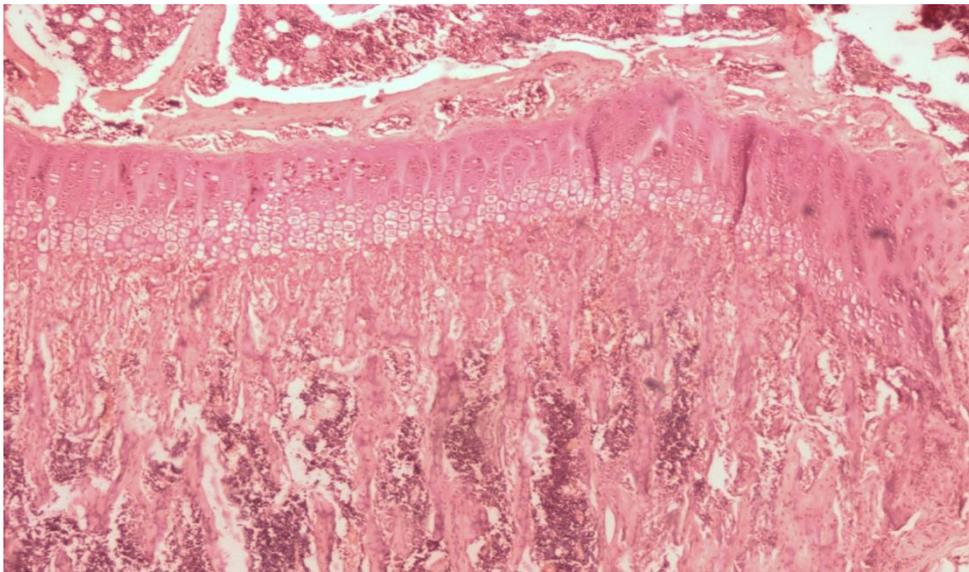
Por último, a la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata donde me formé gratuitamente recibiendo una educación de excelencia. Por último a la AGENCIA y CONICET, por haberme otorgado las becas y financiamiento necesario para llevar a cabo este trabajo de tesis.

Índice

CAPITULO I	1
Introducción	1
I.1 TEJIDO ÓSEO.....	2
I.1.1 Organización del tejido óseo	2
<i>I.1.1.1 Estructura macroscópica</i>	2
<i>I.1.1.2 Estructura microscópica</i>	4
I.1.2 Composición del tejido óseo: Matriz y células	7
<i>I.1.2.1 Matriz ósea</i>	7
<i>I.1.2.2 Células del tejido óseo</i>	8
I.1.3 Mineralización de la matriz ósea	16
I.1.4 Modelado y remodelado óseo	17
I.1.5 Diferenciación de las CPMO hacia distintos fenotipos	19
I.1.6 Osteoporosis	23
<i>I.1.6.1 Causas y tipos de osteoporosis</i>	27
<i>I.1.6.2 Tratamiento de la osteoporosis</i>	28
I.1.7. Bisfosfonatos	30
<i>I.1.7.1 Mecanismo de acción de los bisfosfonatos</i>	33
<i>I.1.7.2 Efectos de los bisfosfonatos sobre osteocitos y osteoblastos.</i>	35
I.2 Diabetes.....	36
I.2.1 Clasificación de Diabetes mellitus	37
<i>I.2.1.A Diabetes mellitus tipo 1</i>	37
<i>I.2.1.B Diabetes mellitus tipo 2</i>	38
I.2.2 Complicaciones de la diabetes	40
<i>I.2.2.A Complicaciones agudas</i>	40
<i>I.2.2.B Complicaciones crónicas</i>	40
I.2.3 Fisiopatogénesis de la diabetes	41
I.2.3.1 Productos de glicación avanzada (AGEs)	42
<i>I.2.3.2 Generación de AGEs</i>	43

I.2.3.3 <i>Metabolismo de los AGEs</i>	45
I.2.3.4 <i>Mecanismo de acción de los AGEs</i>	47
I.3 <i>Diabetes mellitus y hueso</i>	49
I.4 <i>Modelos animales utilizados en el estudio de Diabetes mellitus tipo 2</i>	52
I.4.1 <i>Modelos espontáneos</i>	52
I.4.2 <i>Modelos inducidos</i>	54
I.4.2.1 <i>Modelo de diabetes inducida por STZ-NA</i>	55
CAPITULO II	60
Objetivos	60
CAPITULO III	62
Materiales y Métodos	62
III.1. Estudios in vitro: Efecto directo del alendronato sobre el destino fenotípico de CPMO	63
III.1.1. Preparación de AGEs (Productos de Glicación Avanzada, PGA)	63
III.1.2. Preparación de soluciones de Alendronato (ALN)	63
III.1.3. Obtención de las CPMO	63
III.1.4. Diferenciación osteoblástica de las CPMO	64
III.1.5. Determinación de parámetros de diferenciación osteoblástica	65
III.1.6. Diferenciación adipocítica de las CPMO	66
III.1.7. Determinación de parámetros de diferenciación adipocítica	67
III.1.8. Diferenciación condrocítica de las CPMO	68
III.1.9. Determinación de la producción intracelular de especies de oxígeno reactivas (ROS) ..	69
III.1.10. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por Western blot	69
III.2. Estudios in vivo: tratamiento oral con Alendronato en un modelo de Diabetes.....	70
III.2.1. Modelo Animal y tratamiento	70
III.2.2. Estudios ex-vivo	71
III.2.3. Análisis Histomorfométrico	72
CAPITULO IV	76
Resultados	76
IV.1. Estudios <i>in vitro</i>	77
IV.1.1. Efecto de AGEs y alendronato sobre la diferenciación osteoblástica de células progenitoras de médula ósea.	77

IV. 1.2. Efectos de AGEs y alendronato sobre la diferenciación adipogénica.	81
IV.1.3. Efectos de AGEs y alendronato sobre la diferenciación condrogénica de CPMO.....	83
IV.1.4. Efecto de AGEs y Alendronato en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	85
IV.1.5. Efectos de AGEs y alendronato sobre los niveles de factores de transcripción de CPMO	86
IV.2. Estudios in vivo	88
IV.2.1. Efecto del tratamiento oral con alendronato sobre la microarquitectura ósea en un modelo de diabetes con déficit parcial de insulina	88
IV.2.1.1 Evaluación del modelo animal.....	88
IV.2.2. Efectos sobre la microarquitectura ósea.....	89
IV.2.3 Estudios ex vivo.....	95
IV.2.3.1. Efectos sobre la diferenciación osteoblástica.....	95
IV.2.3.2. Efectos sobre la diferenciación adipocítica.....	97
IV.2.3.3. Efectos sobre la diferenciación condrocítica	99
CAPITULO V	100
Discusión y Conclusiones	100
V.1. Discusión y Conclusiones	101
V.2. Conclusiones:	110
CAPITULO VI	111
Bibliografía	111
VI. Bibliografía	112



CAPITULO I

Introducción

I.1 TEJIDO ÓSEO

La palabra esqueleto (gr. *Skeleton*) significa materia seca, nada más erróneo en lo que al tejido óseo confiere. Nuestro esqueleto está formado mayoritariamente por tres tejidos: tejido conectivo denso, tejido cartilaginoso y tejido óseo, que sin duda poseen vida por lo que el conocimiento de su estructura y función es la base para comprender, diagnosticar y tratar enfermedades propias del esqueleto y las que influyen sobre él. Si bien la mayor parte del esqueleto la forma el tejido óseo, también contribuyen a su estructura y función cartílagos, tendones y ligamentos. Este tejido es único debido a que puede combinar gran dureza y fortaleza con el mínimo peso posible, pero a su vez, posee una gran elasticidad, confiriéndole propiedades óptimas para ejercer como material esquelético. El tejido óseo da la fortaleza necesaria al esqueleto en su conjunto para cumplir con su principal función, la de órgano de sostén, dado que provee de sitios de inserción a los músculos y a su vez, da rigidez a modo de protección de la fuerza de gravedad y al rodear distintos órganos como el cerebro y médula espinal, órganos del tórax y abdomen. La segunda función importante que posee el tejido óseo es la de mantener la homeostasis mineral del organismo, principalmente del calcio, ya que contiene el 99% de dicho mineral del organismo [Geneser, 2006]. Además, funciona como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento y provee del microambiente para la hematopoyesis en los espacios donde se aloja la médula ósea roja [Clarke, 2008].

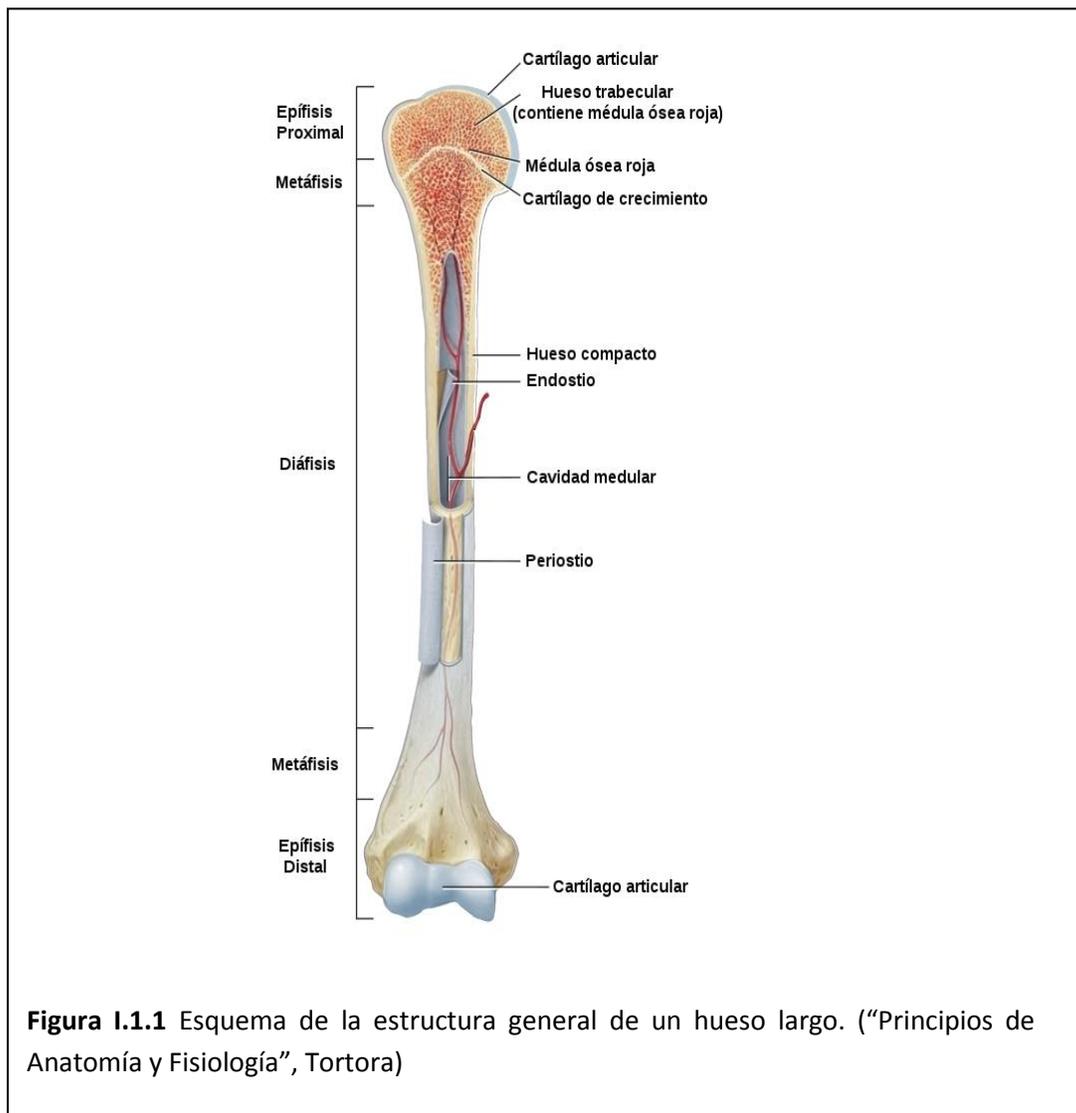
I.1.1 Organización del tejido óseo

I.1.1.1 Estructura macroscópica

Anatómicamente, los huesos se pueden clasificar según su geometría en *huesos largos* como el fémur, la tibia y el húmero, *huesos planos* como los del cráneo y la mandíbula, *huesos cortos* como los huesos del carpo y del tarso, y *huesos irregulares* como las vértebras [Testut, 1983; Clarke, 2008].

Por ser de mayor interés en este trabajo de tesis, se describirán en mayor detalle los huesos largos. En éstos se pueden describir diferentes regiones: una región central o cuerpo, de forma cilíndrica, denominada **diáfisis** y dos extremos, más voluminosos, las **epífisis**. Entre la diáfisis y

cada una de las epífisis se encuentra una zona, de forma cónica, denominada **metáfisis** (Figura I.1.1). En un hueso en crecimiento, se puede distinguir en esa región una zona de cartílago hialino, destinada al crecimiento longitudinal del hueso, llamada **placa epifisaria o cartílago de crecimiento**. A partir de éste y por un complejo proceso de crecimiento óseo, la osificación endocondral, el hueso crece en largo. Una vez finalizado dicho proceso, la placa epifisaria se cierra por reemplazo del tejido cartilaginoso por óseo, dando lugar a la línea epifisaria. [Tórtora, 2011; Clarke, 2008].



Las epífisis presentan en sus superficies externas, regiones lisas recubiertas de una delgada capa de cartílago articular hialino que proporciona una superficie lubricada, resistente y con muy escasa

fricción que a la vez es compresible y elástica, posibilitando la articulación con otros huesos. La superficie de hueso que no está cubierta por cartílago, está rodeada por *periostio*, una membrana de tejido conectivo denso que es esencial tanto en el crecimiento óseo como en su reparación y nutrición debido a su rica inervación e irrigación, además de ser el sitio de unión de tendones, ligamentos y músculos [Roberts, 2015]. Internamente, los huesos largos poseen una cavidad central, la cavidad medular donde aloja a la médula ósea, llamada roja cuando está formada por tejido hematopoyético, y amarilla cuando su componente principal es adiposo. Las superficies internas del hueso están cubiertas por una membrana formada por una delgada capa de células planas llamada *endostio*. Este recubre tanto la cara interna del hueso cortical como el hueso trabecular (se describen más adelante), además de tapizar conductos que transportan vasos sanguíneos y nervios, los conductos de Havers y Volkmann [Geneser, 2006].

El tejido óseo se puede clasificar, por su organización, en **tejido óseo cortical o compacto** y **tejido óseo trabecular o esponjoso**. El esqueleto humano está compuesto por un 80% de hueso cortical y 20% de hueso trabecular, variando la proporción de cada uno de ellos en los diferentes huesos del organismo o incluso entre regiones de un mismo hueso [Clarke, 2008].

1.1.1.2 Estructura microscópica

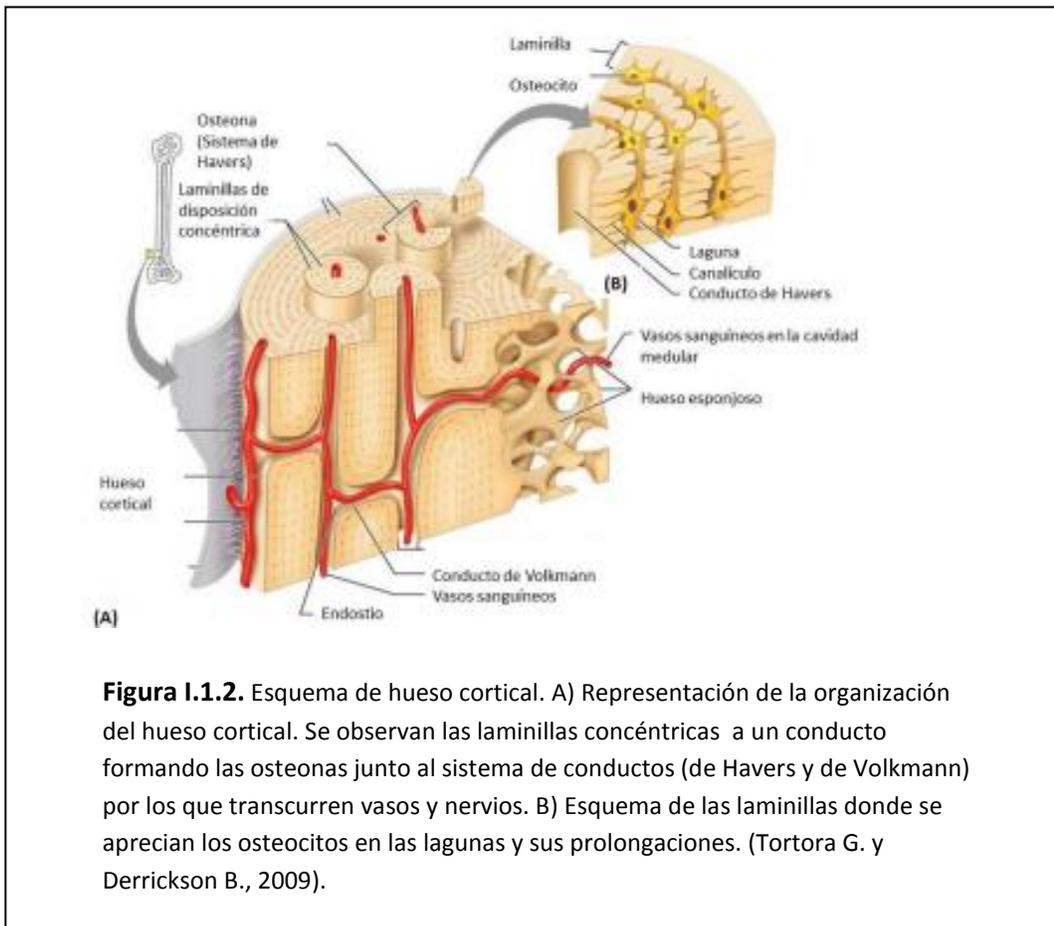
Tanto el hueso cortical como el trabecular se organizan en estructuras básicas denominadas **osteonas o sistemas de Havers**, variando en cuanto a su organización en cada tipo de hueso.

- ✓ **Tejido óseo cortical o compacto:** se aprecia como una masa compacta, sin espacios apreciables a simple vista. Se encuentra 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 en la parte más externa de las epífisis. Esto le confiere protección y soporte para el peso y movimiento. A nivel microscópico, la unidad estructural tiene forma cilíndrica con el eje mayor paralelo al eje del hueso, las osteonas corticales. Cada una de ellas posee un conducto central por el que transcurren vasos sanguíneos y nervios, el conducto de Havers. Alrededor de cada conducto se disponen, concéntricamente, laminillas de matriz ósea. Los conductos de Havers se comunican entre sí a través de conductos perpendiculares a la osteona, los conductos de Volkmann, por los que

también transcurren vasos sanguíneos y nervios y se diferencian de los anteriores por no estar rodeados de laminillas concéntricas (Figura I.1.2).

En las laminillas hay espacios denominados *lagunas* donde se alojan osteocitos, un tipo celular del tejido óseo (ver sección siguiente). Estas células emiten numerosas prolongaciones que transcurren por espacios en la matriz ósea, denominados *canaliculos*, que permiten establecer comunicación con otras lagunas y también con los conductos de Havers y Volkmann.

Entre las osteonas se encuentran zonas de tejido óseo irregular, denominadas *laminillas intersticiales*, que corresponden a restos de osteonas degradadas.



- ✓ **Tejido óseo trabecular o esponjoso:** este tipo de hueso se denomina así por su aspecto a simple vista, ya que se aprecian espacios tipo esponja. Se encuentra en el

interior del hueso, cubierto por hueso cortical como en los huesos planos, cortos, irregulares y en la profundidad de las epífisis de huesos largos como también en las metáfisis. Está formado por finas láminas, las *trabéculas*, y se entrecruzan formando un reticulado, el espacio que queda entre ellas está ocupado por médula ósea. La unidad estructural es la osteona trabecular pero no se observan conductos de Havers ni de Volkmann. Tiene forma de disco plano de espesor variable, de no más de 0,4 mm para permitir la difusión de nutrientes desde el endostio mediante un sistema de canalículos comunicantes. Esta osteona está formada por laminillas que transcurren paralelas al eje del disco, y en el caso de huesos que soportan carga mecánica como las vértebras, las trabéculas son más gruesas en el sentido de la carga (Figura I.1.3). La tasa de recambio del hueso trabecular es mayor que la del hueso cortical, y en exceso respecto a lo necesario para mantener la fuerza mecánica del hueso, indicando que su recambio participa en la homeostasis mineral [Clarke, 2008].

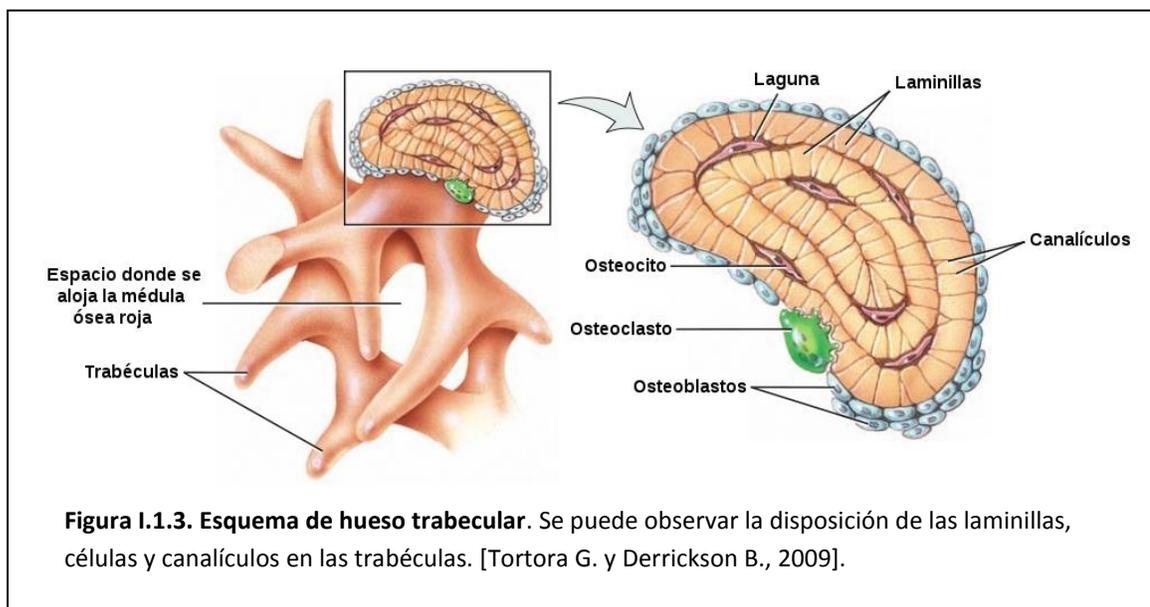


Figura I.1.3. Esquema de hueso trabecular. Se puede observar la disposición de las laminillas, células y canalículos en las trabéculas. [Tortora G. y Derrickson B., 2009].

I.1.2 Composición del tejido óseo: Matriz y células

I.1.2.1 Matriz ósea

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo. La matriz ósea extracelular se compone de una matriz orgánica u osteoide y de sales inorgánicas. La matriz orgánica constituye el 40% del peso en seco y está formada por fibras de colágeno tipo I en un 90%, proteoglicanos, fosfoproteínas, fosfolípidos y glicoproteínas; mientras que los componentes inorgánicos representan un 60% del peso en seco del hueso y están compuestos en su mayor parte por depósitos de fosfato de calcio cristalino (y una pequeña parte de fosfato de calcio amorfo), casi idénticos a los del mineral hidroxiapatita, con fórmula general $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Los cristales se disponen en paralelo, en relación estrecha con las fibras de colágeno [Geneser, 2006]. Además del fosfato de calcio, el componente mineral incluye otros iones como magnesio, potasio, sodio, carbonato y citrato. El contenido de sales inorgánicas le proporciona las propiedades de dureza y resistencia a la compresión del tejido óseo, mientras que sus propiedades elástica y la resistencia a la tracción se debe a la presencia de colágeno [Geneser, 2006].

La matriz orgánica está compuesta por fibras de colágeno y proteínas no colágenas incluidas en sustancia fundamental que contiene principalmente proteoglicanos. El colágeno presente en la matriz es mayormente de tipo I aunque también hay de tipo V y se han encontrado vestigios de colágeno tipo III, XI y XIII. La proteína mayoritaria es el colágeno, que representa un 90% de las mismas, el resto está formado por otras proteínas que son esenciales para el desarrollo, crecimiento y reparación del hueso. Esas proteínas son sintetizadas por células óseas y se pueden dividir en grupos [Ross & Pawlina, 2007]:

- Proteínas glicosiladas, como la Fosfatasa alcalina, osteonectina, tetranectina, tenascina-C y tenascina-W.
- Proteínas dependientes de vitamina K, γ -carboxiladas, como la osteocalcina que capta el calcio desde la circulación, atrae y estimula osteoclastos. Esta proteína es sintetizada por células osteoblásticas y se relaciona con la mineralización ósea. Luego de su síntesis la mayor parte es carboxilada e incorporada a la matriz extracelular pero una pequeña parte no se carboxila y se libera a circulación; Proteína S que interviene en el removimiento de células que entran en apoptosis; y Proteína-Gla de Matriz (MGP) que participa en el desarrollo de calcificaciones vasculares.

- Glucoproteínas multiadhesivas que actúan en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la matriz mineralizada. Por ejemplo: sialoproteínas como la *osteopontina* (que interviene en la adhesión de las células a la matriz ósea) y las *sialoproteínas I y II* (que intervienen en la adhesión celular e inician la formación de fosfato de calcio durante el proceso de mineralización).
- Factores de crecimiento y citoquinas que son proteínas reguladoras pequeñas entre las que se encuentran los *factores de crecimiento insulino similares (IGF)*, el *factor de necrosis tumoral α (TNF- α)*, el *factor transformante de crecimiento β (TGF- β)*, los *factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF)*, las *proteínas morfogénicas óseas (BMP)* y las *interleuquinas (IL-1, IL-6)*.

I.1.2.2 Células del tejido óseo

Las células asociadas al tejido óseo se pueden diferenciar en cinco tipos: células ostoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento y osteoclastos, y un tipo celular presente en la médula ósea, las células progenitoras de médula ósea (CPMO) o células estromales mesenquimáticas. Excepto los osteoclastos, cada una de estas células se puede considerar como una forma diferenciada de las células progenitoras mesenquimales, como se puede observar en la Figura I.1.4.

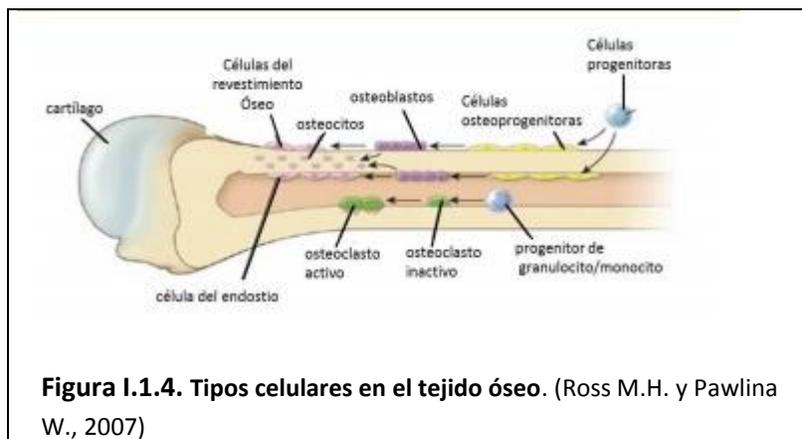


Figura I.1.4. Tipos celulares en el tejido óseo. (Ross M.H. y Pawlina W., 2007)

a. Células progenitoras de médula ósea (CPMO)

También conocidas como células estromales mesenquimáticas, las *células progenitoras de médula ósea* son un grupo de células indiferenciadas que presentan un alto potencial proliferativo y tienen dos características principales: son capaces de autorrenovarse, es decir, formar células idénticas a las de origen, y tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones específicas en el organismo, es decir, presentan *pluripotencialidad* [Flores-Figueroa, 2006; Tropel, 2004].

La célula con mayor potencialidad es el oocito fertilizado, ya que puede formar todas las células del embrión como también las de la placenta, es *totipotencial*. Las células progenitoras embrionarias pueden diferenciarse a todos los tipos celulares que forman las tres capas del embrión (HSC, por sus siglas en inglés). Las células estromales mesenquimáticas o CPMO (MSC, *mesenchymal stem cells* en inglés) son células que derivan de tejidos mesenquimáticos como la médula ósea y el tejido adiposo, son multipotentes y pueden diferenciarse a varios tipos celulares como osteoblastos, adipocitos y condrocitos según el microentorno al que sean expuestas [Spencer, 2011; Tropel, 2004]. Los factores involucrados en la diferenciación de las CPMO hacia el fenotipo osteoblástico, adipocítico o condrocítico se describirán en la sección I.1.5.

Además de las CPMO, en la médula ósea se encuentran las *células progenitoras hematopoyéticas* (CPH), que dan origen a los componentes de la sangre.

b. Células osteoprogenitoras

Las células osteoprogenitoras derivan de la diferenciación de células progenitoras de médula ósea. Estas células aparecen en el mesénquima fetal cerca de los centros de osificación, en el endostio y en la parte profunda del periostio después del parto. Tienen una morfología similar a la de los fibroblastos, con núcleos aplanados y citoplasma claro. Durante la formación de hueso, las células osteoprogenitoras se dividen y desarrollan a células formadoras de hueso u osteoblastos. Esto ocurre durante la vida fetal y la etapa de crecimiento, pero en el adulto se relaciona con la reparación de fracturas [Geneser, 2006; Ross & Pawlina, 2007].

c. Osteoblastos

Los osteoblastos son las células formadoras de hueso que se originan a partir de células osteoprogenitoras por diferenciación a pre-osteoblastos y luego a osteoblastos maduros. Sintetizan y secretan el osteoide o matriz ósea orgánica (fibras de colágeno, proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína ósea, osteopontina), además de estar involucrados en el proceso de mineralización ósea, por producir fosfatasa alcalina. Esta enzima favorece la deposición de fosfato de calcio, siendo su actividad uno de los primeros marcadores del fenotipo osteoblástico. En las zonas de formación de hueso, se disponen como una capa de células cúbicas con citoplasma bien basófilo debido a la presencia de abundante retículo endoplasmático rugoso, presentan abundante aparato de Golgi y numerosas mitocondrias, con el núcleo en la zona opuesta a la que corresponde a la síntesis. Están en contacto entre sí mediante prolongaciones delgadas unidas por nexos [Geneser, 2006; Ross & Pawlina, 2007].

Otra función de los osteoblastos es la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que regulan tanto el reclutamiento como la diferenciación de osteoclastos, células que degradan hueso. Entre ellos se encuentran el Ligando para el Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa (RANK-L), interleuquinas, TNF- α , factor estimulante de colonias monocito-macrófago (M-CSF) y osteoprotegerina (OPG) [Rosenberg, 2012].

La osteoblastogénesis es inducida por factores sistémicos, como PTH, insulina, estrógenos, hormona de crecimiento, y locales que pueden ser sintetizados y secretados por los propios osteoblastos (factor de crecimiento transformante (TGF- β), proteínas séricas morfogénicas (BMPs), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento insulino-símil (IGF-1) [Rosenberg, 2012].

Alcanzada la finalización del proceso de formación ósea, los osteoblastos pueden tener tres destinos: incorporarse en su propio osteoide y continuar la diferenciación hacia osteocito (célula ósea madura); transformarse en células de muy baja actividad (células de revestimiento óseo) o continuar hacia el proceso de apoptosis [Clarke, 2008].

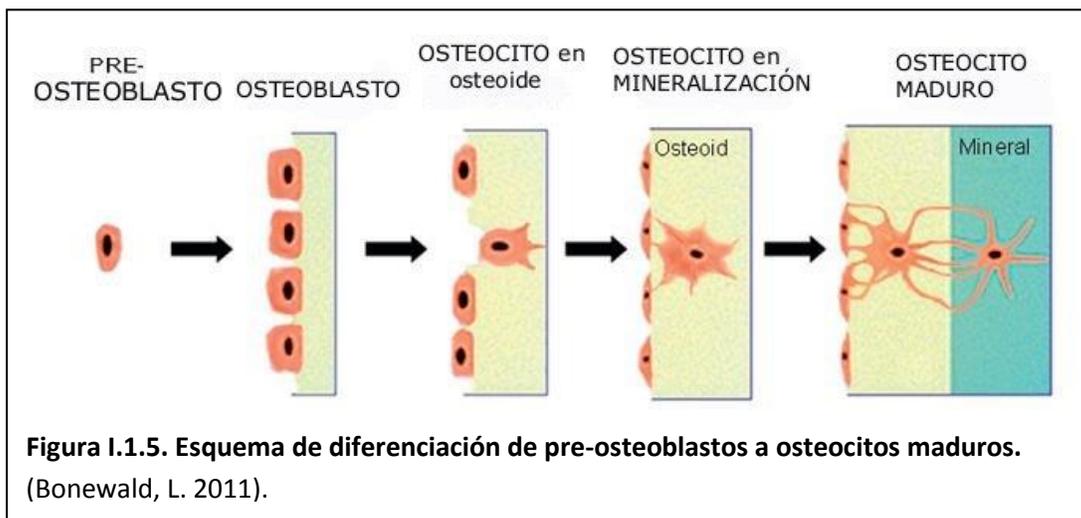
d. Osteocitos

Una vez que el osteoblasto se rodea completamente de osteoide, pasa a ser un *osteocito*, representando así el 90% de las células óseas en el esqueleto adulto [Ross & Pawlina, 2007].

Poseen una vida media más larga que los osteoblastos, que viven semanas y que los osteoclastos, que viven días [Hekimsoy, 2008].

Cada osteocito se encuentra en una *laguna* dentro de la matriz, que se adapta a la forma de la célula. Son más pequeños que los osteoblastos por tener menos citoplasma. Tienen numerosas prolongaciones citoplasmáticas a través de los *canalículos* de la matriz, contactándose con otros osteocitos o con células de revestimiento aunque también se comunican indirectamente con osteoblastos, pericitos de los vasos sanguíneos o con otras células distantes mediante moléculas señal [Ross & Pawlina, 2007].

Los mecanismos de selección por los cuales los osteoblastos maduran a osteocitos no se conocen completamente, pero se sabe que un 10-20% de los osteoblastos se convierten en osteocitos mediante un proceso que dura 72 horas aproximadamente, en el cuál la célula sufre cambios morfológicos: aumenta de tamaño al producir matriz extracelular, se redistribuyen las organelas y cambia de cúbica a estrellada ya que emite prolongaciones hacia el frente de mineralización para mantener la comunicación entre osteocitos y con células de la superficie [Bonewald, 2011].



La función primaria de los osteocitos es la de **sensor mecánico**: la carga mecánica que recibe el esqueleto afecta la actividad de osteoblastos y osteoclastos. La posición que tienen los osteocitos en la matriz es propicia para registrar diferencias en la carga mecánica y traducirla en señales bioquímicas. La carga mecánica produciría un flujo de líquido intersticial entre la pared del canalículo y la membrana del osteocito produciendo un esfuerzo de corte tangencial (*shear stress*) que deformaría el cuerpo de la célula en la laguna y las prolongaciones en los canalículos. Estas

cargas/descargas *in vivo* producen variaciones en la expresión génica de los osteocitos. Ante la presencia de carga mecánica normal sobre el esqueleto, los osteocitos envían señales que inhiben a los osteoclastos como prostaglandina E₂, óxido nítrico, IGF, ATP y aumento del Ca⁺² intracelular, activándose la vía de la β-catenina. Cuando esta carga no está presente, como en la inmovilización, se activa la resorción ósea: M-CSF y RANKL estimulan la formación de osteoclastos, mientras que se inhiben a los osteoblastos mediante la secreción de esclerostina, que a su vez también induce la formación de osteoclastos por aumento de los niveles de RANKL y disminución de osteoprotegerina [Wijenayaka, 2011; Niedzwiedzki, 2015].

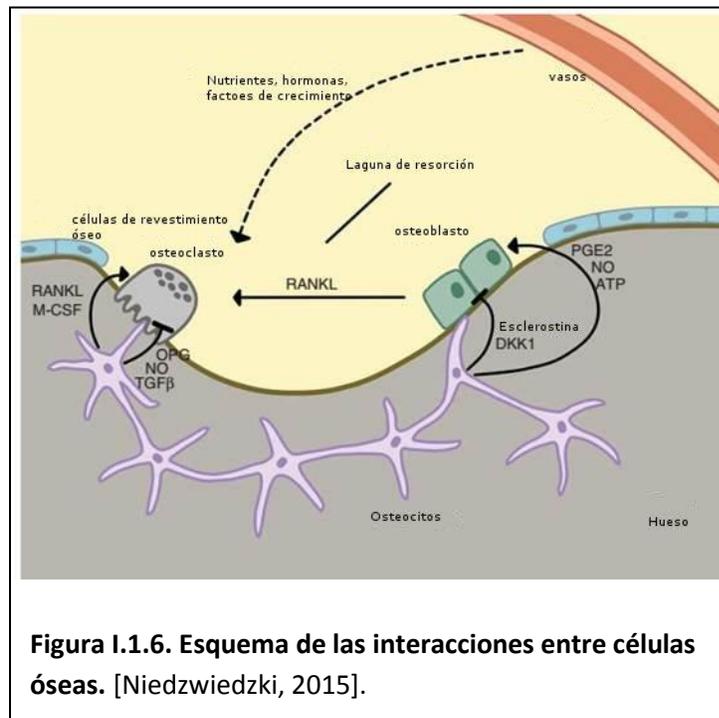


Figura I.1.6. Esquema de las interacciones entre células óseas. [Niedzwiedzki, 2015].

