



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Alteraciones óseas asociadas al Síndrome Metabólico en ratas: evaluación preclínica de un tratamiento oral con metformina

Tesista: Lic. Nahuel Ezequiel Wanionok

Directores: Prof. Dr. Antonio Desmond McCarthy

Prof. Dr. José Ignacio Aguirre

Año: 2022

Trabajo de tesis desarrollado para acceder al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, realizado bajo la dirección conjunta del Prof. Dr. Antonio Desmond McCarthy y Prof. Dr. José Ignacio Aguirre.

El mismo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM) de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, y fue posible gracias a las Becas otorgadas en el marco de los proyectos financiados por el FONCyT y a las Becas Internas de Finalización de Doctorado otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Agradecimientos

Primeramente, no está de más mencionar lo muy feliz que fui y soy dentro del laboratorio y en el desarrollo de mi Tesis. Es mi primera oportunidad laboral dentro de mi actividad profesional y la he disfrutado al máximo.

Quiero agradecer a Ana y Antonio por haber confiado en mí para desarrollar esta investigación, estar pendientes de mi accionar, ayudarme a ir mejorando poco a poco y en cualquier situación que los necesité.

A Ignacio y a toda su familia, por abrirme las puertas de su casa sin conocerme y tratarme de la mejor manera en mi estadía en Gainesville. Ojalá en un futuro, sea en trabajo u ocio, sigamos compartiendo tiempo juntos.

A Juanma, Vir y Sil por estar siempre al pie del cañón con las mil y una consultas que les hice, aconsejándome no solamente en esta etapa sino también pensando hacia el futuro.

A toda la primera banda de becarios/as del LIOMM por siempre apoyarme y ayudarme con buena predisposición, hasta cuando no se los pedía. Gracias a Luz, la as de la PCR; Lucas, el mejor editor de Power Point; Leti, la mejor no cebadora de mate; Lau, la compañera de aventura de pañales. También a Lucas 2, Lucas 3, Nancy y Ángel que, pese a que la pandemia no nos permitió vernos tanto al principio, siempre están para las charlas de descarga de nervios previas a la Defensa de Tesis que se aproxima.

A Evelyn y Jessica por enseñarme muchísimas cosas y hacerme sentir como uno más dentro de UF.

A Claudia y León por sus colaboraciones en nuestra investigación.

A Química Montpellier por donarnos muy gentilmente la metformina.

A mi papá, por contagiarme ese amor por hacer todo de la mejor manera posible, sin tibieza y con convicción. Ojalá estuvieras acá para darme un abrazo cuando termine la exposición.

A mi mamá por inspirarme tanto al estudio, con amor y dedicación; y acá estoy a poquito de un posgrado.

A mi familia por su cariño y por preocuparse siempre por cómo iba mi trabajo.

A todos mis amigos por ayudarme a tirar siempre hacia adelante y estar cuando los

necesito.

A Tamara, mi compañera de vida, por caminar a mi lado hombro a hombro, apoyarme incondicionalmente, demostrarme que puedo y disfrutar cada momento juntos.

Por último, agradecer infinitamente a Camila, por haber llegado a nuestras vidas. Por llenarme de felicidad cada uno de mis días, por enseñarme siempre, por cada abrazo y cada sonrisa. Ojalá pueda devolverte la mitad de todo lo que nos das.

¡De corazón, muchas gracias!

ÍNDICE

Resumen

Listado de abreviaturas

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN	1
I. 1. Tejido óseo	2
I. 1. 1. Esqueleto.....	2
I. 1. 2. Estructura general de los huesos.....	2
I. 1. 3. Tejido óseo.....	5
I. 1. 3. A. Clasificación del tejido óseo.....	5
I. 1. 3. B. Composición del tejido óseo.....	7
I. 1. 3. B. i. Matriz extracelular.....	8
I. 1. 3. B. ii. Células.....	9
I. 1. 3. C. Proceso de mineralización de la matriz ósea.....	14
I. 1. 3. D. Modelado y remodelado óseo.....	15
I. 1. 4. Diferenciación de células estromales mesenquimáticas hacia el fenotipo osteoblástico.....	17
I. 1. 5. Técnicas para la evaluación de la microarquitectura y masa ósea en modelos animales.....	19
I. 1. 5. A. Técnicas histológicas.....	19
I. 1. 5. B. Técnicas con imágenes.....	20
I. 1. 6. Pruebas mecánicas.....	21
I. 2. Síndrome Metabólico (SM).....	24
I. 2. 1. Definición.....	24
I. 2. 2. Criterios diagnósticos de SM.....	24
I. 2. 3. Prevalencia del SM.....	25
I. 2. 4. Complicaciones asociadas al SM.....	27
I. 2. 5. Patofisiología del SM.....	27
I. 2. 5. A. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina.....	27
I. 2. 5. B. Almacenamiento de energía disfuncional y obesidad.....	29
I. 2. 6. Consumo de fructosa y SM.....	29
I. 2. 7. Metabolismo de la fructosa.....	31
I. 2. 8. Efectos del consumo sostenido de fructosa.....	33
I. 2. 8. A. Dislipidemia.....	33
I. 2. 8. B. Deposición ectópica de lípidos en hígado y músculo esquelético....	

.....	34
I. 2. 8. C. Homeostasis de la glucosa alterada y resistencia a la insulina..	34
I. 2. 8. D. Metabolismo del ácido úrico.....	36
I. 2. 8. E. Hipertensión arterial.....	37
I. 2. 9. Modelos animales utilizados en el estudio del SM.....	38
I. 2. 10. Estrategias terapéuticas para pacientes con SM.....	40
I. 2. 11. Metformina y SM.....	42
I. 3. Síndrome Metabólico y hueso.....	44
I. 3. 1. Alteraciones en el metabolismo óseo asociadas al SM.....	44
I. 3. 1. A. Alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la insulina.....	45
I. 3. 1. B. Obesidad.....	46
I. 3. 1. C. Hipertensión.....	47
I. 3. 2. Metformina y metabolismo óseo.....	47
CAPÍTULO II - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	50
CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
III. 1. Estudios <i>in vivo</i>	53
III. 1. 1. Determinación de parámetros séricos.....	54
III. 1. 2. Protocolo de inyecciones de fluorocromos para la determinación de superficies óseas de mineralización activa.....	55
III. 1. 3. Estudio de parámetros estructurales óseos por Tomografía Computada Cuantitativa Periférica (pQCT).....	55
III. 1. 3. A. Obtención de las muestras.....	55
III. 1. 3. B. Mediciones.....	55
III. 1. 3. C. Parámetros evaluados.....	55
III. 1. 4. Análisis histomorfométrico.....	56
III. 1. 4. A. Obtención y procesamiento de las muestras.....	56
III. 1. 4. B. Tinciones realizadas.....	58
III. 1. 4. C. Evaluación de parámetros de histomorfometría estática.....	59
III. 1. 4. D. Evaluación de parámetros de histomorfometría dinámica.....	59
III. 1. 5. Evaluación de resorción ósea en el hueso maxilar superior izquierdo.....	60
III. 1. 6. Análisis biomecánico mediante ensayo de flexión en tres puntos.....	61
III. 1. 6. A. Obtención y procesamientos de muestras.....	61
III. 1. 6. B. Análisis de los parámetros biomecánicos.....	61
III. 2. Estudios <i>ex vivo</i>	63

III. 2. 1. Obtención e incubación de células estromales mesenquimáticas (MSC) de rata.....	63
III. 2. 2. Diferenciación osteoblástica de MSC.....	63
III. 2. 3. Determinación de parámetros de diferenciación osteoblástica	64
III. 2. 4. Determinación de niveles de expresión de marcadores osteogénicos, adipogénicos y pro-resortivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	65
III. 2. 5. Análisis estadístico.....	65
CAPÍTULO IV - RESULTADOS.....	66
IV. 1. Peso corporal y evaluación bioquímica de los grupos experimentales.....	67
IV. 2. Análisis de la longitud de huesos.....	68
IV. 3. Análisis estructural por tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT)	69
IV. 3. 1. Estudio del tejido óseo trabecular.....	69
IV. 3. 2. Estudio del tejido óseo cortical.....	70
IV. 4. Análisis histomorfométrico.....	71
IV. 4. 1. Histomorfometría dinámica.....	71
IV. 4. 1. 1. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica de la metáfisis tibial proximal.....	71
IV. 4. 1. 2. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica del cuerpo de la segunda vértebra lumbar.....	72
IV. 4. 1. 3. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica de la diáfisis tibial.....	73
IV. 4. 2. Histomorfometría estática.....	74
IV. 4. 2. 1. Estudios de parámetros de histomorfometría estática de la metáfisis tibial proximal.....	74
IV. 4. 2. 1. A. Parámetros estructurales.....	74
IV. 4. 2. 1. B. Parámetros celulares.....	75
IV. 4. 2. 2. Estudios de parámetros de histomorfometría estática del cuerpo de la segunda vértebra lumbar.....	76
IV. 5. Estudio para la determinación de pérdida de altura vertical del hueso alveolar (AHA).....	77
IV. 6. Análisis biomecánico mediante ensayo de flexión en tres puntos.....	78
IV. 7. Evaluación del potencial osteogénico en MSC.....	79
IV. 7. 1. Evaluación de actividad específica de FAL, producción de colágeno tipo 1 y acumulación de mineral extracelular.....	79
IV. 7. 2. Evaluación de niveles de expresión génica de marcadores	

osteogénicos, anti-osteogénicos y pro-resortivo.....	80
CAPÍTULO V - DISCUSIÓN	82
CAPÍTULO VI - CONCLUSIONES	93
CAPÍTULO VII - REFERENCIAS.....	95

Resumen

Introducción. El síndrome metabólico (SM) se define por la presencia de tres o más factores de riesgo cardiovascular en un individuo, incluyendo: obesidad central, triglicéridos elevados, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) reducido, hipertensión, glucemia por encima del intervalo de referencia en ayunas y/o intolerancia a la glucosa. Además, los pacientes que se encuentren medicados para controlar su hipertrigliceridemia, colesterol HDL bajo, hipertensión y/o hiperglucemia también se incluyen en esta definición.

La metformina (MET), insulino-sensibilizante, se prescribe con frecuencia para el tratamiento del SM y/o diabetes mellitus tipo 2. Hemos demostrado previamente efectos osteogénicos directos de MET sobre los osteoblastos y células progenitoras mesenquimáticas presentes en la médula ósea (MSC). En ratas, el tratamiento con esta droga previene alteraciones óseas inducidas por una diabetes experimental con déficit parcial de insulina, dado que aumenta en MSC la expresión del factor de transcripción Runx2, producción de colágeno tipo 1, expresión de fosfatasa alcalina (FAL) y capacidad de mineralización de la matriz extracelular. Además, MET mejora la formación y reparación ósea en ratas no diabéticas.

Numerosos estudios epidemiológicos han proporcionado evidencia convincente que relaciona el consumo de fructosa con el riesgo de obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular y SM. La introducción del jarabe de maíz con alto contenido de fructosa como edulcorante principal para bebidas gaseosas ha aumentado considerablemente el problema. Para imitar el estado de la enfermedad en humanos, muchos modelos animales con SM se basan en la administración de un solo tipo de dieta o una combinación de las mismas, como altas en carbohidratos y/o altas en grasas. En roedores, una dieta rica en fructosa induce cambios metabólicos y clínicos compatibles con el SM, como aumento de peso corporal y adiposidad, hiperlipidemia con hipertrigliceridemia, hiperuricemia, hipertensión, intolerancia a la glucosa y disminución de la sensibilidad a la insulina. Además, esta dieta puede generar una acumulación sistémica de productos finales de glicación avanzada (AGEs) como resultado de la presencia de hiperglucemia. Nuestros estudios experimentales y los de otros autores han demostrado que los AGEs pueden causar reacciones inflamatorias y estrés oxidativo que es perjudicial para el desarrollo y la supervivencia de las células óseas.

Aunque existe evidencia clínica contradictoria con respecto a las consecuencias del SM sobre la integridad esquelética, la mayoría de los estudios apuntan a efectos negativos. El SM también se ha asociado con una mayor incidencia de periodontitis con pérdida de hueso alveolar y caída de piezas dentarias. En estudios preclínicos, hemos demostrado previamente que las ratas

alimentadas con una dieta rica en fructosa durante 5 semanas desarrollan SM, con efectos anti-osteogénicos en las MSCs, pero sin cambios en la microarquitectura ósea (evaluado por tomografía computada periférica cuantitativa (pQCT) e histomorfometría estática/dinámica). En dichos estudios, la microarquitectura ósea tampoco se vio afectada por un tratamiento de 3 semanas con MET, aunque el tratamiento conjunto con dicho fármaco y fructosa previno los efectos anti-osteogénicos del SM sobre MSC.

Hipótesis. El aumento en el tiempo de exposición a una dieta rica en fructosa inducirá efectos negativos en la microarquitectura ósea, los cuales pueden ser prevenidos mediante el tratamiento simultáneo con MET.

Objetivos. Se planteó el objetivo general de investigar la posible asociación entre el SM y las alteraciones del tejido óseo en ratas, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos: a) investigar *in vivo* las posibles alteraciones óseas consecutivas a la inducción de resistencia insulínica, dislipidemia e hipertensión, en un modelo de ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa; b) investigar el efecto *ex vivo* del SM sobre el potencial osteogénico de MSCs; c) evaluar la posible modulación de las alteraciones óseas consecutivas a un SM inducido por fructosa, con un tratamiento con MET.

Materiales y métodos. Los estudios se hicieron en ratas que recibieron solución de fructosa al 20% *ad libitum* (grupo F) para generar el SM. Como vehículo (grupo Veh), se usaron ratas que recibieron agua corriente *ad libitum*. En los ensayos en los que se evaluaron los efectos de la MET, esta se administró en el agua de bebida en una dosis de 100 mg/kg/día (grupos M y FM). Se hicieron estudios de histomorfometría estática y dinámica de la metáfisis tibial proximal y el cuerpo de la segunda vértebra lumbar, estudios de histomorfometría dinámica de la diáfisis tibial, análisis por tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT), pruebas biomecánicas, e histomorfometría de maxilar superior para evaluar pérdida de hueso alveolar. Además, se evaluó el potencial osteogénico de las MSCs, y se midió la expresión de factores de transcripción de cada linaje celular.

Resultados. Una dieta rica en fructosa de 12 semanas indujo anomalías en el metabolismo de glucosa y lípidos compatibles con SM en ratas Wistar, pero no se presentaron alteraciones esqueléticas. Asimismo, 10 semanas de co-tratamiento con MET previnieron las anomalías metabólicas del SM; sin embargo, también aumentó la pérdida de hueso alveolar maxilar y alteró varios parámetros estructurales tanto del hueso trabecular como del cortical. Es importante

destacar que estas alteraciones estructurales parecieran reflejarse en el desempeño biomecánico de los huesos. Se están realizando más estudios para evaluar los mecanismos celulares y moleculares por los que la MET podría estar afectando el metabolismo óseo en este modelo experimental, así como sus posibles consecuencias a largo plazo.

En cuanto a los experimentos *ex vivo*, las MSCs derivadas de animales tratados con fructosa presentaron un menor potencial osteogénico, el cual fue completamente prevenido por el co-tratamiento con MET (grupo FM). Sin embargo, las MSCs derivadas de animales tratados sólo con MET (grupo M, frente a Veh) mostraron una reducción significativa en la actividad de FAL y producción de colágeno tipo 1.

Conclusión. En este modelo de ratas con SM inducido por fructosa durante un tiempo prolongado (12 semanas) no se observaron alteraciones biomecánicas óseas, ni cambios detectables por histomorfometría estática o dinámica. Sin embargo, el tratamiento prolongado con MET (en presencia o ausencia de SM) se asoció con pérdida de hueso alveolar maxilar y alteraciones en la microarquitectura del hueso trabecular y cortical apendicular que afectarían su comportamiento biomecánico.

Listado de abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
ACE/AACE	American College of Endocrinology / American Association of Clinical Endocrinologists
ADA	Asociación americana de diabetes (American diabetes association)
AGEs	productos de glicación avanzados
AHA	altura vertical del hueso alveolar
AMP	adenosín monofostato
AMPK	proteína quinasa activada por 5' AMP
ANOVA	análisis de varianza unidireccional
ATP	adenosín trifosfato
BFR/BS	índice de formación de hueso/superficie de hueso
BRU	unidad remodeladora ósea
BMP	proteína morfogénica ósea
BV/TV	volumen de hueso trabecular/volumen total
CHA	cresta del hueso alveolar
c-Fms	receptor de tirosina quinasa
CFU-GM	unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos
CMO	contenido mineral óseo
CPH	células progenitoras hematopoyéticas
CREB2	cAMP response elements binding protein 2
dLS	superficie de hueso trabecular con marcación doble de fluorocromos
DMEM	medio esencial modificado por Dulbecco
DMO	densidad mineral ósea
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
ES/BS	superficie erosionada/superficie de hueso trabecular
F	fructosa
FAL	fosfatasa alcalina
FM	fructosa + metformina
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
GAG	glucosaminoglucanos

GLOW	Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women
GLUT	transportador de glucosa
GTP	trifosfato de guanosina
HA	hidroxiapatita
H&E	hematoxilina & eosina
HDL	lipoproteína de alta densidad
HOMA-IR	modelo homeostático para evaluación de insulinoresistencia
IGF	factor de crecimiento insulinosimil
IL	interleuquina
IMC	índice de masa corporal
ITAM	secuencia de activación basado en tirosina del receptor inmune
JMAF	jarabe de maíz con alto contenido de fructosa
LDL	lipoproteína de baja densidad
LRP5	proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5
MAP	proteína activada por mitógenos
MAR	índice de aposición de mineral
M-CSF	factor estimulante de colonias macrofágicas
MET	metformina
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MMP	metaloproteinasas de la matriz
MS/BS	superficie de mineralización/superficie total de hueso
MSC	células estromales mesenquimáticas
NBF	formalina neutra tamponada
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NO	óxido nítrico
Ob	osteoblasto
Ob.S/BS	superficie de osteoblastos/superficie de hueso
Oc	osteoclasto
OC	osteocalcina
Oc.S/BS	superficie de osteoclastos/superficie de hueso
OMS	Organización mundial de la salud
OPG	osteoprotegerina

OS/BS	superficie de osteoide/superficie de hueso trabecular
Ot	osteocito
PBS	buffer fosfato salino
pDEXA	absorciometría periférica con rayos X de doble energía
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE2	prostaglandina E2
PI-3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PKC	proteína quinasa C
p-NP	p-nitrofenol
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor gamma
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
pQCT	tomografía computada cuantitativa periférica
PTH	hormona paratiroidea
RANK	receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
RE	retículo endoplasmático
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
Runx2	Runt related transcription factor 2
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
SER	elemento de respuesta a esteroides
SFB	suero fetal bovino
sLS	superficie de hueso trabecular con marcación simple de fluorocromos
SM	Síndrome Metabólico
SREBP	proteína de unión al elemento regulador de esteroides
Ta	temperatura de alineamiento
Tb.Th	espesor de las trabéculas
TG	triglicéridos
TGF- β	factor de crecimiento transformante β
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
Tb.N	número de trabéculas
Tb.S	separación entre trabéculas
TRAP	fosfatasa ácida tartratoresistente (tartrate resistant acid phosphatase)

UCE	unión cemento - esmalte
UFAW	Universities Federation for Animal Welfare
Veh	vehículo
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad

Capítulo I

Introducción

I. 1. Tejido óseo

I. 1. 1. Esqueleto

El sistema óseo reúne los diferentes huesos del esqueleto más los cartílagos, ligamentos y tendones que sirven para estabilizarlos o interconectarlos [Martini, 2009]. Tiene varias funciones vitales:

- ❖ Soporte: ofrece apoyo estructural a todo el cuerpo, proporcionando un armazón sobre el que fijar los tejidos blandos y los órganos.
- ❖ Protección: los tejidos y los órganos más delicados suelen estar rodeados por elementos óseos.
- ❖ Asistencia en el movimiento: la mayoría de los músculos esqueléticos se fijan a los huesos; cuando se contraen, traccionan de ellos para producir el movimiento.
- ❖ Homeostasis mineral (almacenamiento y liberación): almacena diversos minerales, especialmente calcio y fósforo.
- ❖ Producción de células sanguíneas: dentro de algunos huesos, en un tejido conectivo denominado *médula ósea roja*, se produce la hemopoyesis.
- ❖ Almacenamiento de triglicéridos: la médula ósea amarilla está constituida principalmente por adipocitos que conforman una posible fuente de energía [Martini, 2009; Tórtora, 2011].

I. 1. 2. Estructura general de los huesos

Los huesos son considerados órganos debido a que se encuentran compuestos primordialmente por tejido óseo, pero también se relacionan con cartílago, tejido conectivo denso, epitelio, tejido adiposo y tejido nervioso [Tórtora, 2011]. Según sus características, los huesos pueden ser clasificados anatómicamente en seis categorías:

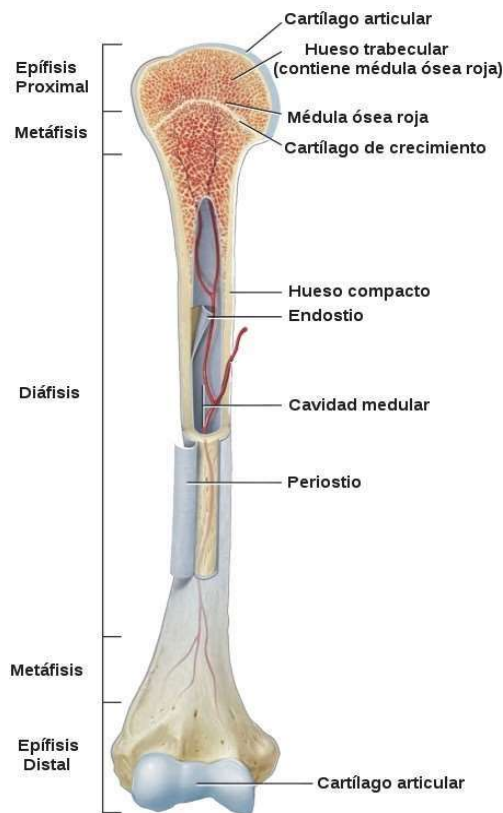
- ❖ *Huesos largos*, en la cual son relativamente largos y delgados, formando parte de las extremidades como el fémur y el húmero.
- ❖ *Huesos cortos*, poseen dimensiones similares a un cubo, están compuestos por tejido compacto y en su interior por el tejido esponjoso, por ejemplo: los huesos del carpo y del tarso.
- ❖ *Huesos planos*, poseen superficies delgadas de hueso y generalmente protegen tejidos blandos, como el caso de los que forman el techo del cráneo.
- ❖ *Huesos irregulares*, presentan formas complejas con superficies pequeñas, planas y

surcadas por escotaduras o crestas. Ejemplo de este tipo de hueso son las vértebras.

- ❖ *Huesos neumáticos*, son huecos o contienen numerosas bolsas de aires como el etmoides.
- ❖ *Huesos sesamoideos*, suelen ser pequeños, redondos y planos, se forman en el interior de los tendones, como la rótula [Martini, 2009].

En las siguientes líneas se hará hincapié en la caracterización anatómica de los huesos largos, vértebras lumbares y maxilar superior; para comprender luego los análisis realizados durante esta Tesis.

La estructura macroscópica de los huesos largos posee diferentes regiones (Figura I. 1. 2. 1). Al centro se lo llama *diáfisis*, la cual es cilíndrica y hueca, y contiene la cavidad medular. Su superficie externa se encuentra recubierta por el *periostio*, que consta de una capa fibrosa externa de tejido conjuntivo fibroso denso y una capa celular interna que contiene células osteoprogenitoras. Los extremos de los huesos largos son voluminosos y se les da el nombre de *epífisis proximal* y *distal*. Estas regiones son revestidas por *cartílago hialino articular*, que tiene como función reducir la fricción y absorber los impactos en las articulaciones móviles con otros huesos.



A su vez, las regiones comprendidas entre la diáfisis y cada una de las epífisis se les da el nombre de *metáfisis*, proximal o distal según corresponda. Si el hueso se encuentra en etapa de crecimiento, cada metáfisis contiene la *placa epifisaria* (placa de crecimiento), que es una capa de cartílago hialino que permite a la diáfisis crecer en longitud. Cuando un hueso deja de crecer longitudinalmente, el cartílago de la placa epifisaria se reemplaza por hueso, y la estructura ósea remanente se conoce como *línea epifisaria* [Tortora, 2011].

Es importante aclarar que el conducto medular no es la única cavidad en los huesos largos, ya que existen espacios entre las trabéculas del tejido esponjoso.

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

recubiertas por una membrana llamada *endostio*, que contiene una sola capa de células formadoras de hueso y escaso tejido conectivo, y es donde se aloja la *médula ósea*.

En cuanto a las características generales de las vértebras, como se observa en la Figura I. 1. 2. 1, se componen por: un *cuerpo*, que ocupa la parte anterior de este hueso y posee forma de cilindro con dos caras. Hacia posterior encontramos el *agujero vertebral* (donde se aloja la médula espinal) delimitado por el cuerpo vertebral en su parte anterior, los pedículos en sus paredes laterales, y la *apófisis espinosa* en su cara posterior, la cual se dirige hacia atrás en forma de una larga espina. Este hueso también comprende otras apófisis que son las *articulares*, dos ascendentes y dos descendentes, que como su nombre lo indica, tienen la función de articular con otras vértebras; y las *transversas* que son dos, una derecha y otra izquierda, y se dirigen transversalmente hacia afuera. Al referirnos específicamente a las vértebras lumbares, debemos reconocer que estas poseen un cuerpo bastante voluminoso, el agujero vertebral es triangular y la apófisis espinosa es cuadrilátera y horizontal [Testut, 1983].

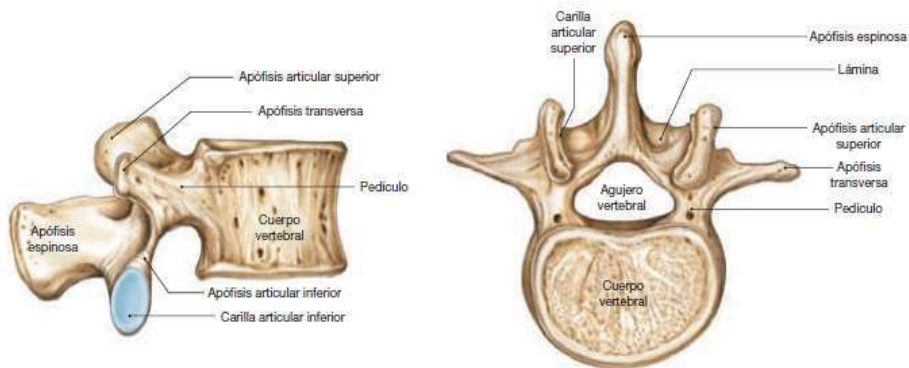


Figura I. 1. 2. 2 - Estructura de la segunda vértebra lumbar. Adaptado de Martini, 2009.

El último hueso a describir es el maxilar superior, el cual es parte de los huesos craneofaciales, específicamente de los que forman la mandíbula superior. Es un hueso par, de forma cuadrilátera, ligeramente aplanada de afuera hacia adentro. En la cara interna, presenta la *apófisis palatina*, la cual se articula con la de su lado opuesto, constituyendo el piso de las fosas nasales. En la cara externa se sitúa la *apófisis piramidal o frontal*, la cual es una gran eminencia transversal que forma parte del suelo de la órbita y del reborde orbitario. En el borde inferior, también llamado borde alveolar, se hallan los *alvéolos* de los dientes, que son cavidades más o menos espaciales. Por último, en su interior encontramos el *seno maxilar* [Testut, 1983].

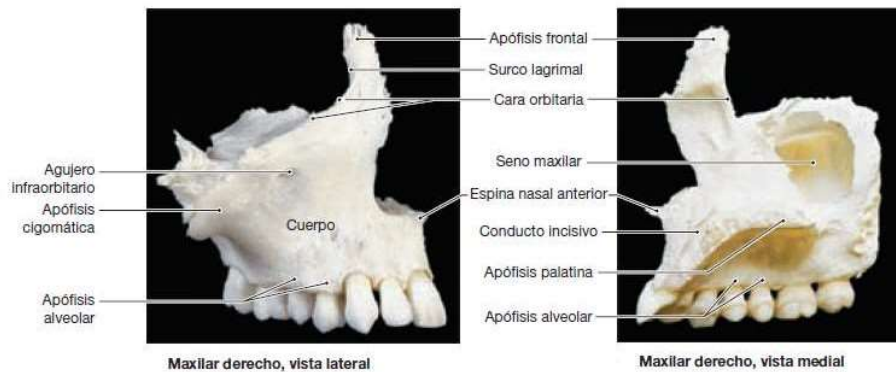


Figura I. 1. 2. 3 - Estructura del maxilar superior. Adaptado de Martini, 2009.

I. 1. 3. Tejido óseo

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo que tiene como principal característica poseer una matriz extracelular mineralizada, lo que produce un tejido muy duro capaz de proporcionar sostén y protección [Ross, 2007].

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

Existen dos tipos de tejido óseo: el *tejido óseo compacto* o *cortical* y el *tejido óseo esponjoso* o *trabecular*, que varían de acuerdo al tamaño y distribución de espacios que se encuentre en los mismos. Aproximadamente el esqueleto se encuentra compuesto por un 80% de hueso cortical y por un 20% de hueso trabecular [Tórtora, 2011]. A su vez, los diferentes huesos y sitios esqueléticos dentro de estos tienen diferentes proporciones de hueso cortical a trabecular. Por ejemplo, la vértebra está compuesta de hueso cortical a trabecular en una proporción de 25:75 y esta relación es 50:50 en la cabeza femoral [Clarke, 2008].

❖ *Tejido óseo cortical o compacto*: es una estructura densa y sólida. Se encuentra por debajo del periostio de todos los huesos y forma la mayor parte de las diáfisis de los huesos largos. A pesar de su remodelado de sólo el 2-3% anual, cumple sus funciones de brindar protección y soporte, y ofrecer resistencia a la tensión causada por el peso y el movimiento. Este tipo de tejido está formado por unidades estructurales repetidas llamadas *osteonas* o *sistema de Havers*. Las mismas se componen de matriz ósea dispuesta en *laminillas concéntricas*, conteniendo aproximadamente 15 de ellas, formadas casi exclusivamente por fibras de colágeno tipo 1. Las laminillas rodean un cilindro central llamado *conducto de Havers*, que posee: capilares, fibras nerviosas y tejido conectivo en su interior, y tienen un trayecto paralelo a la

superficie del hueso. Otros conductos, llamados *conductos de Volkmann*, comunican a los conductos de Havers entre sí y con las superficies externa e interna del hueso, atravesando el tejido óseo en sentido casi transversal. En diferencia con el conducto principal, los de Volkmann no están rodeados por laminillas concéntricas.

Entre este tipo de laminillas hay pequeños espacios denominados *lagunas*, que contienen los núcleos de los *osteocitos*. Estos poseen numerosas prolongaciones que transcurren en unos canales estrechos que tienen el nombre de *canaliculos*, los cuales tienen ramificaciones que permiten realizar una red de unión con otras lagunas y los demás conductos de la osteona. De esta manera, los osteocitos pueden recibir y secretar sustancias entre ellos y desde/hacia los vasos sanguíneos.

Entre los sistemas de Havers se encuentran restos de laminillas provenientes de estos sistemas ya degradados, denominados *laminillas intersticiales*. Por último, justo por debajo del periostio y el endostio se encuentra una capa relativamente delgada de laminillas, las *laminillas circunferenciales externas e internas*.

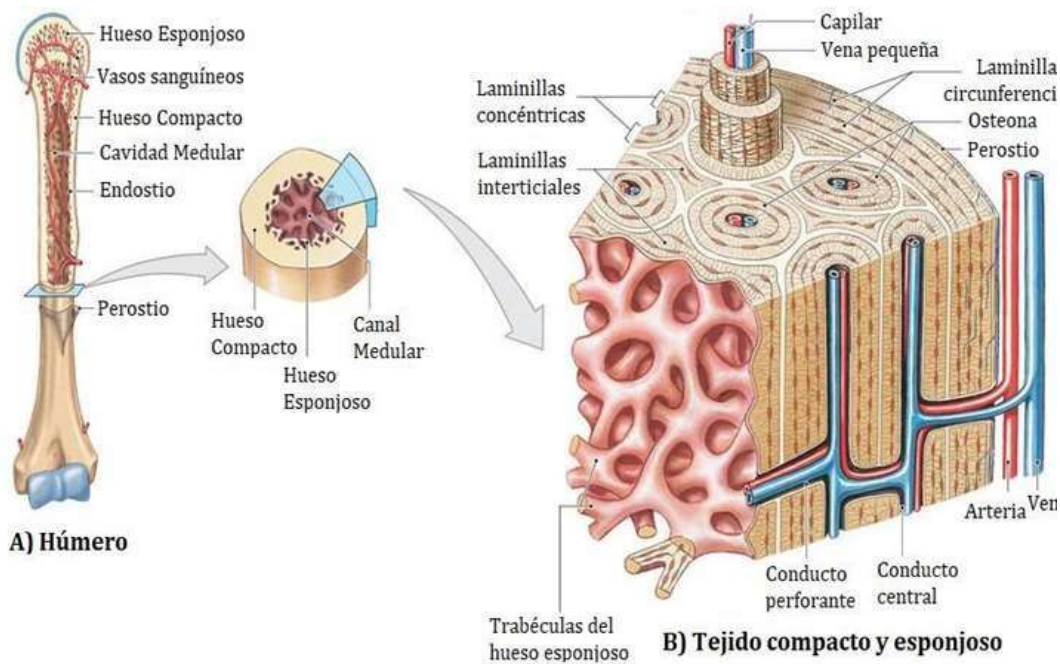


Figura I. 1. 3. A. 1 -Estructura del tejido óseo. A) Anatomía macroscópica del húmero. B) Vista esquemática sobre la organización histológica del hueso compacto y esponjoso. Adaptado de Martini, 2009.

Tejido óseo trabecular o esponjoso: se encuentra organizado en láminas gruesas ramificadas llamadas *trabéculas*, que poseen un patrón irregular y tienen gran cantidad de interconexiones entre sí. Entre estas láminas existen numerosos espacios, donde se aloja la

médula ósea roja (que produce las células sanguíneas) o médula ósea amarilla (tejido adiposo) según cada hueso. La ramificación de las trabéculas otorga al tejido esponjoso una considerable resistencia, aunque tenga un peso relativamente liviano, lo que sirve para aligerar el esqueleto y facilitar que los músculos pongan en movimiento a los huesos. Estas tienen una orientación precisa a lo largo de las líneas de fuerza, característica que permite al hueso resistir y transmitir fuerzas sin romperse. Este tipo de tejido se aloja siempre en el interior del hueso recubierto por tejido óseo cortical, encontrándose en la profundidad de: huesos cortos, planos, sesamoideos e irregulares, y en el seno de las epífisis de los huesos largos.

Su unidad funcional es la *osteona trabecular*, que tiene la forma de un disco plano y se encuentra formada por alrededor de 20 laminillas dispuestas de manera paralela a la superficie de dicho disco. Estas laminillas están compuestas de idéntica forma que las corticales.

En el tejido óseo trabecular no hay vasos sanguíneos, por lo que la nutrición de los osteocitos se produce por difusión desde la superficie del endostio a través de los canaliculos comunicantes.

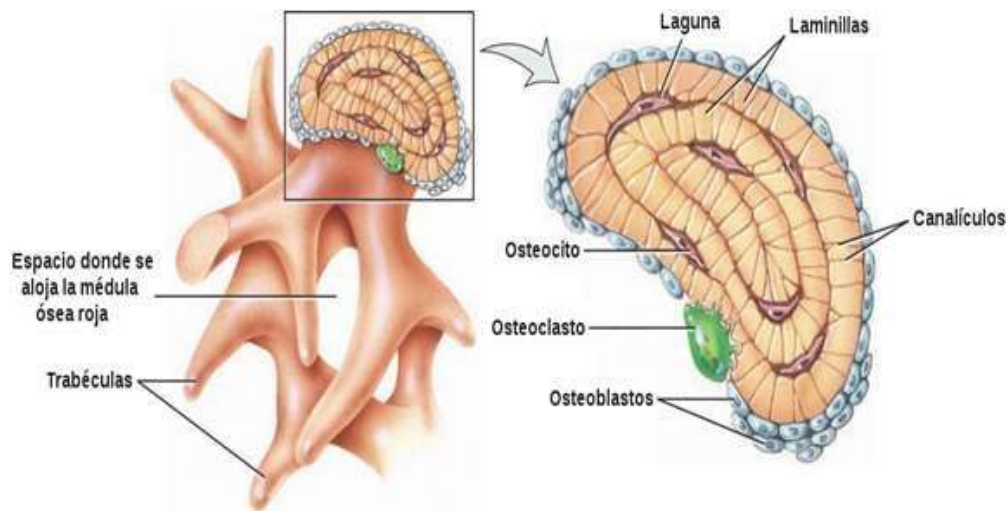


Figura I. 1. 3. A. 2 - Estructura histológica del hueso trabecular o esponjoso [Tortora, 2011].

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

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

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

El tejido óseo se diferencia del resto de los tejidos conjuntivos debido a que posee una matriz extracelular mineralizada. Esta se encuentra compuesta por una matriz orgánica, que le brinda propiedades elásticas y de resistencia a la tracción, y por sales minerales, que son las encargadas de dar resistencia a la compresión [Geneser, 2006].

La matriz orgánica está formada principalmente por *fibras colágenas* incluidas en una *sustancia fundamental*, y representa entre un 20 y 40% del hueso. Las fibras colágenas del tejido óseo se componen fundamentalmente de colágeno de tipo I y en menor medida de colágeno tipo V. También se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos III, XI, XIII. Todas las moléculas de colágeno constituyen alrededor del 90% del peso total de las proteínas de la matriz ósea [Ross, 2007].

La sustancia fundamental posee proteoglicanos compuestos principalmente por una proteína central con diferentes cantidades de cadenas laterales de glucosaminoglicanos (GAG) como: hialuronano, condroitín sulfato y queratán sulfato, y otras proteínas no colágenas. Dentro de estas, comprenden proteínas séricas, derivadas de manera exógena, como la albúmina sérica, la α 2-SH-glicoproteína y factores de crecimiento (factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de necrosis tumoral α (TNF α), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), entre otros) que colaboran en regular la mineralización de la matriz y la proliferación de células óseas. Otras proteínas no colágenas sintetizadas por osteoblastos se clasifican en: *proteínas glicosiladas*, como la fosfatasa alcalina y la osteonectina; *proteínas que contienen ácido γ -carboxiglutámico*, que es el caso de la osteocalcina; y *glicoproteínas adhesivas*, como la osteopontina y la sialoproteína ósea.

El componente inorgánico representa 50-70% del hueso. Está compuesto mayoritariamente por fosfato de calcio cristalino en forma de cristales de hidroxiapatita, con fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Tienen aspecto de varas o placas finas y se disponen entre los extremos de las moléculas de colágeno de las fibrillas y entre las propias fibrillas colágenas [Geneser, 2006]. Además del fosfato de calcio, la matriz inorgánica contiene magnesio, potasio, sodio, carbonato y citrato. Una serie de elementos normalmente extraños al tejido óseo también son capaces de unirse a los cristales de hidroxiapatita, por ejemplo, estroncio, fluoruro, iones de plomo, oro y otros metales pesados [Geneser, 2006].

I. 1. 3. B. ii. Células

En el hueso existen diferentes tipos de células. En esta sección se describirán aquellas presentes en el tejido óseo: células progenitoras de médula ósea, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y células de revestimiento; y un tipo en particular de la médula ósea, las células estromales mesenquimáticas.

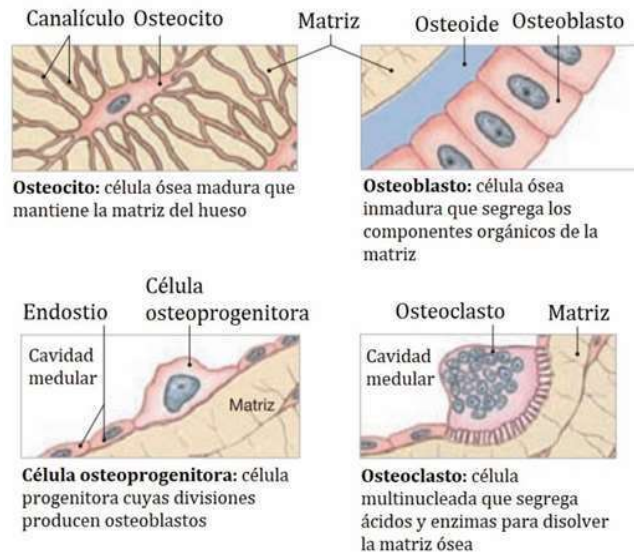


Figura I. 1. 3. B. ii. 1 - Células del tejido óseo. Adaptado de Martini, 2009.

a. Células estromales mesenquimáticas

Las células estromales mesenquimáticas (MSC, siglas del inglés mesenchymal stromal cells) son células indiferenciadas provenientes de tejidos mesenquimáticos, como tejido adiposo y médula ósea; y poseen la capacidad de autorreplicarse y diferenciarse [Keating, 2012].

Son caracterizadas principalmente por: su capacidad de proliferar en cultivo al tener la capacidad de adherirse al plástico, tomando una morfología fibroblástica en forma de huso, bien extendida y unida; definirse como multipotentes, debido a que se diferencian en osteoblastos, adipocitos y condroblastos al utilizarse condiciones estándar de diferenciación de tejidos en cultivos *in vitro*; y expresar diferentes antígenos específicos de superficie (CD 105, CD 73 y CD90) [Pittenger, 1999; Deans, 2000; Dominici, 2006].

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

Los factores involucrados en la diferenciación selectiva de las células estromales mesenquimáticas hacia el fenotipo osteoblástico serán tratados en la Sección I.1.4.

b. Células osteoprogenitoras

Las células osteoprogenitoras se originan en el mesénquima fetal cerca de los centros de osificación, diferenciándose a partir de las MSC. Aparecen en médula ósea, endostio y en la

capa profunda del periostio después del parto y durante el resto de la vida posnatal. Son similares a los fibroblastos, dado que poseen núcleos ovales claros y citoplasma claro con límites irregulares. Durante la formación del hueso, que comprende la vida fetal y la etapa de crecimiento, se dividen y se diferencian a osteoblastos. En la edad adulta, esto puede observarse en la reparación de fracturas, modelado y remodelado [Geneser, 2006].

c. *Osteoblastos*

Los osteoblastos son células diferenciadas a partir de las células osteoprogenitoras, y están involucradas en la formación de hueso. Los precursores de osteoblastos cambian su forma de huso a osteoblastos diferenciados cuboides grandes en las superficies de la matriz ósea después de que los pre-osteoblastos dejan de proliferar. Aquellas células maduras y activas se observan en las regiones donde se está sintetizando nueva matriz como una única capa de células cúbicas. Tienen núcleos grandes que suelen localizarse en la porción de la célula orientada en dirección opuesta a la del hueso recién formado, un citoplasma muy basófilo, estructuras de Golgi prominentes, un retículo endoplásmico extenso y tienen prolongaciones que los comunican con los osteocitos vecinos [Ross, 2007; Clarke, 2008; Geneser, 2006].

Estas células secretan tanto el colágeno tipo 1 como las proteínas de la matriz ósea (proteínas fijadoras de calcio como la osteocalcina y la osteonectina, las glucoproteínas multiadhesivas como las sialoproteínas óseas, la trombospondina, proteoglicanos y sus agregados), que constituyen la matriz no mineralizada inicial, llamada *osteóide*. También secretan FAL con el fin de mineralizar la matriz nombrada anteriormente [Ross, 2007].

La vida de un osteoblasto puede continuar de tres maneras diferentes: transformarse en un osteocito, en una célula de revestimiento o sufrir una muerte celular programada [Manolagas, 2010].

d. *Osteocitos*

Los osteocitos son las células más abundantes en los huesos (diez veces más que los osteoblastos) y se encuentran ubicadas regularmente dentro de la matriz ósea. Proviene de las MSC a través de la diferenciación de osteoblastos, lo que ocurre al quedar inmersos dentro de lagunas de matriz mineralizada. Estas células experimentan una transformación dramática, de una forma poligonal a una célula con un citoplasma reducido que extiende prolongaciones citoplasmáticas hacia el frente de mineralización, al espacio vascular o la superficie ósea. A su vez, a través de estas prolongaciones pueden comunicarse entre sí [Manolagas, 2010];

Bonewald, 2011]. También tienen contacto en forma indirecta mediante distintas moléculas señal con osteoblastos, pericitos de vasos sanguíneos y otras células óseas distantes [Ross, 2007].

A medida que el osteoblasto se diferencia en un osteocito, la FAL se reduce y la caseína quinasa II se eleva, al igual que la osteocalcina, galectina 3 y CD44, un receptor para hialuronato que sirve para la adhesión celular [Clarke, 2008; Bonewald, 2011].

En los últimos años, interesantes descubrimientos han demostrado que los osteocitos son en realidad células multifuncionales con muchas acciones reguladoras claves en la homeostasis ósea y mineral [Dallas, 2013]. Estas funciones se detallan a continuación.

Los osteocitos tienen el rol de *mecanorreceptores* y *mecanotransductores*. La carga mecánica que recibe el esqueleto regula la osteogénesis y la resorción ósea, a través de la actividad de osteoblastos y osteoclastos. Los osteocitos registran la presencia o ausencia de cargas mecánicas y las transforman en señales bioquímicas para enviar a las células de la superficie ósea. Cuando un hueso se carga mecánicamente, el osteocito puede detectar varios estímulos posibles. Estos incluyen la deformación física de la matriz ósea en sí, y el flujo de fluido canalicular inducido por la carga que es capaz de deformar el cuerpo de la célula en la laguna, y las prolongaciones en los canaliculos [Bonewald, 2011; Dallas, 2013]. Por último, el osteocito convierte la señal de deformación mecánica percibida en una respuesta biológica. La carga normal del esqueleto provoca que estas células envíen señales que inhiben la actividad de osteoclastos como: óxido nítrico (NO), prostaglandina E2, IGF, ATP y elevación del Ca^{2+} intracelular. Cuando existe falta de carga, como en el caso de la inmovilización, hay señales para activar la resorción ósea: RANKL y M-CSF que promueven la formación de nuevos osteoclastos, y esclerostina que inhibe la actividad de osteoblastos [Dallas, 2013].

Los osteocitos *modifican su matriz perilacunar*. Estas células pueden eliminar y reemplazar su matriz perilacunar, por ejemplo, durante los procesos relacionados con la función reproductiva normal. Esto sugiere que los osteocitos pueden desempeñar un papel en la homeostasis mineral durante condiciones de alta demanda de calcio, como la lactancia, y también por la acción de la hormona paratiroidea (PTH). A causa de esto, Dallas propone que "el término "osteólisis osteocítica" se reserve para afecciones patológicas, mientras que el término "remodelación perilacunar" se use para la función del osteocito sano".

Los osteocitos como *fuentes de factores y reguladores del metabolismo mineral*. La *esclerostina* es un antagonista de un regulador positivo de la masa ósea, proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 (LRP5), por lo que inhibe la actividad de los osteoblastos. Los osteocitos secretan esta proteína. La carga mecánica reduce sus niveles en hueso, mientras que la descarga aumenta la expresión. El *factor de crecimiento fibroblástico 23* (FGF23) es altamente expresado

en los huesos, predominantemente por los osteocitos, teniendo como acciones inhibir la reabsorción de fosfatos por el túbulo contorneado proximal, promover la disminución de los niveles de calcitriol al disminuir la actividad de la 1α -hidroxilasa renal y bloquear la síntesis/liberación de la PTH [Dallas, 2013].

El osteocito puede morir por: necrosis, apoptosis y autofagia, cada uno de los cuales puede tener efectos reguladores específicos sobre otras células del tejido óseo. Por ejemplo, al dañarse el hueso, este requiere reemplazo. Las microgrietas generadas pueden dañar el osteocito y sus procesos, lo que induce a la célula a enviar señales de reclutamiento de osteoclastos para iniciar la resorción del hueso y continuar posteriormente con la reparación. Además, los osteocitos apoptóticos pueden apoyar la formación de osteoclastos al aumentar la liberación de RANKL y disminuyendo la producción de osteoprotegerina (OPG). La apoptosis de los osteocitos suele darse en personas con deficiencia de estrógenos o expuestos a un tratamiento con glucocorticoides [Clarke, 2008; Dallas, 2013].

e. *Osteoclastos*

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas que degradan el hueso y se encuentran directamente sobre la superficie ósea en proceso de resorción. Poseen un diámetro de hasta 100 μm y pueden contener entre 5 y 10 núcleos. En un principio, sus citoplasmas son algo basófilos, pero al madurar adquieren una acidofilia que les es característica debido a la gran cantidad de mitocondrias. También contienen muchos lisosomas que poseen en su interior catepsina K, metaloproteinasas de la matriz (MMP) y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) [Geneser, 2006; Ross, 2007].

Estas células derivan de las células progenitoras de granulocitos/monocitos (CFU-GM), lo que la diferencia del resto de las células del tejido óseo. Las CFU-GM se diferencian a células progenitoras de osteoclastos, las cuales llegan al tejido óseo por el torrente sanguíneo o por migración directa, asociándose con las células del estroma de la médula ósea, que secretan factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF) y varias interleucinas (IL), con el fin de lograr su diferenciación a pre-osteoclastos. Finalmente, por fusión de las mismas se obtienen los osteoclastos maduros multinucleados [Geneser, 2006; Ross, 2007].

Para producirse la osteoclastogénesis, es necesario un contacto directo entre una serie de moléculas que son expresadas en la membrana de los osteoblastos con otras que se expresan en la membrana de los pre-osteoclastos. Una de ellas es el ligando del receptor

activador de NF κ B (RANKL), un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), que se expresa en la superficie de las células formadoras de hueso e interactúa con su receptor RANK en precursores de osteoclastos [Novack, 2008]. Además, tiene como función la remodelación del hueso, estimulando la resorción ósea por osteoclastos, lo que a su vez estimula la síntesis ósea por osteoblastos muy adyacentes, proceso llamado "acoplamiento" [Boyle, 2003]. TNF α , una citoquina inflamatoria, también promueve la diferenciación de osteoclastos al actuar sinérgicamente con RANKL. Cuando existe una cantidad mínima de uno, se mejoran las propiedades osteoclastogénicas del otro, aunque se sabe que TNF α requiere niveles constitutivos de RANKL [Novack, 2008].

Otra molécula participante en la diferenciación de osteoclastos es el factor estimulante de colonias macrofágicas, M-CSF. Promueve la proliferación de precursores y la supervivencia de todos los miembros del linaje de osteoclastos, al unirse al receptor de tirosina quinasa c-Fms presente en la membrana de los precursores de osteoclastos. En procesos inflamatorios, el TNF α estimula la expresión de M-CSF y, por lo tanto, este factor desempeña un papel fundamental en la pérdida ósea en enfermedades como la osteólisis inflamatoria [Novack, 2008].

Por último, receptores ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) son expresados en los pre-osteoclastos, los cuales se unen a sus ligandos, presentes en las membranas de los osteoblastos. Este contacto provoca una señal adicional para la diferenciación de las células resorptivas.

Una proteína secretada por osteoblastos, que regula negativamente la osteoclastogénesis, es la OPG. Regula la densidad y masa ósea al actuar como un receptor señuelo de alta afinidad para RANKL, lo que impide la unión de este ligando con RANK [Roodman, 1999; Boyle, 2003].

Como factores pro-resorptivos encontramos: 1,25(OH) $_2$ vit-D $_3$, PTH, PTHrP, PGE $_2$, IL-1, IL-6, TNF, prolactina, corticoesteroides, entre otros. Ejemplos de factores anti-resorptivos o anabólicos son: estrógenos, calcitonina, BMP 2/4, TGF- β , IL-17, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), niveles de calcio plasmático [Boyle, 2003].

El proceso de resorción ósea provoca la polarización del osteoclasto, la cual comienza con la unión de estas células a la matriz ósea mediante los receptores de integrina de su membrana. La superficie de resorción ósea desarrolla un borde ondulado que se forma cuando las vesículas acidificadas que contienen MMP y catepsina K se transportan a través de los microtúbulos para fusionarse con la membrana. Primeramente, para la desmineralización de la matriz ósea, los osteoclastos secretan iones H $^+$ mediante una ATPasa. Luego por acción de las enzimas liberadas por exocitosis digieren la matriz proteica [Clarke, 2008]. Son capaces de

fagocitar los restos de osteocitos, colágeno y mineral [Geneser, 2006].

Los osteoclastos pueden sufrir apoptosis, que es caracterizada por condensación nuclear y citoplasmática, y fragmentación de su ADN [Roodman, 1999].

f. *Células de revestimiento*

Al finalizar la formación ósea, aproximadamente del 50 al 70% de los osteoblastos sufren apoptosis, y el resto se convierte en osteocitos o células de revestimiento [Clarke, 2008]. Esto último se logra reduciendo su citoplasma y maquinaria de organelas para transformarse en células quiescentes [Teti, 2011]. Se organizan en una capa simple de células planas sobre una capa delgada de osteoide (matriz ósea no mineralizada) en las superficies óseas internas y externas en las que no hay remodelado óseo, tomando el nombre de células endólicas y periólicas respectivamente [Geneser, 2006].

Poseen prolongaciones citoplasmáticas con las que se involucran en funciones como regular el flujo de entrada y salida de iones minerales (calcio y fósforo) dentro y fuera del fluido extracelular óseo, e intervienen en el mantenimiento y el soporte nutricional de los osteocitos incluidos en la matriz ósea [Ross, 2007]. A su vez, conservan la capacidad de rediferenciarse en osteoblastos tras la exposición a PTH o fuerzas mecánicas [Clarke, 2008].

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

La mineralización, también llamada calcificación, comprende el depósito de minerales en la matriz orgánica del cartílago y el tejido óseo, que recibe el nombre de *osteoide* [Geneser, 2006]. Este proceso es un fenómeno regulado por células y proporciona rigidez mecánica y resistencia de carga al hueso [Ross, 2007; Clarke, 2008]. Consta de dos etapas: la *mineralización primaria*, comienza entre los 10 y 20 días posteriores a la formación de la matriz orgánica y tiene una duración de 3 a 4 días. En ella se deposita el 80% del mineral óseo. La finalización del proceso ocurre en la *mineralización secundaria*, donde los cristales de hidroxiapatita (HA) crecen al reemplazar el agua ligada a ellos por mineral [Geneser, 2006]. Esto permite la reducción del nivel de impurezas y el incremento de tamaño de dichos cristales por su crecimiento o agregación [Clarke, 2008].

En el proceso de mineralización, los minerales son depositados en los “huecos” disponibles entre los extremos de las fibrillas de colágeno. Primeramente, condrocitos y osteoblastos desarrollan *vesículas matriciales*, que incorporan iones calcio mediante diferentes

proteínas de unión a calcio, e iones fosfato por actividad de fosfohidrolasas (principalmente FAL). Estas vesículas funcionan como microambientes protegidos en los que las concentraciones de estos minerales pueden aumentar lo suficiente como para precipitar. A continuación, comienza la liberación de cristales de HA preformados en el osteoide que rodea a los osteoblastos [Anderson, 2003; Clarke, 2008].

La maduración de la matriz extracelular se asocia con la expresión de FAL y proteínas no colágenas como osteocalcina, osteopontina y sialoproteína ósea; que ayudan al depósito ordenado de minerales al regular la cantidad y el tamaño de los cristales de HA formados [Clarke, 2008]. A su vez, los colágenos tipo II y X unidos a las superficies externas de las vesículas matriciales pueden servir como puente en la propagación de cristales sobre las fibrillas de colágeno en una matriz orientada espacialmente [Anderson, 2003].

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

Se denomina *osificación* a la formación de tejido óseo y tiene lugar cada vez que los osteoblastos sintetizan y secretan matriz ósea orgánica que poco después se mineraliza. El desarrollo del hueso se clasifica en *osificación endocondral* y *osificación intramembranosa*, y la diferencia entre estos procesos radica en si un modelo de cartílago funciona como precursor óseo o si el hueso está formado por un método más sencillo, sin la intervención de un cartílago precursor [Geneser, 2006; Ross, 2007].

La formación ósea intramembranosa tiene lugar en las placas membranosas densas de mesénquima del feto, lo cual ocurre cuando las células mesenquimáticas se diferencian a osteoblastos. Estos secretan matriz ósea orgánica que luego es mineralizada. Los huesos planos del cráneo, partes de la mandíbula y la mayor parte de la clavícula se desarrollan de esta manera. El resto de los huesos se forman por osificación endocondral, que es realizada sobre un molde preformado de cartílago hialino embrionario rodeado de pericondrio. La formación ósea comienza en las cercanías del centro de la futura diáfisis, donde aparecen los centros de osificación primarios [Geneser, 2006]. Durante la vida, los huesos crecen longitudinal y radialmente, y experimentan procesos de modelado y remodelado.

El modelado es el proceso por el cual los huesos cambian su forma general en respuesta a influencias fisiológicas o fuerzas mecánicas. Estos pueden aumentar su ancho o cambiar de eje ya que la formación de hueso puede ocurrir en superficies óseas inactivas sin que ocurra resorción ósea por medio de los osteoclastos. A su vez, estos procesos no se

encuentran acoplados y lo que predomina es la síntesis ósea [Kobayashi, 2003; Clarke, 2008]. El modelado ocurre durante la etapa de crecimiento (infancia y primera juventud), donde la masa ósea total posee un incremento constante. El esqueleto alcanza su masa ósea máxima alrededor de los 30 años, cuando el mismo ya adquirió su tamaño y forma definitivos [Geneser, 2006].

El remodelado es el proceso por el cual el hueso se renueva para mantener la resistencia ósea y la homeostasis mineral. Comienza antes del nacimiento y continúa hasta la muerte, enlenteciéndose con el envejecimiento. Cuando disminuye la actividad de modelado, la remodelación se convierte en la principal actividad de recambio óseo. La resorción de hueso viejo precede a la formación del hueso nuevo, lo que permite evitar la acumulación de microdaños. Cada una de estas actividades se realizan de manera acoplada creando una unidad remodeladora ósea (BRU) compuesta por osteoclastos y osteoblastos [Kobayashi, 2003; Clarke, 2008]. Este proceso se compone de cinco etapas secuenciales:

1- *Activación*: se produce el reclutamiento de los precursores osteoclásticos de la circulación, desprendimiento de las células de revestimiento del endostio y fusión de los precursores para formar osteoclastos maduros [Clarke, 2008].

Los microdaños acumulados o los cambios de tensiones afectan las tensiones locales cerca de los osteocitos o dañan la red que los conecta, lo que induce la apoptosis de estas células. Esto desencadena un aumento de la osteoclastogénesis que posteriormente se verá reflejada en el incremento de la resorción de la matriz ósea deteriorada [Burr, 2002; Henriksen, 2009].

2- *Resorción*: Los osteoclastos resorben preferentemente hueso viejo ya que contienen menos osteocitos vivos [Henriksen, 2009] constituyendo un cono de corte que se desplaza por el hueso que tendrá una forma cilíndrica con un diámetro correspondiente al de la osteona [Geneser, 2006]. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor insulino-símil I y II).

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

3- *Inversión*: en esta etapa se comienza a detener la resorción para darle lugar a la formación ósea. Las células de revestimiento y los pre-osteoblastos median la limpieza de las lagunas de resorción antes de iniciar la diferenciación en osteoblastos maduros que permitan la formación de hueso. Las células que revisten el hueso eliminan las fibras de colágeno sobrantes a través de la síntesis de colagenasas [Hauge, 2001; Henriksen, 2009].

Existen moléculas de la familia ephrin que funcionarían como señales que favorecen tanto la

degradación del colágeno como la diferenciación osteoblástica [Henriksen, 2009].

4- *Formación*: los osteoblastos sintetizan una nueva matriz orgánica de colágeno y regulan su mineralización. Aquellos que quedan rodeados y enterrados dentro de la matriz se convierten en osteocitos [Clarke, 2008]. La formación ósea podría comenzar como respuesta a señales parácrinas sintetizadas por los osteoclastos o a moléculas liberadas durante la resorción, como TGF- β e IGF-I [Henriksen, 2009].

5- *Terminación*: al finalizar la formación ósea, aproximadamente del 50 al 70% de los osteoblastos sufren apoptosis, y el resto se convierte en osteocitos o células de revestimiento [Clarke, 2008]. Si bien no se saben exactamente los mecanismos que regulan esta etapa, existen evidencias que la esclerostina producida por osteocitos podría participar en la regulación del equilibrio entre los osteoblastos formadores de hueso y las células de revestimiento [Henriksen, 2009].

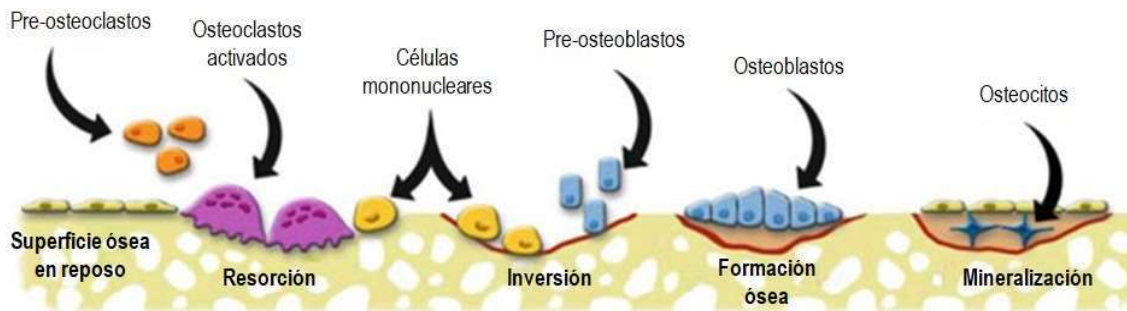


Figura I. 1. 3. D. 1 - Etapas del remodelado óseo. Adaptado de Aydin, 2016.

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

Las MSC ubicadas en la médula ósea tienen el potencial de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. La elección del fenotipo dependerá de las condiciones de su microambiente, involucrando numerosos factores de transcripción y vías de señalización que regularán este proceso.

Se llama osteoblastogénesis al proceso por el cual las MSC se diferencian en células progenitoras, para posteriormente hacerlo en pre-osteoblastos y, por último, en osteoblastos maduros. Runx2 (Runt related transcription factor 2) es el principal regulador transcripcional requerido para la determinación de este linaje, pero también se encuentran implicados otros como: osterix, β -catenina y CREB2 (cAMP response elements binding protein2) [Marie, 2008].

Runx2 es un miembro de la familia de factores de transcripción Runt y es expresado por células mesenquimales desde el inicio del desarrollo del esqueleto. Su expresión aumenta de pre-osteoblastos a osteoblastos inmaduros, pero se reduce durante la maduración de estas células. Esto explica su regulación durante la etapa de diferenciación ósea sobre los principales genes de la matriz ósea, como colágeno tipo 1, osteocalcina, osteopontina y sialoproteína ósea; y su rol no esencial en mantener estas expresiones en osteoblastos maduros. A su vez, Runx2 debe ser suprimido para formar hueso maduro y controla negativamente la proliferación de osteoblastos al actuar sobre su ciclo celular [Marie, 2008; Komori, 2010; Liu, 2013].

Existen diferentes evidencias, logradas a partir de estudios realizados en modelos experimentales con ratones, que marcan una conexión entre osteoblastogénesis y adipogénesis. La presencia de sustancias en el medio promueve la expresión de factores osteoblastogénicos y la inhibición de factores adipogénicos o viceversa. Se ha demostrado que la supresión de PPAR γ (del inglés peroxisome proliferator activated receptor gamma) desarrolló una notoria mejora en la osteoblastogénesis en simultáneo con un detrimento en la diferenciación adipogénica. Asimismo, muchos factores como tratamientos farmacológicos, dietas o condiciones metabólicas, pueden alterar este balance concluyendo en la modificación de la relación osteoblastos/adipocitos en la médula ósea [Nuttall; 2004; Kawai, 2013].

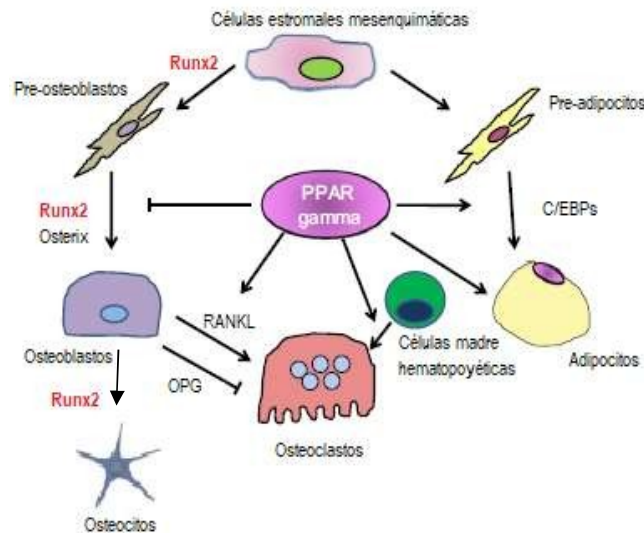


Figura I. 1. 4. 1 - Rol de los factores de transcripción Runx2 y PPAR γ . Adaptado de Kawai, 2013.