Los osteocitos tienen la capacidad de modificar su matriz pericelular mediante un proceso denominado **osteólisis osteocítica** [Bonewald, 2011]. Estas células pueden formar nueva matriz o remover la matriz en su laguna. Este proceso no se da extensamente y ocurre por inducción de la PTH (hormona paratiroidea) o bajo una dieta pobre en calcio, por lo que este mecanismo aumentaría la concentración sérica de este ion.

Estas células están involucradas también en el *metabolismo mineral*. Expresan una serie de factores o proteínas selectivas, como la *esclerostina* que es un antagonista de un regulador positivo de la masa ósea (LPR5, receptor de la lipoproteína 5), inhibiendo a los osteoblastos. También se ha demostrado su rol en la reabsorción de fosfatos en el riñón, pudiendo considerar al sistema de lagunas y canalículos como una estructura endócrina, ya que produce señales que regulan la actividad de órganos distantes, como el riñón [Bonewald, 2011].

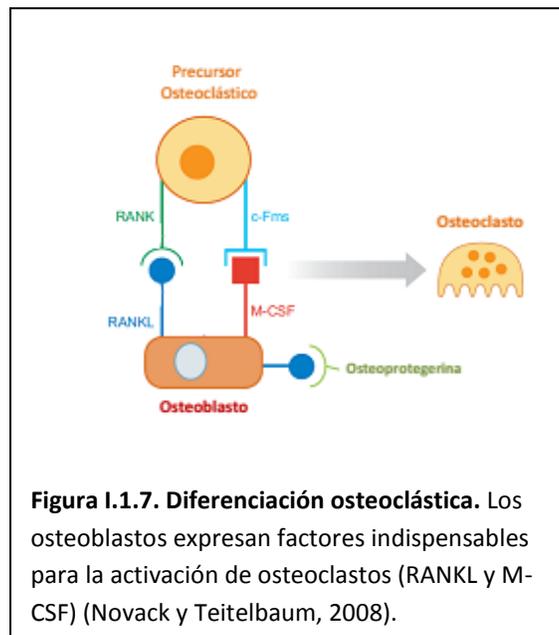
Los osteocitos pueden morir por senescencia, degeneración/necrosis, apoptosis o pueden ser fagocitados por osteoclastos. La apoptosis puede inducirse por inmovilización, micro-daño, falta de estrógenos o por el aumento de TNF- α . Este daño en los osteocitos genera un aumento en los niveles de RANKL y M-CSF, con la consecuente activación de la actividad osteoclástica [Hekimsoy, 2008].

e. Osteoclastos

Son las únicas células que son capaces de resorber el hueso. Derivan de células precursoras mononucleares, a partir de las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM), presentes en la médula ósea [Geneser, 2006; Clarke, 2008]. Estas células precursoras pueden llegar a la superficie ósea por el torrente sanguíneo o por migración directa, donde se ubican, proliferan y se diferencian a pre-osteoclastos. Estas células todavía son mononucleares, las que se fusionan para formar los osteoclastos maduros [Geneser, 2006]. Los osteoclastos son células grandes (hasta 100 μm de diámetro) que tienen entre 5 y 10 núcleos por célula y citoplasma acidófilo ya que presentan numerosas mitocondrias. Producen la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), útil para su caracterización.

Para que se lleve a cabo la formación de osteoclastos, hay dos citoquinas críticas: el Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κB (RANKL) que se expresa en la membrana plasmática de osteoblastos y células estromales e interactúa con RANK (receptor activador del factor nuclear κB), expresado en la membrana de precursores osteoclásticos. El RANKL es miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y es crítico para la formación de osteoclastos [Ross & Pawlina, 2007; Clarke, 2008]; la segunda citoquina necesaria para este proceso es el factor estimulante de colonias monocíticas-macrofágicas (M-CSF), que también se expresa en la membrana de osteoblastos/células estromales y promueve la proliferación, supervivencia y diferenciación de los precursores osteoclásticos. Este se une a un receptor de membrana expresado en los pre-

osteoclastos, denominado c-Fms, con actividad tirosinquinasa [Clarke, 2008; Novack y Teitelbaum, 2008]. Por lo tanto, para que se produzca la osteoclastogénesis, es necesario el contacto directo de estos dos factores entre osteoblastos y los pre-osteoclastos mediante moléculas de membrana (Figura I.1.6 y Figura I.1.7).

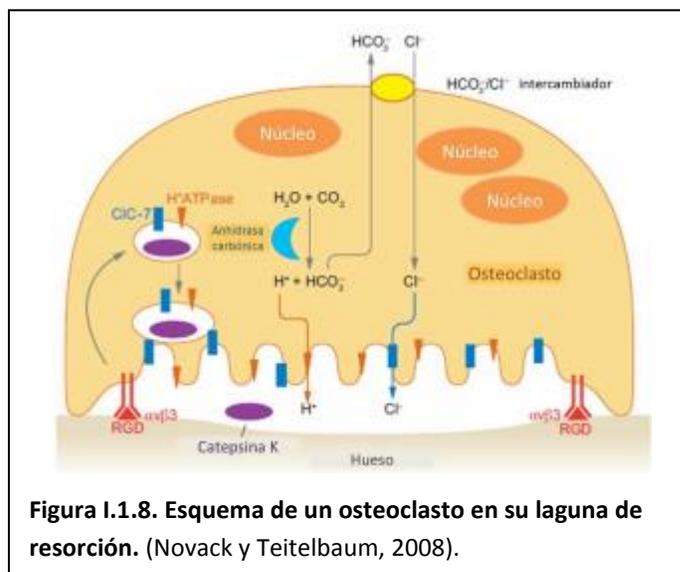


El $\text{TNF-}\alpha$, elevado en situaciones inflamatorias, es capaz de actuar sinérgicamente con el RANKL y estimular la osteoclastogénesis [Novack y Teitelbaum, 2008].

La osteoprotegerina (OPG) es una proteína soluble secretada por los osteoblastos, que une RANKL con gran afinidad para inhibir su acción sobre RANK, limitando la formación de osteoclastos. Las concentraciones relativas de RANKL y OPG determinan la proliferación y diferenciación de los precursores osteoclásticos, y por lo tanto, la masa ósea [Boyce, 2012]. Su producción está influenciada por varios factores, como PTH, estrógenos, interleuquina-1, prostaglandina E_2 , TNF, TGF- β , vitamina D [Ross & Pawlina 2007].

El proceso de resorción ósea comienza con una reorganización del citoesqueleto de los osteoclastos para adherirse a la superficie ósea fuertemente, mediante un anillo rico en actina, la *zona sellada* (Figura I.1.8). En esa zona, la *laguna de resorción*, los osteoclastos se polarizan, formando un borde festoneado hacia la superficie mineralizada, lo que aumenta el área desde la

cuál van a secretar activamente enzimas proteolíticas junto con H^+ que acidifican el medio y desmineralizan la matriz. Al disolverse el mineral, queda expuesta la matriz orgánica que va a ser degradada por la catepsina K, una enzima proteolítica. Durante este proceso, los osteoclastos son capaces de fagocitar los osteocitos, el mineral y la matriz orgánica degradada. Por último, el osteoclasto puede morir por apoptosis o volver a la forma no resortiva y desplazarse con rapidez por la superficie del hueso, para un posible nuevo proceso de resorción. La zona liberada de células y matriz está disponible para la formación de hueso nuevo por los osteoblastos [Boyce, 2012; Novack y Teitelbaum, 2008].



f. Células de revestimiento óseo

En las zonas donde no hay remodelamiento óseo, la superficie está cubierta por una capa de células planas. Proviene de osteoblastos que no sufrieron apoptosis ni se convirtieron en osteocitos luego del proceso de formación ósea y que redujeron su citoplasma y maquinaria de organelas para convertirse en células quiescentes. Se encuentran revistiendo superficies externas e internas del hueso, donde no hay osteoblastos ni osteoclastos. Las que están en la superficie externa se denominan *células periósticas* y las que se ubican en la parte interna, *células endósticas*. [Ross & Pawlina, 2007; Geneser, 2006].

Estas células poseen prolongaciones citoplasmáticas que se extienden en canaliculos del hueso subyacente, comunicándose con los osteocitos. Por eso se cree que intervienen en el mantenimiento y nutrición de los osteocitos y además regulan el movimiento bidireccional del calcio y el fosfato entre el hueso y la sangre [Ross & Pawlina, 2007].

I.1.3 Mineralización de la matriz ósea

Se denomina *mineralización* al proceso por el cual se produce la deposición de minerales en la matriz extracelular orgánica del cartílago y tejido óseo. La matriz no mineralizada se denomina *osteoides*. Este proceso es regulado por los osteoblastos y comienza unos 20 días después de que los osteoblastos formaron la matriz ósea orgánica [Geneser, 2006].

El mecanismo exacto de mineralización aún no se conoce, pero inicialmente el mineral sería depositado en “huecos” en los extremos de las fibras de colágeno. Para que se produzca este proceso, la concentración local de iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} en la matriz debe superar su K_{ps} o producto de solubilidad; con este fin, la osteocalcina y otras sialoproteínas fijan Ca^{+2} , aumentando así la concentración local de este ion, lo que estimula a los osteoblastos a secretar fosfatasa alcalina. La función de esta enzima es liberar iones PO_4^{-3} , que causan un aumento local de pH hasta niveles básicos, lo cual disminuye el K_{ps} para el fosfato de calcio favoreciendo su depósito en forma de cristales. En esta etapa de concentraciones extracelulares altas de Ca^{+2} y PO_4^{-3} , los osteoblastos liberan pequeñas vesículas matriciales hacia la matriz ósea que contienen fosfatasa alcalina y pirofosfatasa que escinden iones PO_4^{-3} de otras moléculas de la matriz; luego se produce la cristalización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en las vesículas matriciales circundantes. Los cristales de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ inician la mineralización de la matriz por formación y depósito de cristales de hidroxiapatita en la matriz que rodea a los osteoblastos. Una vez que han precipitado los primeros cristales de hidroxiapatita, éstos crecen con rapidez hasta que se unen con los cristales vecinos producidos alrededor de otras vesículas.

En el tejido óseo recién formado se deposita alrededor del 80% del total del mineral al cabo de 3-4 días, lo que se denomina mineralización primaria. La mineralización completa tiene lugar en la

mineralización secundaria, luego de 3-4 meses durante los cuales los cristales de hidroxiapatita crecen en tamaño por intercambio del agua ligada a los cristales por mineral [Geneser, 2006; Ross & Pawlina, 2007].

I.1.4 Modelado y remodelado óseo

La osificación es el proceso por el cual se forma el tejido óseo y siempre tiene lugar por síntesis y secreción de matriz ósea orgánica por los osteoblastos que luego se mineraliza.

Hay dos formas de osificación: a) *intramembranosa*, que se produce en el tejido mesenquimático primitivo del feto, en el que las células mesenquimáticas se diferencian a osteoblastos y empiezan a secretar matriz. Los huesos que se originan de esta manera son los huesos planos del cráneo y parte de la mandíbula y la clavícula y b) *endocondral*, que ocurre a partir de un molde de cartílago hialino embrionario. Los demás huesos del esqueleto se originan por este tipo de osificación [Geneser, 2006].

Durante la vida, los huesos crecen en largo y en ancho, aunque también se produce modelado y remodelado óseo.

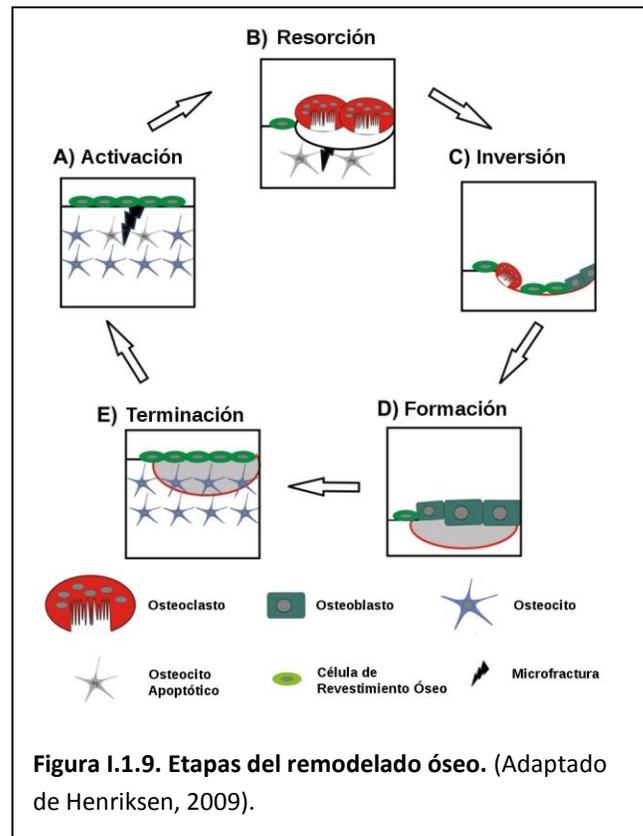
El **modelado** es el proceso por el cual los huesos cambian su forma adaptándose gradualmente a cambios fisiológicos o de fuerza mecánica. Se produce durante todo el periodo de desarrollo en paralelo al crecimiento longitudinal de los huesos y es menos frecuente en adultos. Se produce formación de hueso en algunas zonas y resorción en otras, se caracteriza porque estos procesos no están acoplados siendo las funciones de osteoblastos y osteoclastos independientes entre sí [Clarke, 2008; Geneser, 2006]. Durante el crecimiento predomina el proceso de formación ósea, por lo que la masa va aumentando continuamente hasta alcanzar el pico máximo a los 20-25 años, momento en el que el esqueleto adquiere su forma y tamaño definitivos [Geneser, 2006].

El **remodelado** es el proceso por el cual se reemplaza tejido óseo formado por tejido nuevo, y por el cual se mantiene la fuerza ósea y la homeostasis mineral. Ocurre desde el nacimiento hasta la muerte, por lo que coexiste con el modelado durante la etapa de crecimiento. Este proceso previene la acumulación de micro-daños óseos al ir renovando pequeños “paquetes” de hueso

[Clarke, 2008]. Se caracteriza porque hay actividad acoplada de osteoblastos y osteoclastos, trabajando en conjunto para formar la Unidad Remodeladora Ósea (BFU).

El ciclo de remodelado se produce en cinco etapas secuenciales (Figura I.1.9):

1. Activación: Reclutamiento de precursores osteoclásticos de la circulación, desprendimiento de las células de revestimiento del endostio y fusión de dichos precursores para formar osteoclastos maduros [Clarke, 2008]. Las señales que determinan las zonas de remodelado puede ser la apoptosis de osteocitos en lugares cercanos a micro-daños o ser en lugares aleatorios [Henriksen, 2009].
2. Resorción: los osteoclastos resorben el hueso formando un *cono de corte* que se desliza degradando una porción cilíndrica [Geneser, 2006]. La actividad de los osteoclastos va a estar regulada por la relación RANKL/OPG, niveles de IL-1, IL-6, M-CSF, PTH, Estradiol, 1,25-dihidroxi vitamina D y calcitonina [Clarke, 2008].
3. Inversión: se produce por la transición de la resorción a la formación. No se conocen los mecanismos subyacentes. La formación de hueso nuevo ocurre solamente en las lagunas de resorción donde han sido removidos los restos de colágeno, esto último lo realizan las 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. Factores parácrinos secretados por osteoclastos o moléculas liberadas durante la resorción que pueden ser reconocidas por los osteoblastos (como TGF- β o IGF-1) serían los que dan inicio a esta etapa [Henriksen, 2009].
5. Terminación: no se conoce con exactitud como ocurre esta etapa pero sería importante la producción de esclerostina por los osteocitos de la matriz mineralizada. Esta molécula estaría implicada en la regulación del balance entre osteoblastos y células de revestimiento [Henriksen, 2009].



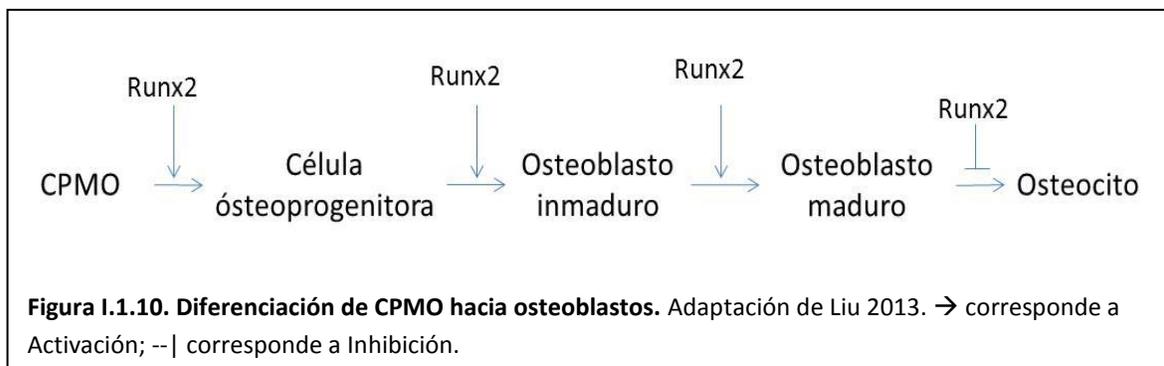
I.1.5 Diferenciación de las CPMO hacia distintos fenotipos

Como se mencionó en la sección I.1.2.2, las células progenitoras de médula ósea (CPMO) son capaces de diferenciarse a distintos fenotipos, como osteoblástico, adipocítico o condrocítico. Las condiciones del microambiente (que consta tanto de señales intracelulares como extracelulares) al que estén expuestas determinarán la expresión de genes específicos que las comprometerán hacia un linaje en particular. Así, las señales que inducen la diferenciación hacia un linaje pueden inhibir la diferenciación de las CPMO hacia otro [Tropel, 2004; James, 2013].

La **osteoblastogénesis** implica que las CPMO se diferencien a células osteoprogenitoras, que éstas se diferencien a pre-osteoblastos y estos últimos a osteoblastos maduros. Estos procesos requieren principalmente la expresión del factor Runx2 (*Runt related transcription factor2*), aunque también se requieren otros factores, como *Osterix* [James, 2013].

Runx2, también llamado factor de unión nuclear alfa (Cbfa1), es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de proteínas con dominio homólogo Runt, contiene un dominio N-terminal rico en glutamina y alanina y un dominio C-terminal rico en prolina/serina/treonina. Runx2 se expresa en células que todavía mantienen capacidad para diferenciarse en osteoblastos o condroblastos, así como también se expresa en condrocitos hipertróficos, odontoblastos y ameloblastos.

Tiene un rol esencial en la diferenciación osteoblástica, producción de matriz y mineralización durante la formación de hueso, dado que controla la expresión de la mayoría de los genes que codifican para las proteínas de la matriz ósea como: colágeno tipo I (col I), fosfatasa alcalina ósea (FAL), osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina (OC). Sin embargo, no es esencial para mantener la expresión de los genes de osteoblastos maduros y necesita ser suprimido para la formación de hueso maduro [Liu, 2013].



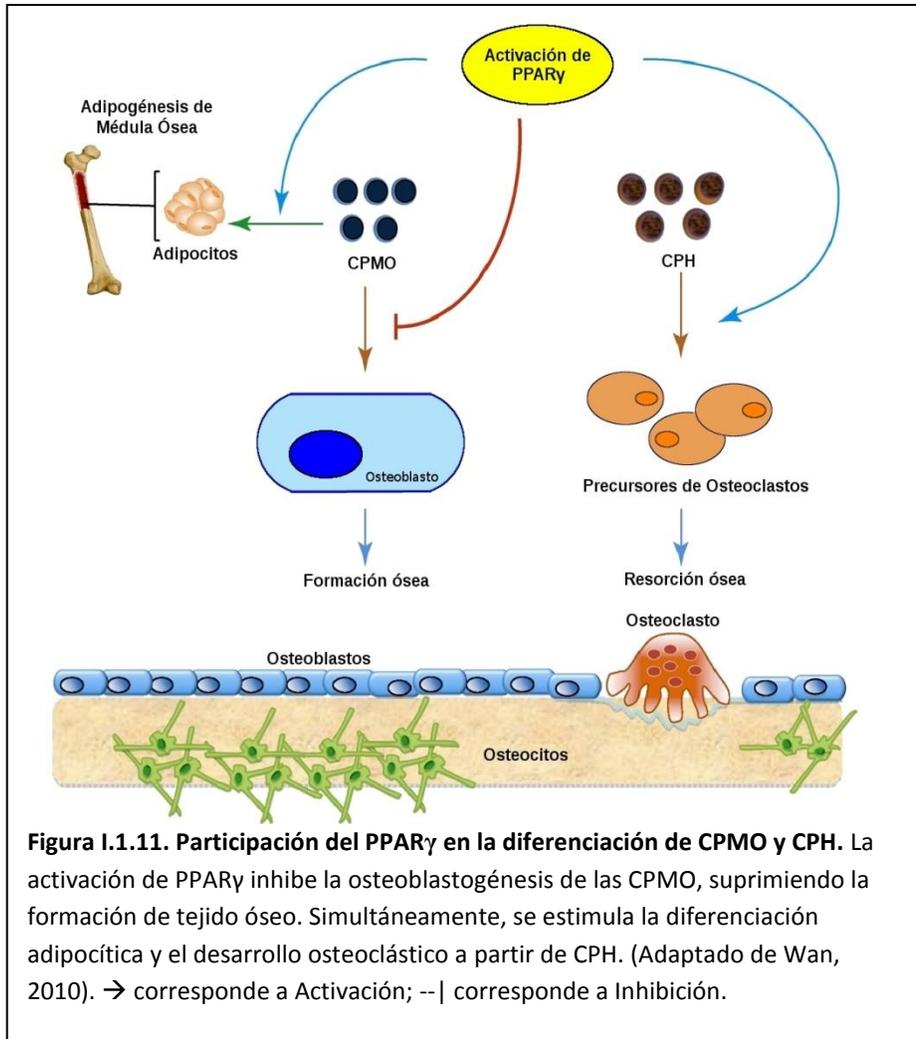
La **adipogénesis** es un proceso en el que las CPMO se comprometen hacia el linaje adipocítico y se da en dos fases, la primera de *determinación* hacia pre-adipocitos y una segunda fase en la que se sintetizan y acumulan lípidos al diferenciarse a adipocitos maduros. Es un proceso ordenado temporal y secuencialmente que involucra múltiples cascadas de señalización que convergen en la activación del 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 . Al ser activados forman heterodímeros funcionales, junto con el *receptor X de retinoides* (RXR) y se unen a elementos regulatorios para controlar la transcripción de genes involucrados en

la adipogénesis, el metabolismo lipídico, la inflamación y la homeostasis [James, 2013]. Es el principal regulador de la adipogénesis y tiene efectos anti-osteoblastogénicos, además de tener la capacidad de promover la osteoclastogénesis mediante la estimulación de células precursoras monocíticas (Figura I.1.10).

Entre los ligandos capaces de activar estos receptores se encuentran derivados de ácidos grasos como también compuestos sintéticos y lipofílicos naturales, como las tiazolidinedionas, prostaglandina J₂, ácidos grasos poliinsaturados y componentes de las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

PPAR γ regula la formación de diversos procesos metabólicos como: adipogénesis, metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina e inflamación; también se encuentra involucrado en patologías como la diabetes, obesidad y aterosclerosis. Su importancia se refuerza por el uso de activadores selectivos como las tiazolidindionas (por ejemplo, rosiglitazona y pioglitazona), las cuales son drogas empleadas en el tratamiento de la insulino resistencia y la diabetes tipo 2. El PPAR γ es un regulador metabólico para el destino de las células progenitoras mesenquimáticas, dado que una vez activado, la célula se va a diferenciar al fenotipo adipocítico en detrimento de la diferenciación osteoblástica.



La **condrogénesis** es otro de los destinos fenotípicos de las CPMO. La diferenciación condrogénica de CPMO es regulada por numerosas hormonas y factores de crecimiento. Entre los factores más prominentes se encuentran las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) cuya señalización vía receptores heteroméricos induce la fosforilación del receptor activado R-Smad. Los R-Smads fosforilados forman complejos con Smad4 y translocan al núcleo donde regulan la transcripción a un amplio rango de genes diana [Karystinou, 2015]. Solchaga et al. detalló la técnica de diferenciación condrogénica de las CPMO donde expuso que la conformación tridimensional de las células en los agregados de alta densidad celular y las interacciones células-células juegan un rol importante en este proceso. Estas condiciones físicas del cultivo junto con un medio de diferenciación definido conteniendo TGF- β y suplementado con Insulina-transferrina-selenio (ITS) es requerido para alcanzar la diferenciación condrogénica

[Solchaga, 2011]. Se cree que ITS promueve la proliferación de condrocitos y la formación de cartílago de alta calidad al regular la síntesis de matriz cartilaginosa específica [Liu, 2014]. Se supone que su efecto es a través del control de la expresión de genes específicos pero el mecanismo exacto no se ha dilucidado.

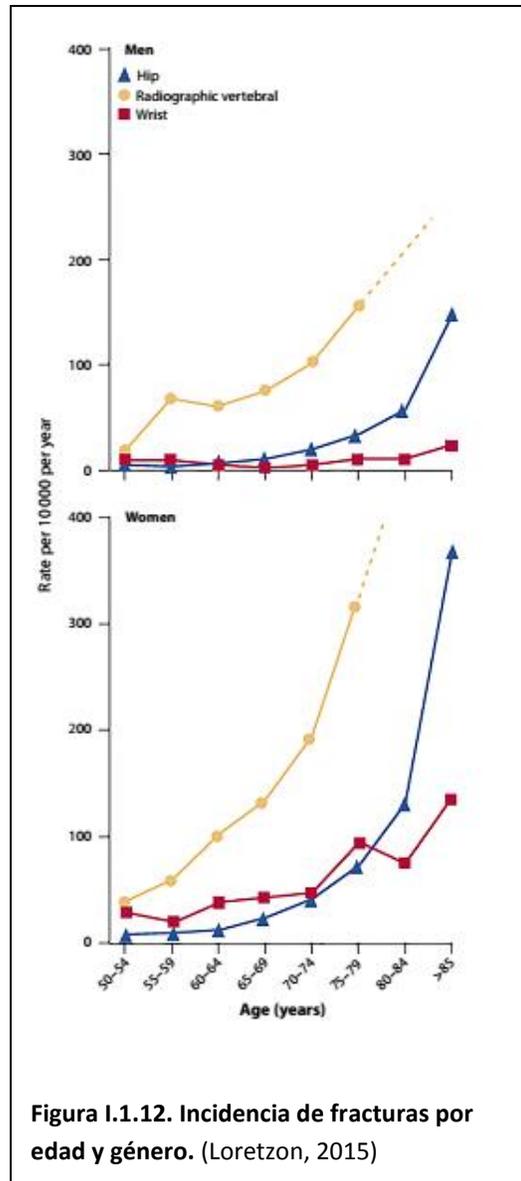
I.1.6 Osteoporosis

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente y representa uno de los mayores problemas de salud pública en todo el mundo, debido a los costos sociales y económicos que genera. Actualmente se define como “una enfermedad esquelética caracterizada por una resistencia ósea disminuida que predispone a una persona a un mayor riesgo de fractura” [NIH Consensus Statement, 2001].

La resistencia ósea depende de dos factores, la densidad mineral ósea (contenido mineral óseo) y la calidad ósea. La densidad mineral ósea (DMO) se expresa como los gramos de mineral por unidad de área o volumen y está determinada por el pico de masa ósea alcanzado durante el crecimiento y la pérdida de hueso. Esta información se obtiene por densitometría. La calidad o fortaleza ósea a su vez tiene dos componentes: (a) la calidad del material óseo, es decir sus propiedades mecánicas (rigidez y tenacidad); y (b) la calidad del diseño o arquitectura ósea, determinada por la distribución espacial de sus componentes cortical y trabecular [Ferretti, 2001]. La micro-arquitectura ósea se puede evaluar mediante técnicas histomorfométricas, o por métodos de imagen como micro-tomografía computada.

Al mejorar la calidad de vida, las condiciones socio-económicas y el estilo de vida en el último siglo, se ha incrementado la esperanza de vida de muchos países. Así, la incidencia de afecciones que se desarrollan principalmente en personas mayores ha aumentado considerablemente. Se ha observado un aumento en las fracturas por fragilidad u osteoporóticas en los últimos 50 años tanto en países industrializados como en vías de desarrollo. El riesgo de fracturas aumenta exponencialmente con la edad y más del 70% de todas las fracturas afectan a mujeres mayores de 65 años (Figura I.1.12). Después de los 50 años, una de cada dos mujeres y uno de cada cinco hombres van a sufrir al menos una fractura por fragilidad [Loretzon, 2015].

La osteoporosis es asintomática y los pacientes acuden a atención médica después de sufrir una fractura por fragilidad, la primera manifestación de la enfermedad. Se observan compresión vertebral, fractura de cadera, muñeca, hombro o antebrazo como los lugares más frecuentes de lesión. Estas fracturas se producen por traumas de baja energía, como caerse desde estar parado o menos, debido a una resistencia ósea reducida. En mujeres con baja DMO las fracturas de vértebra, hombro, muñeca o antebrazo resultan ser discapacitantes (o inhabilitantes) y más aún las de cadera que son más riesgosas y aumentan la mortalidad de los pacientes que las padecen [Loretzon, 2015]. En nuestro país se estima que la media de edad en que se produce la fractura de cadera es 82 años en mujeres y 79 años en varones, siendo la tasa media anual de 298 fracturas cada 100000 mujeres mayores de 50 años. Si bien las fracturas vertebrales también son frecuentes, solo 1 de cada 3 reciben atención médica. En ambos casos, constituyen una problemática de salud pública por los costos que implican los tratamientos y además por los trastornos que les genera a los pacientes la recuperación de dichas fracturas por su alta tasa de morbi-mortalidad. Es importante remarcar que si bien muchas de las fracturas por fragilidad se deben a una osteoporosis establecida, el número absoluto de fracturas es mayor en pacientes osteopénicos (pacientes con baja DMO, previo a desarrollar osteoporosis) [Schurman, 2012].



Los factores de riesgo de osteoporosis y fracturas más importantes son:

1. Edad, sexo y etnia: la incidencia de fracturas es mayor en mujeres postmenopáusicas de origen caucásico y en el último tercio de la vida para ambos sexos, siendo mayor la incidencia en la raza blanca.
2. Menopausia precoz y deficiencia de estrógenos en la premenopausia.
3. Delgadez: personas con un índice de masa corporal bajo o en mujeres con bajo peso (<55 kg ya se considera un indicador de riesgo).

4. Antecedentes de fracturas previas por bajo trauma: personas con este antecedente tienen un riesgo mayor de sufrir nuevas fracturas osteoporóticas. La disminución de la talla en 3 cm o más pueden orientar al médico a la presencia de aplastamientos vertebrales.
5. Antecedentes familiares: familiares cercanos (madre, abuela) que padecieron fracturas de vertebra, cadera, muñeca, tienen mayor riesgo de padecer osteoporosis.
6. Sedentarismo: el ejercicio en la edad adulta contribuye a mantener la masa ósea, conservar el tono muscular adecuado y mejorar los reflejos, factores que disminuyen la incidencia de caídas.
7. Alto recambio óseo: niveles elevados de marcadores de recambio óseo aumentan el riesgo de padecer fracturas.
8. Tabaco: los fumadores tienden a ser más delgados y hacer menos actividad física, contribuyendo negativamente a la masa ósea, además de intervenir en los factores patogénicos de la enfermedad.
9. Tratamientos: corticoides, citostáticos, heparina, anticonvulsivantes.

El diagnóstico de osteoporosis se realiza según los criterios diagnósticos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Fundación Europea de Osteoporosis y Enfermedad ósea y la Fundación Nacional de Osteoporosis de Estados Unidos en 1994, aún vigentes. La clasificación se basa en comparar valores de DMO del paciente adulto con la media (\pm desvío estándar) de valores de pacientes jóvenes del mismo sexo y raza [Schurman, 2012]. Esta determinación se realiza por absorciometría dual de rayos X (DXA).

Tabla I.1.1. Clasificación de los valores de DMO

Normal: hasta -1.0
Osteopenia: inferior a -1.0 y hasta -2.5
Osteoporosis: inferior a -2.5
Osteoporosis grave: inferior a -2.5 más la presencia de fractura

En la clasificación se considera el T-score que es el número de desvíos estándar por arriba o por debajo de la DMO normal de la población adulta joven del mismo sexo, estudiada por DXA central. El diagnóstico de osteoporosis puede realizarse en mujeres postmenopáusicas y hombres mayores de 50 años si el T-score es menor a 2.5 en raquis lumbar, fémur total o cuello femoral. Puede usarse el radio también, pero en circunstancias particulares [Schurman, 2012].

1.1.6.1 Causas y tipos de osteoporosis

La osteoporosis tiene causas multifactoriales pero puede diferenciarse en dos tipos, una *primaria* en la que no hay factores causales claramente aparentes, y una *secundaria* en la que es posible identificar el origen de la patología, excluyendo la menopausia y el envejecimiento.

La osteoporosis primaria es la forma más frecuente de la enfermedad, que se debe a procesos fisiológicos normales que producen una condición de fragilidad ósea con el consiguiente riesgo de fracturas. Existen dos tipos de osteoporosis que afectan a la población joven, éstas son la *osteoporosis idiopática juvenil* (que afecta a niños entre 8 y 14 años) y la *osteoporosis idiopática de adultos jóvenes*. Ambos casos son muy poco frecuentes.

Por otro lado, la osteoporosis primaria involutiva se clasifica en osteoporosis postmenopáusica o tipo I y la osteoporosis primaria senil o de tipo II. La osteoporosis de tipo I afecta a mujeres con pérdida acelerada de la masa trabecular desde el inicio del climaterio, que conlleva a riesgo aumentado de fracturas de cuerpos vertebrales o fractura distal de radio. Afecta en una relación 6:1 respecto a varones presentándose mayormente entre los 51 y 75 años. En la fisiopatología de la enfermedad se ha descrito la disfunción paratiroidea, disminución de la absorción intestinal de

calcio y secundariamente, de la hidroxilación renal de vitamina D. La osteoporosis de tipo II afecta a ancianos que pierden tanto masa cortical como trabecular del hueso, con elevado riesgo de fractura de cadera. Afecta principalmente a mujeres pero con una relación respecto a varones 2:1 y aparece desde los 70 años. En este caso la función paratiroidea está aumentada, con disminución de la absorción intestinal de calcio y la disminución de la hidroxilación de la vitamina D se da primariamente [Riggs y Melton, 1983].

La osteoporosis secundaria se genera por una lista de factores extensa e incluye enfermedades variadas. Puede presentarse en pacientes con alcoholismo crónico, hipercortisolismo, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, inmovilización, síndromes de malabsorción, uso crónico de anticonvulsivantes, anticoagulantes, corticoides o litio, quimioterapia, hipogonadismo, enfermedades renales crónicas.

1.1.6.2 Tratamiento de la osteoporosis

El mejor tratamiento anti-osteoporótico es la prevención. Mediante la información sobre esta enfermedad, nutrición adecuada, actividad física e ingestas adecuadas de calcio y vitamina D desde la infancia, manteniéndolo en la adolescencia y en adultos jóvenes se promueve alcanzar una masa ósea máxima entre los 20 y 30 años.

El tratamiento farmacológico de la osteoporosis tiene por objetivo reducir la incidencia de las fracturas osteoporóticas. Si bien se identificaron numerosos factores de riesgo además de la osteoporosis como el sexo, la edad, antecedentes personales y familiares, la acción de estos agentes está dirigida a mejorar la masa y estructura ósea. Los lineamientos de estilo de vida, ingestas adecuadas de calcio, niveles aceptables de vitamina D y actividad física aplicables a la población general constituyen una recomendación estándar adicional a cualquier tratamiento farmacológico. Actualmente hay una gran oferta de fármacos para tratar la osteoporosis, con mecanismos de acción variados, por lo que se observa una efectividad diferente en la prevención de distintos tipos de fracturas osteoporóticas. Esto trae acaparado ventajas y desventajas ya que la toma de decisión en el tratamiento a administrar se complica pero da la posibilidad de ir

variando los tratamientos o ir combinándolos según los resultados observados en cada paciente. Por eso es necesario un estudio exhaustivo de cada caso particular y las causas que producen la osteoporosis. Con este objetivo se han desarrollado una gran variedad de tratamientos que se detallan brevemente a continuación.