I. 1. 5. Técnicas para la evaluación de la microarquitectura y masa ósea en modelos animales

I. 1. 5. A. Técnicas histológicas

La histomorfometría es el único método que permite analizar directamente *in situ* las células óseas, posibilitando evaluar su número, estado y actividad [Iwaniec, 2008]. Su utilización también puede proporcionarnos información sobre índices dinámicos de la remodelación ósea y de la microarquitectura del hueso mediante análisis estereológicos [Rosen, 2000].

Según el análisis del hueso deseado, se utilizarán muestras calcificadas o descalcificadas. Las primeras son inmersas en resinas, como metilmetacrilato, donde quedan incluidas en un bloque sólido. Posteriormente se realizan las secciones con micrótomos equipados de una cuchilla de carburo de tungsteno, que tiene las propiedades necesarias para poder realizar cortes en estos tipos de tejido. En cambio, cuando se desea descalcificar las muestras se utilizan agentes quelantes (como EDTA) o soluciones acuosas de ácidos fuertes (HCl o HNO₃) o débiles (ácido fórmico) para remover y eliminar los minerales de la matriz ósea. Luego se las incluyen en parafina y se seccionan con micrótomos convencionales.

Una vez realizados estos pasos, las secciones son coloreadas según el análisis a realizar, utilizando tinciones como: Hematoxilina & Eosina, Fosfatasa ácida tartrato resistente, von Kossa con Tetrachrome como contracoloreante, entre otras.

Utilización de fluorocromos para determinación de superficies de mineralización activa

Los fluorocromos son sustancias utilizadas para realizar marcaciones en las superficies óseas mineralizadas con el fin de realizar una medición cuantitativa de la formación ósea y de la dinámica de remodelación del hueso. Pueden visualizarse en muestras histológicas por su fluorescencia bajo excitación con ultravioleta (UV) [An, 2003; Iwaniec, 2008].

Su administración puede ser por inyección subcutánea, por vía oral o parenteral, ingresando en el torrente sanguíneo para finalmente incorporarse de manera irreversible al frente del nuevo tejido óseo mineralizado. Esto sucede ya que los fluorocromos se unen al mineral mediante la quelación de iones de calcio de los cristales de HA recién formados, lo que se debería al menor tamaño de los cristales de apatita durante las etapas iniciales de este proceso. Es por esta razón, que las muestras no deben descalcificarse ya que perderían las marcaciones realizadas con estas sustancias [An, 2003].

Generalmente se utilizan dos o tres fluorocromos diferentes para generar marcaciones

dobles o triples que permitan observar las superficies óseas que fueron mineralizadas en el momento de sus inyecciones. El intervalo de las mismas es mayor en las ratas mayores para compensar la disminución de depósito y mineralización de la matriz generado por la edad [Iwaniec, 2008].

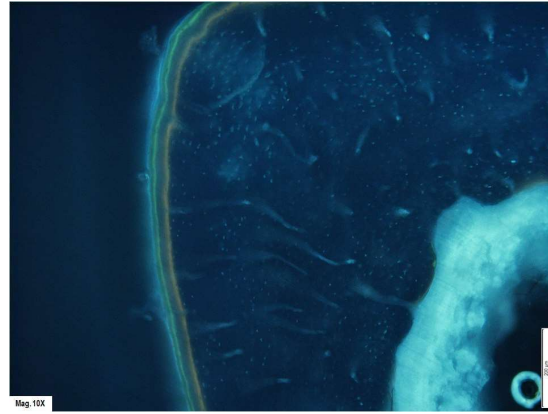


Figura I. 1. 5. A. 1 – Marcación doble con demeclociclina y calceína en diáfisis de tibia de ratas.

Los compuestos más utilizados para realizar marcaciones de este tipo son las tetraciclinas (demeclociclina, clortetraciclina y oxitetraciclina) y fluoresceínas (calceína y calceína azul). El uso de fluorocromos de diferentes colores permite ver distintas marcaciones a distintos tiempos [An, 2003].

I. 1. 5. B. Técnicas con imágenes

Las técnicas con imágenes se utilizan generalmente para estudiar efectos sobre: el esqueleto en diferentes situaciones como traumatismos, envejecimiento, distintos tipos de patologías asociadas con metabolismo, mutaciones génicas, cáncer, entre otras; y cómo funcionan sus tratamientos. Las técnicas frecuentemente realizadas son:

❖ Radiografías: Se basa en la emisión de un haz de rayos X que translumina a la muestra y de acuerdo a la densidad de los tejidos provocará regiones más claras y oscuras en la placa reveladora que se coloca detrás de dicha muestra. En las regiones donde los haces alcanzan la placa se obtendrán zonas oscuras. En cambio, los tejidos densos, como el hueso cortical, absorben mayor cantidad de radiación que otros menos densos como el hueso trabecular o tejidos blandos, y se corresponderán con las zonas blancas en la placa reveladora. Las radiografías se utilizan para evaluar aspectos generales de la morfología esquelética en dos dimensiones, teniendo la ventaja de ser rápidas y muy económicas.

❖ Absorciometría de rayos X de doble energía (DXA): Es uno de los métodos más usados para medir la densidad mineral ósea (DMO). DXA utiliza haces altamente colimados que atraviesan los tejidos blandos y óseos del cuerpo y son captados por un detector colocado en el lado opuesto. La intensidad del haz que sale del cuerpo y luego se refleja en el detector es

inversamente proporcional con la densidad de los tejidos evaluados [Chun, 2011].

La DMO es evaluada generalmente en columna vertebral (anteroposterior) y cadera ya que son los sitios más comunes de fracturas por osteoporosis, aunque pueden realizarse medidas en huesos periféricos e incluso obtener la DMO corporal total [Chun, 2011]. Posee una buena precisión, baja dosis de radiación ionizante y cortos tiempos de exposición [Rosen, 2008]. Existen algunas desventajas debido a que las imágenes obtenidas son proyecciones bidimensionales y los resultados dependen del tamaño de los huesos, observándose diferencias por edad, género y etnia [Rosen, 2008]. Otra limitación es que los algoritmos utilizados para convertir las mediciones de rayos X en DMO toman a la composición del tejido blando de manera homogénea afectando tanto a la médula ósea y tejidos blandos externos al hueso en la trayectoria del haz [Blake, 2008; Rosen, 2008].

❖ Tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT): la imagen se forma cuando la fuente de rayos X rota alrededor de la muestra y en el sector opuesto son absorbidos por un detector. Las mediciones de absorción de rayos X tomadas en los diferentes ángulos se graban en una computadora y son integradas [Lang, 2010]. Se utiliza tanto *in vivo* como *ex vivo*. Permite obtener: la geometría tridimensional de los huesos, con buena resolución sólo para el tejido cortical, y con ella el momento de inercia transversal que da una apreciación de la fortaleza en huesos largos; CMO (contenido mineral óseo) y DMO volumétricos, diferenciándose de DXA que mide DMO en dos dimensiones [Rosen, 2008].

Si bien la exposición a la radiación es baja, el nivel de la misma depende del nivel de resolución de imagen deseada, la ubicación de la región de medición (proximidad a los órganos sensibles a la radiación) y el tamaño de la región de interés [Rosen, 2008].

❖ Tomografía microcomputarizada (μ CT): Proporciona imágenes de mayor resolución que la pQCT, lo que permite el estudio de la microarquitectura ósea tanto cortical como trabecular. Se utiliza habitualmente en la evaluación de muestras *ex vivo*, pero en la actualidad se ha extendido a animales *in vivo* e imágenes de extremidades humanas. Utiliza múltiples rayos X que inciden en diferentes ángulos para reconstruir una representación tridimensional de la muestra [Rosen, 2008].

I. 1. 6. Pruebas mecánicas

Las pruebas mecánicas son ensayos experimentales utilizados para evaluar las características funcionales de huesos provenientes de animales de laboratorio con el metabolismo óseo alterado [Brodt, 1999]. Generalmente se realizan estas pruebas para estudiar

las propiedades de las diáfisis de huesos largos. Pueden ser monotónicos, comprendiendo una única velocidad de carga, o ejecutarse con múltiples ciclos de carga. A su vez, estos ensayos pueden ser de flexión, compresión y torsión. En huesos largos, las cargas *in vivo* suelen incluir flexión y torsión, por lo que estos modos de carga son los más utilizados en su estudio [Jepsen, 2015].

Existen ciertas consideraciones que se deben tener en cuenta al momento de plantear una prueba mecánica. Entre ellas, se encuentra la edad al momento de la evaluación de los huesos. Hay que tener en cuenta si el esqueleto se encuentra en la etapa de modelado o remodelado, y si la madurez esquelética ha sido alcanzada [Brodt, 1999].

Las pruebas más utilizadas son las monotónicas y durante su realización son medidos la carga y el desplazamiento. Los datos son representados en una curva que se utilizará para calcular las propiedades mecánicas del hueso completo. Los valores de carga se ubican en el eje Y, mientras que los valores de desplazamiento forman parte del eje X [Jepsen, 2015].

Una de las diferencias entre las pruebas de flexión y torsión, es que la primera nos brinda distintos datos que la segunda. Un ensayo de torsión proporciona una medida de rigidez y resistencia al corte, mientras que una de flexión proporciona una medida de rigidez y resistencia a la tracción [Brodt, 2015]. También debe considerarse que los huesos largos tienden a fallar de manera quebradiza mayormente durante las pruebas de torsión [Jepsen, 2015].

Existen dos tipos de ensayos de flexión: de tres o cuatro puntos, siendo fáciles de diseñar e interpretar. Son sensibles a los cambios en la matriz ósea y se utilizan para evaluar el impacto de la perturbación en una fractura. En cuanto a los ensayos de torsión, no aplican cargas en el centro del hueso y no dependen de la orientación de la sección transversal (a tener en cuenta en pruebas de flexión para un estudio correcto), por lo que son usados para evaluar la curación de huesos fracturados [Jepsen, 2015].

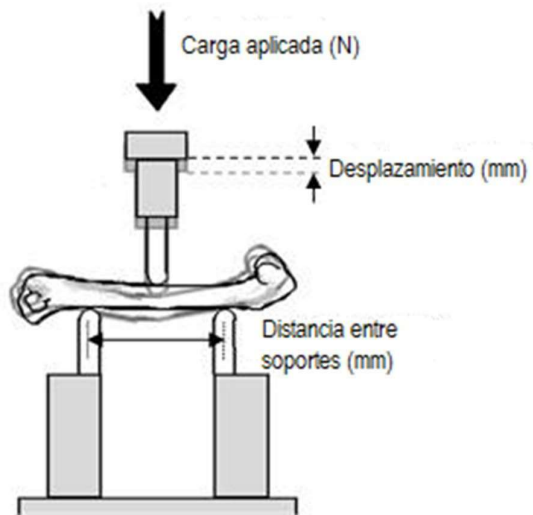


Figura I. 1. 6. 1 -Diagrama esquemático de un ensayo biomecánico de flexión de tres puntos.

I. 2. Síndrome Metabólico (SM)

I. 2. 1. Definición

El SM es un desorden heterogéneo y multifactorial asociado con riesgo cardiovascular elevado [Alberti, 2006]. Se caracteriza por poseer diferentes síntomas que son comúnmente encontrados en pacientes que incluyen: resistencia a la insulina, dislipidemia (específicamente triglicéridos altos, niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas), obesidad central, hipertensión, intolerancia a la glucosa o Diabetes mellitus y elevada incidencia de enfermedad aterosclerótica [Miranda, 2005a].

I. 2. 2. Criterios diagnósticos del SM

Se ha intentado desarrollar un sistema único para poder definir e identificar el SM. Existen diferentes definiciones que corresponden a distintos grupos de expertos, pero todos concuerdan en que los componentes centrales de este síndrome son: obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión. Asimismo, cada uno de ellos proporciona diferentes criterios clínicos para su identificación [Alberti, 2006].

❖ Organización Mundial de la Salud (OMS): debe existir una alteración del metabolismo de la glucosa/insulina (Diabetes mellitus tipo 2, tolerancia a la glucosa alterada, o tolerancia a la glucosa normal con insulinoresistencia -definido como el cuartil más alto del HOMAIR-). Acompañando esta alteración, deben de hallarse al menos dos de los siguientes componentes: hipertensión bajo medicación o $>140/90$ mmHg sin tratamiento; dislipidemia con triglicéridos plasmáticos elevados (>150 mg/dL) y/o bajos niveles de HDL (<35 mg/dL en hombres, <39 mg/dL en mujeres); obesidad con índice de masa corporal (IMC) >30 kg/m² o adiposidad central (relación cintura:cadera $>0,90$ en hombres, $>0,85$ en mujeres); y microalbuminuria (excreción urinaria de albúmina >20 g/min o relación albumina:creatinina >30 mg/g) [Alberti y Zimmet, 1998].

❖ European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) propuso el uso de niveles de insulina en ayunas para estimar la resistencia a la insulina y la glucosa en ayunas alterada como sustituto de la intolerancia a la glucosa (≥ 110 mg/ dl para no diabéticos). También propone puntos de corte ligeramente modificados para hipertensión ($\geq 140/90$ mmHg), triglicéridos (>178 mg/dl), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (<39 mg/dl) y medidas y puntos de corte alterados para la obesidad central basados en la circunferencia de la cintura (≥ 94 cm en

hombres y ≥ 80 cm en mujeres).

Además, si los sujetos estaban siendo tratados por dislipidemia o hipertensión, se consideró que tenían las anomalías correspondientes [Alberti, 2006].

❖ American Diabetes Association (ADA): reconoce que el “síndrome de resistencia a la insulina” reúne una serie de hallazgos clínicos o de laboratorio que incluyen: intolerancia a la glucosa, obesidad central, dislipidemia (triglicéridos elevados, HDL disminuido, LDL pequeñas y densas elevadas), hipertensión, aumento de factores protrombóticos y antifibrinolíticos, y propensión a enfermedad vascular aterosclerótica. Sin embargo, no establece valores de corte ni algún tipo de orden para los distintos parámetros nombrados [Miranda, 2005a].

❖ National Cholesterol Education Program - Third Adult Treatment Panel (NCEP-ATP III): establece que el SM requiere de al menos 3 de los siguientes criterios: obesidad abdominal (circunferencia de cintura en hombres >40 pulgadas y en mujeres >35 pulgadas), triglicéridos plasmáticos ≥ 150 mg/dL, colesterol HDL <40 mg/dL en hombres o <50 mg/dL en mujeres, presión arterial $\geq 130/85$ mmHg y glucosa plasmática en ayunas de 110 a 125 mg/dL. En particular, la definición del NCEP no incluye una medida de resistencia a la insulina y se basa en la medición de la glucosa en ayunas en lugar de la determinación de tolerancia a la glucosa.

Según el NCEP, el SM aumenta el riesgo para diabetes mellitus tipo 2, pero no la incluye; lo que sí ocurre por parte de la OMS [Miranda, 2005a].

❖ American College of Endocrinology/American Association of Clinical Endocrinologists (ACE/AACE): se fijan una serie de factores de riesgo para el desarrollo de SM, que comprenden los siguientes signos: sobrepeso, haciendo hincapié en la obesidad abdominal (IMC ≥ 25 kg/m², circunferencia de cintura >102 cm en hombres o >88 cm en mujeres); triglicéridos elevados o cercanos al punto de corte (≥ 150 mg/dL); HDL colesterol bajo (<40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres); hipertensión moderada o importante ($\geq 130/85$ mmHg); y tolerancia a la glucosa alterada (>140 mg/dL, 2 hs luego de una carga de 75g de glucosa) o glucosa plasmática en ayunas alterada (110 a 125 mg/dL). También se reconocen otros factores de riesgo como síndrome de ovario poliquístico, diabetes gestacional, estilo de vida sedentario, edad, raza, e historia familiar de Diabetes mellitus tipo 2, hipertensión o enfermedad cardiovascular. No se especifica el número mínimo de factores que deben existir para diagnosticar el síndrome, pero sí que es más probable su desarrollo a medida que su cantidad sea mayor [Miranda, 2005a].

I. 2. 3. Prevalencia del SM

El aumento de la prevalencia mundial del sobrepeso se ha relacionado con el

incremento de la incidencia de Diabetes mellitus tipo 2 y la intolerancia a la glucosa [Kolovou, 2007], la cual se asocia muy fuertemente con el SM. A su vez, este síndrome se encuentra en amplio crecimiento debido al aumento de la obesidad y de los estilos de vidas sedentarios [Yamaoka, 2012].

Existen varios estudios realizados a partir de la recolección de datos de diferentes partes del mundo que demuestran lo que se ha mencionado anteriormente. Un buen ejemplo es el análisis propuesto por Márquez-Sandoval y colaboradores en el 2011. Se basaron en trabajos publicados que evaluaban la prevalencia del SM en América Latina. Analizaron once estudios transversales seleccionados, los cuales realizaron el diagnóstico del SM de acuerdo a los criterios establecidos por el NCEP-ATP III.

La prevalencia hallada en los países latinoamericanos fue de aproximadamente 25% (con oscilaciones entre 18,8% y 43,3%). El SM fue poco más frecuente en mujeres que en hombres (25,3% vs 23,2%). Además, encontraron que los componentes más frecuentes del mismo fueron: disminución de los valores de colesterol HDL y presencia de obesidad abdominal. También se halló que el grupo etario de mayor riesgo eran las personas mayores de 50 años.

En otro estudio transversal llamado CARMELA, en el cual se evaluaron hombres y mujeres de 24 a 65 años de edad, los resultados fueron muy similares. El rango de prevalencia en Latinoamérica se sostuvo entre 14% y 27%; también en este caso fue ligeramente mayor en mujeres que en hombres (22% vs 20%). Asimismo, determinaron que la prevalencia del SM aumentaba con la edad [Escobedo, 2009].

En 2017, Moore y sus colaboradores compararon los datos de la población de Estados Unidos en tres períodos diferentes: 1988-1994, 1999-2006 y 2007-2012. Encontraron que la prevalencia del SM aumentó de 1988 a 2012 para cada uno de los grupos sociodemográficos estudiados. En 2012, más de un tercio de todos los adultos estadounidenses cumplían con la definición y los criterios para dicho síndrome acordados conjuntamente por varias organizaciones internacionales. Además, observaron que la prevalencia de la obesidad en adultos aumentó constantemente desde la década de 1990; encontrando en la actualidad cifras mayores a los dos tercios de adultos con sobrepeso u obesidad.

La prevalencia en la población de Estados Unidos se encuentra entre 21,8% y 23,7%, y también se incrementa con la edad [Ford, 2002]. Pero al separarse en grupos étnicos se observan algunas diferencias. La prevalencia es similar en caucásicos (23,8%), superior en personas de origen mexicano posiblemente por una mayor prevalencia de obesidad (31,9%) y menor en los de origen africano (21,6%) [Kolovou, 2007]. Por otro lado, en Europa existen valores similares de prevalencia para el SM y también se reportó un aumento relacionado con la

edad [Scuteri, 2015].

I. 2. 4. Complicaciones asociadas al SM

El SM produce diferentes alteraciones a nivel sistémico. Entre las más frecuentes se encuentra su causalidad en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como enfermedad coronaria e infarto de miocardio [Alberti, 2006]. Otra complicación asociada muy relevante es el elevado riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (de hasta cinco veces mayor que en personas sin SM); relacionado con el aumento del tamaño de los adipocitos abdominales subcutáneos [Miranda, 2005a].

En el hígado, se incrementa el depósito de lípidos debido al aumento de afluencia de ácidos grasos por lipólisis asociado con la obesidad y resistencia a la insulina. Esto provoca la inducción de esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis y cirrosis [Cornier, 2008; Panchal, 2011].

Asimismo, se ha demostrado que pacientes con SM presentan un mayor riesgo de enfermedad renal crónica y microalbuminuria, hipogonadismo, y neuropatías [Cornier, 2008]. También se encuentra asociado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, como el de mama, próstata y páncreas [Handelsman, 2009].

I. 2. 5. Patofisiología del SM

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

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

El SM se vincula estrechamente con la resistencia a la insulina. Las células beta del páncreas sensan la situación y aumentan la secreción de esta hormona para intentar compensar el defecto planteado. Igualmente, esta no es la única causa del desarrollo de dicho síndrome y tampoco una consecuencia directa del accionar alterado de la insulina [Miranda, 2005a; Di Pino, 2019].

Los mecanismos que permitirían explicar el resultado de la resistencia insulínica son: efectos de la hiperglucemia leve a moderada, efectos de la hiperinsulinemia compensatoria y

efectos de los desequilibrios ocurridos en las distintas vías de acción en las que se encuentra involucrada esta hormona [Miranda, 2005a].

La hiperglucemia corresponde principalmente a la posprandial y se encuentra por debajo de los niveles de un paciente diabético. Esto aceleraría la aterogénesis por formación de productos de glicación avanzada (AGEs), principalmente sobre el colágeno presente en las paredes vasculares; promoviendo complicaciones micro y macrovasculares [Miranda, 2005b].

Asimismo, el consumo excesivo de glucosa y fructosa estimula los procesos inflamatorios en los adipocitos subcutáneos, y como consecuencia se obtiene un aumento en el cortisol intracelular con el fin de disminuirlos. Este incremento conduce a un mayor flujo de ácidos grasos hacia el exterior de estos adipocitos, lo que genera más sustrato para la lipogénesis. Los órganos diana de este proceso son generalmente hígado, páncreas, músculo esquelético y corazón, lo que puede alterar los procesos metabólicos y deteriorar la función de los órganos [Dinicolantonio, 2017].

La acción de la insulina se encuentra dada por medio de diferentes vías intracelulares que diferirían en su respuesta. En el SM y Diabetes mellitus tipo 2, la vía correspondiente a la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K), encargada de los efectos metabólicos de la insulina, está parcialmente bloqueada. Esto provoca la inhibición del metabolismo de la glucosa, pero también promueve la hipertensión y la aterogénesis. A su vez, la vía de la MAP (proteína activada por mitógenos) quinasa de la acción de la insulina, interviene en efectos proinflamatorios, proliferación de células del músculo liso vascular y aterogénesis. Esta vía, debido a la alta concentración de insulina y la inhibición de la vía PI-3K, permanece activa y hasta podría estar hipersensibilizada [Cusi, 2000; Di Pino, 2019].

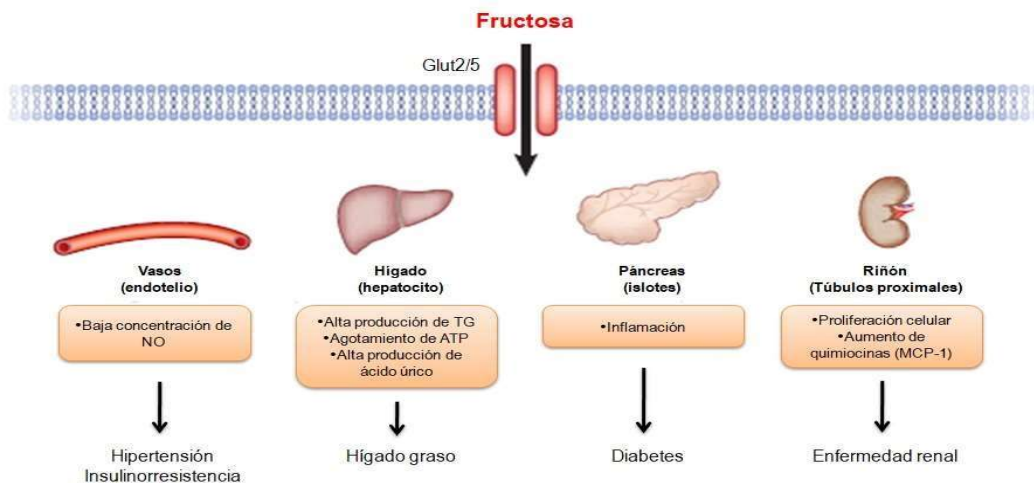


Figura I. 2. 5. A. 1 - Efectos de la fructosa en el desarrollo de hipertensión, hígado graso, diabetes y enfermedad renal. Adaptado Johnson, 2010.

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

El almacenamiento disfuncional de energía se debería a anomalías en el procesamiento y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos, que correlaciona con la obesidad de los pacientes [Miranda, 2005a].

En el momento en que se excede la capacidad de los adipocitos periféricos pequeños, los triglicéridos comienzan a acumularse en hepatocitos, células musculares esqueléticas y adipocitos viscerales. Su consecuencia podría ser la resistencia a la insulina, tomando como órganos diana el hígado y el músculo esquelético [Miranda, 2005a]. Esto ocurre muy frecuentemente por una mayor cantidad de ingesta energética y de fructosa, lo que aumenta la lipogénesis de *novo* y los triglicéridos postprandiales [Stanhope, 2009].

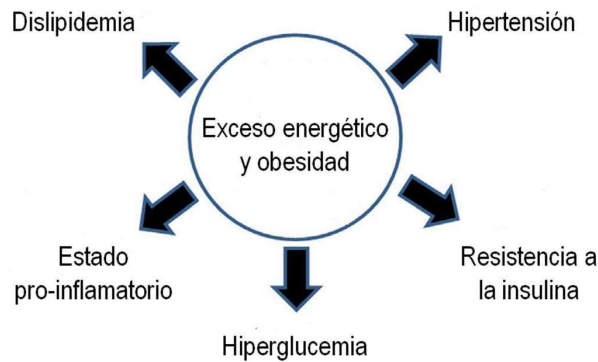


Figura 1. 2. 5. B. 1 - Relaciones entre exceso energético/obesidad y factores de riesgo del síndrome metabólico. Adaptado de Grundy, 2016.

I. 2. 6. Consumo de fructosa y SM

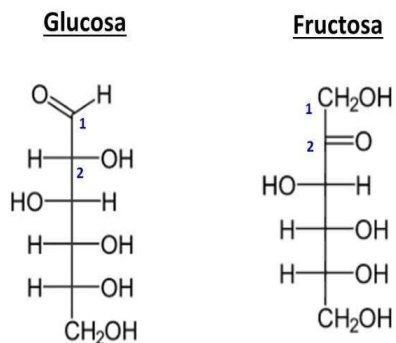


Figura I. 2. 6. 1 - Estructuras químicas de la glucosa y la fructosa.

La fructosa es una hexosa de fórmula química idéntica a la de la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), pero difieren en que la fructosa posee un grupo cetona en su segundo carbono (cetohehexosa), y la glucosa dispone de un grupo aldehído en el primero (aldohexosa) [Tappy, 2010].

La fructosa puede ser obtenida por hidrólisis de sacarosa, un disacárido compuesto por una molécula de fructosa y otra de glucosa, a partir de

caña de azúcar o remolacha azucarera. A su vez, su producción se da por hidrólisis de inulina (polisacárido de fructosa) o de almidón [Metha, 2005].

Frecuentemente, es clasificada en “mala fructosa” y “buena fructosa” según su fuente alimenticia. La “buena fructosa” proviene de frutas y verduras enteras, productos lácteos y jugos 100% de frutas; y se asocia con vitaminas, minerales y fibra presentes en estos productos. Se denomina “mala fructosa” a la que se encuentra en alimentos y bebidas refinados que generalmente tienen pocos nutrientes, y se endulzan utilizando como base el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (JMAF) [Bray, 2010].

La exposición a la fructosa se ha acelerado debido a la introducción del JMAF al ser el edulcorante más utilizado por la industria en alimentos procesados y bebidas [Pollock, 2012], debido a sus propiedades organolépticas, larga vida útil y su bajo costo [Tappy, 2010]. Este se elabora convirtiendo la glucosa en fructosa mediante enzimas cultivadas en bacterias y luego realizando su dilución al 42% o 55% [Bray, 2010].

En las últimas décadas ha aumentado notablemente el consumo de fructosa de la mano del uso de este jarabe, ya que este monosacárido se encuentra en su forma libre y no unido a la glucosa como en el caso de la sacarosa. Según lo establecido en los reportes de la USDA Nationwide Food Consumption Survey, el consumo de fructosa en EEUU era de 37 g/día en 1977-1978; siendo los refrescos azucarados no alcohólicos la principal fuente de esta cetohehexosa. Asimismo, estudios más recientes como NHANES 1999-2004 estimaron que el consumo de fructosa promedio aumentó a 49 g/día, siendo un 32% mayor a lo consumido casi 25 años atrás. Nuevamente, la fuente principal de este hidrato de carbono eran las gaseosas, siendo los adolescentes y los adultos jóvenes los principales consumidores [Tappy, 2010], proporcionando entre el 29% y 45% de la ingesta promedio de fructosa [Bray, 2010]. Estas bebidas proporcionan grandes cantidades de azúcares refinadas, implicando una gran carga de hidratos de carbono sin que generen sensación de saciedad. Estadísticas del año 2010 remarcan que los países con mayor consumo fueron México, Estados Unidos y Argentina; y se estima que el aumento continúe en todo el mundo, pero en mayor medida para los países con ingresos bajos y medios [Basu, 2013]. A su vez, este tipo de bebidas contiene cafeína, que puede inducir una retroalimentación positiva en su consumo debido a su capacidad de estimular el sistema nervioso central [Bray, 2014].

En el mundo, América del Sur y Oceanía son los mayores consumidores de azúcar, seguidos de cerca por Europa. En los últimos años, este consumo ha aumentado en todo el planeta menos en el continente oceánico; representando Asia el mayor incremento relativo con un 50% [Tappy, 2010].

Existe abundante evidencia asociando el consumo de fructosa con la prevalencia y riesgo de obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, SM, entre otros; asociado a nivel poblacional en todo el mundo, incluyendo países de niveles de ingresos bajos y medios [Bray, 2010; Basu, 2013; Tappy, 2010].

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

I. 2. 7. Metabolismo de la fructosa

La fructosa se absorbe en el yeyuno a través de los transportadores GLUT-5, que se encuentran en la membrana apical de los enterocitos, sin la necesidad de hidrólisis de ATP y de absorción de sodio como si ocurre en el caso de la glucosa [Dinicolantonio, 2017; Tappy, 2010]. Dentro de esta célula, este azúcar difunde hacia los vasos sanguíneos transportada mediante GLUT-2, ubicados en la membrana basolateral. Posteriormente, esta cetohexosa llega al hígado a través de la vena porta e ingresa a los hepatocitos por los transportadores GLUT-2. En su primer paso, lo hace casi en un 100%, por lo que su concentración sanguínea no será mayor a 50-500 μM posterior a su ingesta [Tappy, 2010].

En el hígado, se produce la fosforilación a fructosa 1-fosfato por medio de la enzima fructoquinasa, caracterizada por su alta especificidad para la fructosa y su no inhibición por ATP o citrato, por lo que no posee una etapa de control. En contraste, el metabolismo de la glucosa es inhibido a altas concentraciones de ATP o citrato. Por lo tanto, aún siendo elevado el nivel energético en este órgano, la fructoquinasa continúa catalizando dicha reacción y la fructosa es absorbida y metabolizada de forma no controlada [Stanhope, 2012; Dinicolantonio, 2017].

Posteriormente, la fructosa 1-fosfato se transforma en dos triosas, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído por acción de la fructosa 1-fosfato aldolasa [Lehninger, 2001]. Estos productos pueden converger fácilmente en la vía glucolítica. Mientras el metabolismo de la glucosa se regula negativamente por la fosfofructoquinasa, la fructosa puede producir de manera incontrolable glucosa, glucógeno, lactato y piruvato; y proveer el glicerol y los ácidos grasos libres para la producción de triglicéridos [Basciano, 2005].

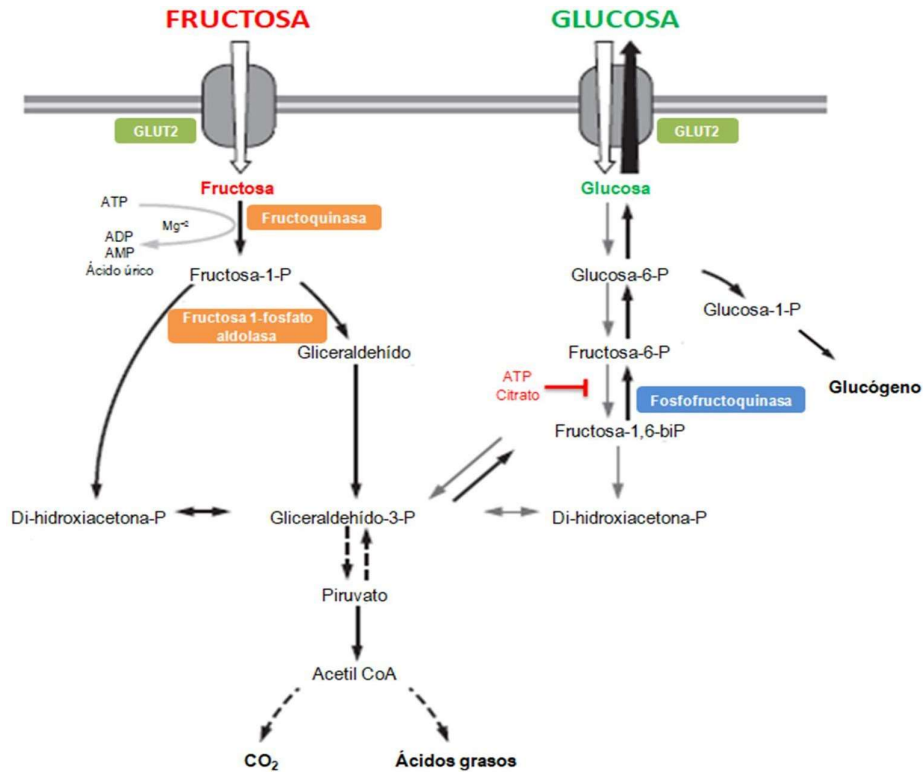


Figura I. 2. 7. 1 - Metabolismo hepático de la fructosa y comparación con el metabolismo de la glucosa. Adaptado de Tappy, 2010.