1. Calcio y vitamina D: los niveles necesarios para mantener la masa ósea están determinados por un “umbral”, es decir, por debajo de cierto valor la masa ósea se ve afectada, mientras que por encima de él, mayores aportes de estos compuestos no se reflejan en un aumento de la masa ósea. Se recomienda universalmente la administración de calcio y vitamina D junto con fármacos antiresortivos u osteoformadores en el tratamiento de la osteoporosis. Esto se debe a que la vitamina D cumple un papel importante en la absorción de calcio. El metabolito activo es la 1,25-dihidroxitamina D, de vida media corta (4 horas) y más costosa, por lo que es posible administrar 25-hidroxitamina D más económica y de mayor vida media [Dawson-Hughes, 2005].
2. Calcitonina: actúa sobre los osteoclastos mediante receptores de membrana, haciendo reorganizar su citoesqueleto y desaparecer el borde festoneado en la laguna de resorción. Así permite estabilizar la masa ósea vertebral [Silverman, 2003].
3. Estrógenos: actúan sobre los osteoblastos, mediante receptores estrogénicos. Por disminución de la relación RANKL/OPG, se inhibe la actividad osteoclástica. Se postula que pueden tener, además, efectos indirectos mediante la disminución de citoquinas que degradan hueso.
4. Raloxifeno: existen dos tipos de receptores de estrógenos y se han podido desarrollar fármacos que estimulen selectivamente unos e inhiban los otros. Estos fármacos se denominaron moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM) y actúan como antagonistas estrogénicos en el tejido mamario, y agonistas en el tejido óseo. Así se logró evitar el efecto desfavorable, el cáncer de mama a expensas del favorable, la inhibición de la resorción ósea.
5. Hormona paratiroidea (PTH): la hormona paratiroidea al actuar sostenidamente en el hueso produce resorción ósea. Actúa sobre los osteoblastos, aumentando la producción de RANKL y por lo tanto, estimulando la osteoclastogénesis. Al administrarse en forma

intermitente, como sería mediante una inyección diaria, estimula la formación ósea. El mecanismo por el cual se observa esta diferencia no se conoce pero se supone que la osteoclastogénesis implica una señalización celular más lenta. De esta forma, al administrarla intermitentemente se logra este segundo efecto a diferencia de la administración continua que genera ambos pero prevalece el primero. Hay dos formas de PTH, el fragmento aminoterminal 1-34 (Teriparatide) y la molécula completa (1-84). El ensayo clínico Fracture Prevention Trial [Neer, 2001] demostró la eficacia de la teriparatide en la reducción de fracturas vertebrales y no vertebrales, en tanto que otro estudio clínico, TOP [Greenspan, 2007] demostró la eficacia de la PTH 1-84 en fracturas vertebrales pero no en otras.

6. Ranelato de estroncio: se incorpora a los cristales de hidroxapatita e inhibe la actividad osteoclástica. Además puede estimular la proliferación osteoblástica y la producción de OPG. Estudios SOTI [Meunier, 2004] y TROPOS [Reginster, 2005] demostraron la eficacia en la prevención de fracturas vertebrales y no vertebrales.
7. Bisfosfonatos: son una de las alternativas terapéuticas más eficaces en la prevención de fracturas en mujeres osteoporóticas. Constituyen la primera línea de elección de tratamiento antiresortivo. Se han demostrado ampliamente sus acciones sobre la masa ósea y la prevención de fracturas. Se describen en profundidad en la próxima sección, por ser el fármaco de estudio en este trabajo de tesis.

I.1.7. Bisfosfonatos

Los bisfosfonatos (BP) son las drogas más utilizadas y las de primera elección en el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades que presentan un aumento de la resorción ósea como enfermedad de Paget, metástasis ósea, o complicaciones óseas asociadas a mieloma múltiple. En la osteoporosis postmenopáusica los BP reducen los marcadores de recambio óseo y se observa un aumento de la densidad mineral ósea (DMO) en columna lumbar y cadera y reducen el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales [Boonen, 2005; Reginster, 2000].

Los bisfosfonatos son análogos sintéticos no hidrolizables del pirofosfato inorgánico (PPi). El PPi se libera normalmente en las células por la hidrólisis de ATP a AMP ($\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PPi}$), y actúa como un inhibidor natural de la mineralización ósea. La fosfatasa alcalina, enzima de membrana presente en los osteoblastos, hidroliza el PPi a fósforo inorgánico (Pi), siendo éste un sustrato para la formación de hidroxiapatita [Orimo, 2010]. Los bisfosfonatos tienen fuerte afinidad por el mineral óseo y son potentes inhibidores de la resorción de dicho mineral mediante el bloqueo de sitios activos de disolución [Henneman, 2009].

Los bisfosfonatos se forman al reemplazar un enlace P-O-P por uno P-C-P, el cual no es hidrolizable química ni enzimáticamente por las fosfatasas. Por ese motivo, los BP se excretan inalterados, sin ser metabolizados [Russell, 2008]. La estructura tridimensional de los BP permite la quelación de iones divalentes como el Ca^{+2} , lo que hace que se eliminen rápidamente de circulación e *in vivo* tienen como blanco la hidroxiapatita de la superficie mineral ósea en los sitios de resorción, principalmente. Los BP se unen al mineral óseo y pueden ser liberados de la superficie del hueso en el ambiente ácido de la laguna durante la resorción ósea. Como la quelación del calcio ocurre en medio ácido, este proceso ocurre en la laguna de resorción [Ebetino, 1998]. Los BP, cargados negativamente, pueden ser tomados por células como los osteoclastos por endocitosis, aunque en otros tipos celulares ocurre por un mecanismo distinto. Morelli *et.al.* han descrito que en células osteoblásticas los BP tienen sitios de unión específicos y pueden incluir la apertura de hemicanales, como conexina 43, siendo la diana intracelular probable las fosfatasas [Lezcano, 2012; Lezcano, 2014].

La acción antiresortiva de los BP se debe tanto a la inhibición directa de la disolución mineral como también a la acción directa intracelular de inhibición de los osteoclastos. La afinidad por el mineral de los huesos varía entre los distintos tipos de BP y puede influir en la distribución diferencial dentro del hueso, la potencia biológica y la duración de la acción. El efecto anti-catabólico sobre los osteoclastos puede deberse a disminución del número de osteoclastos, alteración en el reclutamiento y/ a la inducción de apoptosis [Escudero, 2012]. La acción antiresortiva se debe a la inhibición de la actividad de osteoclastos maduros y también de la inhibición de la formación desde células hematopoyéticas. Este último efecto se ha estudiado principalmente *in vitro* y puede deberse a un efecto directo sobre los precursores osteoclásticos o indirecto, a través de la generación de factores que regulan el desarrollo y diferenciación terminal de osteoclastos [Van Beek, 1999]. En el caso de los BP que contienen nitrógeno, como el alendronato, el efecto

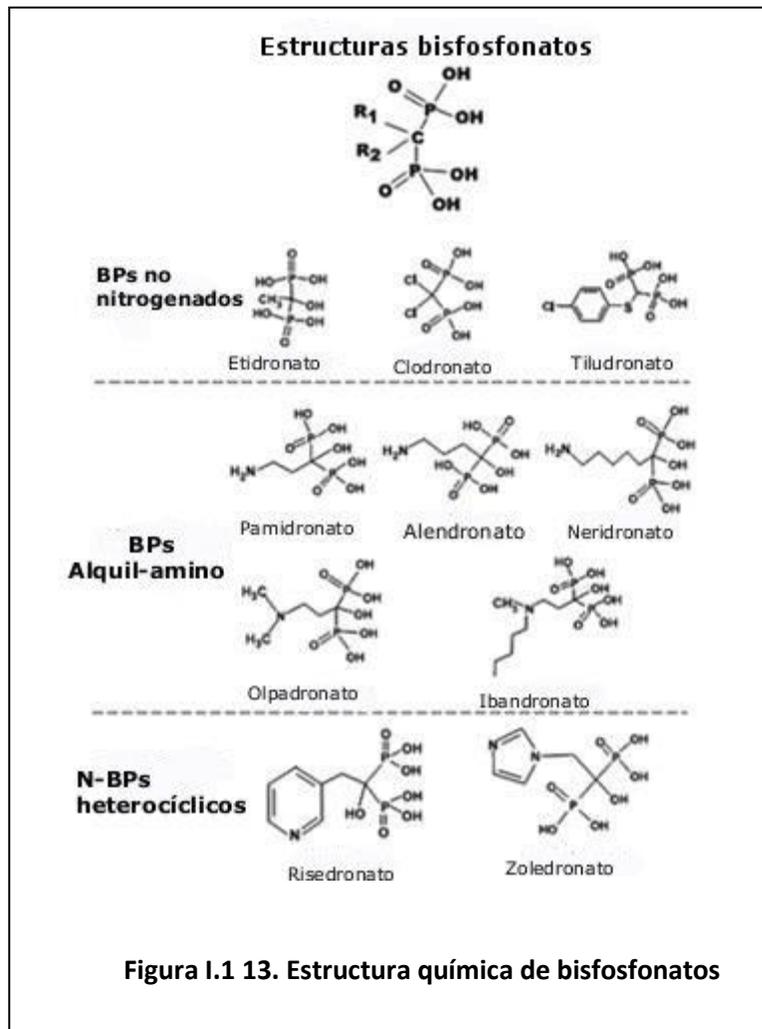
inhibitorio sobre osteoclastos se debe a la inhibición de la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS), una enzima clave en la vía de síntesis del mevalonato. Esta enzima genera isoprenoides utilizados en la modificación postraduccional de proteínas pequeñas asociadas a proteína G, esenciales para la función de los osteoclastos. Estas drogas también tendrían efectos antiapoptóticos sobre osteocitos y osteoblastos, y acción directa sobre estos últimos, que se discutirá más adelante [Bellido y Plotkin, 2006].

El amplio rango de actividad observado entre los BPs se debe a las cadenas laterales unidas al átomo de carbono, denominadas R1 y R2 [Lezcano, 2012] Tabla I.1.1. Los principales BP de uso clínico son: Etidronato de sodio (primera generación), Risedronato y Alendronato de sodio (segunda generación).

Tabla I.1.2. Bisfosfonatos y potencia antiresortiva

Bisfosfonato	Potencia	R1	R2
Etidronato	1	-OH	-CH ₃
Clodronato	10	-Cl	-Cl
Pamidronato	100	-OH	-(CH ₂) ₂ NH ₂
Alendronato	1000	-OH	-(CH ₂) ₃ NH ₂
Risedronato	5000	-OH	-CH ₂ -3-piridina
Ibandronato	10000	-OH	-(CH ₂) ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃
Zoledronato	>10000	-OH	-CH ₂ -imidazol

El zoledronato y risedronato son los más potentes debido a que el átomo de nitrógeno está en el anillo heterocíclico, mientras que el ibandronato, que tiene el grupo amino más sustituido es más potente que el alendronato y pamidronato, con su grupo amino sin sustituyentes. El aumento en la potencia se debe a su acción biológica sobre la inhibición de la FPPS y afinidad a la hidroxiapatita. En la Figura I.1.13 se muestran las estructuras químicas de los distintos bisfosfonatos.



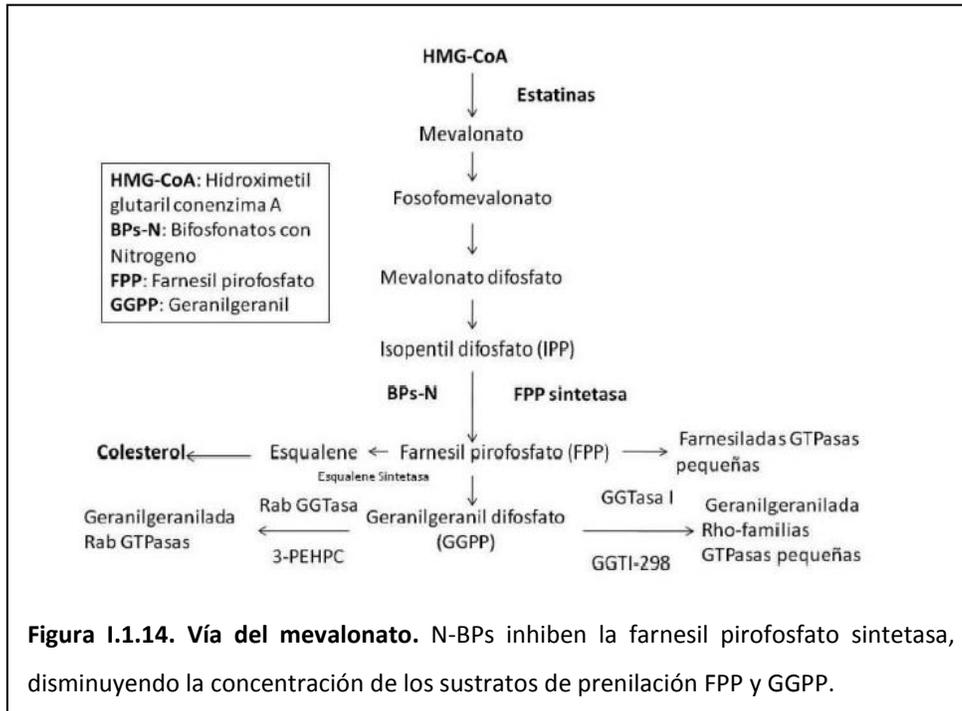
1.1.7.1 Mecanismo de acción de los bisfosfonatos

Los bisfosfonatos en general poseen la acción primaria de actuar sobre la hidroxiapatita (HAP). Los bisfosfonatos inhiben la precipitación de novo de fosfato de calcio desde la solución, retardan la transformación de HAP amorfa a cristalina, inhiben la agregación de cristales y también la disolución de los mismos. La afinidad de unión de cualquier BP puede predecir la posibilidad de ataque al hueso y la duración del efecto. Se ha postulado que la configuración tridimensional de los BP que contienen nitrógeno (N-BP) y la orientación de su átomo de nitrógeno puede jugar un rol importante en la afinidad por el mineral. Esto se debe a la capacidad de los N-BP de formar enlaces N-H-O en la superficie de la HAP [Russell, 2008].

Esa adsorción preferencial que presentan los BP por la HAP permite que estén en contacto con los osteoclastos. El pH ácido de la laguna de resorción aumenta la disociación del BP de la HAP, que se continúa con la incorporación del fármaco por endocitosis. Si bien los BP no son metabolizables, los BP simples o primeras generaciones (como clodronato o etidronato) pueden ser incorporados al ATP por reacción de la aminoacil-tRNA sintetasa. Estos BP son metabolizados a nucleótidos de tipo AppCp por su similitud con el PPI, los cuales se acumulan y resultan tóxicos para la célula, causando la apoptosis de los osteoclastos. Este constituye el mayor modo de acción de estos BP [Russell, 2008].

Los N-BP son varios órdenes de magnitud más potentes que los BP simples y son metabolizados a análogos tóxicos del ATP. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la farnesil pirofosfato sintasa (FPP), la enzima clave en la vía del mevalonato. Varias enzimas de la vía utilizan isoprenoides difosfato como sustrato y los N-BP pueden actuar como análogos de dichos sustratos, inhibiendo la actividad de una o varias de las enzimas involucradas. El principal blanco de acción es la Farnesil Pirofosfato Sintasa (FPPS), que es inhibida por todos los N-BP clínicamente usados. La inhibición de esta enzima produce una disminución en la concentración del sustrato FPP, necesario para la enzima que sigue en la vía, para producir geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) [Russell, 2008; Lezcano, 2012]. Tanto FPP como GGPP son necesarios para la modificación, llamada *prenilación*, de GTPasas pequeñas, una gran familia de proteínas de señalización fundamentales para la función y supervivencia de los osteoclastos (Figura I.1.7.2). Estas proteínas se acumulan en su forma no prenilada y no pueden ser reemplazadas en osteoclastos por la vía de recambio normal de proteínas.

Al inhibir esa enzima, se acumula el IPP, que puede reaccionar con AMP para formar un análogo del ATP (Apppl), del tipo AppCp como sucede con los BP simples. Este metabolito puede inhibir la adenina nucleótido translocasa mitocondrial, induciendo la apoptosis de osteoclastos.



De esta manera, los N-BP pueden producir apoptosis también, pero se ha demostrado que el mecanismo de acción crítico es la inhibición de la vía del mevalonato.

1.1.7.2 Efectos de los bisfosfonatos sobre osteocitos y osteoblastos.

Concentraciones muy bajas de BP pueden inhibir la apoptosis en osteocitos y osteoblastos. Se ha demostrado que tanto los BP como un inhibidor de fosfatasa de tirosin-proteínas aumentaban la proliferación de osteoblastos [Lezcano, 2014]. La fosforilación de tirosin-proteínas juega un rol importante en el crecimiento celular, diferenciación y metabolismo. Los osteocitos pueden sufrir apoptosis por diversos estímulos, como los glucocorticoides, microdaño, carga mecánica, etc [Bonewald, 2007]. Se ha demostrado que los efectos anti-apoptóticos de los BP depende, al menos en parte, de la expresión del dominio citoplasmático C-terminal de Conexina 43, proteína de membrana que al interactuar con BP resulta en la apertura de un hemicanal, iniciando una vía de señalización intracelular de supervivencia. Esta conexina 43 interactúa con la quinasa Src,

activador aguas arriba de ERK. Esta vía parece ser indispensable para la unión de alendronato [Lezcano, 2012; Lezcano, 2014].

A pesar de estos avances, los efectos directos de los BPs *in vivo* no han sido dilucidados y han sido difíciles de determinar a concentraciones clínicamente relevantes. Rogers et al (2003) e Im et al (2004) han demostrado que muy bajas concentraciones de BP estimulan la proliferación y maduración de osteoblastos *in vitro*, mientras que los efectos clínicos observados en la actividad osteoblástica se atribuyen a un efecto indirecto sobre el ciclo de remodelación ósea, por disminución de la resorción.

Altas concentraciones de BP producen un efecto inhibitorio sobre osteoblastos, debido a su potencial tóxico [Gangoiti, 2008].

1.2 Diabetes

La Sociedad Americana de Diabetes define la Diabetes mellitus como un *grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, su acción, o en ambas*. La hiperglucemia crónica está asociada con el deterioro de varios órganos y daño a largo plazo, especialmente de ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos [Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus 2014].

Diversos procesos patológicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Estos abarcan desde la destrucción autoinmune de células β del páncreas (con la consecuente deficiencia en la secreción de insulina) hasta anormalidades en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, resultantes de la resistencia a la acción de la insulina en sus órganos blanco.

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

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

La gran mayoría de los casos de diabetes se pueden incluir en dos amplias categorías. Una, la diabetes de tipo 1, donde la causa es ausencia de secreción de insulina (en general por destrucción autoinmune de las células β pancreáticas); y la otra, mucho más prevalente, la diabetes de tipo 2 donde la causa es la combinación de resistencia a la acción de la insulina y una respuesta compensatoria inadecuada en la secreción de la misma. En esta última categoría, existe un grado de hiperglucemia suficiente para generar alteraciones patológicas y funcionales en varios tejidos, durante un tiempo prologado, sin síntomas clínicos. Esta etapa asintomática es posible detectarla por anomalías en el metabolismo de carbohidratos mediante la determinación de glucosa plasmática en ayuno y/o por el test de tolerancia oral a la glucosa o por determinación de hemoglobina glicosilada (A1c), aunque los métodos para esta última determinación no están estandarizados en nuestro país para utilizarla como método diagnóstico. Los criterios diagnósticos de la diabetes mellitus se discutirán más adelante.

1.2.1 Clasificación de Diabetes mellitus

1.2.1.A Diabetes mellitus tipo 1

Inmunomediada: Corresponde al 5-10% de los pacientes diabéticos, los cuales presentan destrucción autoinmune de las células β del páncreas. La diabetes autoinmune se presenta mayoritariamente en la niñez y adolescencia, pero puede ocurrir a cualquier edad, aún en la octava o novena década de vida. En el suero de estos pacientes se pueden encontrar marcadores de destrucción autoinmune como por ejemplo autoanticuerpos contra células del islote, insulina y descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), tirosina-fosfatasa IA-2 y IA-2 β . También esta enfermedad tiene una asociación alta con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) donde ciertos alelos pueden ser predisponentes o bien, protectores.

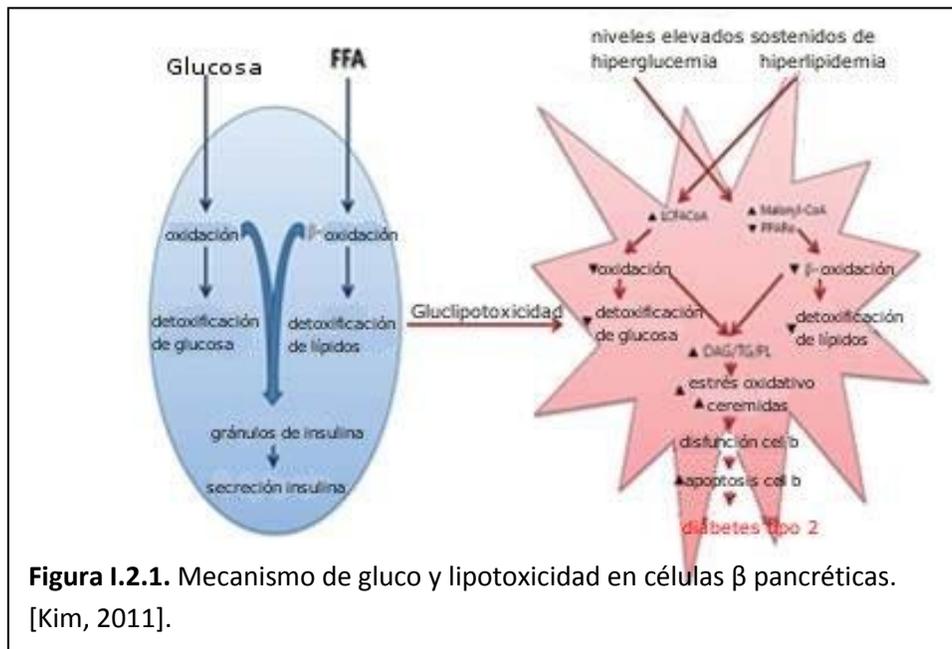
La tasa de destrucción de las células β es muy variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente en lactantes y niños) y lenta en otros (principalmente adultos). Algunos pacientes, particularmente niños y adolescentes, presentan como primera manifestación cetoacidosis; mientras que otros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

puede dar el caso de que mantengan una funcionalidad suficiente de las células β como para prevenir la cetoacidosis por varios años. Los pacientes con este tipo de diabetes raramente padecen obesidad, aunque no es incompatible con el diagnóstico.

Idiopática: Algunas formas de la diabetes mellitus tipo 1 tienen etiologías desconocidas. Los pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a sufrir cetoacidosis, pero no tienen evidencia de destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Solo una minoría de pacientes está dentro de esta categoría, y dentro de los que la padecen se encontró que son de ascendencia africana o asiática. Esta forma de diabetes es altamente hereditaria.

1.2.1.B Diabetes mellitus tipo 2

Este tipo de diabetes afecta al 90-95% de los pacientes diabéticos, previamente se la conocía como diabetes no dependiente de insulina o diabetes del adulto, abarca individuos que presentan resistencia a la insulina y por lo general tienen relativa (no absoluta) deficiencia de insulina. Existen muchas causas diferentes para este tipo de diabetes, aunque la etiología específica no se conoce, se sabe que en un principio no hay destrucción autoinmune de las células β del páncreas, aunque con la evolución de la enfermedad puede haber pérdida de la masa de células beta por glucotoxicidad o lipotoxicidad. Se ha descrito una pérdida progresiva de función y la masa de células β ; la hiperglucemia crónica produce alteraciones en varios genes específicos de estas células (Pdx-1, BETA2/NeuroD y MafA) como también sobre el gen que codifica para la Insulina. Se generan alteraciones del metabolismo energético intracelular y estrés oxidativo, con la consecuente disfunción mitocondrial. Altos niveles de ácidos grasos libres también contribuyen a la disfunción de las células β , tanto por una disminución en la transcripción génica de insulina como por alterar la secreción de insulina estimulada por glucosa, además de por promover la apoptosis de las células beta pancreáticas, por aumento en la síntesis de ceramidas, las cuales inhiben a proteínas anti-apoptóticas como Bcl-1 y disminuyen la señalización vía IRS1/2 [Kim, 2011].



La mayoría de estos pacientes presentan obesidad, y la obesidad por sí misma causa resistencia a la insulina, aunque no es común que sufran cetoacidosis y, en caso de padecerla, suele darse debido al estrés ocasionado por otra enfermedad como puede ser en el caso de una infección. Inicialmente, y a menudo a lo largo de toda la vida, no es necesario el tratamiento con insulina.

Este tipo de diabetes suele permanecer por años sin ser diagnosticada debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en los primeros estadios es leve, de modo que el paciente no nota los síntomas clásicos de la enfermedad. De todos modos, estos pacientes tienen un alto riesgo de padecer complicaciones macro y micro-vasculares. Dependiendo del estadio de la enfermedad, los pacientes con este tipo de diabetes pueden tener niveles de insulina bajos, normales o elevados (aunque siempre menores a los que se esperarían por los altos niveles de glucemia que presentan). De este modo, la secreción de insulina es deficiente en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina, la cual puede mejorar con la reducción del peso corporal y/o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia.

El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, obesidad y falta de actividad física. La enfermedad se da con más frecuencia en mujeres que previamente hayan padecido diabetes mellitus gestacional y en individuos con hipertensión o dislipemia. La frecuencia de la

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

I.2.2 Complicaciones de la diabetes

I.2.2.A Complicaciones agudas

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 son vulnerables a sufrir tanto descompensaciones metabólicas hiperglucémicas graves (cetoacidosis) como episodios hipoglucémicos (debidos al tratamiento con insulina). La cetoacidosis se encuentra favorecida por la deficiencia de insulina acoplada con incrementos de glucagón (dado que no se encuentra contrabalanceado) lo que provoca en primer lugar hiperglucemia, como así también aumento de la lipólisis con la consecuente oferta de ácidos grasos libres al hígado para su oxidación a cuerpos cetónicos (ácido acetoacético, β -hidroxibutírico y acetona) que pueden ser utilizados por las células como fuente de energía supliendo la imposibilidad del consumo de glucosa. La cantidad de cuerpos cetónicos producidos supera la capacidad de su oxidación celular y su acumulación en la sangre desencadena acidosis y agravamiento del cuadro clínico, pudiendo llegar a un coma.

En el caso de diabetes mellitus tipo 2, los pacientes descompensados pueden desarrollar un coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico, debido a una deshidratación severa a causa de la diuresis hiperglucémica. Este cuadro en general es desencadenado por una patología intercurrente como una infección en pacientes en estado de abandono, y es de muy alta mortalidad.

I.2.2.B Complicaciones crónicas

Las complicaciones a largo plazo son las mismas para diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, y son las que causan mayor morbilidad y mortalidad en estos pacientes. Como se comentó anteriormente, la hiperglucemia crónica produce alteraciones en varios tejidos y clínicamente se desarrollan macro- y microangiopatías y también alteraciones óseas.

Macroangiopatía. Se denomina así, al daño que la diabetes va produciendo en los vasos de mediano y grueso calibre. En ambos tipos de diabetes se producen una serie de trastornos que, de diferentes maneras, van dañando el endotelio vascular y llegan a producir una placa de ateroma (depósito en la túnica íntima de colesterol, tejido fibroso, miocitos y células inflamatorias) que puede llegar a obstruir la luz del vaso haciendo que el flujo sanguíneo se reduzca, comprometiendo la circulación de los órganos irrigados. Además, estas placas de ateroma pueden ulcerarse formándose rápidamente un trombo sobre ellas, pudiendo obstruir el vaso (o una de sus ramificaciones) completamente y de forma repentina, dando lugar a un infarto agudo de miocardio si afecta a las arterias coronarias, a un accidente cerebro-vascular si afecta a alguna de las arterias que irrigan el encéfalo, o a un accidente vascular periférico si queda comprometida la irrigación de miembros superiores o (más frecuentemente) inferiores. Las complicaciones macrovasculares son las que causan mayor mortalidad en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2.

Microangiopatía. En ambos tipos de diabetes se produce un engrosamiento de la membrana basal de los capilares, con o sin alteraciones del endotelio y/o pérdida de pericitos. También se sabe que los capilares diabéticos son más permeables a las proteínas plasmáticas. La microangiopatía diabética genera alteraciones en la microcirculación de diferentes órganos, induciendo retinopatía (pérdida de visión, puede progresar a ceguera); neuropatía (se afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico, con alteraciones principalmente autónomas y/o motoras); y nefropatía (puede progresar a insuficiencia renal, constituye la principal causa de muerte en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1).

Alteraciones óseas. Este tipo de complicación, junto con las alteraciones articulares y el pie diabético entran dentro de la clasificación de complicaciones mixtas, en las cuales se interrelacionan disfunciones micro- y macrovasculares. Se ampliará con mayor profundidad en la sección Diabetes y hueso.

I.2.3 Fisiopatogénesis de la diabetes

El principal factor de riesgo de la diabetes es la hiperglucemia, ya que sostenida en el tiempo es la principal responsable de las complicaciones microvasculares que se describieron previamente. Esto se concluyó a partir de estudios clínicos prospectivos como el DCCT (Diabetes Control and

Complications Trial) y UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) [DCCT, 1993; UKPDS, 1998] donde se observó que la hiperglucemia es el factor mayoritariamente involucrado en las complicaciones microvasculares de la Diabetes, mientras que las complicaciones macrovasculares son principalmente una consecuencia de la hipertensión asociada frecuentemente con Diabetes. Se han formulado varias hipótesis para explicar la asociación de la hiperglucemia con dichas complicaciones, como ser:

- hipótesis de los productos de glicación avanzada (AGEs, advanced glycation – end products) [Vlassara, 1996];
- vía de los polioles [Hotta, 1995];
- estrés oxidativo [Baynes, 1991];
- estrés reductor o pseudohipoxia [Williamson, 1993];
- hipoxia verdadera [Cameron, 1997];
- estrés carbonílico [Lyons, 1997],
- alteraciones en el metabolismo de las proteínas [Witztum, 1997];
- aumento de la actividad de la proteína-quinasa C (PKC) [Ishii, 1998]
- modificaciones en la actividad de factores de crecimiento [Pfeiffer, 1995] o citoquinas [Sharma, 1997];
- vía de las hexosaminas [Kolm-Litty, 1998].

Estas hipótesis se superponen unas con otras; así la formación de AGEs y la acumulación de polioles pueden provocar estrés oxidativo, el cual a su vez puede acelerar la formación de AGEs. Por otro lado, el estrés reductor puede activar la PKC; los AGEs pueden inducir la expresión de citoquinas y factores de crecimiento. En esta tesis se va a profundizar la hipótesis del aumento de AGEs y cómo éstos contribuyen con la patología diabética.

I.2.3.1 Productos de glicación avanzada (AGEs)

Los productos de glicación avanzada son un grupo heterogéneo de moléculas que se forman principalmente sobre proteínas de vida media larga. Clásicamente se describe su origen por reacción entre un grupo amino de las proteínas con el grupo carboxilo de hidratos de carbono reductores, de manera no enzimática. Los AGEs se acumulan en el cuerpo debido a la glicación *in*

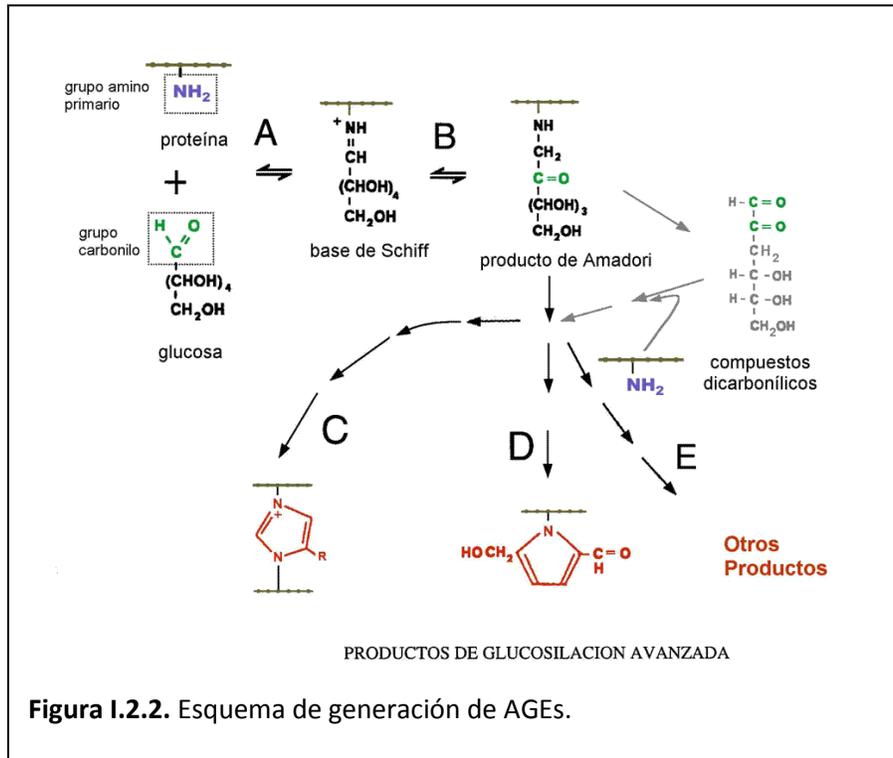
vivo, así como a través de la ingesta de AGEs exógenos, que están formadas principalmente debido a un sobrecalentamiento de los alimentos y bebidas. Se postula que una ingestión crónica de los AGEs exógenos predispone a la resistencia a la insulina y a la diabetes por regulación negativa del receptor anti-AGE-1 (AGER1) y de la sirtuina-1, así como por regulación positiva de los receptores de AGE (RAGE) [Cai, 2012]. En un paciente con hiperglucemia y/o estrés oxidativo, la formación de AGEs aumenta considerablemente [Jay, 2006], y se ha descrito previamente que las personas diabéticas tienen concentraciones séricas de AGEs más altas que los individuos no diabéticos [Sharp, 2003]. Estos productos se consideran importantes mediadores de las complicaciones diabéticas ya que son capaces de producir modificaciones irreversibles en una gran variedad de estructuras biológicas. Mediante la generación de radicales libres, se producen entrecruzamientos con las proteínas o a través de interacción con receptores de membrana, los AGEs provocan un aumento del estrés oxidativo, alteraciones funcionales de las células y aumento de los mediadores inflamatorios.

1.2.3.2 Generación de AGEs

Los AGEs se generan por reacción amino-carbonilo, entre azúcares reductores o dicarbonilos libres, y el grupo amino de proteínas, ácidos nucleicos o aminofosfolípidos [Barbosa, 2008]. Este proceso se conoce como reacción de Maillard y si bien los mecanismos exactos por los que ocurren estas reacciones son desconocidos, sí se ha descrito que se inicia con la formación reversible de una base de Schiff inestable entre el carbonilo y el grupo amino. Sufre una serie de rearrreglos intramoleculares para dar productos de Amadori (hasta este punto el proceso es reversible), los cuales también sufren reordenamientos intramoleculares, deshidratación y condensaciones para dar un producto final, irreversible, la gran familia de AGEs. Son compuestos heterogéneos, algunos pueden ser fluorescentes y de color marrón-amarillento y otros pueden formar entrecruzamientos estables (Figura 1.2.2) [Ulrich y Cerami, 2001]. La formación de AGEs afecta principalmente a proteínas de larga vida media, como el colágeno [Forbes, 2005], al cual se le agregan entrecruzamientos intramoleculares e intermoleculares como resultado del proceso de glicación, lo que conduce a alteraciones irreversibles en su estructura y bioactividad. Otras

proteínas de vida media larga que sufren glicación son la mielina, tubulina, activador del plasminógeno 1 y el fibrinógeno [Vlaasara, 1996].

Hay vías alternativas de formación de AGEs, una es la vía del estrés carbonílico en la cual la oxidación de lípidos o azúcares producen compuestos dicarbonílicos muy reactivos. Existen procesos como la glucólisis o la autooxidación de la glucosa en donde se generan metilglioxal y glioxal que interactúan rápidamente con aminoácidos y se forman AGEs. Esos compuestos dicarbonílicos son extremadamente reactivos por lo que se los considera los principales intermediarios de formación de AGEs. Por esta vía las reacciones que pueden ocurrir son más complejas y heterogéneas, lo que dificulta la identificación de compuestos. Entre ellos se encuentran la carboximetilisina (CML), pirralina y pentosidina [Barbosa, 2008; Ottum, 2015].



Clase	Fuente o vía	Intermediario importante
AGEs 1	Glucosa, reacción de Maillard	Glucosa
AGEs 2	Glucólisis, metabolismo de fructosa y vías de los polioles.	Gliceraldehído (α -hidroxialdehído)
AGEs 3	Reacción de Maillard, bases de Schiff	Glicolaldehído
AGEs 4	Glicerladehído (triosa intermediaria en glucólisis)	Metilglioxal (dicarbonilo)
AGEs 5	Glucosa y glicolaldehído	Glioxal (dicarbonilo)
AGEs 6	Fructosa (vía de los polioles, dieta)	3-DG (dicarbonilo)

1.2.3.3 Metabolismo de los AGEs

La formación de AGEs se produce lentamente en condiciones fisiológicas, afectando a proteínas de vida media larga como el colágeno, y tienen una función importante en el envejecimiento (Forbes 2005). Se afectan todas las proteínas pero los efectos se evidencian sobre este tipo de proteínas, entre las que se encuentran, además del colágeno, la mielina, las cristalinas, la tubulina, el activador de plasminógeno I y el fibrinógeno [Vlassara, 1996]. En personas diabéticas se ve exacerbada la producción de AGEs, siendo la concentración sérica de estos productos, mucho más elevada que en individuos no diabéticos. La hemoglobina glicosilada (Hb A1c) es una variante de hemoglobina en la que transporta un producto de Amadori en su cadena beta reflejando la hiperglucemia en los últimos 2-3 meses y por tanto, la primera etapa reversible de la glicación [Forbes, 2005; Rahbar, 2005].

La producción de AGEs es principalmente endógena pero también son incorporados exógenamente, a través del tabaquismo y la dieta. Esta última vía es la fuente exógena principal, y puede ser importante en el desarrollo de patologías como la diabetes. Se ha establecido que el 10

% de los AGEs ingeridos se absorben aunque no se conocen los mecanismos, de ese 10% un tercio se excreta en orina dentro de las 48 horas, en individuos con función renal normal [Koschinsky, 1997].

La formación de AGEs en los alimentos está influenciada por los métodos de elaboración, como cocción a alta temperatura y baja humedad o alimentos ricos en grasa [Goldberg, 2004].

El humo también es una fuente de AGEs, en la combustión del tabaco, las especies reactivas de AGEs se volatilizan, ingresan a los pulmones donde se absorben y entran en contacto con proteínas plasmáticas. Ese es el motivo por el cual se encuentran concentraciones de AGEs y apoB-AGE en suero más elevadas en fumadores que en personas no fumadoras [Cerami, 1997; Vlassara y Palace, 2002].

Nuestro organismo cuenta con sistemas enzimáticos para reducir la formación de AGEs. Las enzimas oxalaldehído reductasa y aldosa reductasa desintoxican el organismo de intermediarios dicarbonílicos reactivos, pudiendo así controlar el pool endógeno de AGEs. Los sistemas enzimáticos glioxalasa I y II, fructosamina-3-quinasa y fructosamina oxidasa (amadorasa) son capaces de intervenir en diferentes etapas de las reacciones de glicación, impidiendo que se propaguen. Sin embargo, en casos donde hay una producción exacerbada de AGEs estos sistemas no son suficientes [Barbosa, 2008].

Los AGEs presentes en distintos tejidos también pueden ser eliminados, mediante proteólisis extracelular o por scavengers como los macrófagos que endocitan AGEs mediante receptores y llevan a cabo proteólisis intracelular. Esto genera péptidos-AGEs y aductos de AGEs libres (AGEs unidos a un aminoácido) que al ser liberados al plasma se pueden eliminar por la orina [Gugliucci, 2007]. Cuando los AGEs se forman sobre proteínas de la matriz extracelular, que son más resistentes a la degradación, este proceso puede ser menos eficiente. Los aductos libres se pueden excretar directamente en la orina pero los AGE-péptidos pueden ser endocitados por las células del túbulo proximal y ser degradados a AGE-aminoácidos. La principal forma de excreción de AGEs es mediante aductos libres, y en menor medida como AGE-aminoácidos.

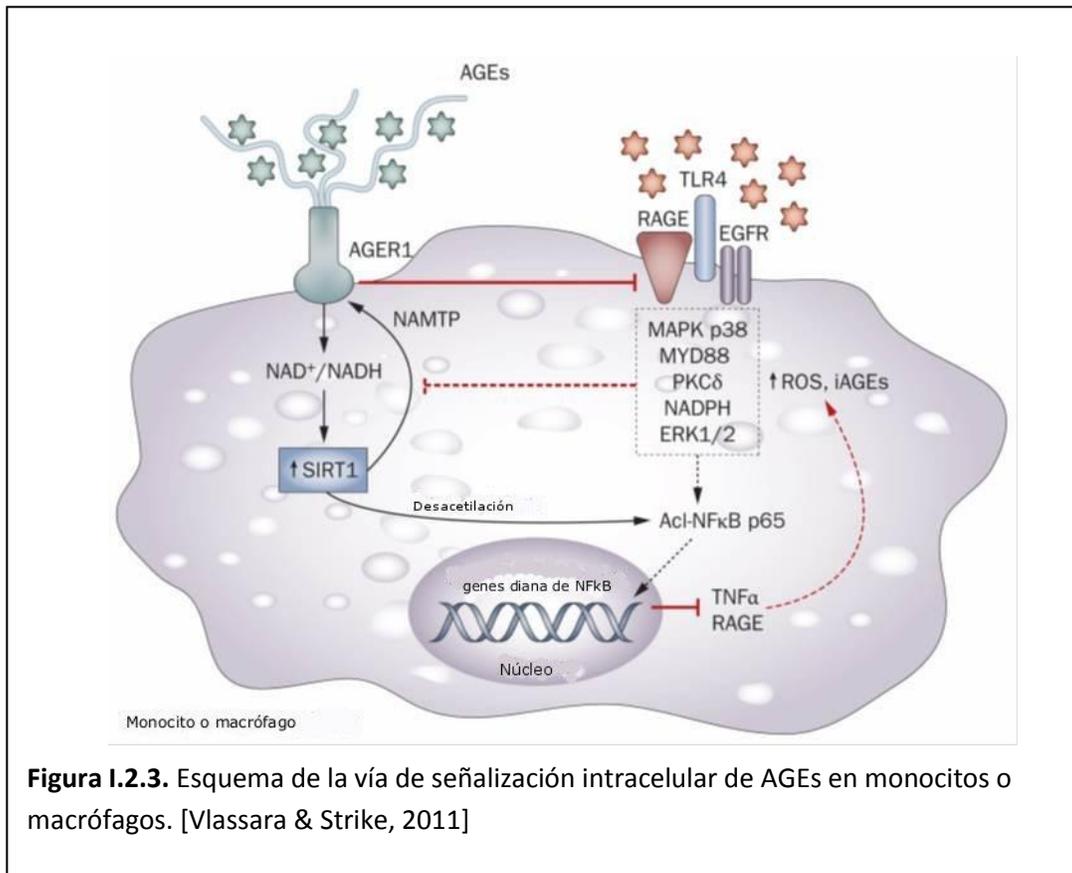
1.2.3.4 Mecanismo de acción de los AGEs

Los AGEs actúan de varias maneras en las células causando alteraciones. Producen modificaciones de estructuras intracelulares, modificación de la señalización de moléculas de matriz extracelular (por glicación) y de la célula, que lleva a disfunción y produce la modificación de proteínas y lípidos circulantes. Estas estructuras circulantes modificadas por AGEs pueden interactuar con receptores específicos, induciendo la generación de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento, que contribuyen al desarrollo de las complicaciones de la diabetes [Brownlee, 2005].

Hay una gran variedad de receptores para AGEs pero el mejor caracterizado es el RAGE [Lin, 2006]. Este receptor pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas de superficie celular y su gen está en el cromosoma 6, en el complejo mayor de histocompatibilidad, entre los genes de clase II y III. En el promotor del gen de RAGE existen secuencias de consenso para el factor nuclear κB (NF- κB) e interleuquina 6, por lo que en respuestas inflamatorias se regula la expresión de este receptor.

En condiciones fisiológicas el RAGE se expresa mínimamente en los tejidos pero en condiciones de exceso de AGEs, el receptor aumenta su expresión, especialmente en monocito, macrófagos, células musculares lisas, astrocitos, células endoteliales y osteoblastos [Lin, 2006; Cortizo, 2003; Mercer, 2007].

Se ha demostrado que la interacción AGE-RAGE induce el aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la activación de NAD(P)H oxidasa. El aumento de ROS induce el aumento de p21^{ras} unido a GTP activando las ERK 1 y 2 y así, las ERK producen la activación del NF- κB [Schmidt, 1999]. Así, la unión AGEs-RAGE induce NF- κB , lo cual puede regular positivamente su propia expresión (Figura 1.2.3) [Vlassara & Strike, 2011].



En células endoteliales, la interacción AGE-RAGE activa la transcripción del factor NF-κB, activando la transcripción de distintos genes diana como la endotelina-1, molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), selectina-E, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y citoquinas proinflamatorias como IL-1α, IL-6, TNF-α además de regular positivamente la expresión del propio RAGE [Yonekura, 2005; Goldin, 2006].

Otros ligandos de RAGE incluyen HMGB1 (high mobility group box-1, anfoterina), proteínas S100, β-amiloide, que también contribuirían a la lesión vascular progresiva.

Se han descrito otros receptores que reconocen AGEs como AGE-R1, AGE-R2 y AGE-R3/galectina-3 y los receptores ERM (Ezrin, radixin y moesina) [McRobert, 2003], como también los receptores scavenger de macrófagos [Goldin, 2006].

El AGE-R3/galectina-3 pertenece a la familia de las lectinas, proteínas que unen hidratos de carbono. En nuestro grupo se ha descrito que este receptor es expresado por osteoblastos, y que

en dichas células se regula positivamente en la hiperglucemia y ante la exposición a AGEs [Mercer, 2004]. Este receptor también está involucrado en la regulación de apoptosis en varios sistemas [Mercer, 2007].

Los receptores ECM unen AGEs con una afinidad similar a RAGE y se los encontró en órganos donde se dan complicaciones de la diabetes. La unión de AGEs a estos receptores inhibirían su actividad, entre las que se incluyen enlaces cruzados entre proteínas de membrana y el citoesqueleto de actina, por lo que los AGEs alteran las interacciones célula-célula, adhesión célula-matriz extracelular y llevaría a alteraciones en la forma celular [McRobert, 2003].

Otra vía de reconocimiento de AGEs es a través del receptor *scavenger* clase 3, lecitin like de LDL oxidada-1 (LOX-1) y se ha visto que los AGEs aumentan la expresión de este receptor en animales diabéticos [Goldin, 2006].

1.3 Diabetes mellitus y hueso

La diabetes mellitus y la osteoporosis son dos patologías muy frecuentes, cuyo riesgo de padecerlas aumenta con la edad. La osteoporosis está caracterizada por una disminución en la fortaleza ósea y un incremento de fracturas causadas por traumas mínimos asociada a una mayor morbilidad, mortalidad y reducción de la calidad de vida [van Staa, 2001; Manolagas, 2000]. En un principio, estas patologías eran estudiadas como enfermedades aisladas, pero numerosas investigaciones han demostrado que hay una asociación entre la diabetes y el incremento en el riesgo de fracturas no traumáticas concluyendo que la primera es un factor de riesgo de la segunda [Janghorbani, 2007; Montagnani y Gonnelli, 2013]. A partir de estos estudios se definió a las alteraciones óseas asociadas a la diabetes como *osteopatía diabética*.

En ambos tipos de diabetes el hueso presenta frecuentemente alteraciones en su microarquitectura y en su capacidad de formación, lo cual se suele traducir en una menor calidad ósea. La diabetes mellitus puede afectar el hueso de múltiples maneras, y entre estos factores se incluyen: obesidad, cambios en los niveles de insulina, concentraciones altas de AGEs sobre proteínas de matriz extracelular y proteínas intracelulares, alta excreción urinaria de calcio junto con mala absorción intestinal, respuesta inapropiada a la secreción de hormona paratiroidea

(PTH), alteraciones en la regulación de la vitamina D, función renal disminuida, bajos niveles del factor de crecimiento similar a la insulina, microangiopatías e inflamación [Isidro, 2010]. Así, el esqueleto diabético presenta ciertas características, como ser disminución del crecimiento óseo lineal durante el crecimiento puberal de adolescentes diabéticos, disminución de la DMO y riesgo aumentado de osteopenia y osteoporosis, aumento del riesgo de fracturas y alteración en la cicatrización ósea como en la regeneración ósea [Salerno, 1997; Janghorbani, 2007; Vestergaard, 2007; Cozen, 1972].

La osteopenia y la osteoporosis son complicaciones frecuentes en pacientes con DM tipo 1, tanto en niños como en adultos. La DMO parece estar disminuida tanto a nivel de la columna vertebral como en la cadera. Utilizando DEXA se ha encontrado que un 50-60% de pacientes con DM tipo 1 presentan osteopenia, mientras que alrededor de un 14-20% de dichos pacientes tienen osteoporosis [Kayath, 2000; Kemink, 2000]. Se esperaría que una disminución en los niveles de DMO debería aproximadamente duplicar el riesgo de fracturas por fragilidad en pacientes con DM tipo 1 [Hofbauer, 2007], sin embargo la incidencia de fracturas osteoporóticas está incrementada 7-12% respecto de controles no diabéticos apareados [Forsen, 1999]. Algunos autores sugieren que la disminución en la DMO (es decir, la osteopenia u osteoporosis) podría deberse al hecho de que no se alcance el pico de masa ósea en la pubertad. Sin embargo, se han encontrado niveles disminuidos de DMO aún en pacientes que han desarrollado DM luego de alcanzar el pico de masa ósea [Tuominen, 1999].

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

En cambio, la DMO en pacientes con DM tipo 2 se encuentra aumentada (o sin modificaciones) respecto a la de individuos no diabéticos, aun luego de la corrección por índice de masa corporal [Strotmeyer, 2004; De Liefde, 2005]. Aunque se esperaría que un mayor índice de masa corporal protegiera al paciente con Diabetes mellitus tipo 2 de fracturas osteoporóticas, en realidad se observa en los mismos una duplicación en el riesgo de fracturas por fragilidad [Melton, 2008]. La mayoría de los estudios reportaron una disminución en el recambio óseo en pacientes con DM tipo 2, debido a una reducción tanto en la formación como en la resorción ósea. Esto

resulta en un incremento en el contenido de mineral, pero a la vez, en una mayor acumulación de imperfecciones que generan un hueso más propenso a fracturarse. Si bien la determinación de la DMO es la forma habitual de evaluar el riesgo de fracturas en mujeres con osteoporosis postmenopáusicas, no resulta útil para la predicción del riesgo de fracturas en pacientes diabéticos. Se han propuesto otros marcadores de diagnóstico, como la pentosidina, pues varios estudios revelaron que la cantidad de pentosidina presente en hueso cortical o trabecular proveniente de pacientes diabéticos con fractura de cuello femoral aumenta respecto a individuos controles de la misma edad [Saito, 2006]. La desventaja de este marcador radica en que su determinación requiere de procedimientos invasivos, aunque la pentosidina en plasma se puede correlacionar linealmente con el contenido de este marcador en el hueso cortical [Odetti, 2005].

Una explicación de la osteopatía diabética es la acumulación de AGEs en la matriz extracelular ósea, en las moléculas de colágeno que la componen. Se producen entrecruzamientos de las proteínas y los AGEs, que conducen a una mayor resistencia del tejido a la degradación proteolítica que alteran las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del tejido, con el consecuente aumento de rigidez del colágeno [Hein, 2006]. Estas alteraciones en el colágeno también afectan las interacciones celulares con la matriz, a través de su interacción con integrinas [McCarthy, 2004]. Además, nuestro grupo demostró que el colágeno modificado por AGEs altera el metabolismo de células óseas. Se han descrito alteraciones en la proliferación y diferenciación de líneas celulares osteoblásticas, donde se observó inhibición de la actividad de fosfatasa alcalina y los depósitos de nódulos de mineral. Estos efectos dependen del estadio celular y puede estar mediado por la producción de ROS y NO [McCarthy, 2001]. También se ha demostrado que las células osteoblásticas expresan RAGE y AGE-R3/galectina-3 y que la presencia de AGE modula la expresión de estos receptores, con la consecuente alteración del metabolismo de dichas células, afectando el recambio óseo [Mercer, 2004; Cortizo, 2003]. Además de la modulación osteoblástica, los AGEs pueden modular la osteoclastogénesis mediante la interacción con receptores de membrana. Valcourt et al postulo que puede producirse una disminución del remodelado óseo y recambio del colágeno con la consecuente acumulación de mayores cantidades de AGEs [Valcourt, 2007].

Se cree que la osteopenia/osteoporosis mayormente asociada a Diabetes tipo 1 podría tratarse con las terapias actuales para la osteoporosis, dado que muestran una disminución en el riesgo de

fracturas en poblaciones de edad avanzada y con baja DMO. Sin embargo, no se sabe exactamente si serían igualmente eficaces para prevenir la osteopatía diabética en pacientes con diabetes de tipo 2 con DMO normal o aumentada. Varios estudios poblacionales han coincidido en que la evaluación del riesgo de fracturas en estos pacientes puede hacer de manera similar a los pacientes con osteoporosis, considerando los mismos factores de riesgo [Melton, 2008]. Actualmente, se analiza cada caso y se trata de la manera más conveniente, con el objetivo principal de estabilizar la patología diabética.

1.4 Modelos animales utilizados en el estudio de Diabetes mellitus tipo 2

Existen multitud de modelos experimentales potencialmente útiles para el estudio de los diversos aspectos de la Diabetes de tipo 2 y la decisión acerca del modelo a utilizar en un experimento es multifactorial. De todas maneras, hay que tener en claro que ningún modelo representa exactamente la complejidad de la patología humana. No obstante, existen ventajas inherentes a la experimentación animal que han permitido el avance en el conocimiento de la enfermedad, su progresión, sus mecanismos, inclusive la evaluación de posibles tratamientos.

Estos modelos se pueden clasificar según el mecanismo de generación de Diabetes en: *modelos espontáneos*, donde se seleccionan los animales que espontáneamente desarrollan diabetes; o *modelos inducidos*, a los cuales se promueve el desarrollo de la enfermedad mediante el uso de fármacos, o cambios en la dieta, etc. A su vez, dentro de los modelos espontáneos existen los modelos análogos, que son útiles como sustitutos de la enfermedad humana pues tratan de simular la enfermedad; y los modelos intrínsecos, que sirven para contestar alguna pregunta concreta de aspectos específicos de la enfermedad, pero no tratan de imitarla [Arias-Díaz, 2007].

1.4.1 Modelos espontáneos

Se mantienen por cruces endogámicos y se obtuvieron de animales que desarrollaron diabetes mellitus tipo 2 espontáneamente o que se generaron por cruces selectivos para favorecer determinado rasgo de la patología.

A veces no son totalmente "espontáneos" en el sentido que se requieren modificaciones dietéticas adicionales para generar la diabetes tipo 2 en el seno de una predisposición genética. Dentro de estos modelos encontramos:

Modelos análogos: como es muy amplio el abanico de estos modelos para el estudio de la DM tipo 2, a continuación solo se presentan algunos de ellos:

- *Rata Goto Kakizak (GK)*: este modelo reproduce bien las principales características de la diabetes mellitus tipo 2 humana: hiperglucemia, reducción de la tolerancia a la glucosa, deterioro en la secreción de insulina, aumento de la resistencia periférica a la insulina, alteración en el metabolismo lipídico. Sugiere la participación de 6 regiones cromosómicas en la etiología de la enfermedad y así como también la existencia de factores epigenéticos.
- *Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)*: se trata de una cepa endogámica seleccionada por obesidad poligénica. Hay un defecto en el transporte de leptina a través de la barrera hemato-encefálica. [Michael Igel, 1997]. El desarrollo de DM en este modelo está íntimamente relacionado con la de adiposidad precoz, con establecimiento de un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina. [Arias-Díaz, 2007].
- *Ratón KK (Kuo Kondo)*: es uno de los modelos poligénicos más adecuados como análogo de la DM tipo 2. Es producido por endocría selectiva de animales de mayor peso que lo normal. [Wakasugi, 1967].
- *Rata OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat)*: ratas con diabetes espontánea, poliuria, polidipsia y discreta obesidad. Estos animales son portadores de un alelo nulo para el gen de la colecistoquinina A, lo que conlleva a una capacidad reducida para procesar las señales gastrointestinales de saciedad tras la ingesta de nutrientes. [Arias-Díaz, 2007; Kawano, 1992].

Modelos intrínsecos: estos modelos son valiosos sobre todo para el estudio de la fisiología y de los mecanismos patogénicos que intervienen en la DM tipo 2 y sus complicaciones tardías.

- *Ratón db/db*: existe una mutación en el gen que codifica para el receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocítica [Arias-Díaz, 2007].
- *Ratón ob/ob*: son animales portadores de una mutación en el gen de la leptina, y es un buen modelo para el estudio de la obesidad, siendo la incidencia de DM relativamente baja [Chua, 1996].

- *Rata Zucker Obesa ZUC- Lepr^{fa/fa}*: presentan resistencia a la leptina (mutación en el receptor largo de leptina), y constituye un excelente modelo para el estudio de síndrome metabólico [Zucker LM and Zucker TF, 1961].
- *Rata Zucker Diabética ZDF-Lepr^{fa}/Crl*: derivan de ratas Zucker en las que se presentó espontáneamente diabetes tipo 2 [Clark, 1983].

1.4.2 Modelos inducidos

Son aquellos en los que se pueden reproducir una o más de las manifestaciones clínicas de la DM tipo 2 humana en animales de laboratorio a través de diferentes estrategias, como por ejemplo mediante manipulación genética, o a través de dietas específicas, o por la administración de fármacos. A este último modelo le prestaremos particular atención debido a que es de interés en el presente trabajo.

-Manipulación genética: se modifican genes específicos para sobre-expresar, eliminar o reemplazar algún gen de interés.

-Inducidos por la dieta:

Dieta rica en grasas: los animales desarrollan diabetes mellitus tipo 2 asociada a la obesidad como resultado de dietas ricas en grasas, presentando hiperglucemia post-prandial e intolerancia a la glucosa, hipertrofia de células beta, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, resistencia a la leptina e hipertensión.

Rata de la arena (*Psammomys obesus*): son animales que desarrollan obesidad y diabetes en cautiverio al modificarse su dieta vegetariana natural [Schmidt-Nielsen et al., 1964].

-Administración de fármacos: en estos modelos hay pérdida selectiva de las células *beta* del páncreas, dejando a las células *alfa* y las células *delta* intactas. Comparativamente, son modelos fáciles de desarrollar y mantener.

- *Ratones diabéticos y obesos por tioglucosa aurica (GTG):* la GTG es un compuesto derivado de la glucosa que produce daño en la región ventromedial del hipotálamo causando lesiones necróticas que llevan al desarrollo de hiperfagia y obesidad. Además, se ha

demostrado que la GTG interfiere en la vía de señalización de la insulina. Una gran desventaja es que los animales tardan mucho tiempo en desarrollar la enfermedad y la tasa de mortalidad luego de la inyección de GTG es muy alta [Pace, 1989].

- *Diabetes inducida por aloxano (ALX) y estreptozotocina (STZ)*: el ALX y la STZ actúan de forma selectiva destruyendo los islotes pancreáticos y llevando a una deficiencia de insulina, hiperglucemia y cetosis. Esta cetosis provoca alta mortalidad [Srinivasan, 2005]. Este tipo de modelo se utiliza mayormente para diabetes de tipo 1.
- *Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA)*. En el presente trabajo de tesis se eligió este modelo de diabetes inducida, por lo que se desarrolla a continuación.

1.4.2.1 Modelo de diabetes inducida por STZ-NA

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

La estreptozotocina ejerce su citotoxicidad en células β pancreáticas, mientras que la nicotinamida posee acción protectora parcial frente a la STZ [Szkudelski, 2012]. Debe ser enfatizado el hecho de que la inducción de diabetes con STZ-NA varía según las concentraciones de las dos drogas, la edad del animal, el tiempo de administración de NA en relación con la administración de STZ, la vía de administración de la STZ y el estado nutricional de la rata. Cuando la dosis de NA es relativamente baja, la función protectora es despreciable. A su vez, las células β pancreáticas de animales jóvenes son menos sensibles a la acción de la STZ, y son mejor protegidas por la NA. Se sabe que el efecto protector de la NA disminuye con el tiempo transcurrido después de la administración de STZ, es por esto que en la mayoría de los experimentos la NA se administra 15 minutos antes que la STZ.

Fundamento del modelo de Diabetes insulino-deficiente

La STZ [2-deoxi-2(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa, (Figura II. 2. 1) es una nitrosourea ampliamente usada para inducir diabetes experimental en animales. La potente acción diabetogénica de la STZ se debe a la lesión en las células β pancreáticas, las cuales son la única fuente de insulina. La STZ es relativamente selectiva para estas células e ingresa a través del transportador de glucosa GLUT2, sin embargo la fracción metil nitrosourea es la responsable de la toxicidad. Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que la STZ produce alquilación del ADN produciendo la fragmentación de ADN en las células β pancreáticas. Como resultado del daño en el ADN, se activan mecanismos intracelulares de reparación del ADN, como por ejemplo la activación de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Esta enzima nuclear cataliza la síntesis de poli ADP-ribosa a partir de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+). Cuando el daño en el ADN es escaso, la activación de PARP-1 es beneficiosa. Sin embargo, el daño excesivo en el ADN producido por la STZ conduce a la hiperactividad de PARP-1 con la consiguiente disminución sustancial de su sustrato, NAD^+ .

El NAD^+ es una importante molécula implicada en el metabolismo energético celular. Una reducción severa de NAD^+ trae aparejada una disminución de ATP, ya que la biosíntesis del NAD^+ es ATP dependiente, lo cual lleva a la muerte celular por apoptosis y reducción de la síntesis de insulina. Sin embargo, la disminución del ATP no resulta solo del incremento en la actividad de la PARP-1, sino que también se debe a que la STZ produce disfunción mitocondrial, reduciendo el consumo de oxígeno, y el potencial de membrana de la mitocondria.

La nicotinamida (NA) (piridina-3-carboxamida, (Figura I.4.1) es una amida proveniente de la vitamina B3 (niacina). La citotoxicidad producida por la estreptozotocina es atenuada por la nicotinamida, uno de los componentes del NAD^+ , el cual inhibe a la enzima poli ADP-ribosa sintetasa y en consecuencia previene la depleción del NAD^+ en las células pancreáticas, así como también cumple la función de proveer NAD^+ . En mamíferos el NAD^+ es sintetizado a partir de NA y su formación está catalizada por dos enzimas: nicotinamida fosforil transferasa (Nampt) y nicotinamida/ ácido nicotínico mononucleótido adeniltransferasa (Nmnat) (Figura I.4.2) [Szkudelski, 2012].

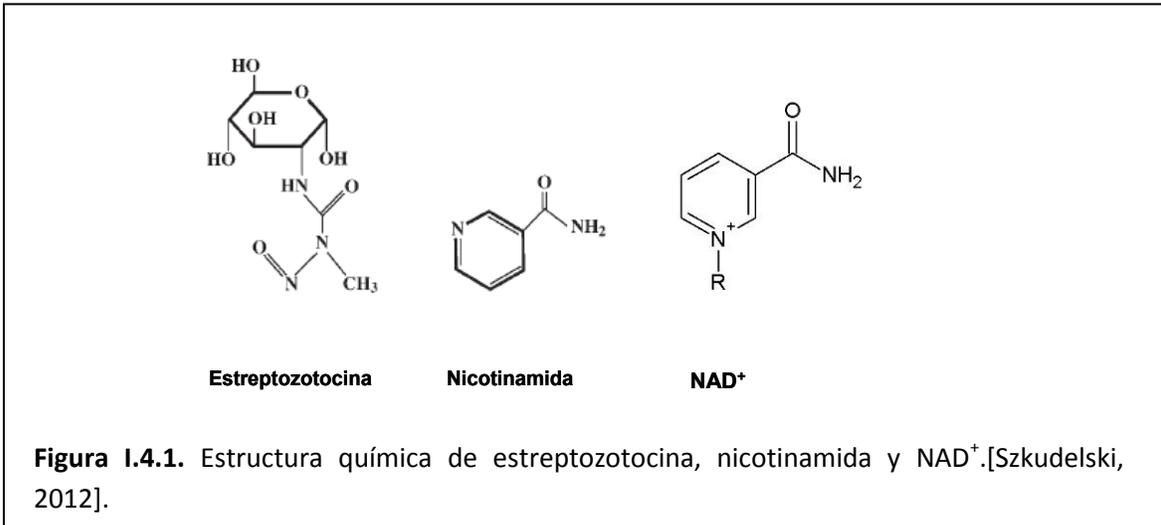


Figura I.4.1. Estructura química de estreptozotocina, nicotinamida y NAD⁺. [Szkudelski, 2012].

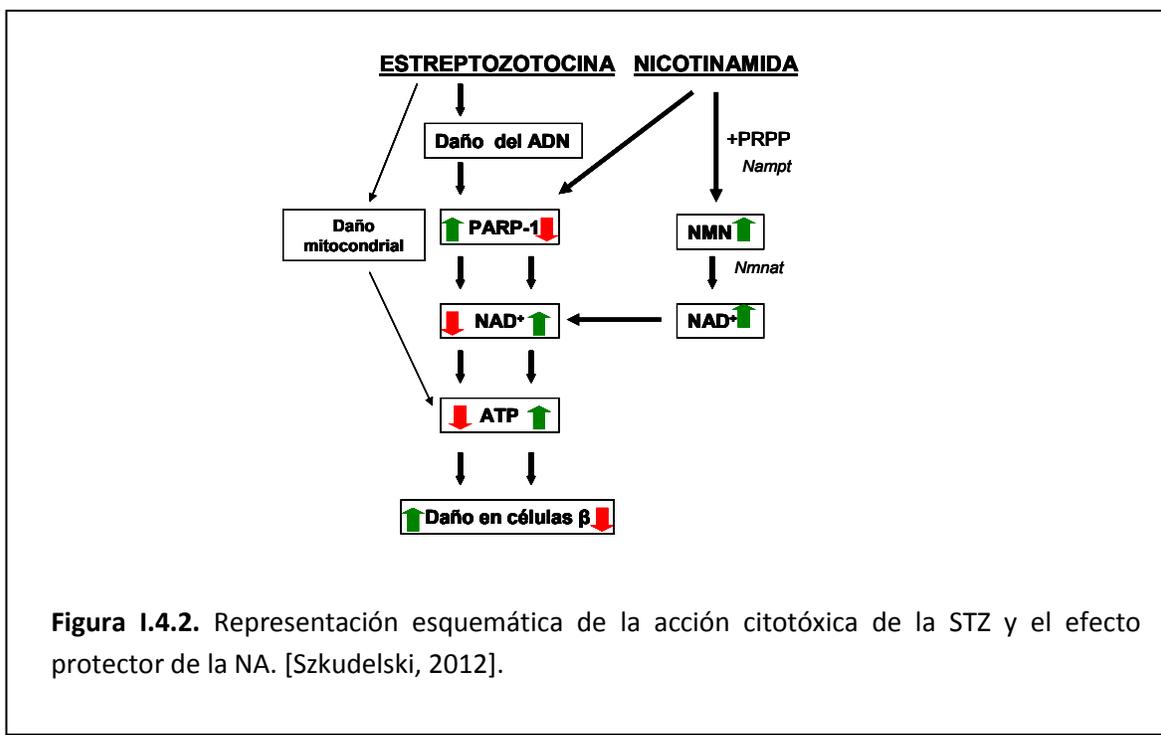
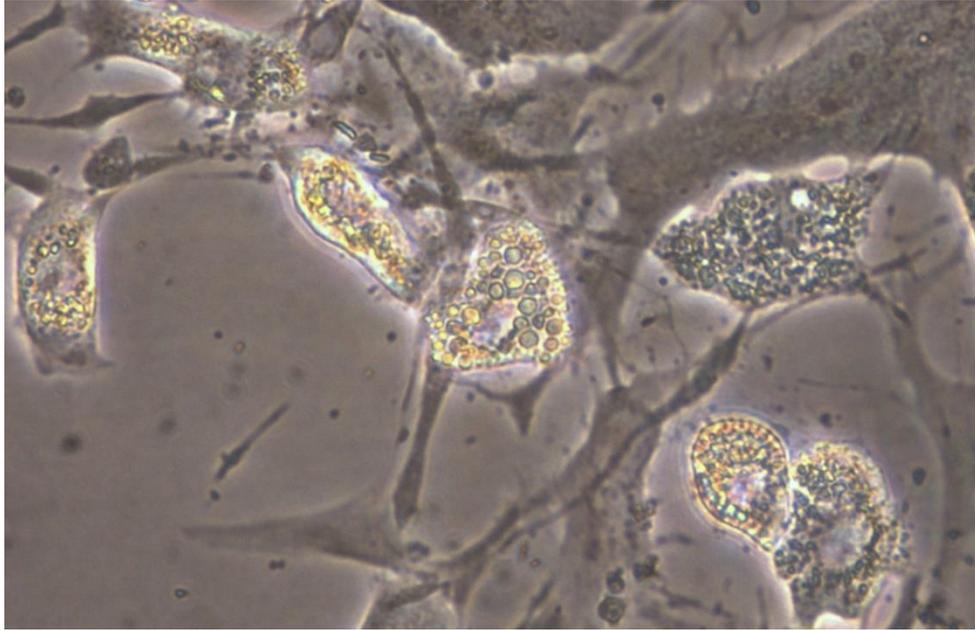


Figura I.4.2. Representación esquemática de la acción citotóxica de la STZ y el efecto protector de la NA. [Szkudelski, 2012].

Características del modelo:

- Tolerancia a la glucosa: El test de tolerancia a la glucosa en humanos con diabetes tipo 2, induce un incremento en la glucosa sanguínea la cual es marcadamente mayor que en personas sanas. Esto resulta tanto por la insulino-resistencia como por la disminución en la función de las células β . La administración de glucosa a animales sanos produce un pico rápido de insulina. De forma opuesta a este comportamiento dinámico, en ratas diabéticas, la secreción de la insulina en respuesta a glucosa se ve disminuida casi sin presentar modificaciones en la insulinemia y en consecuencia la intolerancia a la glucosa observada en ratas STZ-NA es debida principalmente a la alteración en la secreción de insulina. Los islotes pancreáticos de humanos con diabetes tipo 2, presentan una disminución en la primera fase de secreción de insulina, y la segunda fase se encuentra deteriorada. La secreción de insulina en células β provenientes de ratas tratadas con STZ-NA frente a un estímulo con glucosa responden con un inicial incremento en la secreción de insulina, sin ser observada la segunda fase de secreción. La secreción total de insulina se halla disminuida. El grado de disminución está relacionado con la cantidad de STZ y NA que fue administrada.
- Secreción de insulina: En humanos con diabetes tipo 2, la insulino-resistencia es inicialmente compensada por un incremento en la secreción de insulina para mantener la glucemia en valores normales. Este mecanismo compensatorio está implicado en el incremento de la función secretora de las células β y en el aumento en la masa de células. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, la secreción exagerada de insulina lleva al fracaso de las células β , las cuales entran en apoptosis y la masa celular se reduce. En este contexto, los islotes de ratas tratadas con STZ-NA correspondería con un estado de diabetes tipo 2 con reducción en la masa de células β en humanos.
- Estrés oxidativo: En humanos con diabetes tipo 2, el estrés oxidativo está incrementado en diferentes tejidos y está implicado en las complicaciones diabéticas. En el modelo de STZ-NA también se encuentra un incremento en el estrés oxidativo evidenciado en el aumento del factor de necrosis tumoral α , interleuquina 1b, IL-6, factor nuclear kB (NF-kB) unidad p65 y NO respecto a animales control. Estudios recientes demostraron incapacidad en el sistema de defensa antioxidante en estas ratas y, en consecuencia, los niveles de lípidos, peróxidos, hidroperóxidos y proteínas carboxiladas son significativamente más altos en

plasma, tejido pancreático y riñón en animales diabéticos. En simultáneo, la actividad de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidas y glutatión-S-transferasa se encontraron disminuidas en eritrocitos, tejido pancreático, hígado y riñones de rata con diabetes comparada con animales sanos. Sin embargo, los cambios observados en ratas STZ-NA son menos marcados que en ratas tratadas con STZ solamente.



CAPITULO II

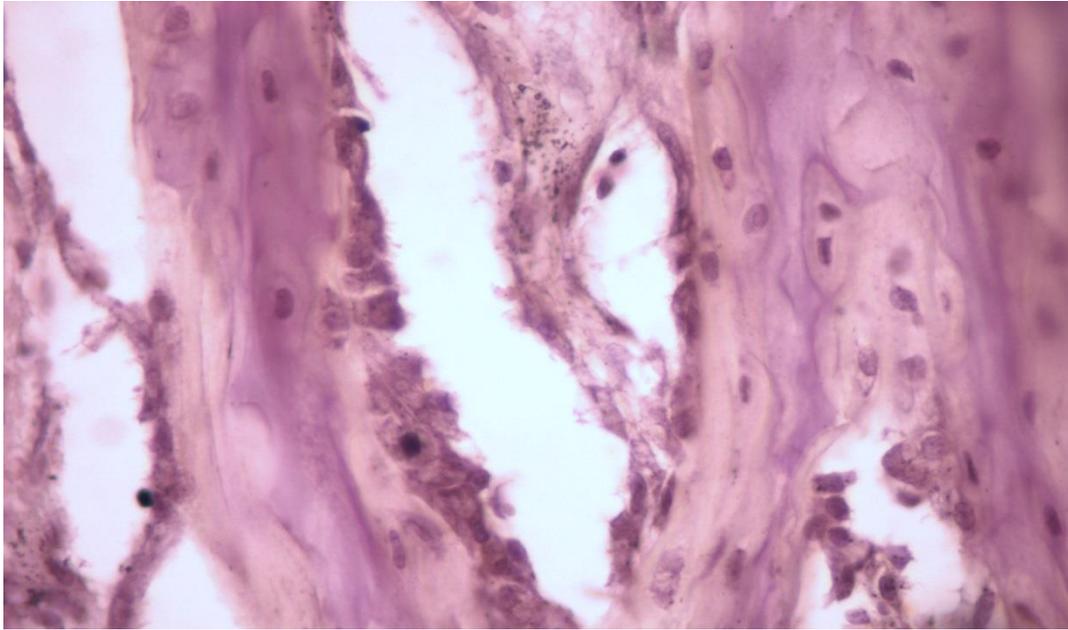
Objetivos

Objetivos generales:

Investigar las alteraciones óseas que se desarrollan en un modelo murino de diabetes leve.
Investigar el efecto de los AGEs sobre células progenitoras de médula ósea (CPMO) en cultivo, así como el rol del alendronato sobre dichos efectos.