En el hígado, aproximadamente el 50% de la carga de fructosa ingerida se transforma en glucosa, que es liberada a la circulación sistémica y luego es oxidada en tejidos extrahepáticos. Asimismo, cerca del 25% de la carga se convierte en lactato y un 17% se almacena como glucógeno. En menor cantidad, es convertida en ácidos grasos mediante lipogénesis de novo y son liberados a la circulación sistémica como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [Tappy, 2010].

A su vez, la conversión de glucosa en piruvato es regulada por la insulina, activando las enzimas glucolíticas en relación al estado energético celular. Mientras que el metabolismo de la fructosa ocurre independientemente de esta enzima y no produce una elevación importante de sus niveles plasmáticos. Sin embargo, este mínimo incremento provoca la inhibición de la hidrólisis de TG y la liberación de ácidos grasos libres; debido a la gran sensibilidad por esta hormona del tejido adiposo [Tappy, 2010].

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

Un problema de la ingesta de fructosa y su gran asociación al consumo de bebidas azucaradas, es que estas no suprimen la ingesta de los alimentos sólidos. En consecuencia, las elevadas calorías provenientes de las llamadas gaseosas se sumarían a las de su ingesta total [Bray, 2010]. Simultáneamente, este consumo sostenido agrava la desregulación de diferentes hormonas relacionadas al metabolismo como la insulina, grelina y leptina [Teff, 2004] provocando distintas alteraciones metabólicas como las que se desarrollarán a continuación.

I. 2. 8. A. Dislipidemia

La fructosa puede proporcionar una gran cantidad de triosas fosfatos, a partir de las cuales se podrían obtener moléculas de glicerol o ácidos grasos para futuros TG; y también induce la transcripción de enzimas sintetizadoras de lípidos, por lo que es considerada una molécula altamente lipogénica [Le, 2009; Tappy, 2010; Hu, 2017].

La proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP, sterol regulatory element binding protein) es un regulador transcripcional vinculado a la síntesis de lípidos. Existen tres isoformas, 1a, 1c y 2; las primeras encargadas de la regulación de la síntesis de enzimas lipogénicas, y la última correspondiente a la regulación de la síntesis de colesterol [Matsuzaka, 2004].

Su isoforma SREBP-1c es expresada predominantemente en el hígado y necesitaría de la proteína quinasa C (PKC) para su activación. Se une al elemento de respuesta a esteroides (SER, sterol response element) estimulando la síntesis de ácidos grasos y TG al aumentar la transcripción de la sintasa de ácidos grasos, acetil-CoA carboxilasa y esteroil-CoA desaturasa [Yamamoto, 2010].

Asimismo, la expresión de SREBP es regulada de manera positiva por la insulina, lo que tiene lugar en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo mediante la vía de las MAP quinasas. En sus estudios, Matsuzaka y colaboradores demostraron que en ratones inyectados con estreptozotocina, la alimentación con fructosa, glucosa o sacarosa inducía la expresión de SREBP-1c; encontrándose en mayor medida cuando se realizaba sólo con fructosa. A causa de estos resultados, podría plantearse que la lipogénesis *de novo* sería independiente de la acción de la insulina si el consumo de los carbohidratos mencionados es excesivo.

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

La fructosa no sólo genera un desequilibrio en los niveles plasmáticos de lípidos, sino que también lo hace en su disposición intracelular. Estos lípidos ectópicos se depositan principalmente en hígado y músculo esquelético como consecuencia de la resistencia a la insulina específica de cada tejido. En roedores este efecto se debería a la estimulación de la síntesis *de novo* de lípidos, una disminución en su oxidación y un incremento en la expresión de genes lipogénicos [Tappy, 2010]. En estudios realizados en varones sobrealimentados con un contenido de fructosa equivalente a dos litros de gaseosa estándar por día, no se indujo un aumento en el depósito de lípidos hepáticos y musculares [Le, 2006]. A pesar de esto, cuando la administración tomaba el doble de contenido de fructosa, en 7 días ese aumento resultó significativo [Le, 2009].

Estudios recientes han demostrado que la inflamación producida por la ingesta excesiva de fructosa conduce a un aumento de la actividad de la 1- β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1. Esta enzima cataliza la activación de cortisol con el fin de combatir dicha inflamación, y su concentración aumentará en mayor medida en el tejido adiposo y el hígado. Al mismo tiempo que este glucocorticoide colabora a disminuir la inflamación, promueve el almacenamiento de grasas. Como consecuencia, esto conduce a la resistencia a la insulina y el aumento del flujo de ácidos grasos fuera de los adipocitos subcutáneos, lo que permite un mayor sustrato para el almacenamiento de grasas en los tejidos viscerales como hígado, páncreas, músculo esquelético y corazón. Por lo tanto, una persona podría verse “delgada por fuera, pero tener grasa por dentro” debido al consumo excesivo de fructosa [Dinicolantonio, 2017].

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

Existen diferentes causas por las que un consumo de fructosa podría afectar la tolerancia a la glucosa e incluso una posterior resistencia a la insulina. Gran cantidad de los mecanismos propuestos fueron estudiados mayormente en roedores, aunque existen varios realizados en humanos.

El consumo excesivo de fructosa se encuentra estrechamente relacionado con la regulación de la inflamación metabólica. Bajo estas condiciones, el tejido adiposo secreta una mayor cantidad de citoquinas inflamatorias. Esto provocará un incremento en el reclutamiento de macrófagos que tendrá como consecuencia un nuevo aumento en la producción de la hormona ya mencionada [Dinicolantonio, 2017]. Además, se sabe que el consumo de este azúcar provoca

resistencia a la leptina, siendo menor su efecto en el tejido graso, teniendo como resultado una mayor inflamación en el mismo [Shapiro, 2011]. Esto generará alteraciones sobre la cascada de señales mediante las que actúa la insulina, induciendo la resistencia a esta hormona [Chen, 2006].

Por otro lado, existen asociaciones entre una elevada cantidad de fructosa ingerida en la dieta y un aumento en la producción de TG; dándose como consecuencia de una disminución en la síntesis de glucógeno y aumentos en la glucogenólisis y glucogénesis en el hígado; logrando una resistencia hepática a la insulina [Pollock, 2012]. A su vez, el aumento de los TG y ácidos grasos libres en plasma pueden depositarse en otros tejidos, produciendo metabolitos como diacilglicerol, responsables de la activación de la proteína quinasa C (PKC) conduciendo a una disminución de la sensibilidad del receptor de insulina, y a una posterior resistencia a la misma [Pollock, 2012; Dinicolantonio, 2017].

El estrés del retículo endoplasmático (RE) es definido como el desequilibrio que ocurre entre el plegamiento necesario del número de proteínas requeridas y la capacidad de plegamiento de esta organela; estimulando la acumulación de proteínas plegadas incorrectamente [Cnop, 2012]. Una posible causa de estrés del RE podría ser el aumento de la síntesis y la acumulación de proteínas y/o lípidos, al incorporar una dieta rica en fructosa. Se ha comprobado que en roedores esto no ocurre al consumir cantidades excesivas de grasa, pero si de este azúcar [Collison, 2009; Ren, 2012]. Cuando este estrés se hace crónico altera la síntesis de insulina y puede producir la apoptosis de células β pancreáticas. Por esta razón, se suele relacionarlo con la resistencia a la insulina y Diabetes mellitus tipo 2 en condiciones de obesidad [Cnop, 2012].

En adición, Collison y colaboradores han sugerido que ratones alimentados con una dieta con JMAF-55 al 20% producían deterioros a nivel mitocondrial. Observaron que en los hepatocitos la actividad de la enzima citocromo C se encontraba reducida, activando una vía proapoptótica en estas células. Los defectos en la fosforilación oxidativa en mitocondrias han sido implicados como parte de los mecanismos para el desarrollo de resistencia a la insulina [Collison, 2009].

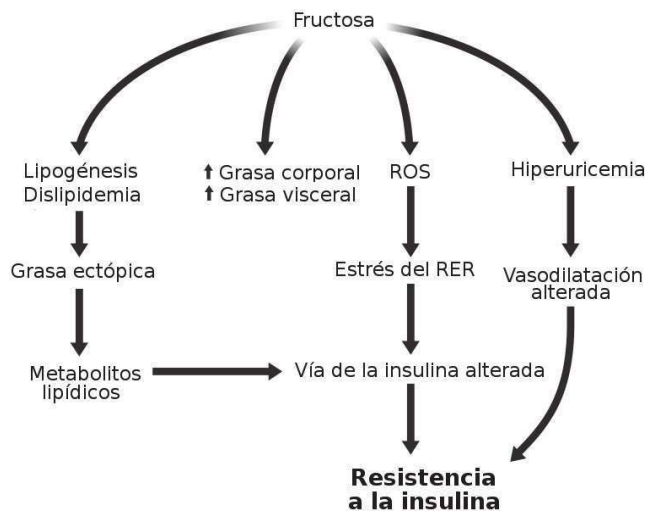


Figura I. 2. 8. C. 1 - Resumen de los posibles mecanismos involucrados en la resistencia a la insulina inducida por fructosa [Tappy, 2010].

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

En los últimos 100 años, ha habido un aumento progresivo de los niveles séricos de ácido úrico, especialmente en los países occidentales. Una de las principales causas se basa en el aumento del consumo de azúcares que contienen fructosa, lo que fue demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, si el consumo permanece de manera sostenida durante varios días pueden ser asociado con aumentos en los niveles sanguíneos en ayunas [Caliceti, 2017; King, 2018; Russo 2020]. Según Carran et al, podría existir una dosis-respuesta entre la ingesta de fructosa y los aumentos posprandiales en las concentraciones de ácido úrico sérico. Además, considera que existe un valor umbral de fructosa, por debajo del cual no se produciría este compuesto orgánico. Vale aclarar que su estudio fue realizado en adultos jóvenes sanos, donde encontraron pequeños aumentos de ácido úrico luego de tomar una bebida comercial azucarada de 355 ml [Carran, 2016].

Como se describió en la Sección I. 2. 7, la fosfofructoquinasa provoca rápidamente la fosforilación de la fructosa disminuyendo los niveles intracelulares de ATP, GTP y fosfato; lo que desencadena la acumulación de AMP y la inhibición transitoria de la síntesis de proteínas. Finalmente, esto aumentará la producción de ácido úrico en las células, incrementando su concentración paulatinamente [King, 2018].

La mayor parte de este ácido es filtrada por los riñones y eliminada en orina; el resto se dirige hacia el intestino y es desechado por medio de las heces. Cuando la excreción renal no se desarrolla de forma óptima, se convierte en la principal causa de hiperuricemia [Russo, 2020]. A su vez, la administración de fructosa afecta la excreción del ácido a la luz intestinal [Kaneko, 2017].

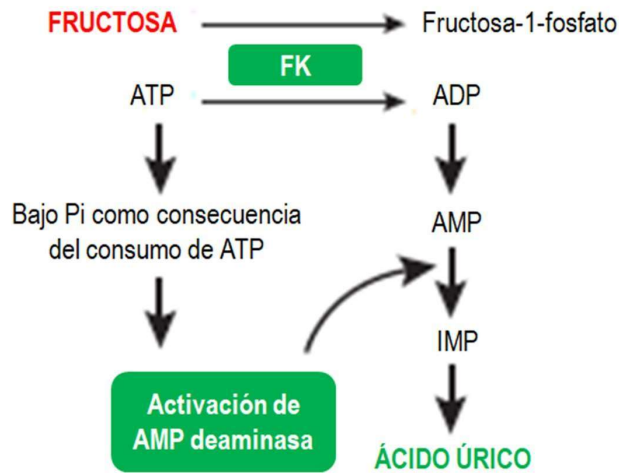


Figura I. 2. 8. D. 1 - Vía por la cual la fructosa se metaboliza en ácido úrico. FK, fosfofructoquinasa; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; AMP, adenosín monofosfato; IMP, inosina monofosfato. Adaptado de Johnson, 2010.

El ácido úrico induce inflamación, oxidación y daño endotelial; pudiéndose relacionar con la resistencia a la insulina y el SM. Esto se produce ya que inhibe la enzima endotelial óxido nítrico sintasa (eNOS); la cual es activada por la insulina con el fin de aumentar el flujo sanguíneo hacia el músculo esquelético permitiendo la llegada de nutrientes como la glucosa. Al mismo tiempo, sus niveles séricos altos son utilizados como biomarcadores de morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares [Tappy, 2010; Russo, 2020].

I. 2. 8. E. Hipertensión arterial

Si bien existen certezas sobre la relación indirecta entre el consumo de fructosa y la hipertensión, son numerosos los mecanismos propuestos que aún se encuentran en estudio. Uno de ellos se basa en que una vez generada la resistencia a la insulina por una dieta con elevadas cantidades de fructosa, la hiperinsulinemia produciría un aumento en la presión arterial por un incremento en la actividad de la división simpática del sistema nervioso autónomo. Asimismo, este aumento en las concentraciones séricas de insulina elevaría la absorción renal de sodio, lo que podría llevar a una hipertensión. Además, el metabolismo de la fructosa produce

altas cantidades de gliceraldehído y dihidroxiacetona fostato, que pueden ser convertidos en metilglioxal. Este compuesto es precursor de AGE, puede reaccionar con grupos sulfhidrilo de proteínas y alterar su función. Esto sucede con aquellas presentes en los canales L de calcio en el músculo liso de los vasos sanguíneos, provocando el incremento del ingreso de este ión y aumentando la contracción muscular en dicho tejido; elevando la resistencia vascular y por ende la presión sanguínea [Tappy, 2010].

Otros estudios demostraron que la hiperuricemia produciría una respuesta hipertensiva debido al estrés oxidativo y la disfunción endotelial. El ácido úrico disminuye la biodisponibilidad de óxido nítrico, actuante como vasodilatador, lo que induce los efectos mencionados. Existe la hipótesis que la actividad de la xantina oxidasa y el aumento de radicales de oxígeno actuarían sobre la disfunción endotelial [Sanchez-Losada, 2008; Caliceti, 2017].

Es importante aclarar que no se ha encontrado que la hipertensión haya sido incitada por azúcares provenientes de yogurt, frutas y jugos 100% de fruta [Liu, 2019].

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

Un modelo animal es un organismo vivo que desarrolla un proceso patológico. Este puede ser heredado, adquirido de forma natural o inducido; reproduciendo una o varias características de dicho proceso ocurrido en un ser humano [Varga, 2010]. Debe ser reproducible, simple, confiable, no poseer desventajas, y en caso de presentarlas que sean mínimas [Wong, 2016].

Los roedores son muy utilizados para representar enfermedades humanas teniendo el objetivo de comprender las causas y la progresión de los síntomas de la enfermedad, como también las posibles y futuras intervenciones terapéuticas [Panchal, 2011].

Existen dos grandes grupos de modelos animales relacionados al SM; aquellos que lo inducen por medio de la dieta o los que son modificados genéticamente mediante mutaciones.

❖ Modelos con alteraciones genéticas: se utilizan para evaluar mecanismos moleculares específicos implicados en el desarrollo de enfermedades. En lo que respecta al SM, estos modelos se relacionan con el desarrollo de la obesidad en roedores; aunque este síndrome no es monogénico. Además, la mayoría de estos modelos producen una mutación en el gen de la leptina o en el de su receptor, por lo que se debe prestar atención a si estos cambios genéticos se manifiestan de manera similar a lo que ocurre en el SM humano; siendo estas mutaciones muy raras en humanos [Wong, 2016].

Ratón ob/ob (C57BL/6J-ob/ob): estos ratones heredan una mutación autosómica recesiva

única en el gen de la leptina. La falta de esta hormona provoca una desregulación en la inhibición del apetito y una disminución en el gasto energético. Por lo tanto, desarrollan obesidad, hiperinsulinemia, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, complicaciones cardiovasculares y esteatosis e inflamación hepática. Sin embargo, este modelo se diferencia de lo observado en humanos en que demuestra una disminución de la presión arterial y no desarrolla dislipidemia [Panchal, 2011; Wong, 2016].

Ratón db/db (C57BL/Ks-db/db): poseen una mutación autosómica recesiva en el gen codificante del receptor de leptina, permitiendo la unión de dicha hormona, pero siendo no funcional su transducción de señales [Fellmann, 2013]. Estos ratones obtienen mayores pesos corporales, glucemia, trigliceridemia, y colesterol total en sangre. Asimismo, se observó hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática y disfunción vascular; aunque sin hipertensión e inflamación del hígado [Panchal, 2011; Wong, 2016].

Rata Zucker: tienen una mutación en el gen codificante para el receptor de leptina, teniendo como consecuencia la síntesis de receptores con menor afinidad por dicha hormona; aumentando su nivel circulante. Debido a esta mutación, las ratas poseen un mayor consumo de alimento y, por ende, obesidad. Además, presentan hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, intolerancia leve a la glucosa y dislipidemia. También desarrollan disfunción endotelial y aumentos moderados en la presión arterial con el transcurso de su edad [Panchal, 2011; Fellmann, 2013; Wong, 2016].

❖ Modelos inducidos mediante dieta alimentaria: se emplean combinaciones de diferentes componentes dietarios ricos en carbohidratos y grasas con el fin de provocar la inducción del SM de manera similar a lo que ocurre en seres humanos. Las cepas de roedores más comúnmente utilizadas en este tipo de modelos incluyen ratas Sprague-Dawley, ratas Wistar, ratones C57BL/6J y hámster sirio dorado [Wong, 2016].

Dieta rica en fructosa: este tipo de dieta se desarrolla generalmente de forma *ad libitum* pudiendo disolverse el carbohidrato en agua potable utilizando diferentes concentraciones, o ser incluido en el alimento sólido; ambas maneras bajo distintos tiempos de estudio. Las ratas bajo esta alta ingesta calórica desarrollan un aumento en su peso corporal, mayor adiposidad, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hiperuricemia, hipertensión, intolerancia a la glucosa y disminución de la sensibilidad a la insulina. A su vez, en el corazón se induce dilatación e hipertrofia ventricular, función contráctil ventricular disminuida, como infiltración de células inflamatorias. En el hígado se observa esteatosis tanto micro como macrovesicular; y en riñón causa lesión tubular renal y la infiltración de macrófagos en ellos. Por último, algunos autores

han descrito el desarrollo de obesidad, aunque no ha sido confirmado [Panchal, 2011; Wong, 2016].

Dieta rica en grasas: la fuente del componente graso puede ser aceites vegetales como maíz, oliva o cártamo; o de grasa de origen animal como sebo y manteca de res. Suelen emplearse diferentes tipos de esta dieta, en las que el contenido graso varía entre 20 y 60% de la energía total [Wong, 2016]. Sin embargo, el uso de grasa animal es más efectivo ya que contiene mayor cantidad de ácidos grasos saturados [Fellman, 2013].

Este tipo de dieta induce aumento de peso, masa grasa, glucosa plasmática, colesterol, TG, ácidos grasos libres, leptina y niveles de insulina; de manera dependiente de la cantidad de grasa incorporada en el alimento [Wong, 2016]. Asimismo, se describen aumentos en la presión arterial sistólica y la inducción de disfunción endotelial. La complicación de este tipo de dieta es que, si bien reproduce los síntomas del SM humano en roedores, no tiene la misma complejidad de la dieta que produce dicho síndrome en las personas [Panchal, 2011].

Combinación de dieta rica en carbohidratos y grasas: poseen diferentes combinaciones de leche condensada, sebo de res o cerdo, fructosa, alimento en polvo de roedores, sales y agua. Son muy utilizadas debido a que de cierta forma son similares a las dietas humanas que inducen el SM. Los animales expuestos a este tipo de alimento desarrollan hipertensión, intolerancia a la glucosa, aumento de la deposición de grasa abdominal, y alteración del perfil lipídico [Wong, 2016]. También se ha observado hipertensión, hipertrofia e inflamación cardíaca, disfunción endotelial, daños renales leves y aumento en la masa de islotes pancreáticos [Panchal, 2011].

Existen modelos animales que inducen el *SM por medio de fármacos*, como glucocorticoides o antipsicóticos. Son utilizados generalmente para investigaciones del SM desarrollado en humanos a través de tratamientos con estas drogas [Wong, 2016].

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

La primera estrategia planteada para el tratamiento del SM es promover un estilo de vida saludable, teniendo como ejes la nutrición y la actividad física de cada paciente. El principal objetivo es generar un balance energético negativo debido a una disminución en la ingesta calórica y un aumento en la realización de ejercicio físico [Alberti, 2005; Miranda, 2005b; Cornier, 2008]. Disminuir el peso corporal entre un 5 a 10% tendrá importantes efectos beneficiosos en cada uno de los factores de riesgo metabólico [Cornier, 2008; Han, 2015; Grundy, 2016].

En cuanto a la dieta, debe evitarse o reducir el consumo de grasas saturadas debido a que estimulan un aumento de la insulinemia en períodos de ayuno, los niveles de colesterol en sangre y la probabilidad de eventos cardiovasculares; e introducir o aumentar las grasas insaturadas. A su vez, se desea una baja en el consumo de los azúcares simples y agregados; ya que estos alimentos tienen gran cantidad de estos carbohidratos y no se encuentran acompañados de nutrientes como vitaminas y minerales. Otra restricción necesaria es la ingesta de sal, la cual se asocia con hipertensión y eventos cardiovasculares. Asimismo, las dietas bajas en carbohidratos optimizan el metabolismo de estos. Paralelamente, es necesario el incremento de la ingesta de frutas, verduras, pescados y carnes magras; aportantes de buenos nutrientes [Miranda, 2005b; Cornier, 2008; Grundy, 2016].

Sería suficiente realizar actividad física de forma moderada (como caminar a paso ligero) durante aproximadamente 30 minutos en 5 días a la semana; y en caso de realizar ejercicios con mayor vigorosidad se necesitarían unos 60 minutos semanales. No solamente previene el SM, sino que ya desarrollado puede revertir los componentes del mismo y su nueva incidencia [Alberti, 2005; Miranda, 2005b; Han, 2015]. El ejercicio reduce la resistencia a la insulina y el tejido adiposo visceral, mejora la dislipidemia y la hipertensión. Además, favorece el transporte de glucosa y la acción de la insulina en el músculo esquelético en funcionamiento. Estas condiciones tienen como consecuencia una mejor aptitud cardiorrespiratoria, disminución de enfermedades cardiovasculares y en la resistencia a la insulina [Cornier, 2008; Grundy, 2016]. A su vez, existen evidencias que el entrenamiento de resistencia reduce la masa de grasa corporal total y el tejido adiposo visceral de forma independiente de la restricción dietética; y mejora los perfiles lipídicos y glucémicos [Strasser, 2010].

Aquellos pacientes en los que no se observan cambios favorables en concordancia con los cambios en sus estilos de vida, suelen ser tratados farmacológicamente con el fin de manejar individualmente los componentes del SM. Los fármacos más utilizados son la metformina y las tiazolidenedionas, ambos relacionados con un aumento en la tolerancia a la glucosa y una mejora en el perfil lipídico. En pacientes con resistencia a la insulina, retrasan o previenen el desarrollo de Diabetes mellitus tipo 2 [Alberti, 2005; Han, 2015]. Las estatinas son administradas con el objetivo de controlar la dislipidemia. Estas drogas poseen escasos efectos secundarios y débil interacción con otros medicamentos; a la vez de tener efectos beneficiosos sobre eventos inflamatorios y cardiovasculares, y sobre la función endotelial. Por otra parte, para tratar la hipertensión se recomienda usar inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueantes del receptor de angiotensina; debido a que diuréticos y bloqueadores beta en dosis altas pueden empeorar la resistencia a la insulina y la dislipidemia [Alberti, 2005; Cornier, 2008].

I. 2. 11. Metformina (MET) y SM

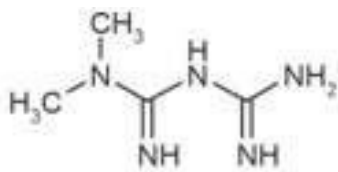


Figura I. 2. 11. 1 – Estructura química de la metformina.

La metformina (MET), clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida, es una molécula hidrófila relativamente plana, monoprotónada a pH neutro; y derivada de un producto natural. Se comercializa como clorhidrato de metformina en una gran cantidad de países debido a su

bajo costo y a poseer efectos adversos mínimos. Es utilizada de forma oral como normoglucemiante, generalmente en personas que han sido diagnosticadas con intolerancia a la glucosa o recientemente con Diabetes mellitus tipo 2. Asimismo, tiene la particularidad de no haber sido diseñado para accionar contra una vía de una cierta enfermedad; y en la actualidad, sus mecanismos de acción siguen siendo ampliamente debatidos [Bailey, 2017; Rena, 2017; Sanchez-Rangel, 2017].

La MET disminuye los niveles glucémicos en ayunas y posprandiales al actuar sobre el hígado, su principal órgano diana. En este órgano, reduce la síntesis de glucosa al inhibir principalmente la gluconeogénesis independientemente de la estimulación de la insulina; por lo que no causa hipoglucemia o hiperinsulinemia [Bailey, 2017]. Además, aumenta la captación periférica de glucosa y su metabolismo anaeróbico en el intestino. En adición a estos efectos, posee actividad anti-aterogénica promoviendo una disminución de eventos cardiovasculares, posiblemente en parte por ser un scavenger de carbonilos precursores de los AGEs [Fujita, 2017; Oliveira, 2021].

La eficacia de este fármaco es dependiente de la dosis, variando de 500 - 2000 mg por día. Cuando la dosis utilizada suele ser la máxima, esta es administrada en dos tomas diarias [Sanchez-Rangel, 2017]. Luego de su administración oral, aproximadamente el 70% de la MET es absorbida en el intestino delgado; excretándose el resto de manera inalterada a través de las heces. Dentro del organismo, se distribuye fundamentalmente en hígado, riñón e intestino delgado; eliminándose en su totalidad en la orina sin ser metabolizada [McCreight, 2016; Bailey, 2017; Rena, 2017].

En la actualidad, aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares por los cuales actúa la MET. Sin embargo, existen grandes certezas de sus acciones. Este fármaco inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que aumenta las relaciones AMP/ATP y ADP/ATP; y como consecuencia es activada la AMPK (del inglés *5' AMP-activated protein kinase*), que actúa como sensor de energía celular. Finalmente, esta quinasa incrementa la sensibilidad a la insulina y reduce el AMPc; reduciendo la expresión de las enzimas

gluconeogénicas. A la vez, la MET tiene efectos independientes de AMPK como por ejemplo la inhibición de la fructosa-1,6-bifosfatasa debido a las concentraciones de AMP [Rena, 2017].

I. 3. Síndrome Metabólico y hueso

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

Se han realizado varios estudios que relacionan al SM con el deterioro de la salud ósea, teniendo en cuenta la DMO y la incidencia de fracturas. Asimismo, aún no se ha logrado obtener resultados concluyentes al respecto.

El primer ensayo en relacionar lo antes mencionado fue el Estudio Rancho Bernardo. Se basó en un análisis prospectivo sobre población caucásica adulta mayor del sur de California, Estados Unidos. Se observó que aquellas personas con SM poseían una mayor DMO en cadera y columna, por lo que primeramente se adjudicó como un efecto protector de dicho síndrome. Sin embargo, al realizar un ajuste mediante el IMC, esta DMO disminuyó significativamente en el cuello femoral. Además, se encontró que la incidencia de fracturas osteoporóticas no vertebrales era significativamente mayor en los participantes con SM, concluyendo que el mismo podría ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de fracturas osteoporóticas [von Muhlen, 2007].

Existen otros estudios que han reportado resultados similares como el de Hwang y Choi, donde se informó que mujeres adultas coreanas con SM presentaron una menor DMO en la columna vertebral lumbar que el grupo control, al ser ajustada por edad, peso y altura [Hwang y Choi, 2009]. De manera similar, Kim y colaboradores en un estudio realizado en Corea del Sur, hallaron una disminución en la DMO del cuello femoral en hombres mayores de 40 años de edad y mujeres posmenopáusicas con SM, posterior a efectuar un ajuste con el peso corporal [Kim, 2010]. Además, el grado de disminución de DMO correlacionaba con el número de componentes del SM [Hwang y Choi, 2009; Kim, 2010].

No obstante, múltiples estudios han informado una relación positiva entre SM y DMO. La encuesta Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) mostró un aumento en la DMO del cuello femoral en los sujetos con SM en comparación con aquellos que no padecían este síndrome. Sin embargo, al realizar un ajuste por IMC, los resultados entre ambos grupos eran similares [Chin, 2020]. Por último, en el estudio de Rotterdam se analizó a hombres y mujeres mayores de 55 años de edad mediante el uso de una corrección por edad, IMC, estilos de vida y usos de medicamentos. Se relacionó al SM con una mayor DMO femoral, pero también con un incremento en la inestabilidad y un menor espesor óseo. Sin embargo, no se detectaron asociaciones con el riesgo de fracturas, posiblemente al no acumularse microfisuras corticales como si ocurre en individuos diabéticos [Muka, 2015].

Como se mencionó al principio de este apartado, los resultados de los diferentes estudios no son concluyentes, por lo que resulta interesante la continuación de más estudios. De igual manera, no es menor remarcar que el SM y las fracturas óseas se relacionan a su vez en sus factores de riesgo como envejecimiento, tabaquismo, consumo de alcohol y sedentarismo. Por lo tanto, la aparición de fracturas podría relacionarse a alguno de estos factores y no al SM en sí [Sun, 2014].

Adicionalmente, el SM puede incluir varias combinaciones de sus componentes por lo que aquellos sujetos que lo padecen suelen representar un grupo bastante heterogéneo. En conclusión, no sería desacertado promover la realización de estudios longitudinales que tengan como objetivo evaluar la relación de los componentes individuales y las fracturas óseas [Sun, 2014].

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

Se han realizado varios estudios que evidencian que las personas con Diabetes mellitus tanto de tipo 1 como de tipo 2 tienen un mayor riesgo a sufrir una fractura en comparación con aquella población que no posee esta enfermedad [Vestergaard, 2007; Kanazawa, 2017; Murray, 2019]. Asimismo, un metanálisis hecho por Vestergaard indica que en la cadera de pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 se observa un incremento de DMO, mientras que en Diabetes mellitus tipo 1 existe una disminución [Vestergaard, 2007]. Algo similar se estableció en el estudio de Napoli y colaboradores, al ver de manera simultánea una correlación entre un aumento del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) con la DMO [Napoli, 2019]. Por otro lado, de Araujo indica que el HOMA-IR, el tejido adiposo visceral y los lípidos hepáticos no se encuentran relacionados negativamente con la DMO sino con la calidad ósea [de Araujo, 2020]. Así, encuentran que la fragilidad ósea no se debería principalmente a la DMO de estos pacientes; sino que podría estar ligada a la acumulación de AGEs sobre el colágeno óseo, lo que impediría su remodelado disminuyendo la calidad ósea [Schwartz, 2009; Kanazawa, 2017; Murray, 2019].

De igual manera, existen otros estudios que encuentran que la resistencia a la insulina se asocia de forma inversa con el volumen de hueso trabecular y cortical, aumentando la incidencia de fracturas asociadas a Diabetes mellitus tipo 2 [Verroken, 2017].

I. 3. 1. B. Obesidad

Inicialmente se consideraba a la obesidad como un factor protector para las fracturas osteoporóticas debido a la acumulación de tejido blando que protegería al tejido óseo. Sin embargo, en los últimos años se ha revelado que pacientes obesos pueden tener mayor riesgo a ciertos tipos de fracturas; y principalmente, las diferencias estarían basadas de acuerdo a la zona anatómica [Hou, 2020].

La masa de tejido óseo se adapta como consecuencia de los cambios del peso corporal, con la finalidad de brindar soporte a los tejidos blandos. Por lo tanto, varios autores establecieron una correlación positiva entre el peso corporal y la DMO [Naot, 2014]. Esto fue corroborado por Evans y colaboradores, quienes concluyeron que los individuos obesos tenían una mayor DMO en todos los sitios evaluados que aquellos de peso normal. Es importante aclarar que, no existieron diferencias en el espesor trabecular, sino que esta mayor DMO se debía a un incremento en el número de trabéculas. Asimismo, se observó un mayor grosor de las paredes corticales y una menor porosidad cortical en personas obesas [Evans, 2015]. Por su parte, Tang y colaboradores realizaron un metanálisis con más de tres millones de participantes, concluyendo que los adultos obesos tuvieron un riesgo significativamente menor de desarrollar una fractura de cadera que aquellos no obesos, probablemente por el factor protector [Tang, 2013]. En conclusión, resulta muy relevante determinar los mecanismos responsables que relacionan el incremento de la DMO en pacientes obesos; lo que permitirá mejorar el conocimiento sobre la osteoporosis y sus posibles estrategias terapéuticas.

No obstante, mediante el estudio GLOW (Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women) se ha demostrado que la obesidad es un factor de riesgo para fracturas de tobillo, parte superior de la pierna y muñeca (debido a la dirección de caídas) [Compston, 2011]. En parte, podría relacionarse con una menor resistencia ósea en relación a la carga al tener mayores fuerzas de impacto en las caídas [Ishii, 2015]. Además, se demostró que un incremento en el riesgo de fracturas de cadera estaría asociado a la circunferencia de la cintura; siendo pertinente una medida mayor a 100 cm, aún existiendo un incremento de la DMO [Li, 2017].

Como vimos, la relación entre obesidad y metabolismo óseo incluye varios factores. La carga mecánica debido al peso corporal ejerce efectos positivos sobre el tejido óseo, y la inflamación sistémica mediada por citocinas es perjudicial para el mismo. A la vez, existen otros aspectos a tener en cuenta para la salud ósea como: edad, sexo biológico, consumo de nutrientes (vitamina D, calcio y fósforo), sitios óseos anatómicos y ubicación de tejido adiposo [Savvidis, 2018; Hou, 2020].

I. 3. 1. C. Hipertensión

La hipertensión arterial ha sido relacionada con una disminución en la DMO, siendo demostrado en varios estudios. Esto se ha observado en diferentes zonas anatómicas, siendo las estudiadas con mayor frecuencia el cuello femoral y la columna lumbar [Tsuda, 2001; Yang, 2013; Yang, 2015; Ye; 2017]. Además, la hipertensión se asocia con un mayor riesgo de fracturas de manera independiente de la DMO, siendo más fuerte dicha asociación en mujeres que en hombres [Yang, 2013; Yang, 2015; Li; 2017]. En particular, Li y colaboradores concluyeron que existe una mayor asociación entre hipertensión y las fracturas de caderas, que para cualquier otro sitio óseo [Li, 2017].

Se ha demostrado que aquellas personas hipertensas, principalmente mujeres, presentan un metabolismo de calcio alterado, con hipercalciuria e hipocalcemia [Young, 1992; Tsuda, 2001; Barzilay, 2017; Li, 2017]. Por esto último, se activa la secreción de la hormona paratiroidea, lo que acelera el recambio óseo y disminuye la calidad de los huesos [Cappuccio, 2000; Ilić, 2013].

Por otra parte, la hipertensión se asocia con un aumento en la actividad de la división simpática del sistema nervioso autónomo, lo que desencadenaría en una disminución de la densidad ósea [Barzilay, 2017]. Esto se basa en la estimulación de la actividad de los osteoclastos y la inhibición de la actividad de los osteoblastos, mediante la actividad adrenérgica de los receptores β_2 presentes en dichas células [Togari, 2005].

A su vez, otros estudios revelaron un mecanismo adicional relacionado a la disminución de la DMO a causa de la hipertensión, en el que tendría relevancia la angiotensina II. Este péptido se encuentra ligado al aumento de la presión arterial, y podría promover la diferenciación y activación de osteoclastos a través de la regulación de la expresión de RANKL por osteoblastos [Shimizu, 2008].

I. 3. 2. Metformina y metabolismo óseo

La MET posee efectos favorables sobre el SM como se describió previamente en la sección I. 2. 11. Esta droga previene parcial o totalmente algunos de los componentes de dicho síndrome que podrían estar afectando perjudicialmente al hueso. Por lo tanto, existen evidencias que indican que la MET actuaría mejorando la condición ósea de forma indirecta.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se han realizado numerosos estudios que, hasta el momento, demuestran que esta droga posee efectos osteogénicos directos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, los cuales concuerdan con un gran número de publicaciones, y serán enumerados y

descriptos a continuación.

En los estudios realizados *in vitro* se demostró que la MET estimula la proliferación osteoblástica de las líneas UMR106 y MC3T3E1 de manera dosis dependiente. Además, esta droga incrementa la actividad de FAL, producción de colágeno tipo 1 y la formación de nódulos de mineralización en los osteoblastos MC3T3E1; lo que marca un aumento en su diferenciación osteoblástica [Cortizo, 2006]. En otro ensayo, la MET previno los efectos deletéreos de los AGEs sobre la apoptosis y diferenciación osteoblástica, en cultivos de osteoblastos de las líneas celulares ya mencionadas [Schurman, 2008].

Posteriormente, se estudiaron los efectos de un tratamiento oral con MET en ratas, sobre cultivos *ex vivo* de MSC aisladas de la médula ósea. Estas demostraron una mayor predisposición hacia el perfil osteogénico al desarrollar un incremento en la actividad de FAL, producción de colágeno tipo 1 y mineralización extracelular; y un aumento en la expresión de los marcadores Runx2 y osteocalcina [Molinuevo, 2010]. Conjuntamente, en un modelo de lesión ósea se encontró que el tratamiento oral con MET mejoró la reparación ósea en comparación con las ratas controles y diabéticas no tratadas.

En un modelo de ratas con diabetes con déficit parcial de insulina (inducido mediante inyección de nicotinamida seguida por otra de estreptozotocina), el tratamiento con MET aumentó la relación Runx2/PPAR γ en MSC aisladas de la médula ósea. Asimismo, previno varias alteraciones en la estructura microscópica ósea inducida por la diabetes, como la reducción de: la densidad osteocítica, cantidad de hueso trabecular, actividad TRAP en la esponjosa primaria y espesor del cartílago de crecimiento [Tolosa, 2013].

Finalmente, en otro trabajo demostramos que tres semanas de tratamiento oral con esta droga en ratas Wistar con SM inducido por fructosa, aumentó el potencial osteogénico de las MSC de médula ósea y mejoró algunos parámetros histomorfométricos de huesos largos [Felice, 2017].

Sin embargo, no todos los resultados reportados para esta droga muestran un beneficio para el tejido óseo. Jeyabalan y colaboradores no pudieron demostrar efectos de la MET sobre la microarquitectura ósea o la reparación de fracturas después de ocho semanas de tratamiento en ratas jóvenes, o luego de un tratamiento de cuatro semanas en ratones ovariectomizados [Jeyabalan, 2013]. Además, La Fontaine y colaboradores encontraron que seis semanas de tratamiento con MET tuvieron un efecto adverso sobre la reparación de fracturas femorales y sus propiedades biomecánicas en ratas diabéticas [La Fontaine, 2016].

Sobre la base de estas consideraciones, si bien tanto nuestros estudios previos como los de otros investigadores demuestran que la MET posee efectos positivos sobre las MSC de

médula ósea y la microarquitectura del hueso, tanto la duración del tratamiento con este fármaco oral, como la alteración metabólica específica del modelo de roedor utilizado en el estudio, podrían influir en lo anteriormente mencionado.

Capítulo II

Hipótesis y

Objetivos

La **hipótesis** de este trabajo es que el SM induce una disminución en el potencial osteogénico de las células mesenquimáticas presentes en la médula ósea, generando en consecuencia alteraciones en la celularidad, microarquitectura, metabolismo y biomecánica ósea. Adicionalmente, que dichas alteraciones pueden ser prevenidas mediante un tratamiento oral con MET.

Para probar esta hipótesis, se propuso utilizar un modelo de ratas con SM inducido por una dieta rica en fructosa. Una vez establecido el SM, los animales fueron sometidos o no a un tratamiento con MET por vía oral durante tres meses.

Como **objetivo general** se planteó determinar las consecuencias del SM y/o su tratamiento con MET sobre diferentes tipos de huesos.

Los **objetivos específicos** del proyecto fueron investigar las acciones del SM y/o MET sobre:

1. El potencial osteogénico de las MSC presentes en la médula ósea de los animales.
2. La estructura microscópica de huesos largos, cortos y craneofaciales; en especial su celularidad (densidad de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) y microarquitectura (volumen y área trabecular, resorción trabecular; separación, espesor y número de trabéculas óseas). Evaluado por análisis histomorfométrico estático de huesos.
3. La formación ósea en huesos largos y cortos, evaluando: área de mineralización, tasa de aposición mineral, tasa de formación ósea relativa. Estudiado mediante histomorfometría dinámica.
4. El contenido, densidad y distribución espacial del mineral óseo trabecular y cortical de huesos. Determinado mediante Tomografía Computada Cuantitativa periférica (pQCT).
5. Propiedades mecánicas de huesos: módulo elástico, resistencia a la flexión/compresión, estrés máximo a ruptura. Investigado mediante ensayos de flexión a tres puntos en huesos largos.

Capítulo III

Materiales y

Métodos

III. 1. Estudios *in vivo*

Se procedió a evaluar los posibles efectos del SM inducido mediante una elevada ingesta de fructosa sobre el metabolismo y la microarquitectura ósea. Al mismo tiempo, se estudió el efecto de un tratamiento oral con MET para observar si era posible prevenir los supuestos cambios provocados por el SM. Para ello se utilizaron ratas machos Wistar de tres meses de edad al comienzo del ensayo con un peso inicial de 300 a 330 gramos. Los animales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, y trasladados al bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Se los mantuvo en un ambiente con temperatura controlada de 23°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los ensayos se llevaron a cabo teniendo en cuenta la Guía de Manejo y Entrenamiento de Animales de Laboratorio publicada por la UFAW [UFAW, 2011].

Inicialmente, los animales fueron divididos de forma aleatoria en dos grupos de 18 ratas cada uno. Uno de ellos recibió como bebida una solución de fructosa 20% p/v (Biopack, Buenos Aires, Argentina) *ad libitum*, mientras que al otro se le ofreció agua corriente estéril *ad libitum*. A su vez, ambos grupos recibieron alimento balanceado estándar (Asociación de Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina). Luego de 14 días de tratamiento, a la mitad de los animales de cada grupo se le adicionó MET (100 mg/kg/día) en su bebida. Así, se conformaron 4 grupos de 9 animales cada uno, nombrándolos: Vehículo (Veh), Metformina (M), Fructosa (F) y Fructosa + Metformina (FM). Estas condiciones se mantuvieron hasta cumplirse los 3 meses de tratamiento.

Cada uno de los animales recibió una inyección de dos fluorocromos (calceína y demeclociclina, subcutáneas, 3 y 10 días previos al sacrificio respectivamente) con el objetivo de reconocer los sitios de mineralización activa.

Al finalizar los tratamientos, los animales fueron pesados y anestesiados con inyecciones sucesivas de xilacina (intramuscular, 5 mg/kg peso corporal) y ketamina (intraperitoneal, 80 mg/kg peso corporal). Bajo anestesia, se obtuvieron muestras sanguíneas provenientes de la vena cava inferior. Posteriormente, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Tibia izquierda, fémur derecho, segunda vértebra lumbar y maxilar superior izquierdo de cada animal fueron disecados y procesados como se describen en las siguientes secciones.

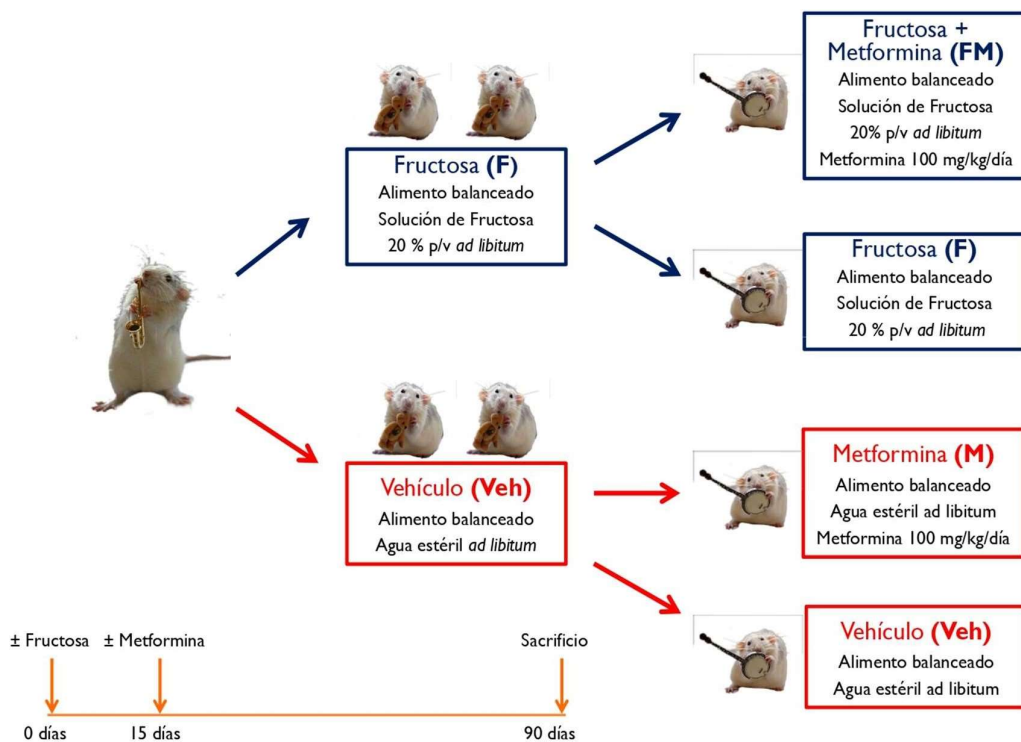


Figura III. 1. 1 - Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto del SM inducido por una dieta rica en fructosa, en conjunto o no con un tratamiento con MET, sobre el metabolismo óseo.

III. 1. 1. Determinación de parámetros séricos

Con el objetivo de evaluar el estado metabólico de los animales, se obtuvieron muestras de sangre posprandial. El suero fue separado del resto de los componentes sanguíneos por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos.

Los valores de glucosa, triglicéridos (TG), creatinina, colesterol total y colesterol HDL (HDLc) se determinaron mediante kits comerciales (WienerLab, Argentina), y la concentración de insulina mediante un kit ELISA específico para ratas (Cayman Chemical, EE.UU.). La resistencia a la insulina se calculó con el índice de evaluación del modelo de homeostasis-resistencia a la insulina (HOMA-IR), utilizando la siguiente ecuación: $[(\text{Glucosa (mg/dL)}) \times (\text{Insulina (mU/L)})] / 2430$ [Cacho, 2008]. Como marcador subrogante adicional de insulinoresistencia, evaluamos la relación TG/HDLc que puede estar relacionada con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y aterogenicidad [da Luz, 2008].

III. 1. 2. Protocolo de inyecciones de fluorocromos para la determinación de superficies óseas de mineralización activa

Se realizó la administración de dos fluorocromos por vía subcutánea. Diez días previos al sacrificio, los animales recibieron cloruro de demeclociclina (15mg/kg de peso corporal; Sigma, St Louis; MO, EEUU) y en el tercer día previo recibieron calceína (15mg/kg de peso corporal; Sigma, St Louis; MO, EEUU) [Aguirre et al., 2009; Felice et al., 2017]. Las soluciones fueron preparadas en solución fisiológica 1 hora antes de ser administradas y fueron esterilizadas por filtración [An, 2003].

III. 1. 3. Estudio de parámetros estructurales óseos por Tomografía Computada Cuantitativa Periférica (pQCT)

III. 1. 3. A. Obtención de las muestras

Posterior al sacrificio, las tibias izquierdas y las segundas vértebras lumbares fueron disecadas y despojadas de la musculatura. Se fijaron durante 24 hs en Formalina Neutra Tamponada (NBF, *neutral buffered formalin*), sumergidas posteriormente en etanol 70% y conservadas a 4°C hasta el momento de su transporte a la Universidad de Florida.

III. 1. 3. B. Mediciones

Estos estudios se realizaron en el Laboratorio del Dr. Aguirre en la Universidad de Florida, EEUU, en el marco de un proyecto cooperativo. Los huesos fueron escaneados utilizando un equipo Stratec XCT Research M (Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI) equipado con el software versión 6.20. Se realizaron dos medidas en las tibias izquierdas: la primera en la metáfisis proximal (25% de la longitud total del hueso) para evaluar parámetros óseos trabeculares, y la segunda en la diáfisis (50% de la longitud total) para evaluar los parámetros corticales [Aguirre, 2009]. Las segundas vértebras lumbares se escanearon a 25% y 75% de la longitud del cuerpo vertebral.

El sitio del hueso donde se realizaron las medidas fue determinado utilizando el escaneo previo (scout scan) que realiza el equipo.

III. 1. 3. C. Parámetros evaluados

Los parámetros medidos para la evaluación del tejido óseo en la metáfisis de tibias y en cuerpo vertebral fueron:

- ❖ Contenido mineral óseo total (CMO_{tot}), [mg/mm]

- ❖ Densidad mineral ósea total (DMO_{tot}), [mg/cm³]
- ❖ Contenido mineral óseo trabecular (CMO_{trab}), [mg/mm]
- ❖ Densidad mineral ósea trabecular (DMO_{trab}), [mg/cm³]

Los parámetros evaluados a nivel de la diáfisis fueron los siguientes:

- ❖ Contenido mineral óseo cortical (CMO_{cort}), [mg/mm]
- ❖ Densidad mineral ósea cortical (DMO_{cort}), [mg/cm³]
- ❖ Espesor de hueso cortical, [mm]
- ❖ Circunferencia del periostio, [mm]
- ❖ Circunferencia del endostio, [mm]

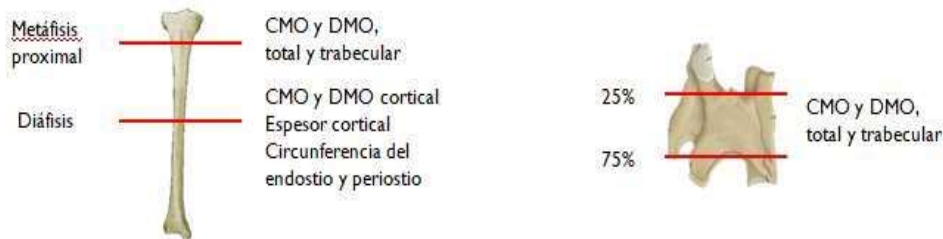


Figura III. 1. 3. C. 1 - Regiones analizadas por tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT) en tibias y segundas vértebras lumbares. CMO: contenido mineral óseo; DMO: densidad mineral ósea.

III. 1. 4. Análisis histomorfométrico

III. 1. 4. A. Obtención y procesamiento de las muestras

Metáfisis de tibias izquierdas y segundas vértebras lumbares

Los huesos se deshidrataron en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%) y xileno. Las muestras fueron orientadas y se utilizaron soluciones de composiciones variables de metilmetacrilato, dibutil (n-butil) ftalato y peróxido de benzoilo hasta quedar inmersas en la resina sólida resultante. Se realizaron cortes longitudinales con un micrótopo rotativo Leica RM 2025 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con cuchilla de carburo de tungsteno para obtener muestras de 8µm de espesor, las cuales se mantuvieron sin teñir con el fin de evaluar los parámetros de histomorfometría dinámica; y muestras de 4 µm de espesor que fueron deplastificadas con 2-metoxietil acetato para luego realizar la tinción de von Kossa con Tetrachrome como contracolorante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) [Aguirre, 2009].

Para evaluar solamente el modelado y remodelado óseo en el tejido trabecular se evitan:

las superficies de esponjosa primaria, para descartar los fenómenos de crecimiento óseo; y la superficie endocortical con el fin de no tener en cuenta este tipo de tejido. Se delimitó una región de interés entre 0,5 y 4 mm desde la placa de crecimiento, y 0,25 mm de las superficies endocorticales.

Diáfisis de tibias izquierdas

Las diáfisis de las tibias izquierdas se deshidrataron en soluciones de concentraciones crecientes de etanol y xileno, y fueron incrustadas sin descalcificar en *TAP Clear-Lite Casting Resin* (Tap Plastics, San Leandro, CA). Las muestras se seccionaron longitudinalmente (200-350 μm de espesor) con un cortador de precisión Isomet de baja velocidad (Buehler, Lake Bluff, IL), y fueron montadas en un portaobjetos Exakt Plexiglass con adhesivo Technovit Exakt mediante vacío y luz UV utilizando una prensa adhesiva Exakt 402 (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Alemania). Posterior a estos pasos, las muestras se rebajaron con una amoladora Exakt 400 CS (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Alemania) para obtener muestras de 50-100 μm de espesor. Finalmente, se colocaron los cubreobjetos utilizando como pegamento Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Maxilares superiores

Luego de la eutanasia, los maxilares superiores izquierdos fueron diseccionados para estudiar la pérdida de tejido óseo alveolar en los espacios intermolares. Estos huesos fueron fijados en NBF y posteriormente descalcificados en solución de ácido fórmico 5% v/v durante 30 días, cambiando la solución cada 3 días. Luego de este paso, las muestras se deshidrataron por inmersión en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%) y xileno, y finalmente fueron incluidas en parafina de bajo punto de fusión.

Se realizaron cortes de 5 μm en el plano mesiodistal utilizando un micrótopo Microme HM 325 (GMI Inc., Ramsey, MN, EE. UU.), los cuales posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las secciones se realizaron desde el paladar hacia la superficie vestibular. El bloque fue orientado para visualizar las raíces mesiales y distales de todos los molares como un indicador de alineación adecuada. Cincuenta secciones consecutivas de 10 μm se descartaron para obtener finalmente dos secciones consecutivas más adyacentes a la superficie vestibular (secciones de la superficie vestibular) [Aguirre, 2012; Aguirre, 2017].

III. 1. 4. B. Tinciones realizadas

Hematoxilina – eosina

Estos colorantes se unen a diferentes estructuras celulares o de la matriz extracelular que poseen carga por medio de una interacción electrostática. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe a las estructuras con carga negativa al pH que se realiza la tinción (estructuras basófilas) en tono violáceo. La eosina, colorante con naturaleza ácida, tiñe componentes que poseen una carga positiva al pH al que realiza la tinción (estructuras acidófilas) de color rosado. Son ejemplos de estructuras basófilas los ácidos nucleicos y de estructuras eosinófilas las proteínas.

Los cortes descalcificados, desparafinados e hidratados fueron colocados en hematoxilina por 3 minutos y luego fueron lavados en agua corriente. Posteriormente se colocaron en eosina durante 30 segundos y se lavaron con agua destilada. Los preparados teñidos fueron deshidratados utilizando soluciones de etanol de concentración creciente y luego xileno para poder ser montados con Permount® (Fischer Chemical, Fischer Scientific, EEUU).

von Kossa con Tetrachrome como contracolorante

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

Se utilizaron cortes de hueso calcificado de 4 μm de espesor previamente deplastificados e hidratados. Los cortes fueron colocados por 15 minutos en solución de nitrato de plata 5% (Fischer Chemical, Fischer Scientific, EEUU) en oscuridad. Se lavaron con agua destilada y luego se colocaron en solución de carbonato de sodio 5% (Fischer Chemical, Fischer Scientific, EEUU) en formaldehído:agua destilada (1:3) por 2 minutos. Luego de lavar con agua destilada, los cortes se colocaron durante 20 segundos en reductor de Farmer, que contiene tiosulfato de sodio 9,5% y ferricianuro de potasio 0,5%. Los preparados se lavaron con agua corriente por 20 minutos y finalmente se tiñeron con la solución de Tetrachrome 2,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante 6 minutos [Hilton, 2014]. Los cortes se deshidrataron y fueron montados con Permount® (Fischer Chemical, Fischer Scientific, EEUU).

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

III. 1. 4. C. Evaluación de parámetros de histomorfometría estática

Metáfisis tibial proximal y segunda vértebra lumbar

Los cortes fueron analizados con el software Osteomeasure (Osteometrics Inc., Decatur, GA, EEUU).

Con los cortes teñidos de 4 μm de espesor se determinó:

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

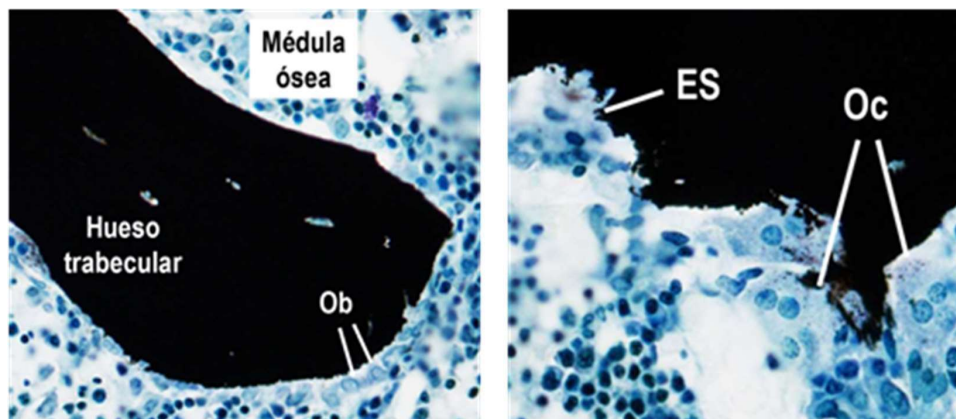


Figura III. 1. 4. C. 1 - Fotos de cortes de la metáfisis tibial proximal con la tinción de von Kossa y contracolorados con Tetrachrome. Ob: osteoblasto, Oc: osteoclasto, ES: superficie erosionada.

III. 1. 4. D. Evaluación de parámetros de histomorfometría dinámica

Evaluación de hueso trabecular en la metáfisis proximal de tibia y en el cuerpo de la segunda vértebra lumbar

Los parámetros dinámicos fueron medidos con el software Osteomeasure (Osteometrics Inc., Decatur, GA, EEUU). Se utilizaron cortes de 8 μm de espesor de hueso calcificado que

fueron observados en un microscopio (Nikon Labophot-2, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EEUU) utilizando luz UV. Esto pone en evidencia las zonas de la superficie ósea que captaron los fluorocromos inyectados. Las longitudes de onda de excitación y emisión son, respectivamente, 470 nm y 509 nm para la calceína (datos del fabricante del reactivo), y 458 nm y 535 nm para el cloruro de demeclociclina [Pautke, 2010].

Este software nos permite determinar donde se encuentra una marcación simple (sLS) o una marcación doble (dLS) en la superficie del hueso trabecular. Luego se ingresa el tiempo, en días, que hubo entre las inyecciones que dieron lugar a las marcas, y el software calcula los siguientes parámetros:

- ❖ *Superficie de mineralización/superficie total de hueso trabecular (MS/BS), [%]*: porcentaje de la superficie del hueso trabecular donde existió marcación. El algoritmo que utiliza el software es $MS/BS = dLS + 1/2sLS$.
- ❖ *Índice de aposición mineral (MAR), [$\mu\text{m}/\text{d}$]*: es calculado por el programa teniendo en cuenta el tiempo que hubo entre las inyecciones de los dos fluorocromos y la distancia media entre ambas marcas fluorescentes.
- ❖ *Índice de formación ósea/superficie de hueso (BFR/BS), [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{día}$]*: se obtiene realizando el producto entre los dos parámetros nombrados anteriormente.

Evaluación de hueso cortical en la diáfisis media de la tibia

Se utilizó el software Osteomeasure (Osteometrics Inc., Decatur, GA, EEUU) para analizar las secciones de 50-100 μm de espesor, las cuales fueron observadas en un microscopio (Nikon Labophot-2, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EEUU) utilizando luz UV. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron las mismas que en las metáfisis y cuerpos vertebrales. Los parámetros estudiados tanto en el periostio como el endostio fueron:

- ❖ *Superficie de mineralización/superficie total de hueso trabecular (MS/BS), [%]*.
- ❖ *Índice de aposición mineral (MAR), [$\mu\text{m}/\text{d}$]*.
- ❖ *Índice de formación ósea/superficie de hueso (BFR/BS), [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{día}$]*.

III. 1. 5. Evaluación de resorción ósea en el hueso maxilar superior izquierdo

La pérdida de la altura vertical del hueso alveolar (AHA) se determinó midiendo la distancia desde una línea trazada entre las uniones cemento-esmalte (UCE) de los molares

adyacentes hasta la cresta del hueso alveolar (CHA) entre el primer y el segundo molar (M1-M2), y segundo y tercer molar (M2-M3) en cortes histológicos descalcificados de la superficie palatina y bucal coloreados con H-E, utilizando el Sistema OsteoMeasure (OsteoMetrics Inc., Atlanta, GA, EEUU) con un aumento de 100X [Aguirre, 2012; Messer, 2020].

III. 1. 6. Análisis biomecánico mediante ensayo de flexión en tres puntos

III. 1. 6. A. Obtención y procesamientos de muestras

Luego del sacrificio, los fémures derechos fueron disecados y despojados de su musculatura. Se conservaron en glicerina a 4°C hasta el momento de su transporte a la Universidad de Florida.

La prueba de flexión en tres puntos se realizó al 50% de la longitud total del hueso, utilizando una máquina de prueba electromecánica (Bose® ElectroForce® 5500 Test Instrument) con una celda de carga de 200 N de capacidad a temperatura ambiente, con una longitud de separación de 18 mm y una velocidad de carga de 1 mm/seg. La carga (F) y el desplazamiento (D) fueron registrados hasta la ruptura [Álvarez Lloret, 2018].

III. 1. 6. B. Análisis de los parámetros biomecánicos

Los datos de carga y desplazamiento de cada muestra se usaron para obtener cada una de las curvas de tensión-deformación. Se analizó:

- ❖ *Fuerza máxima soportada por el hueso antes de la ruptura (F_{max}):* considerada como su máxima resistencia.
- ❖ *Rigidez estructural del eje en el punto de fluencia (F_y/D_y):* relación entre la deflexión elástica máxima (desplazamiento del punto de fluencia D_y) y la carga máxima soportada elásticamente en el punto de fluencia (F_y).
- ❖ *Trabajo de fractura (E_{abs}):* cantidad de energía absorbida por el hueso mientras se deformaba. Se determina como el área bajo la curva tensión-deformación.
- ❖ *Momento de inercia:* medida de la inercia rotacional del cuerpo. Depende de la geometría del mismo y de la posición del eje de giro. Se calcula como: $(r_{ext}^4 - r_{int}^4) \cdot \pi / 4$; r_{ext} es el radio externo de la diáfisis, r_{int} es el radio interno.

- ❖ *Módulo de Young o módulo elástico:* se define mediante la fórmula $E = \frac{KL^3}{48I}$, donde K es la rigidez, L es la longitud de separación entre los apoyos, e I es el momento de inercia. Este módulo caracteriza el comportamiento del hueso mientras se deforma.

III. 2. Estudios *ex vivo*

III. 2. 1. Obtención e incubación de células estromales mesenquimáticas (MSC) de rata

Las MSC fueron obtenidas del canal medular de ambos húmeros. Posteriormente al sacrificio, estos huesos fueron disecados y despojados de los tejidos blandos. Se seccionaron las epífisis y se inyectó medio de cultivo esencial modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified essential medium*, Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) a través del canal medular en condiciones de esterilidad [Tropel, 2004].

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

Cuando las células alcanzaron confluencia (luego de aproximadamente 10 días), la monocapa celular fue despegada utilizando una solución 0,025% de tripsina (GIBCO, Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) en PBS - EDTA 1mM. Las células se resuspendieron en DMEM con suero fetal bovino (SFB) 10% y fueron repicadas en frascos de 75 cm². Por último, se repicaron nuevamente, esta vez en platos de cultivo multipocillos para su posterior análisis.

III. 2. 2. Diferenciación osteoblástica de MSC

Las MSC se repicaron a una densidad de 5x10⁴ células/pocillo en platos de 24 pocillos conteniendo medio DMEM - SFB al 10% y se incubaron a 37°C con atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ y 95% de aire. Después de que las células alcanzaran la confluencia, se las indujo a una diferenciación osteogénica utilizando como medio DMEM - SFB al 10%, al cual se le adicionó 25 mg/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β-glicerol-fosfato de sodio durante 15 días. El medio de cultivo se cambió entre dos y tres veces por semana [Molinuevo, 2010]. Estos compuestos agregados al medio inducen la expresión fenotípica osteoblástica. El ácido ascórbico es necesario para la acumulación de colágeno en la matriz extracelular y para inducir la actividad de la FAL. El β-glicerol-fosfato acentúa notablemente los efectos producidos por el ácido ascórbico actuando de forma sinérgica. A la vez, es necesario para la mineralización extracelular, relacionándose su catabolismo con la liberación de fosfato inorgánico.