Objetivos específicos:

1. Analizar el efecto de AGEs y alendronato sobre la diferenciación de CPMO al fenotipo osteoblástico, adipogénico y condrogénico en cultivo.
2. Investigar la capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de CPMO provenientes de ratas controles o diabéticas, tratadas o no con alendronato (efecto ex-vivo del alendronato sobre CPMO).
3. Investigar el efecto del tratamiento *in vivo* con alendronato sobre las alteraciones asociadas con la diabetes, en la microarquitectura de huesos largos.



CAPITULO III

Materiales y Métodos

III.1. Estudios in vitro: Efecto directo del alendronato sobre el destino fenotípico de CPMO

Los ensayos *in vitro* se realizaron con células progenitoras de médula ósea (CPMO) de ratas no diabéticas y sin tratamientos.

III.1.1. Preparación de AGEs (Productos de Glicación Avanzada, PGA)

Los productos de glicación avanzada se prepararon mediante la incubación de 10mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA- Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) con 33 mM de D-glicolaldehído como agente glicante (Sigma-Aldrich) en 150 mM de PBS (buffer fosfato salino) pH=7.4 a 37°C por 3 días bajo esterilidad [Unno et al., 2004]. Se utilizó el D-glicolaldehído en lugar de glucosa por su mayor reactividad en la glicosilación no enzimática. Se incubó un control de BSA en las mismas condiciones, en ausencia del azúcar. Las moléculas de azúcar que no reaccionaron fueron removidas por centrifugación/filtración a través de filtros Centricon con punto de corte de 10kDa (Amico Inc. Beverly, Mass., EEUU). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford usando BSA como estándar.

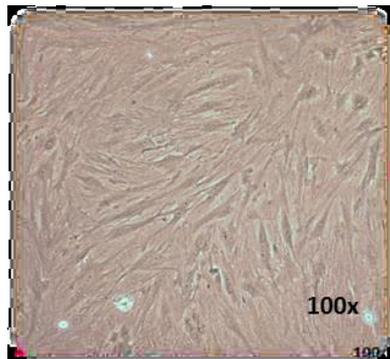
III.1.2. Preparación de soluciones de Alendronato (ALN)

El Alendronato es un bifosfonato nitrogenado. Se utilizó el trihidrato de la sal monosódica del ácido 4-amino-1hidroxibutiliden-1,1-bisfosfónico, provisto generosamente por el Dr. Ostrowski de Laboratorios Elea (Argentina). La droga sólida se pesó en balanza analítica y se disolvió en agua destilada estéril para preparar una solución stock de concentración 10^{-2} M, la cuál se fraccionó y congeló a -20°C. Al momento de iniciar los experimentos, se realizaron las diluciones seriadas correspondientes (10^{-5} - 10^{-7} M) para obtener las concentraciones finales deseadas en cada pocillo de cultivo celular.

III.1.3. Obtención de las CPMO

Las CPMO fueron obtenidas luego de sacrificar los animales y disecar los fémures y las tibias. Luego de un lavado con alcohol 70°, se cortaron las epífisis en condiciones de esterilidad a fin de

exponer el canal medular por el cual se hizo fluir medio de cultivo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Natocor, Córdoba, Argentina), penicilina (100 UI/l) y estreptomina (100 mg/l) [Troppe, 2004]. La suspensión obtenida fue incubada en frascos de 25 cm² manteniéndose en una estufa termostata a 37 °C, en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Luego de 24 horas, las células no adheridas fueron removidas aspirando el medio de cultivo, el cual se renovó dos veces por semana hasta que las células llegaron a confluencia, como se muestra en la fotografía (aproximadamente 10 días). A continuación la monocapa celular fue despegada usando 0,025% de tripsina en buffer salino fosfato (PBS) con 1 mM de EDTA y las células transferidas a frascos de 75 cm² o a platos de cultivo multipocillo para realizar los diferentes experimentos manteniendo las mismas condiciones [Molinuevo, 2010].



Una vez que las CPMO llegaron a confluencia en los frascos de cultivo, se tripsinizaron y replaquearon en platos de cultivo de 6, 12 o 24 pocillos, según el ensayo a realizar. En un principio se incubaron las células con distintas concentraciones de AGEs (50, 100 y 200 mg/ml) y Alendronato (10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} M), luego de lo cual se seleccionó la concentración de cada uno que producía efectos significativos respecto del control. En cada ensayo se describen los tiempos de incubación.

III.1.4. Diferenciación osteoblástica de las CPMO

Las CPMO se plaquearon a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en platos de 24 pocillos y fueron incubadas en DMEM suplementado con SFB 10%, penicilina (100 UI/l) y estreptomina (100 mg/l) a 37°, en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Una vez que alcanzaron 70-80% de confluencia,

se comenzó la diferenciación osteoblástica mediante el agregado de un medio osteogénico que contiene 25 ug/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β -glicerolfosfato de sodio, cambiando el medio 3 veces por semana. El tratamiento se mantuvo durante 15 o 21 días [Molinuevo, 2010].

Los dos compuestos son esenciales para la diferenciación 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 actividad sinérgica con el ácido ascórbico en promover la expresión del fenotipo osteoblástico y es necesario para la mineralización de la matriz extracelular [Quarles, 1992].

Luego de 15 días de incubación con dicho medio, se evaluó la actividad de Fosfatasa Alcalina (FAL) y la producción de colágeno tipo 1 (Col - 1), parámetros característicos de diferenciación de dicho linaje. Luego de 21 días se cuantificó la formación de nódulos de mineralización extracelulares. Las técnicas utilizadas se describen a continuación.

III.1.5. Determinación de parámetros de diferenciación osteoblástica

Actividad de fosfatasa alcalina

Luego de 15 días de diferenciación se lavó la monocapa de células con PBS y se solubilizó en 250 μ l de Triton-X100 al 0,1 %. Una alícuota del extracto celular obtenido se utilizó para determinar la concentración de proteínas celulares totales por el método de Bradford [Bradford, 1976]. Otra alícuota fue utilizada para evaluar la actividad de la enzima Fosfatasa Alcalina. La actividad de la enzima se midió por un método colorimétrico cinético utilizando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como sustrato. El producto de hidrólisis, p-nitrofenol, se determinó por absorbancia a 405nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en buffer glicina pH 10,4 durante un período de tiempo predeterminado [Cortizo, 1995]. Los resultados se expresaron como nmoles p-NP/ mg de Proteína/ minuto.

Producción de colágeno tipo I

La producción de colágeno tipo 1 se determinó utilizando un ensayo colorimétrico mediante la técnica de Sirius Red [Tullberg-Reinert & Jundt, 1999]: luego de 15 días de diferenciación

osteoblástica, las células se fijaron con solución fijadora de Bouin (Ácido Pírico: formaldehído 35 %: Ácido Acético glacial; 15 : 5 : 1) durante 1h. Luego se lavó la monocapa celular con Ácido Clorhídrico 0,1 N y se tiñó con una solución del colorante Sirius Red por 1h. El material teñido se disolvió en 1 ml de Hidróxido de Sodio 0,1 N y se midió la absorbancia a 550 nm. Se realizó en paralelo una curva de calibración utilizando colágeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Los resultados se expresaron como μg de colágeno/well.

Mineralización

Los depósitos de calcio extracelular (nódulos de mineralización) se evaluaron luego de 21 días de cultivo en un medio de diferenciación osteogénico. Luego de fijar la monocapa celular con formalina y teñir con Rojo de Alizarina S [Ueno, 2001], los depósitos de calcio teñidos se extrajeron con 1 ml de solución de hidróxido de sodio 0,1N y la densidad óptica se midió a 548 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) del basal.

III.1.6. Diferenciación adipocítica de las CPMO

Las CPMO obtenidas fueron plaqueadas en platos de 12 pocillos y se incubaron en DMEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos a 37° en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Una vez adheridas y habiendo alcanzado una confluencia del 50-60%, se comenzó la diferenciación adipocítica por el agregado DMEM-10%SFB suplementado con 3-isobutil-1metil-xantina (IBMX) 0,5 μM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), dexametasona 1 μM (Decadrón, Sidus, Argentina) e insulina 200nM (Lilly, Buenos Aires, Argentina). El IBMX se une y activa PPAR γ , factor de transcripción clave para la diferenciación adipocítica y el mantenimiento del fenotipo. La dexametasona actúa como ligando de los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR), cuya acción final es reprimir la expresión de Pref-1 (factor de preadipocitos 1, que es el principal factor de transcripción antiadipogénico) y activar PPAR γ . La insulina, por su parte, ejerce su efecto a través de su vía normal de señalización que incluye IRSs, PI3K y PKB/AKT. Finalmente, regula positivamente la expresión de PPAR γ y C/EBP- α , aumentando la expresión de genes del fenotipo maduro como los que intervienen en la captación de glucosa y en la lipogénesis (Morrison, 2000). La insulina también tiene efectos antilipolíticos. La incubación se realizó durante 10 días, cambiando el medio de cultivo 3 veces por semana. Pasado dicho

período, se determinaron los niveles de triglicéridos intracelulares así como la actividad enzimática de lipasa celular.

III.1.7. Determinación de parámetros de diferenciación adipocítica

Depósitos intracelulares de triglicéridos

Los depósitos intracelulares de triglicéridos fueron analizados mediante un kit enzimático comercial (Wiener, Rosario, Argentina). La monocapa celular fue lisada con 100 μ l de Tritón X-100 0,1%. Del extracto obtenido se utilizó una alícuota para realizar la medida enzimática-colorimétrica de triglicéridos a una longitud de onda de 505nm (siguiendo las instrucciones del fabricante) y otra alícuota para determinar la cantidad de proteínas celulares totales por la técnica de Bradford [Bradford, 1976]. Los resultados se expresaron como μ g de triglicéridos/ μ g de proteína. Además, las células fueron observadas y fotografiadas con un microscopio invertido con contraste de fase, detectando las gotas lipídicas intracelulares.

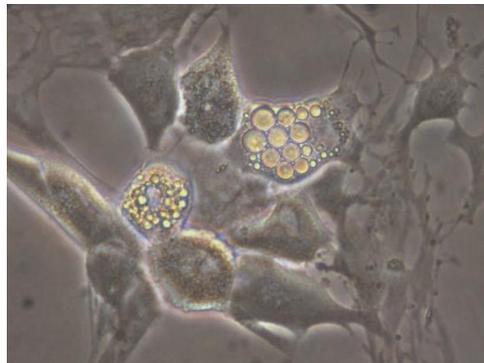


Figura II.1. Imagen de cultivos de CPMO diferenciadas al linaje adipocítico, se puede apreciar las gotas lipídicas intracelulares. Obj. 40X.

Lipasa

La actividad de esta enzima marcadora de adipocitos diferenciados se determinó mediante un kit comercial (Wiener, Rosario, Argentina). Se utilizó el mismo extracto que se describió previamente en la determinación de triglicéridos intracelulares. A partir de una alícuota del mismo se realizó una medida colorimétrica a una longitud de onda de 575nm, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresan en mUnidades Internacionales por miligramo de proteína (mU/mg de proteína).

III.1.8. Diferenciación condrocítica de las CPMO

Las CPMO fueron resuspendidas a una concentración de 10^7 células/mL en DMEM libre de suero. Pequeñas gotas de 10 μ L fueron depositadas en el centro de un pocillo de una placa de 24 pocillos y se incubaron por 2 horas a 37 °C para permitir su adherencia. Después de este tiempo, se agregó DMEM suplementado con 10% de SFB y se incubaron durante 24 horas a 37°C y en atmósfera humidificada y con 5% CO₂. A continuación, se agregó medio condrogénico (DMEM libre de suero suplementado con 10 ng/ml TGF-b3 [Peprotech, USA], 10^{-8} M dexametasona, 1x de suplemento insulina-transferrina-selenio (ITS) (Invitrogen). Las células en estas condiciones se incubaron durante 21 días, cambiando el medio cada tres días.

Determinación de glucosaminoglucanos sulfatados

Al finalizar el período de diferenciación condrocítica descrito arriba, se determinó el glucosaminoglucano condroitín sulfato (GAGs) [Bahmanpur, 2006], como una medida de maduración de los condrocitos. Las células se fijaron durante toda la noche, se tiñeron con 0.5% de Azul Alcían en 0.1N HCl y se lavaron dos veces con 0.1N HCl. Luego, se realizó un lavado con agua destilada y se extrajo el colorante con 4M cloruro de guanidinio para solubilizar los GAGs asociados a la matriz. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 600 nm.

III.1.9. Determinación de la producción intracelular de especies de oxígeno reactivas (ROS)

La generación intracelular de radicales libres en osteoblastos se evaluó mediante la oxidación de dihidrorodamina 123 (DHR 123) a rodamina según la técnica descrita por McCarthy et al (2001). La técnica se basa en que las especies altamente oxidantes como el hidroxilo (OH^*) y el $\text{ONOO}^*/\text{ONOOH}$, son capaces de oxidar la DHR a rodamina que es un compuesto fluorescente, por lo que puede ser detectada mediante su emisión característica a 532 nm cuando se excita a 495 nm [Kooy, 1994]. Las monocapas de células se cultivaron en platos de 24 pocillos bajo diferentes condiciones experimentales por 24 horas. Al final de este período de incubación, el medio fue reemplazado por DMEM libre de suero con DHR 10 μM y las células se incubaron por 4 horas adicionales. Las células se lavaron con PBS varias veces y luego la monocapa se lisó en 1ml de Tritón X-100 0.1%. La concentración de producto oxidado (Rodamina) presente en el extracto celular fue determinada midiendo la intensidad de fluorescencia relativa con respecto a un estándar 0.5 μM de Rodamina [Cortizo, 2000]. Una alícuota del extracto se usó para determinar proteínas totales por el método de Bradford [Bradford, 1976].

III.1.10. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por Western blot

Las CPMO se plaquearon hasta confluencia en placas de 6 pocillos en DMEM–10% SFB y luego se diferenciaron hacia el linaje osteoblástico o adipocítico. Al finalizar los diferentes períodos de diferenciación, las células fueron lisadas en buffer de Laemmli. Los lisados se calentaron a 100°C por 3 minutos, las proteínas se separaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida 10% con SDS y luego se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Después de lavar y bloquear con leche descremada 5% en PBS-T (buffer fosfato adicionado con 0,1% de Tween 20) durante 1 hora, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario dirigido contra el factor de transcripción Cbfa1/Runx2 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) para evaluar el linaje osteoblástico o contra PPAR γ 1:700 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) para evaluar adipogénesis. Después de lavar, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente. Como *housekeeping*, se utilizó el anticuerpo anti- β -actina (Novus Biologicals) en

concentración 1:10000 o α -tubulina 1:5000. Luego de lavar con PBS-T, las membranas fueron reveladas mediante el método de quimioluminiscencia o por el método de la diaminobencidina (DAB). La intensidad de las bandas específicas fueron cuantificadas con el programa Image J (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

III.2. Estudios in vivo: tratamiento oral con Alendronato en un modelo de Diabetes

III.2.1. Modelo Animal y tratamiento

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos jóvenes (3 meses de edad) de 200-220gr de peso mantenidas en un bioterio climatizado (23°C) con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, alimentados con alimento balanceado estándar y agua “ad libitum”. Todos los ensayos con animales fueron realizados de acuerdo a la Guía de Manejo y Uso de Animales de Laboratorio [Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. In: The Biological Council of Animal Reserch and Welfare Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992], bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales -Disposición ANMAT 5330/97- e internacionales. Asimismo, se tuvieron en cuenta las indicaciones de la guía del NIH para animales de experimentación (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>).

Los animales fueron divididos en 4 grupos de 4 ratas cada uno:

- Ratas controles (no diabéticas sin tratamiento) [**C**]
- No diabéticas tratadas durante 2 semanas con alendronato en el agua de bebida (1 mg/kg/día) [**A**] (ELEA, Argentina)
- Ratas con Diabetes inducida por destrucción parcial de las células beta pancreáticas, sin tratamiento con alendronato [**D**]
- Diabéticas tratadas 2 semanas con alendronato (1 mg/kg/día) [**DA**].

La inducción de Diabetes se realizó una semana antes de iniciar el tratamiento con alendronato, por inyecciones intraperitoneales sucesivas de 50 mg/kg de nicotinamida y 60 mg/kg de

estreptozotocina [Tahara, 2008]. Antes de iniciar el tratamiento con Alendronato, se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola utilizando un medidor de glucemia comercial (Accu-Check®) para confirmar el desarrollo de la enfermedad. Las ratas inyectadas que no presentaron hiperglucemia fueron descartadas del ensayo. Al finalizar todos los tratamientos se obtuvieron muestras de sangre con el fin de medir distintos parámetros bioquímicos, luego de lo cual los animales se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia. Los huesos largos de una de las extremidades posteriores de cada animal se disecaron y colocaron inmediatamente en una solución fijadora de 10% formalina neutra tamponada. Los huesos se procesaron para su posterior análisis, como se describirá más adelante en **Análisis histomorfométrico**. Los fémures de la otra extremidad posterior de cada rata se disecaron y colocaron en alcohol 70% para extraer, luego, CPMO para cultivo celular y la realización de distintos ensayos.

Se evaluaron, empleando equipos comerciales, los siguientes parámetros séricos: Glucemia (Wiener Lab., Argentina), Trigliceridemia (Wiener Lab., Argentina), Colesterolemia (Wiener Lab., Argentina) y fructosamina (Byosystems, España).

Este experimento fue realizado 2 veces, bajo las mismas condiciones y con el mismo diseño experimental. Este modelo presenta diabetes con producción deficiente de insulina, hiperglucemia, triglicéridos, colesterol y fructosamina aumentados en sangre.

III.2.2. Estudios ex-vivo

Obtención de las CPMO

Las CPMO de cada grupo experimental fueron obtenidas luego de sacrificar los animales (previa anestesia mediante inyecciones sucesivas de ketamina y xilacina) y disecar los fémures y las tibias. Se procedió de la misma manera que se describió previamente, en la sección **Estudios *in vitro*** para obtener los cultivos celulares de CPMO correspondientes a cada grupo y realizar los experimentos necesarios.

Diferenciación osteoblástica de las CPMO

Como se describió previamente en Materiales y métodos, en la sección **Estudios *in vitro***, las CPMO se replaquearon en platos de 24 pocillos y fueron incubadas e inducidas a diferenciación osteoblástica de la manera descrita.

Una vez que transcurrieron 15 días de diferenciación, se determinó la actividad de fosfatasa alcalina y producción de colágeno tipo I, y luego de 21 días se determinaron los depósitos de nódulos de mineral, siguiendo las mismas técnicas y procedimientos descriptos previamente.

Diferenciación adipocítica de las CPMO

Las CPMO obtenidas fueron replaqueadas en platos de 12 pocillos y se incubaron en DMEM adicionado con IBMX, Insulina y Dexametasona, de la misma manera que se describió en **Estudios *in vitro***. Luego de 7-10 días de diferenciación se evaluó la inducción a este linaje mediante la determinación de depósitos de triglicéridos intracelulares y la actividad enzimática de lipasa, al igual que se describió anteriormente.

Diferenciación condrocítica de las CPMO

Las CPMO de cada grupo experimental fueron resuspendidas a una concentración de 10^7 células/mL en DMEM libre de suero. Se sembraron de la misma forma que se describió anteriormente y se diferenciaron en medio condrogénico. Luego de 21 días de diferenciación, se determinaron los glucosaminoglucanos sulfatados mediante la técnica de Azul Alcían, detallada previamente.

III.2.3. Análisis Histomorfométrico

Obtención de muestras óseas para análisis histomorfométrico

Se disecaron fémures y tibias de cada rata para analizar la microarquitectura metafisaria. Los huesos se fijaron en formalina neutra tamponada (NBF) durante 72 hs y luego se descalcificaron mediante sucesivos lavados con soluciones de EDTA (Biopack, Buenos Aires, Argentina) 10 %, pH = 7,0 durante aproximadamente 3 semanas a temperatura ambiente. Las muestras fueron incluidas en parafina. Para llegar a incluir los fémures en parafina se usó un tren de deshidratación formado por dos pasajes sucesivos de 1h de duración en cada uno de los siguientes solventes: alcohol 70º, alcohol 96º, alcohol 100º xileno y finalmente parafina I y parafina II. Se hicieron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo Leica SM 2000 R, los cortes se recogieron en un baño de flotación y se los dejó secar durante 48 hs a 56ºC.

Los cortes de los preparados embebidos en parafina se sumergieron en xileno para eliminar la parafina, luego se pasaron por una serie de alcoholes (100º, 96º y 70º) para rehidratarlos, y a continuación se realizaron las siguientes coloraciones:

- Hematoxilina - Eosina (H - E).
- Histoquímica de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).
- Azul Alcían.

a) Tinción con Hematoxilina - Eosina. La hematoxilina es un colorante catiónico o básico, y por esta razón tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y violáceo, como por ejemplo los núcleos celulares. El colorante eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa (gracias a su naturaleza aniónica o ácida), como la mayoría de las proteínas al pH de la tinción. Los cortes desparafinados e hidratados se sumergieron en hematoxilina por 5 minutos, se lavaron con agua corriente, luego se introdujeron en eosina por 30 segundos y finalmente se lavaron con agua destilada. Posteriormente se pasaron por una serie de alcoholes (70º, 96º y 100º) para deshidratarlos, se los introdujo en xileno y finalmente se montaron con bálsamo sintético para montaje (Biopur, Argentina).

b) Tinción histoquímica para fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP). En los cortes histológicos se determinó la presencia de células (principalmente osteoclastos) con actividad positiva de fosfatasa ácida tartrato resistente. La reacción involucra una sustitución nucleofílica con un reactivo acoplante en la cual se forma un precipitado violáceo en las células que presentan actividad TRAP. Para esto se preparó una solución que contiene Fast Garnet GBC en Metilglicol acidificada con HCl, a la cual se le agregó nitrito de sodio gota a gota y a temperatura ambiente para producir la diazotación que permitirá formar la sal de diazonio altamente reactiva que será sustituida con el α -naftol liberado por la enzima a partir del sustrato naftol AS-BI (específico para la TRAP expresada en osteoclastos). La reacción enzimática se lleva a cabo en presencia de tartrato de sodio que inhibe las fosfatasas ácidas celulares no TRAP, en buffer citrato pH 4,9. Recién a partir de este momento se colocaron los cortes ya desparafinados e hidratados en la solución termostatzada durante 60 minutos a 37ºC. Luego se lavaron con agua destilada, se contra-colorearon con Fast Green durante 10 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se montaron los preparados en glicerina.

c) Tinción de Azul Alcían pH 2.5. A este pH, el azul alcían tiñe las mucinas altamente sulfatadas sintetizadas por los condrocitos de la placa de crecimiento, las cuales se observan de color azul. Los cortes desparafinados e hidratados se tiñeron con solución de Azul Alcían durante 4 hs. Luego se lavaron con agua corriente durante 10 minutos. Los preparados se contra colorearon con Eosina (30 segundos). Posteriormente se pasaron por una serie de alcoholes (70º, 96º y 100º) para ser deshidratados, se los introdujo en xileno y finalmente se montaron con bálsamo sintético.

Una vez teñidos, los preparados fueron fotografiados con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 en un microscopio Nikon Eclipse E400. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (<http://www.macbiophotonics.ca>) utilizando un plugin para incorporar una escala micrométrica.

Histomorfometría ósea

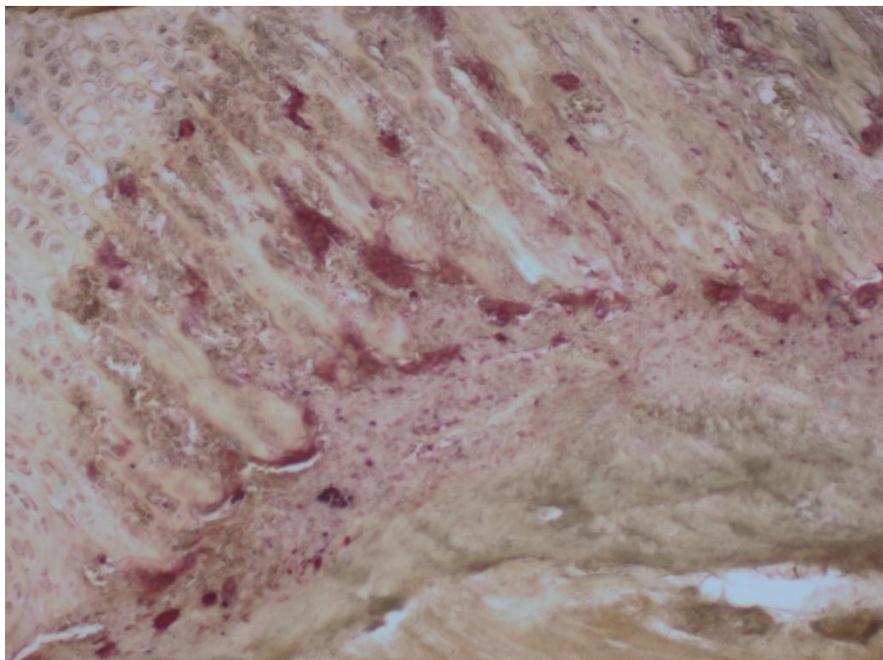
En las imágenes fotográficas de cortes teñidos con H-E, se determinó el área de hueso trabecular en la esponjosa secundaria femoral, definido como: área trabecular sobre área total (trabéculas más médula ósea). Los resultados se expresaron como porcentajes (%).

Se calculó la densidad osteocítica contando el número de osteocitos por unidad de área de hueso trabecular. Los resultados se expresaron como número de osteocitos/mm². Además se determinó la densidad adipocítica en la médula ósea, cuantificando el número de adipocitos presentes en un área de médula ósea. Se expresó como el número de adipocitos/mm².

Usando imágenes de histoquímica de fosfatasa ácida tartrato resistente, se calculó el área con actividad TRAP/área total de hueso en los 250 µm proximales al cartílago de crecimiento (esponjosa primaria), los resultados se expresaron como % del área TRAP positiva sobre el área total.

En las fotos de la tinción de Azul Alcían se cuantificó la altura en micrómetros (µm) del cartílago o placa de crecimiento en la metáfisis proximal de cada tibia (media de 3 medidas para cada placa).

Análisis estadístico: Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por el test de ANOVA (one-way) y el test de Turkey. Se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.



CAPITULO IV

Resultados

IV.1. Estudios *in vitro*

IV.1.1. Efecto de AGEs y alendronato sobre la diferenciación osteoblástica de células progenitoras de médula ósea.

En primera instancia, se evaluaron distintas concentraciones de BSA o AGE-BSA (50, 100 y 200 mg/ml) sobre el potencial osteogénico de CPMO obtenidas de ratas controles (no diabéticas y sin tratamiento). Para ello, las células plaqueadas en platos de 24 pocillos, fueron incubadas durante una semana en medio osteogénico y luego una semana más en medio osteogénico suplementado con diferentes concentraciones de BSA o AGE-BSA. Al final de este periodo de incubación, se evaluaron dos marcadores de diferenciación osteoblástica, actividad de Fosfatasa Alcalina (FAL) y producción de colágeno de tipo I (Col-I). Como se puede ver en la Figura 1 (A y B), 200 mg/ml de AGE-BSA disminuyeron significativamente ambos parámetros.

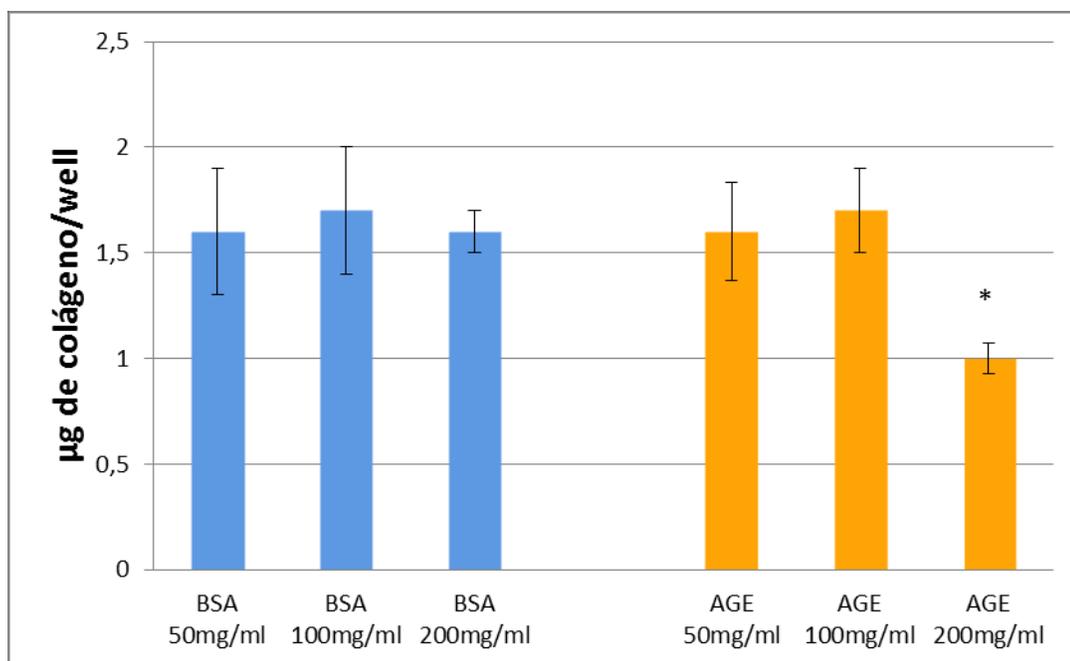


Figura 1A. Producción de colágeno tipo I. Las CPMO se diferenciaron 15 días en medio osteogénico, con distintas dosis de AGE-BSA (50, 100 y 200 mg/ml). Luego se ese periodo, las células se tiñieron mediante la técnica de Sirius Red y se determinó la DO a 550 nm. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs BSA.

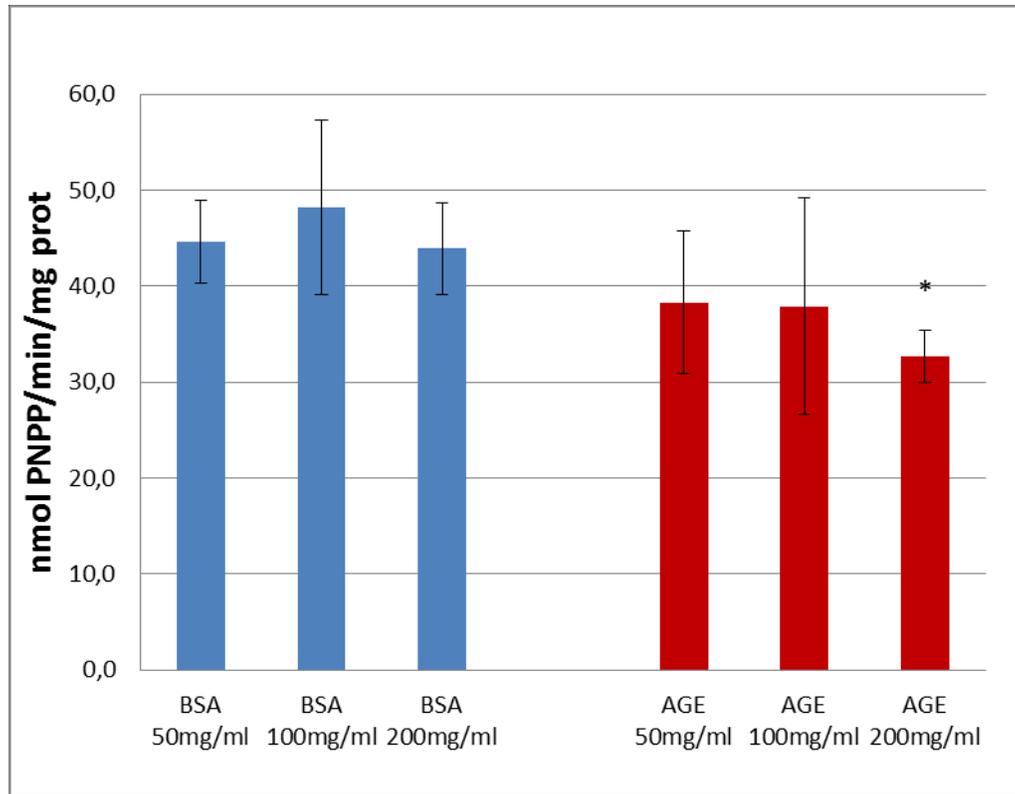


Figura 1B. Actividad de Fosfatasa Alcalina. Luego de 15 días de diferenciación de las CPMO en medio osteogénico adicionado con distintas dosis de AGE-BSA (50, 100, 200 g/ml), se determinó la actividad específica de fosfatasa alcalina por un método cinético. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs BSA.

Por lo tanto, se adoptó esta concentración para realizar los ensayos subsecuentes, con un esquema experimental similar. Las CPMO fueron inducidas a diferenciación osteogénica por 15 o 21 días, en un medio suplementado con 200 mg/ml BSA o AGE-BSA en presencia de 0, 10^{-7} , 10^{-8} o 10^{-9} M de alendronato durante la última semana. Los cultivos de 15 días se utilizaron para determinar colágeno de tipo I y FAL, mientras que en los cultivos de 21 días se determinó la producción de nódulos de mineralización extracelulares. Tanto la producción de Colágeno tipo I como la actividad de FAL fueron inhibidas en presencia de AGE-BSA y estimuladas con alendronato, comparando con BSA (Figura 2 A y B).

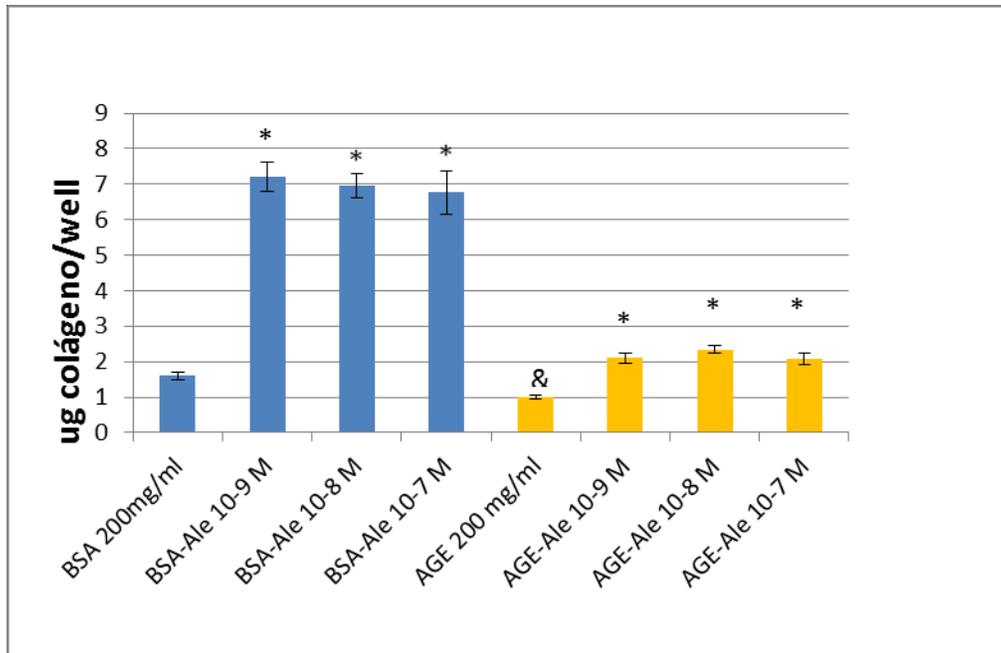


Figura 2A. Producción de colágeno tipo I. Las CPMO fueron diferenciadas durante 15 días en medio osteogénico adicionado con 200 mg/ml de AGE-BSA o BSA y 3 dosis diferentes de alendronato (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M). Mediante la técnica de Sirius Red se determinó la producción de colágeno. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs BSA 200 mg/ml; & $p < 0,05$ vs BSA 200 mg/ml y.

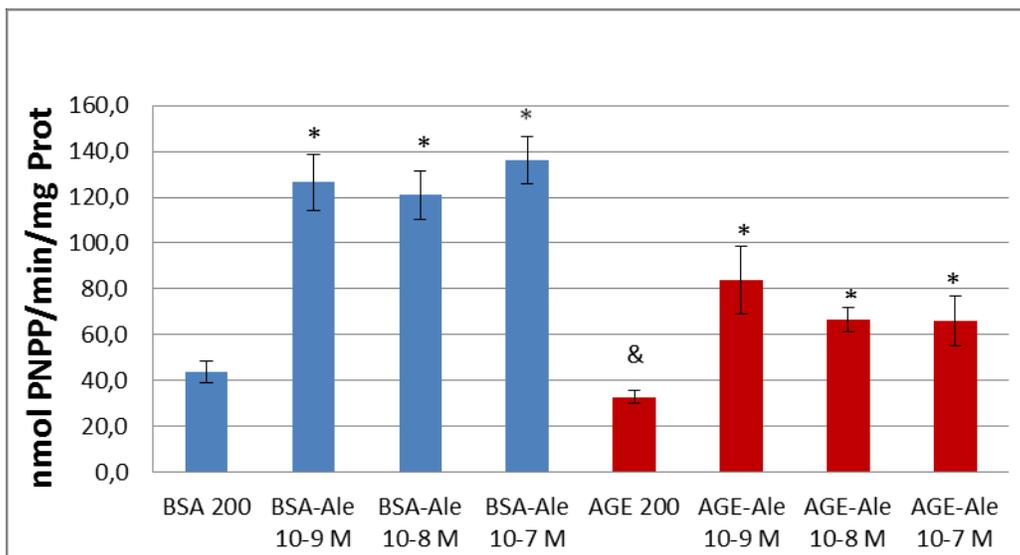


Figura 2B. Actividad de Fosfatasa Alcalina. Luego de 15 días de diferenciación osteoblástica en presencia de BSA o AGE-BSA 200 mg/ml con o sin Alendronato en distintas dosis (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M), se determinó cinéticamente la actividad de FAL a una DO de 405nm. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs BSA 200 mg/ml; & $p < 0,05$ vs BSA 200 mg/ml.

La co-incubación de AGE-BSA con alendronato previno completamente los efectos inhibitorios de los AGEs sobre la diferenciación de CPMO. El efecto observado fue similar para las tres concentraciones de alendronato testeadas, por lo que se decidió continuar los estudios con 10^{-8} M. Luego de 21 días de diferenciación osteogénica se observó que AGE-BSA inhibió significativamente la producción de depósitos de nódulos de mineral extracelulares por parte de las CPMO (Figura 2C) y esto fue completamente prevenido por 10^{-8} M de alendronato.

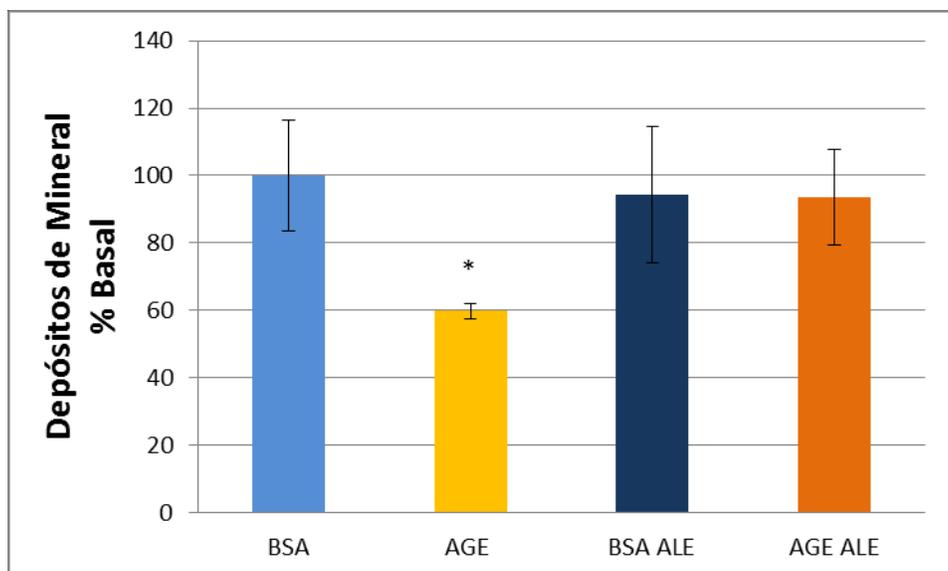


Figura 2C. Producción de nódulos de mineralización extracelulares en células progenitoras de médula ósea diferenciadas a osteoblastos. Luego de 21 días de diferenciación, se determinó la producción extracelular de nódulos de mineralización, utilizando la técnica de rojo de alizarina. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs basal.

IV. 1.2. Efectos de AGEs y alendronato sobre la diferenciación adipogénica.

Con el fin de investigar si los AGEs y alendronato pueden regular otros destinos fenotípicos de las CPMO, se realizaron ensayos de diferenciación hacia el linaje adipocítico. Para ello, las CPMO en presencia de 200 mg/ml de BSA o AGE-BSA, con o sin 10^{-8} M de alendronato, fueron incubadas con medio de diferenciación específico para adipogénesis, como se describió en Materiales y métodos. Para evaluar el fenotipo adipocítico, se determinó el contenido de triglicéridos intracelulares y la actividad de lipasa luego de 10 días de diferenciación. Como se muestra en la Figura 3 (A, B), la incubación de CPMO con AGE-BSA aumentó significativamente su diferenciación adipocítica, observando un aumento en la acumulación de Triglicéridos y en la actividad de Lipasa (Figura 3 A y B). En ambos casos, la co-incubación con 10^{-8} M de alendronato previno completamente los efectos inducidos por AGE-BSA.

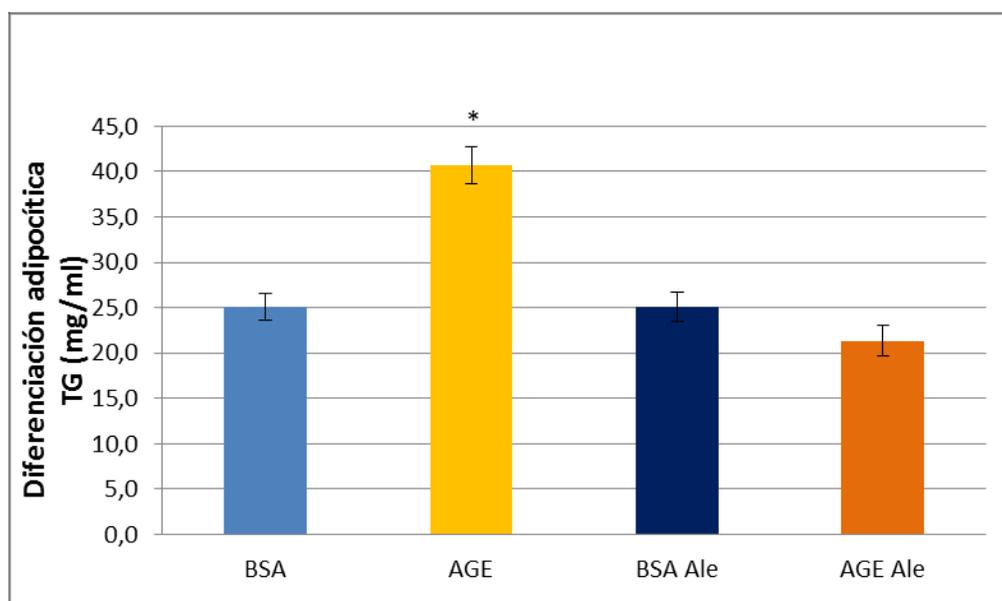


Figura 3A. Diferenciación adipocítica. Las CPMO fueron diferenciadas por 10 días en medio adipogénico suplementado con 200mg/ml de BSA o AGE-BSA con o sin 10^{-8} M de alendronato. Se determinó el contenido de triglicéridos intracelulares mediante un kit comercial. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. BSA.

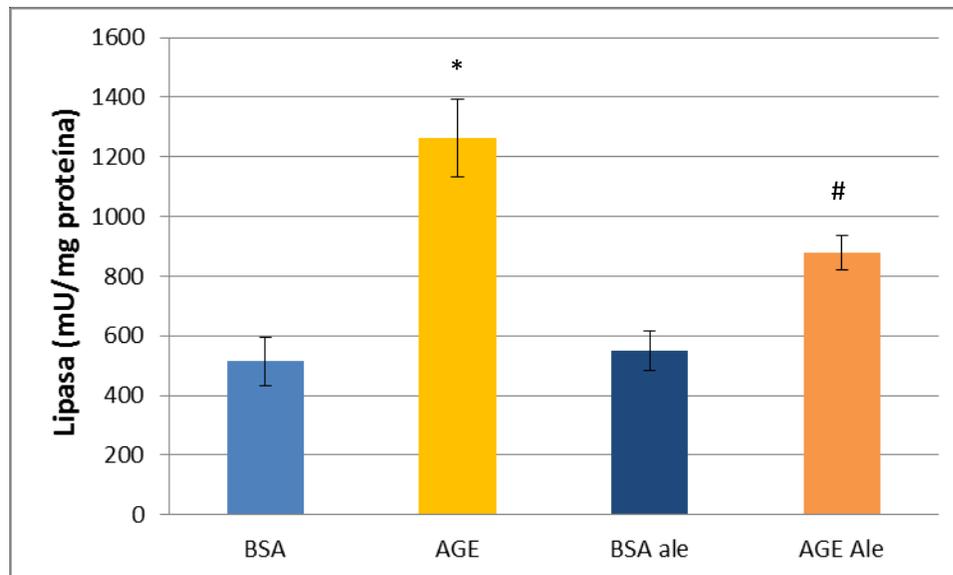


Figura 3B. Diferenciación adipocítica. Las CPMO fueron diferenciadas por 10 días en medio adipogénico suplementado con 200mg/ml de BSA o AGE-BSA con o sin 10^{-8} M de alendronato. Se determinó la actividad enzimática de Lipasa mediante un kit comercial. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs. BSA; # $p < 0,05$ vs AGE.

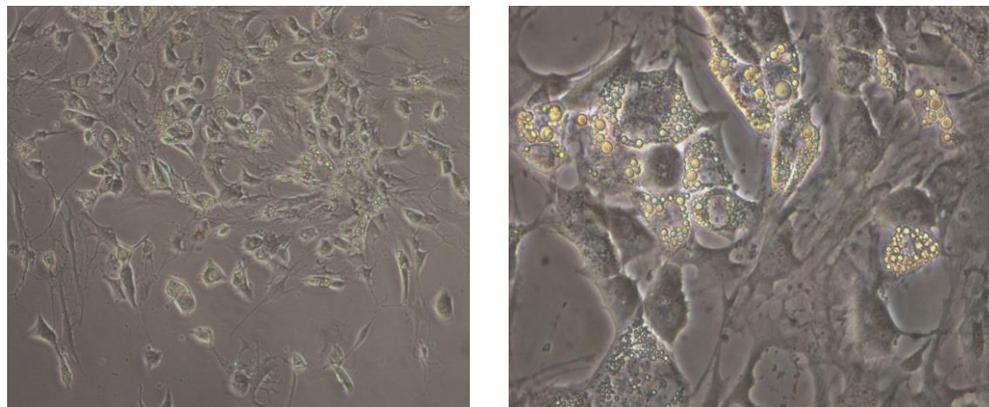


Figura 3C. Imágenes de cultivos de CPMO diferenciadas a adipocitos. Se pueden identificar las gotas de lípidos intracelulares por su marcada birrefringencia. Izquierda: Obj. 10X, Derecha: Obj. 40X.

IV.1.3. Efectos de AGEs y alendronato sobre la diferenciación condrogénica de CPMO.

Otro de los destinos fenotípicos de las CPMO es el condrogénico, por lo que se procedió a investigar si AGEs y alendronato son capaces de regular la diferenciación condrogénica. Para ello, las CPMO fueron incubadas con medio de diferenciación específico para el linaje condrocítico, como se describió en Materiales y métodos. Para evaluar la diferenciación condrogénica se determinó la producción de glucosaminoglicanos (GAGs) intracelulares mediante la técnica colorimétrica de Azul Alcían, luego de 21 días de diferenciación. En una primer instancia, se realizó una curva dosis-respuesta con distintas concentraciones de AGEs (50, 100 y 200 mg/ml), los que fueron adicionados al medio de cultivo la última semana de diferenciación. Se evidenció que el mayor efecto inhibitorio se observaba a una concentración de 200 mg/ml, con lo cual se seleccionó esta concentración para los ensayos siguientes (Figura 4A). Posteriormente, se investigó el efecto de 200 mg/ml de AGEs, con o sin 10^{-8} M de alendronato sobre la diferenciación condrogénica. En este caso, se observó una disminución significativa en la producción de GAGs en presencia de AGEs, efecto que fue totalmente prevenido en la co-incubación con alendronato (Figura 4B).

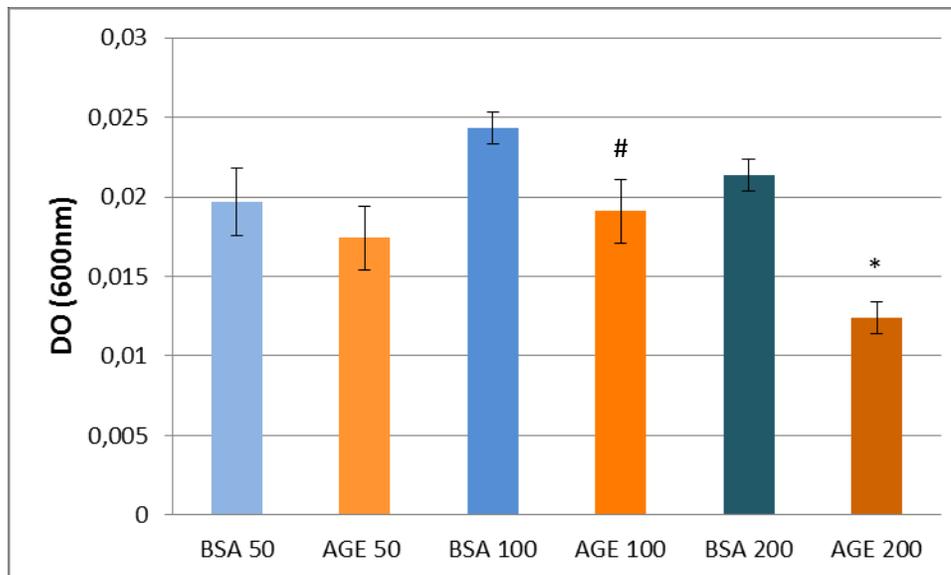


Figura 4A. Diferenciación condrocítica. Las CPMO fueron diferenciadas por 21 días en medio condrogénico suplementado con 50, 100 o 200mg/ml de BSA o AGE-BSA. Se determinó el contenido de GAGs intracelulares coloriméticamente, a 600 nm. Los resultados se expresaron como la media±SEM. #p<0,001 vs. BSA 100; *p<0,001 vs BSA 200.

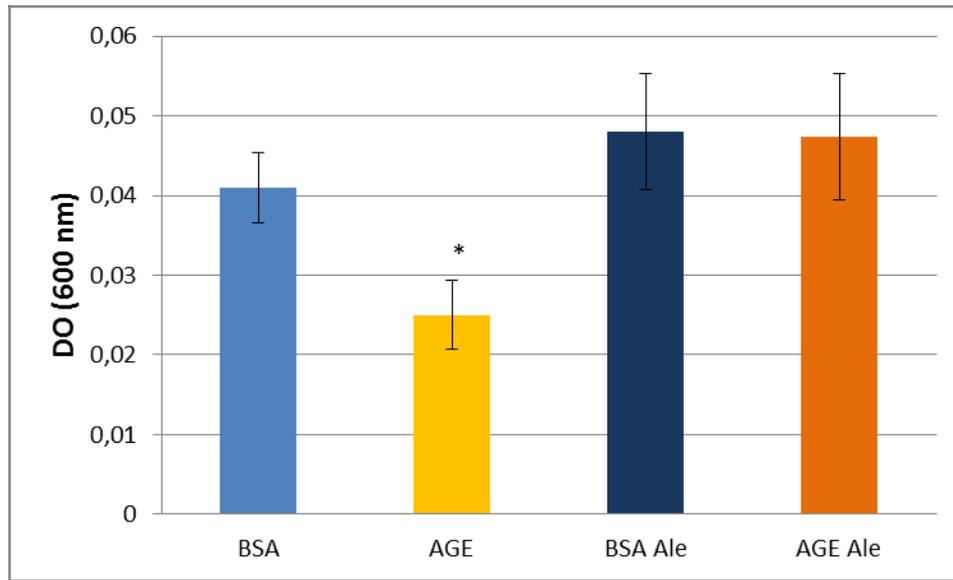


Figura 4B. Diferenciación condrocítica. Las CPMO fueron diferenciadas por 21 días en medio condrogénico suplementado con 200mg/ml de BSA o AGE-BSA con o sin 10^{-8} M de alendronato. Se determinó el contenido de GAGs intracelulares coloriméticamente, a 600 nm. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. BSA.

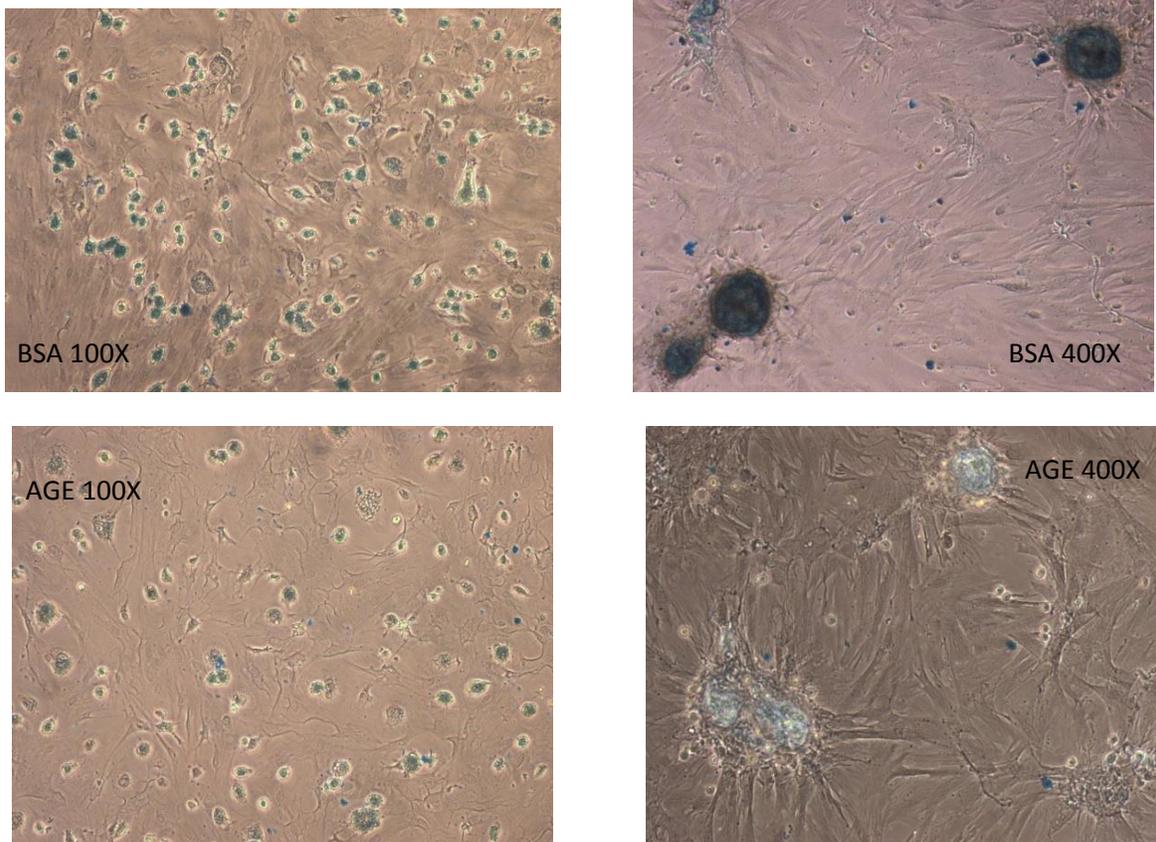


Figura 4C. Imágenes de cultivos de CPMO luego de la diferenciación condrogénica. Se puede evidenciar en las imágenes de 100X una disminución de GAGs (agregados celestes) en presencia de AGEs vs BSA. A 400X se puede observar una menor intensidad de tinción en las células incubadas con AGEs respecto a BSA, donde esos agregados están más organizados y teñidos más intensamente.

IV.1.4. Efecto de AGEs y Alendronato en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La generación de ROS intracelulares interviene en ciertos efectos de AGEs, particularmente aquellos que dependen del reconocimiento de AGEs por RAGE, el receptor de AGEs. Por eso, se evaluó si esta vía de transducción de señal podría estar involucrada en las acciones de los AGEs y/o alendronato, sobre las CPMO. Para este fin, las CPMO fueron incubadas por 48 horas con 200 mg/ml de BSA o AGE-BSA, con o sin 10^{-8} M de alendronato y en presencia o ausencia de 50μ M de vitamina E (como antioxidante). Después de este tiempo de incubación, la producción de ROS

intracelulares fue determinada por el método de la Dihidrorodamina (DHR). La Figura 5 muestra que la producción de ROS intracelulares fue significativamente mayor en presencia de AGE-BSA. Este incremento inducido por AGEs fue completamente prevenido por co-incubación con vitamina E, alendronato o ambos.

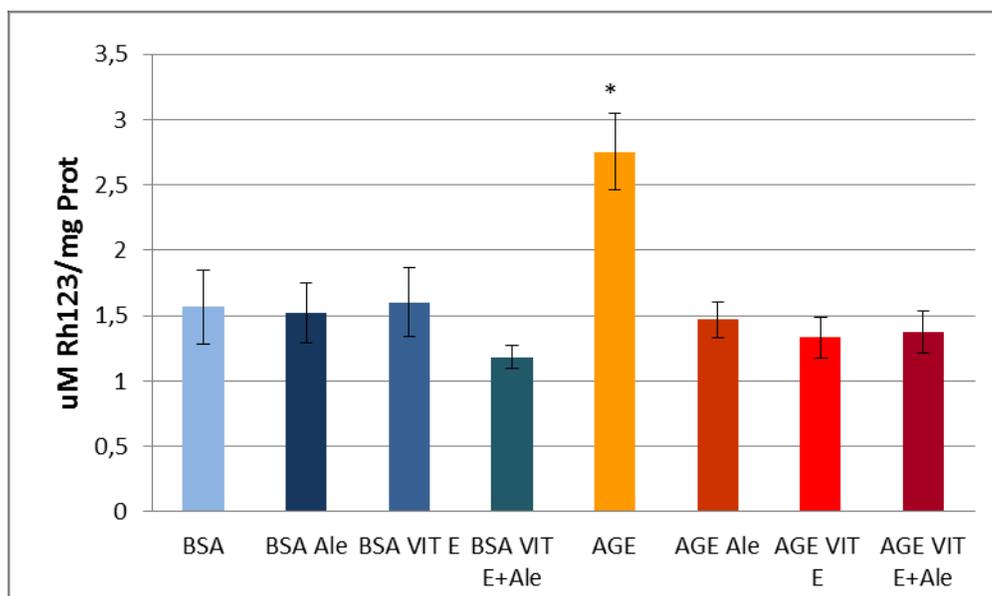


Figura 5. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de AGEs y alendronato. Las CPMO fueron incubadas 48hs con AGE-BSA con o sin alendronato y/o vitamina E. Los ROS se determinaron por la técnica fluorométrica de la dihidrorodamina (DHR). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. BSA.

IV.1.5. Efectos de AGEs y alendronato sobre los niveles de factores de transcripción de CPMO

Mediante la técnica de Western blot, se evaluó si los AGEs y/o alendronato podían inducir modificaciones en la expresión de los principales factores de transcripción involucrados con osteogénesis o adipogénesis, Runx2 y PPAR γ respectivamente. Las CPMO fueron incubadas con medio de diferenciación osteogénico o adipogénico suplementado con BSA o AGE-BSA 200 mg/mL, en presencia o ausencia de 10^{-8} M de alendronato, durante el periodo de tiempo correspondiente a cada linaje. Para cada condición experimental, la monocapa celular fue lisada y sometida a análisis por Western blot. AGE-BSA indujo una disminución en la expresión del factor de transcripción osteoblástico Runx2 (Figura 6A), mientras que se observó un aumento en la expresión del factor adipogénico PPAR γ (Figura 6B). Sin embargo, la co-incubación de AGE-BSA con alendronato previno completamente estas alteraciones inducidas por AGEs en la expresión de factores de transcripción específicos de cada linaje.

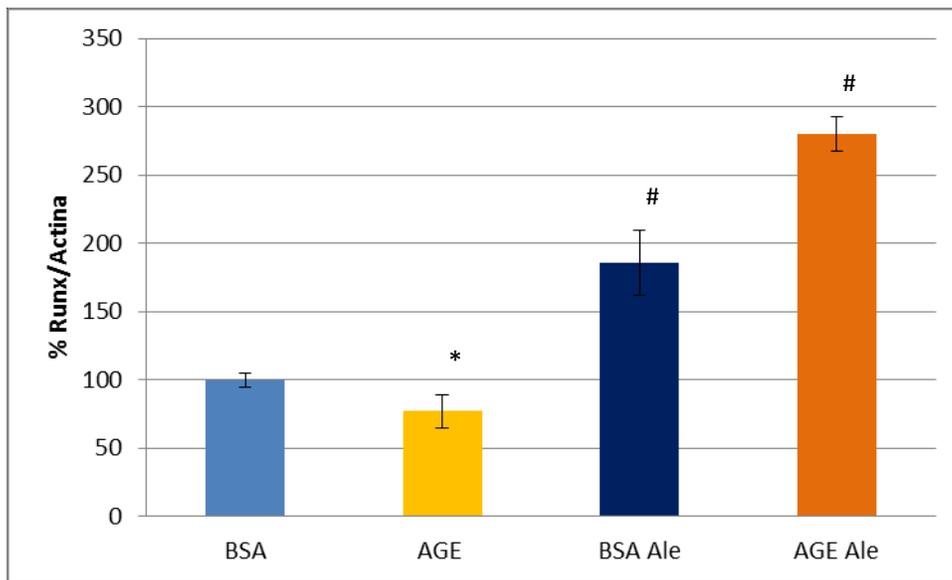


Figura 6A. Expresión del factor de transcripción Runx2. Las CPMO diferenciadas durante 15 días en medio osteogénico, se incubaron con BSA o AGE-BSA 200 mg/ml y alendronato 10^{-8} M. Los resultados se expresaron como % del Basal \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. BSA; # $p < 0,001$ vs BSA.

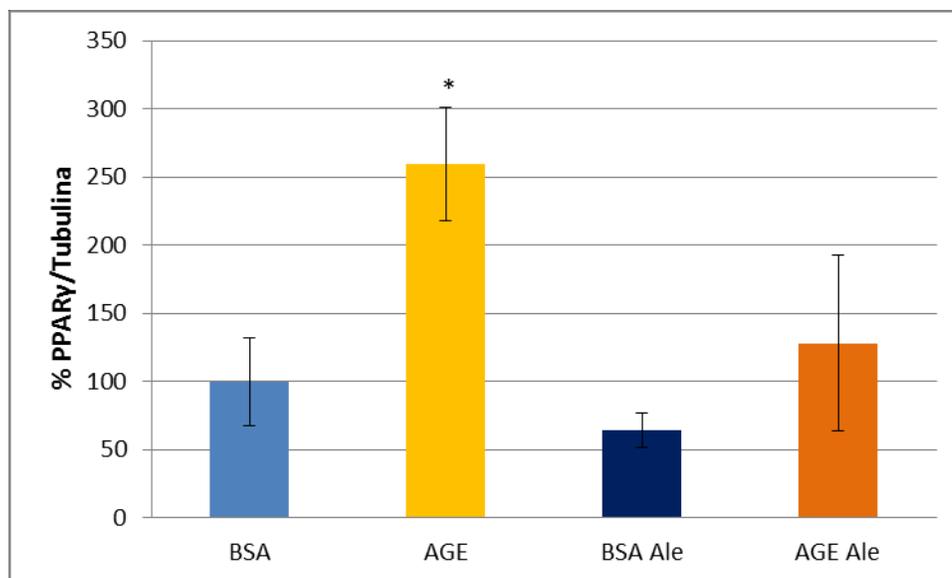


Figura 6B. Expresión del factor de transcripción adipogénico PPAR γ . Las CPMO diferenciadas durante 7-10 días en medio adipogénico, se incubaron con BSA o AGE-BSA 200 mg/ml y alendronato 10^{-8} M. Los resultados se expresaron como % del Basal \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. BSA.

IV.2. Estudios in vivo

IV.2.1. Efecto del tratamiento oral con alendronato sobre la microarquitectura ósea en un modelo de diabetes con déficit parcial de insulina

IV.2.1.1 Evaluación del modelo animal

Para llevar a cabo este estudio se utilizó un modelo animal de diabetes, generado por inyecciones sucesivas de ácido nicotínico y estreptozotocina, tal como se describió en Materiales y métodos. El diseño experimental consta de 4 grupos de animales:

- Ratas Controles [C], es decir, no diabéticas y sin tratamiento con alendronato
- Ratas no diabéticas tratadas con alendronato 1 mg/kg/día [A]
- Ratas Diabéticas [D]
- Ratas Diabéticas tratadas con alendronato 1 mg/kg/día [DA].

Parámetros Bioquímicos en el plasma de los Grupos Experimentales

	Control	Control + Alendronato	Diabéticas	Diabéticas + Alendronato
Glucosa [mg/dL]	168 ± 6	175 ± 9	453 ± 40 [*]	380 ± 33 ^{#&}
Triglicéridos [mg/dL]	62 ± 7	54 ± 4	134 ± 42 [#]	128 ± 19 [#]
Fructosamina [μmol/L]	120 ± 15	135 ± 13	190 ± 12 [%]	210 ± 16 [%]
Colesterol [mg/dL]	37 ± 0,8	37 ± 1	51 ± 5 [#]	56 ± 7 [#]

*p<0,001 vs C; #p<0,05 vs C; &p<0,01 vs D. %p<0,01 vs C.

En base a los resultados obtenidos a partir de los parámetros sanguíneos se pudo corroborar el establecimiento de la patología diabética, con una glucemia elevada en el caso de los animales diabéticos, acompañados por un incremento en los triglicéridos y el colesterol como resultado de

un metabolismo alterado. La fructosamina se vio alterada en los dos grupos de animales diabéticos. Estos resultados nos permitieron concluir que se desarrolló un estado metabólico compatible con un cuadro de diabetes deficiente de insulina como se describe en el modelo animal seleccionado (Tahara, 2008; Skudelski, 2012), que se produce por una destrucción parcial de las células beta del páncreas, cuyo mecanismo se detalló en Materiales y métodos.

IV.2.2. Efectos sobre la microarquitectura ósea

Para evaluar la microarquitectura de huesos largos, se realizaron una serie de cortes histológicos de los fémures y tibias aislados de los animales de los cuatro grupos experimentales, es decir, de ratas no diabéticas con y sin tratamiento con alendronato, y ratas diabéticas también tratadas o no con alendronato. Sobre esos cortes histológicos se realizaron distintas tinciones con el fin de poder evaluar una serie de parámetros de la arquitectura ósea, como el Área trabecular, el número de osteocitos, el área TRAP, la altura de la placa de crecimiento y la densidad de adipocitos en la médula ósea.

Área trabecular: como se puede apreciar en la Figura 7, se encontró una disminución significativa de este parámetro en el grupo de ratas diabéticas. El tratamiento oral con alendronato previno esta alteración, inclusive se observó un aumento significativamente mayor en el grupo diabético tratado respecto a ambos grupos con animales no diabéticos.

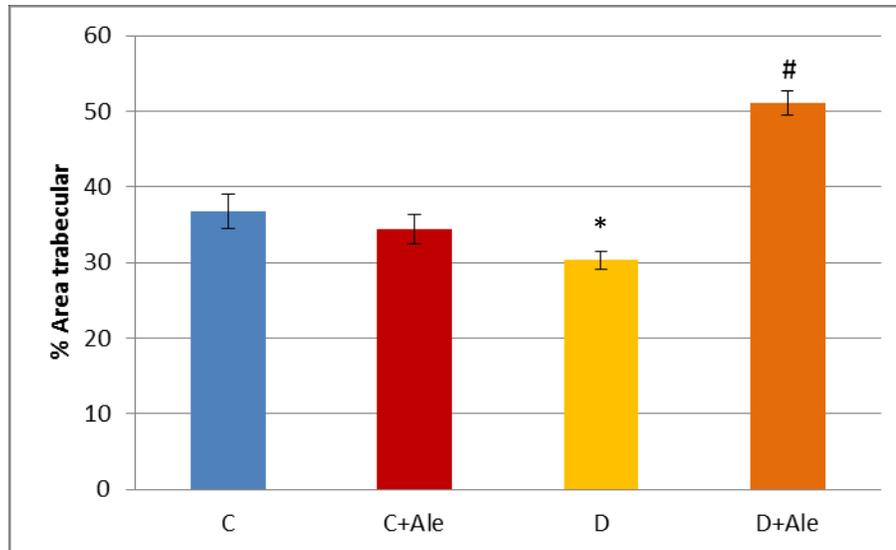


Figura 7. Efecto del tratamiento oral con alendronato sobre el área trabecular. Se analizaron histomorfométricamente cortes histológicos de las metafisis proximales de fémures y tibias de los 4 grupos experimentales, teñidos con hematoxilina-eosina. Se determinó el área trabecular/área total en la esponjosa secundaria, a 250 μ m de la placa de crecimiento. Resultados expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,001$ vs D.

Número de osteocitos: este parámetro se analizó en cortes teñidos con hematoxilina-eosina (usando un objetivo de 40X), delimitando el área de una trabécula y cuantificando la densidad de osteocitos en cada una. Lo que se pudo observar fue una disminución significativa del número de osteocitos en el grupo diabético respecto al control no tratado; en tanto que en los grupos tratados con alendronato este parámetro se mantuvo similar al control. En tanto, en el grupo diabético tratado con alendronato se demuestra un aumento de la densidad osteocítica respecto al grupo diabético, sugiriendo una prevención de los efectos de la diabetes en dicho parámetro, como se observa en la Figura 8.

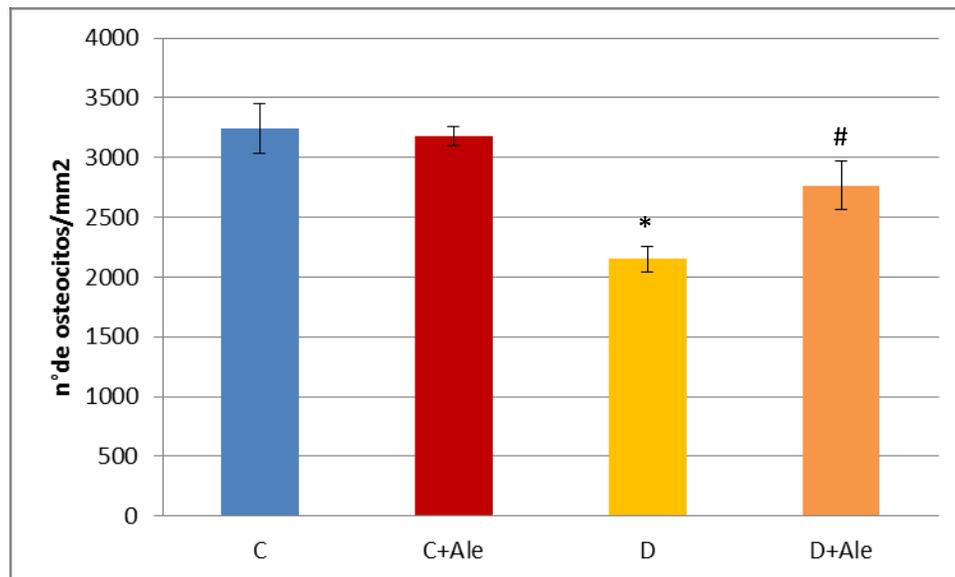


Figura 8. Efecto del tratamiento oral con alendronato sobre la densidad osteocítica en un modelo de diabetes. Se analizaron cortes histológicos de las metáfisis proximales de fémures y tibias de los 4 grupos experimentales, teñidos con hematoxilina-eosina. Se determinó el número de osteocitos/área trabecular en la esponjosa secundaria. Resultados expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs C; # $p < 0,05$ vs D.



Densidad adipocítica: en cortes teñidos con hematoxilina-eosina, utilizando el objetivo de 10X, se delimitó un área de médula ósea de la diáfisis de fémures y/o tibias de los animales de los cuatro

grupos experimentales, y se determinó el número de adipocitos presentes en la misma. Se evidenció un aumento muy significativo de este parámetro en el grupo diabético respecto al grupo control, en tanto que el grupo diabético tratado con alendronato exhibió una prevención parcial de este efecto. Los grupos control y control con alendronato no mostraron diferencias entre sí (Figura 9).

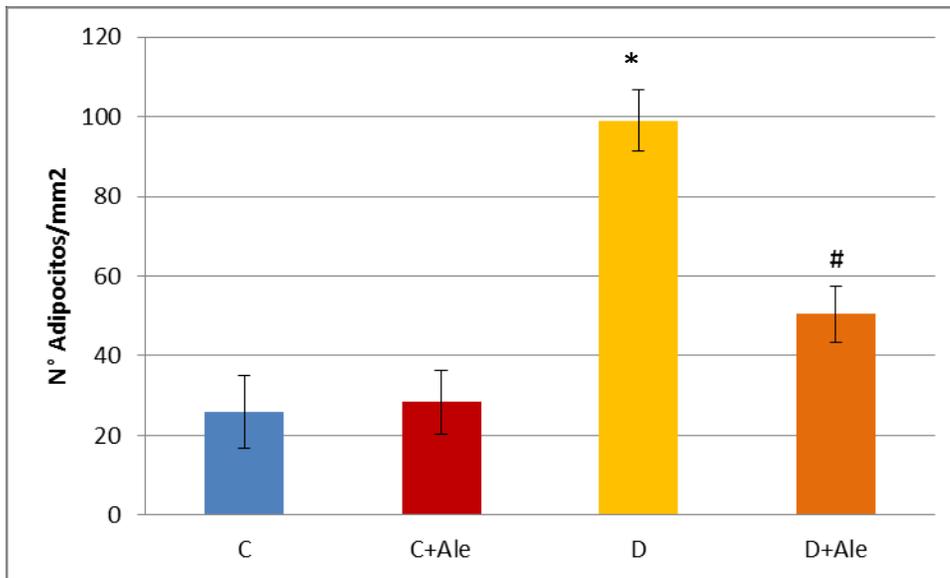


Figura 9. Efecto del tratamiento oral con Alendronato sobre la densidad adipocítica de la médula ósea en un modelo de diabetes. En la diáfisis de huesos largos se determinó el número de adipocitos por unidad de área de médula ósea, en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Resultados expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs C; # $p < 0,01$ vs D.