Antes de iniciar la diferenciación osteoblástica, y luego de 15 días de la misma, se midió

la actividad específica de FAL, la producción de colágeno tipo 1, y la acumulación de depósitos extracelulares de calcio.

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

Actividad específica de Fosfatasa Alcalina (FAL)

Para la obtención del extracto celular sobre el cual se realizó el análisis, se lavó la monocapa con PBS y se lisó la misma con 200 μ l de Tritón X-100 0,1%. Se utilizó una alícuota de 50 μ l para medir la concentración de proteínas por el método de Bradford [Bradford, 1976]. Los 150 μ l restantes se usaron para evaluar la actividad de esta enzima.

La fosfatasa alcalina se determinó por un método colorimétrico cinético en el cual se evalúa la producción de p-nitrofenol (p-NP) a partir de la hidrólisis del sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP). La reacción se lleva a cabo a 37°C, pH = 10,4 y durante un tiempo que dependerá de la coloración que toma la solución. El p-NP es un compuesto coloreado por lo que se registra su producción espectrofotométricamente a 405 nm [Cortizo, 1995].

Los resultados calculados como nmoles de p-NP/mg de proteína/minuto se expresaron como porcentaje (%) del control antes de la diferenciación osteogénica (tiempo a 0 días).

Producción de colágeno tipo I

Las células cultivadas en los pocillos fueron fijadas con solución de Bouin (compuesta por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial en proporción 15:5:1) durante 1 hora. Luego se realizó un lavado con HCl 0,1 N y se tiñó con solución del colorante Sirius Red por 1 hora. El colorante retenido en las fibras de colágeno se extrajo en 1mL de NaOH 0,1N y se midió la absorbancia a 550nm [Tullberg-Reinert & Jundt, 1999].

Los resultados calculados como μ g de colágeno/pocillo se expresaron como porcentaje (%) del control a 0 días.

Producción de nódulos de mineralización extracelulares

Anteriormente a la diferenciación osteogénica y luego de 15 días de la misma, se evaluó la producción de nódulos de mineralización mediante un método colorimétrico [Ueno, 2001]. Las monocapas celulares fueron fijadas con formalina y se tiñeron con Rojo de Alizarina. El colorante adherido a los depósitos de calcio se extrajo con 1 mL de solución de NaOH 0,1 N y se evaluó la absorbancia a 548 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) del control antes de la diferenciación osteogénica.

III. 2. 4. Determinación de niveles de expresión de marcadores osteogénicos, adipogénicos y pro-resortivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Para los estudios de RT-PCR se aisló el ARN total de las células MSC cultivadas sobre placas de 6 pocillos con y sin diferenciación osteogénica mediante el método del reactivo TRIZOL (Invitrogen, Argentina), según indicaciones del fabricante.

Se analizó la expresión de marcadores osteogénicos (Runx2, FAL, osteocalcina (OC), osteoprotegerina (OPG)), adipogénicos (PPAR γ) y pro-resortivos (RANKL) mediante la técnica semicuantitativa RT-PCR utilizando Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, MMLV-RT (PB-L Productos Bio-Lógicos, Argentina), oligo dT (Biodinamics) y ADN polimerasa termoestable (Taq pegasus; PB-L Productos Bio-Lógicos, Argentina). El oligo dT funciona como cebador de la reacción para retrotranscribir ARN mensajero (ARNm) y así obtener ADN codificante. Para esta técnica se prosiguió según el protocolo indicado por el fabricante. Los primers específicos para los marcadores se diseñaron a partir de datos de secuencia del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el software CLC Genomics Workbench (QIAGEN). La temperatura de alineamiento (Ta) para cada par de primers se calculó usando el software disponible en www.appliedbiosystems.com. Luego los productos de la RT-PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 2% p/v en buffer TAE (0.5% p/v Tris (Sigma-Aldrich, Bs. As., Arg.), 0.1% v/v ácido acético glacial y 0.001 M de EDTA, pH 8) con Gel-Red (Sigma-Aldrich, Bs. As., Arg.) como colorante de visualización. El gel se corrió a 150V durante 20 minutos y la cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó utilizando la herramienta de análisis de geles del programa MBF ImageJ.

Los resultados se expresaron como intensidad relativa y representan el cociente entre la intensidad de señal de la banda específica de cada marcador evaluado y la intensidad de señal de β -actina como proteína constitutiva (housekeeping) [Lino, 2019].

III. 2. 5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba posterior de Tukey utilizando el software InStat Graph Pad 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ para todos los análisis estadísticos.

Capítulo IV

Resultados

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

La evaluación de los pesos corporales mostró sólo diferencias significativas entre los grupos Vehículo (Veh) ($387,78 \pm 11,03$ g) y Fructosa (F) ($442,50 \pm 15,78$ g). En tanto que el grupo Metformina (M) tuvo un peso promedio de $412,00 \pm 11,33$ g y el de Metformina + Fructosa (FM) de $398,89 \pm 13,17$. Ninguno de estos grupos mostró diferencias significativas respecto del grupo de ratas control (Veh). Así, pudimos observar que el tratamiento con MET previno el aumento de peso provocado por tres meses de SM inducido por fructosa.

La Tabla IV. 1. 1 resume los resultados obtenidos al evaluar los perfiles bioquímicos postprandiales de los distintos grupos experimentales.

Tabla IV. 1. 1 - Perfiles de sueros posprandiales luego de 12 semanas de tratamientos con fructosa y/o metformina.				
	Veh	M	F	FM
Glucosa [mg/dL]	214.4 ± 6.3	$242.3 \pm 10.9^{\#}$	$314.8 \pm 36.0^{**}$	$244.0 \pm 12.3^{\#}$
Insulina [ng/ml]	1.94 ± 0.35	2.32 ± 0.52	$3.87 \pm 0.40^*$	3.55 ± 0.61
HOMA-IR	4.18 ± 0.70	$5.66 \pm 1.15^{##}$	$12.32 \pm 1.61^{**}$	8.77 ± 1.56
Colesterol HDL [mg/dL]	54.3 ± 2.8	49.0 ± 2.7	55.9 ± 2.4	60.9 ± 2.6
Colesterol total [mg/dL]	217.8 ± 7.4	200.0 ± 8.3	232.5 ± 16.0	226.7 ± 4.1
Triglicéridos [mg/dL]	79.9 ± 19.0	$74.3 \pm 8.6^{##}$	$188.6 \pm 34.6^{**}$	113.4 ± 15.8
Relación TG/HDLc	0.35 ± 0.07	$0.43 \pm 0.07^{\#}$	$0.78 \pm 0.10^{**}$	0.50 ± 0.07
Creatinina [mg/dL]	0.74 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.76 ± 0.02
Veh: grupo vehículo; F: grupo de ratas que recibieron 20% de fructosa en agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que recibieron fructosa más metformina. HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; TG: triglicéridos; HDLc: colesterol HDL. Diferencias: ** p<0,01, ***p<0,001 vs. Veh; #p<0,05, #p<0,05, ##p<0,01 vs. F. Resultados expresados como la media \pm SEM.				

Los valores de glucemia mostraron un aumento en el grupo al cual se le administró una dieta rica en fructosa con respecto al grupo Veh. En los valores de los animales co-tratados con fructosa y MET se observa una normalización de la glucosa en sangre debido al tratamiento de prevención con este fármaco, no encontrándose diferencias con Veh. En el grupo M tampoco se vieron diferencias significativas respecto de Veh, lo que concuerda con la acción normoglucémica del mencionado fármaco.

De manera similar, los valores correspondientes a la insulinemia y al índice HOMA-IR expresan un incremento en las ratas del grupo F versus Veh, indicando hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en estos animales. Además, la MET previno estas alteraciones al no encontrarse diferencias entre los grupos FM y Veh.

Los niveles de triglicéridos plasmáticos también registraron un incremento en el grupo F en relación a Veh. MET no modificó este parámetro al ser administrada sola, pero en las ratas tratadas con esta droga en conjunto con fructosa se vio una disminución con respecto al grupo F, aunque no teniendo un valor significativo; y a su vez, no se encontraron diferencias significativas comparado con los valores del grupo Veh.

El colesterol total y colesterol HDL en sangre no resultaron modificados por los diferentes tratamientos, por lo que no existieron diferencias entre los grupos estudiados. Pero sí la relación TG/colesterol HDL fue mayor en el grupo al que se le indujo el SM (grupo F) en relación al vehículo, lo que es prevenido en las ratas co-tratadas con dicho azúcar y MET. Por lo tanto, la dieta rica en fructosa induce alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico compatibles con el desarrollo de un SM inducido de manera experimental, y estos cambios son prevenidos de forma parcial por un tratamiento oral con MET.

IV. 2. Análisis de la longitud de huesos

Se midieron las longitudes de las tibias izquierdas y los cuerpos de las segundas vértebras lumbares. Para el caso de los huesos largos no se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales, siendo: $39,33 \pm 0,33$ mm para el grupo Veh, $39,85 \pm 0,32$ mm para el grupo F, $40,46 \pm 0,33$ mm para el grupo M y $39,80 \pm 0,39$ mm para el grupo FM.

Tampoco se observaron diferencias en las mediciones de los cuerpos vertebrales, obteniéndose longitudes de $6,66 \pm 0,13$ mm para el grupo Veh, $6,69 \pm 0,13$ mm para el grupo F, $6,61 \pm 0,12$ mm para el grupo M y $6,83 \pm 0,13$ mm para el grupo FM.

IV. 3. Análisis estructural por tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT)

IV. 3. 1. Estudio del tejido óseo trabecular

El SM experimental de las ratas tratadas con fructosa (grupo F) no indujo cambios en los parámetros estudiados mediante pQCT en la metáfisis proximal de tibia en comparación con las ratas vehiculos (grupo Veh).

Por el contrario, MET disminuyó significativamente el CMO y la DMO trabecular, y el CMO total en las ratas M con respecto a Veh, y en los animales del grupo FM en comparación con aquellos del grupo F (Figura IV. 3. 1. 1).

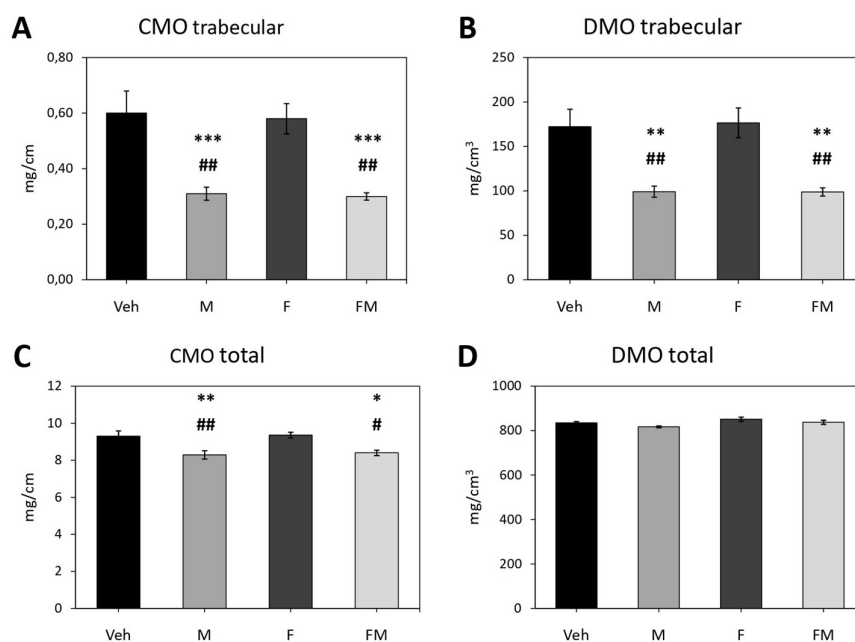


Figura IV. 3. 1. 1 - Análisis de tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT) de la metáfisis tibial proximal.

Veh: grupo de vehiculos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. Análisis de los parámetros del hueso trabecular que incluyen: (A) contenido mineral del hueso trabecular (CMO trabecular), (B) densidad mineral del hueso trabecular (DMO trabecular), (C) CMO total; (D) DMO total. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Diferencias: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Veh; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. F.

A su vez, las medidas realizadas en las segundas vértebras lumbares (Tabla IV. 3. 1. 1) no arrojaron diferencias entre grupos, tanto a 25% como a 75% del cuerpo vertebral.

Tabla IV. 3. 1. 1 - Análisis estructural del cuerpo vertebral de la segunda vértebra lumbar por pQCT

	Veh	M	F	FM
CMO Total [mg/cm]	4.76 +/- 0.37	4.49 +/- 0.18	5.05 +/- 0.24	4.42 +/- 0.23
DMO Total [mg/cm ³]	701 +/- 21	690 +/- 16	716 +/- 15	685 +/- 17
CMO Trabecular [mg/cm]	1.05 +/- 0.09	1.05 +/- 0.05	1.14 +/- 0.06	1.10 +/- 0.08
DMO Trabecular [mg/cm ³]	515 +/- 23	529 +/- 17	539 +/- 16	557 +/- 30

Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. CMO: contenido mineral óseo; DMO: densidad mineral ósea. Los resultados se expresan como la media ± SEM.

IV. 3. 2. Estudio del tejido óseo cortical

Como se observa en la Tabla IV. 3. 2. 1, en el escaneo de hueso cortical, realizado en la diáfisis de tibias, no se encontraron diferencias entre las ratas a las que se le indujo el SM y las del grupo Veh en todos los parámetros estudiados. A su vez, MET disminuyó significativamente el espesor cortical comparando los animales del grupo M con los Veh, y el CMO cortical y el espesor cortical en las ratas cotratadas con fructosa y MET (grupo FM) en relación con las tratadas solamente con fructosa (grupo F).

Tabla IV. 3. 2. 1 - Análisis estructural por pQCT a nivel de la diáfisis de tibia.				
	Veh	M	F	FM
CMO cortical [mg/cm]	8.69 +/- 0.95	8.01 +/- 0.59	8.99 +/- 0.37	8.04 +/- 0.53 [#]
DMO cortical [mg/cm³]	1346 +/- 15	1337 +/- 14	1344 +/- 11	1342 +/- 16
Espesor cortical [mm]	0.87 +/- 0.04	0.82 +/- 0.05 [*]	0.88 +/- 0.02	0.83 +/- 0.02 [#]
Circunferencia del periostio [mm]	10.40 +/- 0.72	10.03 +/- 0.39	10.38 +/- 0.60	9.93 +/- 0.55
Circunferencia del endostio [mm]	5.00 +/- 0.66	4.84 +/- 0.30	4.89 +/- 0.56	4.67 +/- 0.48
Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. CMO: contenido mineral óseo; DMO: densidad mineral ósea. Diferencias: *p<0,05 vs. Veh; # p<0,05 vs. F. Los resultados se expresan como la media ± SEM.				

IV. 4. Análisis histomorfométrico

IV. 4. 1. Histomorfometría dinámica

IV. 4. 1. 1. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica de la metáfisis tibial proximal

La Tabla IV. 4. 1. 1. 1 muestra la evaluación de las marcas registradas en la metáfisis tibial proximal como resultado de la inyección de fluorocromos. Este análisis reveló que la superficie activa de mineralización (MS/BS) y la tasa de aposición de mineral (MAR) no presentaron diferencias significativas en las distintas condiciones experimentales. Por lo tanto, la tasa de formación ósea (BFR/BS), equivalente al producto de estos dos parámetros, tampoco registró variaciones entre los diferentes tratamientos.

Tabla IV. 4. 1. 1 - Parámetros de histomorfometría dinámica en la metáfisis tibial				
	Veh	M	F	FM
MS/BS [%]	24.3 +/- 1.8	24.6 +/- 12.1	21.5 +/- 3.6	26.6 +/- 2.1
MAR [$\mu\text{m}/\text{d}$]	2.08 +/- 0.16	2.06 +/- 0.12	2.11 +/- 0.32	2.03 +/- 0.14
BFR/BS [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$]	51.6 +/- 6.9	51.8 +/- 7.1	50.5 +/- 12.0	55.7 +/- 7.9

Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. MS/BS: superficie de mineralización/superficie total de hueso trabecular; MAR: índice de aposición mineral; BFR/BS: índice de formación ósea/superficie de hueso. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

IV. 4. 1. 2. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica del cuerpo de la segunda vértebra lumbar

De manera similar a lo obtenido en la metáfisis proximal de tibia, al analizar los cuerpos de las segundas vértebras lumbares no se encontraron diferencias entre los grupos evaluados para ninguno de los parámetros dinámicos estudiados (Tabla IV. 4. 1. 2).

Tabla IV. 4. 1. 2. 1 - Parámetros de histomorfometría dinámica en el cuerpo de la segunda vértebra lumbar				
	Veh	M	F	FM
MS/BS [%]	8.68 +/- 0.95	6.84 +/- 1.34	6.27 +/- 1.22	7.58 +/- 0.53
MAR [$\mu\text{m}/\text{d}$]	1.03 +/- 0.18	1.09 +/- 0.23	1.14 +/- 0.26	0.89 +/- 0.10
BFR/BS [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$]	9.52 +/- 1.81	6.43 +/- 1.51	7.33 +/- 2.09	6.94 +/- 1.94

Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. MS/BS: superficie de mineralización/superficie total de hueso trabecular; MAR: índice de aposición mineral; BFR/BS: índice de formación ósea/superficie de hueso. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

IV. 4. 1. 3. Estudio de parámetros de histomorfometría dinámica de la diáfisis tibial

Como se observa en la Tabla IV. 4. 1. 3. 1, en la superficie perióstica no existieron diferencias significativas para ninguno de los parámetros dinámicos que han sido estudiados. Sin embargo, al analizar el endostio, se observaron importantes reducciones en la superficie de mineralización (MS/BS) en todos los grupos evaluados con respecto al grupo Veh. A su vez, se demostró una disminución en el índice de formación ósea para todas las ratas tratadas con MET (grupos M y FM) y un decrecimiento en el índice de aposición mineral sólo para el grupo FM, siempre en relación al grupo Veh.

Tabla IV. 4. 1. 3. 1 - Parámetros de histomorfometría dinámica en la diáfisis de tibia				
<i>Superficie endóstica</i>	Veh	M	F	FM
MS/BS [%]	19.1 +/- 2.8	8.6 +/- 1.7**	7.3 +/- 1.3**	10.1 +/- 2.4**
MAR [µm/día]	2.40 +/- 0.69	1.54 +/- 0.52	0.68 +/- 0.32	0.51 +/- 0.13*
BFR/BS [µm³/µm²/da]	47.9 +/- 15.7	19.7 +/- 9.3*	5.6 +/- 3.3	6.8 +/- 2.9*
<i>Superficie perióstica</i>	Veh	M	F	FM
MS/BS [%]	33.5 +/- 4.2	45.7 +/- 6.1	37.2 +/- 3.5	45.6 +/- 5.2
MAR [µm/day]	3.02 +/- 0.64	2.72 +/- 0.41	2.18 +/- 0.30	1.99 +/- 0.24
BFR/BS [µm³/µm²/day]	120.7 +/- 34.4	127.3 +/- 26.2	80.1 +/- 12.6	94.8 +/- 17.9
Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. MS/BS: superficie de mineralización/superficie total de hueso trabecular; MAR: índice de aposición mineral; BFR/BS: índice de formación ósea/superficie de hueso. Los resultados se expresan como la media ± SEM.				

IV. 4. 2. Histomorfometría estática

IV. 4. 2. 1. Estudios de parámetros de histomorfometría estática de la metáfisis tibial proximal

IV. 4. 2. 1. A. Parámetros estructurales

Todas las ratas tratadas con MET experimentaron una reducción del volumen óseo trabecular (BV/TV), área trabecular y espesor de trabéculas (Figura IV. 4. 2. 1. A. 1, Panel A, B y C), al comparar el grupo M con respecto al Veh, y el grupo F en relación al FM. No se observaron diferencias significativas entre las ratas de los grupos Veh y F (Figura IV. 4. 2. 1. A. 1, Panel A - E). Asimismo, no se encontraron diferencias en los parámetros: separación trabecular y número de trabéculas entre todos los grupos experimentales.

En la figura IV. 4. 2. 1. A. 2 se observan las fotografías representativas de cortes histológicos de la tibia proximal de animales de todos los grupos experimentales, con el fin de demostrar los diferentes efectos de los tratamientos sobre la microarquitectura ósea.

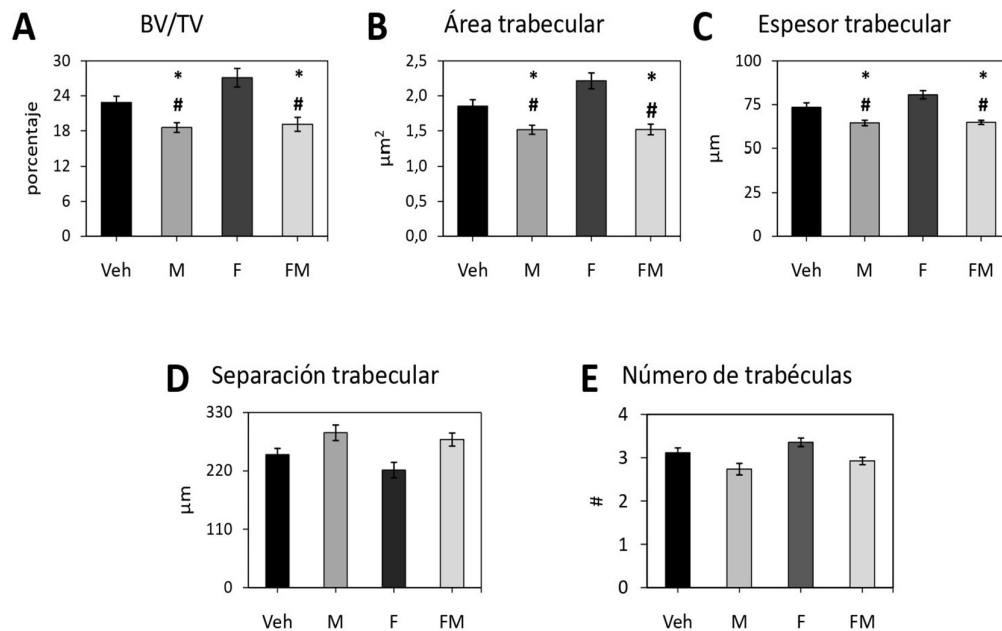


Figura IV. 4. 2. 1. A. 1 - Parámetros estructurales de la metáfisis tibial proximal.

(A) Volumen de hueso trabecular/volumen total (BV/TV). (B) Área trabecular. (C) Espesor trabecular. (D) Separación trabecular. (E) Número de trabéculas. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Diferencias: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs Veh; # $p < 0.05$ vs F.

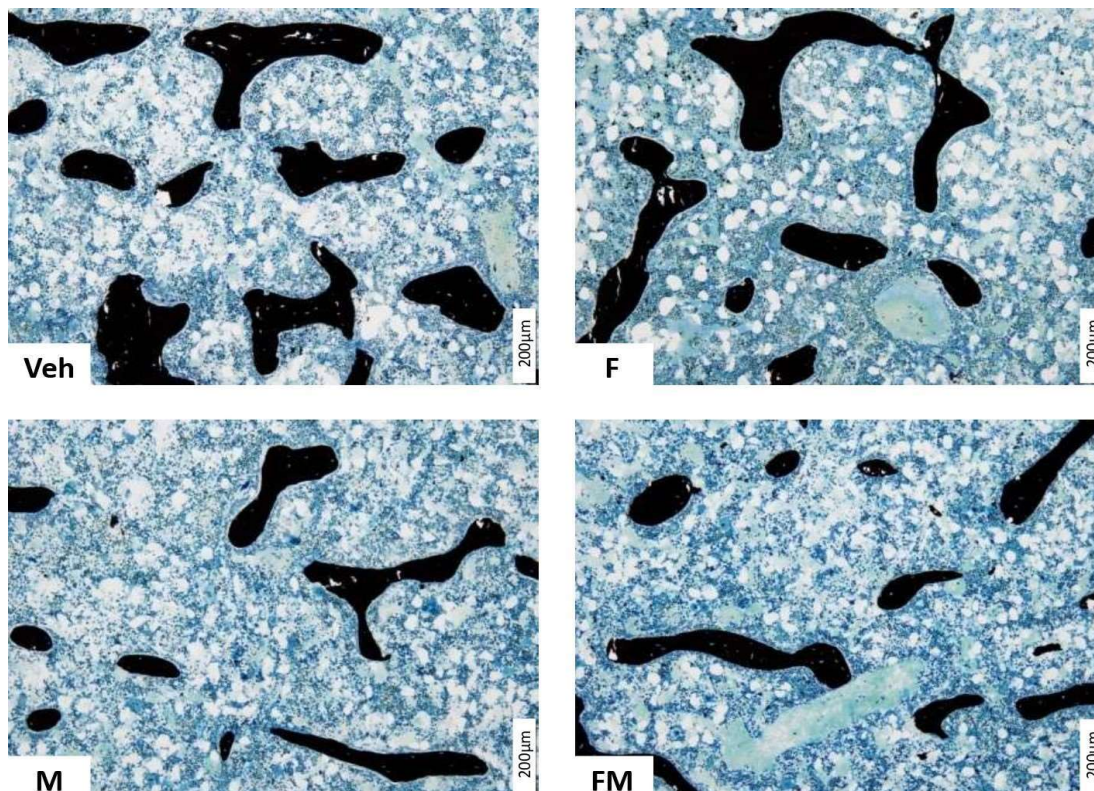


Figura IV. 4. 2. 1. A. 2 - Efectos de diferentes tratamientos sobre la microarquitectura de la tibia. Fotografías representativas de cortes histológicos de la tibia proximal de animales de todos los grupos experimentales. Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. Las tibias se diseccionaron, se procesaron como se indica en la Sección III. 1. 4. A., se tiñeron con tinción de von Kossa y Tetrachrome. Obj. (x10).

IV. 4. 2. 1. B. Parámetros celulares

Como puede apreciarse en la Tabla IV. 4. 2. 1. B. 1, al cuantificar el revestimiento trabecular de la metafisis proximal por osteoblastos (Ob) y osteoclastos (Oc), no se encontraron diferencias en el número de dichas células por unidad de superficie entre los distintos grupos experimentales. A su vez, la superficie trabecular cubierta por osteoblastos (Ob.S/BS) y por osteoclastos (Oc.S/BS) tampoco se modificó en relación a los diferentes tratamientos. A pesar de estos resultados, se evidenció una mayor cantidad de superficie erosionada en los grupos tratados con MET, sola o con fructosa, con respecto a las ratas vehículos.

Finalmente, la densidad de osteocitos en las trabéculas sólo mostró diferencias en el grupo en el cual fue inducido el SM experimental en comparación al resto de los mismos (grupo F respecto de Veh, M y FM).

Tabla IV. 4. 2. 1. B. 1 - Análisis histomorfométrico de metáfisis proximales de tibia para evaluar parámetros estáticos del hueso trabecular

	Veh	M	F	FM
Ob.S/BS [%]	13.20 +/- 1.21	10.52 +/- 0.79	10.35 +/- 1.24	11.63 +/- 1.46
N.Ob/B.Pm [#/ μ m]	17.51 +/- 1.60	14.09 +/- 1.26	14.27 +/- 1.66	15.01 +/- 1.85
Oc.S/BS [%]	6.07 +/- 0.75	5.21 +/- 0.54	4.40 +/- 0.44	6.78 +/- 0.69
N.Oc/B.Pm [#/ μ m]	1.44 +/- 0.18	1.24 +/- 0.12	1.03 +/- 0.08	1.47 +/- 0.11
ES/BS [%]	25.62 +/- 1.45	31.94 +/- 1.14*	31.24 +/- 2.51	34.68 +/- 1.07**

Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. Oc.S/BS: superficie de osteoblastos/superficie de hueso trabecular; Ob.N/B.Pm: número de osteoblastos/superficie de hueso trabecular; Oc.S/BS: superficie de osteoclastos/superficie de hueso trabecular; N.Oc/B.Pm: número de osteoclastos/superficie de hueso trabecular; ES/BS: superficie erosionada/superficie de hueso trabecular. Diferencias: *p<0.01, ** p<0.05 vs. F. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

IV. 4. 2. 2. Estudios de parámetros de histomorfometría estática del cuerpo de la segunda vértebra lumbar

Al evaluar los parámetros histomorfométricos en la segunda vértebra lumbar (volumen, área, número, espesor y separación de trabéculas), las ratas provenientes de todos los grupos estudiados mostraron resultados similares a los realizados en tibia, sin existir diferencias significativas entre los mismos, lo que se observa en la Tabla IV. 4. 2. 2. 1.

Tabla IV. 4. 2. 2. 1 - Análisis histomorfométrico del cuerpo de la segunda vértebra lumbar para evaluar parámetros estáticos del hueso trabecular

	Veh	M	F	FM
BV/TV [%]	28.10 +/- 1.24	30.98 +/- 0.79	33.74 +/- 1.22	30.56 +/- 1.24
Espesor trabecular [μm]	74.58 +/- 1.68	79.30 +/- 1.55	85.38 +/- 2.66	82.62 +/- 3.97
Separación trabecular [μm]	193.7 +/- 9.7	173.5 +/- 6.3	168.4 +/- 5.8	183.2 +/- 3.4
Número de trabéculas [#]	3.76 +/- 0.13	3.91 +/- 0.08	3.95 +/- 0.08	3.72 +/- 0.08
Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. Los resultados se expresan como la media ± SEM.				

IV. 5. Estudio para la determinación de pérdida de altura vertical del hueso alveolar (AHA)

En el análisis de la AHA para el espacio intermolar M1-M2 (Figura IV. 5. 1, panel A1) se observó que el grupo co-tratado con fructosa y MET (grupo FM) presentó una mayor distancia desde la unión cemento-esmalte (UCE) a la cresta del hueso alveolar (CHA), lo que es equivalente a una mayor pérdida de AHA, en comparación con el grupo Veh. Además, no se observaron diferencias entre los grupos Veh y F.

Similar a lo ocurrido en el espacio intermolar M1-M2, en M2-M3 (Figura IV. 5. 1, panel A2) se observó que las ratas tratadas solamente con MET (grupo M) obtuvieron un incremento significativo en la pérdida ósea en comparación con el grupo Veh (Figura IV. 5. 1, paneles B1 y B2). Aquí tampoco se encontraron diferencias entre Veh y F.

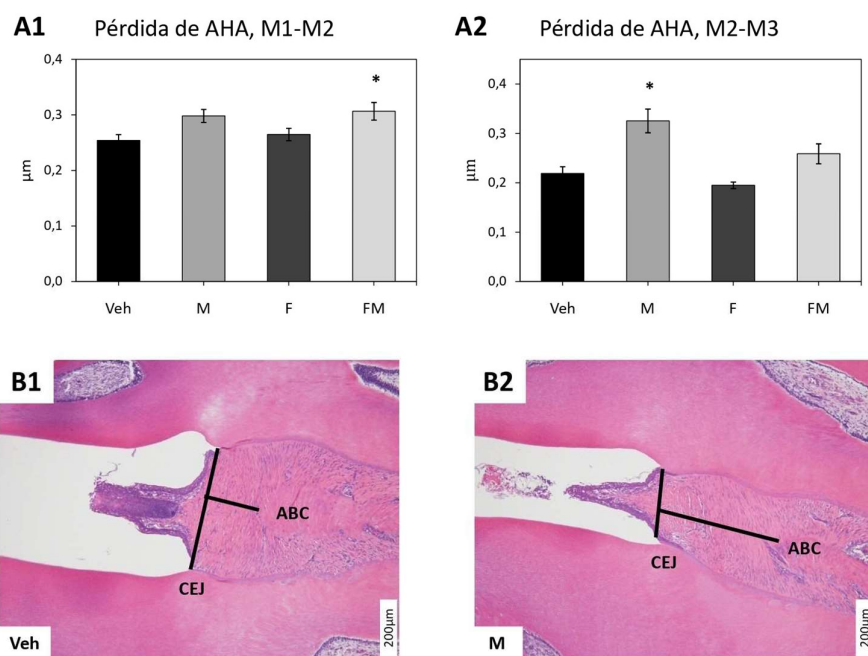


Figura IV. 5. 1 - Cuantificación de la pérdida ósea alveolar maxilar. Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. (A1) Grado de pérdida de AHA en el espacio interdental entre los primeros y segundos molares (M1-M2). (A2) Grado de pérdida de AHA en el espacio interdental entre segundos y terceros molares (M2-M3). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Diferencias: * $p < 0,05$ vs. Veh. (B1-B2) Imágenes representativas que demuestran la distancia desde la unión cemento- esmalte (UCE) a la cresta del hueso alveolar (CHA) en el espacio interdental M2-M3 en los grupos vehículo (Veh) y metformina (M). Obj. (x10).

IV. 6. Análisis biomecánico mediante ensayo de flexión en tres puntos

Los fémures derechos fueron sometidos a una prueba de flexión en tres puntos para observar las propiedades biomecánicas observándose una reducción significativa en el parámetro de trabajo de fractura en las ratas que fueron tratadas solamente con MET (grupo M) en relación al grupo Veh. No se observaron diferencias en el resto de los parámetros estudiados entre todos grupos (Tabla IV. 6. 1).