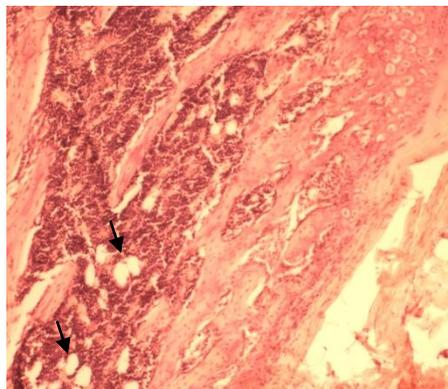


Figura 9a. Imagen de adipocitos en la médula ósea, en un preparado teñido con hematoxilina-eosina. Objetivo 10X.

Área TRAP: este parámetro, asociado a actividad osteoclástica, se determinó en la esponjosa primaria de cortes de metáfisis de huesos largos, es decir, por debajo de la placa de crecimiento. Los resultados obtenidos, como se ven en la Figura 10, demuestran una disminución en el área TRAP positiva en el grupo diabético respecto al control, en tanto que el tratamiento con alendronato, como era de esperar, exhibió una disminución muy marcada de esta actividad enzimática tanto en animales diabéticos como no diabéticos.

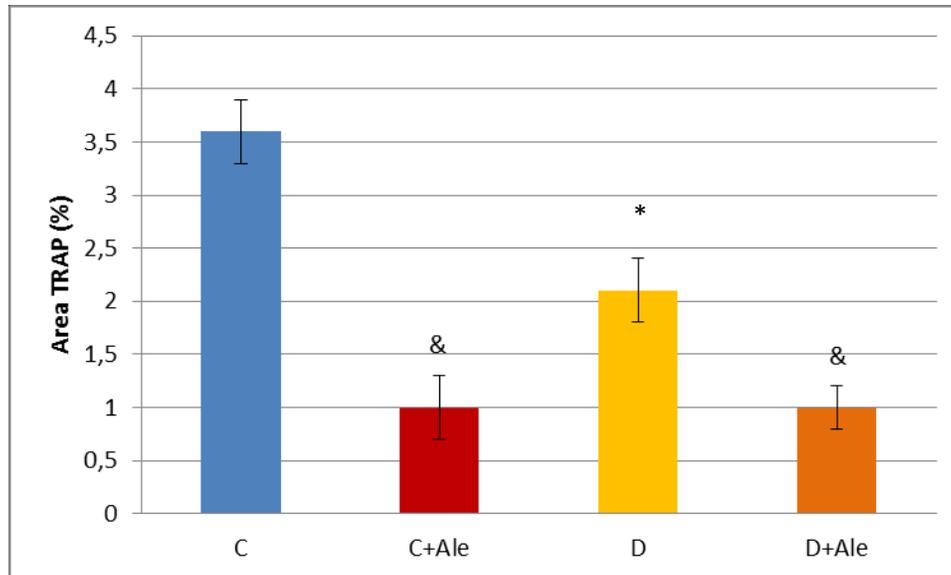


Figura 10. Efecto de la diabetes y el tratamiento oral con alendronato sobre la actividad TRAP. Se analizaron cortes histológicos de las metáfisis proximales de fémures y tibias de los 4 grupos experimentales, mediante la tinción de TRAP. Se determinó el área TRAP positiva/área total en la esponjosa primaria. Resultados expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,01$ vs C; & $p < 0,001$ vs C.

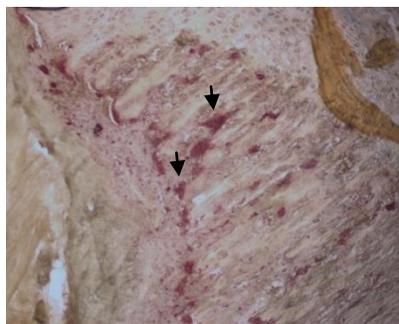


Figura 10a. Preparados sometidos a la reacción histoquímica de TRAP. Con flechas se señalan las áreas TRAP en tono púrpura. Obj. 4X.

Altura de la placa de crecimiento: en cortes histológicos de huesos provenientes de animales de las cuatro condiciones experimentales se realizó la tinción de Azul Alcian para evidenciar la placa de crecimiento cartilaginosa. Se determinó la altura de dicha placa en μm , observando que el grupo control mostraba una altura de placa significativamente mayor que los otros tres grupos experimentales (Figura 11).

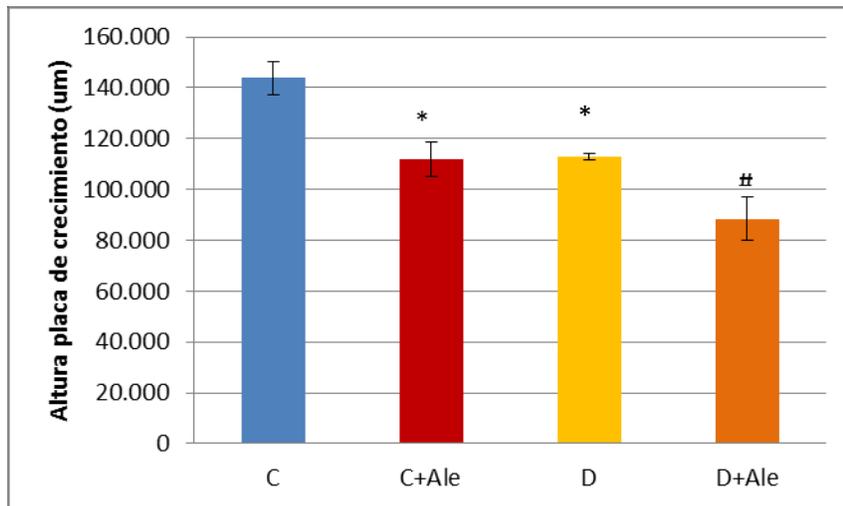


Figura 11. Efecto del tratamiento oral con alendronato sobre la placa de crecimiento en un modelo de diabetes. Se analizaron cortes histológicos teñidos con Azul Alcian de los cuatro grupos en estudio y se determinó la altura de la placa de crecimiento. Se determinó la altura en μm . Resultados expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,001$ vs C.

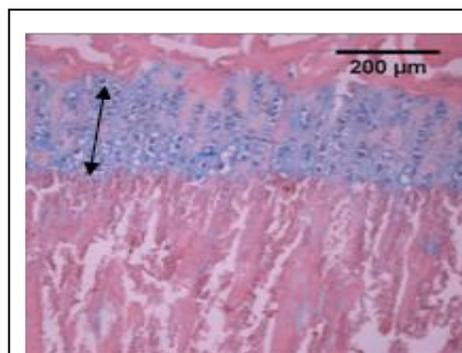


Figura 11a. Placa de crecimiento cartilaginosa en la metáfisis distal de un hueso largo (línea con flechas). Objetivo 10X.

IV.2.3 Estudios ex vivo

Una vez que se sacrificaron los animales de los distintos grupos experimentales, se extrajeron las CPMO como se describió previamente en Materiales y métodos, para analizar si la capacidad de diferenciación de dichas células se ve afectada por el desarrollo de la diabetes, así como también el efecto del tratamiento oral con alendronato sobre dicha diferenciación y los mecanismos involucrados.

IV.2.3.1. Efectos sobre la diferenciación osteoblástica

Las células aisladas de los cuatro grupos experimentales fueron cultivadas hasta confluencia, a partir de lo cual se plaquearon en platos de cultivo para inducir la diferenciación osteoblástica. Luego de 15 días de incubación en medio osteogénico, se determinaron los valores de colágeno tipo I y actividad de FAL, observándose una disminución significativa de dichos parámetros en el grupo D, mientras que en el grupo D+Ale se observó una recuperación de dichos valores (Figura 12 A y B). Luego de 21 días de diferenciación osteoblástica, se observó un patrón similar en la mineralización de la matriz: una disminución en la producción de nódulos de mineral en el grupo D y una prevención parcial del efecto en el caso del grupo diabético tratado con alendronato (Figura 12C). Estos resultados concuerdan con lo observado en los ensayos *in vitro*, es decir, una prevención de los efectos observados en la producción de colágeno, la actividad de FAL y la producción de nódulos de mineralización extracelulares por el tratamiento con alendronato en células incubadas con AGE-BSA provenientes de ratas controles (Figura 1 A, B y C).

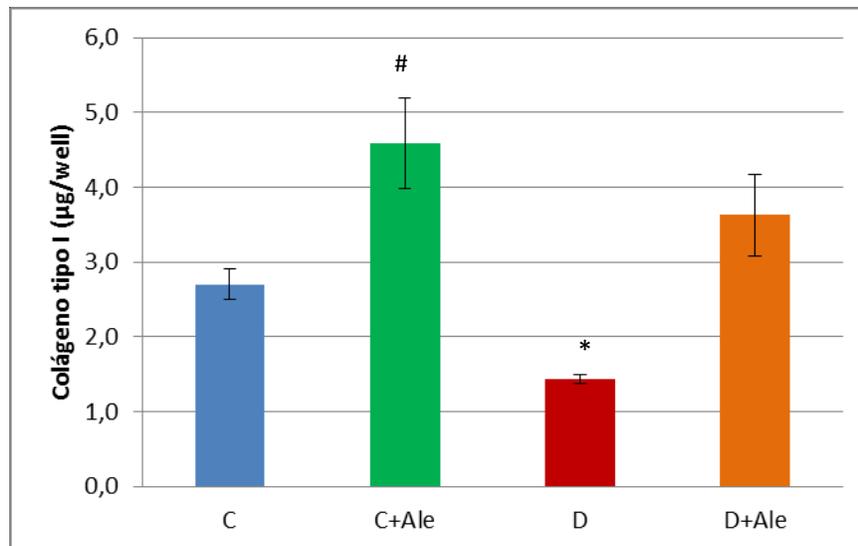


Figura 12A. Producción de Colágeno tipo I. CPMO aisladas de animales diabéticos y no diabéticos, tratados y no tratados con alendronato fueron incubadas 15 días en medio osteogénico. La producción de colágeno se determinó colorimétricamente mediante la tinción de Sirius Red. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,001$ vs C.

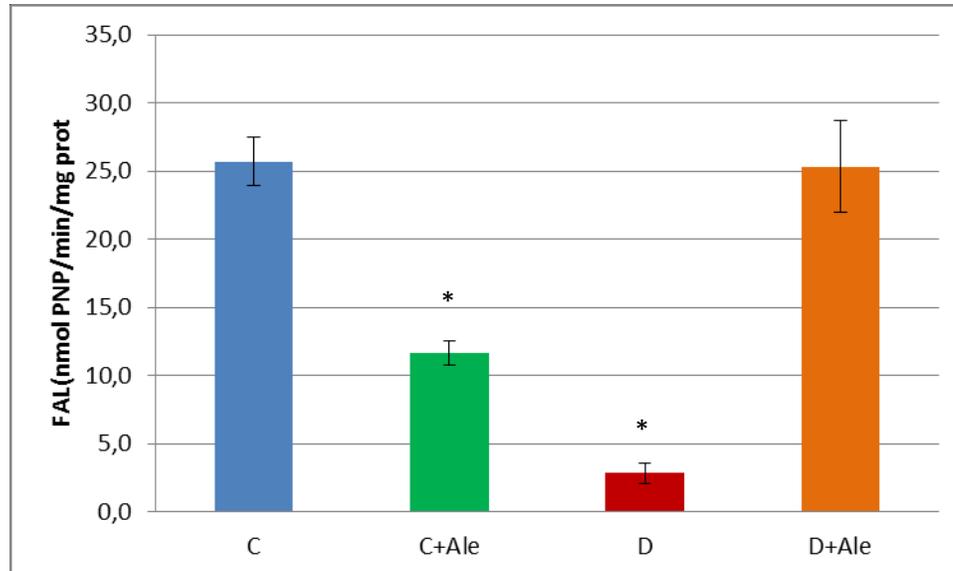


Figura 12B. Actividad específica de Fosfatasa Alcalina. Las CPMO provenientes de los cuatro grupos experimentales se diferenciaron 15 días en medio osteogénico. La actividad de FAL se determinó mediante un método cinético colorimétrico. Los resultados se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs C.

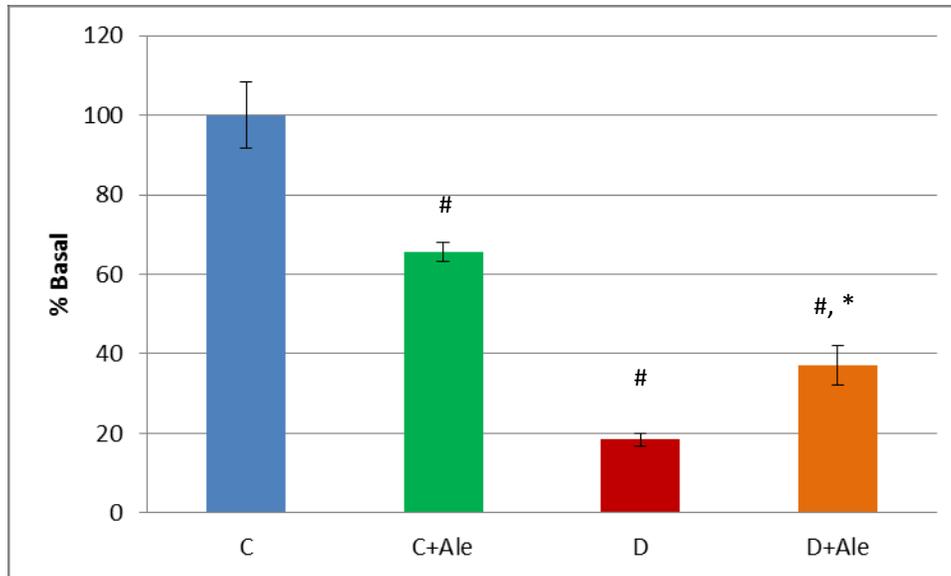


Figura 12C. Depósito de nódulos de mineralización extracelulares. Las CPMO provenientes de los cuatro grupos experimentales se diferenciaron 21 días en medio osteogénico. Los nódulos de mineral extracelulares se evaluaron mediante la tinción de Rojo de Alizarina, a una DO de 548nm. Los resultados se expresaron como % del basal \pm SEM. # $p < 0,001$ vs C; * $p < 0,05$ vs D.

IV.2.3.2. Efectos sobre la diferenciación adipocítica

Las células provenientes de las cuatro condiciones experimentales fueron plaqueadas a baja confluencia para realizar los ensayos de diferenciación adipocítica. Luego de 7 a 10 días de incubación de las CPMO en medio adipogénico, se evaluó los niveles de triglicéridos contenidos en gotas lipídicas intracelulares mediante un kit comercial, como también se evaluó la actividad enzimática de lipasa como segundo marcador de este linaje, con un kit comercial. Como se puede observar en las Figura 13 A y B, la producción de lípidos intracelulares fue significativamente mayor en células provenientes de ratas diabéticas respecto al control, observándose el mismo patrón en la actividad de lipasa. En ambos casos se observa que en células de ratas diabéticas tratadas con alendronato los niveles de triglicéridos y lipasa no presentaron diferencias significativas respecto al control, pudiendo sugerir que el tratamiento con el bisfosfonato previno los efectos pro-adipogénicos de la Diabetes sobre las CPMO.

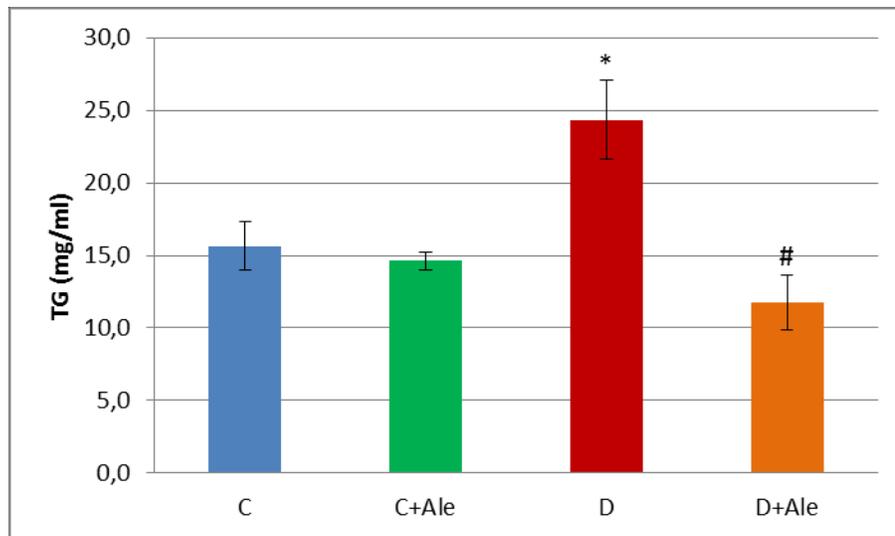


Figura 13A. Diferenciación adipocítica. Las CPMO de ratas de las 4 condiciones experimentales fueron diferenciadas por 10 días en medio adipogénico. Se determinó el contenido de triglicéridos intracelulares mediante un kit comercial. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,01$ vs. D.

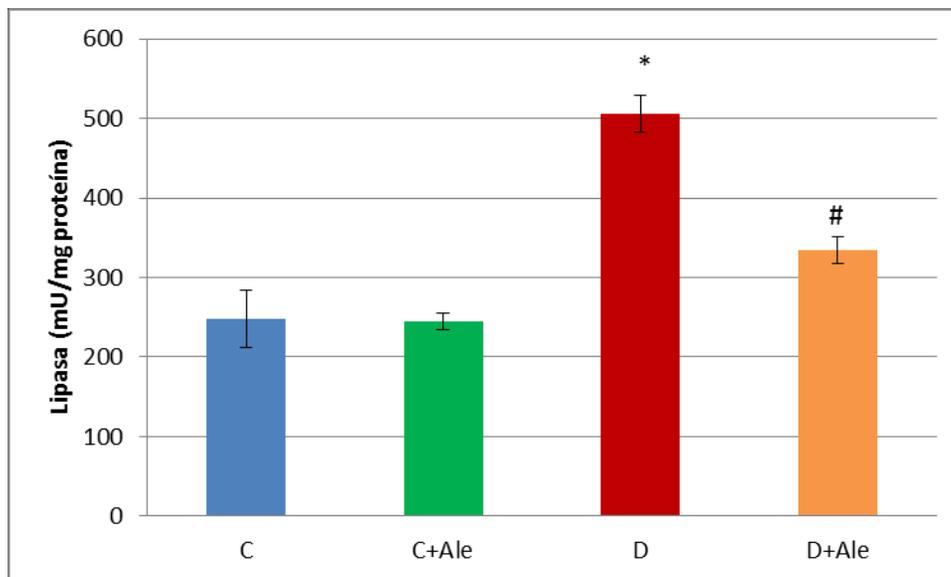


Figura 13B. Diferenciación adipocítica. Las CPMO de ratas de las 4 condiciones experimentales fueron diferenciadas por 10 días en medio adipogénico. Se determinó la actividad enzimática de lipasa mediante un kit comercial. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs. C; # $p < 0,001$ vs. D.

IV.2.3.3. Efectos sobre la diferenciación condrocítica

El potencial de diferenciación hacia el linaje condrogénico se evaluó mediante la incubación de CPMO aisladas de las ratas C, A, D y DA, y su diferenciación hacia dicho fenotipo, como se describió en Materiales y métodos. Luego de 21 días de diferenciación en medio suplementado con TGF- β e ITS, las células fueron fijadas y teñidas con Azul Alcían, determinando colorimétricamente la producción de glucosaminoglicanos (GAGs) a una DO de 600nm. Como puede observarse en la Figura 14, en la condición diabética se produce una disminución en la generación de GAGs respecto a las células provenientes de ratas C, y una prevención de dicho efecto en los cultivos de CPMO de ratas DA, registrándose valores similares al de las células control.

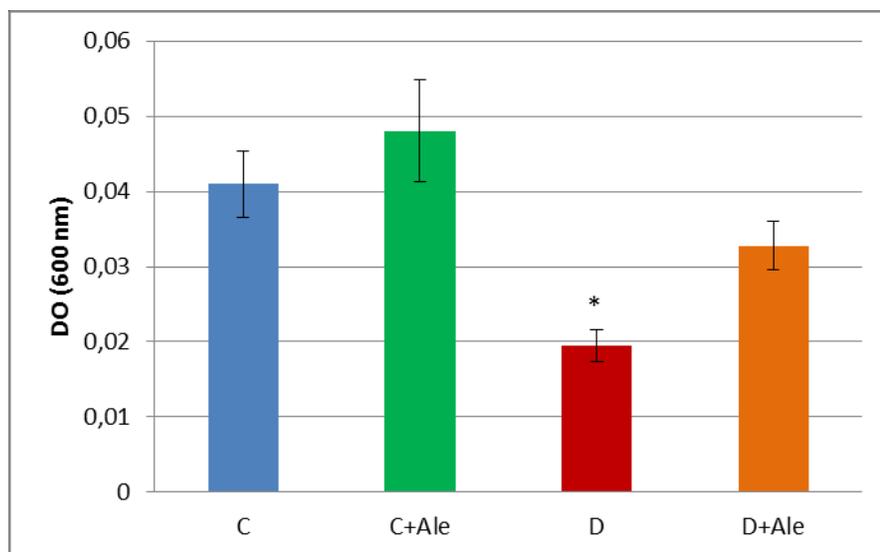
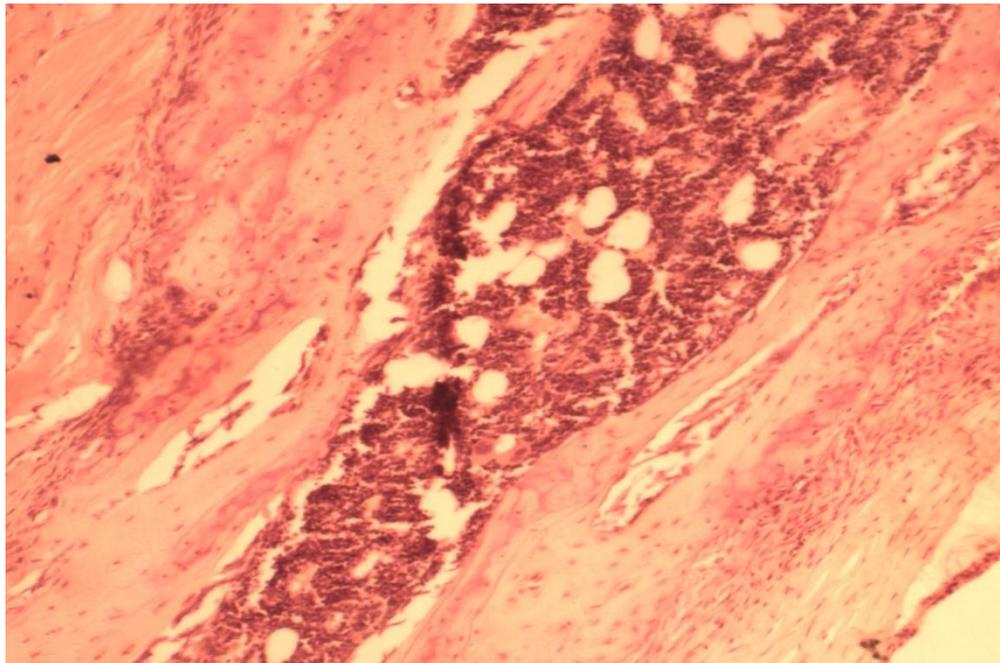


Figura 14. Diferenciación condrocítica. Las CPMO aisladas de los 4 grupos experimentales fueron diferenciadas por 21 días en medio condrogénico. Se determinó el contenido de GAGs intracelulares colorimétricamente, a 600 nm mediante la técnica de Azul Alcían. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. C.



CAPITULO V

Discusión y Conclusiones

V.1. Discusión y Conclusiones

El hueso es un tejido conectivo especializado, muy dinámico, ya que se encuentra constantemente sujeto al proceso de remodelamiento óseo, respondiendo a necesidades mecánicas y metabólicas. De esta manera se va adaptando a las necesidades del organismo según los estímulos que recibe. Durante la adultez temprana, la maquinaria celular mantiene la composición del material óseo y su microestructura reemplazando un volumen de hueso envejecido o dañado por uno igual de hueso nuevo, sin ocurrir pérdida ósea permanente ni deterioro de la estructura. Con el avance de la edad, y en la mujer especialmente después de la menopausia, el remodelado se desbalancea y se acelera, habiendo grandes cantidades de unidades de remodelado, cada una con un depósito menor de hueso que el removido que generan deterioro estructural. En esta situación, el remodelado sobre la superficie trabecular afina y desconecta las trabéculas. Por otro lado, el remodelado en la superficie endocortical afina la corteza mientras, que el intracortical, con la gran cantidad de sistemas de Havers que hay, los agranda focalmente, aumentando la porosidad [Zebaze, 2014]. Este remodelado se da por acoplamiento de la actividad de osteoclastos y de osteoblastos, un proceso que se regula por distintos factores, entre los que se pueden nombrar factores genéticos, hormonales, nutricionales y mecánicos [Datta, 2008].

Esta condición de disociación de los procesos de formación y resorción ósea, puede llevar a situaciones que abarcan desde osteopetrosis hasta osteoporosis, esta última una enfermedad metabólica muy frecuente del hueso. El acoplamiento entre la formación y resorción ósea, que están estrechamente regulados en el recambio óseo adulto, se puede disociar fisiológicamente, como en el crecimiento esquelético (ganancia ósea neta) donde predomina la formación ósea; o en procesos patológicos, como en la diabetes, la enfermedad de Paget o por tratamiento con ciertos fármacos como los glucocorticoides.

Los productos de glicación avanzada (AGEs) se forman mediante la glicosilación no enzimática de proteínas principalmente, pero también afecta a lípidos y ácidos nucleicos. Estos compuestos se acumulan con la edad inevitablemente, y están aumentados en ciertas patologías como la diabetes mellitus o el síndrome metabólico. Se ha descrito que los AGEs están involucrados en el desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas de la diabetes [Ulrich y Cerami, 2001; Brownlee, 2005], como las micro y macroangiopatías.

Reciente evidencia clínica y experimental señala una asociación entre la diabetes mellitus y anormalidades óseas que incluyen osteopenia, osteoporosis y/o un índice aumentado de padecer fracturas de bajo estrés [Wongdee & Charoenphandhu, 2011]. Esta condición ósea inducida por la diabetes se denomina también *osteopatía diabética*, y se cree que se debe, en gran parte, a la acumulación de AGEs en la matriz. Los AGEs forman entrecruzamientos irreversibles con moléculas de colágeno, alterando las propiedades mecánicas del hueso. Nuestro grupo ha demostrado que modificaciones del colágeno de la matriz por AGEs puede regular la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas [McCarthy, 2001; McCarthy, 1997]. Los AGEs disminuyen la funcionalidad de osteoblastos y osteoclastos mediante su reconocimiento por el receptor RAGE, con la potencial capacidad de inducir una disminución del recambio óseo, lo que aumenta aún más la acumulación de AGEs [McCarthy, 2013; Yamagishi, 2011]. El efecto de AGEs en las CPMO también ha sido demostrado: un exceso de estos productos (o de los productos de oxidación avanzada de proteínas, íntimamente relacionados) pueden aumentar la apoptosis y disminuir la migración, proliferación y diferenciación osteogénica de CPMO, mientras que inducen un aumento del potencial adipogénico [Kume, 2005; Yang, 2010; Sun, 2014; Weinberg, 2014]. Nuestro grupo, como también otros investigadores, ha encontrado que las CPMO aisladas de ratas diabéticas muestran un aumento de su potencial adipogénico y una disminución en su capacidad de formar hueso, lo que se correlaciona con las alteraciones observadas por histomorfometría de huesos largos y análisis por pQCT [Stolzing, 2010; Tolosa, 2013]. Los resultados del presente trabajo de tesis son compatibles con lo comentado previamente: los AGEs, en dosis similares a las halladas en piel o proteínas séricas de pacientes diabéticos [Genuth, 2015], disminuyen *in vitro* la diferenciación osteogénica y condrogénica y favorecen el compromiso adipocítico de CPMO obtenidas de ratas no diabéticas.

Para impedir la pérdida de masa ósea, los agentes anti-resortivos deben prevenir la osteoclastogénesis o acceder a sitios de remodelamiento existentes y reducir la actividad resortiva o la longevidad de osteoclastos ya formados y que están resorbiendo hueso. Las trabéculas son placas finas en íntimo contacto con espacios vasculares. Estas placas tienen grandes áreas de superficie lo que permite la adsorción de bisfosfonatos dentro de la matriz ósea trabecular, por lo que los bisfosfonatos estarán en altas concentraciones. Así, cuando los osteoclastos degradan e ingieren la matriz, también ingerirán al bisfosfonato presente [Zebaze, 2014].

El alendronato es el agente más ampliamente utilizado en el tratamiento de osteoporosis postmenopáusicas. Es un N-BP con alta afinidad por la matriz ósea y ejerce sus efectos anti-resortivos principalmente mediante su acción inhibitoria sobre osteoclastos, disminuyendo la actividad de la farnesil pirofosfato sintetasa y la disponibilidad de grupos geranylgeranilo. Mediante este mecanismo reduce la densidad de fibras de estrés osteoclasticas y la adhesión focal conduciendo a la disrupción del citoesqueleto de actina [Kazmers, 2009; Gangoiti, 2013]. Se ha demostrado que dosis bajas de alendronato estimulan la función de osteoblastos *in vitro* [Tsuchimoto, 1994; Gangoiti, 2008], y que modulan la inducción fenotípica de CPMO incrementando el potencial osteogénico y disminuyendo el adipogénico [Duque & Rivas, 2007; Kim, 2009; Ribeiro, 2014; Chang, 2014]. En este trabajo presentamos resultados en concordancia y que contribuyen a ampliar estudios previos: el alendronato (en dosis que han sido reportadas en suero y la laguna de resorción de pacientes tratados con este BP) [Rogers, 2000; Im, 2004; Giuliani, 1998] aumenta el compromiso de CPMO hacia el fenotipo osteoblástico y condrocítico y disminuye su diferenciación adipocítica. Las dosis de alendronato elegidas en el tratamiento *in vitro* de la CPMO se eligieron en base a estudios previos de nuestro grupo, donde se puso en evidencia el efecto dual del alendronato: a dosis altas (10^{-4} - 10^{-6} M) resultaba tóxico para células osteoblásticas en tanto que dosis bajas (10^{-7} - 10^{-9} M) tenía efectos beneficiosos. En este trabajo de tesis se utilizaron dosis bajas, 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} M de alendronato para estudiar el efecto directo del mismo sobre las CPMO, en concordancia con otros autores [Im, 2003; Giuliani, 1998; Fomigué-Body, 2002; Boanini, 2008; Plotkin, 1999], quienes observaron efectos beneficiosos de los bisfosfonatos sobre la diferenciación osteoblástica en concentraciones similares, entre 10^{-9} y 10^{-6} M, con un pico a 10^{-8} M. Más aún, Plotkin y colaboradores determinaron que los efectos antiapoptóticos de los bisfosfonatos se producían a concentraciones tres órdenes de magnitud menores que los necesarios para producir la apoptosis de osteoclastos [Plotkin, 1999].

Esta aceptado que el tratamiento con alendronato aumenta la DMO y disminuye el índice de fracturas, sin embargo, también reduce el remodelamiento óseo, el cual puede acumular microdaños, afectando en forma adversa las capacidades de disipación de la energía y la resistencia ósea en general [Tang, 2009]. Es de esperar un aumento en la acumulación de AGEs debido a una reducción en el remodelado, lo cual fue analizado por otros investigadores en perros no diabéticos tratados por un año con diferentes dosis de alendronato. Se encontró un incremento en la fragilidad ósea y en la acumulación de AGEs en la matriz a altas dosis de alendronato, pero no a dosis equivalentes a las usadas para el tratamiento de la osteoporosis

post-menopáusica [Tang, 2009]. La diabetes *per se* es capaz de disminuir el recambio óseo, por lo que la opción de tratar la osteopatía diabética con alendronato debe analizarse cuidadosamente para determinar su pertinencia y eficacia. En estudios *in vitro* previos, hemos demostrado que mientras el alendronato puede prevenir los efectos anti-osteogénicos y pro-apoptóticos de los AGEs en osteoblastos [Gangoiti, 2008], AGEs y alendronato se potencian entre sí para inhibir el reclutamiento y actividad osteoclástica [Gangoiti, 2013]. Dos estudios clínicos apoyan el uso de alendronato en pacientes diabéticos: por un lado, un tratamiento por 3 años con alendronato se asoció con aumento de DMO en mujeres mayores con diabetes de tipo 2 [Keegan, 2004], mientras que el tratamiento durante 5 años inhibió la disminución de la DMO en el radio inducida por diabetes [Ikeda & Iwata, 2011]. Por otro lado, otros investigadores han advertido que mujeres post-menopáusicas con diabetes mellitus tipo 2 pueden ser resistentes a un tratamiento a largo plazo con alendronato [Dagdelen, 2007].

En vista de esta controversia, propusimos la hipótesis de este trabajo: que los cambios en el compromiso fenotípico de CPMO inducidos por AGEs acumulados en la matriz ósea diabética pueden ser prevenidos por la presencia de dosis terapéuticas de alendronato en el microambiente de la médula ósea. Nuestros resultados sostienen esta hipótesis: las CPMO diferenciadas a osteoblastos en presencia de AGEs mostraron una disminución en la secreción de colágeno tipo I, actividad de FAL y la deposición de nódulos de mineral extracelulares, mientras que la coincubación con alendronato previno completamente dicho efecto. Al inducir las CPMO a la diferenciación condrogénica, hallamos resultados similares, la incubación con AGEs provocó una disminución de su compromiso hacia dicho fenotipo, evaluada a través de la producción de GAG y la coincubación con alendronato previno los efectos inducidos por AGEs. Finalmente, cuando se indujo la diferenciación adipocítica de estas células, encontramos que los AGEs aumentan la acumulación intracelular de gotas de triglicéridos y la actividad de lipasa, un efecto que fue inhibido por la presencia de alendronato.

En experimentos subsiguientes, investigamos la expresión por Western blot de factores de transcripción específicos de linaje celular en CPMO en cultivo con AGEs y/o alendronato. En coincidencia con los parámetros fenotípicos que determinamos para osteoblastos y adipocitos, los AGEs aumentan la expresión de PPAR γ y disminuyen la expresión de Runx2. Lo que es importante, es que todos estos efectos fueron completamente prevenidos por coincubación de AGEs con alendronato. Estos resultados concuerdan con los publicados por Fu *et al* donde demostraron que

el alendronato es capaz de potenciar la proliferación y diferenciación osteoblástica de las CPMO y es capaz de inhibir la diferenciación adipogénica, mediante la activación de ERK y JNK de manera rápida y transitoria [Fu, 2008].

Los radicales libres son moléculas muy reactivas ya que tienen 1 o más electrones desapareados en sus orbitales atómicos o moleculares. Su efecto nocivo en los sistemas biológicos se conoce como estrés oxidativo o nitrosativo (por especies reactivas de oxígeno o nitrógeno), cuando hay un exceso en la producción de ROS o RNS y una deficiencia en los sistemas anti-oxidantes enzimáticos y no enzimáticos [Valko, 2007]. En resumidas palabras, el estrés oxidativo es el producto del desequilibrio de reacciones prooxidantes-antioxidantes en organismos vivos, durante procesos metabólicos que utilizan oxígeno. El exceso de ROS altera distintas moléculas, como DNA, proteínas, lípidos, lo que inhibe su funcionamiento normal. Como antioxidantes endógenos podemos identificar al *glutación* y distintas enzimas encargadas de la detoxificación de compuestos (catalasa, superóxido dismutasa, tioredoxina, etc) pero también hay sustancias exógenas (vitamina C, vitamina E por ejemplo) que al adicionarlas al medio pueden prevenir o revertir los efectos oxidativos de estructuras como los AGEs. Como antioxidante exógeno, utilizamos vitamina E (α -tocoferol), el antioxidante liposoluble más importante en sistemas biológicos. Es capaz de inhibir la peroxidación lipídica, evitando los daños en la membrana y la modificación de lipoproteínas de baja densidad al interactuar con radicales peroxilo con mayor velocidad que éstos con los lípidos y proteínas de la membrana plasmática [Stahl y Sies, 1997].

Se sabe que la producción intracelular de ROS interviene en varias acciones dependientes de la unión de los AGEs a su receptor RAGE. Se ha descrito que su aumento genera estrés oxidativo en diferentes tipos celulares, como hepatocitos [Guimaraes, 2010], células endoteliales [Zhang, 2006], adipocitos [Unno, 2004] y osteoblastos [McCarthy, 2001]. Los radicales libres pueden formarse extracelularmente, por reacción de AGEs acumulados sobre proteínas extracelulares de vida media larga como el colágeno, o intracelularmente generados por AGEs como vía de señalización de RAGE luego de su interacción con AGEs extracelulares [Negre-Salvayre, 2009].

Con el fin de definir mecanismos moleculares que podrían estar operando para AGEs y BP en CPMO, evaluamos la producción intracelular de ROS y encontramos que tanto la vitamina E como el alendronato pueden evitar el aumento inducido por AGEs de los ROS intracelulares. Estos resultados concuerdan con nuestros estudios previos con osteoblastos [Gangoiti, 2008] y con

reportes de otros autores que utilizaban células endoteliales de vena umbilical humana [Okamoto, 2002; Yamagishi, 2005]. En esos estudios se encontró que los BP pueden suprimir la generación de ROS intracelulares derivados de la NADPH oxidasa, mediante la inhibición de la geranigeranilación de Rac. El aumento de ROS induce un estado intracelular pro-oxidativo, conduciendo a un incremento en los productos de oxidación avanzada de proteínas, oxidación lipídica además de activar vías de señalización específicas, como MAPK que luego induce la translocación nuclear de NF- κ B, el cuál estimula la transcripción de varios genes blanco como VCAM-1, E-selectina y citoquinas pro-inflamatorias [Chawla, 2014; Yamagishi, 2011].

Una vez analizados los resultados *in vitro* y continuando con los objetivos de este trabajo de tesis, se estudiaron los efectos del alendronato *in vivo*. Utilizamos un modelo murino ya caracterizado de diabetes leve con déficit parcial de insulina, en el que se induce la patología por inyecciones sucesivas de nicotinamida y estreptozotocina (la segunda droga provoca un daño selectivo en las células beta pancreáticas, mientras que la primera previene este daño en forma dosis-dependiente) [Tahara, 2008; Szkudelski, 2012]. En nuestro laboratorio hemos corroborado este modelo de diabetes con déficit parcial de insulina mediante la determinación de varios parámetros sanguíneos, entre los que se halló una reducción en los niveles de insulinemia respecto a los animales controles y un metabolismo alterado que se refleja por los niveles de glucosa y lípidos en sangre. Animales no diabéticos y diabéticos fueron tratados con alendronato por vía oral (en dosis asimilables a las terapéuticas) [Chen, 2011; Kang, 2010] para evaluar el efecto directo del mismo en el contexto de la patología diabética. Este trabajo de tesis es único en cuanto al tratamiento de alendronato en animales diabéticos. En los estudios histomorfométricos de huesos largos, encontramos que los diferentes tratamientos influyeron en la microarquitectura ósea. Así, observamos una disminución en el área trabecular en los cortes de huesos provenientes de ratas diabéticas, en tanto que la misma se encontró aumentada en cortes de huesos de ratas diabéticas tratadas con alendronato. Este efecto puede explicarse por la estimulación en la proliferación y diferenciación de osteoblastos descrita en este trabajo como también en trabajos previos de nuestro grupo [Gangoiti, 2008; Gangoiti, 2013]. En ratas diabéticas, la disminución del área trabecular se vio acompañada por un descenso del número de osteocitos en los huesos largos. Este efecto debido a la patología diabética fue prevenido en el grupo de animales diabéticos tratado con alendronato, reforzando la hipótesis de que este bisfosfonato estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos. Adicionalmente, las ratas no diabéticas tratadas con alendronato

también mostraron un aumento en la densidad de osteocitos, lo que se correlaciona con los resultados *in vitro* donde los osteoblastos son estimulados por alendronato.

En el grupo de animales diabéticos se detectó un aumento en la adiposidad de la médula ósea. Este efecto pro-adipocítico de la diabetes fue prevenido en el grupo diabético tratado con alendronato, donde se halló una densidad adipocítica similar a la del grupo control. Estos resultados concuerdan con los estudios *in vitro* en los cuales observamos un aumento en la diferenciación adipocítica en CPMO tratadas con AGEs y una prevención de ese efecto por co-incubación con alendronato. El área TRAP, parámetro asociado a la actividad osteoclástica positiva, también fue analizada en los cortes de huesos largos. En este caso, se halló una disminución en los preparados de huesos de ratas diabéticas en concordancia con lo que hemos publicado previamente [Tolosa, 2013] y como era esperable, hubo una disminución de la actividad TRAP en los huesos de ratas tratadas con alendronato, tanto diabéticas como no diabéticas. Las alteraciones sobre la microarquitectura ósea debida a la diabetes fueron demostradas previamente en nuestro laboratorio [Tolosa, 2013; Sbaraglini, 2014; Molinuevo, 2010], corroborando en este trabajo de tesis que esta patología produce una disminución del área trabecular junto con el número de osteocitos y un aumento de la adiposidad en la médula ósea, que pudieron ser prevenidos por el tratamiento oral con alendronato. Podemos asociar estos resultados con la calidad ósea del hueso diabético, el cuál presenta una mayor fragilidad y rigidez y una menor fortaleza, que si bien no lo hemos determinado en este trabajo, sí ha sido descrito por otros autores. Esto contribuye al riesgo aumentado de fracturas de bajo impacto en pacientes diabéticos, además de otros factores de riesgo.

Otro de los parámetros estudiados por histomorfometría es la altura de la placa de crecimiento por tinción con Azul Alcían. La placa epifisaria está constituida principalmente por cartílago hialino, y es un componente crucial para el crecimiento longitudinal del hueso. Su altura depende de procesos complejos y antagónicos: por un lado, crece en dirección desde la epífisis a la metáfisis toda vez que haya un incremento de la proliferación e hipertrofia de condrocitos; y por otro lado, disminuye por un aumento de la actividad osteoclástica en la esponjosa primaria, donde hay invasión vascular y reemplazo de cartílago calcificado por hueso nuevo. En nuestro diseño experimental encontramos una disminución significativa de la altura de la placa de crecimiento tanto en el grupo diabético como en los grupos tratados con alendronato. Por lo tanto, en nuestros resultados la combinación de una reducción de la actividad TRAP en la esponjosa primaria y de la altura de la placa epifisaria son compatibles con una disminución en el crecimiento

longitudinal del hueso [Tolosa, 2013; Sbaraglini, 2014]. El alendronato, por su parte, además de inhibir la resorción ósea, inhibe la resorción de la matriz condrocítica, por lo que inhibiría la invasión vascular y la consecuente formación de hueso nuevo [Kang, 2010]. Este proceso es evidente en animales en crecimiento. Si se pudiera extrapolar a la práctica clínica, la situación en que se prescribe alendronato es diferente, ya que los pacientes son adultos donde las placas epifisarias ya están cerradas, salvo excepciones muy puntuales en los que se administra esta droga a pacientes pediátricos (como ser, en osteogénesis imperfecta). Por lo tanto, el posible efecto del alendronato sobre la placa de crecimiento no debería ser un tema de discusión en la práctica clínica, en vista de la edad de los pacientes osteoporóticos o que presenten osteopatía diabética.

Las CPMO aisladas de ratas diabéticas (estudios *ex vivo*) mostraron una disminución en los parámetros de diferenciación osteoblástica, es decir producción de colágeno tipo I, actividad de FAL y deposición de nódulos de mineralización extracelulares, efectos que fueron prevenidos por el tratamiento oral con alendronato de los animales diabéticos. Al analizar los efectos en la inducción adipocítica, se obtuvieron resultados comparables a los observados *in vitro*, un aumento en la acumulación de triglicéridos intracelulares y en la actividad enzimática de lipasa en el caso de CPMO de ratas diabéticas, en tanto que en células provenientes de ratas diabéticas tratadas con alendronato se observó una prevención de los efectos de la patología. En nuestro grupo hemos descrito previamente los efectos anti-osteogénicos y pro-adipocíticos de la diabetes sobre las CPMO [Tolosa, 2013]. La diferenciación condrogénica mostró el mismo patrón que en los estudios *in vitro*, la producción de GAGs se vio disminuida en células provenientes de ratas diabéticas, y el tratamiento oral con alendronato previno dicha reducción. Todos estos resultados concuerdan con los hallados en los estudios *in vitro*.

Si bien los resultados del presente trabajo de tesis no pueden extrapolarse directamente al humano, aporta información sobre lo que sucede en el hueso por efecto de la diabetes y el tratamiento con bisfosfonatos, en nuestro caso el alendronato. Existen numerosos estudios poblacionales referidos a la osteoporosis postmenopáusica y el tratamiento con alendronato como también sobre la diabetes y sus tratamientos pero muy pocos sobre la osteopatía diabética y el tratamiento con bisfosfonatos. Esto se debe a que se requiere un tiempo considerable de tratamiento para observar efectos sobre el hueso que permitan obtener conclusiones claras.

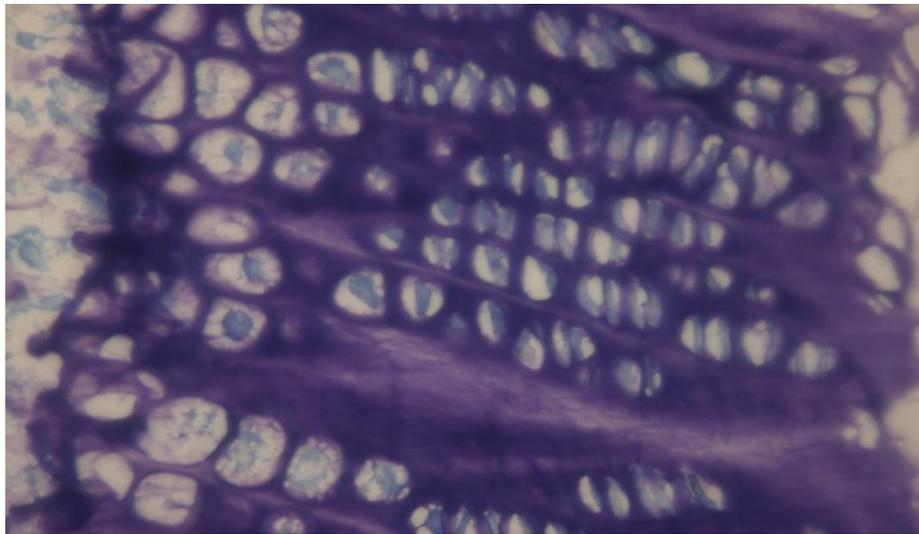
Además no está del todo establecido si el tratamiento con bisfosfonatos es recomendable en pacientes diabéticos o bajo qué circunstancias debe aplicarse.

Según lo que hemos hallado en estudios *in vitro* y *ex vivo*, el alendronato estimula la osteoblastogénesis y la condrogénesis inhibiendo o previniendo la adipogénesis en células progenitoras de médula ósea, en dosis relativamente bajas.

En experimentos *in vivo* encontramos que el alendronato podría estimular la formación ósea mediante el aumento en la proliferación y diferenciación de las CPMO a osteoblastos y condroblastos, disminuyendo la adipogénesis, lo que concuerda con los resultados obtenidos para área trabecular, número de osteocitos y área TRAP. Debido a que el tiempo en que realizamos los ensayos *in vivo* es relativamente corto, no es posible establecer si hay acumulación de microdaños por el tratamiento con alendronato, ya que se evidenciaría luego de un tratamiento a largo plazo, como meses o años. Por lo tanto, no podemos establecer ese tipo de efectos en el hueso, pero sí lo que ocurre en los primeros estadios del tratamiento. En un principio, según estos resultados y los obtenidos previamente en nuestro grupo, podríamos estimar que en pacientes diabéticos con osteopatía diabética el tratamiento con alendronato podría ser beneficioso para aumentar la DMO y la calidad del hueso, fortaleciéndolo y disminuyendo el riesgo de fracturas por bajo impacto. Esto requerirá de un seguimiento y control muy estricto de estas personas tanto en el mantenimiento de los niveles de glucosa como en los efectos del tratamiento con antiresortivos.

V.2. Conclusiones:

- Los AGEs tienen efectos anti-osteogénicos, anti-condrogénicos y pro-adipocíticos *in vitro* sobre células progenitoras de médula ósea (CPMO), evidenciados por la disminución de la producción de colágeno tipo I, la actividad de fosfatasa alcalina, los depósitos de nódulos de mineral extracelulares y la expresión de Runx2; la disminución de la producción de glucosaminoglucanos; y el aumento de los triglicéridos intracelulares, la actividad de lipasa y la expresión PPAR γ de estas células.
- Estos efectos pudieron ser prevenidos completamente *in vitro* por la coincubación con alendronato en baja dosis.
- Los AGEs provocan un aumento en el estrés oxidativo intracelular, efecto que puede atenuarse por la presencia de alendronato y/o antioxidantes como la vitamina E.
- La inducción de diabetes con déficit parcial de insulina genera alteraciones *in vivo* en la microarquitectura ósea de huesos largos, evidenciado en las determinaciones de área trabecular, número de osteocitos, densidad adipocítica, área TRAP y altura de la placa de crecimiento; como también induce cambios *ex vivo* en la predisposición fenotípica de las CPMO (disminución de su potencial osteogénico y condrogénico, aumento en su capacidad adipogénica). Dichas alteraciones del metabolismo y micro-arquitectura ósea pueden prevenirse por un tratamiento oral con alendronato, como se evidencia por nuestros estudios *in vivo* y *ex vivo*.



CAPITULO VI

Bibliografía

VI. Bibliografía

A

Arias-Díaz, Balibrea J. 2007. Animals models in glucose intolerance and type-2 diabetes. *Nutr. Hosp.* 22(2): 160-8.

B

Botolin, S.; Faugere, MC.; Malluche, H.; Orth, M.; Meyer, R.; McCabe LR. 2007. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology.* 146(8):3622-31.

Bahmanpour S & Paulsen DF. 2006. Inhibition of chondrogenic differentiation in chick limb-bud mesenchyme microculture treated with cyclosporine. *Indian J Pharmacol* 38: 43-48.

Barbosa, J.; Oliveira, S.; Tojal e Seara, L. 2008. O papel dos productos finais da glacação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 52: 940-950.

Baynes, JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40(4) 405-12.

Bellido, T.; Plotkin, L. 2006. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates: a survival pathway mediated by Cx-43 hemichannels and extracellular signal-regulated kinase activation, independently of gene transcription. *Actualizaciones en osteología.* 2-131-136.

Boanini, E.; Torricelli, P.; Gazzano, M.; Giardino, R.; Bigi, A. 2008. Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with osteoclast and osteoblast-like cells. *Biomaterials.* Vol.29: 790-796.

Bonewald, LF. 2007. Osteocyte as dynamic, multifunctional cells. *Ann. N Y Acad Sci* 1116: 281-290.

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

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

Boonen, S.; Laan, RF.; Barton, IP.; Watts, NB. 2005. Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and metaanalysis of intention-t-treat studies. *Osteoporos. Int* 16: 1291-1298.

Boyce, B.; Rosenberg, E.; de Papp, A.; Duong, L. 2012. The osteoclast, bone remodeling and treatment of metabolic bone disease. *Eur. Jour. of Clin Invest.* 42: 1332-1341.

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

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

C

Cai, W.; Ramdas, M.; Zhu, L.; Chen, X. 2012. Oral advanced glycation end products (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and situin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 15888-15893.

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

Cerami, C.; Founds, H.; Nicholl, I.; Mitsuhashi, T.; Giordano, D.; Vanpatten, S.; Lee, A.; Al-Abed, Y.; Vlassara, H.; Bucala, R.; Cerami, A. 1997. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13915-13920.

Chang, CH.; Wang, CZ.; Chang, JK.; Hsu, CY.; Ho, ML. 2014. The susceptible alendronate-treatment timing and dosage for osteogenesis enhancement in human bone marrow-derived stem cells. *PlosOne* 9(8): 1-9.

Chawla, D.; Bansal, S.; Banerjee, B.; Madhu, S.; Kalra, O.; Tripathi, A. 2014. Role of Advanced glycation end products (AGE) induced-receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvascular research* 95:1-6.

Chen, LL.; Huang, M.; Tan, JY.; Chen, XT.; Lei, LH.; Wu, YM.; Zhang, DY. 2013. PI3K/AKT Pathway Involvement in the Osteogenic Effects of Osteoclast Culture Supernatants on Preosteoblast Cells. *Tissue Eng Part A.* 19(19-20): 2226-32.

Chua, SC Jr.; Chung, WK.; Wu-Peng, XS.; Zhang, Y.; Liu, SM. 1996. Tartaglia L y cols. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* ;271 (5251): 994-6.

Clark, JB.; Palmer, CJ.; Shaw, WN. 1983. The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med.*;173(1):68-75.

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

Cortizo, AM.; Caporossi, M.; Lettieri, G.; Etcheverry, SB. 2000. Vanadate-induced nitric oxide production: role in osteoblast growth and differentiation. *Eur. Jour of Pharmacol.* 400: 279-285.

Cortizo, AM.; Sedlinsky, C.; McCarthy, AD.; Blanco, A.; Schurman, L. 2003. Osteogenic action of anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur. Jour. Pharm.* 536(1-2) 38-46.

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

Cozen, L. 1972. Does diabetes delay fracture healing? *Clinical Orthopedics and Related Research* 82: 134-140.

D

Dagdelen, S.; Sener, D.; Bayraktar M. 2007. Influence of type 2 diabetes mellitus on bone mineral density response to bisphosphonates in late postmenopausal osteoporosis. *Adv Ther.* 24(6):1314-20.

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

Dawson-Hughes, B.; Heaney, RP.; Holik, MF.; Lips, P.; Meunier, PJ.; Vieth, R. 2005. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos. Int.* 16: 713-716.

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

Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. 2014. American Diabetes Association. *Diabetes care.* 37(1): 81-90.

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

Duque, G.; Rivas, D. 2007. Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Jourof Bone and Min Research.* 22: 1603-1610.

E

Ebetino, FH.; Francis, MD.; Rogers, MJ.; Russell, RGG. 1998. Mechanisms of action of etidronate and other bisphosphonates. *Rev. Contemp. Pharmacother* 9: 233-243.

Escudero, N.; Mandalunis, P. 2012. Influence of bisphosphonate treatment on medullary macrophages and osteoclasts: an experimental study. *Bone Marrow Research*. ID 526236.

F

Ferretti, JL.; Cointry, GR.; Capozza, R.; Capiglioni, R.; Chiappe, MA. 2001. Analisis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 1(3):263-274.

Flores-Figueroa, E.; Montesinos, JJ.; Mayani H. 2006. Mesenchymal stem cells: history, biology and clinical application. *Rev. Invest. Clin.* 58(5) 498-511.

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

Fromigué, O.; Body, JJ. 2002. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J. Endocrinol. Invest.* 25: 539-546.

Forsen, L.; Meyer, HE.; Midthjell, K.; Edna, TH. 1999. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trøndelag Health Survey. *Diabetologia* 42: 920-925.

Fu, L.; Tang, T.; Miao, Y.; Zhang, S.; Qu, Z.; Dai, K. 2008. Stimulation of osteogenic differentiation and inhibition of adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells by alendronate vis ERK and JNK activation. *Bone* 43: 40-47.

G

Gangoiti, MV.; Cortizo, AM.; Arnol, V.; Felice, JI.; McCarthy AD. 2008. Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation end-products on osteoblastic cells. *Eur J Pharmacol.* 600(1-3): 140-7.

Gangoiti, MV.; Anbinder, PS.; Cortizo, AM.; McCarthy, AD. 2013. Morphological changes induced by advanced glycation endproducts in osteoblastic cells: effects of co-incubation with alendronate. *Acta Histochem.* 115(7): 649-57.

Geneser F. *Histología sobre bases moleculares*. 3era. Edición, 6ta. Reimpresión. 2006. Editorial Médica Panamericana.

Genuth, S.; Sun, W.; Cleary, P.; Gao, X.; Sell, D.; Lachin, J.; The DCCT/EDIC Research Group; Monnier, V. 2015. Skin Advanced Glycation End Products glucosepane and methylglyoxal

hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes. *Diabetes* 64: 266-278.

Giuliani, N.; Pedrazzoni, M.; Negri, G.; Passeri, G.; Impicciatore, M.; Girasole, G. 1998. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 22(5): 455-461.

Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, BS.; Uribarri, J.; Vlassara, H. 2004. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 104: 1287-1291.

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

Greenspan, SL.; Bone, HG.; Ettinger, MP.; Hanley, DA.; Lindsay, R.; Zanchetta, JR.; Blosch, CM.; Mathisen, AL.; Morris, SA.; Marriot, TB. 2007. Treatment of osteoporosis with parathyroid hormone study group. Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 146: 326-339.

Gugliucci, A.; Mehlhaff, K.; Kinugasa, E.; Ogata, H.; Hermo, R.; Schulze, J.; Kimura, S. 2007. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clin. Chim. Acta.* 377: 213-220.

Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. In: The Biological Council of Animal Reserch and Welfare Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992.

Guimarães, E.; Empsen, C.; Albert Geerts, A.; van Grunsven, L. 2010. Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. *Jour. of Hepatology.* 52: 389-397.

H

Heap, J.; Murray, MA.; Miller, SC.; Jalili, T.; Moyer-Mileur, LJ. 2004. Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr.* 144: 56-62.

Hein, GE. 2006. Glycation end products in osteoporosis: is there a pathophysiologic importance? *Clin. Chim. Acta.* 371: 32-36.

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

Henneman, Z.; Nancollas, G.; Ebetino, F.; Russell, R.; Phipps, R. 2009. Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 85(4): 993-1000.

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

Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. 2007. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* **22**: 1317-1328.

Hotta N. 1995. New approaches for treatment in diabetes: aldose reductase inhibitors. *Biomed Pharmacoter*. 49: 232-243.

I

Ikeda, T.; Iwata, K. 2011. Long-Term Effect of Alendronate on Bone Mineral Density in Postmenopausal Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab* S1:002.

Im, GI.; Qureshi, SA.; Kenney, J.; Rubash, HE.; Shanbhag, AS. 2004. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonate. *Biomaterials*. 25: 4105-4115.

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

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

J

James A. 2013. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica*. Volume 2013. 1-17.

Janghorbani, M.; Van Dam, RM.; Willett, WC.; Hu, FB. 2007. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *American Journal of Epidemiology*. 166: 495-505.

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

K

Kang, JH.; Choi, NK.; Kang, SJ.; Yang, SY.; Ko, HM.; Jung, JY.; Kim, MS.; Koh, JT.; Kim, WJ.; Oh, WM.; Kim, BY.; Kim, SH. 2010. Alendronate affects cartilage resorption by regulating vascular endothelial growth factor expression in rats. *The anatomical record*. 293: 786-793.

Karystinou, A.; Roelofs, A.; Neve, A.; Cantatore, F.; Wackerhage, H.; De Bari, C. 2015. Yes-associated protein (YAP) is a negative regulator of chondrogenesis in mesenchymal stem cells. *Arthritis Research & Therapy*. 17: 147.

Kawano, K.; Hirashima, T.; Mori, S.; Saitoh, Y.; Kurosumi, M.; Natori, T. 1992. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*; 41 (11): 1422-8.

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

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

Kazmers, NH.; Ma, SA.; Yoshida, T.; Stern, PH. 2009. Rho GTPase signaling and PTH 3-34, but not PTH 1-34, maintain the actin cytoskeleton and antagonize bisphosphonate effects in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*. 45(1):52-60.

Keegan, TH.; Schwartz, AV.; Bauer, DC.; Sellmeyer, DE.; Kelsey, JL. 2004. Effect of alendronate on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in type 2 diabetic women: the fracture intervention trial. *Diabetes Care*. 27: 1547-1553.

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

Kim, HK.; Jim, JI.; Abbas, AA.; Yoon, TR. 2009. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 467: 3121-3128.

Kim, JW.; Yoon KH. 2011. Glucolipotoxicity in pancreatic β -cells. Review. *Diabetes & Metabolism Journal*. 35: 444-450.

Kolm-Litty, V.; Sauer, U.; Nerlich, A.; Lehmann, R.; Schleicher, ED. 1998. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*. 101(1): 160-169.

Kooy,NW.; Royall, JA.; Ischiropoulos, H.; Beckman, JS. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihidrorhodamine 123. *Free radic. Biol. Med*. 16: 149-156.

Koschinsky, T.; He, CJ.; Mitsuhashi, T.; Bucala, R.; Liu, C.; Bunting, C.; Heitmann, K.; Vlassara, H. 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the national Academy of Sciences*. 94: 6474-6479.

Kume,S.; Kato,S.; Yamagishi, S.; Inagaki, Y.; Ueda, S.; Arima, N.; Nagata, K. 2005. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 20(9): 1647-58.

L

Lezcano, V.; Bellido, T.; Plotkin, LI.; Boland, R.; Morelli, S. 2014. Osteoblastic protein tyrosine phosphatases inhibition and connexin 43 phosphorylation by alendronate. *Exp Cell Res.* 324(1):30-9.

Lezcano, V.; Bellido, T.; Plotkin, LI.; Boland, R.; Morelli, S. 2012. Role of connexin 43 in the mechanism of action of alendronate: dissociation of anti-apoptotic and proliferative signaling pathways. *Arch Biochem Biophys.* 518(2):95-102.

Lin, L. 2006. RAGE on the toll road? *Cell Mol. Immunol.* 3: 351-358.

Liu,X.; Liu, J.; Kang, N.; Yan, L.; Wang, Q.; Fu, X.; Zhang, Y.; Xiao,R.; Cao, Y. 2014. Role of Insulin-Transferrin-Selenium in auricular chondrocyte proliferation and engineered cartilage formation *in vitro*. *Intern. J. Mol. Sciences.* 15: 1525-1537.

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

Lorentzon, M.; Cummings, S. 2015. Osteoporosis: the evolution of a diagnosis. *J. Int. Med.* 277: 250-261.

Lyons, TJ.; Jenkins, AJ.1997. Glycation, oxidation and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev.* 5: 365-391.

M

Manolagas, SC. 2010. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine reviews.* 31(3): 266–300.

Martinez-Laguna D.; Tebe C.; Javaid MK.; Nogues X.; Arden NK.; Cooper C.; Diez-Perez A.; Prieto-Alhambra D. 2015. Incident type 2 diabetes and hip fracture risk: a population-based match cohort study. *Osteoporos Int.* 26: 827-833.

McCarthy, AD.; Etcheverry, SB.; Bruzzone, L.; Cortizo, AM. 1997. Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem.* 170(1-2): 43-51.

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

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

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

McCarthy, AD.; Molinuevo, MS.; Cortizo, AM. 2013. Ages and Bone Ageing in Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab* 4: 276.

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

Melton, LJ 3rd.; Leibson, CL.; Achenbach, SJ.; Therneau, TM.; Khosla, S. 2008. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res* 23: 1334-1342.

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

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

Meunier, PJ.; Roux, C.; Seeman, E.; Ortolani, S.; Barduski, JE.; Spector, TD.; Cannata, J.; Balogh, H.; Lemmel, EM.; Pors-Nielsen, S.; Rizzoli, R.; Genant, HK.; Reginster, JY. 2004. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 350: 459-468.

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

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

Morrison, RF.; Farmer, SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* 130(12):3116S-3121S.

N

Neer, RM.; Arnaud, CD.; Zanchetta, JR.; Prince, R.; Gaich, GA.; Reginster, JY.; Hodman, AB.; Erksen, EF.; Ish-Shalom, S.; Genant, HK.; Wang, O.; Mitlak, BH. 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 344: 1434-1441.

Negre-Salvayre, A.; Salvayre, R.; Auge, N.; Pamplona, R.; Portero-Otín, R. 2009. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidant & redox signalling.* 11: 3071-3109.

Niedzwiedzki, T; Filipowska, J. 2015. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *Journal of Molecular Endocrinology.* 55: 23-36.

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

O

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

Okamoto, T.; Yamagishi, S.; Inagaki, Y.; Amano, S.; Takeuchi, M.; Kikuchi, S.; Ohno, S.; Yoshimura, A. 2002. Incadronate disodium inhibits advanced glycation end products-induced angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 297(2):419-424.

Orimo, H. 2010. The mechanisms of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.* 77:4-12.

Ottum, MS.; Mistry, AM. Advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 57(1): 1-12.

P

Pace, C.; Delmo, C.; Lee, R. 1989. Altered electrical responses of B-cells after goldthioglucose-induced lesions in the ventromedial hypothalamus. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 65(3): 401-4.

Pfeiffer, A.; Schatz, H. 1995. Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 103: 7-14.

Plotkin, LI.; Weinstein, RS.; Parfitt, AM.; Roberson, PK.; Manolagas, SC.; Bellido, T. 1999. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest.* 104(10):1363-74.

Q

Quarles, L.D.; Yohay, D.A.; Lever, L.W.; Caton, R.; Wenstrup, R.J. 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 7(6):683-92.

R

Rahbar, S. 2005. The discovery of glycosylated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1043: 9-19.

Reginster, J.; Minne, H.W.; Sorensen, O.H.; Hooper, M.; Roux, C.; Brandi, M.L.; Lund, B.; Ethgen, D.; Pack, S.; Roumagnac, I.; Eastell, R. 2000. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral efficacy with risedronate therapy (VERT). Study Group. *Osteoporos. Int.* 11: 83-91.

Reginster, J.Y.; Seeman, E.; De Vernejoul, M.C.; Adami, S.; Compston, J.; Phenekos, C.; Devogelaer, J.P.; Curiel, M.D.; Sawiki, A.; Goemere, S.; Sorensen, O.H.; Felsenberg, D.; Meunier, P.J. 2005. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: treatment of peripheral osteoporosis (TROPOS) Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 2816-2822.

Ribeiro, V.; García, M.; Olivera, R.; Gomes, P.; Colaço, B.; Fernandes, M.E. 2014. Bisphosphonate induce the osteogenic gene expression in co-cultured human endothelial and mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 18(1): 27-37.

Roberts, S.J.; Gastel, N.; Carmeliet, G.; Luyten, F. 2015. Uncovering the periosteum for skeletal regeneration: The stem cells that lies beneath. *Bone* 70: 10-18.

Rogers, M.J.; Gordon, S.; Benford, H.R.; Coxon, F.P.; Luckman, S.P.; Monkkonen, J.; Frith, J.C. 2000. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88 (12 Suppl): 2961-78.

Rogers, M.J. 2003. New insights into the mechanisms of action of bisphosphonates (review). *Curr. Pharm. Des.* 9: 2643-2658.

Rosenberg, N.; Rosenberg, O.; Soudry, M. 2012. Osteoblast in bone physiology. *Rambam Maimonides Med. J.* 3(2):e0013.

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

Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebtino, F.H.; Rogers, M.J. 2008. Mechanisms of action of bisphosphonate: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos. Int.* 19: 733-759.

S

- Salerno, M.; Argenziano, A.; Di Maio, S.; Gasparini, N.; Formicola, S.; De Filippo, G.; Tenore, A. 1997. Pubertal growth, sexual maturation and final height in children with IDDM. Effects of age at onset and metabolic control. *Diabetes care* 20: 721-724.
- Saito, M.; Fujii, K.; Marumo, K. 2006. Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif. Tissue Int.* 79: 160-168.
- Sbaraglini, ML.; Molinuevo, MS.; Sedlinsky, C.; Schurman, L.; McCarthy, AD. 2014. Saxagliptin affects long-bone microarchitecture and decreases the osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *European Journal of Pharmacology* 727: 8-14.
- Schmidt-Nielsen, K.; Haines, HB.; Hackel, DB. 1964. Diabetes mellitus in the sand rat induced by standard laboratory diets. *science.* 143(3607):689-90.
- Schurman L., Bagur A., Claus-Hermberg H., Messina O., Negri A., Sanchez A., González C.; Dehl, M.; Rey, P.; Gamba, J.; Chiarpenello, J.; Moggia, MS.; Mastaglia, S. 2012. Guías 2012 para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. *Medicina* 2013. 73: 55-74.
- Sharma, K.; Ziyadeth, FN. 1997. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Sem. Nephrol.* 17: 80-92.
- Sharp S.P; Rainbow S.; Mukherjee S. 2003. Serum levels of low molecular weight of advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet. Med.* 20: 575-579.
- Silverman S.L., Chesnut III CH. 2003. Calcitonin therapy for osteoporosis. En: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* Washington D.C: American Society fo Bone and Mineral Research. 342-343.
- Solchaga, L.; Penick,K.; Welter, J. 2011. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Tips and tricks.
- Spencer, N.D.; Gimble, J.M.; Lopez, M.J. 2011. Mesenchymal Stromal Cells: Past, Present, and Future. *Vet Surg.* 40(2):129-39.
- Srinivasan, K.; Viswanad, B.; Asrat, L.; Kaul, CL.; Ramarao, P. 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 52(4): 313-20.
- Stahl, W.; Sies H. 1997. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* 46: S14-18.
- Stolzing, A.; Sellers, D.; Llewelyn, O.; Scutt, A. 2010. Diabetes Induced Changes in Rat Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs.* 191:453–465.
- Strotmeyer, ES.; Cauley, JA.; Schwartz, AV.; Nevitt, MC.; Resnick, HE.; Zmuda, JM.; Bauer, DC.; Tyllavsky, FA.; de Rekeneire, N.; Harris, TB.; Newman, AB, Health ABC Study. 2004. Diabetes is

associated independently of body composition with BMD and bone volume in older white and black men and women: the health, aging and body composition study. *J. Bone Miner. Res.* 19(7): 1084-91.

Sun, H.; Wu, Y.; Fu, D.; Liu, Y.; Huang, C. 2014. SIRT6 regulates osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells partially via suppressing the Nuclear Factor- κ B signaling pathway. *Stem Cells* 32: 1943-1955.

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

T

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

Tang, SY.; Allen, MR.; Phipps, R.; Burr, DB.; Vashisht, D. 2009. Changes in non-enzymatic glycation and its association with altered mechanical properties following 1-year treatment with risedronate or alendronate. *Osteoporos. Int.* 20(6): 887-894.

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

Tolosa, MJ.; Chuguransky, SR.; Sedlinsky, C.; Schurman, L.; McCarthy, AD.; Molinuevo, MS.; Cortizo, AM. 2013. 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.* 191(2):177-86.

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

Tropel, P.; Noel, D.; Platet, N.; Legrand, P.; Benabid, AL.; Berger, F. 2004. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell. Res.* 295(2) 395-406.

Tsuchimoto, M.; Azuma, Y.; Higuchi, O.; Sugimoto, I.; Hirata, N.; Kiyoki, M. 1994. Alendronate modulates osteogenesis of human osteoblastic cells in vitro. *Jpn. J. Pharmacol.* 66, 25-33.

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

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

U

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

Ulrich, P.; Cerami, A. 2001. Protein glycation, diabetes and aging. *Recent Prog. Horm. Res.* 56:1-21.

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

V

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

Valko M.; Liebfriz D.; Moncola J.; Cronin M.; Mazura R.; Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39: 44-84.

Van Beek, E.; Pieterman, E.; Cohen, L.; Lowic, C.; Papapoulos, S. 1999. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 108-111.

Van Staa, T.P.; Dennison, E.M.; Leufkens, H.G.; Cooper, C. 2004. Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone.* 29:517-22.

Vestergaard, P.; Rejnmark, L.; Mosekilde, L. 2005. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia.* 48(7):1292-9.

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

Vlassara, H.; Palace, M.R. 2002. Diabetes and advanced glycation end products. *J. Intern. Med.* 251:87-101.

Vlassara, H.; Striker, G. 2011. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7(9): 526-539.

W

Wakasugi, N.; Tomita, T.; Kondo, K.J. 1967. Differences of fertility in reciprocal crosses between inbred strains of mice. DDK, KK and NC. *Reprod Fertil.* 13(1):41-50.

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

Weinberg, E.; Maymon, T.; Weinreb, M. 2014. AGEs induce caspase-mediated apoptosis of rat BMSCs via TNF α production and oxidative stress.

Wijayanayaka, A.; Kogawa, M.; Lim, H.; Bonewald, L.; Findlay, D.; Atkins, G. 2011. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PlosOne* 6: Issue 10: 1-9.

Williamson, JR.; Chang, K.; Frangos, M. 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes.* 42: 801-813.

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

Wongdee & Charoenphandhu. 2011. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes* 2: 41-48.

Y

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

Yamagishi, S.; Matsui, T.; Nakamura, K.; Takeuchi, M. 2005. Minodronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, inhibits advanced glycation end product-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells by suppressing reactive oxygen species generation. *Int. J. Tissue React.* 27, 189–195.

Yamagishi, S. 2011. Role of Advanced glycation end products (AGE) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. Review. *Experimental gerontology* 96: 217-224.

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

Z

Zebaze, R.; Libanati, C.; Austi, M.; Ghasem-Zadeh, A.; Hanley, D.; Zanchatta, J.; Thomas, T.; Boutroy, S.; Bogado, C.; Bilezikian, J.; Seeman, E. 2014. Differing effects of denosumab and alendronate on cortical and trabecular bone. *Bone* (59) 173-179.

Zhang, J.; Slevin, M.; Duraisamy, Y.; Gaffney, J.; Smith, C.; Ahmed, N. 2006. Comparison of protective effects of aspirin, D-penicillamine and vitamin E against high glucose-mediated toxicity in cultured endothelial cells. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1762: 551-557.

Zucker, LM.; Zucker, TF. 1961. Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.*; 52: 275-278.