Tabla IV. 6. 1 - Resultados de las pruebas mecánicas en fémur derecho (ensayo de flexión tres puntos)

	Veh	M	F	FM
Fuerza máxima[N]	164.8 +/- 9.8	151.6 +/- 8.7	163.6 +/- 11.4	142.2 +/- 8.4
Rigidez[N/mm]	383.8 +/- 46.4	302.7 +/- 17.7	436.7 +/- 37.4	309.1 +/- 12.4
Estrés final [N/mm²]	248.9 +/- 20.1	256.8 +/- 19.7	238.4 +/- 26.9	220.3 +/- 16.2
Módulo de Young [N/mm²]	7.47 +/- 0.66	8.04 +/- 0.98	6.89 +/- 0.58	6.52 +/- 0.94
Trabajo de fractura [N.mm]	81.00 +/- 7.24	57.21 +/- 2.98**	60.14 +/- 3.91	78.29 +/- 4.78
Momento de inercia [mm⁴]	5.12 +/- 0.33	4.47 +/- 0.17	4.95 +/- 0.26	4.64 +/- 0.24

Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina.
Diferencias: ** p<0,01 vs. Veh. Los resultados se expresan como la media ± SEM.

IV. 7. Evaluación del potencial osteogénico en MSC

IV. 7. 1. Evaluación de actividad específica de FAL, producción de colágeno tipo 1 y acumulación de mineral extracelular

Para evaluar los efectos deletéreos del Síndrome Metabólico experimental sobre la diferenciación osteogénica in vitro de las MSC y su posible prevención debido al tratamiento con metformina oral, estas células fueron aisladas de los canales medulares de ambos húmeros de las ratas, luego de su sacrificio (Sección III. 2. 1.).

Después de 15 días de inducción osteogénica, las MSC derivadas de ratas tratadas con F mostraron una disminución significativa en la actividad de FAL, secreción de colágeno tipo 1 y mineralización extracelular, en comparación con las MSC del grupo Veh. Todos estos efectos anti-osteogénicos ex vivo de la fructosa fueron completamente prevenidos por el co-tratamiento con metformina (grupo FM). Por otro lado, las MSC derivadas de animales tratados sólo con metformina (grupo M, comparado con Veh) mostraron una reducción significativa en FAL y colágeno tipo 1, y un incremento significativo en su mineralización (Figura IV. 7. 1. 1)

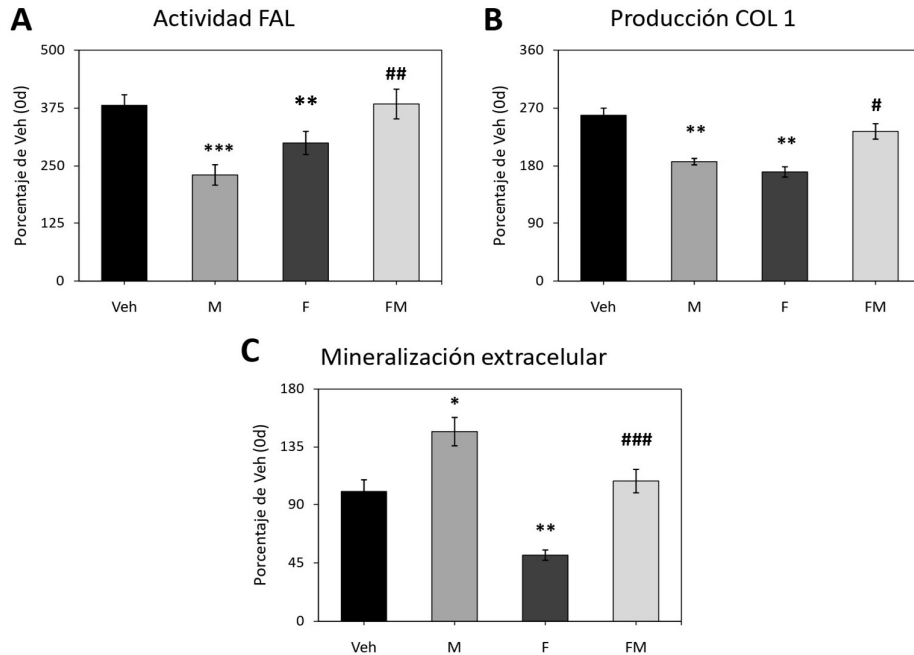


Figura IV. 7. 1. 1 - Efecto ex vivo de todos los tratamientos orales con animales sobre el potencial de diferenciación osteogénica de MSC. Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. Se obtuvieron las MSC de ambos húmeros de animales pertenecientes a todos los grupos experimentales, se cultivaron en un medio osteogénico durante 15 días y se evaluaron para: (A) actividad de fosfatasa alcalina (FAL), (B) producción de colágeno tipo 1 y (C) formación de nódulos extracelulares de mineralización. Diferencias: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Veh; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ frente a F. Los resultados se expresan como porcentaje de Veh a los 0 días de diferenciación osteogénica y se dan como la media \pm SEM.

IV. 7. 2. Evaluación de niveles de expresión génica de marcadores osteogénicos, anti-osteogénicos y pro-resortivos

Se estudiaron las expresiones génicas relativas, luego de 15 días de inducción osteogénica, de: fosfatasa alcalina (FAL), osteocalcina (OC), osteoprotegerina (OPG), ligando del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL), receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR- γ), y factor de transcripción Runx2; los cuales fueron normalizados utilizando β -actina como gen housekeeping.

Tabla IV. 7. 2. 1 - Expresiones génicas relativas de diferentes marcadores normalizados con un gen housekeeping (β -actina).

	FAL	OC	OPG	RANKL	PPAR- γ	Runx2
Veh	0.92 +/- 0.03	1.26 +/- 0.12	1.31 +/- 0.09	0.73 +/- 0.03	0.50 +/- 0.03	0.32 +/- 0.05
M	0.95 +/- 0.03	1.15 +/- 0.16	1.51 +/- 0.17	0.64 +/- 0.09	0.74 +/- 0.09	0.48 +/- 0.09
F	0.88 +/- 0.04	1.13 +/- 0.09	0.92 +/- 0.10 (*,\$)	1.18 +/- 0.09 (**)	0.62 +/- 0.05	0.48 +/- 0.09
FM	0.97 +/- 0.05	1.01 +/- 0.16	0.90 +/- 0.05 (*,\$)	0.79 +/- 0.02 (##)	0.56 +/- 0.07	0.50 +/- 0.05

Veh: grupo de vehículos; F: grupo de ratas que reciben un 20% de fructosa en el agua de bebida; M: grupo de metformina oral; FM: grupo de ratas que reciben fructosa más metformina. Diferencias: * p<0,05, ** p<0,01 vs. Veh; ## p<0,01 vs. F; \$ p<0,05 vs M. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

Como se observa en la Tabla IV. 7. 2. 1, no se obtuvieron diferencias en la expresión de Runx2 y PPAR γ entre todos los grupos experimentales. Por lo tanto, los diferentes tratamientos realizados sobre los animales no modificaron el balance osteogénico/adipogénico a nivel de la expresión génica en nuestro estudio *ex vivo*.

En adición, las ratas con SM experimental (grupo F) demostraron un mayor perfil pro-resortivo, ya que se obtuvo un incremento en la expresión de RANKL con respecto al grupo Veh, y esto fue prevenido en el tratamiento con MET (grupo FM). A su vez, vemos una concordancia para la expresión génica de OPG en los animales tratados solamente con fructosa (grupo F), ya que este nivel es mayor con respecto al grupo Veh. Sin embargo, en este caso la MET no previno el efecto de este azúcar (grupo FM).

No se observaron diferencias en las expresiones relativas de FAL y OC entre todos los grupos estudiados.

Capítulo V

Discusión

Síndrome metabólico y fructosa

Un aumento en la prevalencia de la obesidad se ha relacionado con una mayor incidencia de Diabetes mellitus tipo 2 e intolerancia a la glucosa, que a su vez está fuertemente asociada con el SM [Kolovou, 2007]. La incidencia de dicho síndrome está incrementando a nivel mundial, junto con un aumento del estilo de vida sedentario [Yamaoka, 2012]. En las últimas décadas, la ingesta de fructosa se ha acelerado debido a la introducción del jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (JMAF) como edulcorante principal para bebidas no alcohólicas y alimentos procesados [Pollock, 2012]. El consumo excesivo de este azúcar se ha identificado como un factor de riesgo importante para el desarrollo del SM [Yang, 2018], y por ende para condiciones crónicas como Diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular [Miranda, 2005a].

La fructosa induce una menor secreción de insulina que la glucosa, debido a que no estimula a las células beta pancreáticas. Asimismo, bajo esta condición, la leptina tendrá una concentración disminuida ya que su liberación depende de la acción de la insulina. Como resultado, se tendrá una menor reducción del apetito, pudiendo inducir un aumento del peso corporal y/u obesidad [Basciano, 2005; Steinert, 2011; King, 2018]. Esta situación combinada con la alta lipogenicidad de la fructosa puede derivar en hiperinsulinemia y resistencia a la insulina [Basciano, 2005], y a una acumulación excesiva de triglicéridos que faciliten la formación de radicales libres de oxígeno y daños oxidativos en el tejido adiposo [Furukawa, 2004].

Por otra parte, se sabe que una dieta rica en fructosa causa inflamación. En conjunto con la hiperglucemia, se producen AGEs a través de reacciones no enzimáticas entre los azúcares y proteínas o lípidos. Esto es frecuente en el colágeno y la elastina, contribuyendo con la aterosclerosis. Además, los AGEs potencian la inflamación y el estrés oxidativo, que se relacionan también con la resistencia a la insulina y, a su vez, permiten la progresión del SM [Dekker, 2010; King, 2018].

En base a estas cuestiones se han desarrollado modelos experimentales de SM inducido. Los animales utilizados son sometidos a dietas ricas en hidratos de carbono, grasas o una combinación de ambos. Dichos modelos experimentales son capaces de mimetizar varias anormalidades metabólicas y fisiopatológicas del SM en humanos, tales como: intolerancia a la glucosa, dislipidemia, resistencia a la insulina y aumento de la presión arterial [Thorburn, 1989; Thresher, 2000; Oron-Herman, 2008; Maiztegui, 2009; Felice, 2014; Mamikutty, 2014; Dupas, 2017; Felice, 2017; Wong, 2018; Korkmaz, 2019].

En el presente trabajo de Tesis utilizamos un modelo experimental de SM inducido por fructosa previamente caracterizado en nuestro laboratorio, así como por otros investigadores. Luego de evaluar los parámetros bioquímicos en el grupo tratado sólo con fructosa, se observaron alteraciones metabólicas muy similares a las del SM en humanos. Nuestro modelo se asoció con aumento del peso corporal, hiperglucemia posprandial, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, una relación de TG/HDLc elevada, y un mayor valor de HOMA-IR, lo que sugiere que la fructosa oral indujo resistencia a la insulina y SM.

SM y sus posibles efectos sobre el tejido óseo

Varios estudios clínicos han evaluado las consecuencias del SM en el tejido óseo; sin embargo, los resultados informados no son del todo claros. En estos trabajos se han estudiado los efectos del SM sobre la DMO y la predisposición a fracturas. En varios estudios se ha encontrado que los pacientes con SM tienen una disminución de DMO y un incremento en la incidencia de fracturas osteoporóticas, con un efecto más pronunciado a medida que aumenta el número de componentes del SM [von Muhlen, 2007; Hwang, 2010; Kim, 2010]. Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación directa entre el SM y la DMO [Sun, 2014; Chin, 2020], o incluso han descrito una asociación positiva [Muka, 2015].

Un paciente con SM puede presentar diferentes combinaciones de los componentes de este síndrome, y ello sumado a que existen diferentes criterios diagnósticos propuestos por distintas sociedades de expertos, hace que los sujetos con SM conformen un grupo con una heterogeneidad considerable. También existe una pluralidad por fuera de estos componentes que suele estar presente al momento de realizar algunas evaluaciones, como características propias de la población en estudio (sexo, índice de masa corporal, rango etario, etc.) y sus hábitos personales (consumo de medicamentos, tabaquismo, sedentarismo, etc.). Estos datos no son ajustados en todos los trabajos, por lo que se observa una diversidad de diseños que complica trazar un paralelismo entre ellos. Otro punto de debate es si los efectos del SM sobre el tejido óseo deberían realizarse considerando a este síndrome como un todo, o si deberían evaluarse los efectos óseos de cada uno de sus componentes en forma individual [Sun, 2014].

En este trabajo de Tesis, utilizamos un modelo bien caracterizado de SM inducido por una dieta rica en fructosa, a fin de evaluar su efecto sobre el metabolismo y la arquitectura ósea. Se estudió tanto el tejido óseo trabecular como el cortical de huesos representativos del esqueleto axial y apendicular, con el fin de abarcar la mayor parte posible de estos supuestos cambios. Dado que en nuestros experimentos anteriores no pudimos demostrar alteraciones en

el hueso trabecular y cortical después de 3 a 5 semanas de una dieta rica en fructosa [Felice, 2014; Felice, 2017] (aunque sí una menor capacidad osteogénica de las células mesenquimáticas presentes en la médula ósea), planteamos la hipótesis de que una exposición más prolongada a dicha dieta podría inducir diferencias significativas.

Primeramente, decidimos evaluar el tejido óseo trabecular ya que posee una alta tasa de recambio [Clarke, 2008] y es donde se deberían observar los mayores efectos. Asimismo, si bien la tasa de recambio óseo es mucho más baja en el tejido óseo cortical, se propuso también evaluar el efecto del SM en el mismo con el propósito de observar el comportamiento en ambos tipos de tejido óseo.

El hueso trabecular fue evaluado a nivel de la metafisis proximal de tibia y del cuerpo de la segunda vértebra lumbar debido a que son regiones con alto contenido de trabéculas, permitiendo un análisis correcto y preciso. El CMO y DMO del hueso trabecular para estas dos regiones óseas de las ratas con SM, no mostraron diferencias con respecto al grupo control (Veh) al ser evaluados por tomografía computada periférica cuantitativa (pQCT). Similarmente, en estudios publicados por otros autores tampoco se observaron diferencias por pQCT en tibia y fémur después de una dieta alta en fructosa de 15 semanas [Tzansi, 2008]; y en cuerpo entero luego de una dieta alta en fructosa/alta en grasas (HF/HF) de 20 semanas [Wong, 2018].

En cortes histológicos sin descalcificar (también de metafisis tibial proximal y cuerpo de la segunda vértebra lumbar) se evaluaron parámetros estructurales: volumen de hueso trabecular relativo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), su espesor (Th.Tb) y la separación entre las mismas, no existiendo diferencias entre las ratas con SM y los animales control (Veh). Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos mediante el escaneo por pQCT.

Estas nulas diferencias observadas en la cantidad y densidad mineral ósea trabecular no necesariamente se trasladan a una misma calidad del tejido óseo. Frecuentemente se utiliza la DMO para realizar un pronóstico sobre posibles fracturas. Sin embargo, no siempre este pronóstico es acertado debido a que la DMO es un indicador de la cantidad y distribución de mineral óseo, pero no siempre de su calidad. Además, existe evidencia que la fragilidad ósea no se encuentra necesariamente relacionada con una disminución de este parámetro [Vilaca, 2020]. En patologías metabólicas como Diabetes Mellitus o SM, esto puede explicarse debido al aumento de la formación de AGEs. En estas situaciones, el colágeno tipo 1 presente en la matriz extracelular ósea puede formar menos entrecruzamientos secundarios y terciarios de origen enzimático, debido a que sufre glicosilaciones no enzimáticas que pueden alterar la resistencia ósea aún en ausencia de una DMO disminuida [McCarthy, 2013; Asadipooya, 2019].

En este trabajo también se evaluaron parámetros histomorfométricos estáticos en la metáfisis proximal de tibia, cuantificando superficies recubiertas/número tanto de osteoblastos (Ob.S/BS y N.Ob/B.Pm) como de osteoclastos (Oc.S/BS y N.Oc/B.Pm), así como la superficie trabecular erosionada (ES/BS). No se hallaron diferencias significativas en estos parámetros entre los animales con SM y las ratas control (Veh), similarmente a lo observado en nuestro laboratorio para exposiciones más cortas al SM [Felice, 2014; Felice, 2017].

Por histomorfometría dinámica del hueso trabecular se evaluó también la superficie mineralizada (MS/BS), la tasa de aposición mineral (MAR) y la tasa de formación ósea (BFR/BS). No se observaron alteraciones inducidas por el SM experimental tanto en la metáfisis proximal de tibia como en el cuerpo de la segunda vértebra lumbar. Esto concuerda con los parámetros estáticos obtenidos, ya que como se mencionó, no existieron diferencias en las superficies recubiertas/número de osteoblastos y osteoclastos. A su vez, esto es similar a lo reportado por otros autores en el fémur de animales con SM inducido por una dieta alta en fructosa/alta en grasas [Wong, 2018].

En el hueso cortical se evaluaron parámetros estructurales y funcionales. Primeramente, se realizó un escaneo por pQCT de la diáfisis de tibias, región conformada mayoritariamente por tejido óseo cortical. No se observaron cambios inducidos por el SM en DMO, CMO ni en la geometría diafisaria. De igual manera, por histomorfometría dinámica no se observaron diferencias endósticas ni periósticas asociadas al SM.

Se evaluó la biomecánica diafisaria femoral mediante un ensayo de flexión a tres puntos. Diferencias en los parámetros mecánicos se basarían principalmente en alteraciones de la arquitectura y/o calidad del tejido cortical, predominante en esta región del hueso. No encontramos diferencias para ningún índice biomecánico entre animales con SM y ratas control (Veh), lo cual es coincidente con lo hallado por pQCT e histomorfometría estática y dinámica. Esto indicaría que en nuestro modelo de SM, los principales determinantes de la fortaleza ósea son estructurales más que de calidad del material. Aunque no lo evaluamos en forma directa, sería esperable que en nuestro modelo de SM la acumulación de AGEs sobre las fibras de colágeno tipo 1 del fémur no sea suficiente como para disminuir la calidad ósea y aumentar su fragilidad, como sí ocurre en el caso de Diabetes mellitus [Manolagas, 2010; McCarthy, 2013; Asadipooya, 2019]. Otros autores tampoco han encontrado alteraciones biomecánicas óseas asociadas a SM [Tsanzi, 2008; Yarrow, 2016].

En esta Tesis también estudiamos el posible efecto del SM sobre huesos craneofaciales. En cortes descalcificados del maxilar superior, evaluamos la pérdida de hueso alveolar interradicular. No se observaron alteraciones en este parámetro asociadas al SM. Si bien se ha

descripto previamente que la incidencia y/o el desarrollo de periodontitis se correlacionan positivamente con el número de componentes del SM [Nibali, 2013; Lamster, 2017]; y, a su vez, que la periodontitis provoca un aumento tanto de la inflamación periodontal como de la pérdida de hueso alveolar [Li, 2015], no pudimos observarlo en nuestro modelo de SM.

En vista de nuestros resultados actuales y los de otros investigadores, parecería que en roedores los modelos de SM experimental inducidos por una dieta rica en fructosa no se asocian con alteraciones óseas estructurales y/o funcionales.

Células estromales mesenquimáticas

Los osteoclastos provienen de células vasculares progenitoras de granulocitos/monocitos (CFU-GM); mientras que las células estromales mesenquimáticas de la médula ósea (MSC) son capaces de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares como osteoblastos, adipocitos y condrocitos. El microambiente en el que se encuentren las MSC hará expresar ciertos genes que las comprometerán a diferenciarse en alguno de estos tipos celulares. Además, distintos factores como el uso de fármacos, tipos de dietas o condiciones metabólicas pueden marcar tendencias en dicha diferenciación celular [Nuttall; 2004; Kawai, 2013]. El balance de señales osteogénicas/adipogénicas/osteoclastogénicas en el microambiente celular (y la duración de los estímulos) modula la formación y remodelado óseo, y así podría afectar la estructura y función del hueso.

En esta Tesis se realizaron cultivos *ex vivo* de MSC, a los que se les indujo una diferenciación osteogénica con el fin de cuantificar marcadores osteoblásticos como: actividad de fosfatasa alcalina (FAL), producción de colágeno tipo 1 y mineralización de la matriz extracelular. Encontramos que el SM inducido por dieta rica en fructosa disminuyó el potencial osteogénico de las MSC (versus MSC de ratas Veh), obteniéndose una menor producción de colágeno tipo 1 y depósitos de mineral extracelular.

Además, se determinaron por RT-PCR los valores de diferentes relaciones de niveles de expresión de factores de transcripción osteogénicos/adipogénicos/osteoclastogénicos. Para los animales con SM, no existieron diferencias en las expresiones de FAL, osteocalcina, Runx2 y PPAR γ en comparación al grupo control (Veh). Por otro lado, se observó una mayor expresión relativa de RANKL y una menor expresión de osteoprotegerina en relación con lo demostrado en las ratas vehículo (grupo Veh), indicando un perfil pro-resortivo y siendo concordantes con los resultados obtenidos para cultivo celular.

Sin embargo, esto no se reflejó en lo observado en huesos largos. Es importante tener en cuenta que en los ensayos *ex vivo* se brindaron diferentes tipos de sustancias a través del medio de cultivo con el fin de obtener un entorno favorable para la diferenciación osteogénica de las MSC. Por lo tanto, el ambiente en el que se encontraron estas células podría ser diferente al que poseen en el interior del hueso, viéndose afectadas de distinta manera de acuerdo al entorno que las rodea y a los diferentes factores que actúan dentro de este órgano.

Los resultados obtenidos con las MSC en este trabajo de Tesis, son similares a los ya descritos en nuestros trabajos previos. Anteriormente, el tratamiento con fructosa se realizó durante 3 a 5 semanas, y también indujo una disminución del potencial osteogénico de las MSC [Felice, 2014; Felice, 2017]. A su vez, demostramos previamente en un modelo de Diabetes con deficiencia parcial de insulina, que las MSC de animales diabéticos poseen una menor capacidad osteogénica [Tolosa, 2013].

Efectos de la metformina sobre el SM experimental

La metformina (MET) es una biguanida insulino-sensibilizante. Es la droga más utilizada para el tratamiento de Diabetes mellitus tipo 2 y se prescribe con frecuencia para pacientes con SM y/o intolerancia a la glucosa. Actúa disminuyendo los niveles de glucemia en ayunas y posprandiales al reducir la gluconeogénesis en el hígado y al mejorar la captación de glucosa en los tejidos periféricos [Bailey, 2017; Fujita, 2017].

En nuestro modelo de SM, el tratamiento con MET mejoró las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta rica en fructosa (grupo FM versus F). Esta droga normalizó los valores de glucemia posprandial, trigliceridemia, insulinemia, relación TG/HDLc e índice HOMA-IR, no encontrándose diferencias respecto del grupo control (Veh); lo cual es coincidente con el accionar de la misma al disminuir la gluconeogénesis y lipogénesis, y aumentar la utilización de la glucosa circulante [Rena, 2017].

Es importante destacar que la dosis de MET utilizada (100 mg/kg de peso/día) es mayor que la empleada en humanos debido a las diferencias farmacodinámicas entre las especies. La vida media plasmática de esta droga en ratas es de sólo dos minutos, mucho menor en comparación con la de humanos que es de cinco horas [Choi, 2008].

Efectos de la metformina en el tejido óseo

El único ensayo clínico prospectivo donde se evaluó el efecto de hipo- y normogluceantes sobre el metabolismo óseo y riesgo de fracturas, fue el Asian Diabetes Outcomes Prevention Trial (ADOPT). En este trabajo se encontró que, aunque la incidencia de fracturas fue similar en pacientes asignados a cohortes de MET o sulfonilureas, el tratamiento con MET se asoció con una disminución significativa en los marcadores séricos de formación y resorción, indicando un menor remodelado óseo [Zinman, 2010]. Importantemente, una disminución en el recambio óseo también se ha asociado con complicaciones esqueléticas de la Diabetes mellitus [McCarthy, 2013]. Todos los demás trabajos clínicos publicados son de tipo observacional, la mayoría de los cuales no muestran efectos de MET sobre el hueso [Vestergaard, 2005; Solomon, 2009; American Diabetes Association, 2013; Choi, 2016], aunque otros encuentran un menor riesgo de fractura ósea asociado con dicho tratamiento [Meier, 2008; Monami, 2008; Oh, 2020]. Sin embargo, según una investigación reciente este fármaco tiende a prescribirse en pacientes con un menor riesgo global de fractura [Colhoun, 2012].

Se han publicado también diferentes estudios preclínicos que evalúan los efectos *in vivo* de la MET sobre el esqueleto, aunque sus resultados son controversiales. Por un lado, 4-8 semanas de tratamiento con esta droga mejoraron la DMO y la microarquitectura esquelética en ratones normales [Marycz, 2016] y resistentes a la insulina [Wang, 2012], así como en ratas adultas ovariectomizadas [Gao, 2010]. Por otro lado, tras seis semanas de tratamiento, La Fontaine y colaboradores encontraron efectos adversos de MET sobre la reparación de fracturas femorales y sus propiedades biomecánicas en ratas diabéticas [La Fontaine, 2016]. En otros estudios, Jeyabalan y col. no encontraron ningún efecto de la MET sobre la arquitectura ósea o sobre la reparación de fracturas, tanto en ratas jóvenes tratadas 8 semanas como en ratones ovariectomizados tratados durante 4 semanas [Jeyabalan, 2013]. Finalmente, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, 3 semanas de tratamiento con MET previno la pérdida de densidad osteocítica causada por SM, pero sin inducir mayores cambios en la arquitectura ósea [Felice, 2017].

En conjunto, estos estudios indican que los efectos óseos de la MET podrían depender tanto de la duración del tratamiento con este fármaco oral, como de la alteración metabólica específica del modelo de roedor utilizado en el estudio. Por tal motivo, en este trabajo de Tesis se propuso investigar los efectos sobre el tejido óseo de un tratamiento con MET oral durante 3 meses (es decir, mayor que en cualquier estudio preclínico previamente publicado), en animales con y sin SM.

De manera sorpresiva para nosotros, encontramos que dicho tratamiento con MET provocó alteraciones sobre la arquitectura del hueso cortical y trabecular en tibias.

En primera medida, realizamos un escaneo de la metáfisis proximal tibial por pQCT encontrando una disminución significativa en la DMO y el CMO, en ambos grupos tratados con MET (grupos M y FM, versus Veh y F). Este hallazgo a su vez coincidió con lo observado para varios de los parámetros determinados por histomorfometría estática en la metáfisis tibial proximal: ambos grupos tratados con MET mostraron una reducción del volumen óseo (BV/TV), área trabecular y espesor trabecular, respecto de las ratas control y aquellas tratadas con fructosa. Sin embargo, no se observaron diferencias en el número de trabéculas ni en su separación. En cuanto a los parámetros estructurales, la MET provocó un aumento en la superficie erosionada (aunque sin afectar el número y densidad de osteoblastos y osteoclastos), lo que correlaciona con la reducción observada en los parámetros estáticos.

Todos estos estudios fueron también realizados en el cuerpo de la segunda vértebra lumbar, aunque no se observaron diferencias entre grupos para ningún parámetro cuantificado. Esto indicaría que esta droga afectaría a los huesos de manera diferencial según su tipo y tasa de recambio óseo.

Otro análisis efectuado en hueso trabecular fue la histomorfometría dinámica, basado en el depósito de calceína y demeclociclina, medido bajo iluminación ultravioleta. Tanto en la metáfisis tibial proximal como en cuerpo de la segunda vértebra lumbar, la capacidad de formación ósea no fue afectada por el tratamiento con MET, en presencia de SM o no, al momento de las inyecciones de los fluorocromos.

Como ya fue mencionado, el hueso cortical fue estudiado en la región de la diáfisis tibial. Aquí también se realizó un análisis por pQCT, encontrando alteraciones en las ratas tratadas con MET (grupos M y FM): se observó una reducción en el CMO en el grupo FM con respecto al grupo F, y un menor espesor cortical en el grupo M en relación con Veh y en el FM versus F, demostrando que el tratamiento con este fármaco también afectó a este tipo de hueso. No se encontraron efectos de la MET sobre la formación ósea en el periostio medido mediante histomorfometría dinámica. Sin embargo, en la superficie del endostio se demostró una reducción en la superficie mineralizada en todos los grupos evaluados con respecto al grupo Veh; como también una disminución en el índice de formación ósea para todas las ratas tratadas con MET (grupos M y FM) y un decrecimiento en MAR sólo para el grupo FM, siempre en relación al grupo Veh.

Para completar el estudio funcional de huesos largos, se realizaron las pruebas biomecánicas en fémur. Aquí se encontró una reducción significativa en el trabajo de fractura en

las ratas tratadas solamente con MET (grupo M versus Veh), lo cual se puede asociar a una disminución de las propiedades mecánicas funcionales del hueso cortical.

En el maxilar superior, evaluamos el efecto del tratamiento con MET sobre la pérdida de hueso alveolar interradicular. Los resultados obtenidos mostraron la misma tendencia observada para huesos largos: se encontró una mayor pérdida alveolar en todas las ratas tratadas con MET (grupos M y FM, versus Veh). Si bien se ha reportado previamente que la metformina tiene efectos beneficiosos sobre la pérdida de hueso alveolar y la periodontitis [Sun, 2022], esto podría depender tanto de la concentración utilizada de la droga [Cortizo, 2006; Sun, 2022] como de la duración del tratamiento, mucho más prolongado en nuestro estudio que en los reportados con anterioridad. Además, la mayoría de los trabajos previos se basaron en un modelo de periodontitis inducida, mientras que nosotros no realizamos ningún tipo de inducción de inflamación periodontal [Bak, 2010; Pradeep, 2013; Malta, 2020; Sun, 2022].

A modo de resumen, se demostró que el tratamiento de ratas con MET durante 3 meses (en presencia o ausencia de SM) afectó negativamente varios parámetros estructurales del hueso trabecular y cortical en tibia, produjo una disminución del trabajo de fractura en fémur y aumentó la pérdida de hueso alveolar en maxilares superiores. Sin embargo, se debe tener precaución al traducir nuestros hallazgos a un contexto clínico. Los resultados de varios estudios clínicos en humanos indican que el tratamiento con esta droga probablemente no esté asociado con un aumento en el riesgo de fracturas óseas [Meier, 2008; Monami, 2008; Oh, 2020], lo que sugiere que el efecto de este fármaco insulino-sensibilizante sobre el tejido óseo podría ser especie-específico.

Metformina y MSC

Previamente, hemos demostrado efectos pro-osteogénicos directos *in vitro* de la metformina tanto en osteoblastos como en MSC [Cortizo, 2006; Molinuevo, 2010; Tolosa, 2013]. También encontramos que el tratamiento de ratas no diabéticas con dicha droga durante dos semanas, aumentó la reparación del tejido óseo [Molinuevo, 2010], lo que sugiere que la exposición a corto plazo podría inducir efectos positivos en el mismo. A su vez, demostramos previamente que el tratamiento con MET durante dos semanas en ratas diabéticas con déficit parcial de insulina, indujo en sus MSC un aumento en la expresión del factor de transcripción Runx2, en la producción de colágeno tipo 1, en la expresión de FAL y en la capacidad de mineralización extracelular [Tolosa, 2013].

La mayoría de los estudios *in vitro* han informado efectos proosteogénicos de MET, promoviendo el equilibrio fenotípico de las MSC hacia la osteoblastogénesis, aumentando la capacidad de formación de hueso de los osteoblastos y disminuyendo el reclutamiento y la actividad de resorción ósea de los osteoclastos [Gao, 2008; Lee, 2010; Mai, 2011; Marycz, 2016]. Sin embargo, también se ha reportado que esta droga podría tener un efecto perjudicial dependiendo de la concentración utilizada [Cortizo, 2006; Sun, 2022], que disminuye la proliferación de cultivos primarios de células del núcleo pulposo de discos intervertebrales humanos [Kaya, 2020] y que aumenta la apoptosis de células estromales mesenquimáticas de origen humano [Marycz, 2016].

En este trabajo de Tesis, encontramos que el tratamiento de ratas con MET por un lado indujo una disminución significativa en la actividad de FAL y en la secreción de colágeno tipo 1 de las MSC (grupo M versus Veh), aunque por otro lado previno la reducción de la actividad osteogénica provocada por el SM (grupo FM versus F). Además, el monotratamiento con MET no indujo cambios en las expresiones de todos los marcadores estudiados por RT-PCR. Sin embargo, esta droga previno el aumento en la expresión relativa de RANKL provocado por el SM (grupo FM), pero no pudo hacerlo con la disminución en la expresión de osteoprotegerina.

Comparado con nuestro estudio previo [Felice, 2017], observamos un decaimiento del potencial osteogénico de las MSC obtenidas de animales tratados con MET. Esto podría deberse a la diferencia en el tiempo de exposición a esta droga, casi cuatro veces mayor en el presente estudio (3 meses versus 3 semanas).

Así, en animales tratados con MET, los presentes resultados obtenidos para las MSC se encuentran mayormente alineados con los efectos negativos que encontramos para la arquitectura y biomecánica de huesos largos, y para la pérdida de hueso alveolar. De todas formas, entendemos que es necesario ampliar esta investigación para evaluar el estado de activación de los factores de transcripción y las vías de señalización con el fin de dilucidar mecanismos de acción celulares específicos para la MET, que permitan explicar los efectos óseos deletéreos a largo plazo reportados en este trabajo de Tesis.

Capítulo VI

Conclusiones

✓ La dieta rica en fructosa indujo un Síndrome Metabólico (SM) caracterizado por aumento de peso y alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos (F versus Veh).

✓ Las alteraciones metabólicas inducidas por el SM fueron prevenidas por un co-tratamiento con metformina (FM versus F).

✓ No se observaron cambios inducidos por el SM en la cantidad ni en la distribución del mineral óseo, evaluada por pQCT (F versus Veh).

✓ A través de estudios histomorfométricos estáticos y dinámicos se observó que el SM no indujo cambios en la estructura ni la arquitectura ósea (F versus Veh).

✓ Las células estromales mesenquimáticas (MSC) derivadas de animales con SM presentaron un menor potencial osteogénico (F versus Veh).

✓ El co-tratamiento con metformina previno total o parcialmente los efectos antiosteogénicos del SM sobre las MSC (FM versus F). Sin embargo:

✓ El tratamiento sólo con metformina provocó una disminución en la capacidad osteogénica de las MSC (M versus Veh).

✓ Todas las ratas tratadas con metformina tuvieron una mayor pérdida de hueso alveolar maxilar, y un efecto negativo sobre varios parámetros estructurales trabeculares y corticales de huesos del esqueleto apendicular pero no axial (M versus Veh, FM versus F).

✓ El tratamiento con metformina afectó negativamente el desempeño biomecánico femoral (M versus Veh).

El Síndrome Metabólico inducido por fructosa no se asoció a largo plazo con cambios en el contenido mineral, distribución mineral, arquitectura y estructura ósea en ratas machos Wistar, aunque en el análisis *ex vivo* las células estromales mesenquimáticas hayan presentado una reducción en su potencial osteogénico. El tratamiento con metformina durante 3 meses indujo alteraciones trabeculares y corticales en el esqueleto apendicular, así como pérdida de hueso alveolar maxilar, y afectó negativamente la biomecánica ósea femoral.

Capítulo VII

Referencias

A

American Diabetes Association. (2013). Treatment effects on measures of body composition in the TODAY clinical trial. *Diabetes Care*, 36:1742–1748

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

Aguirre, J. I.; Akhter, M.; Kimmel, D.; Pingel, J.; Xia, X.; Williams, A.; Jorgensen, M.; Edmonds, K.; Lee, J.; Reinhard, M.; Battles, A.; Kesavalu, I.; Wronski, T. J. (2012). Enhanced alveolar bone loss in a model of non-invasive periodontitis in rice rats, *Oral Dis.*; 18:459-468.

Aguirre JI, Akhter MP, Neuville KG, Trcalek CR, Leeper AM, Williams AA, Rivera M, Kesavalu L, Ke HZ, Liu M, Kimmel DB. (2017). Age-related periodontitis and alveolar bone loss in rice rats. *Arch Oral Biol*, 73:193-205.

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

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

Álvarez-Lloret, P., Fernández, J. M., Molinuevo, M. S., Lino, A. B., Ferretti, J. L., Capozza, R. F., Cortizo, A. M., & McCarthy, A. D. (2018). Multi-Scale Approach for the Evaluation of Bone Mineralization in Strontium Ranelate-Treated Diabetic Rats. *Biological trace element research*, 186(2), 457-466.

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

Anderson H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports*, 5(3), 222-226.

Asadipooya, K., & Uy, E. M. (2019). Advanced Glycation End Products (AGEs), Receptor for AGEs, Diabetes, and Bone: Review of the Literature. *Journal of the Endocrine Society*, 3(10), 1799-1818.

Aydin, A.T. (2016). Osteonecrosis and Metabolic Bone Disorders. In: Korkusuz, F. (Eds) Musculoskeletal Research and Basic Science. Springer, Cham.

B

Bak, E. J., Park, H. G., Kim, M., Kim, S. W., Kim, S., Choi, S. H., Cha, J. H., & Yoo, Y. J. (2010). The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. *Journal of periodontology*, 81(3), 412-419.

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

Barzilay, J. I., Davis, B. R., Pressel, S. L., Ghosh, A., Puttnam, R., Margolis, K. L., & Whelton, P. K. (2017). The Impact of Antihypertensive Medications on Bone Mineral Density and Fracture Risk. *Current cardiology reports*, 19(9), 76.

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

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

Bailey C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 60(9), 1566-1576.

Blake, G. M., & Fogelman, I. (2008). How important are BMD accuracy errors for the clinical interpretation of DXA scans? *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 23(4), 457-462.

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

Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.

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.

Bray G. A. (2010). Fructose: pure, white, and deadly? Fructose, by any other name, is a health hazard. *Journal of diabetes science and technology*, 4(4), 1003-1007.

Bray, G. A., & Popkin, B. M. (2014). Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes? Health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes care*, 37(4), 950-956.

Brodthorn, M.D.; Ellis, C.B.; Silva, M.J. (1999). Growing C57B1/6 mice increase whole bone mechanical properties by increasing geometric and material properties. *J. Bone Miner. Res.*, 14 (1999), pp. 2159-2166.

Burr D. B. (2002). Targeted and nontargeted remodeling. *Bone*, 30(1), 2-4.

C

Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 295:E1269-76.

Caliceti, C., Calabria, D., Roda, A., & Cicero, A. (2017). Fructose Intake, Serum Uric Acid, and Cardiometabolic Disorders: A Critical Review. *Nutrients*, 9(4), 395.

Cappuccio, F. P., Kalaitzidis, R., Dunclift, S., & Eastwood, J. B. (2000). Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *Journal of nephrology*, 13(3), 169-177.

Carran, E. L., White, S. J., Reynolds, A. N., Haszard, J. J., & Venn, B. J. (2016). Acute effect of fructose intake from sugar-sweetened beverages on plasma uric acid: a randomised controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, 70(9), 1034-1038.

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

Chin, K. Y., Wong, S. K., Ekeuku, S. O., & Pang, K. L. (2020). Relationship Between Metabolic Syndrome and Bone Health - An Evaluation of Epidemiological Studies and Mechanisms Involved. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 13, 3667-3690.

Choi YH, Lee MG, Lee I. (2008). Effects of diabetes mellitus induced by alloxan on the pharmacokinetics of metformin in rats: restoration of pharmacokinetic parameters to the control state by insulin treatment. *J Pharm Pharm Sci*; 11:88-103.

Choi HJ, Park C, Lee YK, Ha YC, Jang S, Shin CS. (2016). Risk of fractures and diabetes medications: a nationwide cohort study. *Osteopor Int*, 27:2709–2715

Chun, K. J. (2011). Bone Densitometry. *Seminars in Nuclear Medicine*, 41 (3), 220-228

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

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

Colhoun HM, Livingstone SJ, Looker HC, Morris AD, Wild SH, Lindsay RS. (2012). Scottish Diabetes Research Network Epidemiology G. Hospitalised hip fracture risk with rosiglitazone and pioglitazone use compared with other glucose-lowering drugs. *Diabetologia*; 55:2929-37.

Collison, K. S., Saleh, S. M., Bakheet, R. H., Al-Rabiah, R. K., Inglis, A. L., Makhoul, N. J., Maqbool, Z. M., Zaidi, M. Z., Al-Johi, M. A., & Al-Mohanna, F. A. (2009). Diabetes of the liver: the link between nonalcoholic fatty liver disease and HFCS-55. *Obesity* (Silver Spring, Md.), 17(11), 2003-2013.

Compston, J. E., Watts, N. B., Chapurlat, R., Cooper, C., Boonen, S., Greenspan, S., Pfeilschifter, J., Silverman, S., Diez-Perez, A., Lindsay, R., Saag, K. G., Netelenbos, J. C., Gehlbach, S., Hooven, F. H., Flahive, J., Adachi, J. D., Rossini, M., LaCroix, A. Z., Roux, C., ... Siris, E. S. (2011). Obesity Is Not Protective against Fracture in Postmenopausal Women: GLOW. *The American Journal of Medicine*, 124(11), 1043-1050.

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

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

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

Cusi, K.; Maezono, K.; Osman, A.; Pendergrass, M.; Patti, M. E.; Pratipanawatr, T.; DeFronzo, R. A.; Kahn, C. R. & Mandarino, L. J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase-

and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*, 105, 311-320.

D

da Luz PL, Favarato D, Faria-Neto JR Jr, Lemos P, Chagas AC. (2008). High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 63(4):427-32.

Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine reviews*, 34(5), 658-690.

de Araújo, I. M., Parreiras-E-Silva, L. T., Carvalho, A. L., Elias, J., Jr, Salmon, C., & de Paula, F. (2020). Insulin resistance negatively affects bone quality not quantity: the relationship between bone and adipose tissue. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 31(6), 1125-1133.

Deans, R. J.; Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, 28 (8), 875-884.

Dekker, M. J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A. C., & Adeli, K. (2010). Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 299(5), E685-E694.

DiNicolantonio, J. J., Mehta, V., Onkaramurthy, N., & O'Keefe, J. H. (2018). Fructose-induced inflammation and increased cortisol: A new mechanism for how sugar induces visceral adiposity. *Progress in cardiovascular diseases*, 61(1), 3-9.

Di Pino, A., & DeFronzo, R. A. (2019). Insulin Resistance and Atherosclerosis: Implications for Insulin-Sensitizing Agents. *Endocrine reviews*, 40(6), 1447-1467.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.

Dupas J, Feray A, Goanvec C, Guernec A, Samson N, Bougaran P, Guerrero F, Mansourati J. (2017). Metabolic Syndrome and Hypertension Resulting from Fructose Enriched Diet in Wistar Rats. *Biomed Res Int.*; 2017:2494067.

E

Escobedo, J.; Schargrotsky, H.; Champagne, B.; Silva, H.; Boissonnet, C. P.; Vinueza, R.; Torres, M.; Hernandez, R. & Wilson, E. (2009). Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol*, 8, 52.

Evans, A. L., Paggiosi, M. A., Eastell, R., & Walsh, J. S. (2015). Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 30(5), 920-928.

F

Felice JI, Gangoiti MV, Molinuevo MS, McCarthy AD, Cortizo AM. (2014). Effects of a metabolic syndrome induced by a fructose-rich diet on bone metabolism in rats. *Metabolism*. 63(2):296-305.

Felice, J. I., Schurman L., McCarthy A. D., Sedlinsky C., Aguirre J. I., Cortizo A. M. (2017). Effects of fructose-induced metabolic syndrome on rat skeletal cells and tissue, and their responses to metformin treatment. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 126:202-213.

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

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

Fujita, Y., & Inagaki, N. (2017). Metformin: New Preparations and Nonglycemic Benefits. *Current diabetes reports*, 17(1), 5.

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

G

Gao Y, Li Y, Xue J, Jia Y, Hu J. (2010). Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol.* 635(1-3):231-6.

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

Grundy S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine*, 26(4), 364-373.

H

Han, T. S.; Lean, M. E. J. (2015). Metabolic síndrome. *Medicine*, 43(2), 80-87.

Handelsman Y. (2009). Metabolic syndrome pathophysiology and clinical presentation. *Toxicologic pathology*, 37(1), 18-20.

Henriksen, K.; Neutzsky-Wulff, A. V.; Bonewald, L. F. & Karsdal, M. A. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*, 44, 1026-1033.

Hauge, E. M., Qvesel, D., Eriksen, E. F., Mosekilde, L., & Melsen, F. (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(9), 1575-1582.

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

Hou, J., He, C., He, W., Yang, M., Luo, X., & Li, C. (2020). Obesity and Bone Health: A Complex Link. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 600181.

Hu, Y., Semova, I., Sun, X., Kang, H., Chahar, S., Hollenberg, A. N., Masson, D., Hirschey, M. D., Miao, J., & Biddinger, S. B. (2018). Fructose and glucose can regulate mammalian target of rapamycin complex 1 and lipogenic gene expression via distinct pathways. *The Journal of biological chemistry*, 293(6), 2006-2014.

Hwang, D. K., & Choi, H. J. (2010). The relationship between low bone mass and metabolic syndrome in Korean women. *Osteoporosis international: a journal established as result of*

cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 21(3), 425-431.

I

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

Ishii, S., Cauley, J. A., Greendale, G. A., Nielsen, C., Karvonen-Gutierrez, C., Ruppert, K., & Karlamangla, A. S. (2014). Pleiotropic effects of obesity on fracture risk: the Study of Women's Health Across the Nation. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 29(12), 2561-2570.

Iwaniec, U. T., Wronski, T. J., & Turner, R. T. (2008). Histological analysis of bone. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 447, 325-341.

J

Jatkar A, Kurland IJ, Judex S. (2017). Diets High in Fat or Fructose Differentially Modulate Bone Health and Lipid Metabolism. *Calcif Tissue Int*. 100(1):20-28.

Jepsen, K. J., Silva, M. J., Vashishth, D., Guo, X. E., & van der Meulen, M. C. (2015). Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 30(6), 951-966.

Jeyabalan J, Viollet B, Smitham P, Ellis SA, Zaman G, Bardin C, Goodship A, Roux JP, Pierre M, Chenu C. (2013). The anti-diabetic drug metformin does not affect bone mass in vivo or fracture healing. *Osteoporos Int*. 24(10):2659-70.

Johnson, R. J., Sanchez-Lozada, L. G., & Nakagawa, T. (2010). The effect of fructose on renal biology and disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(12), 2036-2039.

K

- Kanazawa I. (2017). Interaction between bone and glucose metabolism [Review]. *Endocrine journal*, 64(11), 1043-1053.
- Kaneko, C., Ogura, J., Sasaki, S., Okamoto, K., Kobayashi, M., Kuwayama, K., Narumi, K., & Iseki, K. (2017). Fructose suppresses uric acid excretion to the intestinal lumen as a result of the induction of oxidative stress by NADPH oxidase activation. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1861(3), 559-566.
- Kawai, Masanobu & Rosen, Clifford. (2013). Bone Marrow Fat and Bone Mass. *Translational Endocrinology of Bone*. 167-179.
- Kaya YE, Karaarslan N, Yilmaz I, Yasar Sirin D, Akalan H, Ozbek H. (2020). A Study of the Effects of Metformin, a Biguanide Derivative, on Annulus Fibrosus and Nucleus Pulposus Cells. *Turk Neurosurg*, 30(3):434-441.
- Keating A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell*, 10(6), 709-716.
- Kim, H. Y., Choe, J. W., Kim, H. K., Bae, S. J., Kim, B. J., Lee, S. H., Koh, J. M., Han, K. O., Park, H. M., & Kim, G. S. (2010). Negative association between metabolic syndrome and bone mineral density in Koreans, especially in men. *Calcified tissue international*, 86(5), 350-358.
- King, C., Lanaspa, M. A., Jensen, T., Tolan, D. R., Sánchez-Lozada, L. G., & Johnson, R. J. (2018). Uric Acid as a Cause of the Metabolic Syndrome. *Contributions to nephrology*, 192, 88-102.
- Kobayashi, S., Takahashi, H. E., Ito, A., Saito, N., Nawata, M., Horiuchi, H., Ohta, H., Ito, A., Iorio, R., Yamamoto, N., & Takaoka, K. (2003). Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone*, 32(2), 163-169.
- Kolovou, G. D., Anagnostopoulou, K. K., Salpea, K. D., & Mikhailidis, D. P. (2007). The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *The American journal of the medical sciences*, 333(6), 362-371.
- Komori T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Advances in experimental medicine and biology*, 658, 43-49.
- Korkmaz, O. A., Sumlu, E., Koca, H. B., Pektas, M. B., Kocabas, A., Sadi, G., & Akar, F. (2019).

Effects of lactobacillus plantarum and lactobacillus helveticus on renal insulin signaling, inflammatory markers, and glucose transporters in high-fructose-fed rats. *Medicine*, 55, 207.

L

La Fontaine J, Chen C, Hunt N, Jude E, Lavery L. (2016), Type 2 diabetes and metformin influence on fracture healing in an experimental rat model. *J Foot Ankle Surg*, 55(5), 955-960.

Lamster IB, Pagan M. (2017). Periodontal disease and the metabolic syndrome. *International Dental Journal*; 67(2):67-77.

Lang T. F. (2010). Quantitative computed tomography. *Radiologic clinics of North America*, 48(3), 589-600.

Lê, K. A., Faeh, D., Stettler, R., Ith, M., Kreis, R., Vermathen, P., Boesch, C., Ravussin, E., & Tappy, L. (2006). A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *The American journal of clinical nutrition*, 84(6), 1374-1379.

Lê, K. A., Ith, M., Kreis, R., Faeh, D., Bortolotti, M., Tran, C., Boesch, C., & Tappy, L. (2009). Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 89(6), 1760-1765.

Lee YS, Kim YS, Lee SY, Kim GH, Kim BJ, Lee SH, Lee KU, Kim GS, Kim SW, Koh JM. (2010). AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone*, 47:926-937

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

Li Y, Lu Z, Zhang X. (2015). Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *J Dent Res*. 94:362-370.

Li, X., Gong, X., & Jiang, W. (2017). Abdominal obesity and risk of hip fracture: a meta-analysis of prospective studies. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 28(10), 2747-2757.

Lino, A. B., McCarthy, A. D., & Fernández, J. M. (2019). Evaluation of Strontium-Containing PCL-PDIPF Scaffolds for Bone Tissue Engineering: In Vitro and In Vivo Studies. *Annals of biomedical engineering*, 47(3), 902-912.

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

Liu, Q., Ayoub-Charette, S., Khan, T. A., Au-Yeung, F., Blanco Mejia, S., de Souza, R. J., Wolever, T., Leiter, L. A., Kendall, C., & Sievenpiper, J. L. (2019). Important Food Sources of Fructose-Containing Sugars and Incident Hypertension: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Journal of the American Heart Association*, 8(24), e010977.

M

Mai QG, Zhang ZM, Xu S, Lu M, Zhou RP, Zhao L, Jia CH, Wen ZH, Jin DD, Bai XC. (2011). Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 112:2902–2909.

Maiztegui B, Borelli MI, Raschia MA, Del Zotto H, Gagliardino JJ. (2009). Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism and insulin secretion. *J Endocrinol*; 200:139-49.

Majumdar SR, Josse RG, Lin M, Eurich DT. (2016). Does Sitagliptin Affect the Rate of Osteoporotic Fractures in Type 2 Diabetes? Population-Based Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 101(5):1963-9.

Malta, F. S., Garcia, R. P., Azarias, J. S., Ribeiro, G., Miranda, T. S., Shibli, J. A., & Bastos, M. F. (2020). Impact of hyperglycemia and treatment with metformin on ligature-induced bone loss, bone repair and expression of bone metabolism transcription factors. *PLoS One*, 15(8), e0237660.

Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, Haji Suhaimi F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int.*; 2014:263897.

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

- Marie P. J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 98-105.
- Márquez-Sandoval, F.; Macedo-Ojeda, G.; Viramontes-Hörner, D.; Ballart, J. F.; Salvadó, J. S. & Vizmanos, B. (2011). The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr*, 1-12.
- Martini, F. H.; Timmons, M. J.; Tallitsch, R. B. (2009). Anatomía humana. 6ta Ed. Editorial Pearson Educación.
- Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM, Wroński S, Tarasiuk J, Maredziak M. (2016). Metformin Decreases Reactive Oxygen Species, Enhances Osteogenic Properties of Adipose-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells In Vitro, and Increases Bone Density In Vivo. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:9785890.
- Matsuzaka, T.; Shimano, H.; Yahagi, N.; Amemiya-Kudo, M.; Okazaki, H.; Tamura, Y.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Tomita, S.; Sekiya, M.; Hasty, A.; Nakagawa, Y.; Sone, H.; Toyoshima, H.; Ishibashi, S.; Osuga, J.-I. & Yamada, N. (2004). Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*, 53, 560-569.
- McCarthy AD, Molinuevo MS, Cortizo AM. (2013). AGEs and bone ageing in Diabetes mellitus. *J Diabetes Metab*, 4:6.
- McCarthy AD, Cortizo AM, Sedlinsky C. (2016). Metformin revisited: Does this regulator of AMP-activated protein kinase secondarily affect bone metabolism and prevent diabetic osteopathy? *World J Diabetes*; 7(6): 122-133
- McCreight, L. J., Bailey, C. J., & Pearson, E. R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*, 59(3), 426-435.
- Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M, Jick SS, Jick H, Meier CR. (2008). Use of thiazolidinediones and fracture risk. *Arch Intern Med*. 168(8):820-5.
- Messer, J. G., Castillo, E. J., Abraham, A. M., Jiron, J. M., Israel, R., Yarrow, J. F., Thomas, S., Reynolds, M. C., Wnek, R. D., Jorgensen, M., Wanionok, N., Van Poznak, C., Bhattacharyya, I., Kimmel, D. B., & Aguirre, J. I. (2020). Anti-vascular endothelial growth factor antibody monotherapy causes destructive advanced periodontitis in rice rats (*Oryzomys palustris*). *Bone*, 130, 115141.

- Metha, B., Metha, M. (2005). Organic Chemistry. Prentice-Hall of India Pvt. Ltd.
- Miranda, P. J.; DeFronzo, R. A.; Califf, R. M. & Guyton, J. R. (2005a). Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J*, 149, 33-45.
- Miranda, P. J.; DeFronzo, R. A.; Califf, R. M. & Guyton, J. R. (2005b). Metabolic syndrome: evaluation of pathological and therapeutic outcomes. *Am Heart J*, 149, 20-32.
- Molinuevo, M. S.; Schurman, L.; McCarthy, A. D.; Cortizo, A. M.; Tolosa, M. J.; Gangoiti, M. V.; 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, 211-221.
- Moore, J. X., Chaudhary, N., & Akinyemiju, T. (2017). Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. *Preventing chronic disease*, 14, E24.
- Monami M, Cresci B, Colombini A, Pala L, Balzi D, Gori F, Chiasserini V, Marchionni N, Rotella CM, Mannucci E. (2008). Bone fractures and hypoglycemic treatment in type 2 diabetic patients: a case-control study. *Diabetes Care*. 31(2):199-203.
- Muka, T., Trajanoska, K., Kieft-de Jong, J. C., Oei, L., Uitterlinden, A. G., Hofman, A., Dehghan, A., Zillikens, M. C., Franco, O. H., & Rivadeneira, F. (2015). The Association between Metabolic Syndrome, Bone Mineral Density, Hip Bone Geometry and Fracture Risk: The Rotterdam Study. *PLOS ONE*, 10(6), e0129116.
- Murray, C. E., & Coleman, C. M. (2019). Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4873.

N

- Naot, D. & Cornish, J. (2014). Cytokines and Hormones That Contribute to the Positive Association between Fat and Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 70.
- Napoli, N., Conte, C., Pedone, C., Strotmeyer, E. S., Barbour, K. E., Black, D. M., Samelson, E. J., & Schwartz, A. V. (2019). Effect of Insulin Resistance on BMD and Fracture Risk in Older Adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(8), 3303-3310.
- Nibali L, Tatarakis N, Needleman I. (2013). Association between metabolic syndrome and

periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 913-920.

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

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

O

Oh TK, Song IA. (2020). Metformin therapy and hip fracture risk among patients with type II diabetes mellitus: A population-based cohort study. *Bone*. 135:115325.

Oliveira AL, de Oliveira MG, Medeiros ML, Mónica FZ, Antunes E. (2021). Metformin abrogates the voiding dysfunction induced by prolonged methylglyoxal intake. *Eur J Pharmacol*; 910:174502.

Oron-Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeger G, Peleg E, Shabtay Z, (2008). Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens*; 21:1018-22.

P

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

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

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.

Pollock, N. K., Bundy, V., Kanto, W., Davis, C. L., Bernard, P. J., Zhu, H., Gutin, B., & Dong, Y. (2012). Greater fructose consumption is associated with cardiometabolic risk markers and visceral adiposity in adolescents. *The Journal of nutrition*, 142(2), 251-257.

Pradeep, A. R., Rao, N. S., Naik, S. B., & Kumari, M. (2013). Efficacy of varying concentrations of

subgingivally delivered metformin in the treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology*, 84(2), 212-220.

R

Ren LP, Chan SMH, Zeng XY, Laybutt DR, Iseli TJ, et al. (2012) Differing Endoplasmic Reticulum Stress Response to Excess Lipogenesis versus Lipid Oversupply in Relation to Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *PLOS ONE*, 7(2), e30816.

Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577-1585.

Roodman G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Experimental hematology*, 27(8), 1229-1241.

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

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

Russo, E., Leoncini, G., Esposito, P., Garibotto, G., Pontremoli, R., & Viazzi, F. (2020). Fructose and Uric Acid: Major Mediators of Cardiovascular Disease Risk Starting at Pediatric Age. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4479.

S

Sánchez-Lozada, L. G., Soto, V., Tapia, E., Avila-Casado, C., Sautin, Y. Y., Nakagawa, T., Franco, M., Rodríguez-Iturbe, B., & Johnson, R. J. (2008). Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. *American journal of physiology. Renal physiology*, 295(4), F1134-F1141.

Sanchez-Rangel, E., & Inzucchi, S. E. (2017). Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 60(9), 1586-1593.

Savvidis, C., Tournis, S., & Dede, A. D. (2018). *Obesity and bone metabolism. Hormones* (Athens, Greece), 17(2), 205-217.

Schurman, L.; McCarthy, A. D.; Sedlinsky, C.; Gangoiti, M. V.; Arnol, V.; Bruzzone, L. & Cortizo, A. M. (2008). Metformin reverts deleterious effects of advanced glycation end-products (AGEs) on osteoblastic cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 116, 333-340.

Schwartz, A. V., Garnero, P., Hillier, T. A., Sellmeyer, D. E., Strotmeyer, E. S., Feingold, K. R., Resnick, H. E., Tylavsky, F. A., Black, D. M., Cummings, S. R., Harris, T. B., Bauer, D. C., & Health, Aging, and Body Composition Study (2009). Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(7), 2380-2386.

Scuteri, A., Laurent, S., Cucca, F., Cockcroft, J., Cunha, P. G., Mañas, L. R., Mattace Raso, F. U., Muiesan, M. L., Rylis̆kytė, L., Rietzschel, E., Strait, J., Vlachopoulos, C., Völzke, H., Lakatta, E. G., Nilsson, P. M., & Metabolic Syndrome and Arteries Research (MARE) Consortium (2015). Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. *European journal of preventive cardiology*, 22(4), 486-491.

Shapiro A, Tumer N, Gao Y, Cheng KY, Scarpace PJ. (2011). Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *Br J Nutr*, 106, 390-397.

Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, M. K., Hanayama, R., Kunugiza, Y., Kizawa, T., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ogihara, T., & Morishita, R. (2008). Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(7), 2465-2475.

Solomon, D. H., Cadarette, S. M., Choudhry, N. K., Canning, C., Levin, R., & Stürmer, T. (2009). A cohort study of thiazolidinediones and fractures in older adults with diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(8), 2792-2798.

Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., Hatcher, B., Cox, C. L., Dyachenko, A., Zhang, W., McGahan, J. P., Seibert, A., Krauss, R. M., Chiu, S., Schaefer, E. J., Ai, M., Otokoza, S., Nakajima, K., Nakano, T., Beysen, C., Havel, P. J. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), 1322-1334.

Stanhope K. L. (2012). Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and

metabolic syndrome. *Annual review of medicine*, 63, 329-343.

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

Strasser, B., Siebert, U., & Schobersberger, W. (2010). Resistance training in the treatment of the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of the effect of resistance training on metabolic clustering in patients with abnormal glucose metabolism. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 40(5), 397-415.

Sun, K.; Liu, J.; Lu, N.; Sun, H.; Ning, G. (2014). Association between metabolic syndrome and bone fractures: A meta-analysis of observational studies. *BMC endocrine disorders*. 14, 13.

Sun, R., Liang, C., Sun, Y., Xu, Y., Geng, W., & Li, J. (2022). Effects of metformin on the osteogenesis of alveolar BMSCs from diabetic patients and implant osseointegration in rats. *Oral diseases*, 28(4), 1170-1180.

T

Tang X, Liu G, Kang J, Hou Y, Jiang F, et al. (2013). Obesity and Risk of Hip Fracture in Adults: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLOS ONE*. 8(4): e55077.

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

Teff, K. L., Elliott, S. S., Tschöp, M., Kieffer, T. J., Rader, D., Heiman, M., Townsend, R. R., Keim, N. L., D'Alessio, D., & Havel, P. J. (2004). Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(6), 2963-2972.

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

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

Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ. (2000). Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp*

Physiol; 279:R1334-40.

Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. (1989). Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr*, 49:1155-63.

Togari, A., Arai, M., & Kondo, A. (2005). The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. *Expert opinion on therapeutic targets*, 9(5), 931-940.

Tolosa MJ, Chuguransky SR, Sedlinsky C, Schurman L, McCarthy AD, Molinuevo MS. (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*; 101:177-86.

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

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

Tsanzi E, Light HR, Tou JC. (2008). The effect of feeding different sugar-sweetened beverages to growing female Sprague-Dawley rats on bone mass and strength. *Bone*. 42(5):960-8.

Tsuda, K., Nishio, I., & Masuyama, Y. (2001). Bone mineral density in women with essential hypertension. *American journal of hypertension*, 14(7 Pt 1), 704-707.

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

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, 347-355.

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

National Academies Press.

V

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

Verroken, C., Zmierzak, H. G., Goemaere, S., Kaufman, J. M., & Lapauw, B. (2017). Insulin Resistance Is Associated With Smaller Cortical Bone Size in Nondiabetic Men at the Age of Peak Bone Mass. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 102(6), 1807-1815.

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), 1292-1299.

Vestergaard P. (2007). Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 18(4), 427-444.

Vilaca, T., Schini, M., Harnan, S., Sutton, A., Poku, E., Allen, I. E., Cummings, S. R., & Eastell, R. (2020). The risk of hip and non-vertebral fractures in type 1 and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis update. *Bone*, 137, 115457.

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

W

Wang C, Li H, Chen SG, He JW, Sheng CJ, Cheng XY, Qu S, Wang KS, Lu ML, Yu YC. (2012). The skeletal effects of thiazolidinedione and metformin on insulin-resistant mice. *J Bone Miner Metab*. 30(6):630-7.

Wong, S.K., Chin, KY., Suhaimi, F. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*, 13, 65.

Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. (2018). Effects of metabolic syndrome on bone mineral density, histomorphometry and remodelling markers in male rats. *PLOS ONE*. 13(2):e0192416.

Y

Yamamoto, T., Watanabe, K., Inoue, N., Nakagawa, Y., Ishigaki, N., Matsuzaka, T., Takeuchi, Y., Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Suzuki, H., Yahagi, N., Gotoda, T. Yamada, N., Shimano, H. (2010). Protein kinase C β mediates hepatic induction of sterol-regulatory element binding protein-1c by insulin. *Journal of Lipid Research*, 51(7), 1859-1870.

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

Yang, S., Nguyen, N. D., Center, J. R., Eisman, J. A., & Nguyen, T. V. (2014). Association between hypertension and fragility fracture: a longitudinal study. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 25(1), 97-103.

Yang, S., Chen, A., & Wu, T. (2015). Association of history of fracture with prehypertension and hypertension: a retrospective case-control study. *BMC musculoskeletal disorders*, 16, 86.

Yang J, Hong N, Shim JS, Rhee Y, Kim HC. (2018). Association of Insulin Resistance with Lower Bone Volume and Strength Index of the Proximal Femur in Nondiabetic Postmenopausal Women. *J Bone Metab*. 25(2):123-132.

Yarrow JF, Toklu HZ, Balazs A, Phillips EG, Otzel DM, Chen C, Wronski TJ, Aguirre JI, Sakarya Y, Tümer N, Scarpace PJ. (2016). Fructose consumption does not worsen bone deficits resulting from high-fat feeding in young male rats. *Bone*. 85:99-106.

Ye, Z., Lu, H., & Liu, P. (2017). Association between essential hypertension and bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8(40), 68916-68927.

Young, E. W., Morris, C. D., & McCarron, D. A. (1992). Urinary calcium excretion in essential hypertension. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 120(4), 624-632.

Z

Zinman B, Haffner SM, Herman WH, Holman RR, Lachin JM, Kravitz BG, Paul G, Jones NP, Aftring RP, Viberti G, Kahn SE. (2010). Effect of Rosiglitazone, Metformin, and Glyburide on Bone Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 134-142.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA