

**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas**



***Diabetes mellitus:*
efectos de la glicosilación no enzimática de
proteínas sobre el desarrollo osteoblástico**

TESIS N° 953

Tesis Doctoral

Bioquímico Antonio Desmond McCarthy

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
60 y 115 1° subnivel
biblioteca@exactas.unp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 Int. 129



DEX-56982

2001

11-11-02

56982

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Departamento de Ciencias Biológicas**



***Diabetes mellitus: efectos de la glicosilación no enzimática
de proteínas sobre el desarrollo osteoblástico***

**Tesis Doctoral
Bioquímico Antonio Desmond McCarthy
2001**

El presente trabajo desarrollado en la Cátedra de Bioquímica Patológica, bajo la dirección de la Prof. Dra. Ana María Cortizo y la co-dirección de la Prof. Dra. Susana Beatriz Etcheverry, constituye la Tesis Doctoral que elevo a consideración de las autoridades correspondientes para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

Noviembre de 2001.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Diana y Desmond, por su confianza incondicional y por el espíritu crítico que me supieron transmitir.

A mi esposa María Laura, por su comprensión, paciencia y apoyo permanentes.

A mis hijas Clara y Victoria, simplemente por estar allí.

A mis directoras y amigas Ana y Nené, por su invaluable guía y su capacidad de trabajo en equipo, evidentes en cada detalle de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, por permitirme acceder, como docente con dedicación semi-exclusiva, a un espacio de reflexión e investigación.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica, UNLP, por su apoyo a través del Programa de Incentivos a Docentes investigadores.

A la Dra. Liliana Bruzzone, por las medidas de fluorescencia realizadas.

Al CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos) y **al IBBM** (Instituto de Bioquímica y Biología Molecular), por facilitarme el uso de su equipamiento.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
Diabetes mellitus: Definición	1
Diabetes mellitus: Clasificación	2
(a) Diabetes mellitus tipo 1	2
(a-1) Inmunomediada	2
(a-2) Idiopática	3
(b) Diabetes mellitus tipo 2	3
(c) Otros tipos específicos de Diabetes	4
(d) Diabetes mellitus gestacional	5
Diabetes mellitus: Diagnóstico	6
Diabetes mellitus: Complicaciones crónicas	8
(a) Complicaciones crónicas en Diabetes mellitus tipo 1	8
(b) Complicaciones crónicas en Diabetes mellitus tipo 2	13
Diabetes mellitus: Mecanismos de patogenicidad	16
Glicosilación no enzimática, glicoxidación y estrés carbonílico	17
Efectos químicos directos de los AGE	24
Efectos de los AGE mediados por receptores	29
1. Macrófagos	30
2. Células del endotelio vascular	31
3. Células mesangiales renales	32
4. Células del sistema nervioso central	33
5. Células musculares lisas	33
6. Fibroblastos	34
7. Linfocitos T	34
Familia de receptores para AGE	34
1. Receptor para AGE (RAGE)	34
2. Receptor de AGE tipo 1 (OST-48)	37

	Página
3. Receptor de AGE tipo 2 (80K-H)	37
4. Receptor de AGE tipo 3 (Galectina-3)	38
5. Receptores <i>scavenger</i>	38
Fisiología del Hueso	40
Composición química y propiedades físicas	40
Morfología y estructura celular ósea	41
1. Células mesenquimatosas	43
2. Osteoblastos	44
3. Osteocitos	46
4. Osteoclastos	47
Mecanismos de formación ósea	51
1. Formación ósea intramembranosa o directa	51
2. Formación ósea endocondral	51
Modelado y remodelado óseo	52
Matriz extracelular y biología celular ósea	54
Regulación de la resorción ósea	56
Regulación de la formación ósea	60
(a) Control génico de la formación ósea	60
(b) Regulación hormonal (sistémica) de la formación ósea ..	62
(c) Regulación local de la formación ósea	64
1. TGF β	65
2. BMP	65
3. Sistema de los IGF	66
Sistema de los factores de crecimiento insulinosímiles	67
1. Ligandos	67
2. Receptores	69
3. Proteínas ligadoras de IGF	71
IGFBP-1	73
IGFBP-2	74
IGFBP-3	75

	Página
Subunidad ácido-lábil (ALS)	76
IGFBP-4	76
IGFBP-5	76
IGFBP-6	77
4. Proteasas	78
Proteasas para IGFBP-3	79
Proteasas para IGFBP-4 y -5	79
Complicaciones óseas de la Diabetes mellitus	80
OBJETIVOS	85
Objetivo general	85
Objetivos específicos	85
MATERIALES Y MÉTODOS	86
Materiales	86
Glicosilación no enzimática (glicación) de proteínas	87
(a) Albúmina sérica bovina	87
(b) Fosfatasa alcalina intestinal bovina	88
Caracterización del grado de glicación	89
(a) Fructosamina	89
(b) Fluorescencia	89
Análisis estructural y funcional de la FAL glicada	90
(a) Actividad específica de fosfatasa alcalina	90
(b) Separación de FAL por métodos electroforéticos	90
Cultivos celulares	91
(a) Células UMR106	91
(b) Células MC3T3E1	91
(c) Preparación de homogenados y fracciones subcelulares	92
Ensayos de proliferación celular	93

	Página
Ensayos de diferenciación celular	93
(a) Actividad específica de FAL	93
(b) Captación celular de calcio	93
Ensayos de mineralización celular	94
Ensayos de receptores para AGE	94
(a) Marcación de AGE-ASB con ¹²⁵ I	94
(b) Correlación entre proteína celular y recuento celular	95
(c) Ensayos de unión de ¹²⁵ I-AGE-ASB	95
(d) Ensayos de captación y degradación de ¹²⁵ I-AGE-ASB	96
(e) Caracterización de los sitios de unión por <i>ligand blot</i>	96
Ensayos de IGF-I	97
(a) Marcación de IGF-I con ¹²⁵ I	97
(b) Eliminación de las IGFBP previo al dosaje de IGF-I	97
(c) Radioinmunoensayo para IGF-I	98
Ensayos de IGFBP	99
(a) Capacidad de unión de IGF-I	99
(b) Western ligand blot	99
Análisis estadístico	100
RESULTADOS OBTENIDOS	101
Glicación de albúmina sérica bovina (ASB)	101
Glicación de fosfatasa alcalina intestinal bovina	102
(a) Efectos sobre la actividad enzimática	102
(b) Formación de productos de glicación tempranos	103
(c) Formación de productos de glicación tardíos	104
(d) Efecto de un inhibidor de la formación de AGE	106
(e) Efecto de dosis del azúcar empleado	107
(f) Análisis de la FAL glicada por métodos electroforéticos	108
Caracterización del modelo celular en estudio	111

	Página
Efectos de AGE sobre la proliferación de células osteoblásticas	112
Efectos de AGE sobre la diferenciación de células osteoblásticas	115
Efectos de AGE sobre la captación celular de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	118
Ensayos de receptores para AGE	119
(a) Unión de ^{125}I -AGE-ASB a osteoblastos en cultivo	119
(b) Captación y degradación de AGE-proteínas	123
(c) Caracterización de los sitios de unión por <i>ligand blot</i>	125
Ensayos de IGF-I	128
(a) Validación del método de eliminación de IGFBP	128
(b) Secreción de IGF-I por osteoblastos en cultivo	130
(c) Secreción de IGFBP por osteoblastos en cultivo	134
DISCUSIÓN	140
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	165
PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO ORIGEN ESTA TESIS	188

INTRODUCCIÓN

Diabetes mellitus: Definición

La Diabetes mellitus (DM) es un síndrome metabólico crónico producido por una insuficiente secreción o acción de la insulina, que se define y diagnostica por la presencia de hiperglucemia persistente. La existencia de DM se sospecha ante la presencia de sus síntomas clásicos: poliuria, polidipsia, polifagia y alteración del peso corporal. Esta patología se confirma con el hallazgo reiterado de hiperglucemia en ayunas y/o intolerancia a la glucosa, determinadas por métodos estandarizados (Expert Committee, 1997).

Debido a su prevalencia relativamente elevada, la DM constituye un grave problema para la Salud Pública. Este síndrome es una de las principales causas de morbilidad por ceguera, insuficiencia renal y amputaciones. Asimismo, es una de las causas más comunes de mortalidad por enfermedad cardiovascular prematura, accidente cerebrovascular y fallo renal terminal.

Se estima que en nuestro país, con una prevalencia de DM de alrededor del 5-7% de la población mayor de 20 años, existen aproximadamente 1.500.000 diabéticos, de los cuales entre el 35 y el 50% (según la región) desconocen su enfermedad (Sereday 1998).

La Diabetes se caracteriza por una predisposición hacia el desarrollo de complicaciones crónicas microvasculares (nefropatía, retinopatía, neuropatía sensorimotora y autonómica), macrovasculares (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente vascular periférico) y mixtas (pie diabético, alteraciones óseas y articulares) (Unger & Foster 1998). Asimismo, este síndrome se asocia también con complicaciones agudas que ponen en riesgo la vida del paciente. Éstas son el coma hipoglucémico, la hiperglucemia con cetoacidosis, y el síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetósico.

La fisiopatología de la Diabetes mellitus es extremadamente heterogénea. Sin embargo, en líneas generales el incremento anormal de la glucemia se puede deber a un déficit en la secreción pancreática de insulina, a una resistencia periférica a la acción de esta hormona, o a ambos.

Diabetes mellitus: Clasificación

El síndrome diabético comprende a un conjunto heterogéneo de enfermedades metabólicas, de etiología muy diversa. Con el objeto de sistematizar su estudio y tratamiento, se ha propuesto recientemente un modelo de clasificación de la Diabetes mellitus que se basa principalmente en el mecanismo fisiopatogénico de la enfermedad (cuando fuera conocido). La clasificación actualmente aceptada se expone a continuación (Expert Committee, 1997):

(a) Diabetes mellitus tipo 1:

Corresponde a una destrucción de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, que habitualmente conduce a un déficit absoluto de insulina. Esta destrucción insular selectiva puede ser inmunomediada o idiopática.

(a-1) Inmunomediada:

Esta forma de Diabetes mellitus tipo 1 resulta de la destrucción autoinmune mediada por células, de las células β del páncreas (Atkinson & MacLaren 1994). Si no existe el sobreagregado de una resistencia periférica a la acción de la insulina, esta enfermedad se manifiesta clínicamente con hiperglucemia en ayunas cuando se ha destruido el 85-90 % de la masa insular β .

La Diabetes inmunomediada se presenta comúnmente en la primera infancia o la adolescencia, pero también puede manifestarse a cualquier edad, incluso a los 80 o 90 años de vida.

Los pacientes con esta forma de Diabetes raramente son obesos, aunque en ocasiones pueden serlo. Asimismo, presentan una incidencia aumentada de otras enfermedades autoinmunes, tales como enfermedad de Addison, vitiligo, anemia perniciosa, enfermedad de Graves o tiroiditis de Hashimoto.

La velocidad de destrucción de las células β es variable, pudiendo ser rápida (pocos años, generalmente en niños) o relativamente lenta en otros individuos (a lo largo de décadas, principalmente en adultos) (Zimmet 1994). Si la capacidad residual funcional de las células β de un determinado paciente desciende por debajo de un cierto umbral, dicho individuo mostrará una

predisposición para desarrollar hiperglucemia con cetoacidosis, si no se le aporta insulina exógena.

En la mayoría de estos individuos, el período de destrucción autoinmune de las células β del páncreas se correlaciona con la presencia de uno o más autoanticuerpos séricos contra epitopes insulares (Unger & Foster 1998): ICAs (anti-célula del islote), IAAs (anti-insulina), anti-GAD₆₅ (anti-decarboxilasa del ácido glutámico) y anti-tirosinafosfatasas (IA-2 e IA-2 β). Asimismo, la enfermedad presenta una cercana vinculación con ciertos antígenos de histocompatibilidad (HLA-DR/DQ), los cuales pueden ser tanto predisponentes como protectores (Cantor 1995).

(a-2) Idiopática:

A esta categoría pertenecen la minoría de los pacientes con Diabetes mellitus tipo 1, y los que la padecen son generalmente de origen africano o asiático. Estos individuos sufren episodios de cetoacidosis, presentando grados variables de insulinodeficiencia entre estos episodios. Aunque esta forma de Diabetes tiene una importante carga hereditaria, no se encuentran evidencias de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, ni asociación con el complejo HLA (Banerjee 1989).

(b) Diabetes mellitus tipo 2:

Esta es la forma más prevalente de Diabetes, y se encuentra asociada con edad adulta (>40 años), hipertensión y obesidad (especialmente en la región abdominal).

En los individuos con este tipo de Diabetes, se encuentra normalmente una insulinorresistencia periférica, así como un déficit relativo en la secreción pancreática de insulina (es decir, la secreción de insulina no alcanza para compensar la insulinorresistencia, y sobreviene hiperglucemia). Cualquiera de estos dos defectos puede ser el predominante en un paciente determinado, pero casi siempre coexiste con el otro en mayor o menor grado (Reaven 1976).

Aunque se desconocen las etiologías específicas de esta forma de Diabetes, el déficit en la secreción de insulina no se debe a la destrucción autoinmune de las células

β del páncreas. Asimismo, la insulinoresistencia periférica no es debida a alteraciones en el reconocimiento de la insulina por su receptor, sino que generalmente es por fallas aún no identificadas en los mecanismos de transducción de señales post-receptor de insulina.

En especial al comienzo de la enfermedad, y en muchos casos durante toda la vida, estos individuos no requieren tratamiento con insulina exógena para sobrevivir.

En estos pacientes, la cetoacidosis espontánea es muy rara. En los casos en que se presenta la misma, normalmente es como consecuencia del estrés inducido por otras enfermedades intercurrentes, tales como los procesos infecciosos (Butkiewicz 1995).

Dado que esta forma de Diabetes es de evolución lenta e insidiosa, en muchos casos sólo se la diagnostica luego de varios años. Sin embargo, en este período preclínico la hiperglucemia crónica frecuentemente alcanza niveles suficientes como para provocar el desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas micro- y macrovasculares (Fujimoto 1987).

Esta enfermedad muestra una importante predisposición genética, mayor inclusive que la Diabetes mellitus tipo 1 autoinmune (Newman 1987). Sin embargo, los factores genéticos de esta forma de Diabetes son complejos y aún no completamente definidos.

(c) Otros tipos específicos de Diabetes:

En este grupo amplio de patologías que provocan Diabetes mellitus, pero de prevalencia relativamente baja tanto en lo individual como global, se incluyen aquellas formas en las cuales la etiología de la enfermedad se conoce con precisión. Ellas incluyen:

- Defectos monogénicos de las células β del páncreas: mutaciones en el gen de la glucoquinasa ("sensor de glucosa" de la célula β) (Froguel 1992), en el gen del factor de transcripción HNF-1 α (Vaxillaire 1995), del factor de transcripción HNF-4 α (involucrado en la regulación de HNF-1 α) (Yamagata 1996), en ciertas secuencias del ADN mitocondrial (Reardon 1992), o en el gen que codifica para la insulina (provocando un déficit en la conversión de pro-insulina a insulina, o una molécula de insulina que se une defectuosamente a su receptor) (Gruppuso 1984, Tager 1979).

- Defectos genéticos en el receptor de insulina (Taylor 1992), que impiden en mayor o menor grado la acción de la insulina (en los casos más severos, provocando insulinoresistencia extrema con *acantosis nigricans*; y los síndromes pediátricos denominados leprechaunismo y de Rabson-Mendenhall).
- Enfermedades difusas del páncreas exócrino, tales como la fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatitis, y los traumatismos, infección y carcinoma pancreáticos. A excepción del cáncer, el daño pancreático debe ser extenso para provocar una Diabetes.
- Endocrinopatías: cantidades excesivas de hormonas que antagonizan la acción de la insulina (hormona de crecimiento en la acromegalia, cortisol en el síndrome de Cushing, glucagón en el glucagonoma, epinefrina en el feocromocitoma) pueden causar Diabetes. Esto ocurre generalmente en individuos con defectos preexistentes en la secreción de insulina, y la hiperglucemia casi siempre se normaliza eliminando el exceso hormonal (Berelowitz & Eugene 1996).
- Diabetes inducida por drogas (Pandit 1993). Puede tratarse de drogas o agentes químicos que actúan sobre las células β del páncreas, alterando la secreción de insulina (Vacor, pentamidina endovenosa); o de fármacos que interfieren con la acción periférica de la insulina, provocando insulinoresistencia (ácido nicotínico, glucocorticoides).
- Presencia de anticuerpos anti-receptor de insulina de acción antagonista (Taylor 1992). Estos autoanticuerpos compiten con la insulina por la unión a su receptor, y en títulos elevados pueden provocar insulinoresistencia extrema con *acantosis nigricans*.

(d) Diabetes mellitus gestacional:

La Diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa, identificada primeramente durante el embarazo. En la mayoría de los casos de DMG, el deterioro en la tolerancia a la glucosa aparece durante el tercer trimestre del embarazo. Seis semanas o más después del parto, la mujer debe ser reclasificada en una de las siguientes categorías (ver diagnóstico de Diabetes mellitus):

Diabetes mellitus, glucemia en ayunas alterada, prueba de tolerancia a la glucosa alterada, normoglucemia (Expert Committee 1997).

La prevalencia de la DMG varía entre 1-14% del total de embarazos, dependiendo de la población en cuestión (en nuestro medio, oscila entre 2-5%). La DMG no detectada o no tratada, se asocia con un incremento de aproximadamente el doble en la mortalidad perinatal, como consecuencia de múltiples factores (macrosomía fetal, síndrome de distrés respiratorio, policitemia con hiperviscosidad, hipoglucemia neonatal, hipocalcemia e hipomagnesemia, entre otros) (Freinkel 1990). Es importante la detección de esta patología ya que su tratamiento, incluyendo dieta e insulinoterapia si es necesario, así como el monitoreo fetal preparto, acercan la morbimortalidad perinatal a los valores observados en embarazos de bajo riesgo.

Diabetes mellitus: Diagnóstico

Los criterios de diagnóstico de la Diabetes mellitus se basan en la medición de la hiperglucemia. Sin embargo, determinar el valor de corte para la hiperglucemia, depende del equilibrio entre el costo médico, social y económico de hacer el diagnóstico en alguien que no presente un riesgo importante de padecer Diabetes (falsos positivos), y el de no hacerlo en alguien que verdaderamente es diabético (falsos negativos) (Expert Committee 1997).

Las concentraciones plasmáticas de glucosa son una variable de distribución continua, pero existe un umbral que separa a los individuos que están expuestos a un riesgo mayor de desarrollar una evolución adversa causada por la Diabetes (complicaciones micro- y macrovasculares), de aquellos que no lo están. Sobre la base de varios estudios (McCance 1994, Expert Committee 1997, Engelgau 1997), se estableció que ese umbral corresponde a un valor de glucemia plasmática en ayunas de 126 mg/dL, y/o a una glucemia plasmática 2 horas post-sobrecarga oral con 75 g de glucosa, de 200 mg/dL. Así, se han propuesto los criterios para el diagnóstico de Diabetes mellitus delineados en la **Tabla I**.

De forma similar, en el diagnóstico de Diabetes mellitus gestacional se sigue el protocolo establecido en la **Figura 1**. Dicho protocolo identifica a embarazadas con alto riesgo de complicaciones maternas o perinatales causadas por hiperglucemia plasmática.

Tabla I. Criterios para el diagnóstico de Diabetes mellitus

1.- Síntomas de diabetes más valores de glucosa plasmática obtenidas al azar ≥ 200 mg/dL. Al azar significa en cualquier momento del día sin considerar el tiempo transcurrido desde la última ingesta. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen poliuria, polidipsia y pérdida de peso sin motivo aparente.

ó

2.- Glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL. Se define como ayuno a la ausencia de ingesta calórica durante por lo menos 8 horas.

ó

3.- Glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL 2 horas post-sobrecarga en una PTOG (prueba de tolerancia oral a la glucosa). La PTOG se realiza mediante una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en 375 mL de agua.

NOTA: en ausencia de una hiperglucemia inequívoca con descompensación metabólica aguda, estos criterios deben confirmarse repitiendo la prueba otro día. No se recomienda la determinación de PTOG para uso clínico rutinario.

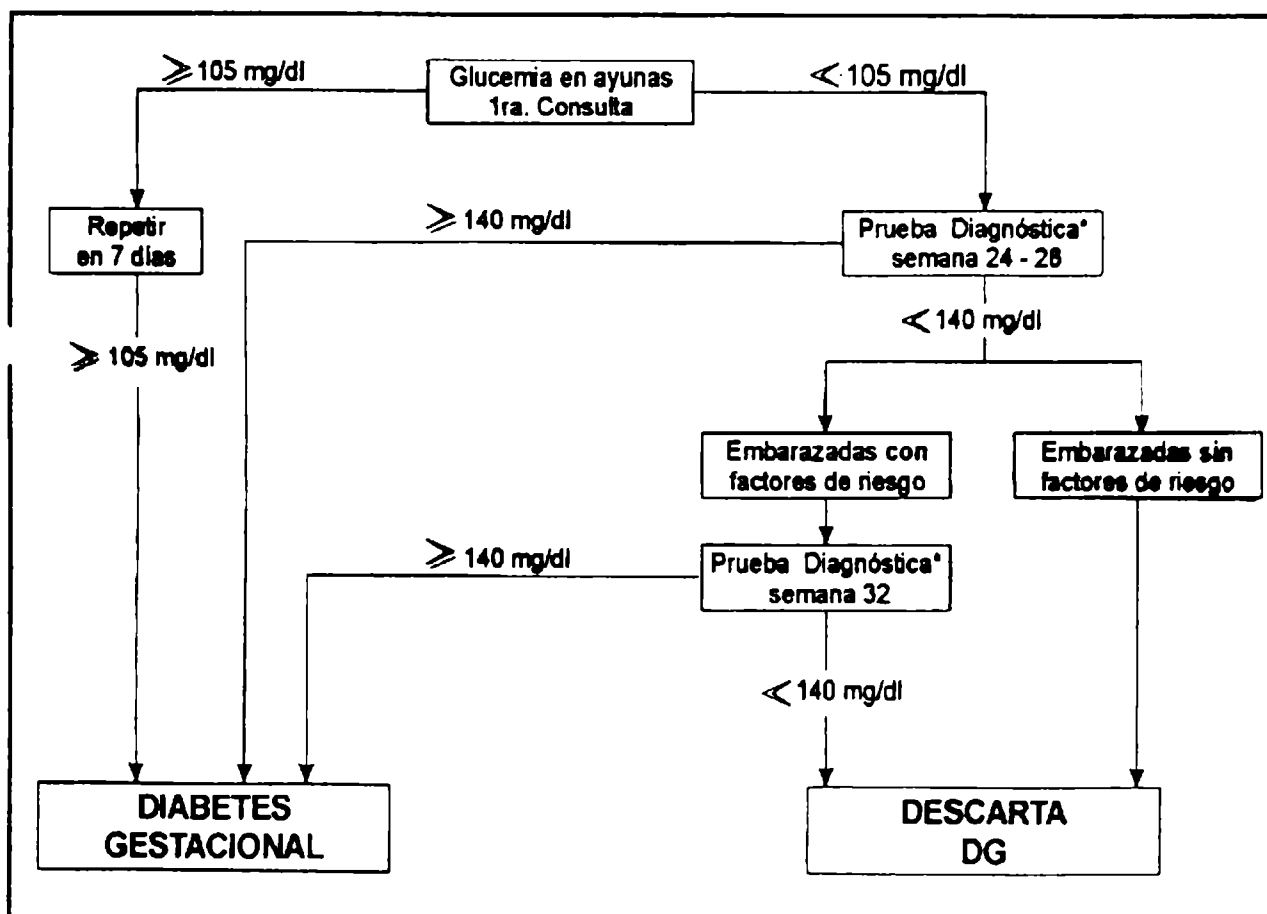


Figura 1. Algoritmo para el diagnóstico de Diabetes mellitus gestacional (DMG). La *Prueba Diagnóstica* se refiere a la PTOG con 75 g de glucosa anhidra, y una única extracción de sangre a los 120 minutos post-sobrecarga (fuente: PRODIABA).

Diabetes mellitus: Complicaciones crónicas

En la actualidad, en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, las principales causas de muerte son respectivamente: enfermedad renal terminal (nefropatía diabética), y enfermedad cardiovascular. Así, estas complicaciones crónicas son responsables del 50-80% del total de los fallecimientos (Unger & Foster 1998).

Tradicionalmente, la retinopatía, nefropatía y neuropatía han sido denominadas complicaciones microvasculares o microangiopatías. Por otro lado, la aterosclerosis y sus secuelas (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente vascular periférico con gangrena) se conocen como complicaciones macrovasculares o macroangiopatías (**Tabla II**).

Existen también complicaciones mixtas, como el pie diabético y las alteraciones óseas y articulares, en las cuales se interrelacionan disfunciones micro- y macrovasculares, dando como resultado una patología de origen complejo.

(a) Complicaciones crónicas en Diabetes mellitus tipo 1 (Borch-Johnsen & Deckert 1997)

Un marcador clínicamente importante de la nefropatía diabética es la proteinuria persistente, que se define como una excreción urinaria de albúmina mayor de 0.5 g/24 horas, en más de tres muestras consecutivas de orina, en pacientes diabéticos sin insuficiencia cardíaca, infección urinaria u otra afección renal previa. En pacientes con Diabetes mellitus tipo 1, el desarrollo de proteinuria es seguido frecuentemente por una disminución progresiva del índice de filtración glomerular. Por ello, no es sorprendente que la mayoría de estos pacientes fallezcan como consecuencia (o con presencia) de insuficiencia renal terminal (IRT).

Sin embargo, en el 15-25% de los pacientes con Diabetes mellitus tipo 1, la causa de muerte es enfermedad cardiovascular (prematura si se tiene en cuenta la edad promedio de defunción). Por otro lado, si se subdivide a los pacientes con DM tipo 1 sobre la base de la presencia o ausencia de proteinuria, se encuentra que la mortalidad por enfermedad cardiovascular es 5 a 15 veces mayor en los individuos con nefropatía diabética, que en los que no la padecen (**Figura 2**).

Tabla II. Complicaciones crónicas más frecuentemente asociadas con Diabetes mellitus.

COMPLICACIONES MICROVASCULARES DE LA DIABETES MELLITUS
(muy dependientes del nivel de hiperglucemia)

Retinopatía (15% de los pacientes con Diabetes de 10 años de duración)

Microaneurismas capilares ➔ Hiper-permeabilidad capilar ➔
➔ Acumulación de exudado ➔ ***Retinopatía no proliferativa***

Oclusión capilar ➔ Isquemia ➔ Infarto de la capa neural ➔
➔ Exudados algodonosos ➔ ***Retinopatía pre-proliferativa***

Neovascularización (por la isquemia) ➔ Proliferación celular
dentro de la cavidad vítrea ➔ Hemorragias ➔ Fibrosis ➔
➔ ***Retinopatía proliferativa*** ➔ Retracción de la retina ➔
➔ **CEGUERA**

Nefropatía (prevalencia de 10 a 30% según tipo de Diabetes)

Hipertrofia renal (expansión del mesangio y de la membrana
basal glomerular) ➔ Arterioesclerosis de las arteriolas
aferentes y eferentes ➔ ***Microalbuminuria***

Cierre del glomérulo afectado ➔ Hipertrofia de los
glomérulos restantes ➔ ***Macroalbuminuria***

Glomeruloesclerosis difusa ➔ **FALLO RENAL TERMINAL**

Polineuropatía diabética

a) Neuropatía sensorimotora distal simétrica (Prevalencia del 50%
en Diabetes de 25 años de duración)

b) Neuropatía autonómica (Constipación, impotencia,
disfunción de la vejiga, gastroparesis)

COMPLICACIONES MACROVASCULARES DE LA DIABETES MELLITUS
(menos dependientes de la hiperglucemia, más dependientes de hipertensión, dislipemias y arterioesclerosis de grandes vasos)

Infarto agudo de miocardio (IAM)

(Morbilidad y mortalidad 3 veces mayor que la población no diabética).

Accidente cerebro-vascular (ACV) (Prevalencia del 15% en Diabetes mellitus tipo 2)

Accidente vascular periférico (AVP) (Prevalencia del 35% en Diabetes mellitus tipo 2)

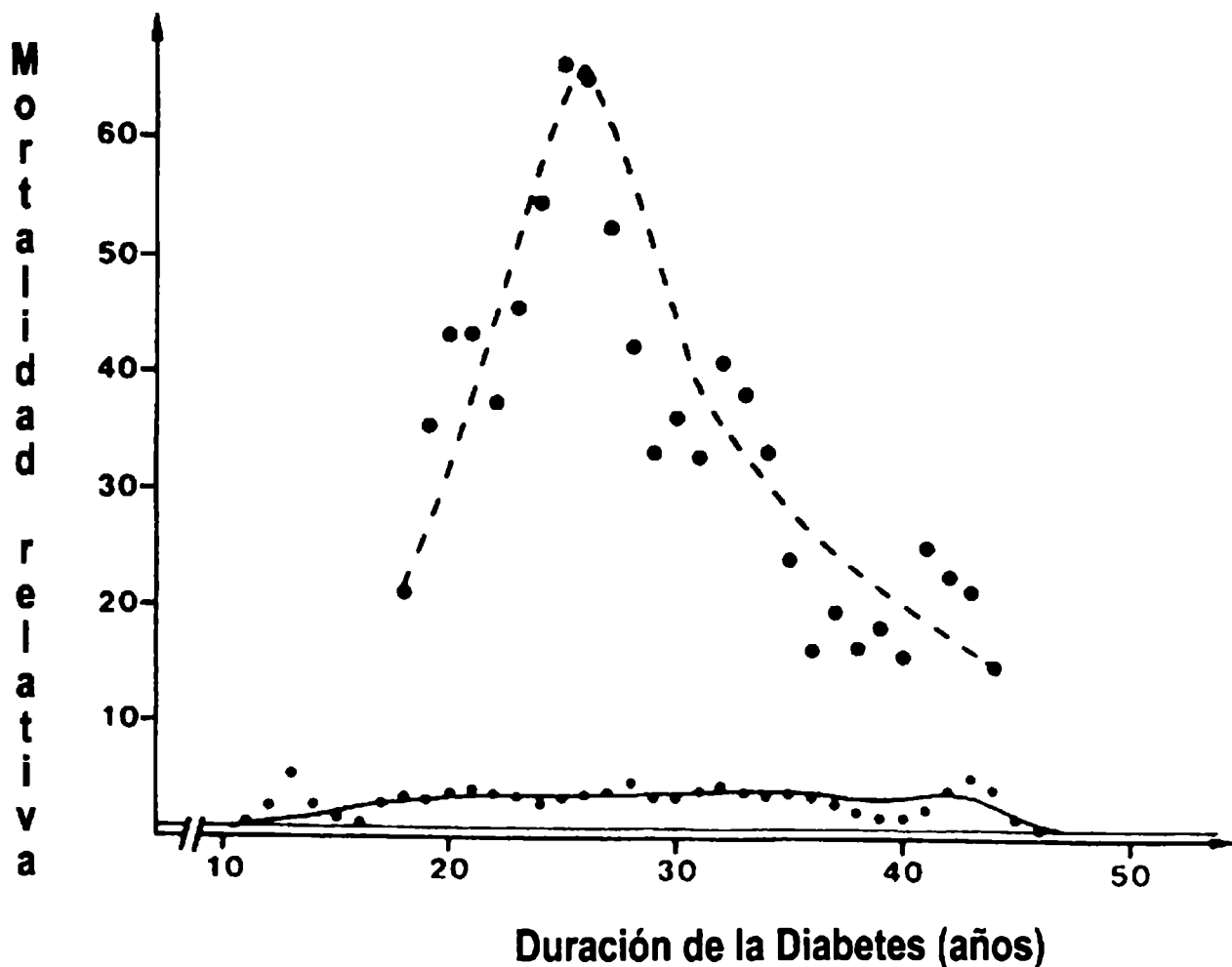
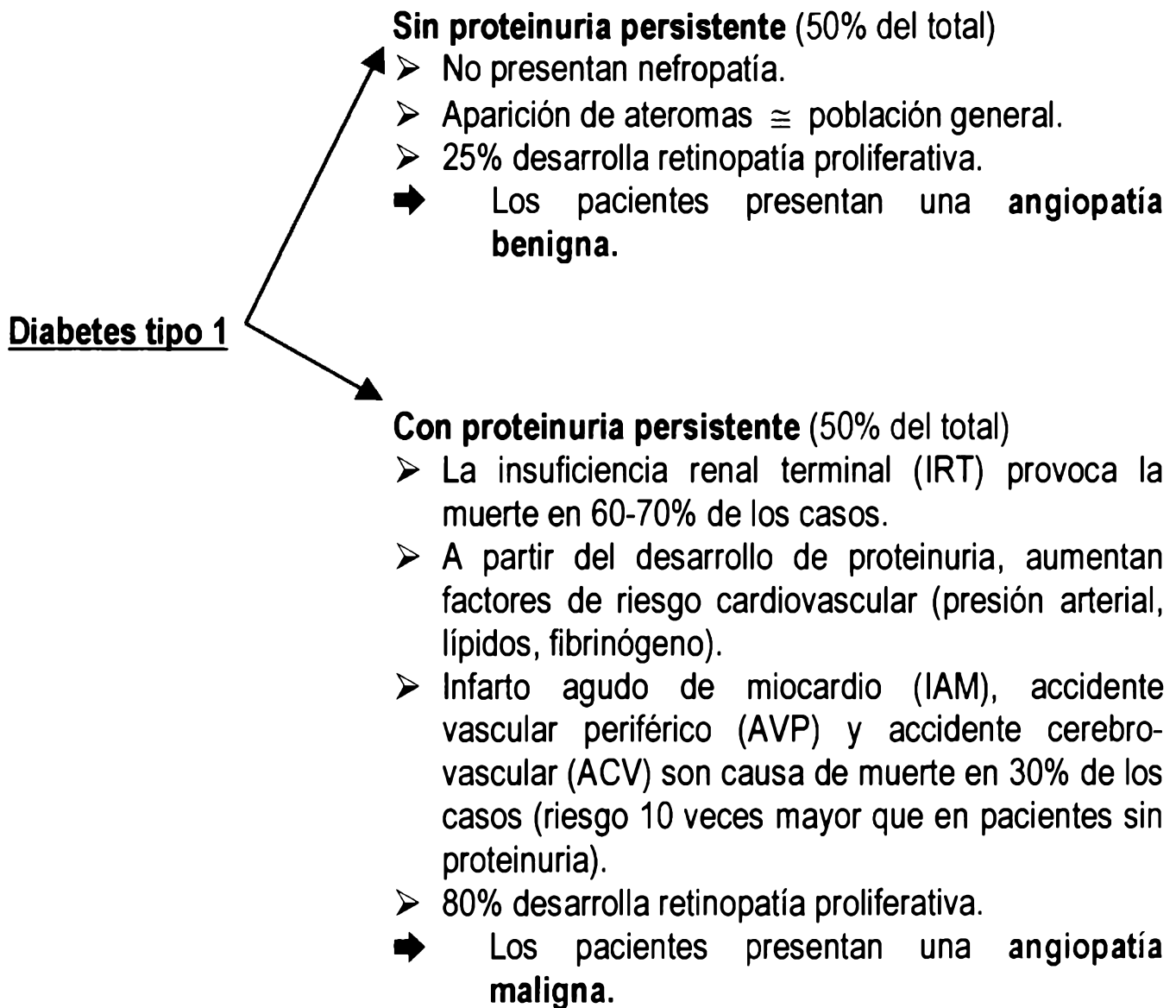


Figura 2. Mortalidad relativa por enfermedad cardiovascular en diabéticos de tipo 1 con proteinuria persistente (línea punteada) o sin proteinuria (línea continua), en función de la duración de su Diabetes (adaptado de Borch-Johnsen & Deckert 1997).

El desarrollo de una proteinuria persistente en los diabéticos de tipo 1, se correlaciona también con la presencia de retinopatía proliferativa. Esta complicación microvascular, que puede progresar finalmente a ceguera, constituye la segunda causa de discapacidad en estos pacientes. De hecho, se ha encontrado que de los individuos diabéticos con proteinuria persistente, el 80% desarrolla también retinopatía proliferativa. Esta cifra disminuye al 25% en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 sin proteinuria persistente (**Tabla III**).

Tabla III. Epidemiología de las complicaciones crónicas en ambos tipos de Diabetes.



Diabetes tipo 2 (alta prevalencia de hipertensión arterial y obesidad abdominal)

- Se desconoce la prevalencia de macroangiopatías por su diagnóstico tardío (manifestación clínica con estenosis del 75%).
- IAM es causa de muerte en 60% de los casos.
- AVP y ACV dan cuenta del 20% de los fallecimientos.
- La proteinuria persistente duplica el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular.
- La prevalencia de cada microangiopatía es de 20-50% (pero en general no llegan a ser incapacitantes).
- Menos del 10% mueren por IRT.

De lo expuesto anteriormente, se desprende que la morbimortalidad elevada observada en estos pacientes, se encuentra confinada casi exclusivamente a aquellos que desarrollan una proteinuria persistente. Sin embargo, estudios epidemiológicos demuestran que este subgrupo está constituido por menos del 50% de los pacientes, lo cual indica una heterogeneidad poblacional en lo que respecta a la susceptibilidad para el establecimiento de la proteinuria. La identificación de marcadores de susceptibilidad permitiría implementar un tratamiento intensivo en individuos con mayor riesgo, resultando en un mejor pronóstico y calidad de vida para dichos pacientes.

Se ha encontrado que los pacientes diabéticos de tipo 1 que desarrollan proteinuria persistente, también presentan mayor presión arterial que los que no la desarrollan, así como niveles séricos de lípidos más elevados (y con un perfil más aterogénico), y mayores concentraciones de fibrinógeno. Estas diferencias no existen al inicio de la Diabetes, pero se establecen concomitantemente con el desarrollo de la proteinuria. Sin embargo, dichas diferencias halladas en los factores de riesgo aterogénico, no alcanzan para explicar el incremento de entre 5 y 15 veces en la morbimortalidad cardiovascular, o el marcado aumento en la incidencia de retinopatía proliferativa, que hemos mencionado anteriormente en este subgrupo de pacientes. Así, se plantea la necesidad de encontrar un nexo que pueda interpretar esta innegable asociación que existe entre microangiopatías y macroangiopatías.

Con el afán de diferenciar a los pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 sobre la base de la patología vascular que presentan, se describe como *angiopatía maligna* a la alteración vascular generalizada que presentan los pacientes que desarrollan proteinuria persistente. Esto se fundamenta en que: (1) las micro- y macroangiopatías se establecen simultáneamente; (2) los pacientes con proteinuria sufren no sólo de alteraciones en la función renal, sino a menudo también de extensas lesiones extra-renales.

Por otro lado, y dado que los pacientes que no desarrollan microalbuminuria normalmente tienen presión arterial normal, así como menor riesgo de desarrollar retinopatía proliferativa y enfermedad cardiovascular, las lesiones vasculares que pudieran presentar se denominan *angiopatía benigna*.

La relación directa entre la incidencia y progresión de las complicaciones microvasculares, y el grado de control metabólico de un paciente con Diabetes mellitus

tipo 1, ha sido establecida de manera inequívoca por los resultados de un estudio multicéntrico denominado *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT, 1993). En dicho estudio, 1441 pacientes diabéticos de tipo 1 se asignaron aleatoriamente a un protocolo de tratamiento insulínico y automonitoreo intensivos, o a un tratamiento insulínico convencional. Estos pacientes se evaluaron periódicamente para su monitoreo bioquímico, y para establecer la aparición y/o progresión de angiopatías, durante un promedio de 6,5 años. El grupo de tratamiento intensivo mostró glucemias en ayunas más bajas en promedio (150 versus 230 mg/dL), y una reducción tanto en la aparición de retinopatía (disminución del 76%) como en la progresión de la misma una vez establecida (disminución del 54%). La insulinoterapia intensiva también disminuyó tanto la aparición de microalbuminuria (reducción del 39%), como el establecimiento de proteinuria persistente (reducción del 54%). La presencia de neuropatía clínicamente detectable se redujo en un 60%. Evidentemente, la reducción de la hiperglucemia (o alguna mejoría metabólica aún no identificada, relacionada directamente con esta disminución en la hiperglucemia) fue la responsable de la efectividad en las estrategias de prevención primaria y secundaria de las microangiopatías diabéticas demostrada en este estudio.

(b) Complicaciones crónicas en Diabetes mellitus tipo 2 (Hamman 1997, Tuomilehto & Rastenyte 1997)

Al ser la Diabetes mellitus tipo 2 una enfermedad que se desarrolla lentamente y de manera insidiosa en individuos adultos (generalmente mayores de 40 años), ha resultado difícil determinar con exactitud la incidencia y prevalencia de complicaciones vasculares originadas verdaderamente por la Diabetes. De hecho, muy frecuentemente se llega al diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2 como consecuencia de la expresión clínica de una angiopatía (por ejemplo: visión borrosa, proteinuria, pérdida de sensibilidad en miembros inferiores, accidente macrovascular por placa complicada o por estenosis del vaso). En estos casos, se tiende a responsabilizar a la Diabetes por la vasculopatía, pero bien podría haber sido originada por otra causa propia de la edad o factores de riesgo concomitantes del paciente.

Las complicaciones macrovasculares (aterosclerosis y sus consecuencias clínicas: infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente vascular

periférico con gangrena) son causa de muerte en el 80% de los pacientes con Diabetes mellitus tipo 2, siendo atribuible al infarto de miocardio el 60% de los casos. La Diabetes tipo 2 está fuertemente asociada con hipertensión arterial y con obesidad abdominal (ambos importantes factores de riesgo independientes para enfermedad cardiovascular). Así, parte del aumento en la incidencia y prevalencia de aterosclerosis observada en estos pacientes, puede atribuirse a la presencia de dichos factores de riesgo (**Tabla III**).

Sin embargo, se ha encontrado que una proporción importante de las alteraciones macrovasculares en estos individuos, es independiente de los factores predisponentes tradicionales para enfermedad cardiovascular, pudiendo ser explicado en gran medida por la hiperglucemia crónica típica de esta enfermedad. El incremento sostenido en los niveles plasmáticos y tisulares de glucosa, podrían inducir un aumento tanto en el estrés oxidativo como en la glicosilación no enzimática (glicación) de macromoléculas, ambos procesos implicados en la generación y progresión de ateromas.

En general, las macroangiopatías son diagnosticadas tardíamente (ya que los ateromas sólo se manifiestan clínicamente cuando existe una estenosis del 75% de la luz del vaso). Por el contrario, las complicaciones microvasculares pueden detectarse más tempranamente, por medio de un examen rutinario de fondo de ojo o de una determinación de microalbuminuria. Así, se encuentra que en estos pacientes la prevalencia para cada microangiopatía (retinopatía, nefropatía, neuropatía sensorimotora o autonómica) oscila entre 20 y 50%. Sin embargo, la proporción de estas complicaciones que pueden provocar incapacidad (es decir, retinopatía proliferativa y proteinuria persistente) es relativamente baja, mostrando una incidencia anual de entre 1 y 2%.

Similarmente a lo descrito para individuos con Diabetes mellitus tipo 1, en los diabéticos de tipo 2 la presencia de microalbuminuria es un factor altamente predictivo de complicaciones macrovasculares, duplicando el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular.

En varios estudios se ha encontrado que la incidencia de nefropatía es similar en pacientes con Diabetes mellitus tipos 1 y 2. Sin embargo, la frecuencia de esta complicación microvascular como causa de muerte es mucho menor en individuos diabéticos de tipo 2 ya que, al poseer probabilísticamente factores de riesgo

cardiovascular en exceso, por lo general fallecen por infarto de miocardio antes de desarrollar una insuficiencia renal terminal.

Recientemente han sido publicados los resultados de un estudio multicéntrico denominado *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS 33, 34, 38 y 39, 1998). Dicho estudio comenzó en 1977 e incluyó a 5102 pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 de diagnóstico reciente, sin enfermedades intercurrentes ni complicaciones micro- o macrovasculares clínicamente evidentes al momento de inclusión. Los pacientes se asignaron a dos grupos, de acuerdo con las metas propuestas para el control de su hiperglucemia: tratamiento convencional (con el objetivo de mantener hiperglucemias menores de 270 mg/dL, en lo posible sólo con dieta); y tratamiento intensivo (se intentaba lograr valores de glucemia menores de 108 mg/dL, por medio de la combinación de dieta y normo/hipoglucemiantes orales [sulfonilureas y/o biguanidas] o insulino-terapia). Asimismo, se agruparon a los pacientes hipertensos en cuanto al tratamiento de su hipertensión: control intensivo, o tratamiento convencional. Los pacientes se evaluaron periódicamente para la detección de micro- y macroangiopatías, y para su monitoreo bioquímico, hasta un máximo de 15 años. Las principales conclusiones de este estudio fueron:

- La glucemia plasmática en ayunas de los pacientes tratados intensivamente, se mantuvo siempre en promedio 20-30 mg/dL por debajo del valor promedio correspondiente a los pacientes tratados en forma convencional, y ambos valores fueron aumentando persistentemente en función del tiempo de estudio (es decir, no fue posible sostener el objetivo propuesto del tratamiento intensivo de 108 mg/dL).
- Los pacientes tratados intensivamente con sulfonilureas o insulina, *versus* tratamiento convencional, mostraron una disminución del 25-30% en la presencia de retinopatía proliferativa, proteinuria persistente y neuropatía sensorimotora. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la incidencia de infarto agudo de miocardio, o a la mortalidad global causada por Diabetes.
- Los pacientes obesos tratados intensivamente sólo con biguanidas (metformina), *versus* tratamiento convencional, presentaron una reducción del 30-40% tanto en la incidencia de eventos macrovasculares (particularmente infarto agudo de miocardio),

como en la mortalidad atribuible a Diabetes. Sin embargo, cuando se combinaron metformina y sulfonilureas desaparecieron estos efectos favorables.

- El tratamiento intensivo *versus* convencional de la hipertensión, se asoció con una reducción del 35% en la aparición de retinopatía proliferativa, y una reducción del 30-35% tanto en la presencia de macroangiopatías como en la mortalidad relacionada con Diabetes.

En otras palabras, el UKPDS ha demostrado la importancia del control de la hiperglucemia, así como de los factores de riesgo cardiovascular presentes concomitantemente en los pacientes con Diabetes mellitus tipo 2, para prevenir las complicaciones micro- y macrovasculares.

Diabetes mellitus: mecanismos de patogenicidad

Como se ha expuesto, estudios como el DCCT y el UKPDS han identificado a la hiperglucemia como un factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones crónicas de la Diabetes mellitus. Sin embargo, no existe consenso en lo que respecta al mecanismo que une a estos dos procesos. Hay varias hipótesis que intentan explicar el origen de estas complicaciones. Entre ellas se destacan: la hipótesis de los productos de glicación avanzada (PGA, o sus siglas en inglés AGE por *advanced glycation endproducts*) (Vlassara 1997); la hipótesis de la vía de los polioles (Hotta 1995); estrés oxidativo (Baynes 1991); estrés reductor o pseudohipoxia (Williamson 1993); hipoxia verdadera (Cameron & Cotter 1997); estrés carbonílico (Lyons & Jenkins 1997); alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas (Witztum 1997); aumento en la actividad de la proteína-quinasa C (PKC) (Ishii 1998); y modificaciones en la actividad de factores de crecimiento (Pfeiffer & Schatz 1995) o citoquinas (Sharma & Ziyadeh 1997).

La lista es extensa, tal vez porque cada hipótesis es un reflejo diferente de un mecanismo patogénico común subyacente, o tal vez porque los diferentes tejidos sean sensibles a mecanismos distintos. Estas hipótesis se superponen unas con otras (Baynes & Thorpe 1999): la formación de AGE y la acumulación de polioles pueden provocar estrés oxidativo, el estrés oxidativo puede acelerar la formación de AGE, el estrés reductor puede derivar en la activación de la PKC, los AGE pueden inducir la expresión

de citoquinas y factores de crecimiento, etc. En las próximas páginas se describirá con algún detalle la hipótesis de los AGE, y su relación con el estrés oxidativo, el estrés carbonílico, y la inducción de citoquinas y factores de crecimiento.

Glicosilación no enzimática, glicoxidación y estrés carbonílico

El término glicosilación no enzimática (o glicación) se aplica principalmente a proteínas, y se refiere a la reacción de pardeamiento no enzimático descrita por Louis Maillard en 1912 (Maillard 1912). La importancia de las reacciones de Maillard en los organismos vivos se ha reconocido sólo en forma reciente. Así, se las ha implicado en las alteraciones asociadas con enfermedades crónicas tan diversas como la Diabetes mellitus (Brownlee 1997), insuficiencia renal (Makita 1991, Miyata 1993), y síndrome de Alzheimer (Yan 1996), y en los mecanismos del envejecimiento de individuos normales.

En la forma en que fue descrita originalmente, esta hipótesis se inicia con la reacción no enzimática entre el carbonilo libre de un azúcar reductor en su forma acíclica (mayoritariamente glucosa), y un grupo amino libre de una proteína (α -amino terminal o ϵ -amino de una lisina). Esta reacción inicialmente lleva a la formación de una base de Schiff inestable, que puede sufrir un reordenamiento intramolecular para dar un producto de Amadori (**Figura 3**). Este producto, aunque de formación reversible, es relativamente estable. Así, su concentración de equilibrio se alcanza a los 28 días, y su valor *in vivo* depende de la concentración de glucosa ambiental promedio en este período de tiempo, y de la vida media de la proteína en cuestión (Bucala 1992).

Una vez formados los productos de Amadori, pueden sufrir una serie de modificaciones oxidativas y no oxidativas, a través de reacciones irreversibles que pueden tardar semanas a años. Así, se llega a una familia de productos covalentemente unidos a proteínas, llamados genéricamente PGA o AGE, originados por vías y mecanismos diferentes. Algunos de estos compuestos son fluorescentes y/o coloreados (de allí el término pardeamiento no enzimático), y como se deduce de su estructura pueden dar lugar a entrecruzamientos entre proteínas (**Figura 4**).

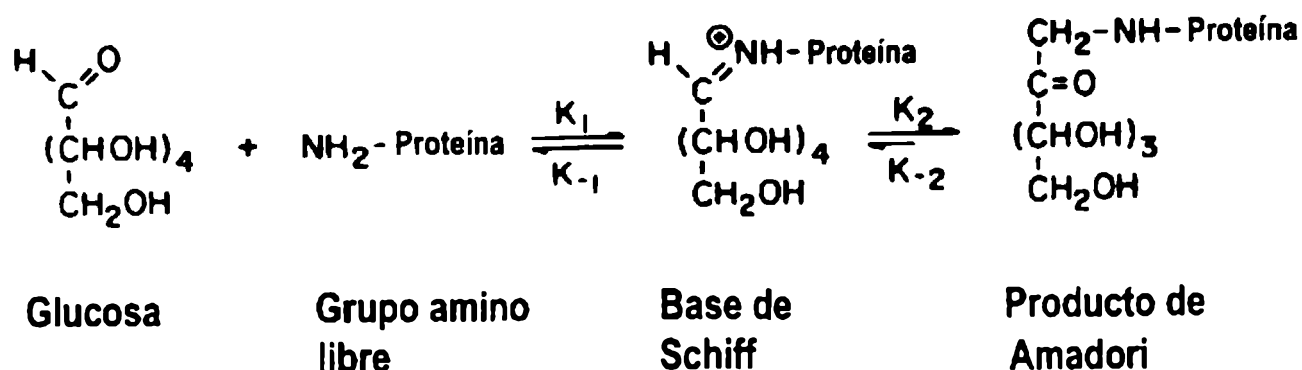


Figura 3. Reacciones iniciales reversibles en la glicosilación no enzimática de proteínas: formación del producto de Amadori.

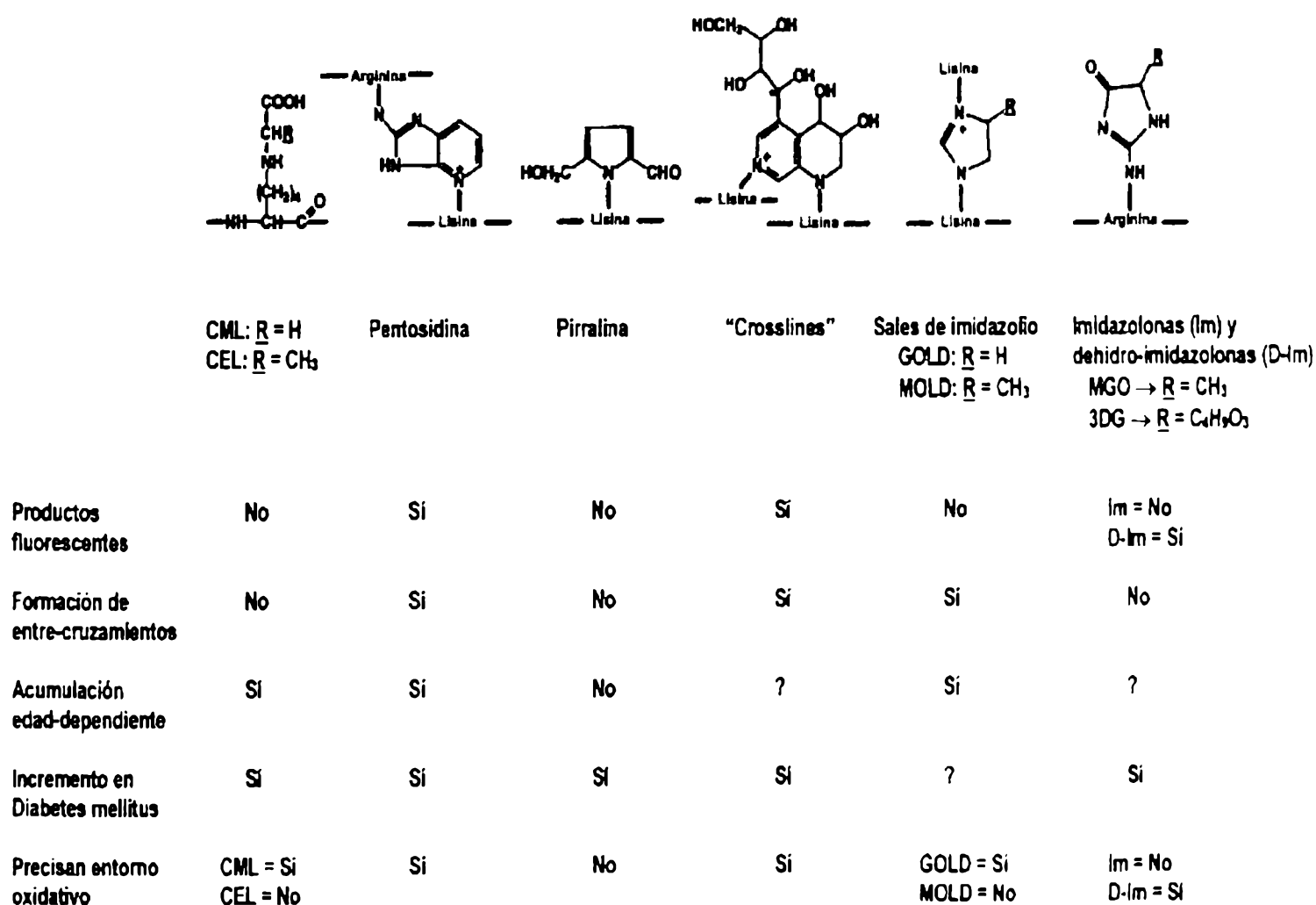


Figura 4. Características y propiedades de algunas estructuras AGE detectadas por métodos químicos e inmunológicos.

La más sencilla de esta serie de reacciones corresponde a la oxidación directa (catalizada por metales) de la cetona perteneciente a un producto de Amadori, dando como resultado una carboxi-metil-lisina (CML), unida covalentemente a la proteína en forma irreversible.

En otra vía conocida, un producto de Amadori puede sufrir una deshidratación no oxidativa. Esta reacción espontánea provoca la recuperación de la estructura proteica original (grupo amino libre), con producción de 3-desoxi-glucosona (3DG), un compuesto dicarbonílico sumamente reactivo que ya no se encuentra covalentemente unido a la proteína. Así, la 3DG puede difundir y reaccionar con otro producto de Amadori (dando como resultado compuestos pirrólicos como la pirralina), o con la cadena lateral de una arginina (dando compuestos imidazólicos como la imidazolona).

Hasta 1987, el producto de Amadori se consideraba un intermediario esencial en la formación de los AGE, y un precursor obligado de compuestos dicarbonílicos como la 3DG. En ese año, se postuló que la auto-oxidación directa de la glucosa catalizada por metales, podía también llevar a la formación tisular de AGE (Wolff & Dean 1987), y se propuso al ascorbato y otros carbohidratos (fructosa, intermediarios de diversas vías metabólicas) como fuentes alternativas importantes de AGE.

La hipótesis glicoxidativa fue introducida en 1991 (Baynes 1991). Según esa hipótesis, productos como la CML y la pentosidina (un entrecruzamiento AGE arginina-lisina cuya formación es dependiente de la existencia de un entorno oxidativo), se describen como una subclase de AGE formados por la interacción de reacciones de glicación y oxidativas. Estas dos moléculas son productos finales inertes (no reactivos) de la reacción de Maillard, que se acumulan como función directa de la edad de un individuo sobre el colágeno y proteínas del cristalino (Dyer 1993). Así, la hipótesis glicoxidativa describe a la oxidación como un fijador de la formación irreversible de AGE sobre proteínas de vida media larga. En otros estudios, se han encontrado niveles aumentados de CML y pentosidina sobre colágeno de piel de pacientes diabéticos versus individuos controles ajustados por edad. Este aumento en el daño glicoxidativo correlacionaba con la presencia y severidad de diversas complicaciones crónicas (nefropatía, retinopatía y enfermedad macrovascular), demostrando la existencia de un descontrol metabólico sistémico en la Diabetes mellitus (Sell 1992, Beisswenger 1993).

Una serie de observaciones recientes han tenido un impacto sustancial sobre la interpretación de la hipótesis de los AGE. En primer lugar, se identificó a la CML como el principal epítipo reconocido por anticuerpos desarrollados *in vitro* contra proteínas modificadas por AGE (Reddy 1995). En consecuencia, estos anticuerpos anti-CML (en

general monoclonales) son ahora utilizados con frecuencia para evaluar el daño glicoxidativo de diversas proteínas tisulares. En segundo lugar, en 1996 se demostró que la CML también puede formarse sobre proteínas a partir de reacciones de peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados (Fu 1996). Es decir que la CML inmunorreactiva de distintos tejidos, puede ser producto tanto de reacciones de glicoxidación como de lipoxidación (ello dependerá del estrés predominante: hiperglucemia o dislipemia en un entorno oxidativo).

En otros estudios, Bucala y col. demostraron la formación de AGE sobre fosfolípidos. Estos investigadores encontraron que los niveles de AGE-lípidos en LDL obtenido de plasma diabético, correlacionaba con los niveles de malondialdehído (MDA, derivado de la peroxidación de lípidos) (Bucala 1994). Estos AGE unidos a lípidos corresponderían a carboxi-metil-fosfatidiletanolamina (CMF), que también es reconocido por los anticuerpos anti-CML (Requena 1997).

En placas ateromatosas ricas en lípidos, se ha encontrado un aumento marcado en la inmunorreactividad utilizando anticuerpos anti-CML, tanto en individuos diabéticos como no diabéticos. Sin embargo, este incremento en la reactividad podría deberse a múltiples causas: CML-proteínas de origen lipoxidativo o glicoxidativo (esta última sólo importante en diabéticos), o CMF unido a fosfolípidos.

En 1997, Lyons y Jenkins propusieron al estrés carbonílico como una explicación alternativa para el incremento en la modificación química de proteínas, observada en Diabetes mellitus y otras patologías. El estrés carbonílico se define como un aumento generalizado en la concentración de compuestos carbonílicos reactivos, precursores de productos de glicoxidación, lipoxidación, y de otros AGE de origen no oxidativo. Este aumento en los carbonilos puede ser el resultado de un estrés por sustratos (hiperglucemia, dislipemia), de la existencia de un entorno oxidativo, y/o de una disminución en la eficiencia de los mecanismos de detoxificación de dichos compuestos carbonílicos. Si los carbonilos en exceso fueran derivados exclusivamente de reacciones oxidativas, estaríamos en presencia de un estrés oxidativo puro. Ahora bien, si dichos carbonilos fueran consecuencia (total- o parcialmente) de procesos no oxidativos, la situación se podría describir mas apropiadamente como estrés carbonílico. Algunos

ejemplos de estos compuestos carbonílicos se muestran en la **Figura 5** (Lyons & Jenkins 1997, Baynes & Thorpe 1999).

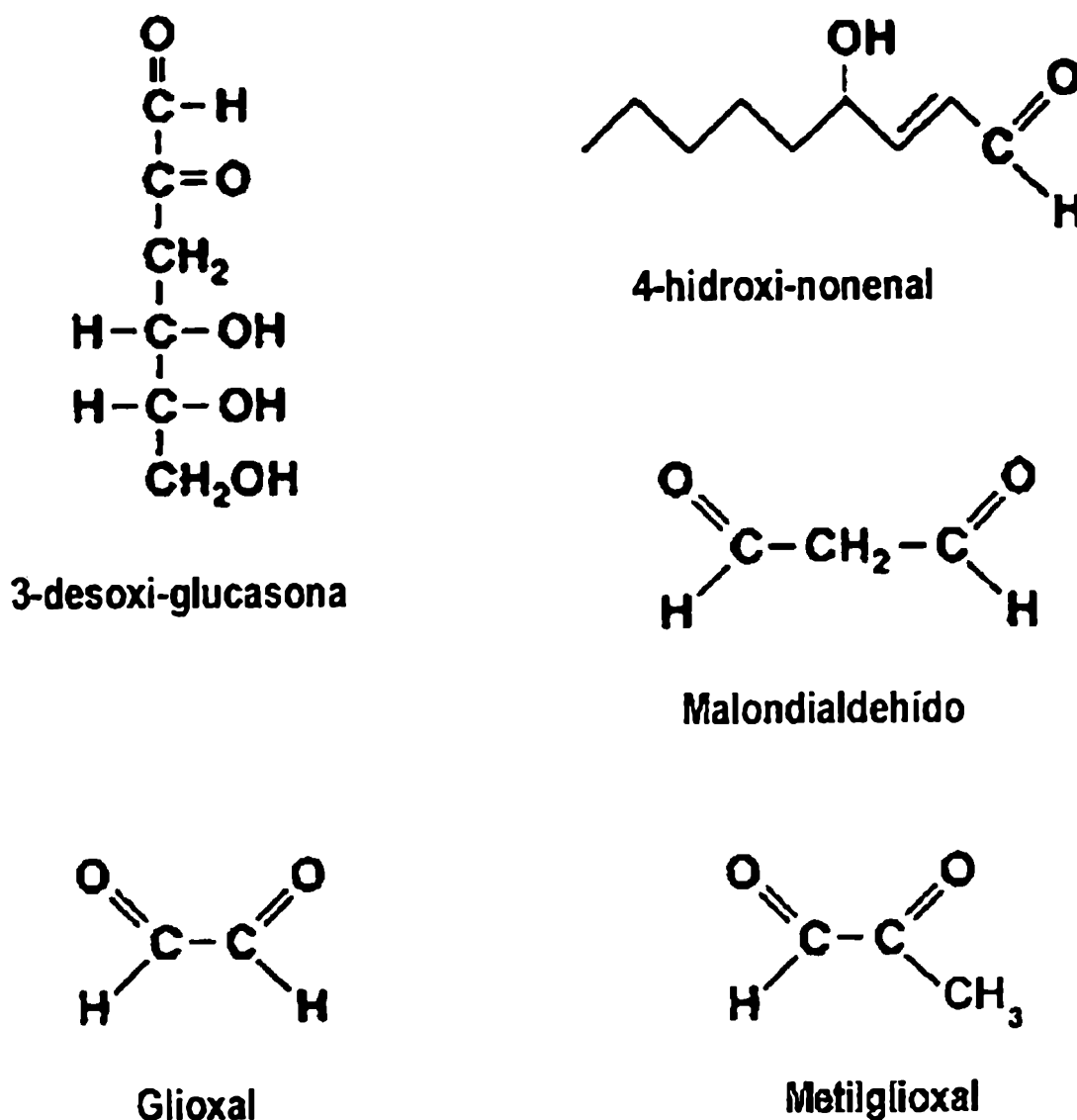


Figura 5. Estructura de algunos compuestos dicarbonílicos reactivos, intermediarios en la formación de productos de Maillard sobre proteínas. Metilglioxal y 3-desoxi-glucosona se generan exclusivamente a partir de carbohidratos, por procesos no oxidativos. Malondialdehído y 4-hidroxi-nonenal son productos de lipoxidación. El glioxal se puede originar tanto por oxidación de lípidos como de hidratos de carbono.

Los procesos que dan origen a estos compuestos carbonílicos pueden ser variados:

- *3-desoxi-glucosona (3DG)*: como hemos visto, este compuesto puede originarse de la hidrólisis no oxidativa de un producto de Amadori, o alternativamente de la β -eliminación no oxidativa del grupo fosfato de la fructosa-3-fosfato. La concentración plasmática de 3DG está incrementada en pacientes con diabetes o insuficiencia

renal, y los niveles tisulares de imidazolona (aducto 3DG-arginina) están aumentados en diabéticos.

- *Metilglioxal (MGO)*: esta molécula se deriva intracelularmente a partir de la β -eliminación no oxidativa de un grupo fosfato perteneciente a triosas-fosfato (intermediarios de la glicólisis). En individuos diabéticos, se ha encontrado un aumento plasmático tanto del MGO, como de sus derivados AGE: aductos con arginina y MOLD (entrecruzamientos di-lisina imidazolio).
- *Glioxal*: éste es el compuesto dicarbonílico estructuralmente más sencillo, y se origina por mecanismos oxidativos. Puede formarse como producto de la peroxidación de lípidos, o por auto-oxidación de la glucosa (es el dicarbonilo mayoritario en este último proceso). El glioxal puede reaccionar directamente con el ϵ -amino de una lisina proteica para dar origen a la CML, o provocar el entrecruzamiento de dos lisinas a través del AGE imidazólico GOLD.
- *Malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE)*: son moléculas derivadas, junto con el glioxal, de la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados. Pueden reaccionar irreversiblemente con residuos de lisina o histidina de proteínas cercanas, resultando en los llamados productos de lipoxidación: CML, lisina-MDA, entrecruzamiento lisina-MDA-lisina, lisina-HNE e histidina-HNE.

En individuos con Diabetes mellitus, se encuentra un aumento simultáneo de estructuras AGE de origen oxidativo (CML y pentosidina) y no oxidativo (derivados de 3DG y MGO). Este hecho indica que los pacientes sufren un aumento generalizado en su nivel de carbonilos (estrés por carbonilos), más que un incremento selectivo de los carbonilos de origen oxidativo (que sería indicativo de estrés oxidativo). Como se ha mencionado, el estrés carbonílico puede deberse en parte a un estrés por sustratos (como consecuencia de la hiperglucemia y/o dislipemia de los pacientes), pero también a una falla o sobrecarga de los mecanismos de detoxificación de carbonilos (**Figura 6**).

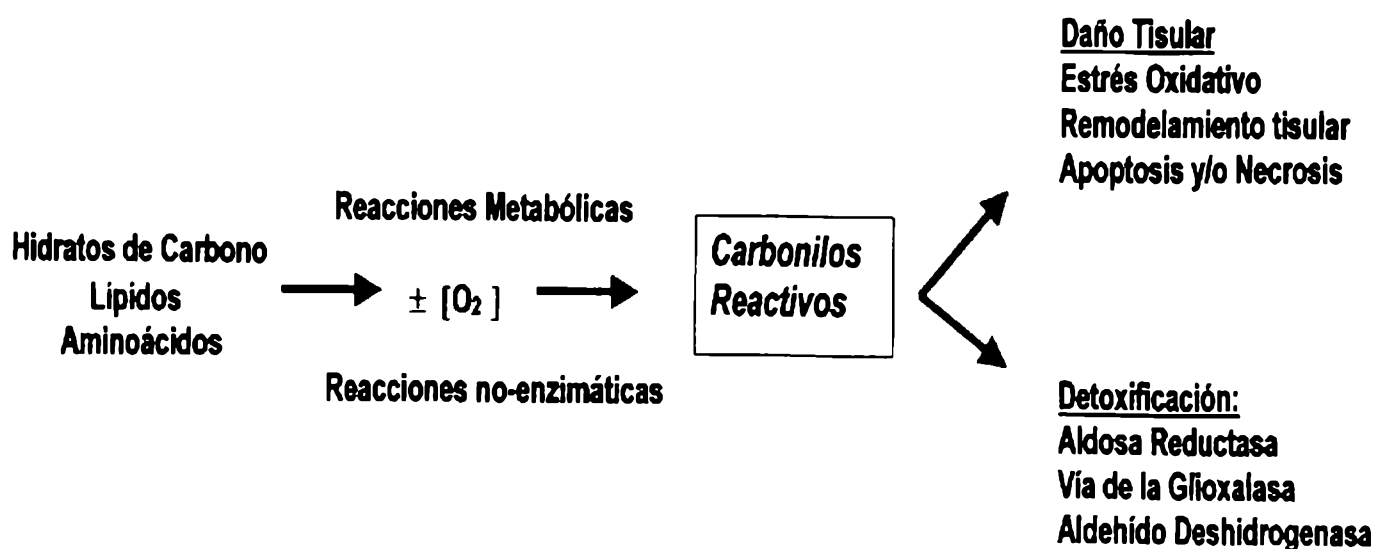


Figura 6. Factores que contribuyen al desarrollo de estrés carbonílico. Un exceso de compuestos carbonílicos reactivos (por excesiva formación y/o defectuosa detoxificación) provoca un incremento en la modificación química de proteínas. Esta sobremodificación proteica puede tener consecuencias biológicas muy variadas, según el tejido en cuestión.

Para aclarar este punto, debe distinguirse entre las actividades de detoxificación y antioxidante. La vitamina E, el hidroxitolueno butilado y el probucol, son antioxidantes que atrapan a los intermediarios reactivos de la peroxidación de lípidos (radical hidroxilo, superóxido, etc.), inhibiendo así la formación de glioxal, MDA y HNE. Sin embargo, los antioxidantes mencionados no pueden eliminar a estos compuestos carbonílicos una vez que ya han sido formados, siendo ésa la función de las vías de detoxificación. Se han descrito tres mecanismos para la detoxificación de compuestos carbonílicos (Baynes & Thorpe 1999):

- *Vía de la glioxalasa:* esta vía es dependiente de la presencia de glutatión reducido (GSH), e ilustra la función dual del glutatión dentro de la célula: GSH puede actuar como antioxidante cuando es utilizado por la GSH-peroxidasa para la reducción de peróxidos o superóxido, dando glutatión oxidado (GSSG) como producto. Sin embargo, en el caso de la glioxalasa GSH forma un intermediario hemitioacetal (trampa de carbonilos), facilitando el rearrreglo del dicarbonilo a un hidroxilácido (por ejemplo, MGO a D-lactato), con regeneración del GSH.

- *Vía de la aldosa reductasa o de los polioles:* en esta vía (dependiente de la presencia de GSH y NADPH), el GSH vuelve a actuar como trampa de carbonilos, permitiendo la ulterior reducción de los mismos a alcoholes, con consumo de NADPH y regeneración del GSH (por ejemplo, MGO a 1,2-propanodiol).
- *Vía de la aldehído deshidrogenasa:* involucra la oxidación NAD⁺-dependiente de compuestos dicarbonílicos a ácidos carboxílicos (por ejemplo, 3DG a 3-deoxifruktosa).

En individuos con Diabetes mellitus descompensada, pueden existir múltiples razones que provoquen fallas en los mecanismos de detoxificación. La existencia de un estrés oxidativo conduciría a una disminución relativa en la relación GSH/GSSG, lo cual impediría una detoxificación eficiente de la glioxalasa y aldosa reductasa. Por otro lado, la hiperglucemia provocaría un déficit relativo tanto en el NAD⁺ (por excesivo metabolismo de glucosa a través de la vía glucolítica), como en el NADPH (por excesiva formación de sorbitol a partir de glucosa, por la vía de los polioles). Esto tendería a disminuir la detoxificación de carbonilos dependiente de aldosa reductasa y aldehído deshidrogenasa.

Efectos químicos directos de los AGE

La Diabetes mellitus de larga data tiende a afectar tejidos muy diversos (retina, nervios, riñones, grandes vasos, huesos y articulaciones, etc.). Sin embargo, a nivel fisiopatológico estas complicaciones crónicas en apariencia tan diferentes poseen alteraciones vasculares muy similares. Así, todas se caracterizan por un aumento en la permeabilidad del endotelio vascular con extravasación de proteínas plasmáticas; deposición irreversible de estas proteínas plasmáticas sobre el colágeno del subendotelio; engrosamiento de la matriz extracelular subendotelial; y crecimiento anormal de las células subyacentes. El efecto conjunto de estos efectos patológicos es un estrechamiento progresivo de la luz de la vasculatura diabética, con perfusión inadecuada de segmentos críticos de los órganos afectados (Brownlee 1997).

La acumulación de AGE sobre proteínas, en especial las de vida media larga, se ha implicado como un mecanismo causal directo de muchas de las alteraciones

diabéticas crónicas. Estas modificaciones covalentes e irreversibles de las proteínas pueden provocar cambios permanentes en su estructura y bioactividad.

Numerosos estudios han revelado que existe un entrecruzamiento progresivo entre las hebras de colágeno, que aumenta con la edad de un individuo normal (Monnier 1984). Estos entrecruzamientos (que son al azar, a diferencia de las uniones sitio-específicas catalizadas por la enzima lisil-oxidasa) hacen al colágeno menos soluble y menos sensible a la digestión enzimática (Schnider & Kohn 1981). Esto confiere una mayor rigidez e inelasticidad al tejido que lo contiene (por ejemplo, la pared vascular) (Schuyler 1976). Estos procesos de envejecimiento fisiológico se ven acelerados en individuos diabéticos y se asocian directamente con los niveles tisulares de AGE-colágeno, medidos tanto por fluorescencia como por inmunoensayos específicos (Beisswenger 1995).

Estas estructuras AGE unidas irreversiblemente al colágeno en la matriz extracelular de la pared vascular, pueden actuar como una red para el atrapamiento de albúmina, inmunoglobulinas y LDL plasmáticas extravasadas, estén o no glicadas. Una vez que estas proteínas plasmáticas de vida media relativamente corta quedan atrapadas en la matriz subendotelial, servirán de sustrato para la formación de aún más AGE, y contribuyen al engrosamiento de la pared vascular (Bucala, 1992). Además, la inmovilización de algunas de estas proteínas puede ocasionar daños directos a la pared vascular: las inmunoglobulinas pueden inducir la iniciación de la activación del complemento. Asimismo, el pegado covalente de LDL impediría su difusión nuevamente a circulación, permitiendo así la oxidación de sus lípidos asociados por el endotelio, y favoreciendo la formación de placas ateromatosas (**Figura 7**). De hecho, se ha demostrado que el atrapamiento covalente de LDL en la matriz extracelular vascular es función lineal de la concentración de AGE unido covalentemente al colágeno (Brownlee 1985).

La formación de AGE sobre proteínas de la matriz extracelular puede también provocar alteraciones en ciertas funciones críticas de la membrana basal, tales como su auto-ensamblado y su capacidad de unión de proteoglicanos-heparán-sulfato (PGHS).

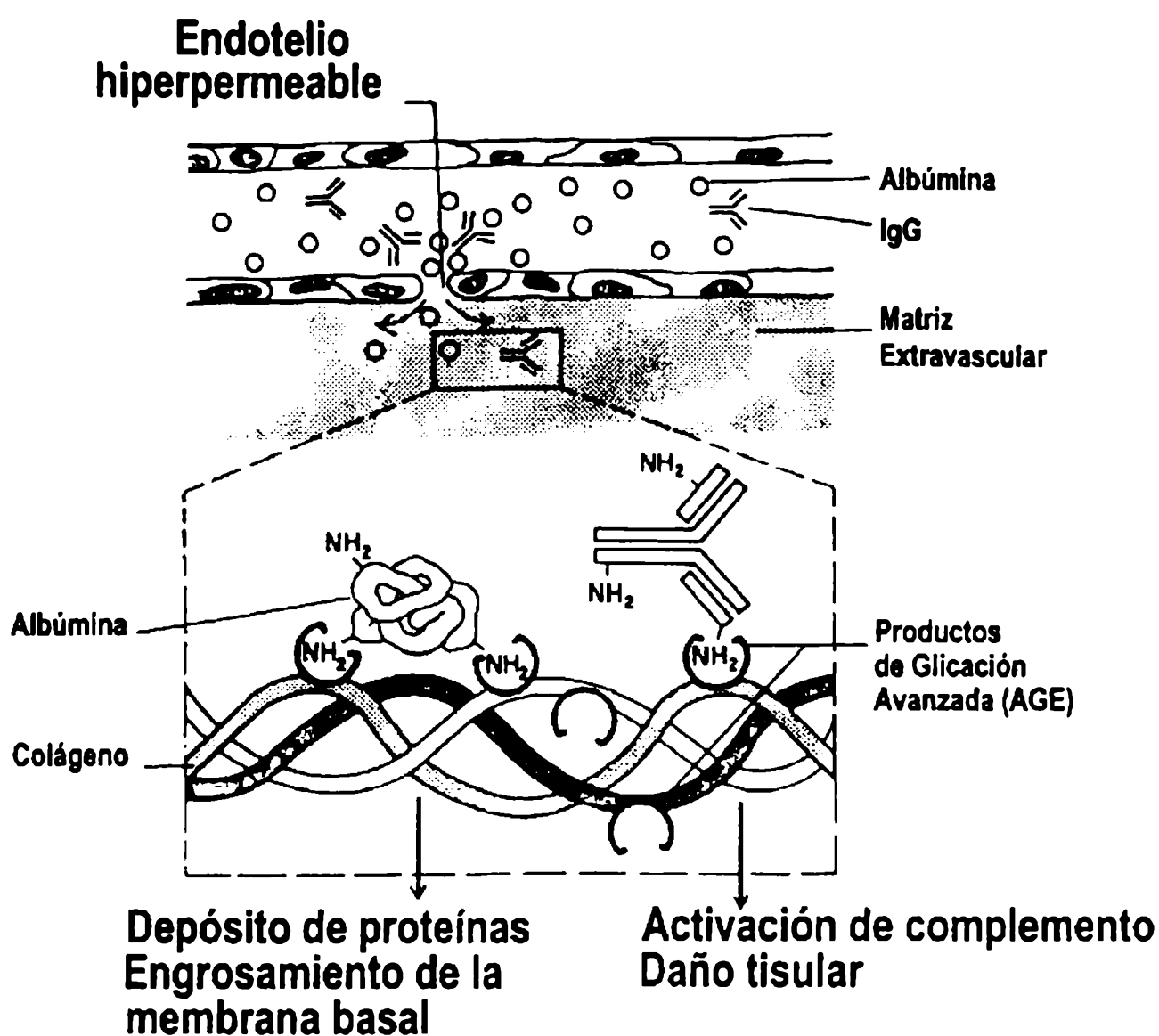


Figura 7. Modelo para el atrapamiento de proteínas plasmáticas extravasadas. Los productos de glicosilación avanzada formados sobre el colágeno subendotelial de la pared vascular, actúan como una red para el pegado covalente de albúmina, inmunoglobulinas y LDL.

El desarrollo y mantenimiento normal de la estructura de la membrana basal, involucra un proceso de auto-ensamblado geoméricamente definido, con interacciones sitio-específicas entre colágeno de tipo IV, laminina, PGHS y entactina (Yurchenco 1986). La formación de AGE interfiere con la capacidad asociativa de estos componentes, encontrándose por estudios de difracción de rayos X un aumento en el espaciado intermolecular (Tarsio 1988). Estos cambios aumentarían en forma permanente el diámetro de poro de la matriz vascular, facilitando la extravasación de proteínas plasmáticas.

Los componentes aniónicos de la membrana basal (en particular el PGHS) son importantes en la barrera de filtración carga-dependiente de la matriz vascular. Por otro lado, disminuyen la proliferación de las células adherentes por dos mecanismos (Klahr 1988): directamente por receptores celulares específicos para glicosaminoglicanos, e indirectamente por secuestro de factores de crecimiento como el bFGF (factor de crecimiento fibroblástico). La acumulación de AGE sobre proteínas de matriz involucra aminoácidos cargados positivamente como lisina y arginina, y disminuye así su capacidad de unión a la heparina. Así, se ha encontrado una disminución marcada en el contenido de proteoglicanos aniónicos en la membrana basal diabética (Shimomura & Spiro 1987), y hay evidencia de que la pérdida de esta señal inhibitoria provoca un aumento compensatorio en la síntesis y secreción celular de proteínas de matriz vascular (Rohrbach 1982), así como una mayor extravasación de proteínas plasmáticas cargadas negativamente.

La hipoperfusión e hipoxia tisular pueden ser consecuencia de alteraciones en el tono vascular y en el flujo sanguíneo regional. Estos dos procesos son regulados en gran medida por la producción de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) por las células endoteliales (Vallance 1989). Esta producción puede ser post-estimulación con acetilcolina, por activación de las NO-sintasas; o puede ser de origen no enzimático, por fármacos como la nitroglicerina. Sea cual fuere su origen, el $\text{NO}\cdot$ difunde a través de la membrana basal sub-endotelial e impacta sobre las células musculares lisas, provocando la relajación de las mismas con la consecuente vasodilatación y disminución del tono vascular. El $\text{NO}\cdot$ también ejerce efectos antiproliferativos sobre ciertos tipos celulares como las células musculares lisas y mesangiales renales, manteniéndolas en un estado de quiescencia (Garg & Hassid 1989).

Estudios recientes han demostrado que el AGE unido a colágeno provoca la inactivación química del $\text{NO}\cdot$ (Bucala 1991). Así, la hipertensión y los defectos en la respuesta vasodilatadora del lecho vascular asociados con Diabetes mellitus (McVeigh 1992), podrían deberse en parte a la acumulación de AGE subendotelial observada en estos pacientes, por la destrucción del $\text{NO}\cdot$ durante su paso a través de la matriz extracelular (**Figura 8**) (Vlassara 1992). Asimismo, los AGE de la membrana basal bloquearían los efectos antiproliferativos del $\text{NO}\cdot$ sobre miocitos y células mesangiales,

promoviendo las lesiones proliferativas vasculares y glomerulares de la Diabetes mellitus (Hogan 1992).

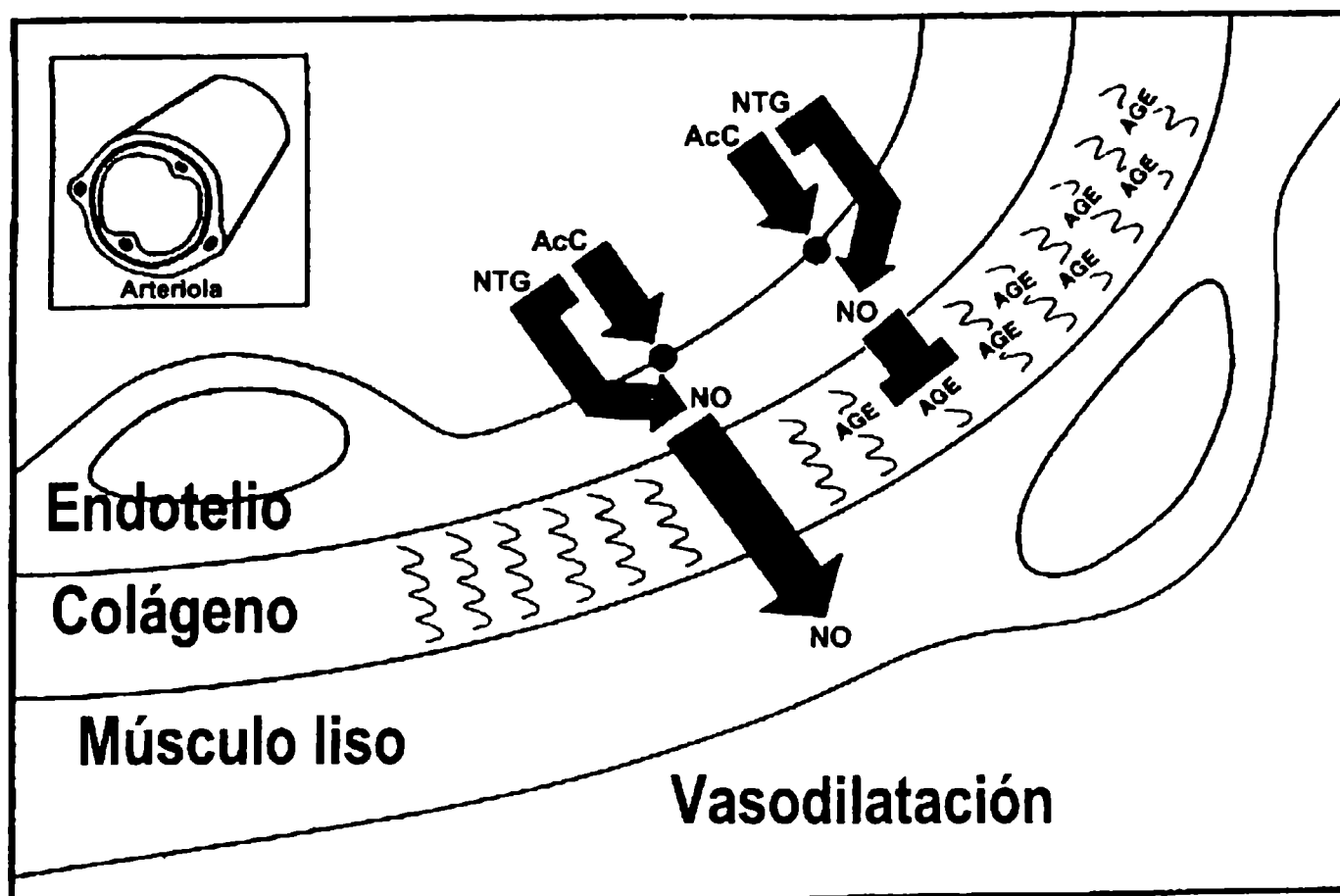


Figura 8. Inactivación química del óxido nítrico (NO) por productos de glicosilación avanzada (AGE) formados sobre proteínas de la matriz extracelular subendotelial. El NO puede ser sintetizado enzimáticamente por las células endoteliales post-estimulación con acetilcolina (AcC), o producido no enzimáticamente por drogas nitrovasodilatadoras como la nitroglicerina (NTG).

Los AGE pueden también formarse sobre proteínas intracelulares *in vivo*, a partir por ejemplo de intermediarios de la glicólisis. Este proceso se ve acelerado en los tejidos insulino-independientes de los pacientes diabéticos, por el incremento en el metabolismo glicolítico inducido por la hiperglucemia (Brownlee 1997). Así, en células endoteliales expuestas a un ambiente hiperglucémico versus euglucémico, el contenido intracelular de proteínas modificadas por AGE aumenta 14 veces, siendo este aumento debido en gran parte a la glicación del bFGF. bFGF es el principal promotor de la actividad mitogénica del endotelio, y la acumulación de AGE sobre este factor de crecimiento (de

aproximadamente 6 veces en condiciones de hiperglucemia) disminuye su actividad mitogénica a un 30% del basal. De esta manera, baja la capacidad regenerativa de las células endoteliales, lo cual en determinadas situaciones de estrés vascular favorecería la denudación endotelial (Giardino 1994).

Efectos de los AGE mediados por receptores

La neuropatía periférica observada frecuentemente en pacientes diabéticos, se asocia con desmielinización segmentaria, degeneración axónica y acumulación de AGE en proteínas de los nervios periféricos (Vlassara 1981, Ryle 1997). Asimismo, frecuentemente se observa una infiltración macrofágica de los nervios afectados, con fagocitosis y degradación *in situ* de la vaina de mielina (Vlassara 1985a). Esta observación llevó al descubrimiento de receptores de membrana plasmática con afinidad para AGE, pertenecientes al sistema de receptores *scavenger* de los macrófagos (Vlassara 1985b). Dichos receptores son específicos para las diversas estructuras AGE (independientemente de la proteína a la cual se hallan irreversiblemente unidas), y han sido caracterizados y aislados en ratas, ratones y humanos.

Desde entonces se ha descrito una familia o sistema de receptores para AGE, habiéndose demostrado su expresión en macrófagos, células del endotelio vascular, células mesangiales renales, fibroblastos, células neuronales, linfocitos T y células musculares lisas. La unión específica AGE-receptor inicia una secuencia de procesos que va a depender de la célula a la cual pertenece el receptor (**Tabla IV**). La intensidad de la respuesta va a ser función de la concentración tisular de los AGE, pudiendo explicar al menos en parte las alteraciones celulares asociadas a varias complicaciones crónicas de la Diabetes. A continuación, se describirán los efectos más importantes de los AGE sobre diversos tipos celulares.

Tabla IV. Efectos de los AGE mediados por receptores específicos.

a. A nivel sistémico:

- ◆ Recambio fisiológico de proteínas envejecidas

b. En la pared vascular:

- ◆ ↑ permeabilidad endotelial
- ◆ ↑ endotelial de VEGF y pérdida de pericitos ⇒ neovascularización
- ◆ Inducción de un estado protrombótico relativo (factor tisular, PAI-1)
- ◆ ↑ migración transendotelial de macrófagos (VCAM-1, ICAM-1)
- ◆ ↑ de TNF, IL-1, PDGF e IGF-I por macrófagos subendoteliales (estimulación local de células mesenquimatosas)
- ◆ ↑ migración y proliferación de células musculares lisas (TGF- β)

c. En el glomérulo renal:

- ◆ ↑ de TGF- β e IGF-I por células mesangiales
- ◆ ↑ producción de matriz extracelular (colágeno tipo IV, fibronectina, laminina)
⇒ modificación en la selectividad de filtración glomerular

d. En tejido conectivo:

- ◆ ↓ producción de colágeno tipo I por fibroblastos (EGF / r-EGF)

e. Sistema nervioso central en Síndrome de Alzheimer:

- ◆ ↑ de AGE sobre proteína tau (aglomerados neurofibrilares) y β -amiloide (placas seniles)
- ◆ ↑ AGE-dependiente de quimiotaxis y supervivencia en células de la microglía (CSF-M / c-fms) ⇒ ↑ inflamación crónica (tóxica para neuronas)

1. Macrófagos. Estas células pueden reconocer los AGE formados *in vivo* a través de sus receptores, modulando así la captación y degradación de estas proteínas irreversiblemente modificadas. La acumulación neta de AGE unido a proteínas de la matriz tisular reflejaría el balance entre su formación no enzimática, y su degradación mediada por macrófagos (Vlassara 1985b). La unión AGE-receptor en este tipo celular induce la síntesis y secreción de factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), factor de crecimiento derivado de

plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) (Vlassara 1988, Kirstein 1992, Morohoshi 1995). IL-1, PDGF e IGF-I estimulan la proliferación de células mesenquimatosas, que pueden entonces secretar colagenasa y otras proteasas, favoreciendo la degradación de proteínas de matriz extracelular. En la pared vascular, IL-1 también puede inducir la proliferación de fibroblastos (que sintetizan colágeno nuevo), de células musculares lisas y de células endoteliales. En pacientes diabéticos descompensados, el aumento tisular de AGE tendería a sobreestimular la proliferación celular y la producción de matriz extracelular, ambos procesos implicados en la formación de ateromas.

- 2. Células del endotelio vascular.** En estas células, la unión específica AGE-receptor induce un aumento en la permeabilidad de la monocapa celular, permitiendo la extravasación de proteínas plasmáticas al subendotelio (Espósito 1989). Además, aumenta la síntesis y expresión en la membrana endotelial tanto del factor tisular (Espósito 1989, Bierhaus 1997), como del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Yamagishi 1998). Ambas proteínas tenderían a provocar un estado protrombótico relativo. Una de las funciones aparentes del sistema de receptores para AGE del endotelio, es el *clearance* (aclaramiento) de proteínas plasmáticas envejecidas *in vivo*, ya sea que se encuentren dispersas o que integren la membrana de los eritrocitos circulantes (Wautier 1994). En este último caso, contribuirían a la disminución descrita en la vida media de los eritrocitos de pacientes diabéticos crónicamente descompensados. El anclado de proteínas-AGE a su receptor, induce en las células endoteliales un estrés oxidativo que provoca la activación de NF- κ B (Yan 1994b). Este factor de transcripción nuclear podría ser el responsable del incremento, mediado por AGE, en la expresión endotelial de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 (Vlassara 1995a, Schmidt 1995). A su vez, estas moléculas de adhesión podrían mediar la migración transendotelial de monocitos hacia la matriz extracelular vascular sobre-modificada por AGE. Se ha encontrado que los capilares de la microcirculación están formados por dos monocapas celulares: la interna endotelial, recubierta externamente por pericitos que regulan la proliferación del endotelio. Como se ha mencionado, el incremento de AGE aumenta la permeabilidad endotelial. También se ha observado que la unión AGE-receptor en la célula

endotelial induce tanto la secreción de IL-6 (Zoukourian 1996), como de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Yamagishi 1997, Lu 1998). Por otro lado, las proteínas-AGE extravasadas (así como los AGE formados sobre la matriz extracelular) pueden ser reconocidas por receptores específicos presentes también en los pericitos, y se ha descrito que dicha unión inhibe la proliferación de este tipo celular (Chibber 1997). De esta forma, tanto la pérdida relativa de pericitos como el incremento local de VEGF inducidos por AGE, podrían aumentar la proliferación endotelial, un paso determinante en la neovascularización observada en las microangiopatías diabéticas (Figura 9).

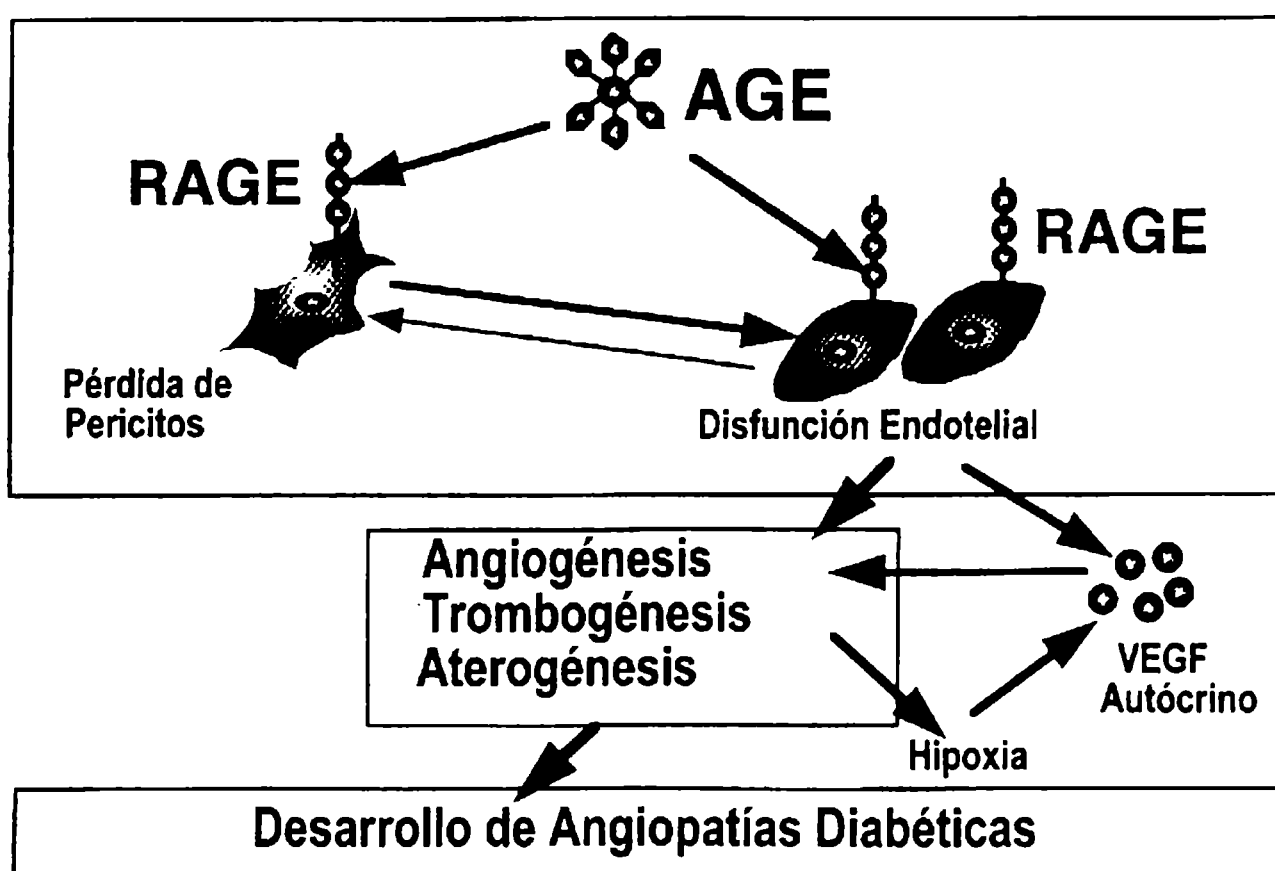


Figura 9. Modelo para el desarrollo de la microangiopatía diabética. Como consecuencia de la interacción excesiva entre los productos de glicosilación avanzada de proteínas (AGE) y sus receptores específicos (RAGE), aumenta tanto la producción endotelial de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como la pérdida de pericitos. Ambos eventos tienen consecuencias patológicas en el lecho microvascular.

3. Células mesangiales renales. En este tipo celular, imprescindible para el mantenimiento de la selectividad de la filtración glomerular, la unión de AGE a su receptor específico induce un aumento en la síntesis y secreción de factores de

crecimiento como el transformante-beta ($TGF-\beta$) e IGF-I, así como de proteínas constituyentes de la matriz extracelular glomerular (colágeno de tipo IV, fibronectina y laminina) (Skolnik 1991, Pugliese 1997, Tsuji 1998). $TGF-\beta$ e IGF-I son estimuladores potentes de la síntesis de proteínas de matriz, pero ejercen efectos opuestos sobre la proliferación celular. Así, la acumulación renal de AGE podría jugar un papel central en la expansión mesangial patognomónica de la nefropatía diabética, a través de la inducción de factores de crecimiento y acumulación de matriz extracelular.

- 4. Células del sistema nervioso central: Síndrome de Alzheimer.** En pacientes con síndrome de Alzheimer existe un incremento de AGE tanto en la proteína Tau (principal componente de los aglomerados neurofibrilares) (Yan 1994a) como en la proteína beta-amiloide (constituyente mayoritario de los depósitos extracelulares de las placas seniles) (Vitek 1994). La unión de estos AGE a receptores específicos de las células neuronales (Li 1998) induce, vía estrés oxidativo y activación de $NF-\kappa B$, la secreción de factor estimulante de colonias macrofágicas (CSF-M) (Yan 1996, Yan 1997). CSF-M es quimiotáctico para células de la microglía (de origen monocítico), atrayéndolas hacia los focos de perturbación neuronal. El CSF-M actúa a través de su receptor c-fms presente en células de la microglía, induciendo la proliferación y supervivencia de este tipo celular frente a concentraciones tóxicas de proteína beta-amiloide (Yan 1997). Las células neuronales no expresan c-fms, por lo cual los acúmulos de beta-amiloide modificados por AGE eventualmente provocarían su muerte o retracción. Estos mecanismos parecerían implicar a las proteínas-AGE en la patogénesis del síndrome de Alzheimer.
- 5. Células musculares lisas.** El crecimiento de las células musculares lisas presentes en la pared vascular, se halla regulado en gran medida por la interacción de los miocitos con ciertos residuos de lisina del colágeno de la matriz extracelular. Así, en condiciones de glicación incrementada, el bloqueo de dichas lisinas con productos de Amadori o estructuras AGE desreprime los miocitos, permitiendo un aumento en su proliferación (Iino 1996). Por otro lado, los miocitos poseen receptores específicos para AGE, y su ocupación induce tanto la secreción de $TGF-\beta$ por estas células, como su quimiotaxis hacia la fuente de AGE (Higashi 1997). Cabe destacar que la

secuencia de activación / migración / proliferación de los miocitos, es uno de los eventos claves de la aterogénesis.

6. **Fibroblastos.** En los tejidos ricos en colágeno de tipo I (piel, tendones, articulaciones y huesos), los fibroblastos son las principales células productoras de colágeno tanto en los procesos fisiológicos como inflamatorios. Este tipo celular posee receptores específicos para AGE, y la unión AGE-receptor induce la síntesis de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y de su receptor (r-EGF). El EGF, actuando entonces en forma autócrina sobre los fibroblastos, disminuye tanto la síntesis como la secreción del colágeno de tipo I (Owen Jr. 1998).
7. **Linfocitos T.** Estas células tienen un sistema de receptores para AGE que se induce en el estado de linfocito activado (por ejemplo, por fitohemaglutinina). En el linfocito T, la unión AGE-receptor produce un aumento en la expresión y síntesis de interferón-gamma (IFN- γ) (Imani 1993). Este sistema de receptores podría servir para anclar los linfocitos en los tejidos ricos en AGE, donde podrían asistir a los macrófagos en su *clearance* de las proteínas irreversiblemente glicadas. En condiciones de acumulación excesiva de AGE, el aumento en la producción de IFN- γ podría acelerar las respuestas inmunes que contribuyan al daño tisular.

Familia de receptores para AGE

En los últimos 15 años se han descrito cinco clases diferentes de receptores para AGE. Algunos de estos receptores han sido estudiados extensamente, y se ha demostrado que reconocen estructuras AGE formadas fisiológicamente *in vivo*, siendo activados por las mismas. Para otros receptores la actividad biológica es menos clara, ya que sólo se ha demostrado que reconocen proteínas modificadas *in vitro* con niveles suprafisiológicos de AGE, y/o corresponden a proteínas que normalmente no se encuentran presentes en la membrana plasmática celular.

1. **Receptor para AGE (RAGE).** Esta proteína de 45 kDa se describió recientemente (Neeper 1992). Su constante de afinidad para AGE-proteínas es de $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas: posee un dominio extracelular

de 320 aminoácidos en forma de V, con dos oligosacáridos N-ligados; un dominio transmembrana de 21 aminoácidos; y un dominio carboxi-terminal intracitoplasmático de 41 aminoácidos (**Figura 10**). Se ha demostrado la expresión de esta proteína en células endoteliales, miocitos, monocitos, células de la microglía, neuronas y fibroblastos. La acción de proteasas extracelulares como la tripsina provoca la liberación del dominio extracelular, dando un fragmento proteolítico de 35 kDa que se ha llamado RAGE soluble (sRAGE). El sRAGE, inmovilizado sobre una columna de afinidad, se ha utilizado para aislar proteínas-AGE formadas *in vivo* en pacientes diabéticos, lo cual refuerza el concepto de su acción como receptor de AGE en sistemas biológicos (Yan 1994b). Por otro lado, se encuentra en estudio el posible uso de sRAGE como fármaco para la prevención tanto de la disfunción micro- y macrovascular como de la enfermedad periodontal asociados con Diabetes (Wautier 1996, Park 1998, Lalla 2000). El receptor RAGE, que normalmente se localiza en la membrana plasmática, forma un complejo con otra proteína de 80 kDa, de secuencia amino-terminal idéntica a la Lactoferrina (LF-L ó *Lactoferrin-like*) (Schmidt 1994). La proteína LF-L contiene en su estructura primaria una secuencia de cuatro argininas consecutivas. Esta secuencia (de carga neta positiva), aunque puede unir estructuras polianiónicas como las proteínas altamente modificadas por AGE *in vitro*, no parece tener afinidad por las proteínas modificadas por AGE *in vivo* (ya que su densidad superficial de AGE es considerablemente menor). Así, se cree que en condiciones fisiológicas las estructuras AGE son reconocidas principalmente por el dominio extracelular de RAGE, no habiéndose aclarado aún el papel que juega en este proceso la proteína LF-L. El anclado de AGE-proteínas a su receptor RAGE en la membrana plasmática, produce en el microentorno circundante una perturbación redox por inducción de especies de oxígeno activas (ROS). Estos radicales libres pueden luego reaccionar con la proteína G p21^{ras} (específicamente por medio de la oxidación del residuo de cisteína en la posición 118), provocando como consecuencia el reclutamiento de la fosfatidil-inositol-3'-quinasa (PI3K), y posterior activación tanto de proteína-quinasa B (PKB) como de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), ERK1 y ERK2. Esta cascada de señales intracelulares, aún no del todo dilucidada, finalmente culmina con la activación del factor de transcripción

nuclear NF- κ B, el cual modula la expresión de diferentes grupos de genes, dependiendo del tipo celular en cuestión (Yan 1994b, Lander 1997, Deora 1998). El gen que codifica para RAGE en humanos se ha localizado en el cromosoma 6p 21.3, en la región del complejo mayor de histocompatibilidad de clase III (Vissing 1994). La eficiencia de transcripción de este gen se encuentra regulada por la interacción de NF- κ B con dos sitios de reconocimiento localizados en la región del promotor génico (Li y Schmidt 1997). Así, una acumulación tisular excesiva de AGE provocaría la activación de NF- κ B, lo cual tendería a aumentar la expresión celular de RAGE, exacerbando aún más los efectos deletéreos de estas proteínas modificadas.

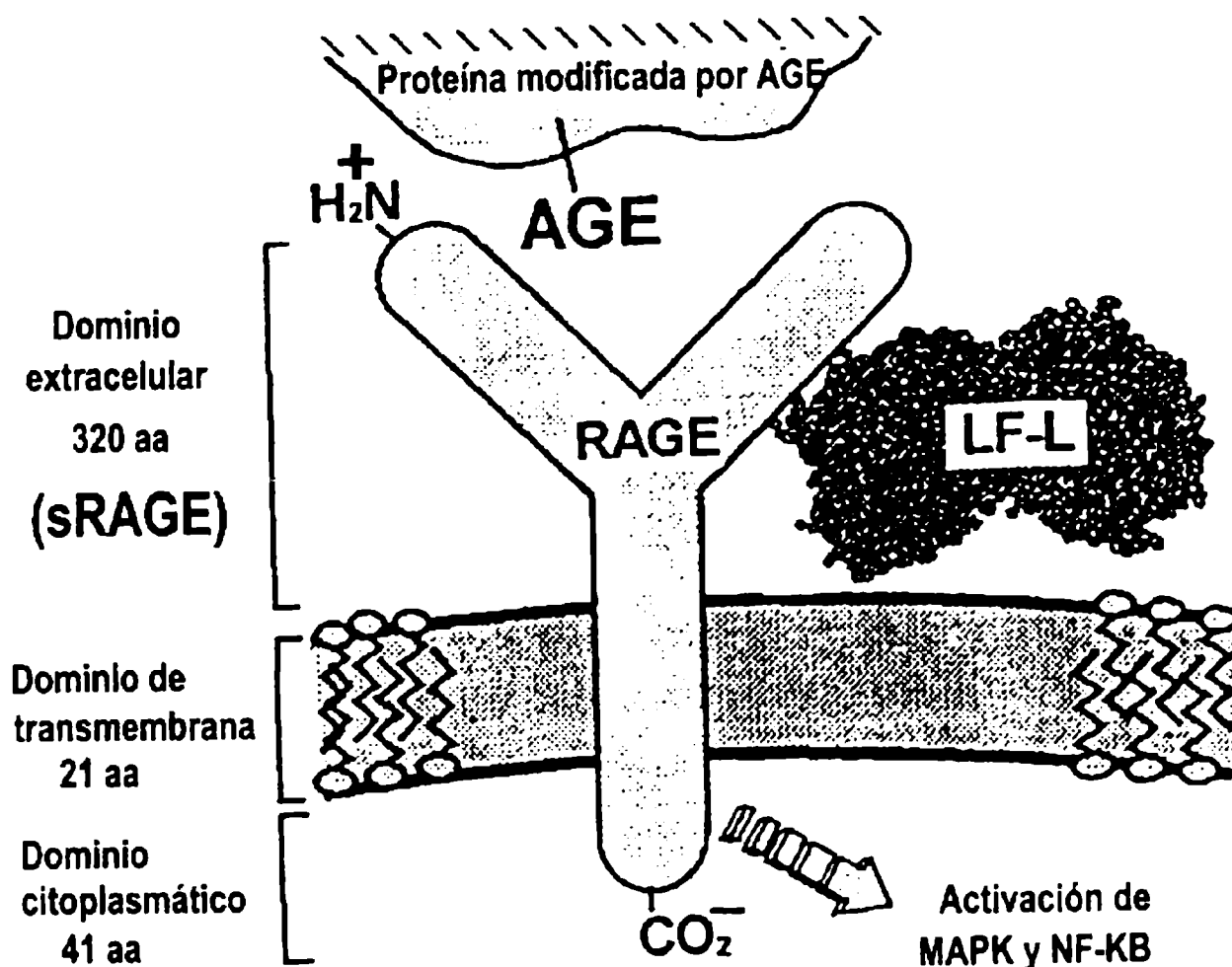


Figura 10. Estructura propuesta para el complejo formado entre RAGE (un receptor descrito para los productos de glicosilación avanzada de proteínas) y LF-L (proteína simil-lactoferrina). El mecanismo de transducción de señales propuesto involucra la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, a través del reclutamiento de la quinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK).

- 2. Receptor de AGE tipo 1 u oligosacaril-transferasa-48 (OST-48).** En 1991, Yang y col. aislaron una proteína de membrana que unía específicamente AGE-proteínas con una $K_{af} = 2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Posteriormente, el análisis de secuencia amino-terminal de esta proteína aislada, demostró que se trataba de la subunidad de 48 kDa del complejo oligosacaril-transferasa (OST-48) (Li 1996). OST-48 es una proteína normalmente asociada con la membrana del retículo endoplásmico, que cataliza la transferencia de oligosacáridos de alta manosa hacia ciertos residuos de asparagina de diversas proteínas. Dada su localización preferencial en el retículo endoplásmico, no se ha precisado aún la función que cumple OST-48 en el reconocimiento de AGE-proteínas en la superficie celular. Por otro lado, la unión de AGE-proteínas a OST-48 tendería a estabilizarla sobre la membrana plasmática. El sitio de reconocimiento para AGE de esta proteína, probablemente coincide con su sitio de unión de oligosacáridos, con lo cual un exceso tisular de AGE inhibiría la glicosilación enzimática catalizada por el complejo OST, efecto que se ha asociado con el ingreso de la célula en apoptosis (Kelleher y Gilmore 1997). En coincidencia con estas observaciones, concentraciones elevadas de AGE son tóxicas para células endoteliales y pericitos en cultivo, y esta toxicidad puede ser bloqueada por el agregado de anticuerpos anti-OST-48 (Chibber 1997). Sin embargo, aún no se ha demostrado que OST-48 reconozca AGE-proteínas formadas *in vivo*, por lo cual se discute su función como receptor de AGE en condiciones fisiológicas.
- 3. Receptor de AGE tipo 2 o proteína 80K-H.** Recientemente se aisló una proteína de membrana, que era fuertemente unida por una matriz sobre la que se habían inmovilizado AGE-proteínas (formadas *in vitro*) como ligando de afinidad. Sin embargo, esta proteína de membrana purificada no era capaz de unir AGE-proteínas en un ensayo de *ligand-blot* sobre nitrocelulosa (Yang 1991). El análisis de secuencia amino-terminal demostró que la proteína en cuestión se trataba de 80K-H (Li 1996). 80K-H fue caracterizada inicialmente como un sustrato de la proteína-quinasa C (PKC) (Hirai y Shimizu 1990), y recientes investigaciones indican que la proteína 80K-H fosforilada estaría involucrada en mecanismos de transducción de señales entre ciertos receptores de factores de crecimiento (como el fibroblástico, FGFR) y la

cascada p21^{ras}/MAPK (Kanai 1997). Así, en lugar de ser un receptor para AGE propiamente dicho, 80K-H podría ser en realidad una proteína involucrada en la transducción de señales iniciadas por AGE (por ejemplo, entre RAGE y la cascada p21^{ras}/MAPK) (Thornalley 1998).

4. Receptor de AGE tipo 3 o Galectina-3. Se ha encontrado que la galectina-3 tiene afinidad específica por proteínas altamente modificadas por AGE *in vitro*, mostrando una $K_{af} = 3,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Vlassara 1995b). Galectina-3 es una lectina de tipo S de 30-35 kDa, con afinidad por β -galactósidos. Puede unir laminina y así facilitar la adhesión de monocitos y neutrófilos a la membrana basal y al endotelio (Woo 1990). La expresión de galectina-3 aumenta durante el proceso de maduración de monocitos a macrófagos (Liu 1995), encontrándose más incrementada aún en los macrófagos y células espumosas de las placas ateroscleróticas (Nachtigal 1998). Esto podría tener importancia dada la elevada concentración de AGE presente en los ateromas ricos en lípidos. Recientemente se ha descrito que el envejecimiento *per se* induce la expresión de Galectina-3 en los glomérulos renales, y que esta inducción dependiente de la edad se ve considerablemente incrementada en el estado diabético (Pugliese 2000). Asimismo, en este estudio se observó una expresión incrementada de Galectina-3 en células mesangiales cultivadas en un ambiente hiperglucémico y/o con agregado exógeno de AGE. Así, la acumulación renal de AGE (dependiente del envejecimiento o acelerado por Diabetes) podría regular la expresión local de Galectina-3 modificando la respuesta tisular a AGE, y/u otros efectos independientes de AGE mediados por dicha lectina. Sin embargo, se desconoce la relevancia fisiológica de la galectina-3 como receptor de AGE, ya que no se ha demostrado aún su afinidad por AGE-proteínas formadas *in vivo*.

5. Receptores scavenger. Los receptores *scavenger* son expresados principalmente por monocitos/macrófagos (incluidos células de Kupffer y de la microglía), células endoteliales y células musculares lisas. Estos receptores promueven la endocitosis de proteínas modificadas por procesos de oxidación, acilación y/o glicación, para su posterior degradación intracelular. Dichos receptores estarían involucrados en los mecanismos de inmunidad inespecífica del huésped (Krieger 1993), aunque también

podrían ser responsables tanto de la captación de LDL oxidadas por células espumosas en la aterosclerosis (Krieger 1993), como de la internalización de agregados de β -amiloide por células de la microglía en el síndrome de Alzheimer (Paresce 1996). Se ha encontrado que las proteínas modificadas por AGE *in vitro*, pueden ser reconocidas y ligadas en forma específica por los receptores *scavenger* de macrófagos, y que los AGE circulantes son aclarados del plasma principalmente a través de su unión a receptores *scavenger* de las células endoteliales y de Kupffer de los sinusoides hepáticos (Shinoda 1993, Araki 1995, Smedsrod 1997). Estos receptores también serían responsables de mediar la unión *in vitro* de macrófagos a colágeno de tipo IV sobre-modificado por AGE (Khoury 1994). Sin embargo, no se ha demostrado aún su afinidad por AGE formados *in vivo* sobre proteínas, por lo que su función fisiológica como receptores de AGE no está clara.

Fisiología del Hueso.

El hueso es un tejido rígido, formado por células que se encuentran incluidas dentro de una matriz intercelular dura y abundante. Esta matriz está compuesta por una fase proteica (mayoritariamente colágeno de tipo I) y una fase inorgánica (principalmente fosfato de calcio).

Las funciones del hueso incluyen: (1) soporte estructural para la acción mecánica de ciertos tejidos blandos, como la contracción muscular y la expansión pulmonar; (2) protección de partes blandas como el encéfalo; (3) provisión de un entorno protegido para tejidos especializados como el hematopoyético (médula ósea); y (4) reservorio de minerales, a través del cual los sistemas endócrinos regulan los niveles de calcio y fósforo en el líquido extracelular corporal (Encyclopædia Britannica 1999).

Composición química y propiedades físicas.

En el adulto las células óseas representan sólo el 1-5% del volumen total del hueso, mientras que proporcionalmente la matriz intercelular es mucho más abundante. El componente proteico de dicha matriz está constituido principalmente por hebras de colágeno de tipo I formando fibrillas, a las cuales se asocian otras proteínas no colagenosas. Estas proteínas no colagenosas constituyen el 10% del contenido proteico total de la matriz ósea. Poseen varias funciones, tales como promover la formación de las fibrillas colagenosas, favorecer la mineralización de las mismas, fortalecer la interacción entre las células y la matriz ósea, y proveer señales para el remodelamiento óseo. Entre estas proteínas no colagenosas se encuentran algunas de adhesión celular con peso molecular mayor de 400 kDa, como la fibronectina; y otras de bajo peso molecular, como la osteocalcina, que es una proteína ligadora de Ca^{2+} de 6 kDa. La osteocalcina podría participar tanto en el proceso de mineralización como en la resorción ósea. Otras proteínas no colagenosas ácidas con secuencias de reconocimiento celular, como el biglicano, decorina, sialoproteína ósea y osteopontina, poseen contenidos relativamente elevados de carbohidratos por lo que se suelen denominar glicoproteínas o proteoglicanos. Muchas de estas proteínas se encuentran altamente fosforiladas, lo cual les permite ligar iones de Ca^{2+} y así regular parcialmente el proceso de mineralización. La matriz extracelular ósea constituye además un verdadero depósito de factores de

crecimiento y de sus proteínas ligadoras, lo cual tiene importantes consecuencias sobre el metabolismo de este tejido (Raisz 1998).

Sobre y entre las fibrillas de colágeno, existen innumerables cristales espiculares, compuestos mayoritariamente por calcio y fosfato en una proporción de (1,4 - 2,1) : 1. Cuando se deposita inicialmente, este mineral es cristalográficamente amorfo, pero con la madurez ósea se transforma principalmente en hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Sin tener en cuenta al agua asociada directamente con las estructuras celulares, se estima que sólo el 8% del volumen total del hueso está constituido por agua libre. Como resultado, la difusión de moléculas hacia y desde la matriz intercelular es lenta, a diferencia de otros tejidos con mayor contenido de agua.

Los cristales inorgánicos son responsables de la dureza, rigidez, y gran resistencia a la compresión que posee el hueso. Sin embargo, al igual que otros materiales cristalinos, no soportan esfuerzos de tensión. Esto se debe a la tendencia de dichos esfuerzos a acumularse alrededor de los defectos cristalinos, provocando la propagación de estos defectos. Por otro lado, las fibrillas de colágeno presentan gran elasticidad y resistencia a la tensión, pero son relativamente compresibles. De esta manera, en el hueso la asociación de un material rígido pero frágil (cristales) con una matriz elástica (fibrillas) impide la propagación de fallas de tensión en la fase cristalina, acercándose así a la resistencia de un cristal ideal. En este sentido, la resistencia a la compresión y tensión de la matriz ósea bifásica es similar a la del aluminio, pero con un peso por unidad de volumen considerablemente menor (Encyclopædia Britannica 1999).

Morfología y estructura celular ósea.

El tejido óseo puede adoptar una variedad de configuraciones, de acuerdo con la función específica que posee. Así, puede formar estructuras anchas y planas (como la escápula) para el anclado de grandes masas musculares; o estructuras tubulares huecas de paredes gruesas (como el fémur y radio), cuando es usado para soportar el peso del organismo o como brazo de palanca.

En todos los huesos existe una cubierta externa denominada **corteza**, la cual es lisa, densa, continua y de espesor variable. El interior óseo en algunos casos se organiza en una serie de placas y espículas entrecruzadas, encerrando espacios que contienen

vasos sanguíneos y médula ósea. Este tipo de hueso con apariencia de panal de abejas se denomina **canceloso o trabecular**, y las placas y espículas se conocen como **trabéculas**. En el hueso canceloso maduro, las trabéculas se disponen en forma paralela a las direcciones de los principales esfuerzos de tensión y compresión. De esta forma, proveen máxima rigidez con el mínimo material posible (**Figura 11**).

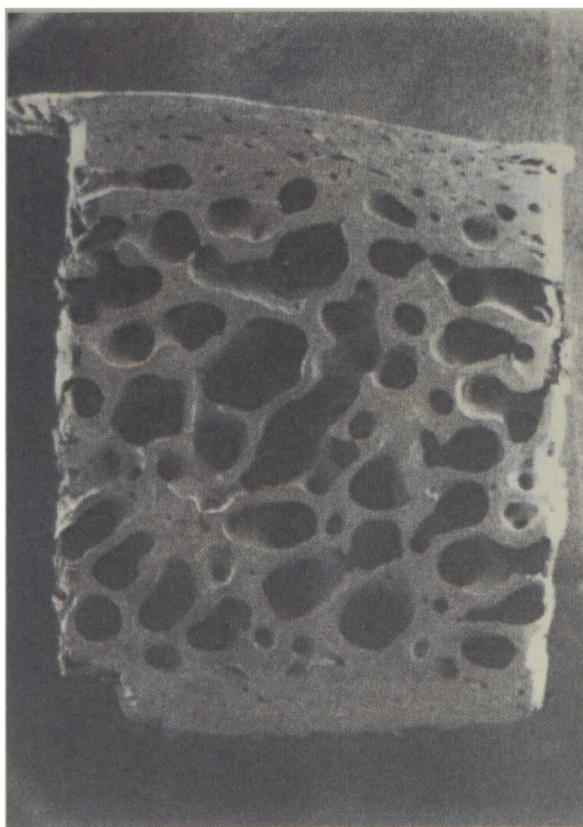


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de una biopsia de cresta iliaca, mostrando el hueso cortical en sus partes superior e inferior, y hueso canceloso o trabecular en su porción interna.

Ciertos huesos como las vértebras (que soportan principalmente esfuerzos de compresión y tensión) poseen una corteza relativamente delgada, logrando la rigidez estructural necesaria por medio de un sistema trabecular particularmente reforzado. Por otro lado, huesos como el fémur, sujetos mayormente a esfuerzos de corte, torsión y doblado, poseen cortezas gruesas y una configuración tubular. La cavidad central de dicha estructura tubular es continua, y se encuentra ocupada por la médula ósea. El material cortical de estos huesos tubulares se denomina **hueso compacto** (ver mas abajo), y se diferencia estructuralmente del hueso canceloso.

Los huesos largos de brazos y piernas poseen una serie de características comunes. La región central del hueso (**diáfisis**) es la mas claramente tubular, pero en

sus extremos se ensancha y adopta una estructura interna mayormente cancelosa. Esta región (**metáfisis**) sirve para transferir cargas desde la superficie articular hacia la diáfisis. Al final del hueso largo, existe una región conocida como **epífisis** con estructura cancelosa, que sirve de sostén para la superficie articular. Durante el período de crecimiento óseo, la epífisis se encuentra separada de la metáfisis por una placa cartilaginosa llamada **placa de crecimiento** (Encyclopædia Britannica 1999).

El hueso se separa de los tejidos adyacentes por medio de tres envolturas (Schenk 1993). El **periostio** recubre la superficie externa de los huesos, con excepción de las superficies articulares y las inserciones de tendones y ligamentos. Su estructura puede variar desde delicadas placas de tejido conectivo laxo, hasta membranas densas y fibrosas. El periostio es rico en células osteoprogenitoras (mesenquimatosas), especialmente en las cercanías de los vasos sanguíneos superficiales. El **endostio** recubre la cavidad central medular de los huesos tubulares largos. Las células que lo componen pueden derivar del estroma medular, o ser osteoblastos en reposo. La **envoltura Haversiana** recubre los canales intracorticales o Haversianos, presentes en el tejido cortical compacto de los huesos tubulares largos (ver mas abajo).

En el hueso existen cuatro tipos celulares característicos, que se pueden localizar sobre o dentro del material intercelular.

1. **Células mesenquimatosas**, llamadas también células progenitoras osteogénicas, que bajo estímulos adecuados pueden dar lugar a la formación de osteoblastos. Estas células residen en el tejido conectivo existente entre las trabéculas, a lo largo de los canales vasculares y en el tejido fibroso condensado exterior del hueso. Poseen varias propiedades características de las células germinales, tales como el potencial de auto-replicación y la capacidad de diferenciación. La transformación de las células progenitoras en osteoblastos activos, transcurre en una serie de etapas: (a) proliferación de las células precursoras, (b) diferenciación en osteoblastos maduros, (c) activación de la producción de matriz extracelular proteica y (d) mineralización de la misma. Estas etapas se pueden estudiar *in vivo* en cámaras de difusión, o *in vitro* en sistemas de cultivo celular (Schenk 1993).

2. **Osteoblastos:** son responsables de la síntesis y aposición de proteínas de matriz en el material intercelular nuevo de las superficies óseas, y en muchos casos inician y promueven el proceso de mineralización de dicha matriz. La actividad de formación ósea de los osteoblastos es muy variable: algunas células tienen aspecto columnar, cilíndrico o cuboide, y producen una gran cantidad de matriz en una superficie relativamente pequeña; otras son aplanadas, y sintetizan menos matriz sobre una superficie considerablemente mayor. Sin embargo, todos los osteoblastos diferenciados comparten ciertas características comunes. Así, siempre se disponen en monocapa sobre las superficies de formación ósea pero, en contraste con un epitelio verdadero, el espacio intercelular lateral no se encuentra sellado por uniones estrechas, sino que existen uniones tipo *gap*. Esto significa que los osteoblastos no ejercen un control estricto sobre el intercambio iónico entre el líquido extracelular y el tejido óseo, pero la presencia de uniones *gap* facilita la comunicación entre osteoblastos vecinos que actúan así como un verdadero sincicio funcional. Los osteoblastos maduros poseen una densa red de retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi prominente, y una polaridad funcional evidente: las proteínas de matriz se secretan sólo hacia la interfase hueso-osteoblasto. La mineralización de esta matriz proteica u osteoide no es inmediata, y este retraso temporal implica que siempre existe una capa de osteoide no mineralizado de espesor variable, por debajo de los osteoblastos (**Figura 12**). Estas células sintetizan significativamente más colágeno de tipo I y fosfatasa alcalina que otras células de origen mesenquimatoso. Algunas proteínas, como Cbfa-1 (un factor de transcripción) y la osteocalcina (inhibidor de la función osteoblástica), son producidas exclusivamente por los osteoblastos. Otras, como la osteopontina, son secretadas también por otros tipos celulares. Los osteoblastos maduros tienen una capacidad limitada de producción de matriz extracelular proteica, por lo cual la formación ósea se perpetúa en el tiempo con la llegada de nuevas poblaciones osteoblásticas a la superficie del hueso. Luego de que han completado su período de formación acelerada de matriz, los osteoblastos pueden quedar atrapados por el material intercelular para formar osteocitos, entrar en apoptosis, o convertirse en células aplanadas de revestimiento, las cuales recubren una gran proporción de la superficie ósea con una delgada capa

citoplasmática. Estos osteoblastos de revestimiento parecen ser importantes en la regulación de la resorción ósea mediada por factores sistémicos y locales, a través de varios mecanismos. Así, por un lado su contracción activa expone porciones de la matriz ósea. Por otro lado, la acción de ciertas hormonas y citoquinas pueden aumentar la producción osteoblástica de colagenasa, de otras metaloproteinasas, y del activador del plasminógeno. Estas proteasas degradan entonces la capa de osteoide no mineralizado, que normalmente bloquea el acceso de los osteoclastos a la matriz ósea mineralizada. Finalmente, los osteoblastos frente a ciertos estímulos producen factores locales, incluyendo citoquinas, prostaglandinas y factores de crecimiento, que pueden actuar directamente sobre los osteoclastos promoviendo la resorción ósea. De hecho, el contacto directo entre osteoblastos y las células hematopoyéticas es un paso necesario en la formación de osteoclastos (ver mas abajo). Los osteoblastos también influyen sobre el desarrollo y el mantenimiento normal de la médula ósea, dado que son una fuente importante de factores de crecimiento y citoquinas que pueden actuar sobre las células hematopoyéticas (Schenk 1993, Ducky 2000).



Figura 12. Microfotografía electrónica de calvaria de rata mostrando (a) osteoblastos maduros con su retículo endoplásmico rugoso denso y un aparato de Golgi prominente; (b) un osteocito inmerso en la matriz ósea mineralizada; y (c) una célula menos diferenciada que podría ser un preosteoblasto.

3. **Osteocitos:** como se ha mencionado, son osteoblastos que han quedado inmersos dentro del material intercelular. Estas células residen en cavidades (**lagunas**), y se comunican con otros osteocitos y con los osteoblastos de las superficies óseas por medio de numerosas extensiones citoplasmáticas filamentosas, que ocupan canales largos y sinuosos llamados **canalículos (Figura 13)**. En las superficies de contacto entre dos extensiones citoplasmáticas adyacentes se encuentran uniones tipo *gap*, que permiten el transporte intercelular de moléculas pequeñas. Este mecanismo implica la existencia de un sistema de transferencia de información entre los osteocitos interconectados, asegurando que su respuesta frente a estímulos diversos sea en forma concertada. Los osteocitos y su red de prolongaciones citoplasmáticas están organizados de tal manera, que esencialmente no existe porción de tejido óseo que se encuentre a más de una fracción de micrón de distancia de una célula o de sus extensiones. De hecho, de los aproximadamente 1200 m² de superficie anatómica celular existente en el esqueleto de un hombre adulto, la superficie de las lagunas y canalículos da cuenta de por lo menos un 99%. En esta superficie osteocítica tiene lugar una resorción y deposición ósea microscópicamente imperceptible, pero que tiene una importante función dual: regular la concentración plasmática de calcio, y renovar el material óseo. Esta renovación, aunque lenta y reducida al microentorno del osteocito, es fundamental porque previene cambios en las propiedades físicas de los materiales involucrados, como por ejemplo el crecimiento de imperfecciones en los cristales de hidroxapatita, o alteraciones funcionales de la matriz extracelular proteica envejecida (Schenk 1993, Encyclopædia Britannica 1999).

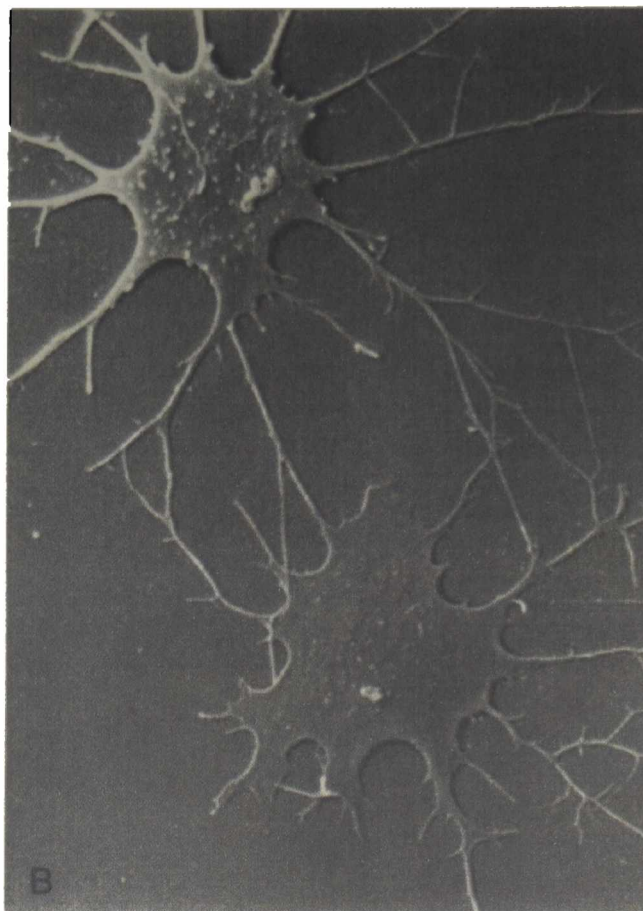


Figura 13. Células obtenidas del hueso de aves: osteocitos y sus conexiones citoplasmáticas.

4. **Osteoclastos:** son células multinucleadas de gran tamaño de origen hematológico, responsables directos de la resorción ósea por ataque químico y enzimático sobre la superficie del hueso. Las células progenitoras hematopoyéticas, bajo el efecto del factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF) y del factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF), pueden proliferar para luego diferenciarse hacia la formación de monocitos o de preosteoclastos. La progresión hacia preosteoclastos va a depender de la asociación entre el receptor RANK (expresado por células de estirpe macrofágicas) y su ligando RANKL (expresado por células osteoblásticas), y de la acción de múltiples factores locales y sistémicos, tales como 1,25-dihidroxi-vitamina D₃, prostaglandinas, IL-1, IL-6 y TNF (ver mas abajo). *In vivo*, los preosteoclastos mononucleares se adhieren a la superficie ósea mineralizada, y por fusiones repetidas entre sí mismos forman osteoclastos multinucleados (en general con 10-20 núcleos). En los osteoclastos, la incorporación de nuevos núcleos por este mecanismo de fusión permanece funcional durante todo su período de actividad resortiva. A medida que los osteoclastos se vuelven inactivos,

sus núcleos se hacen apoptóticos. Así, las hormonas que favorecen la resorción ósea retardarían dicha apoptosis, mientras que los inhibidores de resorción podrían favorecerla. El gran tamaño de los osteoclastos les permite aislar espacialmente una porción de la superficie ósea, y así lograr un microambiente local capaz de disolver los cristales de hidroxiapatita y degradar la matriz proteica (**Figura 14**). El aparato resortivo del osteoclasto se encuentra constituido por una región central vellosa de la membrana plasmática, que secreta protones y enzimas proteolíticas (como catepsina-K) hacia la porción aislada de la superficie ósea, rodeada por una zona circular más clara. Esta última zona está formada por un anillo de proteínas contráctiles del citoesqueleto unidas a receptores integrinas de la membrana celular. A su vez, el osteoclasto secreta osteopontina y sialoproteína ósea, que actúan de puentes entre los receptores integrinas de la zona anular (en especial $\alpha_5\beta_3$) y la matriz expuesta del hueso. Este mecanismo permite tanto el anclado celular como el sellado y aislamiento de la porción ósea en cuestión. Durante el proceso de resorción, la desmineralización se logra a través de la acidificación del microambiente extracelular aislado, un mecanismo mediado por una H^+ -ATPasa vacuolar de la región vellosa. El pH intra-osteoclástico se mantiene por medio de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- , presente en la membrana anti-resortiva. Finalmente, la electroneutralidad celular se preserva a través de un canal de Cl^- en la región vellosa. El resultado neto de estos transportes iónicos es la secreción activa de HCl hacia el microambiente resortivo, dando un pH de $\cong 4,5$. Este entorno ácido solubiliza los cristales de hidroxiapatita. Posteriormente, la matriz orgánica desmineralizada es degradada por una proteasa lisosomal secretada, la catepsina-K. Los productos de degradación son endocitados por el osteoclasto, y exocitados en la superficie anti-resortiva de la célula. En el hueso trabecular los osteoclastos normalmente resorben hasta una profundidad determinada, y luego se desplazan en forma lateral para formar placas de resorción irregulares llamadas **lagunas de Howship** (Raisz 1998, Teitelbaum 2000).

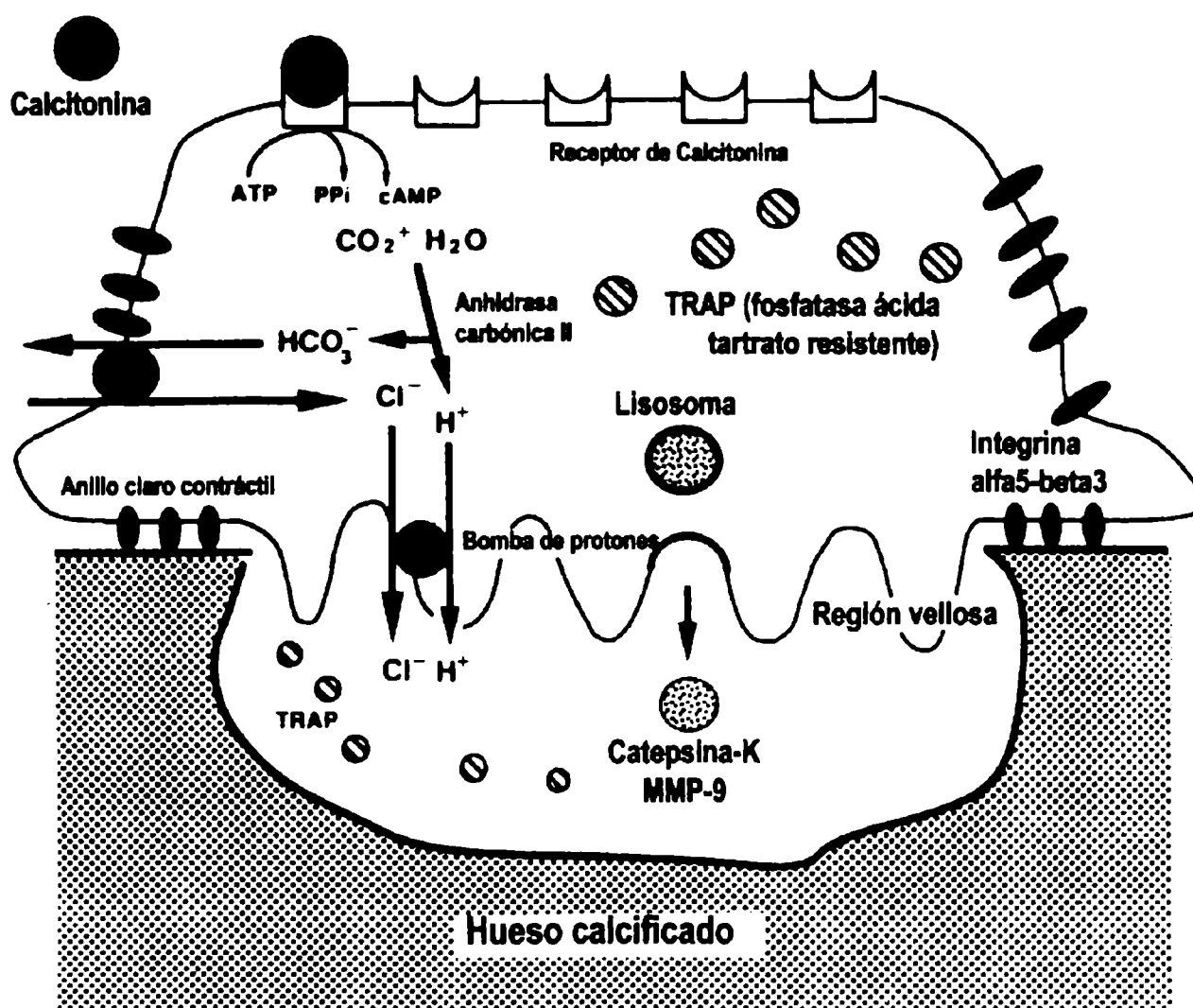


Figura 14. Elementos funcionales de un osteoclasto completamente diferenciado.

El tejido óseo se puede dividir en dos categorías, de acuerdo con la disposición geométrica general que adoptan las fibrillas colagenosas y los osteocitos. Cuando las fibrillas y los ejes largos de los osteocitos se orientan al azar, el hueso se denomina **primario**. Esta configuración es típica del hueso nuevo o recientemente formado. Por el contrario, en el hueso **lamelar** tanto las fibrillas como los osteocitos se organizan en forma de capas claramente delimitadas, de escasos micrones de espesor. De una capa a la siguiente, la orientación principal de las fibrillas varía en aproximadamente 90°. Esta disposición general es típica del hueso maduro (canceloso y compacto). Sin embargo, el tejido óseo cortical compacto de los huesos tubulares largos posee una estructura lamelar aún más compleja: se encuentra organizado en unidades funcionales llamadas **osteones** o **sistemas Haversianos**. Los osteones están formados por elementos lamelares cilíndricos concéntricos de varios milímetros de largo por 0,2-0,3 mm de diámetro. En el centro del osteón existe un **canal Haversiano**, que contiene uno o más vasos sanguíneos derivados de la arteria nutricia del canal medular óseo. Recubriendo la

superficie externa del osteón se encuentra un límite funcional y estructural denominado **línea cementada**. Esta línea o cubierta sirve como barrera difusional, y como punto de apoyo para la aposición de nuevo tejido óseo. Las extensiones citoplasmáticas de los osteocitos no pueden atravesar la línea cementada, por lo cual esta barrera constituye la cubierta externa de una verdadera unidad nutricional (**Figura 15**).



Figura 15. Microfotografía de la sección transversal de un osteón.

Así, los osteocitos ubicados sobre lados opuestos de una línea cementada derivan sus nutrientes de diferentes canales Haversianos vasculares. Existen a su vez, canales de comunicación vascularizados transversales llamados **canales de Volkmann**, que sirven de nexo entre osteones adyacentes, y de conexión entre los vasos sanguíneos de los canales Haversianos (derivados de la arteria nutricia) y los del periostio (irrigados en forma independiente). Así, en caso de una obstrucción de la arteria nutricia, la circulación del periostio es capaz de abastecer ambos sistemas. Las epífisis se encuentran irrigadas por un tercer sistema vascular, el cual consiste en un anillo de arterias que ingresan al hueso a través de una banda circular delimitada por la placa de crecimiento y la cápsula articular. En un individuo adulto, este sistema vascular se conecta con los otros dos (lecho periostial y arteria nutricia) a través de la unión metáfisis / epífisis. Sin embargo, dicha conexión vascular es inexistente en un niño en crecimiento activo, en el cual no se ha cerrado aún la placa de crecimiento. En este caso, la irrigación

de las epífisis es la única fuente nutricional capaz de permitir el crecimiento esquelético lineal (es decir, de las placas de crecimiento), por lo que su integridad es fundamental para el desarrollo del niño (Encyclopædia Britannica 1999).

Mecanismos de formación ósea.

La formación ósea, llevada a cabo por los osteoblastos, es un proceso que depende de dos requisitos fundamentales: la existencia de una circulación sanguínea abundante, y de un soporte mecánico adecuado. Así, un transporte de oxígeno defectuoso puede alterar la expresión génica de los osteoblastos, lo cual provoca la formación de tejido fibroso o fibrocartilaginoso en lugar de óseo. Por otro lado, la elaboración y mineralización del hueso organizado requiere de un soporte mecánico, es decir una base sólida de apoyo (Schenk 1993).

En el embrión, el desarrollo esquelético comienza con la condensación del tejido mesenquimatoso para formar un molde cartilaginoso. Posteriormente, el cartílago se puede convertir en hueso a través de dos mecanismos diferentes, que se mantienen activos durante el período de desarrollo embrionario, y post-natalmente a lo largo de la etapa de crecimiento somático del individuo (Raisz 1998):

1. **Formación ósea intramembranosa o directa:** Este mecanismo es típico de varios huesos planos del cráneo, escápula, íleo, mandíbula, y de la aposición ósea en el periostio de los huesos largos. En este mecanismo, el tejido conectivo de origen mesenquimatoso se condensa en forma directa para formar hueso primario en la cercanía de los vasos sanguíneos. Este tejido primario rápidamente se reorganiza en hueso lamelar.
2. **Formación ósea endocondral:** Este mecanismo es mucho más prevalente que el anterior, ya que se halla involucrado en el crecimiento longitudinal de los huesos largos y de las vértebras. En este caso el soporte mecánico utilizado es cartílago mineralizado, el cual se recubre y eventualmente es sustituido por tejido óseo. Así, los condrocitos de la placa de crecimiento inicialmente proliferan y se hipertrofian. Esto es seguido por una degradación parcial de la matriz cartilaginosa, que entonces se mineraliza formando espículas. A continuación, el cartílago es invadido por vasos

sanguíneos, los condrocitos mueren por apoptosis, y las espículas de cartílago mineralizado se tapizan con osteoblastos que forman una cubierta de hueso primario. Estas estructuras mixtas de cartílago y hueso se resorben y reemplazan por tejido óseo canceloso de organización lamelar (**Figura 16**).

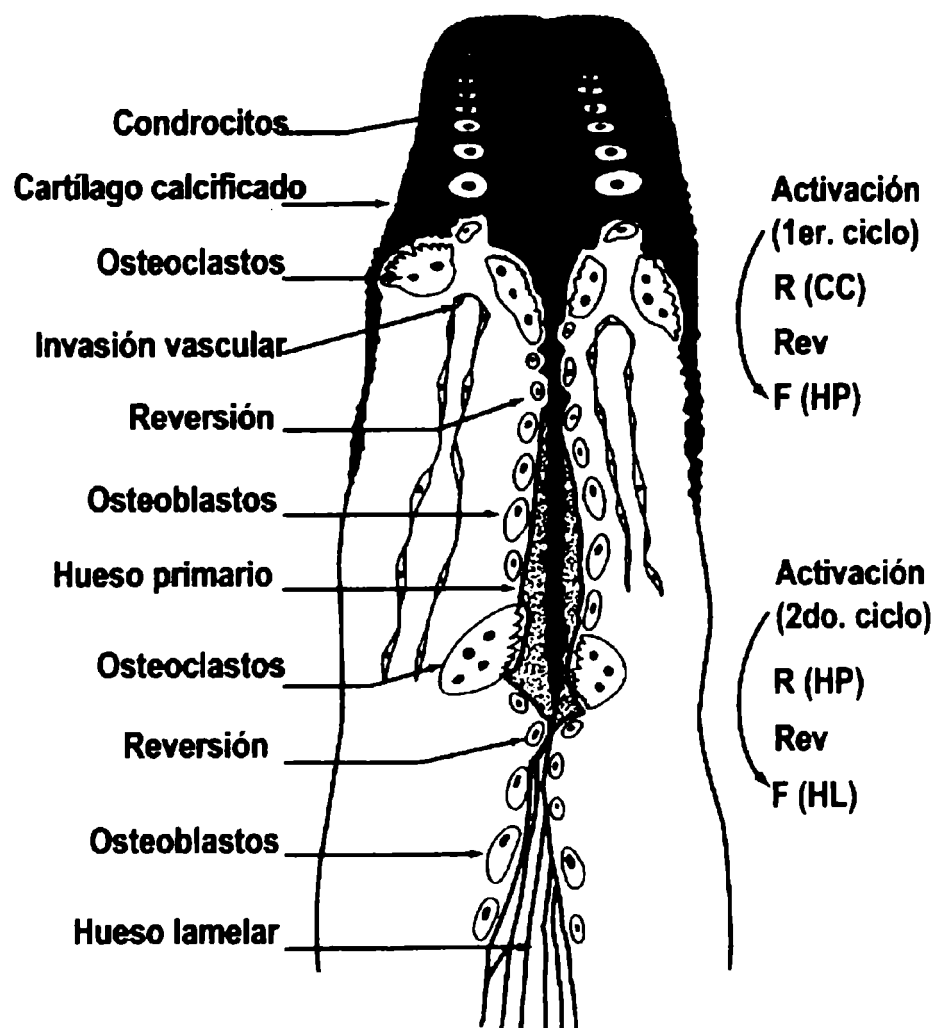


Figura 16. Etapas de la formación ósea endocondral. R, resorción; Rev, reversión; F, formación; CC, cartílago calcificado; HP, hueso primario; HL, hueso lamelar.

Modelado y remodelado óseo.

Luego de que se han cerrado las placas de crecimiento epifisarias, el tejido óseo continúa manteniendo su funcionalismo e integridad a través de dos mecanismos: modelado y remodelado óseo (Schenk 1993). Estos términos a menudo se han utilizado indistintamente, aunque se refieren a procesos óseos claramente diferenciados. En el tejido óseo cortical compacto de los huesos largos, el **modelado** se refiere al cambio en la forma de la diáfisis que se logra por la coordinación entre aposición en el periostio y resorción en el endostio; mientras que **remodelado** describe el recambio de tejido envejecido por hueso nuevo, e involucra el acoplamiento témporo-espacial entre

resorción y formación ósea en los osteones individuales. Por otro lado, en el hueso canceloso o trabecular el **remodelado** implica la formación de lagunas de Howship (por resorción) seguida de formación osteoblástica, resultando en una renovación del material trabecular que tiende a mantener la integridad del hueso; pero el **modelado** se asocia con cambios dirigidos en la disposición espacial de las trabéculas (por ejemplo, reorientación en respuesta a modificaciones en la carga mecánica del hueso).

El remodelado es un proceso continuo cuya función principal es de reparación, especialmente en huesos que se encuentran expuestos a estrés mecánico. Por otro lado, este proceso forma parte integral del sistema de regulación del calcio en el líquido extracelular corporal. El remodelado óseo es tan extenso y activo, que se ha estimado que renueva completamente al esqueleto adulto cada 10 años (Manolagas 2000). En un individuo maduro existen en todo momento entre 1 y 2 millones de sitios microscópicos de remodelado óseo, en cada uno de los cuales la resorción osteoclástica (que tarda aproximadamente 3 semanas por sitio) es seguida de un periodo de formación osteoblástica de unos 3 a 4 meses de duración (**Figura 17**).

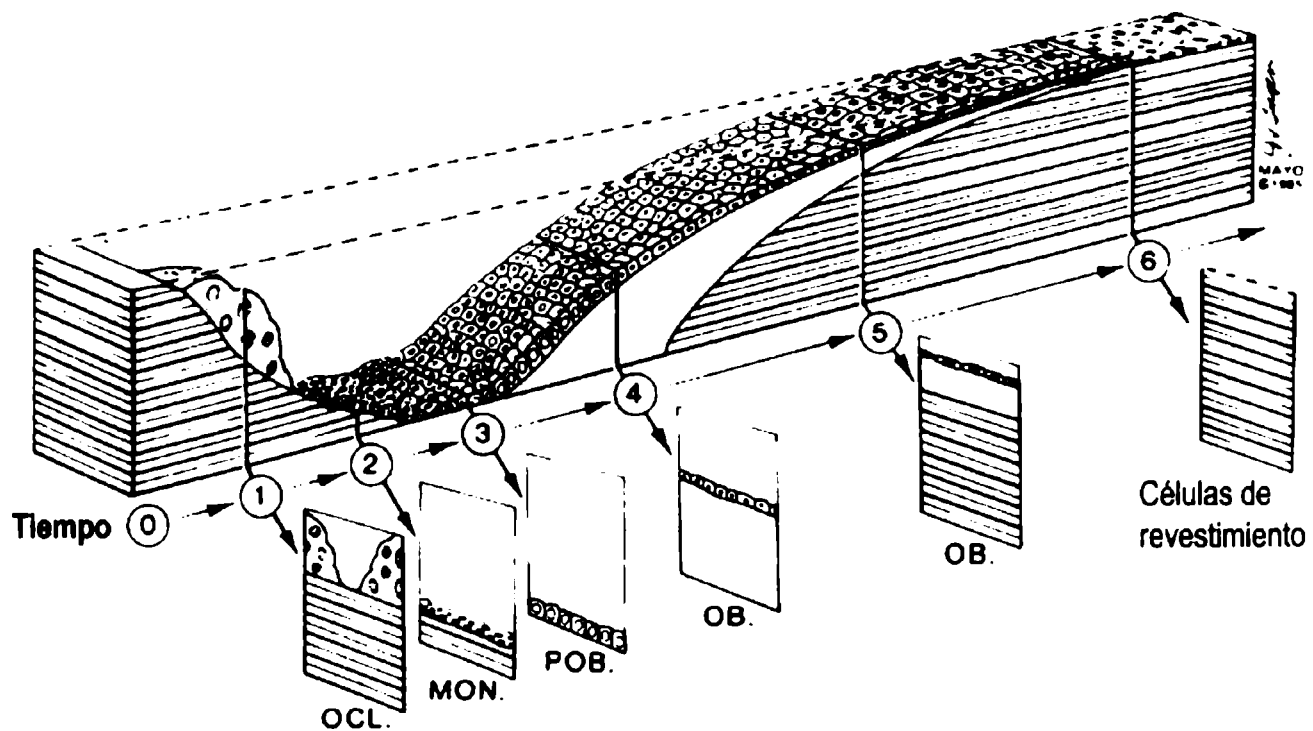


Figura 17. Esquema de las etapas del remodelado en el hueso trabecular humano. 1, resorción temprana con osteoclastos (OCL); 2, resorción tardía con células mononucleares (MON); 3, fase de reversión con preosteoblastos (POB); 4, formación temprana de matriz con osteoblastos (OB); 5, formación ósea tardía con mineralización; 6, final del remodelado con reversión de los osteoblastos a células de revestimiento.

En los adultos jóvenes la destrucción y formación ósea se encuentran mayormente balanceadas. Sin embargo, luego de los 40 años de edad la resorción comienza a superar a la formación, provocando pérdidas netas en la masa ósea locales y/o sistémicas. Se estima que por cada 10% de masa ósea que se pierde, aumenta al doble la probabilidad de fracturas. Tanto el acoplamiento témporo-espacial como el balance (o desbalance) entre la resorción y formación ósea, se encuentran sujetos a regulación por la interacción de las células del hueso con distintos componentes de la matriz extracelular, por factores solubles homeostáticos centrales y locales, y por la utilización mecánica del hueso (Teitelbaum 2000).

Matriz extracelular y biología celular ósea. (Ng 1997, Teitelbaum 2000)

La interacción entre las células y la matriz extracelular (MEC) es un modulador importante de los procesos de proliferación y diferenciación celular. Así, además de proveer un soporte mecánico sobre el cual las células pueden adherirse y migrar, la MEC influye directamente sobre la arquitectura, movimiento y expresión génica celulares, e indirectamente sobre la respuesta celular a diversos estímulos externos solubles.

En líneas generales, la adhesión celular a la MEC está mediada por cuatro familias de receptores: cadherinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, selectinas e integrinas. Una secuencia consenso común, Arg-Gly-Asp (RGD), presente en la fibronectina, vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea, es reconocida por varios receptores de integrinas (por ejemplo, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_5\beta_3$). Aunque este tripéptido también se encuentra presente en la secuencia primaria del colágeno tipo 1 (la proteína extracelular mayoritaria en el hueso), pareciera ser que RGD no es importante para el reconocimiento de dicha proteína por las células óseas. De hecho, se ha encontrado que los osteoblastos reconocen al colágeno tipo 1 principalmente a través de la interacción entre el tetrapéptido Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA, presente en esta molécula de colágeno), y el receptor celular de integrinas $\alpha_2\beta_1$. De todas formas, cuando las células se adhieren a la MEC vía receptores integrinas, lo hacen en determinados puntos de contacto llamados adhesiones focales, los cuales sirven de anclaje para filamentos de actina y otros elementos intracelulares pertenecientes al citoesqueleto. Además de esta función estructural, las adhesiones focales se encuentran involucradas en la transducción de

señales intracelulares a través de la quinasa de adhesión focal (FAK). Esta es una tirosina-quinasa que, como respuesta a la interacción entre las integrinas y sus secuencias consenso, desencadena una serie de fosforilaciones de proteínas del citoesqueleto.

El colágeno de tipo I, componente proteico mayoritario de la MEC ósea y reconocido por ciertos receptores integrinas (principalmente $\alpha_2\beta_1$), actúa en forma paracrina y autocrina –junto con factores solubles locales y sistémicos- para dirigir la diferenciación de preosteoblastos. Así, el cultivo de preosteoblastos sobre una matriz de colágeno de tipo I induce *per se* cambios en la morfología celular, en la transducción de señales y en la expresión de varios genes. En este mismo modelo, la inducción de marcadores osteoblásticos se puede inhibir con el agregado de anticuerpos bloqueantes anti-integrina. Estas observaciones demuestran la importancia de las señales originadas en la MEC, como reguladores de la función osteoblástica diferenciada.

En el caso de los osteoclastos, el reconocimiento de la matriz ósea es controlado por receptores integrinas presentes en la zona anular clara de esta célula multinucleada. Las integrinas $\alpha_2\beta_1$ pueden participar de este proceso a través de su unión al colágeno de tipo I. Sin embargo, la molécula de adhesión mas importante parece ser el receptor de integrinas $\alpha_5\beta_3$, ya que además de favorecer el anclado del osteoclasto a la osteopontina y a otras proteínas de la matriz mineralizada que contengan la secuencia RGD, induce la reorganización intracelular del citoesqueleto que conduce a la formación de la membrana central vellosa, a través de la activación de quinasas del tipo de la FAK.

La MEC del hueso sufre un recambio constante como consecuencia de la actividad de diversas proteasas secretadas por osteoblastos y osteoclastos. Estas proteasas incluyen la catepsina-K y las metaloproteinasas de matriz (MMP). Estas últimas pueden ser reguladas a su vez por inhibidores tisulares específicos (TIMP). Las MMP, entre las cuales se encuentra la colagenasa, se secretan en forma latente requiriendo una proteólisis enzimática para su activación. En ciertas situaciones los osteoblastos pueden secretar colagenasa, la cual podría promover la resorción ósea al remover la capa de osteoide no mineralizado, brindándole así a los osteoclastos acceso a su sustrato: la matriz mineralizada. Otra clase de proteasas expresadas por los osteoblastos son los activadores del plasminógeno (PA y tPA). Estas enzimas, junto con

sus inhibidores específicos (PAI) y sus receptores de membrana plasmática, forman un sistema proteolítico de regulación compleja. Este sistema actúa en forma local, y se halla involucrado en los mecanismos de adhesión, migración e invasividad celular. La producción osteoblástica de PA y PAI se encuentra regulada tanto por factores sistémicos como la PTH, como por citoquinas de acción local. El PA convierte el plasminógeno en plasmina, que es una proteasa capaz de activar las MMP latentes por proteólisis. Estas MMP activas (por ejemplo, colagenasa) pueden actuar sobre las proteínas de matriz, lo cual tiene varias consecuencias: (a) como hemos visto, favorece la resorción ósea por degradación del osteoide no mineralizado; (b) libera y activa factores de crecimiento latentes secuestrados en la matriz como TGF β e IGF-I, así como sus proteínas ligadoras específicas LTBP e IGFBP (ver mas abajo); (c) permite la presentación de proteínas de matriz, o fragmentos crípticos de las mismas, a receptores celulares. Así, los múltiples sistemas de proteasas e inhibidores pueden jugar un papel importante en el acoplamiento entre la resorción y formación ósea.

Regulación de la resorción ósea. (Ng 1997, Raisz 1998, Teitelbaum 2000)

La resorción ósea es un proceso complejo, que se inicia con la proliferación de precursores osteoclasticos inmaduros (macrófagos), la determinación de estos precursores hacia células de fenotipo osteoclastico, y finalmente la degradación por osteoclastos maduros de las fases orgánica e inorgánica del hueso. Varias hormonas sistémicas ejercen un control global sobre este proceso, pudiendo actuar a través de la regulación de cualquiera de sus etapas. En el nivel local (es decir, en cada sitio de remodelado óseo), ciertas proteínas de membrana, citoquinas y factores de crecimiento funcionan como mediadores de esta regulación hormonal global.

En 1990 se observó por primera vez que la diferenciación de macrófagos a osteoclastos *in vitro* requiere la presencia de células del estroma medular u osteoblastos. Después de una década de confusión, en los últimos tres años se ha aclarado el panorama (**Figura 18**). Las células osteoblásticas expresan las dos moléculas que son necesarias y suficientes para promover la osteoclastogénesis: el factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF) y RANKL, el ligando de RANK (receptor para la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B). M-CSF, que es una proteína

secretada por los osteoblastos, se une a su receptor *c-fms* presente en la membrana de los macrófagos, promoviendo así la supervivencia y proliferación macrofágica. Sin embargo, la osteoclastogénesis precisa además un contacto directo entre los macrófagos y células de linaje osteoblástico. Es decir, la interacción entre RANKL (expresado en la membrana de osteoblastos) y RANK (expresado constitutivamente en la membrana de macrófagos). RANKL estimula a los precursores macrofágicos –previamente inducidos a proliferar por M-CSF- a diferenciarse hacia un fenotipo osteoclastístico. De hecho, se puede lograr la osteoclastogénesis *in vitro* en cultivos puros de macrófagos expuestos a distintas concentraciones de M-CSF y RANKL aislados. Por otro lado, los osteoblastos secretan una proteína llamada osteoprotegerina (OPG) que actúa como un receptor soluble de RANKL, y que compite con RANK por la unión a este ligando.

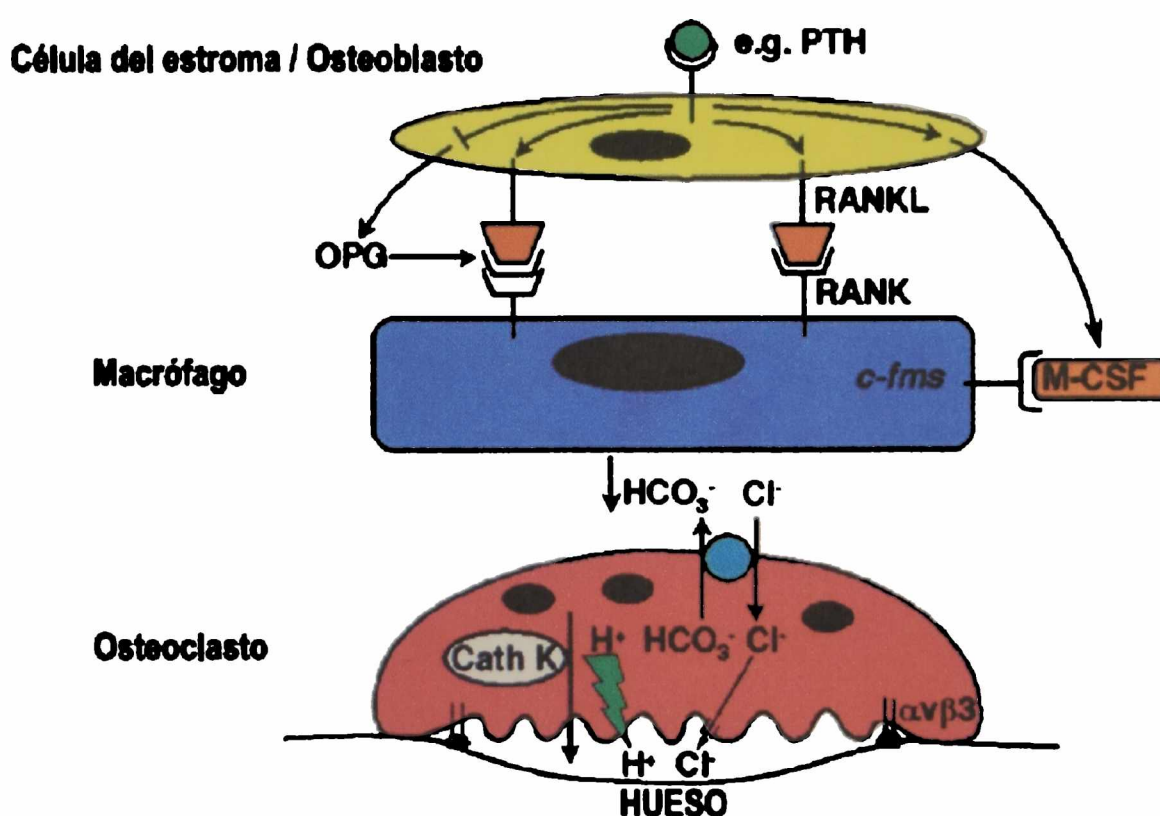


Figura 18. Mecanismos de osteoclastogénesis y resorción ósea por los osteoclastos. Las células del estroma y los osteoblastos expresan RANKL y M-CSF, que pueden ser regulados positivamente por moléculas osteoclastogénicas como la PTH. Por otro lado, PTH disminuye la expresión de OPG (osteoprotegerina). Las proteínas RANKL y M-CSF, interactuando con sus respectivos receptores sobre macrófagos (o sus precursores monocíticos), inducen tanto la progresión hacia osteoclastogénesis como la polarización del osteoclasto diferenciado a la superficie ósea, pero este proceso puede ser inhibido por OPG.

Así, es el balance entre la expresión osteoblástica del estimulador de la osteoclastogénesis RANKL, y del correspondiente inhibidor OPG, quien determina la cantidad de hueso que se resorbe. RANKL también es expresado por los linfocitos T activados, que pueden inducir la osteoclastogénesis y probablemente sean importantes en la destrucción articular observada en la artritis reumatoidea.

La **hormona paratiroidea (PTH)** es secretada por la glándula paratiroides en respuesta a disminuciones del calcio iónico extracelular. En este tipo de situación, la PTH estimula la resorción ósea. Sin embargo, su acción es indirecta ya que son los osteoblastos (y no los osteoclastos) quienes poseen receptores para PTH. Así, la PTH aumenta la expresión osteoblástica de RANKL y M-CSF, y disminuye la síntesis osteoblástica de OPG, incrementando en consecuencia la osteoclastogénesis.

La **vitamina D (1,25(OH)₂D₃)**, cuya acción primaria es aumentar la absorción intestinal de calcio y fósforo, es también un potente estimulador de la función osteoclástica liberando ambos iones de sus depósitos óseos. Esta acción también es indirecta, ya que se logra por un incremento en la expresión de RANKL en los osteoblastos. La síntesis renal de la vitamina D es estimulada por PTH. Un aumento en el calcio iónico del líquido extracelular, induce un descenso tanto en la PTH como en la vitamina D.

La **calcitonina** inhibe la resorción ósea a través de una acción directa sobre los osteoclastos (**Figura 14**), modulando los niveles intracelulares de cAMP. Sin embargo, parece jugar un papel secundario en la regulación del remodelado óseo en individuos adultos.

Los **glucocorticoides** ejercen un efecto bifásico sobre la resorción ósea. En bajas concentraciones aumentan la actividad osteoclástica, posiblemente a través de la inducción de un hiperparatiroidismo secundario provocado por una disminución en la absorción intestinal de calcio. Por el contrario, altas concentraciones de glucocorticoides aumentan la resorción ósea.

Las **hormonas tiroideas** estimulan la resorción ósea. La resorción aumentada que se observa en el hipertiroidismo, provoca un incremento secundario en la formación de hueso, lo cual induce un crecimiento esquelético global acelerado.

Los **esteroides sexuales** son muy importantes para el desarrollo y mantenimiento del esqueleto. Los estrógenos inhiben la resorción ósea, en parte por una inducción de la apoptosis osteoclástica a través de un mecanismo indirecto dependiente de la síntesis osteoblástica de TGF β . *In vivo*, la deficiencia de estrógenos o andrógenos se asocia con un aumento en la resorción ósea. Esto se debe a un incremento en el número de osteoclastos, impulsado por un aumento en la secreción de las citoquinas que regulan la generación de estas células multinucleadas (RANKL, M-CSF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11). De hecho, la producción de todas estas citoquinas es inhibida directa- o indirectamente por estrógenos, y se desreprime frente a un déficit estrogénico.

Las **interleuquinas 6 y 11 (IL-6 e IL-11)** pertenecen a la misma familia de citoquinas, y sus receptores comparten la misma subunidad para la transducción de señales. De esta forma, sus efectos celulares son similares. IL-6 e IL-11 son secretadas por células del estroma medular, monocitos / macrófagos, osteoclastos y osteoblastos, en respuesta a PTH, PTHrP, vitamina D, IL-1 y TNF α . Estas citoquinas por sí solas estimulan débilmente la formación de osteoclastos y la resorción ósea. Sin embargo, pueden potenciar en forma sinérgica la acción de otros factores como la PTH. Estos efectos son indirectos, ya que por ejemplo los osteoblastos –pero no los osteoclastos– poseen receptores para IL-6.

La **interleuquina 1 (IL-1)** es una citoquina inflamatoria secretada por monocitos / macrófagos y osteoblastos, y es el estimulador mas potente de la resorción ósea que se conoce. Actúa estimulando la producción osteoblástica de M-CSF (efecto inhibido por estrógenos, pero importante en mujeres post-menopáusicas), e incrementando la síntesis de prostaglandinas inductoras de la resorción ósea.

Los **factores de necrosis tumoral (TNF α y TNF β)** son potentes estimuladores de la resorción ósea. Son secretados por osteoblastos y monocitos / macrófagos en respuesta a IL-1, GM-CSF y lipopolisacárido. Su efecto sobre la osteoclastogénesis es indirecto, ya que actúan induciendo la expresión osteoblástica de RANKL y M-CSF. Esta acción, al igual que para IL-1, es inhibida por estrógenos por lo cual en estados de déficit estrogénico contribuye a la patogénesis de la osteopenia asociada.

Regulación de la formación ósea. (Ng 1997, Raisz 1998, Ducky 2000)

La formación ósea se encuentra directa- o indirectamente involucrada en los procesos óseos de crecimiento longitudinal, mineralización y remodelado. Todas estas funciones son muy difíciles de dilucidar *in vivo*. Sin embargo, estudios genéticos recientes han revelado que la diferenciación osteoblástica –y por lo tanto la formación ósea- está bajo el control de factores de crecimiento y de transcripción, en respuesta a estímulos centrales (endócrinos) y locales (**Figura 19**).

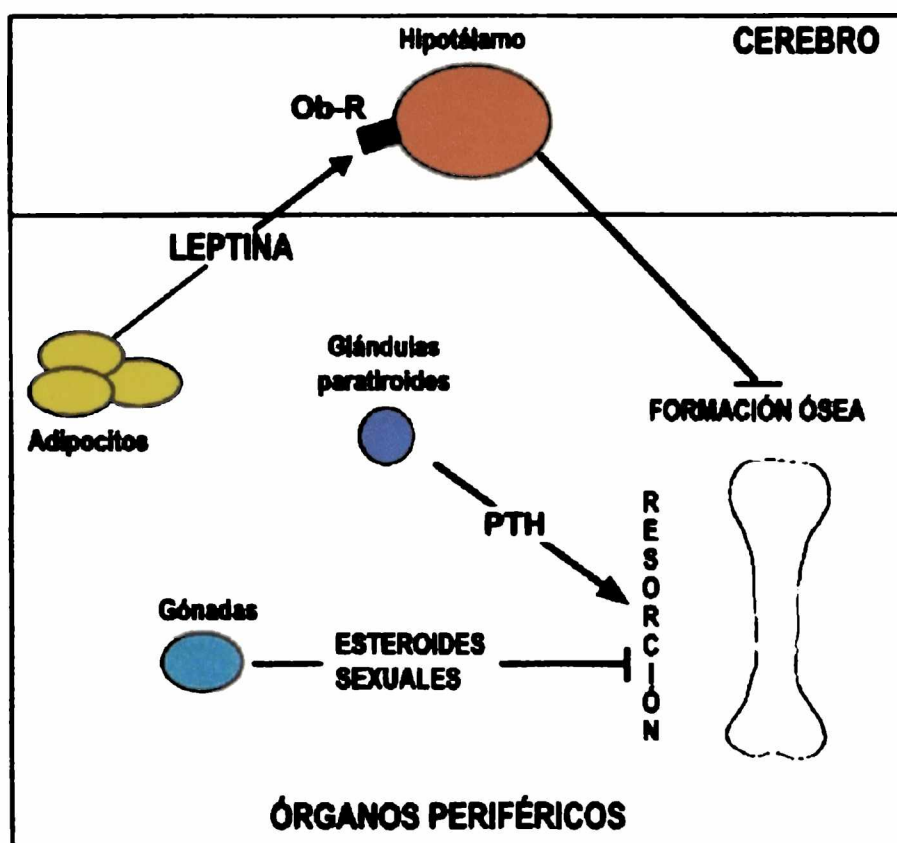


Figura 19. Control hormonal del remodelado óseo. Es conocido desde hace muchos años que los esteroides sexuales y la PTH controlan la resorción ósea. Más recientemente, se ha demostrado que la leptina puede regular la formación ósea a través de un mecanismo central.

(a) Control génico de la formación ósea.

En los últimos 5 años, se han buscado factores de transcripción que pudieran actuar como factores de diferenciación osteoblástica. Como resultado, se identificaron dos elementos cis-actuantes osteoblasto-específicos pertenecientes al promotor del gen de la osteocalcina: OSE1 y OSE2. Se descubrió luego que la proteína nuclear Cbfa1 se puede unir con alta afinidad a OSE2, identificando así a Cbfa1 como un factor de

transcripción osteoblasto-específico. Se ha encontrado que la expresión de *Cbfa1* está restringida a las células mesenquimatosas progenitoras de osteoblastos o condrocitos, manteniéndose su expresión luego en osteoblastos diferenciados pero no en condrocitos (Figura 20). En modelos de cultivo celular *Cbfa1* actúa como un activador de la transcripción, y su sobre-expresión puede inducir la expresión de genes osteoblasto-específicos en diferentes tipos celulares como fibroblastos y mioblastos.

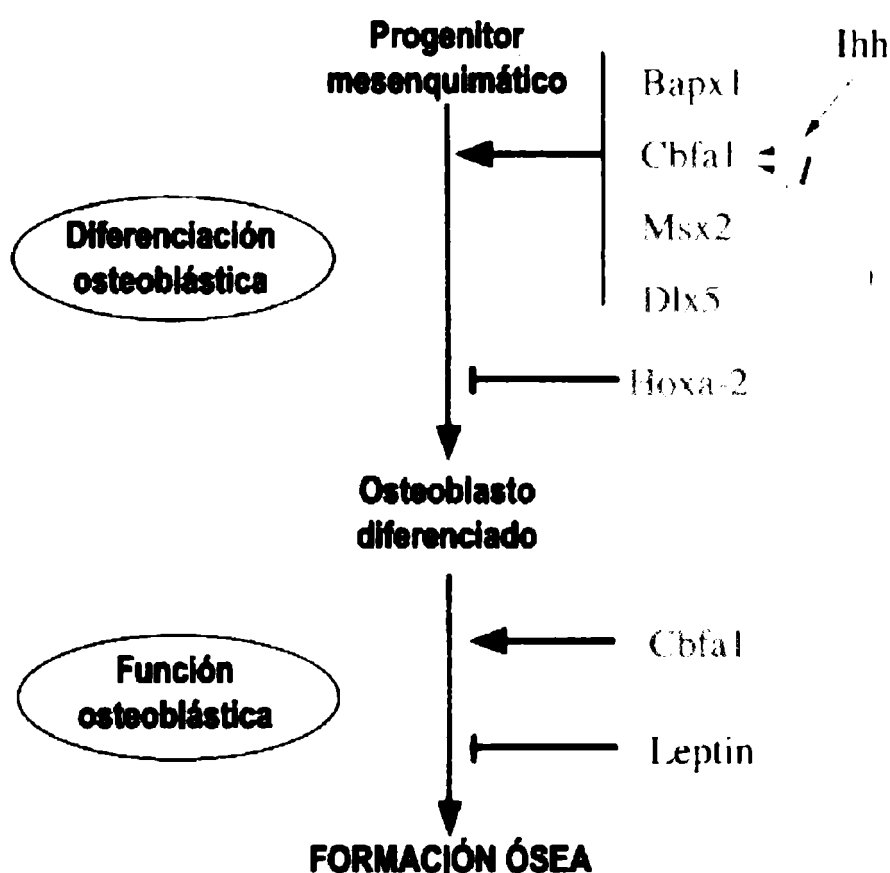


Figura 20. Esquema del control genético de la diferenciación y funcionalismo osteoblástico. Los factores de transcripción involucrados se indican en rojo, mientras que las moléculas secretadas se indican en azul. Se muestran además en color gris, las vías regulatorias más probables. **Cbfa1**, factor de transcripción con afinidad por OSE2, un promotor del gen de la osteocalcina. **Bapx1**, homólogo en mamíferos del gen *Bagpipe* de *Drosophila*. **Msx2**, homólogo en ratones del gen *Msh* del segmento muscular de *Drosophila*. **Ihh**, proteína *indian hedgehog*. El déficit de cualquiera de los factores de transcripción Bapx1 ó Msx2, o del factor de crecimiento Ihh, disminuye la expresión de Cbfa1 e inhibe la formación ósea. **Hoxa-2** es una proteína inhibitoria de Cbfa1 que confiere identidad regional al segundo arco branquial (impide la formación ósea en esta región por inhibición de la expresión de Cbfa1). **Dlx5**, homólogo en ratones del gen *distalless* de *Drosophila*, necesario para el proceso de formación ósea endocondral.

En otros experimentos, se ha observado que ratones con deficiencia completa de *Cbfa1* desarrollan un esqueleto de forma y tamaño normales, pero conformado exclusivamente por tejido cartilaginoso, debido a que se encuentra anulada la diferenciación osteoblástica del mesénquima. Asimismo, estos ratones tampoco poseen osteoclastos, porque la diferenciación de monocitos/macrófagos a osteoclastos requiere interacción con células de linaje osteoblástico.

(b) Regulación hormonal (sistémica) de la formación ósea.

Recientemente se ha encontrado que ratones con deficiencia de **leptina** (*ob/ob*) o de su receptor (*db/db*), que característicamente presentan obesidad prominente, poseen una masa ósea 2-3 veces mayor que los correspondientes ratones controles. La infusión intraventricular de leptina tanto en ratones *ob/ob* como controles induce una disminución en la masa ósea global, como consecuencia de un descenso en la actividad de formación ósea. Estos efectos se logran sin modificar el número de osteoblastos diferenciados, que por otro lado no poseen receptores para leptina. Así, se postula que la leptina – sintetizada por los adipocitos- se une a su receptor en el hipotálamo, y que determinadas señales hipotalámicas provocan a nivel óseo un descenso en la actividad de los osteoblastos ya diferenciados (pero sin actuar sobre sus células progenitoras mesenquimatosas). De esta forma, el control de la formación ósea podría estar coordinado conjuntamente con la regulación del peso corporal global (la función más conocida de la leptina) (**Figura 19**). Esta acción postulada de la leptina sobre la formación ósea, podría explicar el menor riesgo de osteopenia que presentan los individuos obesos, ya que frecuentemente son resistentes a la acción de la leptina.

Desde hace décadas, se conoce que otras hormonas de acción sistémica tienen un efecto global sobre la formación ósea, aunque los mecanismos involucrados sólo se han comenzado a dilucidar en forma reciente. Estos efectos se reseñarán brevemente a continuación.

La **hormona de crecimiento (GH)** es en gran medida responsable del crecimiento esquelético longitudinal en la etapa post-natal. La GH incrementa los niveles sistémicos y locales de IGF-I (ver más abajo), el cual en realidad es quien media la mayoría de los efectos de la GH sobre el tejido óseo (**Figura 21**). Así, la administración

conjunta de IGF-I e IGFBP-3 (su proteína ligadora mayoritaria) puede incrementar el crecimiento esquelético, a través de un aumento en la formación respecto de la resorción ósea. La GH exógena tiene el mismo efecto sobre el hueso, pero además promueve el crecimiento del tejido cartilaginoso.

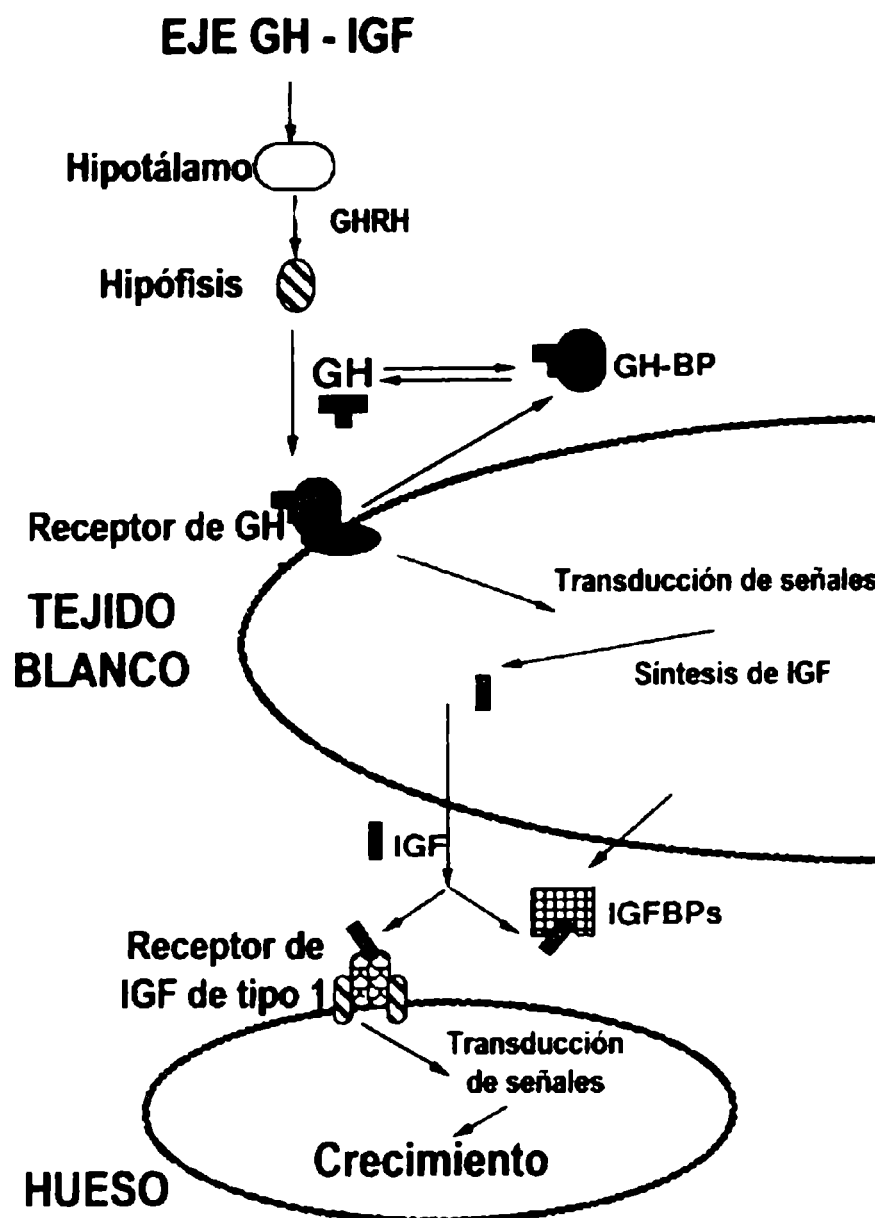


Figura 21. Eje GH/IGF/IGFBP humano normal. GHRH, factor de liberación de GH hipotalámico; GH-BP, proteína ligadora de GH.

Los **glucocorticoides** tienen un efecto bifásico sobre la formación ósea. Inicialmente aumentan la diferenciación de los osteoblastos así como su síntesis de colágeno de tipo I, posiblemente como resultado de un incremento en la sensibilidad al IGF-I endógeno. Sin embargo, a largo plazo los glucocorticoides inhiben la formación ósea a través de una disminución en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, y en la síntesis de IGF-I.

Las **hormonas tiroideas** son fundamentales para el crecimiento y diferenciación de los cartílagos aumentando la sensibilidad tisular a la GH. Su efecto sobre la formación ósea es poco claro, aunque podrían estimular la proliferación de los osteoblastos.

Se ha establecido que un crecimiento esquelético normal es dependiente de la presencia de **insulina** en concentraciones adecuadas. *In vitro*, la insulina en cantidades fisiológicas estimula la síntesis osteoblástica de colágeno de tipo I, a través de un mecanismo pre-traducciona. La insulina puede también mimetizar los efectos del IGF-I sobre la formación ósea, pero sólo a concentraciones suprafisiológicas.

Tanto los **estrógenos** como los **andrógenos** son críticos para el desarrollo y mantenimiento del esqueleto. Los osteoblastos poseen receptores para ambos tipos de esteroides sexuales, y se ha encontrado que los andrógenos incrementan la formación ósea *in vivo*. El efecto de los estrógenos sobre este proceso es menos claro, aunque podrían también estimular la proliferación osteoblástica en forma directa. En estados de deficiencia estrogénica, se encuentra aumentada en forma absoluta la velocidad de formación ósea por un incremento en el número y en la frecuencia de activación de los sitios de remodelado óseo. Sin embargo el déficit estrogénico se asocia con osteopenia, lo cual implica que la velocidad de resorción ósea está aún mas aumentada que la de formación.

La **hormona paratiroidea (PTH)**, aunque considerada un inductor de la resorción ósea por excelencia, puede estimular la formación ósea cuando es administrada en forma intermitente. Este efecto también se ha descrito como consecuencia del tratamiento intermitente con la proteína relacionada a PTH (**PTHrP**).

(c) Regulación local de la formación ósea.

Todos los efectos sobre la formación ósea inducidos por hormonas sistémicas, son importantes para el desarrollo y mantenimiento global del tejido óseo. Sin embargo, para el acoplamiento entre resorción y formación ósea que ocurre permanentemente en cada sitio de remodelado microscópico, tiene mayor importancia la regulación local a través de la interacción con la MEC (ver mas arriba), y de la secreción de factores de crecimiento. La formación post-resorción ósea que ocurre en este proceso, es el resultado de una cascada de eventos que comienza con el reclutamiento de células

mesenquimatosas progenitoras hacia los sitios de resorción. Luego de su estimulación, estas células proliferan, se diferencian en preosteoblastos, maduran para formar osteoblastos, secretan proteínas de matriz extracelular en forma activa, y finalmente inducen la mineralización de esa matriz. La mayor parte de la evidencia disponible indica que estos procesos se encuentran coordinados por factores de crecimiento tales como TGF β , las proteínas morfogénicas óseas (BMP), e IGF I y II. Estas proteínas son secretadas por los propios osteoblastos y se almacenan en la matriz orgánica del hueso hasta que sean liberados por proteólisis enzimática de la MEC.

1. **TGF β .** Estudios *in vivo* han demostrado que TGF β es un potente estimulador de la formación ósea endocondral e intramembranosa. *In vitro*, los efectos de TGF β incluyen estimulación de la proliferación osteoblástica y de la síntesis de colágeno de tipo I, osteonectina, osteopontina, fibronectina y osteocalcina. Por otro lado, indirectamente promueve la acumulación de MEC por inhibición de la expresión de proteasas como la colagenasa, y por aumento de la expresión de inhibidores de proteasas. TGF β es abundante en el tejido óseo, y es un producto de secreción de osteoblastos y osteoclastos. Su síntesis es inducida por 1,25(OH) $_2$ D $_3$, PTH, esteroides sexuales y BMP-2. TGF β es secretado como un precursor latente de 100 kDa, que precisa una proteólisis enzimática para poder manifestar su acción biológica (a través de la unión a sus receptores específicos, de amplia distribución celular). La forma latente de TGF β se acumula en la MEC ósea, ya que su proteína ligadora LTBP está incluida en la matriz. El complejo LTBP/TGF β es un sustrato de la plasmina, y su proteólisis provoca la liberación de TGF β activo. A su vez, el TGF β activo autolimita su propia liberación, ya que induce un aumento en la síntesis de PAI-1 disminuyendo entonces la formación de mas plasmina. El TGF β latente almacenado en la matriz ósea, también puede ser liberado y activado por la proteasa catepsina-K y/o el microambiente ácido existentes dentro del aparato de resorción de los osteoclastos.
2. **BMP.** Las proteínas morfogénicas óseas son un grupo de proteínas que fueron aisladas de la matriz ósea, y caracterizadas por su capacidad de inducir la formación ectópica de hueso cuando son implantadas por vía intramuscular. Llevan a cabo esta

formación ectópica, induciendo la diferenciación de células mesenquimatosas pluripotentes en condrocitos y osteoblastos. La proteína BMP-2 en particular, puede inducir por sí sola la progresión de mioblastos y células mesenquimatosas indiferenciadas hacia preosteoblastos. BMP-2 también aumenta tanto la síntesis osteoblástica de TGF β , como la unión a su receptor de tipo I. En general, las BMP son secretadas por los osteoblastos y almacenadas en la MEC ósea, por lo cual su liberación durante un período de resorción provocará la migración de precursores osteoblásticos hacia dicho sitio, y su diferenciación una vez que lleguen.

3. **Sistema de los IGF.** Los factores de crecimiento insulinosímiles, IGF-I e IGF-II, son sintetizados por los osteoblastos, almacenados en la MEC ósea para actuar como reguladores paracrinos o autocrinos de la formación ósea, y se encuentran entre los factores de crecimiento mas prevalentes del tejido esquelético. Los IGF estimulan la proliferación y/o diferenciación de preosteoblastos, osteoblastos, fibroblastos, progenitores osteoclasticos, y células del estroma medular óseo. La secreción osteoblástica de IGF-I es aumentada *in vitro* por PTH, PTHrP, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ y prostaglandina E $_2$, y es inhibida por exposiciones prolongadas al cortisol. *In vivo*, la administración intermitente de PTH induce un aumento en la producción de IGF-I e IGF-II, y un incremento en la síntesis de MEC ósea. Este mecanismo explicaría el efecto anabólico sobre la formación ósea observado en humanos luego de un tratamiento intermitente con PTH o PTHrP. El efecto de los IGF sobre el hueso se encuentra controlado por un complejo mecanismo regulatorio, que incluye a los propios IGF, sus receptores, sus proteínas ligadoras, y proteasas con sus inhibidores que regulan la degradación de las proteínas ligadoras (Jones & Clemmons 1995, Reiter & Rosenfeld 1998). Este sistema se describirá con algún detalle a continuación.

Sistema de los factores de crecimiento insulinosímiles.

El sistema de los IGF está integrado por dos factores de crecimiento insulinosímiles (IGF-I e IGF-II), que son reconocidos por dos receptores específicos, el de tipo I y el de tipo II. También forman parte de este sistema una serie de proteínas ligadoras o transportadoras (IGFBP), de las cuales se han descrito seis, y proteasas específicas para estas IGFBP (Rechler & Nissley 1990) (Figura 22).

La evidencia acumulada hasta el momento sugiere que IGF-I es el principal mediador de las acciones promotoras del crecimiento de la GH. De esta manera, la GH controla globalmente los niveles de IGF-I, pero es el IGF-I el que tiene acción a nivel celular. Post-natalmente, se encuentra que los niveles de IGF-I total circulante correlacionan con la secreción de GH. Sin embargo, los IGF son también sintetizados en forma independiente de la GH en múltiples tejidos, y tienen así potencialmente acción paracrina y autocrina (Jones & Clemmons 1995).

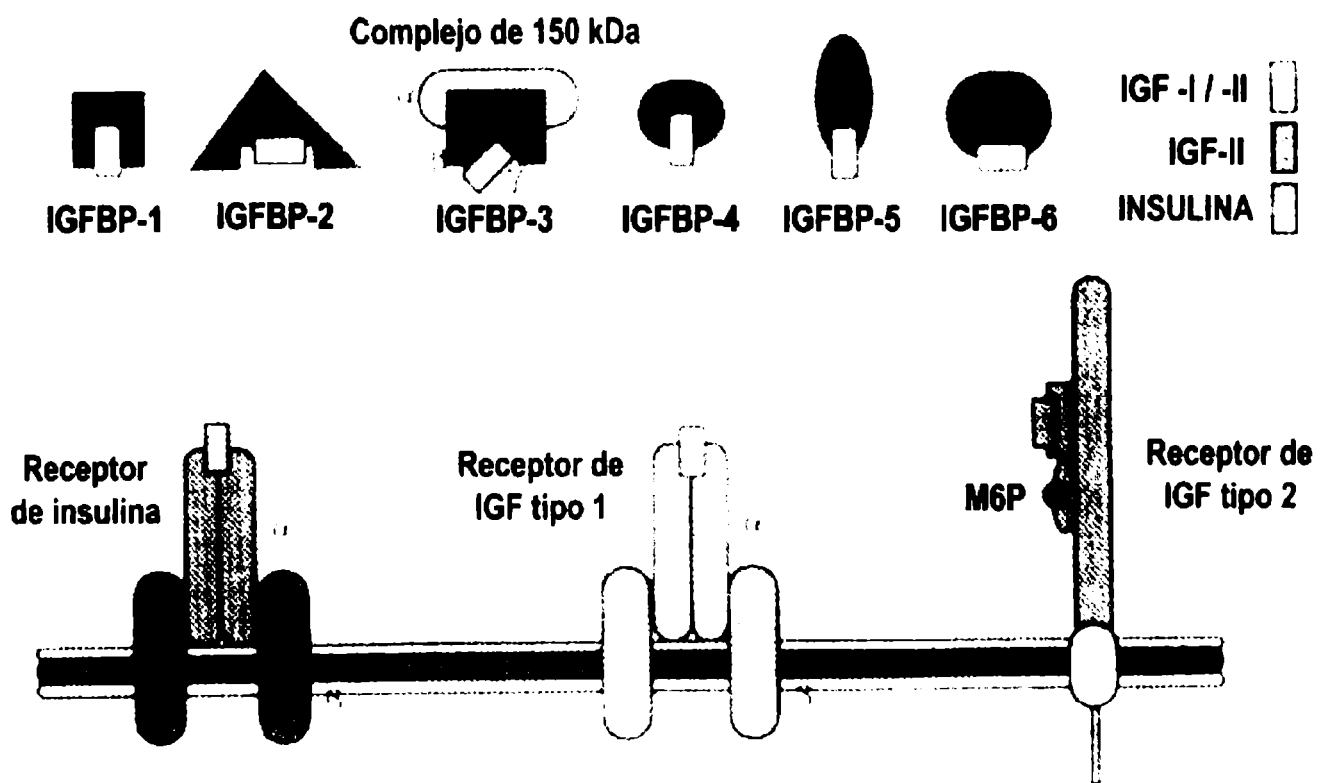


Figura 22. Representación esquemática del sistema de los IGF, incluyendo a los ligandos (IGF), receptores y proteínas ligadoras.

1. **Ligandos.** El IGF-I, el IGF-II y la insulina pertenecen a una familia de hormonas relacionadas estructuralmente, que tienen aproximadamente 40-50% de homología de secuencia (Werner 1994). Los IGF circulantes son péptidos de 70

aminoácidos que, al igual que la insulina, poseen un dominio A y uno B. Sin embargo, difieren de la insulina ya que retienen el péptido conector C, y tienen una secuencia adicional –el dominio D- en su extremo carboxilo terminal (**Figura 23**). El gen que codifica para el IGF-I en humanos se encuentra en el cromosoma 12, y posee múltiples sitios de inicio de la transcripción. La expresión del mRNA producto de cada uno de estos sitios alternativos, es específica de tejido y se encuentra regulada por factores hormonales y dependientes del desarrollo. El gen que codifica para IGF-II en humanos se encuentra en el cromosoma 11, adyacente al extremo 3' del gen de la insulina. La expresión del gen de IGF-II es controlada por cuatro promotores diferentes. Estos promotores son activados diferencialmente, en forma dependiente de tejido y de la etapa de desarrollo. Tanto el IGF-I como el IGF-II son expresados por células óseas como los osteoblastos, alcanzando concentraciones locales que son biológicamente eficaces. Sin embargo, la abundancia relativa de cada IGF en el hueso tiende a ser específica de especie. Así, en los humanos el factor de crecimiento óseo mas prevalente es el IGF-II, mientras que en roedores como la rata y el ratón lo es el IGF-I.

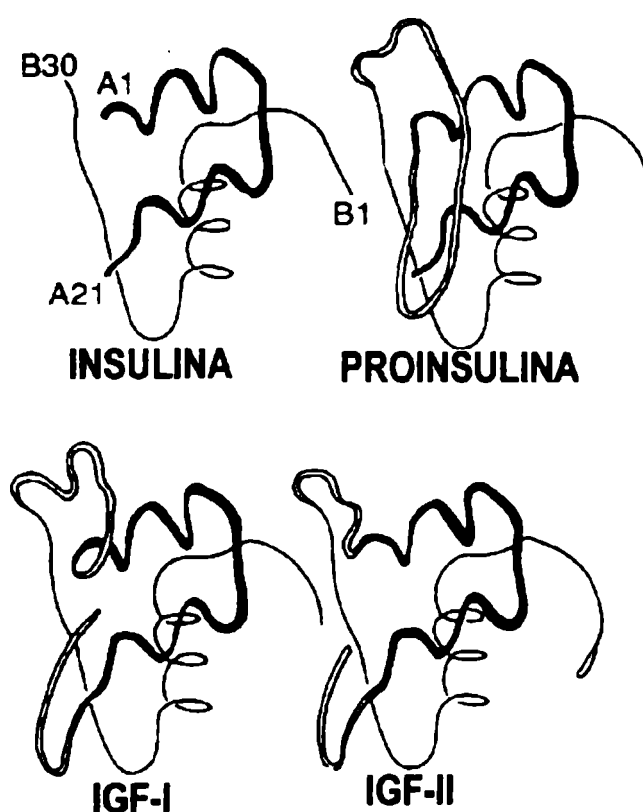


Figura 23. Estructura terciaria propuesta para la familia de péptidos relacionados con los factores de crecimiento insulino-símiles: IGF-I, IGF-II, insulina y proinsulina.

2. **Receptores.** Los IGF ejercen sus acciones biológicas a través del reconocimiento específico de una familia de receptores de membrana plasmática. Ellos son el receptor de IGF de tipo I y el receptor de IGF de tipo II (Czech 1989) (**Figura 24**). El **receptor de IGF de tipo I** es muy semejante al receptor de insulina ya que está formado por un tetrámero del tipo $\alpha_2\beta_2$. Las subunidades α poseen un PM aproximado de 125 kDa y las β de 90 kDa. Este receptor posee tres dominios: uno extracelular constituido mayoritariamente por la subunidad α donde se halla el sitio de unión del ligando; un dominio hidrofóbico de transmembrana perteneciente a la subunidad β ; y uno hidrofílico intracelular constituido por la subunidad β que incluye una actividad de tirosina-quinasa (TK), una secuencia de consenso para la unión de ATP, y múltiples residuos de tirosina pasibles de ser fosforilados cuando el ligando se une a la subunidad α . El receptor de tipo I une IGF-I e IGF-II con alta afinidad ($K_d = 10^{-10}$ M), mientras que su afinidad por la insulina es considerablemente menor ($K_d = 10^{-8}$ M). Es por esta razón que se precisan concentraciones suprafisiológicas de insulina para lograr efectos via receptor de IGF de tipo I, comparables a los obtenidos con niveles fisiológicos de IGF. Posteriormente a la unión del ligando, se produce una agregación de receptores seguida por la autofosforilación de ciertos restos de tirosina en una de las subunidades β . Inmediatamente después de su autofosforilación, la subunidad β adquiere actividad de TK y puede fosforilar en residuos de tirosina a una proteína de 185 kDa llamada IRS-1 (sustrato del receptor de insulina). La IRS-1 fosforilada se puede unir a proteínas que contienen dominios SH2 (homólogos al src), entre las cuales se encuentra la subunidad reguladora de la fosfatidil-inositol-3'-quinasa (PI3K). La activación de esta quinasa conduce a la formación de fosfatidil-inositol-3-fosfato, el cual puede servir como una señal para el crecimiento celular. La IRS-1 fosforilada también puede activar la vía de la proteína G p21^{ras}, desencadenando la fosforilación de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales juegan un papel importante en la regulación del crecimiento celular (Blakesley 1996). El receptor de IGF de tipo I se expresa en casi todos los tejidos del cuerpo, en forma inversamente proporcional a los niveles de IGF-I. Esto sugiere la existencia de una retro-regulación del

receptor respecto de su ligando. El **receptor de IGF de tipo II** está constituido por un monómero de 260 kDa estructuralmente similar al receptor de LDL (Nilsen 1992). La glicosilación enzimática de este receptor es esencial para que puedan unirse con alta afinidad los IGF. Su secuencia aminoacídica tiene un 80% de homología con otro receptor: el de manosa-6-fosfato. En los mamíferos, el receptor de IGF de tipo II une IGF-II con alta afinidad ($K_d = 2 \cdot 10^{-10}$ M). Posee una afinidad aproximadamente 500 veces menor para el IGF-I, y la insulina no es reconocida por este receptor. El receptor de tipo II además tiene afinidad por unas 50 enzimas lisosomales que se encuentran glicosiladas enzimáticamente, en especial por las que poseen residuos de manosa (por ejemplo la β -galactosidasa, una enzima lisosomal extracelular, tiene una afinidad de $5 \cdot 10^7$ M⁻¹). Se ha encontrado que la unión de IGF-II es inhibida parcialmente por β -galactosidasa, y que IGF-II inhibe la captación de β -galactosidasa en células en cultivo. Durante el remodelamiento óseo, los osteoclastos secretan enzimas lisosomales que digieren la matriz; el IGF-II podría modular este proceso inhibiendo la captación celular de dichas enzimas lisosomales. La función de este receptor en la fisiología de los IGF podría ser la de una vía degradativa (receptor tipo *scavenger*), removiendo IGF-II del entorno extracelular. Aunque alguna evidencia reciente sugeriría que ciertas acciones del IGF-II podrían ser mediadas por el receptor de tipo II, se cree que en realidad la mayoría de las funciones de los IGF serían ejercidas a través del receptor de tipo I.

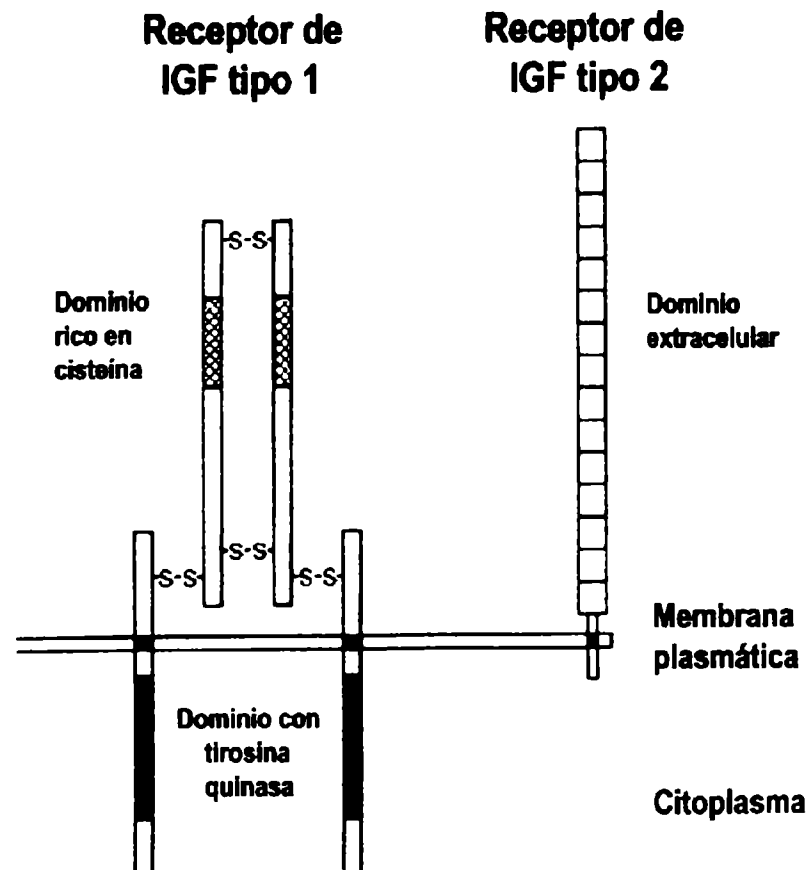


Figura 24. Estructura de los receptores de IGF.

- 3. Proteínas ligadoras de IGF.** Los IGF circulan en el plasma unidos a proteínas ligadoras o transportadoras (IGFBP). Actualmente se han descrito seis IGFBP, con un 40-50% de homología aminoacídica entre ellas (Rechler 1993, Clemmons 1997, Murphy 1998). Estas IGFBP se encuentran en un exceso molar respecto de los IGF, por lo cual la concentración de IGF libre circulante es normalmente muy baja. De hecho, las IGFBP previenen los efectos metabólicos agudos (tales como la hipoglucemia) que provocarían los IGF –de concentración plasmática 100 a 1000 veces mayor que la insulina- en ausencia de sus proteínas ligadoras. Individualmente las IGFBP difieren en su afinidad por cada uno de los IGF, aunque su constante de disociación es normalmente del orden de 10^{-10} M o menor. La afinidad intrínseca de las IGFBP por los IGF puede ser modificada por su asociación con la membrana plasmática celular, con la matriz extracelular, o por fosforilación. Así, las IGFBP pueden modular la acción celular de los IGF por dos mecanismos opuestos: por un lado, restringiendo el acceso del IGF a sus receptores, lo cual inhibe el crecimiento celular; y por otro, facilitando el acceso y aumentando la interacción de los IGF con sus receptores (Figura 25). Se puede

dividir a estas proteínas transportadoras en dos grupos de acuerdo con su peso molecular. El primer grupo incluye las de alto peso molecular, que integran un complejo de 150 kDa el cual une aproximadamente el 90% de todos los IGF circulantes. Este complejo está formado por los IGF (I y II), la IGFBP-3 de 40 kDa, y un tercer componente llamado subunidad ácido lábil (ALS) de 85 kDa que tiene alta afinidad por el complejo IGF / IGFBP-3. Este complejo ternario aumenta la vida media del IGF desde 10 minutos (cuando está libre) hasta unas 16 horas, ya que por su elevado peso molecular no puede atravesar la barrera capilar y queda en el espacio vascular. El segundo grupo de proteínas ligadoras corresponde a las de bajo peso molecular, que en plasma son esencialmente tres: IGFBP-1, -2 y -4. Estas IGFBP de bajo peso molecular (24-31 kDa) pueden atravesar la barrera capilar, por lo cual la vida media del IGF circulante asociado a las mismas es de unos 30 minutos. En otros fluidos corporales se han encontrado IGFBP-5 y -6, también de bajo peso molecular, cuya concentración plasmática es muy baja (Figura 26).

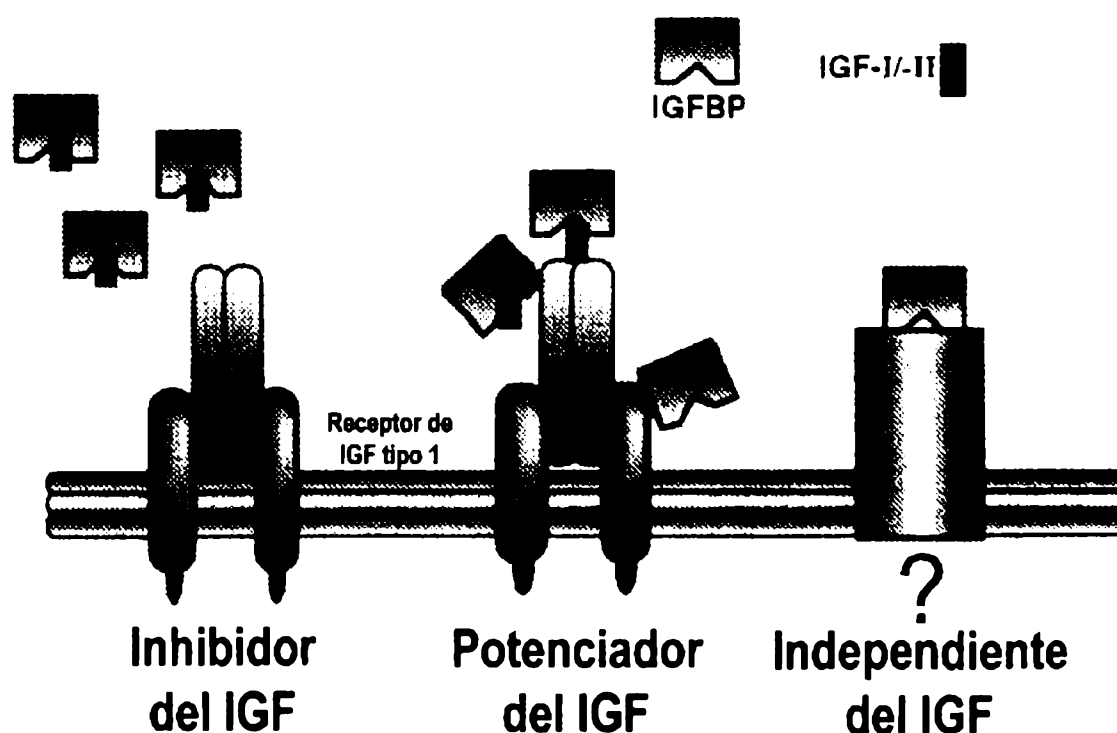


Figura 25. Mecanismos propuestos para las diferentes acciones celulares de las IGFBP.

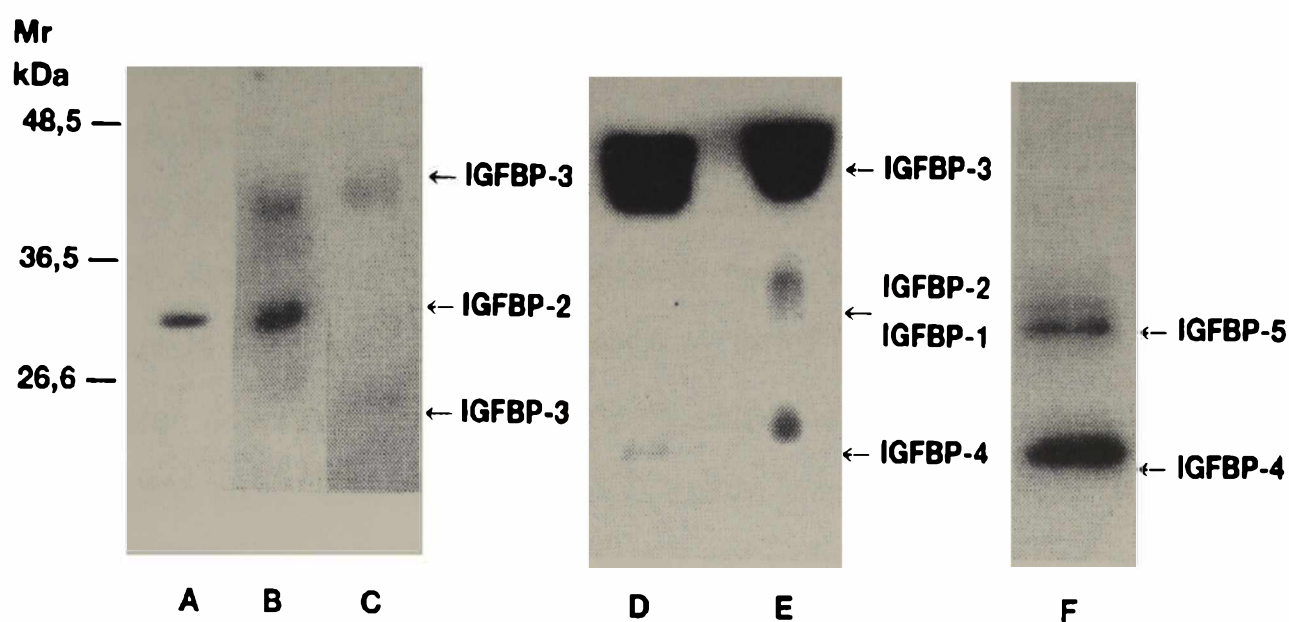


Figura 26. Western ligand blot para IGFBP de diferentes fuentes. (A) Medio condicionado de células β Hit-T15; (B) suero bovino fetal; (C) medio condicionado de fibroblastos Swiss 3T3 de ratón; (D) suero humano adulto normal; (E) suero de rata; (F) medio condicionado de células de osteosarcoma de rata UMR106. A la izquierda de la figura se muestran los marcadores de pesos moleculares precoloreados. A la derecha de cada panel se indican las posiciones de las diferentes proteínas ligadoras de los IGF (IGFBP-1 a -5).

- **IGFBP-1.** Es una proteína de 25 kDa, cuyo gen está codificado en el cromosoma 7 (Drop 1984, Brewer 1988). Su concentración plasmática en un adulto en ayunas, oscila entre 0,02 y 0,04 mg/L. La insulina parece ser el determinante fisiológico mas importante de la expresión de IGFBP-1, aunque la glucosa también podría tener un rol independiente. Así, la IGFBP-1 aumenta cuando la concentración de insulina disminuye: en el ayuno, la diabetes insulínopénica y el ejercicio prolongado. La IGFBP-1 contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) en su extremo carboxilo terminal, lo cual puede mediar su unión a receptores integrina de la membrana plasmática celular. Así, recientemente se ha demostrado que IGFBP-1 se une al receptor de integrinas $\alpha_5\beta_1$, que también reconoce a la fibronectina (Jones 1993b). Por otro lado, esta proteína ligadora se puede fosforilar en ciertos residuos de serina, y se ha encontrado que la IGFBP-1

fosforilada tiene 6 veces más afinidad por el IGF-1 que su forma desfosforilada. Entonces, la isoforma desfosforilada (de afinidad por el IGF-I semejante al receptor de tipo I) permitiría que el IGF-I se particione entre el receptor de tipo I y el receptor de integrinas $\alpha_5\beta_1$ (ya que este último une IGFBP-1), potenciando los efectos del IGF. Por otro lado, la isoforma fosforilada de mayor afinidad atraparía al IGF, sin dejarle acceso al receptor de tipo I, inhibiendo de esta manera la respuesta mitogénica del IGF. Finalmente, la IGFBP-1 (fosforilada o no) podría generar directamente una señal intracelular independiente por su unión al receptor $\alpha_5\beta_1$. Este mecanismo parecería involucrar a la IGFBP-1 en el crecimiento de los tejidos ricos en matriz extracelular. Sin embargo, su acción a nivel del hueso es aparentemente escasa, ya que no se ha podido demostrar su secreción por osteoblastos humanos o de otras especies.

- **IGFBP-2.** Esta proteína ligadora tiene un peso molecular de 31 kDa, y su gen está codificado en el cromosoma 2 (Brown 1989). Al igual que la IGFBP-1, la IGFBP-2 posee una secuencia RGD cerca de su extremo carboxilo terminal, y puede entonces asociarse con receptores integrinas de la membrana plasmática celular. La insulina es el principal regulador metabólico de la IGFBP-2, y la expresión de esta proteína ligadora se encuentra disminuida en condiciones de insulinopenia (por ejemplo, ayuno prolongado y diabetes). Sin embargo, se ha encontrado que los niveles plasmáticos de IGFBP-2 responden menos a alteraciones metabólicas agudas que los de IGFBP-1. En la mayoría de los sistemas estudiados la IGFBP-2 limita el acceso de los IGF a sus receptores celulares específicos, inhibiendo la acción proliferativa de estos factores de crecimiento, aunque en ciertos casos la IGFBP-2 puede potenciar algunas acciones de los IGF. Se ha encontrado, tanto en cultivos primarios de osteoblastos de rata como de osteoblastos MC3T3E1 de ratón, que IGFBP-2 e IGFBP-5 son las dos proteínas ligadoras mayoritariamente secretadas al medio extracelular, y que su abundancia relativa depende del estadio de desarrollo osteoblástico (Thrailkill 1995b, Chen 1998). Este hecho ubica a dichas proteínas ligadoras en una posición fundamental, en cuanto a la regulación de la progresión osteoblástica mediada por los IGF.

➤ **IGFBP-3.** El gen que codifica para la IGFBP-3 se encuentra en el cromosoma 7, a 20 kb del gen de IGFBP-1. Por análisis de Western Ligand Blot la IGFBP-3 se visualiza como un doblete de aproximadamente 40 kDa, debido a la existencia de varias formas N-glicosiladas (Martin & Baxter 1986). Su concentración plasmática oscila entre 3 y 5 mg/L, y por su relativa abundancia transporta el 90% de los IGF circulantes (junto con la subunidad ácido-lábil, formando un complejo ternario de 150 kDa). De hecho, se ha sugerido que la relación molar IGF-I / IGFBP-3 refleja el IGF-I "libre" o biológicamente activo. Los niveles plasmáticos de IGFBP-3 disminuyen hasta un 80% en el hipopituitarismo y en el déficit de GH, por lo cual su dosaje es útil para el diagnóstico diferencial de niños con estas patologías. Por otro lado, sus niveles aumentan 2-3 veces post-inyección de GH y en pacientes con acromegalia. Esta dependencia de GH es indirecta ya que es mediada por IGF-I, el cual es el regulador primario de los niveles de IGFBP-3 en condiciones normales. Así, la concentración plasmática de IGFBP-3 correlaciona en forma directa con los niveles circulantes de IGF-I (Martin & Baxter 1992). La edad es otro factor determinante de la concentración de esta proteína ligadora: los niveles de IGFBP-3 son bajos en niños, luego aumentan aproximadamente al triple en la pubertad y finalmente en el adulto disminuyen lentamente con la edad. Este patrón es muy semejante al del IGF-I, aunque el pico de IGF-I en la pubertad es mucho más marcado que el de IGFBP-3. Por medio de estudios *in vitro*, se ha demostrado que IGFBP-3 puede modular diferencialmente los efectos celulares de los IGF. Por un lado, la IGFBP-3 presente en el líquido extracelular tiene una afinidad significativamente mayor por los IGF que el receptor de IGF de tipo I, inhibiendo entonces los efectos promotores del crecimiento celular de los IGF por un efecto de competencia directa. Por otro lado, IGFBP-3 se puede adherir a ciertas moléculas presentes en la membrana plasmática celular, lo cual disminuye marcadamente su afinidad por los IGF. Esta menor afinidad, así como la proximidad relativa entre IGFBP-3 y el receptor de IGF de tipo I (ambos unidos a la misma superficie celular), aumentan la probabilidad de interacción entre el IGF y su receptor, conduciendo a una potenciación de los efectos celulares del IGF. En cuanto al tejido óseo, se ha demostrado la producción de IGFBP-3 en cultivos

primarios de osteoblastos de humanos y roedores (Malpe 1997, Chen 1998). Esta producción se encuentra regulada por varios factores, entre los que se incluyen la concentración plasmática de GH, y los niveles intracelulares de cAMP.

- **Subunidad ácido-lábil (ALS).** ALS es una proteína de 85 kDa (Baxter 1989), cuya síntesis (principalmente hepática) es regulada en forma directa por la GH. Esta proteína no se une a IGFBP-3 en ausencia de IGF-I o IGF-II, pero su afinidad de unión por el complejo binario IGF / IGFBP-3 es de $6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Ciertos polianiones como la heparina inhiben la unión de ALS al complejo binario, pero no afectan la asociación de IGF-I con IGFBP-3. Así, los proteoglicanos presentes en la superficie de las células endoteliales capilares podrían facilitar la disociación del complejo ternario de 150 kDa, permitiendo el ingreso de los IGF al espacio extravascular (Baxter 1990).
- **IGFBP-4.** Esta proteína ligadora tiene un peso molecular de 24 kDa y se expresa mayoritariamente en el hígado (Shimasaki 1991), aunque también es sintetizada por osteoblastos. Se ha encontrado un aumento de IGFBP-4 circulante en individuos con elevado riesgo de osteoporosis. Esta asociación podría ser importante, dado que IGFBP-4 inhibe la actividad mitogénica del IGF sobre los osteoblastos (Mohan 1989). De hecho, esta proteína ligadora inhibe las acciones celulares del IGF en casi todas las condiciones experimentales probadas, y su función en condiciones normales podría ser la de proteger a ciertas células de una sobre-estimulación por IGF.
- **IGFBP-5.** El gen que codifica para IGFBP-5 se encuentra en el cromosoma 2, muy cerca del gen de IGFBP-2 pero con la orientación contraria. Es una proteína de 29 kDa que se expresa mayoritariamente en el tejido conectivo, y que posee una afinidad para IGF-II 10 veces mayor que para IGF-I (Shimasaki 1991). IGFBP-5 contiene una región de aminoácidos básicos altamente cargados, que incluyen una secuencia de consenso para la unión de heparina (presente en proteoglicanos de la superficie celular y de la matriz extracelular). Así, IGFBP-5 puede unirse a glicosaminoglicanos de la matriz extracelular, lo cual la protege de proteólisis por proteasas específicas y promueve su acumulación en la misma

matriz, dificultando su pasaje a circulación. La afinidad por el IGF-I de la IGFBP-5 unida a matriz, es 7 veces menor que la de IGFBP-5 soluble. El IGF-I asociado a la matriz a través de IGFBP-5 puede entonces ser liberado mas fácilmente, y tiene mayor posibilidad de interacción con los receptores de IGF presentes sobre las superficies celulares cercanas. En consecuencia, cuando IGFBP-5 se adhiere a la matriz extracelular, potencia las acciones celulares de los IGF (Jones 1993a). Esta proteína ligadora también se puede asociar con proteoglicanos de la superficie celular, y potenciar así las acciones de los IGF en una forma similar a la IGFBP-3. Como se ha mencionado, IGFBP-5 es una de las proteínas ligadoras mayoritariamente secretadas al medio extracelular tanto en cultivos de osteoblastos MC3T3E1 de ratón, como en cultivos primarios de osteoblastos de humanos y roedores. Asimismo, se ha visto que su abundancia relativa depende del estadio de desarrollo osteoblástico (Thraikill 1995b, Malpe 1997, Chen 1998). Estas variaciones en los niveles peri-osteoblásticos de IGFBP-5, se han adjudicado a cambios en la actividad de proteasas específicas, o a modificaciones en las actividades intracelulares de PKA y/o PKC que regulen la producción de esta proteína ligadora. Se ha reconocido además, que la producción osteoblástica de IGFBP-5 es sostenida en el tiempo por la acción autócrina de los IGF secretados localmente (Gabbitas & Canalis 1998).

- **IGFBP-6.** Es una proteína de 31 kDa, cuyo gen está codificado en el cromosoma 12 (Shimasaki 1991). Su concentración plasmática en un adulto en ayunas es de 0.2 mg/L. Posee mucha mayor afinidad por el IGF-II (10^{11} M^{-1}) que por el IGF-I (10^9 M^{-1}). Presenta una serie de aminoácidos básicos con elevada densidad de carga, que podrían intervenir en la unión a proteoglicanos. Los estudios *in vitro* de IGFBP-6 son muy limitados, aunque su regulación parece ser específica de tejido. En estudios recientes, se demostró que la IGFBP-6 es expresada y secretada por osteoblastos (Chen 1998).

4. **Proteasas.** Existen varias proteasas que tienen acción sobre las IGFBP, pudiendo degradarlas en ciertas condiciones y así modular la acción de los IGF (Jones & Clemmons 1995) (Figura 27).

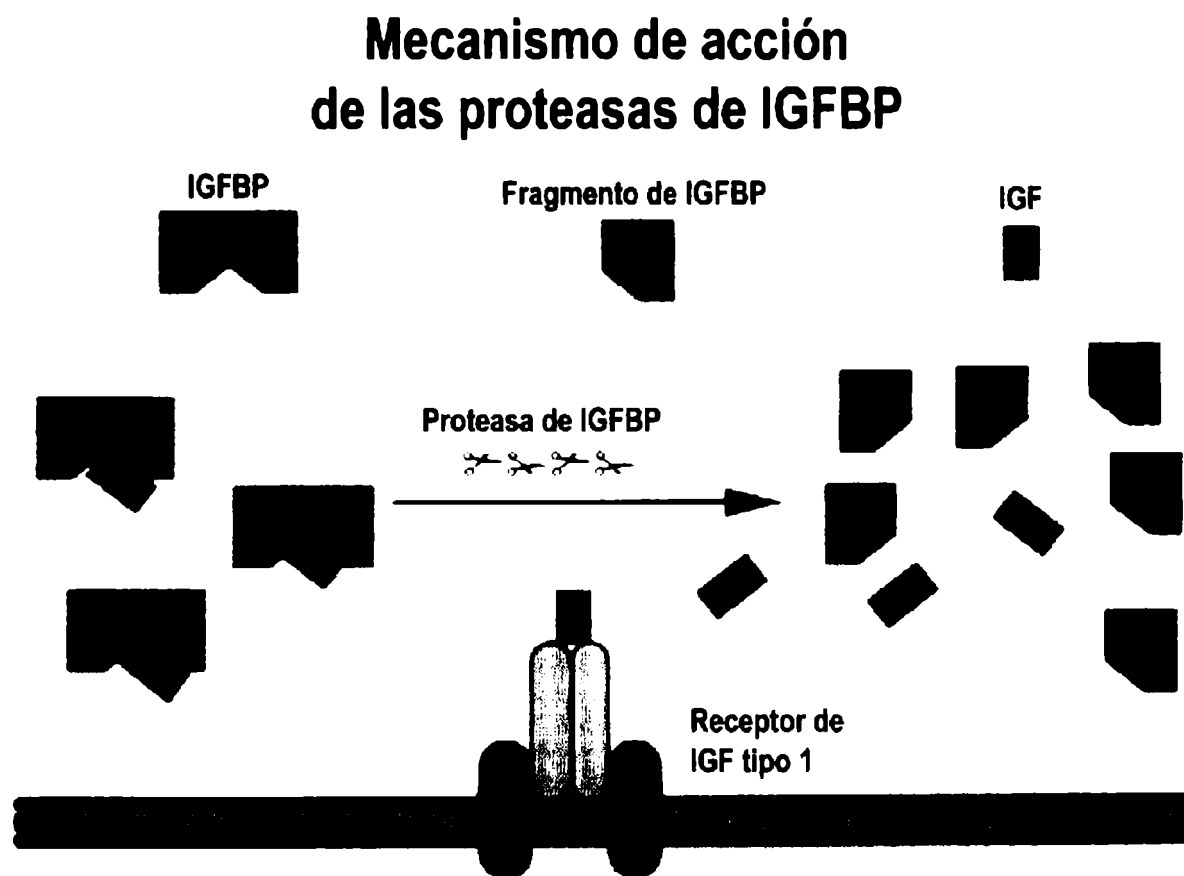


Figura 27. Representación esquemática del efecto de las proteasas de IGFBP sobre la acción de los IGF. En este modelo la proteólisis de IGFBP reduce su afinidad por los IGF, resultando en un incremento de la unión de IGF a su receptor específico de tipo 1.

Estas proteasas están presentes en diversos tejidos y fluidos corporales. Algunas han sido caracterizadas, e incluyen la plasmina (con su sistema de activadores e inhibidores: PA y PAI), metaloproteasas de matriz extracelular o MMP, calicreínas como el antígeno prostático específico (PSA), y la catepsina-D. Se ha demostrado la proteólisis de IGFBP-2, -3, -4 y -5, pero no de IGFBP-1. En el caso de IGFBP-3 e IGFBP-5, los fragmentos proteolíticos retienen una cierta afinidad por los IGF, pudiendo potenciar los efectos celulares de estos factores de crecimiento en algunos casos. Por otro lado, los fragmentos proteolíticos de IGFBP-2 y -4 no muestran afinidad por los IGF. Cada proteasa parece ser específica para una IGFBP determinada. Sin embargo, dado que la mayoría de estas proteasas

actúan sobre residuos de serina, un inhibidor general de serino-proteasas podría aumentar simultáneamente la abundancia de más de una IGFBP.

- **Proteasas para IGFBP-3.** Estas proteasas son las mejor caracterizadas. La IGFBP-3 circulante puede sufrir una proteólisis parcial mientras se encuentra formando parte del complejo ternario de 150 kDa (Hossenlopp 1990). Como resultado se obtiene un fragmento de 30 kDa, que tiene una afinidad 20 veces menor para IGF-I, y 3 veces menor para IGF-II, que la IGFBP-3 intacta. Las proteasas involucradas en este proceso parecen ser las metaloproteasas MMP-1 y MMP-3 (Fowlkes 1994), y su actividad está aumentada en situaciones que requieren una mayor biodisponibilidad de IGF (por ejemplo, la gestación). También se han descrito proteasas para IGFBP-3 en diversos tejidos y fluidos corporales. En particular, el antígeno prostático específico (PSA) es una calicreína presente en el líquido seminal humano con actividad proteolítica para IGFBP-3 (Cohen 1992).
- **Proteasas para IGFBP-4 y -5.** Estas proteasas son también serino-proteasas, pero no son metaloproteasas dado que no se activan con Zn. Se ha encontrado que la proteólisis de IGFBP-5 potencia la actividad de IGF-I en cultivos de osteoblastos, pudiendo ser un mecanismo relevante en la regulación de la formación ósea (Thraillkill 1995a). En el caso de IGFBP-4, la proteína ligadora inhibitoria por excelencia en el tejido óseo, la situación es más compleja: su proteasa específica es secretada al medio extracelular en forma inactiva, y precisa una interacción directa con IGF-II para poder activarse y degradar a la IGFBP-4 (Durham 1994). Así, se postula que en condiciones basales las células óseas co-secretan IGFBP-4 y su proteasa latente. En esta situación la IGFBP-4 pericelular limita el acceso de IGF a su receptor de tipo I. La secreción de IGF-II (por la misma célula o células cercanas) inicia una rápida inducción de la proteólisis de IGFBP-4, incrementando así el IGF local disponible para interactuar con sus receptores de tipo I. Estas IGFBP reguladas por IGF juegan un papel importante y aún poco definido en la biología celular de las células óseas humanas.

Complicaciones óseas de la Diabetes mellitus.

En pacientes con Diabetes mellitus, las alteraciones óseas observadas con mayor frecuencia corresponden a cambios en el contenido o densidad mineral ósea (DMO), tanto de la columna vertebral como del esqueleto periférico o apendicular. Estos cambios en la DMO dependen de varios factores, entre ellos del tipo de Diabetes en cuestión (Rosenbloom 1997), y pueden deberse a alteraciones metabólicas, vasculares, nutricionales, locales (factores de crecimiento y citoquinas) y sistémicas (hormonales).

Existe un acuerdo amplio en la literatura respecto a la disminución de la DMO observada frecuentemente en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1, especialmente en el período de crecimiento longitudinal activo (Levin 1976, Santiago 1977, Rosenbloom 1977). Se define esta situación como **osteopenia** cuando la DMO disminuye un 10% o mas por debajo del valor control (según edad, sexo y origen étnico). Así, la mayoría de los estudios publicados han demostrado la presencia de osteopenia en un 16-54% de los pacientes estudiados con Diabetes mellitus tipo 1. La osteopenia presente en estos pacientes no se debería a una pérdida directa de la masa ósea ya formada, sino mas bien a una falla en la incorporación de hueso nuevo a nivel del endostio (Wiske 1982). Así, estos autores encontraron una disminución en el volumen fraccional correspondiente al hueso cortical, pero con un diámetro sub-periosteal normal. Esta osteopenia se asocia con un retraso en el crecimiento somático de dichos pacientes, pero aparentemente no involucra un mayor riesgo de sufrir fracturas óseas. Aunque algunos resultados son contradictorios, dicha osteopenia no parece mostrar una especificidad de género, es decir que afectaría a ambos sexos por igual (Levin 1976, Santiago 1977, Rosenbloom 1977). Algunos trabajos sugieren que la pérdida de DMO (observada principalmente durante la etapa de crecimiento somático activo) se hace menos evidente en la edad adulta, lo cual podría indicar una recuperación de la masa ósea en algunos casos (McNair 1978). Por otro lado, otros estudios han encontrado una disminución significativa tanto en la DMO vertebral como en la masa ósea promedio del esqueleto periférico, en individuos adultos con Diabetes mellitus tipo 1 de larga data (Auwerx 1988).

En pacientes con Diabetes mellitus tipo 2, los resultados hallados en la bibliografía son contradictorios. En el primer trabajo publicado sobre el tema, el 60% de 101 pacientes estudiados presentaba osteopenia (Levin 1976). Estos autores

encontraron además que en muchos casos la disminución de la DMO ya estaba presente en el momento de diagnóstico de la Diabetes (lo cual no sería extraño dada la presentación insidiosa de este tipo de Diabetes, pero impide descartar causas constitutivas no metabólicas de la osteopenia en el grupo de pacientes estudiados). Resultados similares se encontraron en un grupo de 168 pacientes japoneses con Diabetes tipo 2, en los cuales un 26% presentaba osteopenia, y un 12% disminución severa de la DMO. Estos autores notaron que la osteopenia de los pacientes coexistía con un volumen fraccional de hueso cortical normal. Así, sugirieron que la preservación del volumen cortical óseo podría explicar la aparente ausencia de un aumento en el riesgo de fracturas en este tipo de osteopenia (Ishide 1985). Sin embargo, se hallaron tendencias opuestas cuando se estudiaron 138 pacientes belgas y 578 pacientes holandeses con Diabetes tipo 2 (De Leeuw & Abs 1977, Van Daele 1995). En ambos casos se encontró un aumento significativo de la DMO en un 30-40% de los pacientes, respecto de sus respectivas poblaciones control, que era independiente de otros factores con reconocido efecto sobre la masa ósea tales como la edad, obesidad, uso de estrógenos, sedentarismo, etc.

Todos los estudios sobre la DMO realizados en pacientes diabéticos de tipo 1 y tipo 2 mencionados hasta ahora, tuvieron un diseño de corte transversal. Hasta la fecha, se han publicado solamente dos trabajos prospectivos referidos a este tema (es decir, de corte longitudinal). En el primero de dichos estudios, en el cual se siguió a un grupo de pacientes adultos jóvenes con Diabetes tipo 1 durante 11 años, se encontró que la DMO del esqueleto apendicular disminuía significativa- y progresivamente a lo largo de todo el tiempo de observación (Mathiassen 1990). En el segundo trabajo publicado, se evaluó durante 12,5 años la DMO apendicular y vertebral en un grupo de 109 pacientes diabéticos (46 tipo 1, 63 tipo 2) (Krakauer 1995). Los resultados de DMO al inicio de este estudio mostraron en promedio una osteopenia significativa tanto en los pacientes con Diabetes tipo 1 como en los pacientes tipo 2. Sin embargo, el seguimiento en el tiempo de los pacientes mostró resultados diferentes según el tipo de Diabetes que presentaban: los de tipo 1 mantuvieron o empeoraron su osteopenia a través del tiempo (el empeoramiento se relacionó con la presencia de retinopatía severa o moderada), mientras que los de tipo 2 paulatinamente incrementaron su DMO hasta normalizarla o

incluso superar los valores de referencia al final del estudio. Adicionalmente, a varios pacientes que presentaban osteopenia al inicio del estudio se les realizó una biopsia ósea con marcación previa, para estimar parámetros de histomorfometría ósea dinámica (es decir, de formación y resorción ósea). Los resultados mostraron una reducción del 75% en la velocidad de formación ósea. Esta reducción se debía a una disminución del 70% en la velocidad de aposición de la matriz ósea proteica, y a un retraso temporal en la mineralización de dicha matriz. Los parámetros de resorción también estaban alterados: coexistía una leve disminución en el número de osteoclastos activos, con un leve aumento de la superficie ósea erosionada (esto posiblemente refleje una actividad resortiva previa que no fue seguida por una formación ósea adecuada). Otros parámetros, como volumen óseo y grosor trabecular, estaban dentro de los límites normales.

En base a los resultados de los dos estudios prospectivos mencionados, se ha propuesto una teoría unificada para explicar, al menos en parte, las complicaciones óseas en ambos tipos de Diabetes (Krakauer 1995) (**Figura 28**). En primer lugar, una alteración en el reclutamiento y/o funcionalismo de los osteoblastos en niños con Diabetes de tipo 1 (que se manifiesta como una reducción en las velocidades de formación ósea y aposición de matriz proteica) provoca una acumulación subnormal de hueso durante el período de crecimiento esquelético antes del cierre de las epífisis. En segundo lugar, ciertos efectos causados por un control metabólico deficiente en pacientes con Diabetes de tipo 1, tales como acidosis e hipercalciuria, tenderían a incrementar la resorción ósea. Si esto ocurriera antes del cierre de las epífisis, reduciría mas aún la acumulación ósea; si ocurriera luego del cierre, atenuaría la consolidación ósea e incluso podría inducir una pérdida neta de masa ósea. En tercer lugar, durante el período de pérdida neta fisiológica de masa ósea (es decir, en la edad avanzada), es esperable que la disminución inducida por Diabetes en el remodelado óseo, tenga un efecto protector sobre el descenso de la DMO edad-dependiente. Esto se comprende si se considera que la cantidad de tejido óseo perdido en un sitio en particular (por encima de los 45 años de edad), depende tanto del número de ciclos de remodelado durante el período de observación (que puede variar en un rango amplio), como del déficit promedio

de hueso al completarse cada uno de los ciclos de remodelado (que varía en un rango mucho mas estrecho).

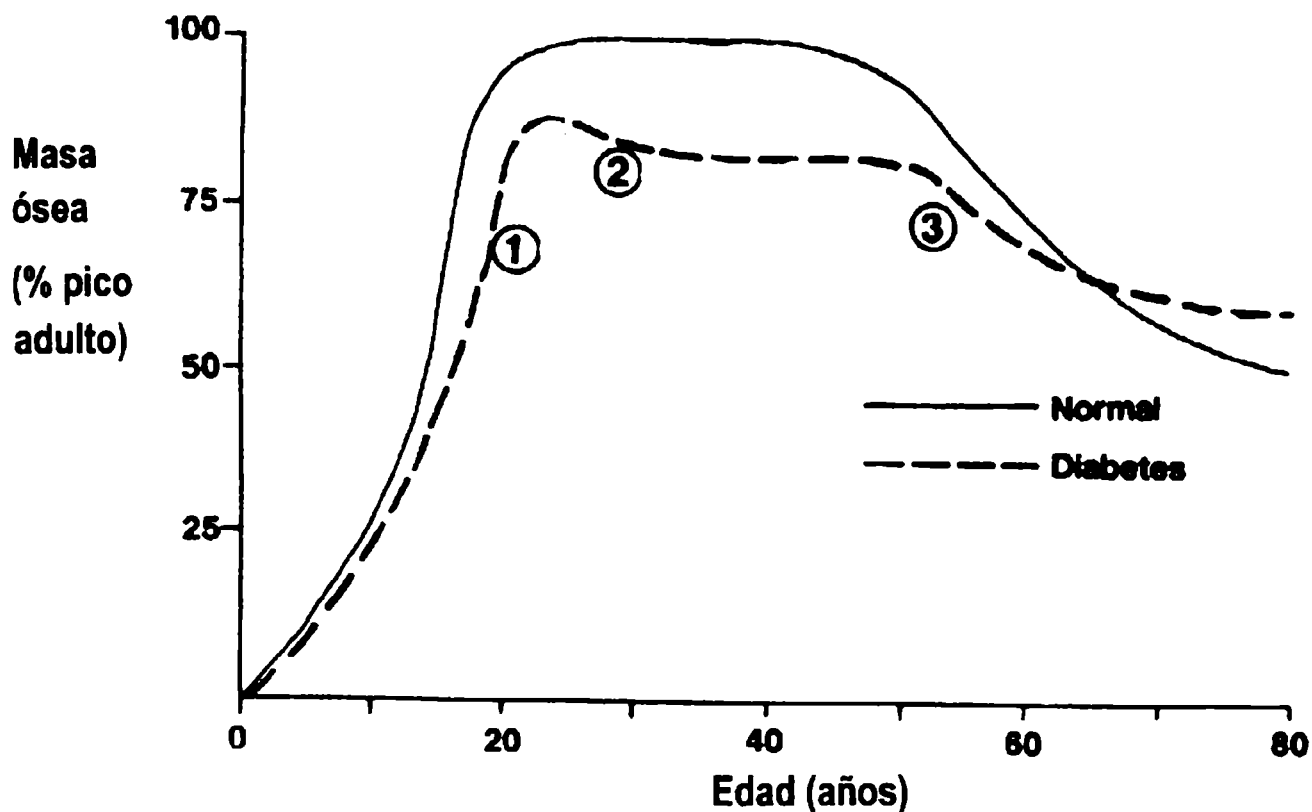


Figura 28. Modelo para los efectos inducidos por Diabetes mellitus sobre el tejido óseo en diferentes etapas de la vida. Cada línea representa la masa ósea en función de la edad, tanto para individuos normales (línea continua) como para pacientes diabéticos (línea punteada). En el estado no diabético existe una acumulación neta de hueso que finaliza alrededor de los 25 años de edad, seguido por una meseta hasta los 40 años, y a mayor edad una pérdida neta de masa ósea (esta pérdida inicialmente es lenta, se acelera luego de los 50 años, y finalmente vuelve a aminorar por encima de los 70 años). En pacientes diabéticos existe una acumulación subnormal de hueso, que es más evidente durante el crecimiento activo de la adolescencia (1), pero que también se puede manifestar en adultos jóvenes a través de un período prematuro de pérdida ósea neta e hipercalciuria, asociado con descompensación metabólica aguda y acidosis (2). En individuos diabéticos mayores (en especial con Diabetes tipo 2), existe un retraso tanto en la edad de inicio como en la velocidad (3) de la pérdida de masa ósea edad-dependiente.

Los efectos múltiples y opuestos que ejerce la Diabetes mellitus sobre el tejido óseo, explican la dificultad que existe en determinar el posible rol de esta enfermedad crónica en la patogénesis de fracturas óseas. En un individuo que desarrolla su Diabetes a una edad temprana, a largo plazo podrían llegar a predominar tanto los efectos perdedores de masa ósea (sobre el esqueleto en crecimiento longitudinal activo) como los efectos conservadores de hueso (en el esqueleto maduro), por lo cual podrían discrepar los resultados obtenidos en estudios transversales sobre una misma población observada en diferentes tiempos. Por otro lado, la presencia de neuropatía y angiopatía diabética podrían aumentar el riesgo de fractura de cadera por una mayor probabilidad de caídas, independientemente de la DMO. Finalmente, una reducción en el remodelado óseo puede incrementar la fragilidad del hueso, independientemente de la DMO, debido a la acumulación de micro-daños causados por fatiga del material (todas las estructuras que soportan cargas cíclicas repetitivas están sujetas a daños por fatiga). Normalmente, el remodelado óseo alcanza a reparar los micro-daños, pero si esta reparación es incompleta o tardía, puede contribuir al riesgo de fracturas de cadera, o al riesgo de fracturas de estrés en el esqueleto apendicular o periférico. De hecho, este último tipo de fracturas suelen aparecer frecuentemente en los metatarsianos de pacientes diabéticos de edad avanzada, y tienden a soldar muy lentamente.

Estudios recientes realizados en modelos animales, han planteado la posibilidad de que la glicosilación no enzimática de proteínas del hueso pueda contribuir a la patogénesis de las alteraciones óseas asociadas con la Diabetes. En uno de dichos estudios (Tomasek 1994), se encontró que la fluorescencia ligada al colágeno, una medida de los niveles de AGE, aumentaba significativamente en el hueso cortical de ratas diabéticas y/o envejecidas. En otro estudio realizado en ratas con Diabetes (Locatto 1993), se demostró un incremento tanto en el grado de glicación como en la resistencia a la hidrólisis del colágeno óseo. Por otro lado, un tercer grupo de investigadores ha encontrado que la formación *in vitro* de AGE sobre una matriz ósea proteica, disminuye su capacidad para inducir la formación *in vivo* de hueso endocondral en animales no diabéticos (Fong 1993). Toda esta evidencia sugiere que la acumulación de AGE sobre proteínas de la matriz extracelular ósea, promovida por un estado de hiperglucemia crónica, podría estar involucrada en las complicaciones óseas de la Diabetes.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Analizar la hipótesis de que proteínas modificadas por AGE ejercen un efecto directo sobre el desarrollo de osteoblastos en cultivo.

Objetivos Específicos.

- Establecer un modelo de células osteoblasto-símiles en cultivo, en diversos estadios de desarrollo, que se asemejen al proceso de diferenciación osteoblástica *in vivo*.
- Preparar y caracterizar diversas proteínas con diferente grado de glicosilación no enzimática (glicación).
- Estudiar el efecto de la glicación sobre diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales de dichas proteínas.
- Investigar el efecto de las proteínas glicadas sobre el crecimiento y desarrollo de células osteoblasto-símiles en cultivo.
- Analizar la presencia, características funcionales y regulación de sitios de unión específicos para productos de glicación avanzada (AGE), en células osteoblasto-símiles en cultivo.
- Investigar el papel del sistema de los factores de crecimiento insulino-símiles (IGF-I e IGFBP) en los efectos inducidos por AGE sobre células osteoblasto-símiles en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

- ◆ Acetato de celulosa gelatinizado (Chemetron, Milano, Italia)
- ◆ Ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Ácido tricloroacético (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Acrilamida (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ α -naftil-fosfato de sodio (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Aminoguanidina (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Anticuerpo policlonal de conejo UBK487 contra IGF-I humano (donación del Dr. LE Underwood, Universidad de Carolina del Norte, USA)
- ◆ β -glicerol-fosfato (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Bio-Gel P-10 (BioRad Laboratories, CA, USA)
- ◆ $^{45}\text{CaCl}_2$ (DuPont, USA)
- ◆ Cartuchos de filtración de 10 kDa de corte Centricon (Amicon Inc., MA, USA)
- ◆ Células de calvaria de ratón MC3T3E1 (ATCC, USA)
- ◆ Células de osteosarcoma de rata UMR106 (ATCC, USA)
- ◆ Cloramina-T (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Coomasie brilliant blue G-250 (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Coomasie brilliant blue R-250 (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Cristal Violeta (BDH Laboratories, UK)
- ◆ Dodecil-sulfato de sodio (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Fast Blue RR (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Fosfatasa alcalina intestinal bovina (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Fructosa (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Glucosa (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Glucosa-6-fosfato (Sigma Chemical Co., MO, USA)

- ◆ Glutaraldehído (Fluka, Alemania)
- ◆ HEPES (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ ¹²⁵I (New England Nuclear, MA, USA)
- ◆ IGF-I recombinante humano (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Iodo-Gen (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Marcadores de peso molecular precoloreados (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Material descartable para cultivo celular (Nunc y/o Corning)
- ◆ Medio de cultivo DMEM (Gibco, Life Technologies, NY, USA)
- ◆ Medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, NY, USA)
- ◆ Papel de nitrocelulosa (MSI Inc., MA, USA)
- ◆ Para-nitro-fenil-fosfato de sodio (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Película fotográfica Kodak XAR-5 (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Penicilina / Estreptomicina (Laboratorios Richet, Argentina)
- ◆ Ribosa (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Sephadex G-25 (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Sephadex G-50 (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Suero fetal bovino (Gen, Buenos Aires, Argentina)
- ◆ Test Combination Fructosamine (Boehringer Mannheim, Argentina)
- ◆ Tripsina / EDTA (Gibco, Life Technologies, NY, USA)
- ◆ Tris-HCl (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Triton X-100 (Sigma Chemical Co., MO, USA)
- ◆ Tween-20 (Sigma Chemical Co., MO, USA)

Otras drogas y reactivos de fuente comercial y grado analítico

Glicosilación no enzimática (glicación) de proteínas.

(a) Albúmina sérica bovina.

Una preparación de albúmina sérica bovina (ASB) libre de ácidos grasos disuelta en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH 7,40, se incubó en condiciones

estériles con glucosa-6-fosfato 100 mM a 37 °C durante seis semanas, en presencia del inhibidor de proteasas fenil-metil-sulfonil-fluoruro (1,5 mM) y los antibióticos penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 µg/mL), como se ha descrito previamente (Vlassara 1985b). Una preparación de ASB control se incubó en las mismas condiciones, pero sin glucosa-6-fosfato. Al término de las incubaciones, tanto la ASB control como la ASB glicada se separaron de las moléculas de menor peso molecular no unidas covalentemente, por un procedimiento de centrifugación / filtración utilizando cartuchos filtrantes Centricon que poseen un corte (cut-off) de 10 kDa.

(b) Fosfatasa alcalina intestinal bovina.

Una preparación de fosfatasa alcalina (FAL) intestinal bovina (10 mg/mL) disuelta en PBS pH 7,40 que contenía fenil-metil-sulfonil-fluoruro 1,5 mM y antibióticos (penicilina 100 UI/mL – estreptomicina 100 µg/mL), se incubó a 37 °C durante 1, 7, 14 o 35 días, con o sin el agregado de diferentes monosacáridos. Los azúcares utilizados, que se probaron a una concentración de 100 mM, fueron glucosa, fructosa y ribosa, los cuales se seleccionaron en base a sus diferentes velocidades de glicosilación (Bucala 1992). En ciertos experimentos se incluyó aminoguanidina 250 mM en la mezcla de incubación, para examinar la posible participación de los AGE en las alteraciones estructurales y funcionales que pudieran aparecer en la FAL como consecuencia de su glicación. En otros experimentos se realizó la incubación durante 5 semanas en presencia de glucosa 30 mM, para evaluar si la posible modificación en los parámetros de la FAL inducidos por la glicación, dependen de la dosis del azúcar utilizado. Al final de cada período de incubación, las alícuotas de FAL se concentraron y separaron de las moléculas de menor peso molecular no unidas covalentemente, por un procedimiento de centrifugación / filtración utilizando cartuchos filtrantes Centricon que poseen un corte (cut-off) de 10 kDa.

Caracterización del grado de glicación.

(a) Fructosamina.

La formación de productos de glicación tempranos sobre proteínas (productos de Amadori) se determinó por medio del método de la fructosamina (Johnson 1982), a 37 °C y pH 10,8. Este método se basa en la capacidad reductora del producto de Amadori sobre el compuesto azul de nitro-tetrazolio, induciendo la formación de un producto rojo cereza que presenta un máximo de absorbancia a 530 nm, y utiliza un estándar de deoxi-morfolino-fructosa. La concentración de proteínas se determinó colorimétricamente, con un reactivo que utiliza azul brillante de Coomassie G-250 (Bradford 1976). Los resultados se expresaron como μmol de fructosamina por gramo de proteína.

(b) Fluorescencia.

La presencia de productos de glicación avanzada de proteínas (AGE), se evaluó por medio de la determinación de un espectro de fluorescencia, observándose la aparición de un característico máximo de emisión de fluorescencia a 420 nm frente a una excitación de 340 nm (Monnier 1981). Esta medida se realizó con diluciones adecuadas de alícuotas de proteínas con creciente grado de glicación, utilizando un espectrofluorómetro Aminco-Bowman SPF 100 equipado con un sistema de condensación de espejos elipsoidales y un fotómetro Aminco. La fuente de excitación utilizada fue una lámpara de arco de xenón de 150W, y el detector empleado fue un tubo fotomultiplicador RCA 4837. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 x 1 cm, y los espectros se registraron en un registrador x-y Linseis 1600. Se utilizó un patrón de quinina (1 $\mu\text{g/mL}$) como estándar de intensidad de fluorescencia, para calibrar y monitorear el funcionamiento del espectrofluorómetro. La concentración proteica de las muestras se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford. Los valores de fluorescencia de las muestras se expresaron como % de fluorescencia relativa a la quinina por miligramo de proteína.

Análisis estructural y funcional de la FAL glicada.

(a) Actividad específica de fosfatasa alcalina.

Se estudiaron alícuotas de FAL glicadas o no glicadas, incubando aproximadamente 0,001 $\mu\text{g/mL}$ de FAL con para-nitro-fenil-fosfato de sodio (pNPP) 5 mM en un buffer glicina 55 mM / MgCl_2 0,55 mM pH 10,5, a 37 °C durante 20 minutos. La producción de para-nitro-fenol (pNP) se determinó midiendo absorbancia a 405 nm (Cortizo & Etcheverry 1995). Los niveles de proteínas en las muestras se evaluaron según el método de Bradford. Los resultados se expresaron como nmol pNP / min x μg proteína.

(b) Separación de FAL por métodos electroforéticos.

Para evaluar posibles cambios en la movilidad electroforética de la FAL durante su glicación, alícuotas correspondientes a 1 μg de proteína se sometieron a una electroforesis sobre acetato de celulosa gelatinizado en un buffer barbital / barbital sódico pH 8,5, a una diferencia de potencial constante de 200 V durante 50 minutos. La reacción enzimática de la FAL se utilizó luego para evidenciar las bandas. Así, se colocó el gel sobre un soporte de agar que contenía α -naftil-fosfato de sodio como sustrato, y se lo dejó actuar 30 minutos a 37 °C. El producto formado sobre el gel de acetato de celulosa, α -naftol, se dejó reaccionar con Fast Blue RR (también incluido en un soporte de agar) durante 20 minutos a 25 °C. Los geles de acetato de celulosa se transparentizaron, y las bandas coloreadas correspondientes a la FAL se evaluaron por análisis densitométrico y determinación de R_f (movilidad electroforética relativa al frente de corrida) (Rhone & Mizuno 1972).

Para evaluar posibles cambios en los patrones de peso molecular de la FAL como consecuencia de su glicación, esta proteína se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), usando un buffer Tris-glicina pH 8,6 (Laemmli 1970). Alícuotas de FAL con diferentes grados de glicación se llevaron a ebullición durante 3 minutos y luego se cargaron sobre un gel de acrilamida de 12,5%. Luego de la electroforesis, los geles se fijaron y colorearon con 0,1% de azul brillante Coomassie R-250. Se corrieron marcadores de peso molecular precoloreados en paralelo.

Cultivos celulares.

(a) Células UMR106.

UMR106, una línea celular de osteosarcoma de rata, expresa varios marcadores de fenotipo osteoblástico. Estos incluyen la expresión de fosfatasa alcalina ósea, la síntesis de colágeno de tipo I, y la regulación de niveles intracelulares de AMP cíclico por PTH (Partridge 1983). Estas células se crecieron en frascos de plástico de 75 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂, en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 µg/mL). Después de 5 a 7 días (el tiempo necesario para que lleguen a subconfluencia), las células se cosecharon usando tripsina-EDTA para resuspenderlas. Para comenzar los experimentos las células resuspendidas se plaquearon en platos de 24 o 48 pocillos, a una densidad de plaqueo de 2,5 x 10⁴ células / pocillo. Luego se cultivaron en DMEM – 10 % SFB hasta llegar nuevamente a subconfluencia, se privaron de suero y se sometieron a las condiciones experimentales indicadas mas abajo.

(b) Células MC3T3E1.

Las células osteoblásticas MC3T3E1 corresponden a una línea celular no transformada, derivada de calvaria de ratón. Estudios previos han demostrado que el cultivo de estas células en un medio suplementado con β-glicerofosfato 5 mM y ácido ascórbico 25 mg/L, induce su progresión a través de etapas de desarrollo muy similares a las observadas en cultivos primarios de osteoblastos. Así, durante los primeros días de cultivo las células proliferan activamente (fase preosteoblástica). Alrededor del día 10 de cultivo sufren un arresto en la proliferación y comienzan a expresar marcadores de fenotipo osteoblástico como FAL y colágeno de tipo I (osteoblastos diferenciados post-mitóticos), y a secretar proteínas de matriz extracelular. A partir del día 20 de cultivo comienzan a mineralizar la matriz extracelular que sintetizaron (fase mineralizante del cultivo). Finalmente, alrededor del día 30 de cultivo mueren por apoptosis (Quarles 1992). En estos estudios, las células MC3T3E1 se crecieron en frascos de plástico de 75 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂, en DMEM suplementado con 10% SFB, penicilina (100 UI/mL)

y estreptomina (100 µg/mL). Después de 4 a 6 días (el tiempo necesario para que lleguen a subconfluencia), las células se cosecharon usando tripsina-EDTA para resuspenderlas. Para comenzar los experimentos, las células resuspendidas se plaquearon en platos de 24 o 48 pocillos, a una densidad de plaqueo de $2,0 \times 10^4$ células / pocillo. Luego se cultivaron en DMEM – 10% SFB suplementado con β -glicerofosfato 5 mM y ácido ascórbico 25 mg/L, durante 3 días (fase de proliferación), 15 días (fase de diferenciación) o 25 días (fase de mineralización), cambiando el medio de cultivo cada 2 días. En cada caso, las células se privaron de suero y se sometieron a las condiciones experimentales indicadas mas abajo.

(c) Preparación de homogenados y fracciones subcelulares.

Para preparar homogenados celulares crudos, se utilizaron células UMR106 y MC3T3E1 subconfluentes replicándose activamente en frascos de 75 cm². Estos cultivos se lavaron con PBS, se desprendieron por raspado, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron 5 minutos a 1000 x g. El sobrenadante se descartó, y el sedimento celular se solubilizó en Triton X-100 0,1%. Se midió la concentración total de proteínas en estos homogenados utilizando el método colorimétrico de Bradford.

Para la preparación de fracciones subcelulares enriquecidas en membranas, se utilizaron células confluentes UMR106 y MC3T3E1 creciendo en frascos de 150 cm². Los cultivos se lavaron con PBS, se resuspendieron en un buffer de homogeneización (Tris 25 mM, sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, fenil-metil-sulfonil-fluoruro 1 mM, pH 7,40) y se sonicaron tres veces durante 15 segundos. Los homogenados resultantes se centrifugaron a 1.000 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante obtenido se re-centrifugó a 10.000 x g / 4 °C durante 30 minutos. Las membranas se aislaron luego de este nuevo sobrenadante, por centrifugación a 105.000 x g / 4 °C durante 60 minutos. El sedimento resultante, enriquecido en membranas, se solubilizó en Triton X-100 0,1% / PBS. La concentración proteica de estas fracciones se determinó por el método de Bradford.

Ensayos de proliferación celular.

La proliferación celular se estimó por medio del ensayo mitogénico del cristal violeta (Okajima 1992). Este ensayo se basa en que el cristal violeta es incorporado por ciertas estructuras sub-celulares –particularmente mitocondrias- de las células metabólicamente activas, pero no por células inactivas. En nuestros experimentos, los cultivos se fijaron con glutaraldehído 5% y se colorearon con cristal violeta 0,5%. El colorante incorporado por las células vivas, se extrajo con una solución compuesta en un 70% por un buffer glicina / HCl pH 3,0 y en un 30% por metanol. La absorbancia del extracto se midió a 540 nm. Previamente se ha demostrado que los valores de absorbancia obtenidos en este ensayo correlacionan en forma directa con el recuento de células vivas ($r = 0,897$; $p < 0,001$) (Cortizo & Etcheverry 1995).

Ensayos de diferenciación celular.

(a) Actividad específica de FAL.

Con el objeto de medir la actividad celular específica de FAL, la monocapa de células en cultivo se solubilizó con Triton X-100 0,1%. Se utilizaron alícuotas de este extracto celular total para dosar la concentración de proteínas por el método de Bradford. La actividad de FAL del extracto se determinó luego por incubación de una alícuota del mismo, con el sustrato para-nitro-fenil-fosfato de sodio (pNPP) 5 mM en un buffer glicina 55 mM / $MgCl_2$ 0,55 mM pH 10,5, a 37 °C durante un tiempo adecuado. La producción de para-nitro-fenol (pNP) se determinó midiendo absorbancia a 405 nm (Cortizo & Etcheverry 1995). La actividad celular específica de FAL se expresó en $\mu\text{mol pNP} / \text{min} \times \text{g proteína celular}$. Se ha establecido anteriormente a la FAL como un marcador de fenotipo osteoblástico maduro, y dicho método ha sido utilizado extensamente para evaluar el grado de diferenciación en este tipo de cultivos (Stein & Lian 1993, Cortizo & Etcheverry 1995).

(b) Captación celular de calcio.

La captación celular de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se determinó por medio de la incubación de células en cultivo con $^{45}\text{CaCl}_2$ (28 Ci / mmol) 0,5 $\mu\text{Ci} / \text{mL}$, a 37 °C durante 30 minutos. Después de

esta incubación, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se solubilizaron luego con Triton X-100 0,1%. Una alícuota de cada extracto se utilizó para la determinación de proteínas por el método de Bradford, y el resto del extracto se empleó para medir radiación beta con un contador de centelleo líquido (Quarles 1992).

Ensayos de mineralización celular.

La mineralización de la matriz extracelular se investigó en el caso de células MC3T3E1 luego de 15 y 25 días de cultivo, siguiendo la técnica de von Kossa (Aronow 1990). Las células en cultivo se fijaron con formalina neutra tamponada al 10%, y se incubaron con una solución de AgNO_3 3% durante 30 minutos. La presencia de nódulos minerales extracelulares se evaluó microscópicamente, utilizando un microscopio invertido.

Ensayos de receptores para AGE.

(a) Marcación de AGE-ASB con ^{125}I .

La albúmina sérica bovina modificada por productos de glicación avanzada (AGE-ASB), se marcó radioactivamente con ^{125}I libre de carrier por el método de Iodo-Gen (Fraker & Speck 1978). Así, 30 μg de AGE-ASB disuelta en PBS se incubaron con 0,5 mCi de ^{125}I libre de carrier en un vial recubierto por 1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-difenilglicolurilo (Iodo-Gen), a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para separar el ^{125}I libre del unido a proteínas, la muestra se fraccionó por una cromatografía de exclusión molecular con una columna de Sephadex G-25. La fracción correspondiente al ^{125}I -AGE-ASB se purificó mas aún con una columna de Sephadex G-50 de 50 mL, hasta que >98% de la radioactividad fuera precipitable con ácido tricloroacético. La concentración proteica de las fracciones se determinó por el método de Bradford, usando ASB como estándar. La radioactividad específica del ^{125}I -AGE-ASB obtenido en todos los casos osciló entre 1,1 - 1,8 x 10⁴ cpm / ng proteína.

(b) Correlación entre proteína celular y recuento celular.

Se determinaron curvas estándar para evaluar la correlación entre el recuento de células y el contenido de proteínas totales, tanto para la línea UMR106 como para las células MC3T3E1. Para tal fin, se tripsinizaron células confluentes creciendo en frascos de 75 cm², y se plaquearon en diluciones seriadas sobre platos de 24 pocillos (8, 4, 2 y 1 x 10⁴ células / pocillo, cada condición por triplicado). Las células se cultivaron luego con DMEM / 10% SFB / 5% CO₂ durante 48 horas a 37 °C. Finalmente las células fueron tripsinizadas (para su recuento en un hemocitómetro), o lavadas con PBS y lisadas con Triton X-100 0,1% (para la determinación de proteínas totales por el método de Bradford). Ambos parámetros fueron evaluados por regresión lineal, tanto para los osteoblastos MC3T3E1 ($r = 0,991$; $p < 0,001$) como para las células de osteosarcoma UMR106 ($r = 0,997$; $p < 0,001$).

(c) Ensayos de unión de ¹²⁵I-AGE-ASB.

Se realizaron ensayos de unión de radioligando con las células UMR106 y MC3T3E1 en diversas etapas de desarrollo, ambas cultivadas sobre platos de 48 pocillos. Estos estudios de desplazamiento se realizaron en 0,25 mL de un medio de unión (RPMI-1640, HEPES 25 mM, ASB 5 g / L, pH 7,40) a 4 °C, como se ha descrito previamente (Imani 1993). Las monocapas celulares se preincubaron durante 30 minutos con concentraciones crecientes de AGE-ASB no marcado (0 – 1.000 µg proteína / mL medio de unión), luego de lo cual se agregó a cada pocillo 10⁶ cpm de ¹²⁵I-AGE-ASB. Después de una incubación de 2 horas a 4 °C, se aspiró el sobrenadante y las monocapas celulares se lavaron tres veces con PBS / ASB 0,5% frío, y tres veces con PBS frío. Las células en cada pocillo se solubilizaron con 0,5 mL de Triton X-100 0,1%, y los extractos se transfirieron a tubos para la determinación de proteínas por el método de Bradford, y para la medida de la radioactividad asociada con un contador gamma. La unión no específica de ¹²⁵I-AGE-ASB se determinó en incubaciones paralelas en las cuales se agregó un exceso de AGE-ASB no marcado. La unión específica se definió como la diferencia entre la unión total (células incubadas con el radioligando y una cantidad conocida de AGE-ASB no marcado) y la unión no específica (como se definió mas arriba). En algunos experimentos, ¹²⁵I-AGE-ASB se coincubó con un exceso de ASB

control. La concentración de proteínas de los extractos se utilizó para estimar el número de células, por medio de las curvas estándar descritas mas arriba. Los datos obtenidos de estos ensayos de unión se sometieron a un análisis de Scatchard, a fin de determinar el número de receptores por célula, la constante de afinidad de dichos sitios de unión, y el error estándar asociado a la medida (Barsano & Baumann 1989).

(d) Ensayos de captación y degradación de ^{125}I -AGE-ASB.

Las células UMR106 y MC3T3E1 se cultivaron con DMEM / SFB 10% en platos de 24 pocillos, hasta alcanzar su confluencia. Las monocapas celulares se lavaron con RPMI-1640, y se incubaron a 37 °C durante 3, 6 y 24 horas con RPMI-1640 / ASB 0,5% / ^{125}I -AGE-ASB, con o sin un exceso de AGE-ASB no marcado. Luego de estas incubaciones se separó el medio correspondiente a cada pocillo, y en el mismo se determinó la radioactividad no precipitable por ácido tricloroacético. Se definió a la degradación específica de ^{125}I -AGE-ASB, como la diferencia entre este valor obtenido sin y con un exceso de AGE-ASB. Por otro lado, las monocapas celulares de cada pocillo se lavaron tres veces con PBS / ASB 0,5% frío, y tres veces con PBS frío. A continuación, las células se lisaron con 0,5 mL de Triton X-100 0,1%, y se determinó la radioactividad de los extractos celulares obtenidos. Se definió a la captación celular específica de ^{125}I -AGE-ASB, como la diferencia entre este valor obtenido sin y con un exceso de AGE-ASB (Imani 1993).

(e) Caracterización de los sitios de unión por *ligand blot*.

Con el objeto de realizar ensayos de *ligand blot* que contribuyeran a caracterizar los sitios de unión de AGE, se tomaron alícuotas correspondientes a 100 μg de proteína tanto de los extractos celulares totales como de las fracciones sub-celulares enriquecidas en membranas, obtenidas de las líneas celulares UMR106 y MC3T3E1. Estas alícuotas se resuspendieron en un buffer de muestra con β -mercaptoetanol (Laemmli 1970), y se hirvieron durante 3 minutos. Las muestras se sometieron luego a una SDS-PAGE con acrilamida al 12%, procesando en paralelo estándares de peso molecular precoloreados. Al finalizar la electroforesis, se realizó una electrotransferencia hacia un papel de nitrocelulosa durante 10 horas. El papel transfido se bloqueó durante 2 horas con una

solución de PBS que contenía ASB 1% y Triton X-100 0,1%. Luego del bloqueo, el papel se incubó a 4 °C durante 2 horas con ^{125}I -AGE-ASB solo (2×10^6 cpm/mL), o co-incubado con 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ASB o AGE-ASB no marcado. Al término de la incubación, el papel se lavó dos veces con la solución de bloqueo y tres veces con PBS, luego de lo cual se secó al aire. Finalmente, la nitrocelulosa se expuso a un film fotográfico con pantalla intensificadora a -70 °C durante 2-3 días, para su evaluación autorradiográfica (Skolnik 1991).

Ensayos de IGF-I.

(a) Marcación de IGF-I con ^{125}I .

Para lograr la radiomarcación del IGF-I, 2 μg de IGF-I recombinante humano y 1 mCi de ^{125}I se incubaron con cloramina-T 10 mg/L en PBS a temperatura ambiente (D'Ercole 1976), hasta lograr una eficiencia de incorporación >80%. Para separar el ^{125}I libre del unido a proteínas, la mezcla se fraccionó por una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Sephadex G-50 de 50 mL, eluyendo a pH 7,40 con un buffer PBS / Tween 20 / Heparina (Furlanetto 1977). Se midió la radioactividad de las fracciones eluidas, seleccionando las correspondientes al pico de ^{125}I -IGF-I. De esta forma, se obtuvo una actividad específica de 400-450 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$.

(b) Eliminación de las IGFBP previo al dosaje de IGF-I.

Como se describirá a continuación, se determinó por radioinmunoanálisis (RIA) la concentración de IGF-I en los medios de cultivo condicionados de células UMR106 y MC3T3E1, obtenidos en diversas condiciones experimentales. Sin embargo, para evitar interferencias en estas medidas, se procedió a eliminar previamente las IGFBP de las muestras por un método de gel-filtración ácida / centrifugación recientemente descrito (Mohan & Baylink 1995). Cada medio condicionado se secó en una centrifuga Speed-Vac de la firma Savant, se redisolvió en 100 μL de la solución de elución (ácido acético 1 M / NaCl 0,1 M) y se aplicó sobre una mini-columna cargada con 4 mL de Bio-Gel P-10 (tamaño de partícula entre 45 y 90 μM) hidratado con la solución de elución / ASB 1%. El

volumen muerto se descartó por centrifugación a 1.250 x g durante 5 minutos. A continuación se eliminaron las IGFBP por aplicación de 250 μ L de la solución de elución, y posterior centrifugación a 1.250 x g durante 5 minutos. El IGF-I se recuperó de la columna por elución / centrifugación con 1,5 mL de la solución de elución. Esta última fracción se neutralizó y se secó en una centrifuga Speed-Vac. Las muestras se almacenaron a -20 °C en estas condiciones hasta la realización del RIA para IGF-I.

Para validar este método en nuestras condiciones de ensayo, se le agregó 125 I-IGF-I a una muestra de suero diluida en solución de elución, previo a su extracción por este método. La muestra se aplicó luego a una columna y fue eluida por etapas, a través de sucesivas eluciones / centrifugaciones con 10 alícuotas de 50 μ L y luego 10 alícuotas de 250 μ L de solución de elución. En cada fracción recogida se midió tanto la radioactividad asociada a 125 I-IGF-I, como la capacidad total de unión de IGF-I (una estimación del nivel de IGFBP presentes en la fracción) (Mohan & Baylink 1995). De esta forma, se determinaron los volúmenes de solución de elución que separan óptimamente las IGFBP del IGF-I.

(c) Radioinmunoensayo para IGF-I.

Una vez que se encontraron libres de IGFBP, las muestras a estudiar se sometieron a un RIA para la cuantificación de IGF-I (Cortizo 1998). En este ensayo, se utilizó IGF-I recombinante humano como trazador (10.000 cpm 125 I-IGF-I/tubo) y como estándar (0,025–50 ng IGF-I/tubo). El anticuerpo anti-IGF-I (UBK487, policlonal de conejo) se utilizó a una dilución de 1:8.000. Diluciones adecuadas de las muestras o del estándar, se incubaron con una cantidad fija del anticuerpo y del trazador durante 72 horas a 4 °C. Al término de esta incubación, el complejo antígeno-anticuerpo formado se precipitó con polietilenglicol, midiéndose la radioactividad del precipitado con un contador gamma. En nuestras condiciones de trabajo, diluciones seriadas tanto del estándar de IGF-I como de un pool de medios condicionados libres de IGFBP, presentaban curvas de desplazamiento paralelas. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo para este método fueron de 10,9% y 13,0% respectivamente.

Ensayos de IGFBP.

(a) Capacidad de unión de IGF-I.

En ciertos casos se estimó el nivel global de sitios de unión para IGF-I en una muestra, a través de la medida de su capacidad de unión de IGF-I. Así, 50 μ L de la muestra se diluyeron adecuadamente y se incubaron con 125 I-IGF-I (40.000 cpm), con o sin el agregado de un exceso de IGF-I no marcado (10^{-7} M), durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los complejos IGF : IGFBP se precipitaron con polietilenglicol, midiéndose la radioactividad de ambos precipitados (con y sin exceso de IGF-I no marcado) con un contador gamma (Clemmons 1986). La diferencia entre estos dos valores de radioactividad se consideró proporcional a la cantidad total de sitios con afinidad por IGF-I de la muestra.

(b) Western ligand blot.

En otro orden, se determinó por Western ligand blot el patrón semi-cuantitativo de IGFBP presentes en los medios de cultivo condicionados de células UMR106 y MC3T3E1, obtenidos en diversas condiciones experimentales. Los medios condicionados se secaron en una centrifuga Speed-Vac, e inmediatamente antes de la electroforesis se resuspendieron en 50 μ L del buffer para muestras no reducido (Laemmli 1970). Las muestras se llevaron a ebullición durante 3 minutos, y se sembraron sobre un gel de poliacrilamida de 12,5% con SDS. En estas condiciones los IGF endógenos son disociados por el SDS, por lo cual el peso molecular obtenido corresponde sólo a la proteína ligadora. Las muestras se sometieron a electroforesis a 150 V, hasta que el frente de corrida llegó al fondo del gel. Se corrieron en paralelo marcadores de peso molecular precoloreados, y suero de rata. Las proteínas se transfirieron a un papel de nitrocelulosa con un buffer Tris 15 mM / glicina 120 mM / metanol 5% pH 8,30 (Hossenlopp 1986), a una intensidad de corriente constante de 50 mA durante 16–18 horas. El papel de nitrocelulosa se bloqueó luego a 4 °C (Hossenlopp 1986), y se incubó a 4 °C durante 24 horas con 125 I-IGF-I (2×10^5 cpm/mL) disuelto en un buffer con ASB 1% / Tween-20 0,1% / NaCl 150 mM / Tris-HCl 10 mM / pH 7,40. Al final de esta incubación, la membrana se lavó, se secó al aire y se sometió a autorradiografía exponiéndolo a un

papel fotográfico con una pantalla intensificadora, durante 2-5 días a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para medir la cantidad de ^{125}I -IGF-I unido a cada fracción de IGFBP, el papel de nitrocelulosa se cortó en trozos correspondientes a cada banda, los cuales se contaron con un contador gamma.

Análisis estadístico.

Se realizaron al menos tres experimentos independientes (cada uno por triplicado) para cada condición experimental. Cuando correspondía, los resultados se expresaron como la media \pm SEM (error estándar de la muestra). El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el test-*t* de Student o análisis de varianza, según correspondía para cada caso. Los análisis de correlación lineal se llevaron a cabo por medio del coeficiente de correlación de Pearson. Los datos obtenidos en los ensayos de unión de receptores para AGE, se sometieron a un análisis de Scatchard, a fin de determinar el error estándar asociado a la medida tanto del número de receptores por célula, como de la constante de afinidad de dichos sitios de unión.

RESULTADOS OBTENIDOS

11/11/2012
56982

En la primera etapa del presente trabajo, se prepararon y caracterizaron proteínas con un grado de glicación creciente. Asimismo, se estudió el efecto de la glicación de dichas proteínas sobre varias de sus propiedades funcionales y fisicoquímicas.

Glicación de albúmina sérica bovina (ASB).

La incubación de ASB con Glucosa-6-P 100 mM durante 6 semanas, indujo la formación de estructuras AGE unidas covalentemente a la proteína (AGE-ASB). La aparición de estas estructuras se determinó espectrofluorométricamente, y se muestran espectros de emisión de fluorescencia típicos para ASB control y AGE-ASB en la **figura 29**.

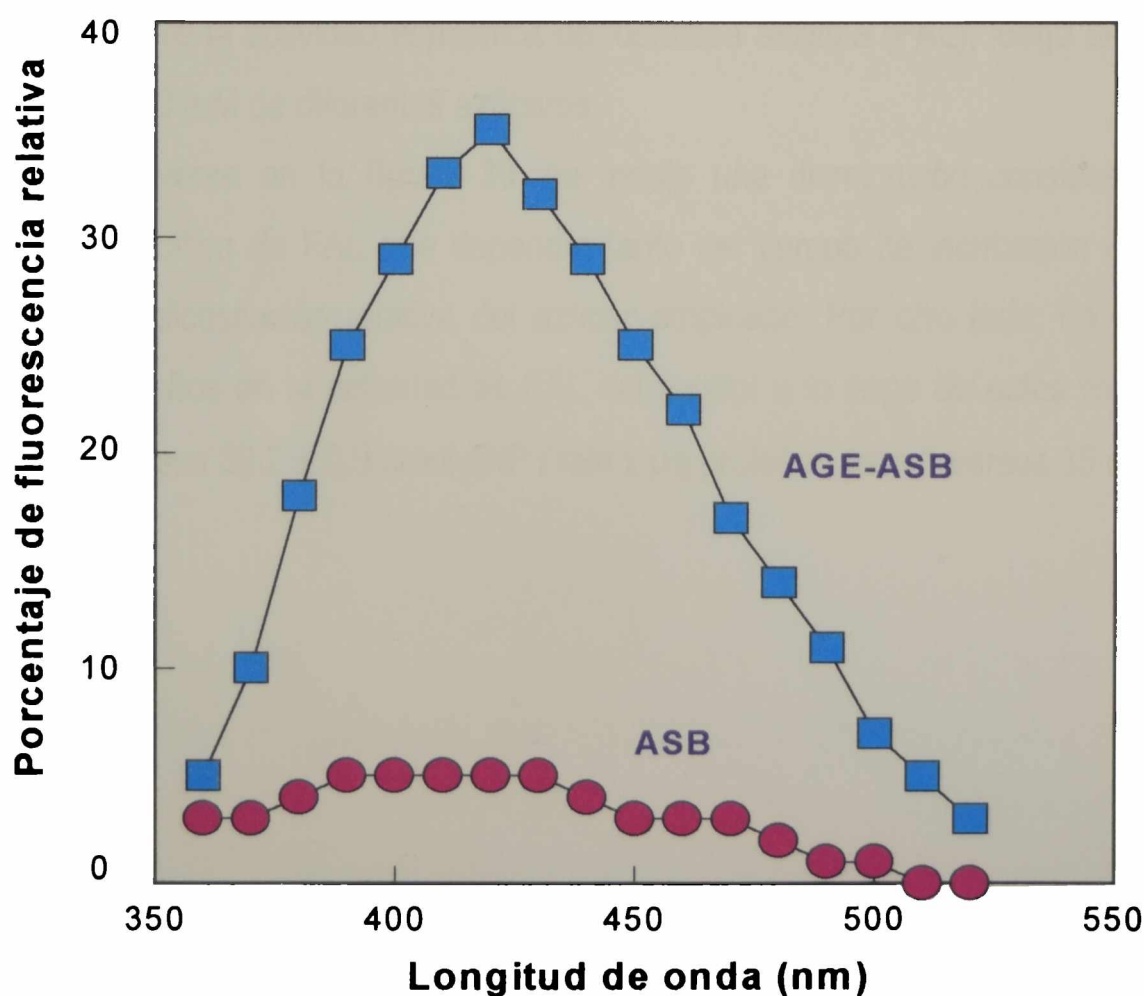


Figura 29. Espectro de emisión de fluorescencia de ASB control y AGE-ASB.

Cabe aclarar que este método fluorométrico no dosa con precisión las estructuras AGE terminales, ya que los fluoróforos más importantes de la familia de los AGE son sus compuestos intermediarios reactivos (Radoff 1991). Sin embargo, dicha metodología ha sido ampliamente utilizada como indicador global de la modificación irreversible de proteínas por AGE (Monnier & Cerami 1981, Monnier 1986, Vlassara 1994, Tomasek 1994).

Glicación de fosfatasa alcalina intestinal bovina.

Para obtener muestras de fosfatasa alcalina intestinal bovina con diferentes grados de glicosilación no enzimática, se incubaron alícuotas de dicha enzima con 100 mM de diferentes azúcares (glucosa, fructosa o ribosa) durante 1, 7, 14 o 35 días.

(a) Efectos sobre la actividad enzimática.

En una primera serie de experimentos se determinó el efecto de la glicosilación no enzimática sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina (FAL), luego de incubar la enzima con 100 mM de diferentes azúcares.

Como puede verse en la **figura 30**, se indujo una disminución considerable en la actividad específica de FAL que dependía tanto del tiempo de incubación como de la velocidad de glicosilación relativa del azúcar empleado. Por otro lado, se observaron cambios pequeños en la actividad de FAL del control a lo largo de estos experimentos ($45,3 \pm 0,7$ versus $39,2 \pm 0,9$ nmol pNP / min x μ g proteína; para 1 versus 35 días).

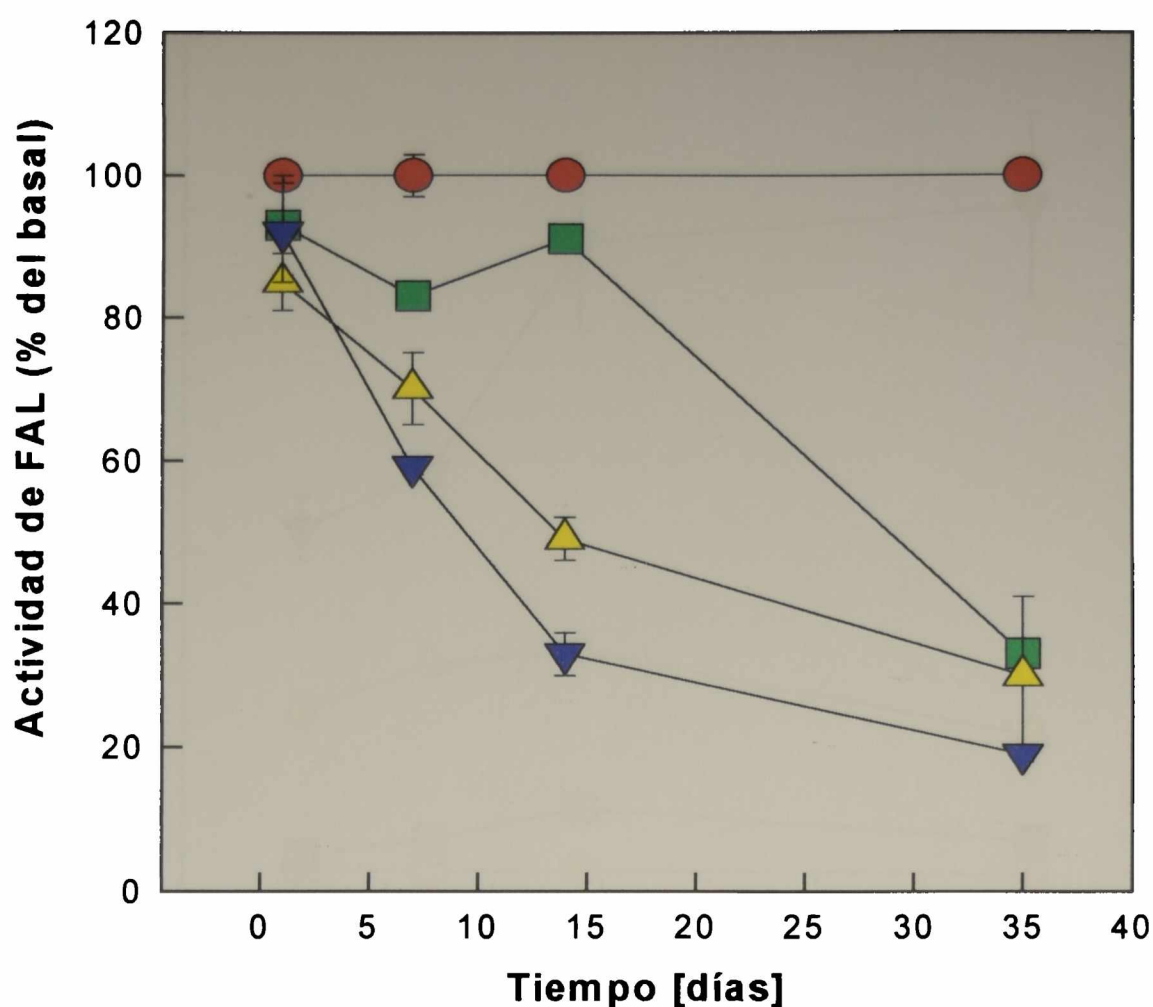


Figura 30. Efecto temporal de la glicosilación no enzimática sobre la actividad de FAL. Se incubó FAL en PBS solo (●), o PBS con 100 mM de glucosa (■), fructosa (▲) o ribosa (▼) a 37 °C por diferentes periodos de tiempo. Se retiraron alícuotas de las muestras a los tiempos indicados para dosarles la actividad enzimática de FAL. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad basal (control) para cada tiempo (media \pm SEM).

(b) Formación de productos de glicación tempranos.

Para evaluar la formación de productos de glicosilación no enzimática reversibles (productos de Amadori), se midió la concentración de fructosamina en todas las muestras de FAL. La **figura 31** muestra un aumento significativo en los niveles de fructosamina, que dependió tanto del tiempo de incubación como de la capacidad glicosilante de cada azúcar. En todos los casos, se observó que el incremento llegaba a un máximo a los 14 días de incubación. No se encontraron diferencias significativas en el grado de glicación temprana de las muestras control (31 ± 4 y 26 ± 5 μmol fructosamina / g proteína para 1 y 35 días, respectivamente).

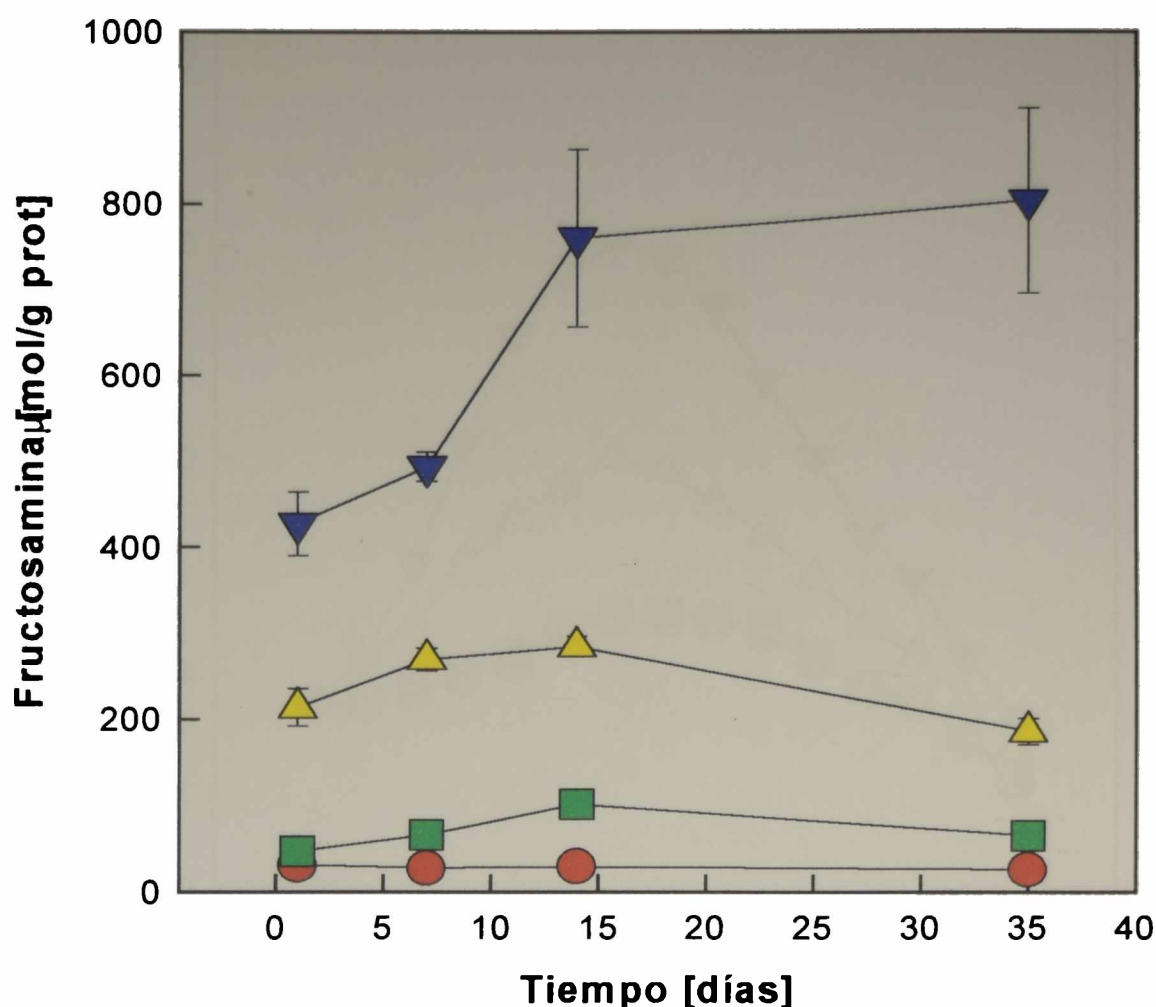


Figura 31. Efecto temporal de la glicosilación no enzimática sobre los niveles de fructosamina. Se incubó FAL en PBS solo (●), o PBS con 100 mM de glucosa (■), fructosa (▲) o ribosa (▼) a 37 °C por diferentes períodos de tiempo. Los productos de Amadori formados sobre FAL se estimaron por el método de la fructosamina. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

(c) Formación de productos de glicación tardíos.

Se evaluó el grado de formación de productos de glicación avanzada (AGE) sobre FAL, a través de medidas de fluorescencia específica. Después de incubar muestras de FAL con diversos azúcares durante una semana, se determinó la presencia de fluorescencia característica de los AGE. Como puede verse en la **figura 32**, los espectros de emisión de fluorescencia de todas las muestras mostraron un máximo a 440 nm (frente a una excitación a 366 nm). La intensidad de esta emisión a 440 nm aumentaba cuando se incubaba FAL con fructosa o ribosa (en ese orden). Por otro lado, después de 7 días de incubación no se encontraron diferencias entre los espectros de emisión de fluorescencia de FAL control, o con el agregado de glucosa.

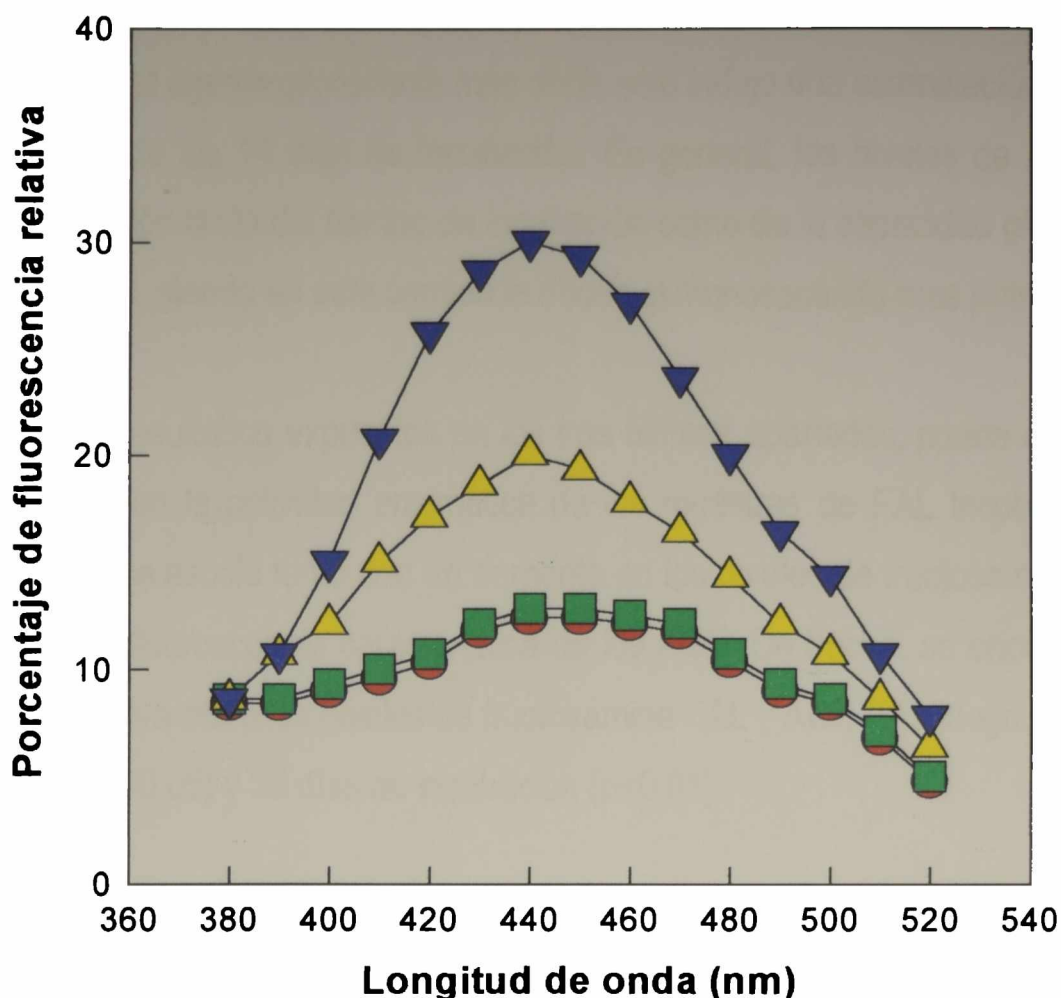


Figura 32. Espectros de emisión de fluorescencia de FAL incubada con PBS solo (●), o PBS con 100 mM de glucosa (■), fructosa (▲) o ribosa (▼) a 37 °C por 7 días ($\lambda_{exc} = 366$ nm).

La incubación de FAL con los diferentes azúcares se prolongó hasta 5 semanas, midiendo la fluorescencia de todas las muestras a distintos tiempos. Los valores obtenidos -expresados como porcentaje de fluorescencia relativa a 440 nm por miligramo de proteína- se muestran en la **tabla V**.

Tabla V. Fluorescencia relativa por mg de proteína luego de la incubación de FAL a 37 °C con diferentes azúcares (100 mM) y por distintos períodos de tiempo.

Tiempo [días]	Fluorescencia relativa a 440 nm (%)*			
	Control	Glucosa	Fructosa	Ribosa
7	13,6	13,6	19,3	29,3
14	11,6	18,4	29,5	142,5
35	12,2	22,3	30,8	157,5

* Expresado como porcentaje de fluorescencia relativo a un patrón de quinina.

La glucosa, que fue el agente glicosilante más débil, sólo indujo una acumulación de AGE sobre FAL a partir de los 14 días de incubación. En general, los niveles de AGE-FAL aumentaron en función tanto del tiempo de incubación como de la capacidad glicosilante del azúcar empleado, siendo en este sentido la ribosa el monosacárido más potente.

Del análisis de los resultados expuestos en los tres últimos apartados, puede deducirse que la disminución en la actividad enzimática de las muestras de FAL incubadas por diferentes tiempos, se asoció tanto con un aumento en los niveles de fructosamina como con la aparición de fluorescencia característica de los AGE. De hecho, se encontró una correlación significativa entre los niveles de fructosamina-FAL y AGE-FAL luego de 7 días ($p < 0,02$), 14 días ($p < 0,05$) y 35 días de incubación ($p < 0,01$).

(d) Efecto de un inhibidor de la formación de AGE.

Con el objeto de examinar la participación de los AGE en las alteraciones estructurales y funcionales de FAL, se agregó aminoguanidina 250 mM tanto a una muestra de FAL control (sin azúcar), como a una muestra que contenía FAL y ribosa 100 mM. Las muestras se incubaron durante dos semanas a 37 °C, luego de lo cual se sometieron a una centrifugación / filtración, como se describe en materiales y métodos. Finalmente se evaluaron en cuanto a su actividad enzimática específica y a su fluorescencia asociada. La aminoguanidina -un compuesto que inhibe la formación de AGE pero no de productos de Amadori- redujo en un 90 % la fluorescencia asociada a AGE, respecto de la inducida por 2 semanas de incubación con ribosa (**figura 33**). Por otro lado, la co-incubación de FAL con ribosa y aminoguanidina incrementó la actividad enzimática específica de FAL a un 72 % del control (en comparación con un 33 % cuando la FAL se incubó durante 2 semanas sólo con ribosa). No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros, entre muestras control incubadas con y sin aminoguanidina (resultados no mostrados).

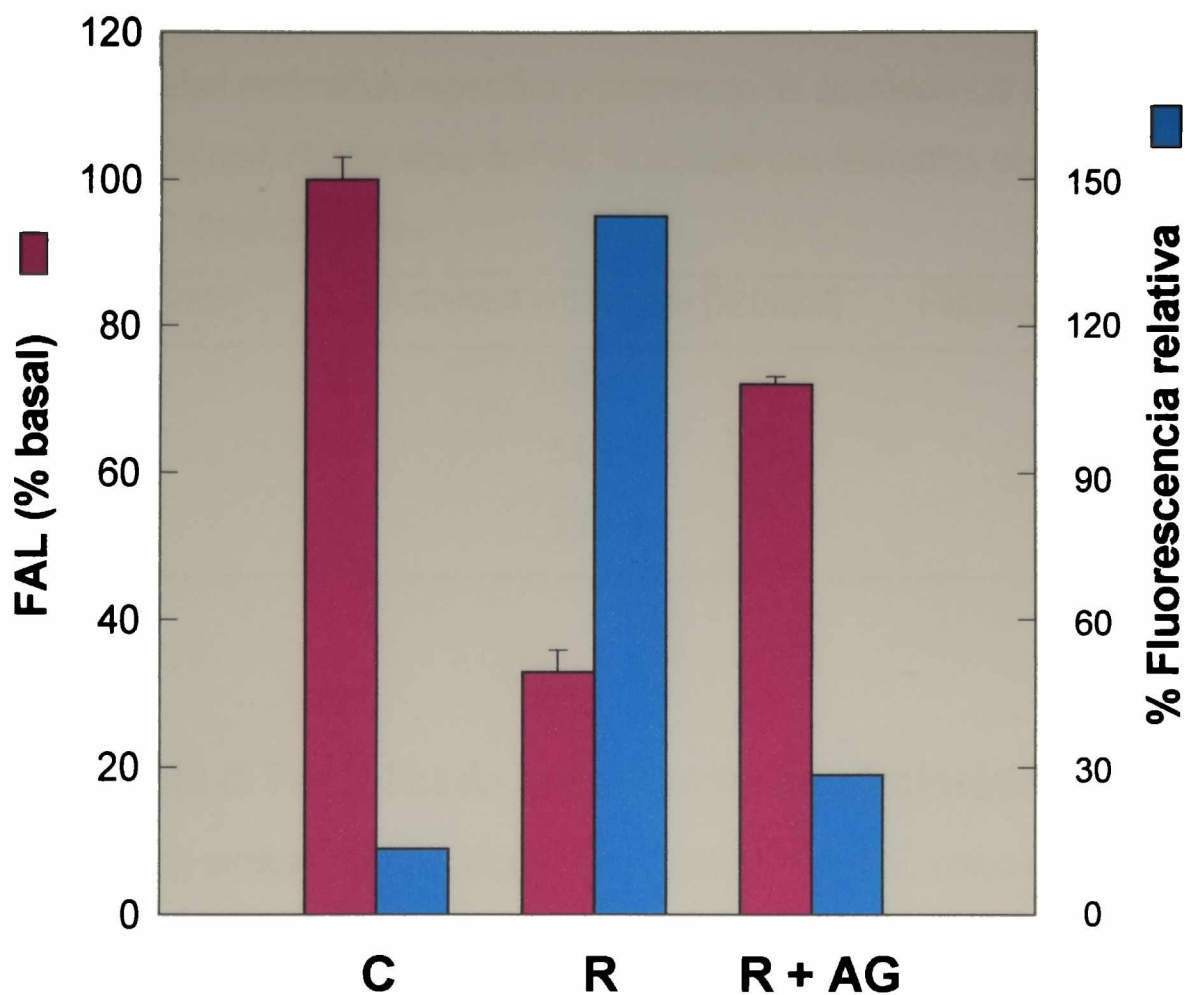


Figura 33. Efecto de la co-incubación con aminoguanidina sobre la actividad enzimática específica de FAL, y sobre su fluorescencia relativa a 440 nm ($\lambda_{exc} = 366$ nm). Se incubó FAL durante 2 semanas a 37 °C sólo con PBS (C), PBS con ribosa 100 mM (R), o PBS con ribosa 100 mM y aminoguanidina 250 mM (R+AG). La actividad de FAL se expresa como porcentaje del basal (C), media \pm SEM. La fluorescencia relativa corresponde al valor obtenido por miligramo de proteína.

(e) Efecto de dosis del azúcar empleado.

En otros experimentos, se incubó FAL con concentraciones crecientes de glucosa (0, 30 o 100 mM) a 37 °C durante 5 semanas. En esta situación, se encontró una dependencia de dosis tanto para la actividad específica de FAL como para la fluorescencia asociada a proteínas: al aumentar la concentración de glucosa se incrementaba también la inhibición de la actividad enzimática, así como la fluorescencia específica de AGE por miligramo de proteína (**tabla VI**).

Tabla VI. Actividad enzimática específica y porcentaje de fluorescencia relativa a 440 nm (excitación a 366 nm), de muestras de FAL incubadas con diferentes concentraciones de glucosa a 37 °C durante 35 días.

Glucosa [mM]	Actividad enzimática [% basal]	Fluorescencia relativa (%)
0	100 ± 1	13
30	54 ± 0.5	19
100	33 ± 1	22

(f) Análisis de la FAL glicada por métodos electroforéticos.

Con el objeto de evaluar posibles cambios estructurales de FAL como consecuencia de su glicación, se sometieron las muestras obtenidas (diferentes tiempos de incubación con diversos azúcares) a dos métodos electroforéticos: SDS-PAGE con coloración de proteínas (para visualizar posibles entrecruzamientos proteicos), y electroforesis en acetato de celulosa gelatinizado revelando las bandas de FAL con una reacción colorimétrica enzimática in situ.

Los patrones de bandas proteicas fraccionadas por SDS-PAGE fueron esencialmente idénticos, tanto para los controles no glicados como para las muestras glicadas en todas las condiciones de incubación (resultados no mostrados).

En el caso de la electroforesis en acetato de celulosa, los resultados obtenidos dependieron del grado de glicación de FAL. En la **figura 34** se muestran las bandas de FAL luego de una incubación de 14 días con 100 mM de cada uno de los azúcares. En el caso de las muestras incubadas con fructosa y ribosa, se observó una disminución en la intensidad de la banda de FAL y un aumento en su movilidad electroforética. Las bandas se evaluaron densitométricamente, y el área bajo cada curva se integró para estimar la actividad enzimática específica de FAL. Estos valores, expresados como porcentaje del control respectivo, en general fueron similares a los encontrados con el ensayo de FAL que utiliza pNPP como sustrato (**figura 30** y **tabla VII**). Esta correlación disminuía sin embargo para valores de actividad enzimática de FAL menores que un 30 % del control. Para cada banda, se calculó el R_f correspondiente al pico de actividad de FAL. Como se

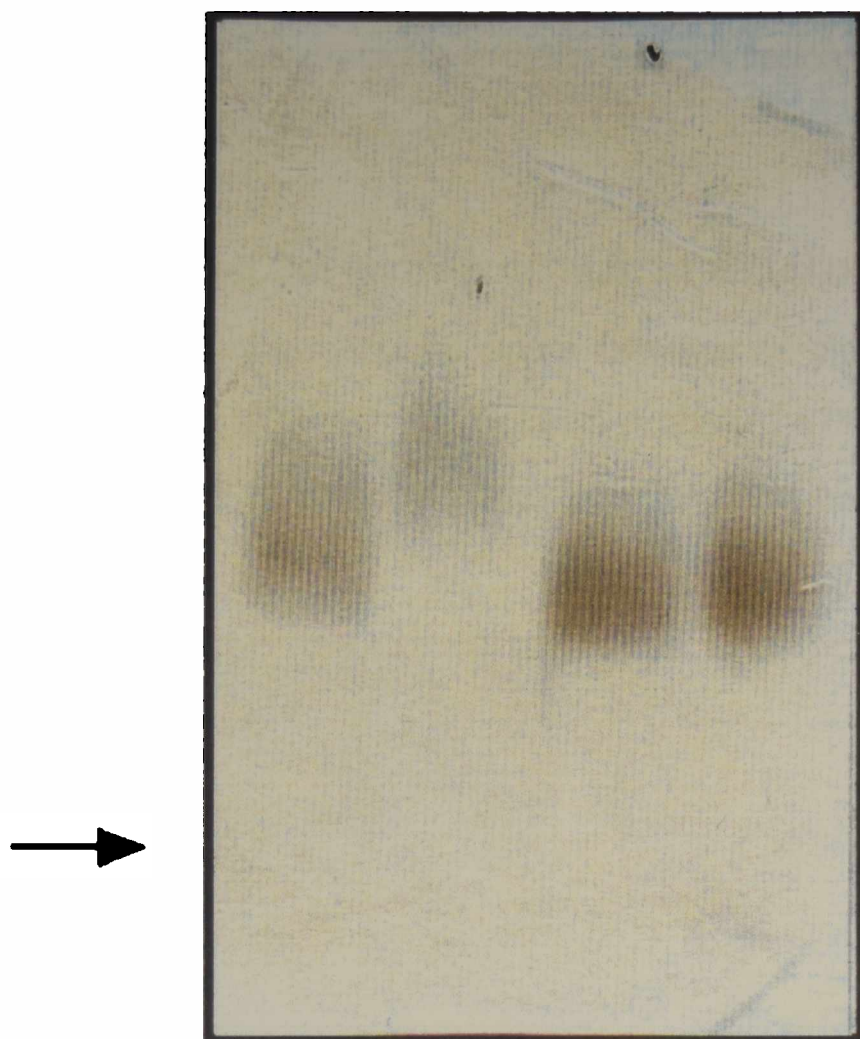
muestra en la **tabla VII**, para cada azúcar la movilidad electroforética de la banda de FAL aumentó en función del tiempo de incubación. Por otro lado, para cada tiempo de incubación el aumento del Rf dependió del poder glicosilante del azúcar empleado. El orden de potencia encontrado fue Glucosa < Fructosa < Ribosa, en concordancia con sus efectos sobre la inhibición de la actividad enzimática de FAL, sobre los niveles de Fructosamina-FAL, y sobre la formación de AGE en las muestras. Así, después de una incubación de 5 semanas con cada uno de los tres azúcares, se encontró una correlación lineal significativa entre: (a) los cambios en la movilidad electroforética de FAL (ΔRf %) y los niveles de Fructosamina-FAL ($r^2 = 0,992$, $p < 0,01$); y (b) ΔRf % y los niveles de AGE-FAL ($r^2 = 0,983$, $p < 0,02$).

Tabla VII. Aumento en la movilidad electroforética de FAL incubada a 37 °C con diferentes azúcares (100 mM) por distintos períodos de tiempo.

Tiempo [días]	ΔRf (%) *			
	Control	Glucosa	Fructosa	Ribosa
1	0	0	0	0
7	0	0	0	9 (58)
14	0	0	6 (57)	35 (22)
35	0	12 (58)	24 (10)	76 (4)

* Expresado como cambios porcentuales en el Rf de las bandas de FAL glicadas, respecto de la muestra control respectiva (es decir, del mismo tiempo de incubación).

Los valores que se muestran entre paréntesis cuando $\Delta Rf > 0$, corresponden a la intensidad de la banda de FAL medida por densitometría y expresada como porcentaje de la muestra control correspondiente. No se hallaron diferencias significativas en la intensidad de la banda de FAL, entre las muestras control y las muestras con $\Delta Rf = 0$.



F R C G

Figura 34. Se incubó FAL en ausencia de azúcares (C), o en presencia de glucosa 100 mM (G), fructosa 100 mM (F) o ribosa 100 mM (R), a 37 °C durante 14 días. Las muestras obtenidas se sometieron a una electroforesis en acetato de celulosa gelatinizado y las bandas de FAL se visualizaron por un método colorimétrico enzimático *in situ*. La flecha indica el origen de la corrida.

En una siguiente etapa de este trabajo se desarrolló un modelo de células osteoblasto-símiles en cultivo, en diferentes estadios de maduración, que simulen el proceso de diferenciación osteoblástica *in vivo*.

Caracterización del modelo celular en estudio.

Con el objeto de caracterizar las etapas sucesivas de progresión osteoblástica en los cultivos de células MC3T3E1, las células se incubaron en DMEM con 10% SFB, 5 mM β -glicerofosfato y 25 mg/L ácido ascórbico, durante diferentes periodos de tiempo (Figura 35).

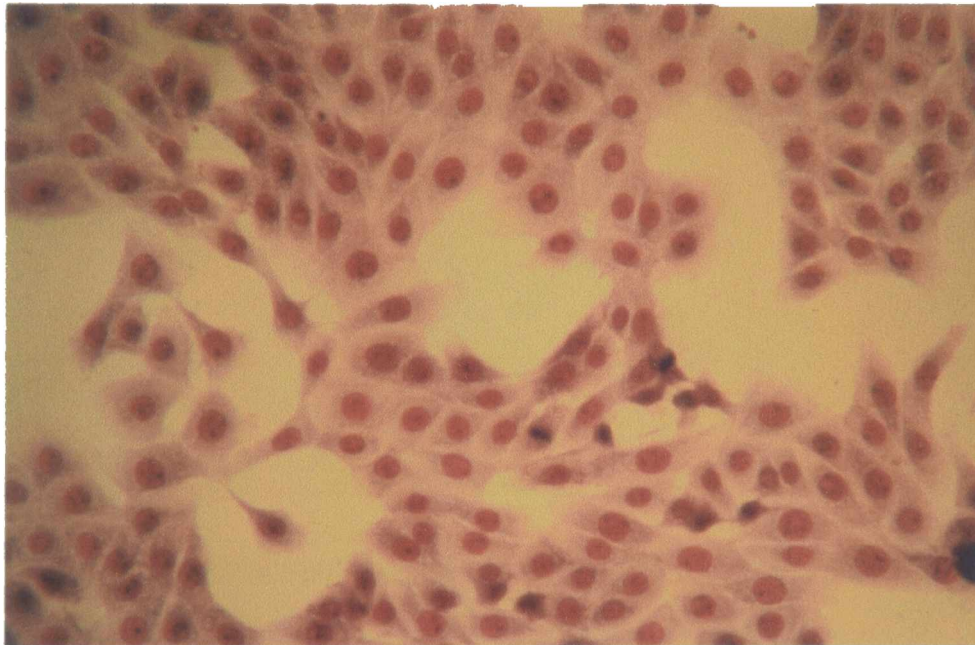


Figura 35. Células preosteoblásticas MC3T3E1 en proliferación activa (coloración de Giemsa, 100X).

El grado de diferenciación de las células MC3T3E1 se evaluó a través de la actividad enzimática de FAL asociada a la monocapa celular a 3, 15 y 25 días de cultivo. Asimismo, se evaluó la mineralización celular en cultivos de 15 y 25 días, a través de la tinción de la monocapa celular utilizando el método de von Kossa, y posterior observación microscópica. En nuestras condiciones de cultivo, la actividad celular de FAL fue indetectable en cultivos de preosteoblastos en proliferación activa (3 días de cultivo); aumentó a $2,2 \pm 0,2 \mu\text{mol pNP} / \text{min} \times \text{g proteína}$ en células diferenciadas (15 días de cultivo); y llegó a una meseta de $8,5 \pm 0,6 \mu\text{mol pNP} / \text{min} \times \text{g proteína}$ en células en su

etapa de mineralización (25 días de cultivo). La tinción de von Kossa demostró la presencia de nódulos minerales extracelulares en cultivos de 25 días, indicando que habían llegado a la fase de mineralización. Este mineral extracelular estaba ausente en los cultivos de 15 días.

Por otro lado en las células de osteosarcoma UMR106, crecidas en un medio de DMEM con 10% SFB (Figura 36), la actividad enzimática de FAL asociada a la monocapa celular fue de $195 \pm 7 \mu\text{mol pNP} / \text{min} \times \text{g proteína}$.

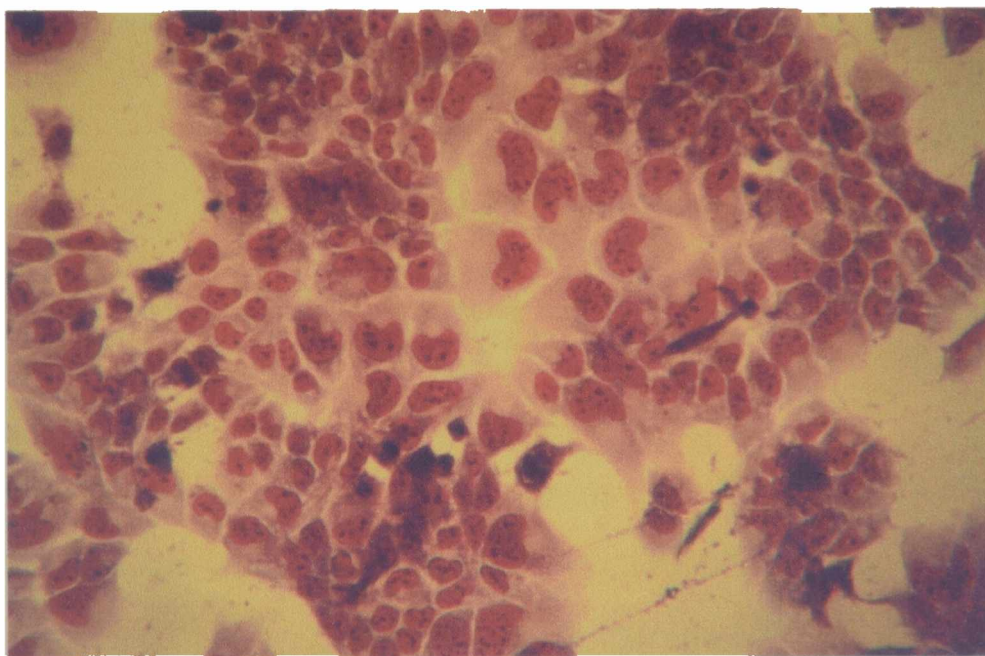


Figura 36. Células de osteosarcoma de rata UMR106 (coloración de Giemsa, 100X).

En la siguiente serie de experimentos, se investigó el efecto de proteínas glicadas solubles (es decir, AGE-ASB), sobre el crecimiento y desarrollo de las células osteoblasto-símiles en cultivo.

Efectos de AGE sobre la proliferación de células osteoblásticas.

Con el objeto de estudiar los posibles efectos de los AGE sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo –así como la variación de estos efectos con el tiempo de cultivo– se incubaron células UMR106 y MC3T3E1 (fase de proliferación) con $200 \mu\text{g} / \text{mL}$ de AGE-ASB o ASB control durante diferentes períodos de tiempo, como se describe en Materiales y Métodos. Como se puede observar en la figura 37, la presencia de AGE indujo un efecto bifásico.

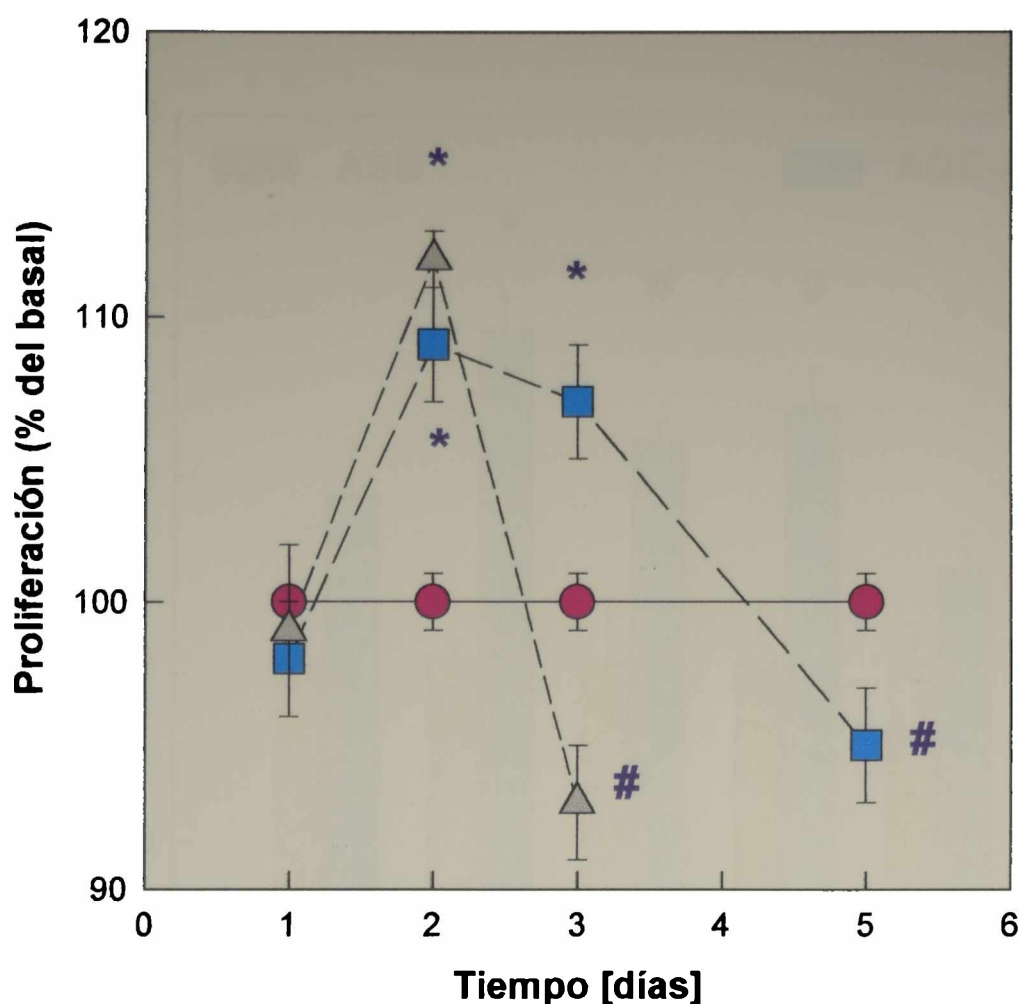


Figura 37. Dependencia temporal de los efectos de AGE-ASB sobre la proliferación de células osteoblásticas UMR106 y MC3T3E1 en cultivo. Los cultivos se incubaron con 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ASB control (●) o AGE-ASB en el caso de UMR106 (▲) o MC3T3E1 (■), durante diferentes períodos de incubación. Al término del tiempo indicado en la figura, se estimó la proliferación celular por medio del bioensayo del cristal violeta. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (ASB control), $\text{media} \pm \text{SEM}$. # $p < 0,05$; * $p < 0,001$.

A tiempos relativamente cortos de cultivo (48 horas), AGE-ASB estimuló la priliiferación celular en ambas líneas celulares. Este efecto desapareció luego de incubaciones mas prolongadas. Así, se detectó una disminución leve pero estadísticamente significativa en la proliferación de las células UMR106 luego de 3 días de incubación con AGE-ASB, mientras que un efecto similar ocurrió después de 5 días de incubación en el caso de los osteoblastos MC3T3E1.

En otros experimentos se estudió el efecto sobre la proliferación celular, de una incubación de 48 horas con concentraciones crecientes de albúmina modificada por AGE. En el caso de las células UMR106, AGE-ASB (100-500 $\mu\text{g} / \text{mL}$) estimuló la proliferación en forma bifásica (112-118 % respecto a ASB control, **figura 38**).

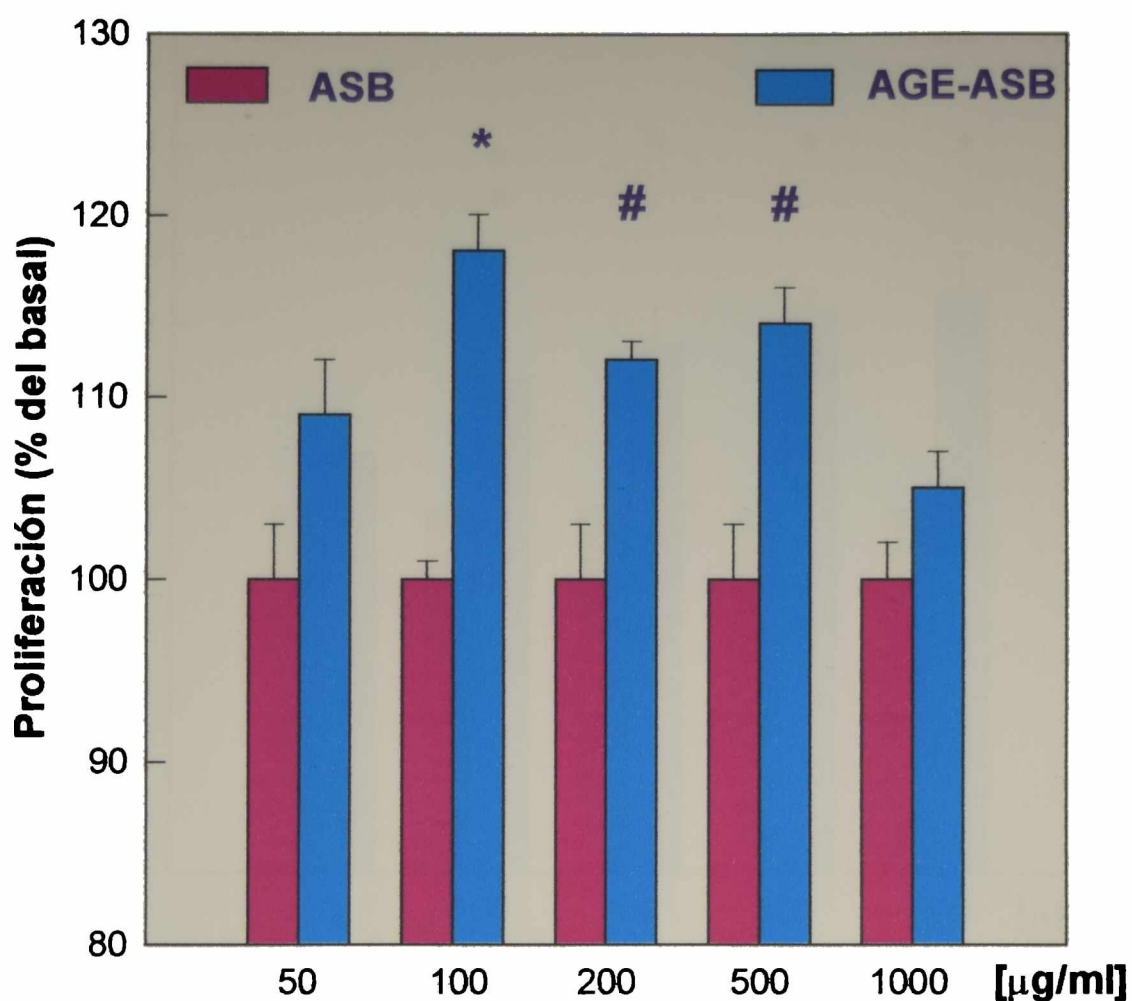


Figura 38. Proliferación celular de los osteoblastos UMR106 incubados con concentraciones crecientes de AGE-ASB o ASB control, durante 48 horas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (ASB control), media \pm SEM. # $p < 0,01$; * $p < 0,001$.

Por otro lado, AGE-ASB indujo un aumento dosis-dependiente en la proliferación de los osteoblastos MC3T3E1 (107-112 % respecto a ASB control, **figura 39**).

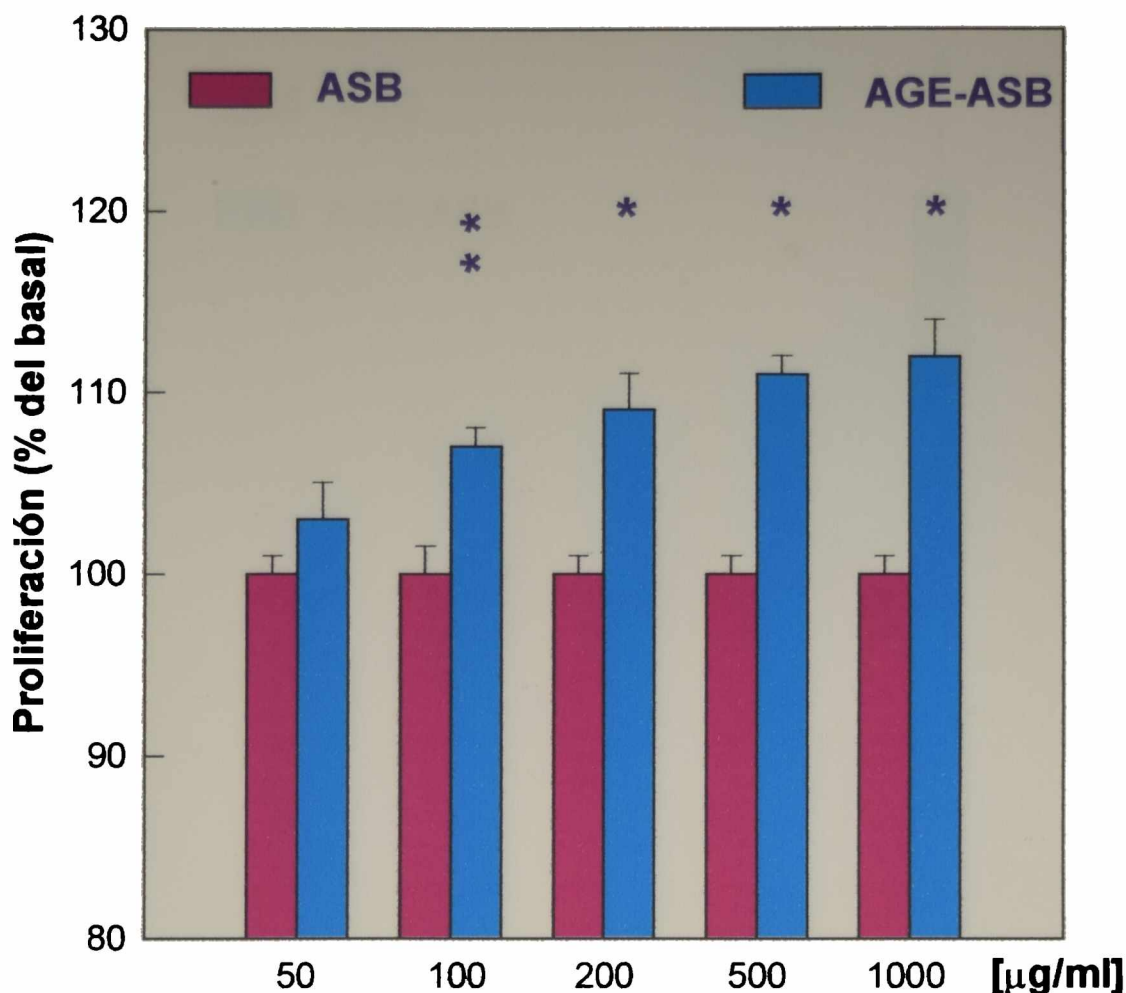


Figura 39. Proliferación celular de los osteoblastos MC3T3E1 incubados con concentraciones crecientes de AGE-ASB o ASB control, durante 48 horas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (ASB control), media \pm SEM. ** $p < 0,002$; * $p < 0,001$.

Efectos de AGE sobre la diferenciación de células osteoblásticas.

Con el propósito de evaluar los efectos de AGE sobre la expresión del fenotipo osteoblástico, las células de ambas líneas se incubaron durante 1 a 3 días con diferentes concentraciones de AGE-ASB o ASB control.

En las células UMR106, luego de 24 horas de incubación, AGE-ASB aumentó la actividad enzimática de FAL en forma dosis-respuesta (125-245 % respecto a ASB control, **figura 40**).

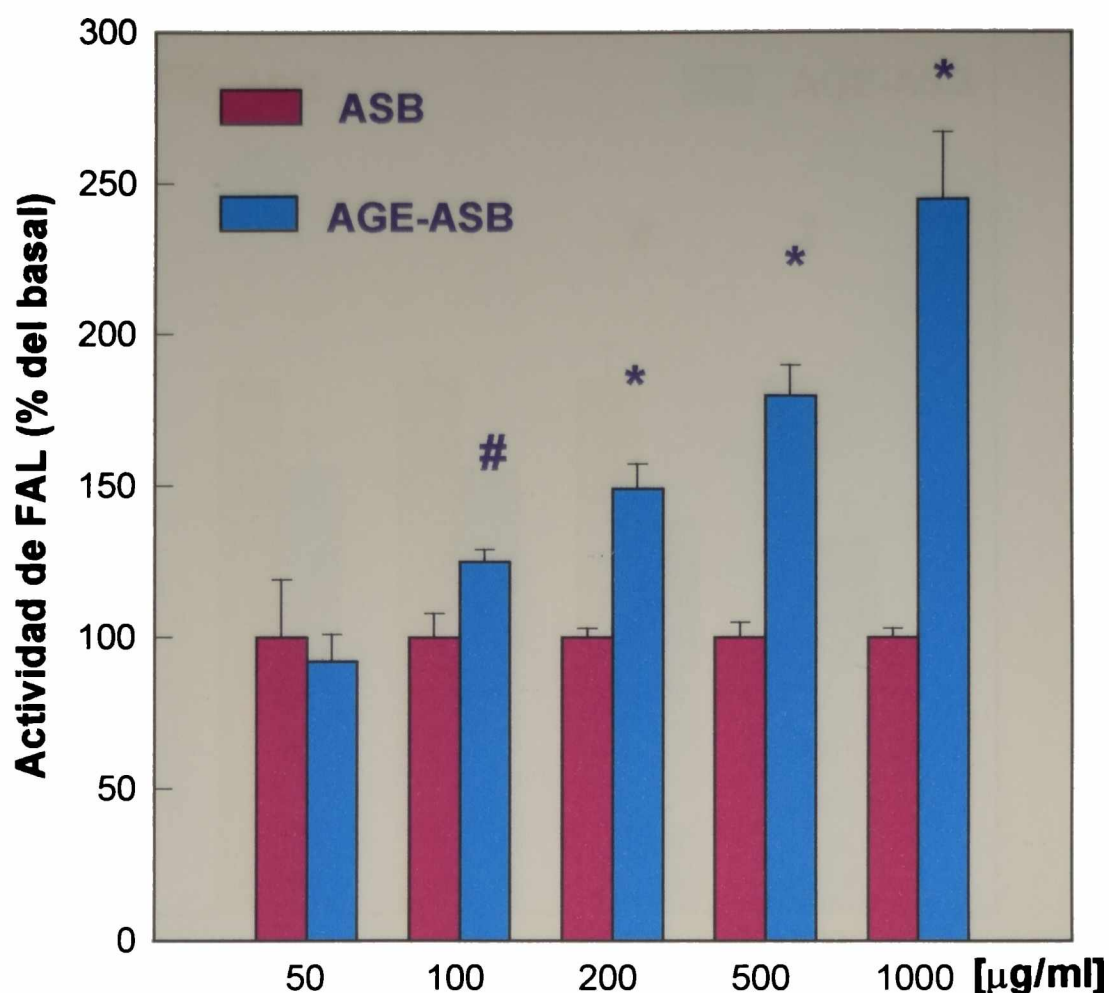


Figura 40. Efecto de diferentes concentraciones de AGE-ASB o ASB control sobre la actividad específica de FAL en osteoblastos UMR106 incubados durante 24 horas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (ASB control), media \pm SEM. # $p < 0,02$; * $p < 0,001$.

Luego de 48 horas de incubación, no se encontraron diferencias significativas entre AGE-ASB y ASB control sobre este parámetro de diferenciación osteoblástica. Un período de incubación mas largo (72 horas) de estas células en presencia de AGE-ASB, indujo una inhibición dependiente de la dosis en la actividad enzimática de FAL (90-95 % respecto a ASB control, **figura 41**).

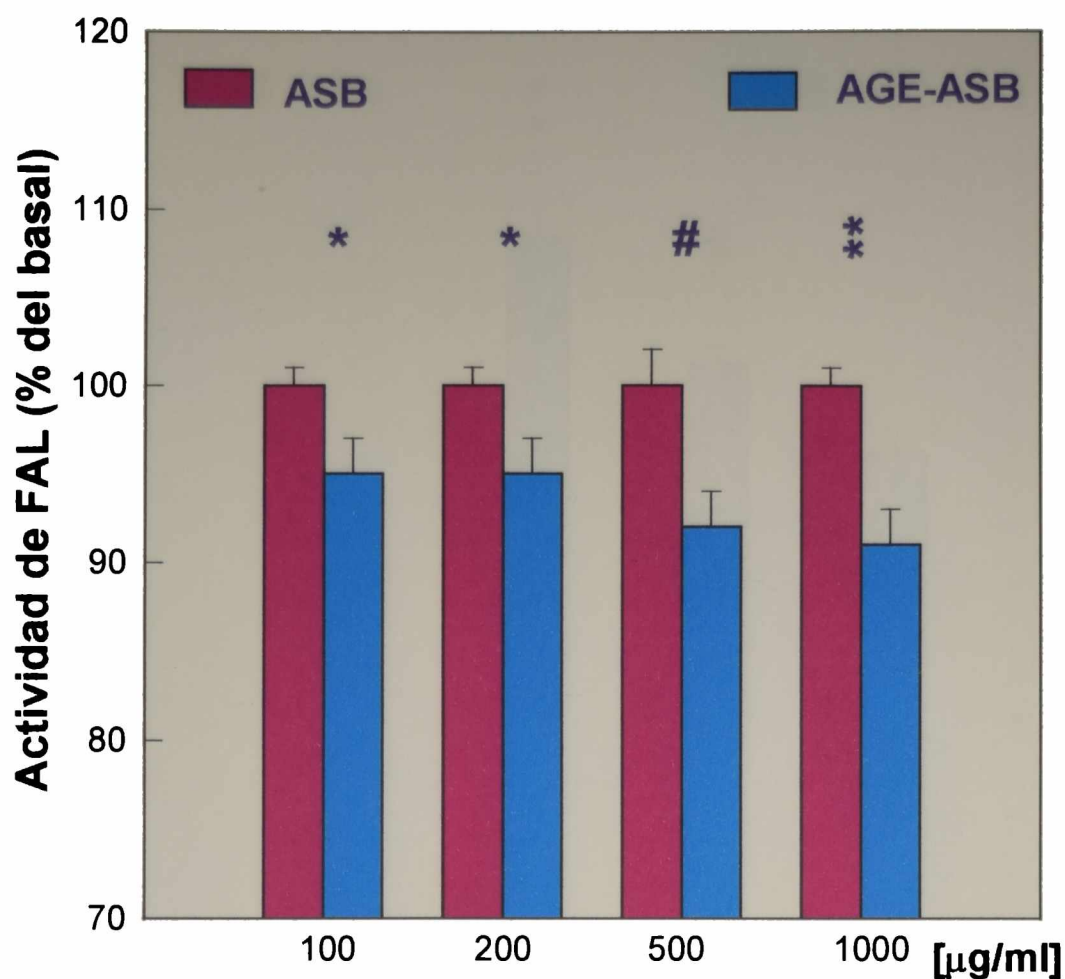


Figura 41. Efecto de diferentes concentraciones de AGE-ASB o ASB control sobre la actividad específica de FAL en osteoblastos UMR106 incubados durante 72 horas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (ASB control), media \pm SEM. * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

En otros experimentos, se estudió el efecto de AGE-ASB sobre la actividad enzimática de FAL en los osteoblastos MC3T3E1 (fases de diferenciación y de mineralización). En su etapa de diferenciación (15 días de cultivo) no se observaron diferencias en la actividad celular de FAL, entre AGE-ASB y ASB control. Por el contrario, en el caso de las células mineralizadas (25 días de cultivo) se observó una estimulación bifásica en la actividad de FAL luego de 72 horas de incubación con 100-500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de AGE-ASB (123-153 % respecto a ASB control, **figura 42**). Sin embargo, a 24 y 48 horas de incubación no se encontraron diferencias entre AGE-ASB y ASB control sobre la actividad de FAL de cultivos de 25 días.

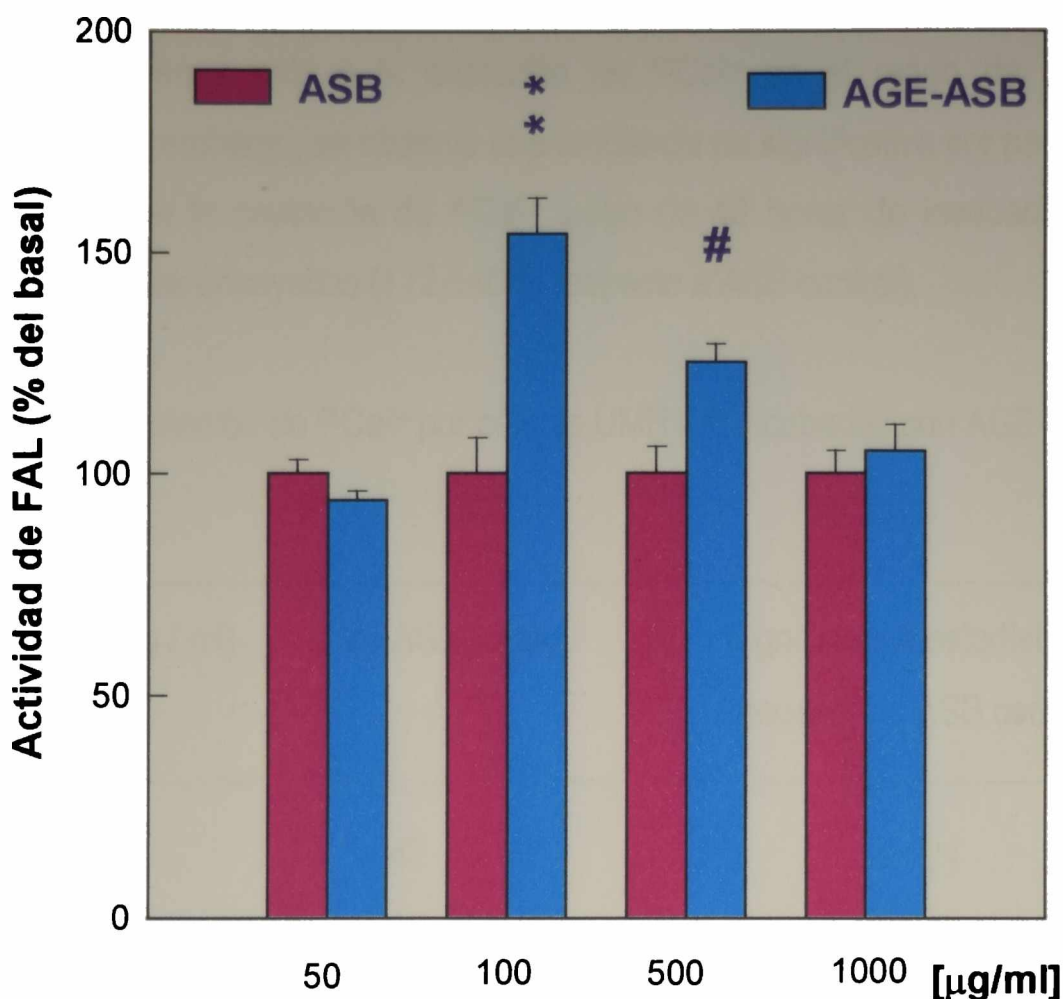


Figura 42. Efecto de diferentes concentraciones de AGE-ASB o ASB control sobre la actividad específica de FAL en osteoblastos MC3T3E1 (fase de mineralización) incubados durante 72 horas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (ASB control), media \pm SEM. # $p < 0,02$; ** $p < 0,01$.

Efectos de AGE sobre la captación celular de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Se realizaron estudios de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en las células UMR106, con el objeto de evaluar la participación de Ca^{2+} en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, mediada por AGE-ASB. Luego de 24 horas de incubación, AGE-ASB inhibió la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a 100-200 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respecto de ASB control (tabla VIII). Para este mismo tiempo de incubación, por encima de 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ se pudo observar una disminución leve no significativa en dicho parámetro, sugiriendo una regulación bifásica para la captación de calcio. Estos cambios en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ correlacionaron inversamente con la actividad de FAL de las células UMR106 incubadas en las mismas condiciones. Se realizaron experimentos similares luego de incubar las células UMR106 con AGE-ASB o ASB control durante 48 y 72 horas, pero no se encontraron diferencias

significativas en cuanto a la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en el rango de concentraciones probadas. Sin embargo, se observó una tendencia no significativa por parte de AGE-ASB de incrementar la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ luego de 48 horas de incubación, a todas las concentraciones ensayadas (112-140 % respecto a ASB control).

Tabla VIII. Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por células UMR106 incubadas con AGE-ASB durante 24 horas.

AGE-ASB [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	% ASB control	Significación estadística (respecto de ASB control)
100	42 \pm 10	< 0.001
200	62 \pm 8	< 0.05
500	73 \pm 7	N. S.
1000	80 \pm 8	N. S.

N. S. : no significativo

En la siguiente serie de experimentos, se investigó la posible presencia de receptores específicos para AGE en osteoblastos, así como las características funcionales de estos sitios de unión y su regulación en función del estadio de maduración osteoblástica. Para ello, se realizaron diferentes estudios de unión y degradación de AGE-ASB radiomarcado con ^{125}I , en células osteoblasto-símiles en cultivo.

Ensayos de receptores para AGE.

(a) Unión de ^{125}I -AGE-ASB a osteoblastos en cultivo.

Para poder realizar estudios de unión de radioligando a una monocapa de células osteoblásticas, se incubaron osteoblastos UMR106 o MC3T3E1 en proliferación activa

con ^{125}I -AGE-ASB durante 2 horas a 4 °C. La cantidad de ^{125}I -AGE-ASB asociada a la monocapa celular, aumentó en forma dosis-dependiente (**figuras 43 y 44**). Esta unión podía ser inhibida por un exceso de AGE-ASB, pero no por ASB control. Por ejemplo, en el caso de células MC3T3E1 en su etapa de proliferación, la unión máxima fue de $0,86\% \pm 0,07\%$ Unido / Libre (U / L) por cada 100 μg de proteína celular; $0,25\% \pm 0,03\%$ U / L cada 100 μg proteína en presencia de un exceso de AGE-ASB; y $0,84\% \pm 0,07\%$ U / L cada 100 μg proteína en presencia de un exceso de ASB control. La unión específica del ligando, como se definió en Materiales y Métodos, se representa en las **figuras 43 y 44** y muestra un patrón saturable (compatible con un número finito de sitios por célula). El análisis de Scatchard de estos datos de unión específica, se representa en los insertos de las **figuras 43 y 44** y es compatible con la presencia de sitios de unión de un solo tipo. A partir de este análisis de Scatchard, resulta evidente que las células MC3T3E1, en su estadio de proliferación, presentan un receptor con mayor afinidad por ^{125}I -AGE-ASB, que las células de osteosarcoma UMR106. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el número de receptores por célula, ya que ambos tipos celulares muestran una capacidad similar para la unión de AGE a su receptor específico (**tabla IX**). Estos resultados sugirieron la existencia de una relación entre la afinidad celular por los AGE y el grado de madurez osteoblástica. Para investigar esta hipótesis, se estudió la regulación de los receptores para AGE presentes en las células MC3T3E1, luego de inducir la diferenciación celular con β -glicerofosfato y ácido ascórbico durante 3, 15 y 25 días. En cada caso se investigó la unión de ^{125}I -AGE-ASB, y los correspondientes parámetros cinéticos encontrados se muestran en la **tabla IX**. Estos resultados sugieren una disminución en la unión específica de AGE, a medida que las células MC3T3E1 avanzan a través de las sucesivas etapas de maduración osteoblástica. Estos cambios se pueden explicar por la disminución observada en la constante de afinidad de los sitios de unión, ya que no se encontraron cambios en el número de receptores por célula.

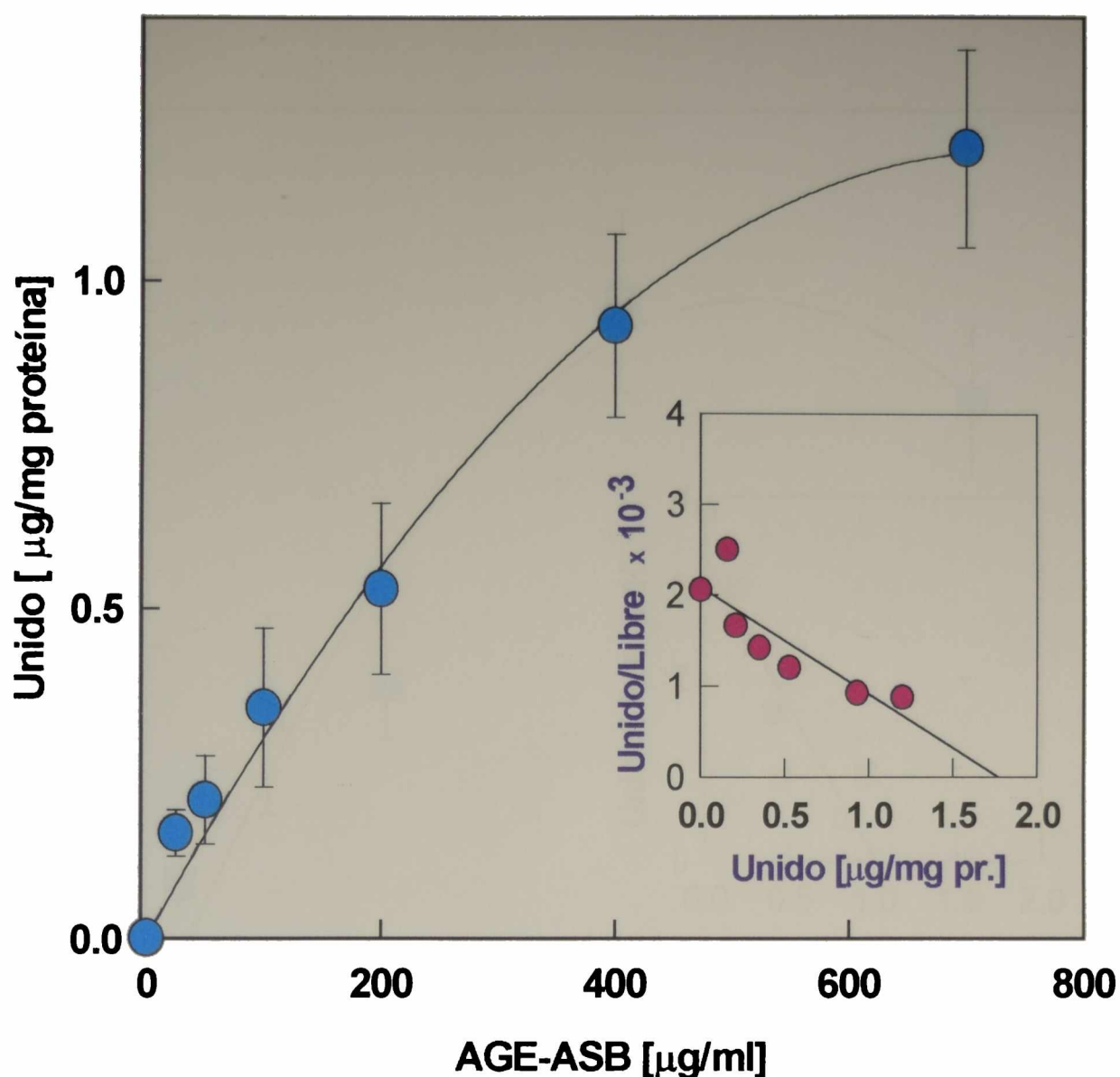


Figura 43. Saturabilidad de la unión de AGE-ASB a los osteoblastos UMR106. En la figura principal se grafica la unión específica en función de la concentración de AGE-ASB. Los resultados corresponden a la media \pm SEM para tres experimentos independientes, cada uno por sextuplicado. Los datos se analizaron con un programa de computación de cuadrados mínimos no lineal, y se indica la mejor curva obtenida. **Inserto:** Análisis de Scatchard de los resultados. Los datos obtenidos en los experimentos de unión se evaluaron según la ecuación $U = nKA / (1 + KA)$, donde U corresponde a la cantidad de ligando unido en forma específica, n es el número de sitios de unión por célula, A es la concentración de radioligando libre, y K corresponde a la constante de asociación.

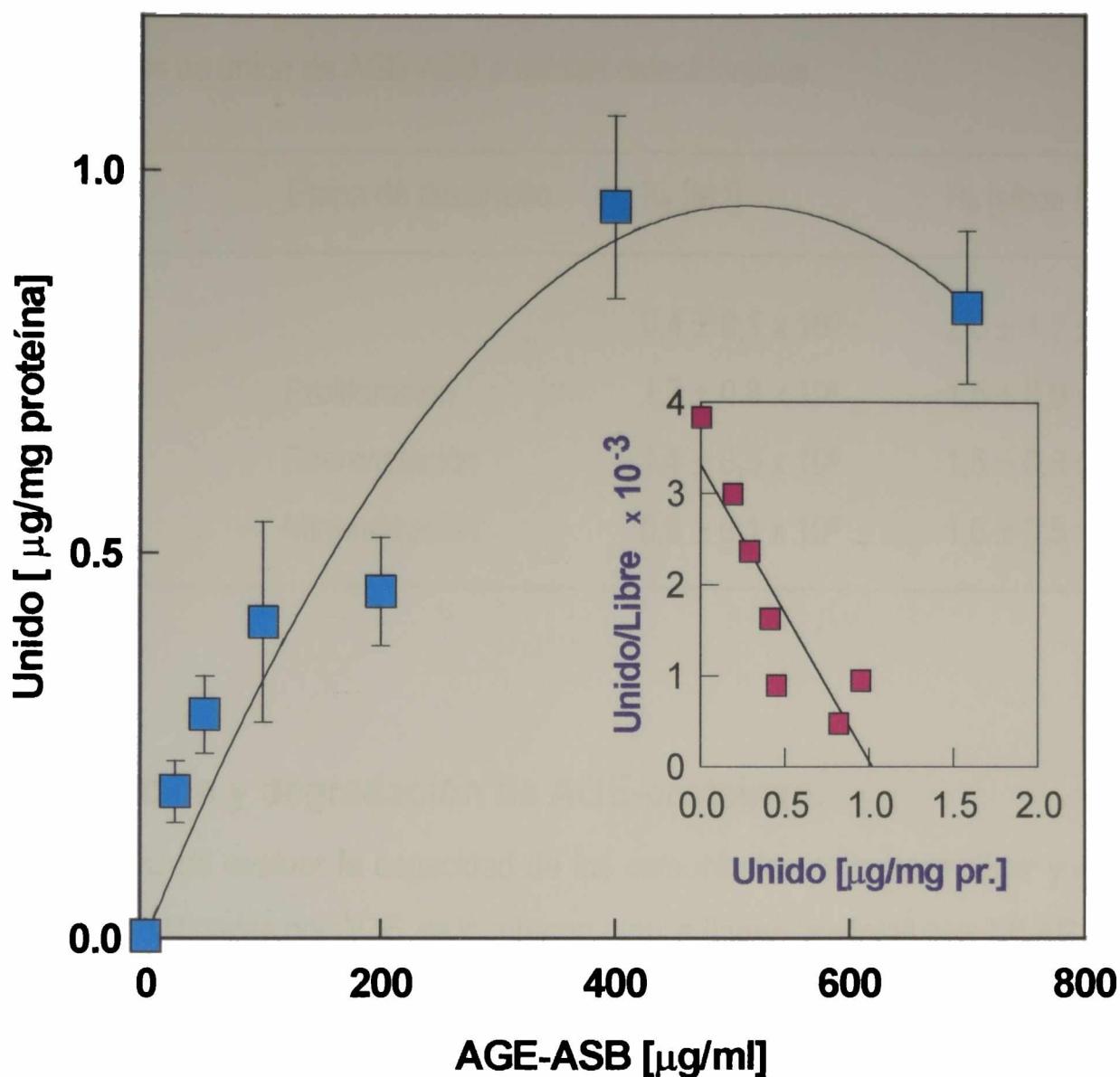


Figura 44. Saturabilidad de la unión de AGE-ASB a los osteoblastos MC3T3E1 en su etapa de proliferación. En la figura principal se grafica la unión específica en función de la concentración de AGE-ASB. Los resultados corresponden a la media \pm SEM para tres experimentos independientes, cada uno por sextuplicado. Los datos se analizaron con un programa de computación de cuadrados mínimos no lineal, y se indica la mejor curva obtenida. **Inserto:** Análisis de Scatchard de los resultados. Los datos obtenidos en los experimentos de unión se evaluaron según la ecuación $U = nKA / (1 + KA)$, donde U corresponde a la cantidad de ligando unido en forma específica, n es el número de sitios de unión por célula, A es la concentración de radioligando libre, y K corresponde a la constante de asociación.

Tabla IX. Parámetros cinéticos obtenidos del análisis de Scatchard de los resultados de experimentos de unión de AGE-ASB a células osteoblásticas.

Tipo celular	Etapa de desarrollo	K_a [M^{-1}]	R_0 [sitios / célula]
UMR106		$0,4 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,0 \pm 1,2 \times 10^7$
MC3T3E1	Proliferación	$1,7 \pm 0,8 \times 10^6$	$1,5 \pm 0,9 \times 10^7$
MC3T3E1	Diferenciación	$1,4 \pm 0,5 \times 10^6$	$1,5 \pm 0,8 \times 10^7$
MC3T3E1	Mineralización	$0,6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,8 \pm 0,5 \times 10^7$

(b) Captación y degradación de AGE-proteínas.

Con el objeto de evaluar la capacidad de los osteoblastos para internalizar y degradar proteínas modificadas por AGE, se incubaron ambas líneas celulares con ^{125}I -AGE-ASB a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo. En el caso de los osteoblastos MC3T3E1 se observó un incremento del contenido celular específico de AGE-ASB, que dependía en forma lineal del tiempo de incubación hasta 24 horas (**figura 45**). Además de esta captación de ^{125}I -AGE-ASB, en el medio de cultivo se detectó un aumento progresivo de radioactividad derivada de la degradación de AGE-proteínas (soluble en ácido tricloroacético). Este aumento fue función del tiempo de incubación, y se mantuvo durante 24 horas (**figura 46**). Por otro lado, en el caso de las células de osteosarcoma UMR106, la captación y degradación de ^{125}I -AGE-ASB mostraron un patrón saturable y una cinética mas rápida (**figuras 45 y 46**). En términos absolutos, luego de 24 horas de cultivo ambas líneas osteoblásticas lograron captaciones celulares específicas de ^{125}I -AGE-ASB aproximadamente similares (**figura 45**). Sin embargo, en el mismo tiempo de cultivo, las células UMR106 degradaron una mayor cantidad de AGE-proteínas que los osteoblastos MC3T3E1 (**figura 46**).

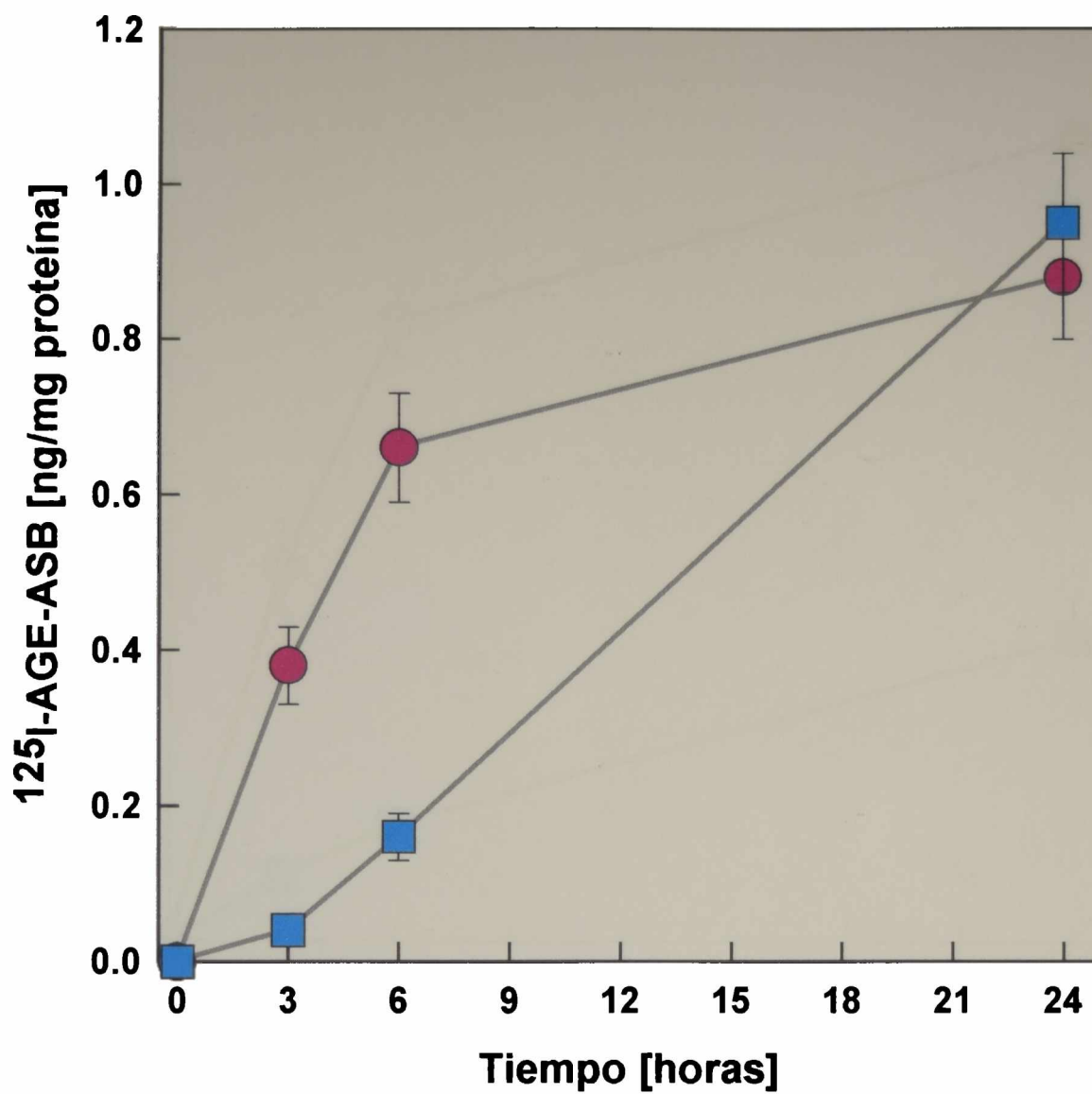


Figura 45. Dependencia temporal de la captación específica de ^{125}I -AGE-ASB por células UMR106 (●) y MC3T3E1 (■). Después de incubar las células a 37°C por el tiempo indicado en la figura, se determinó en cada caso la radioactividad asociada con la monocapa celular. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

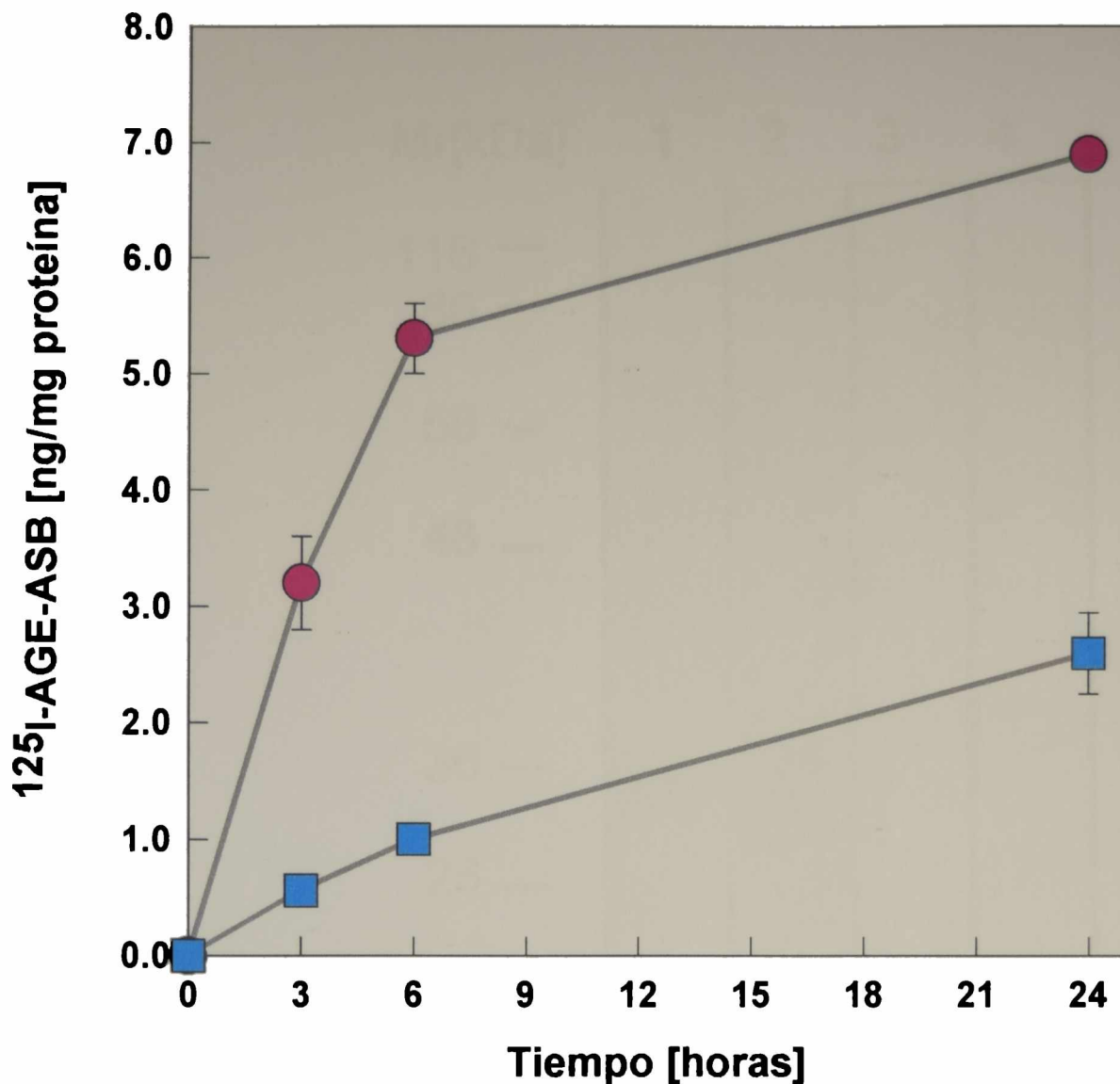


Figura 46. Dependencia temporal de la degradación específica de ^{125}I -AGE-ASB por células UMR106 (●) y MC3T3E1 (■). Después de incubar las células a 37°C por el tiempo indicado en la figura, se midió la radioactividad soluble en ácido tricloroacético presente en el medio de cultivo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

(c) Caracterización de los sitios de unión por *ligand blot*.

Con el objeto de caracterizar y confirmar la presencia de receptores para AGE sobre las células osteoblásticas, se llevaron a cabo estudios de *ligand blotting* en condiciones reductoras, utilizando homogenados celulares totales o extractos de membranas de osteoblastos. Como se muestra en la **figura 47**, en los homogenados totales de las células UMR106 y MC3T3E1 se encontraron dos proteínas con afinidad por AGE, con

pesos moleculares aparentes de aproximadamente 45 kDa (banda minoritaria) y 30 kDa (banda mayoritaria).

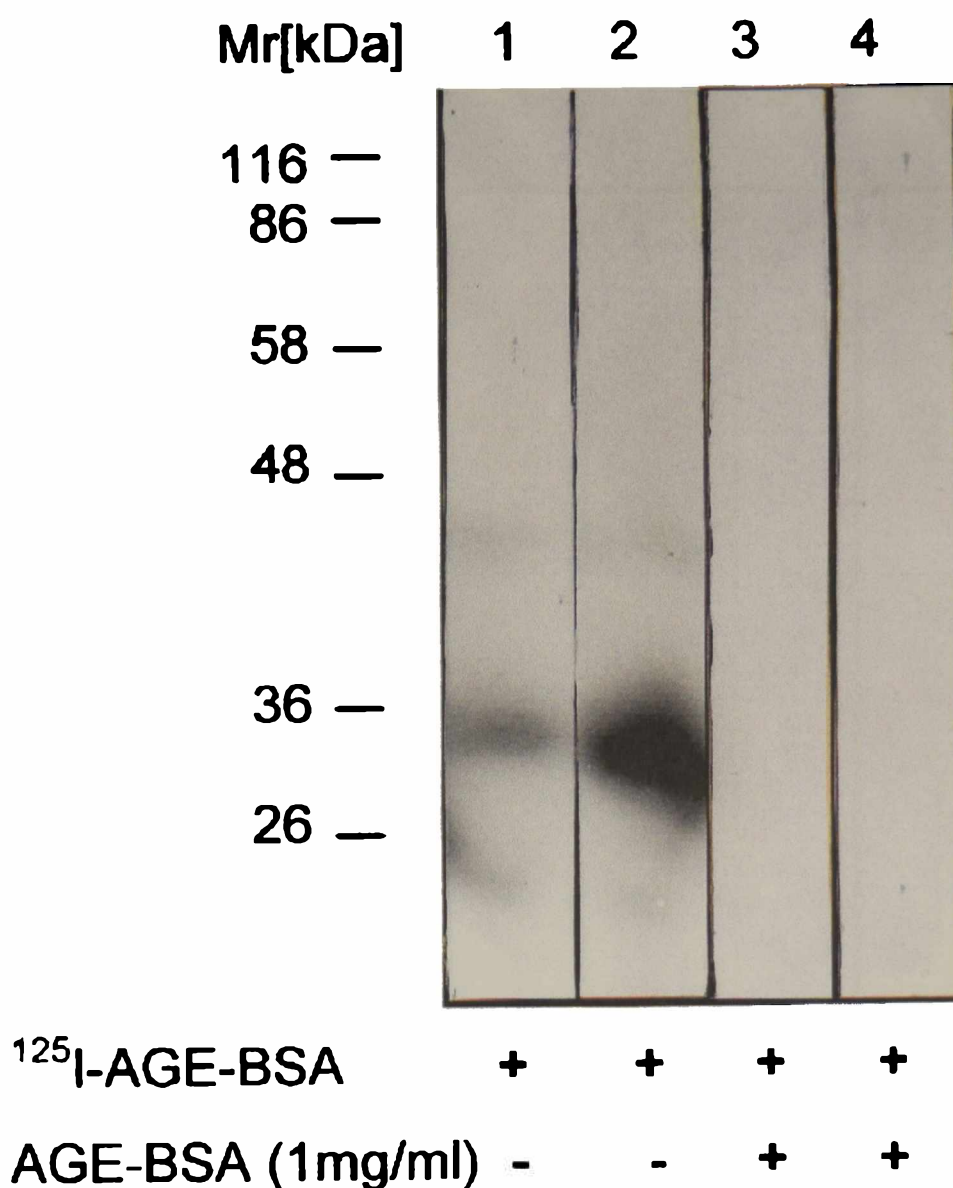


Figura 47. Ensayo de *ligand blot* con ¹²⁵I-AGE-ASB utilizando homogeneizados celulares totales, en presencia o ausencia de un exceso de AGE-ASB no marcado. Las muestras obtenidas de células de osteosarcoma UMR106 (carriles 1 y 3) y osteoblastos MC3T3E1 (carriles 2 y 4) se sometieron a SDS-PAGE, seguido por electrotransferencia a un papel de nitrocelulosa, incubación con ¹²⁵I-AGE-ASB como ligando (2×10^6 cpm / mL medio de incubación; $1,5 \times 10^4$ cpm / ng proteína), y finalmente detección por autorradiografía. Se procesaron simultáneamente marcadores de peso molecular precoloreados. Se confirmó la especificidad de la unión comparando los resultados obtenidos con 0 ó 1.000 μ g / mL de AGE-ASB no marcado.

Por otro lado, en los extractos de membrana se encontraron varias proteínas con afinidad para AGE: dos bandas mayoritarias con pesos moleculares aparentes de 30 y 25 kDa, y bandas minoritarias con pesos moleculares de 50, 40-45 y 18 kDa (**figura 48**).

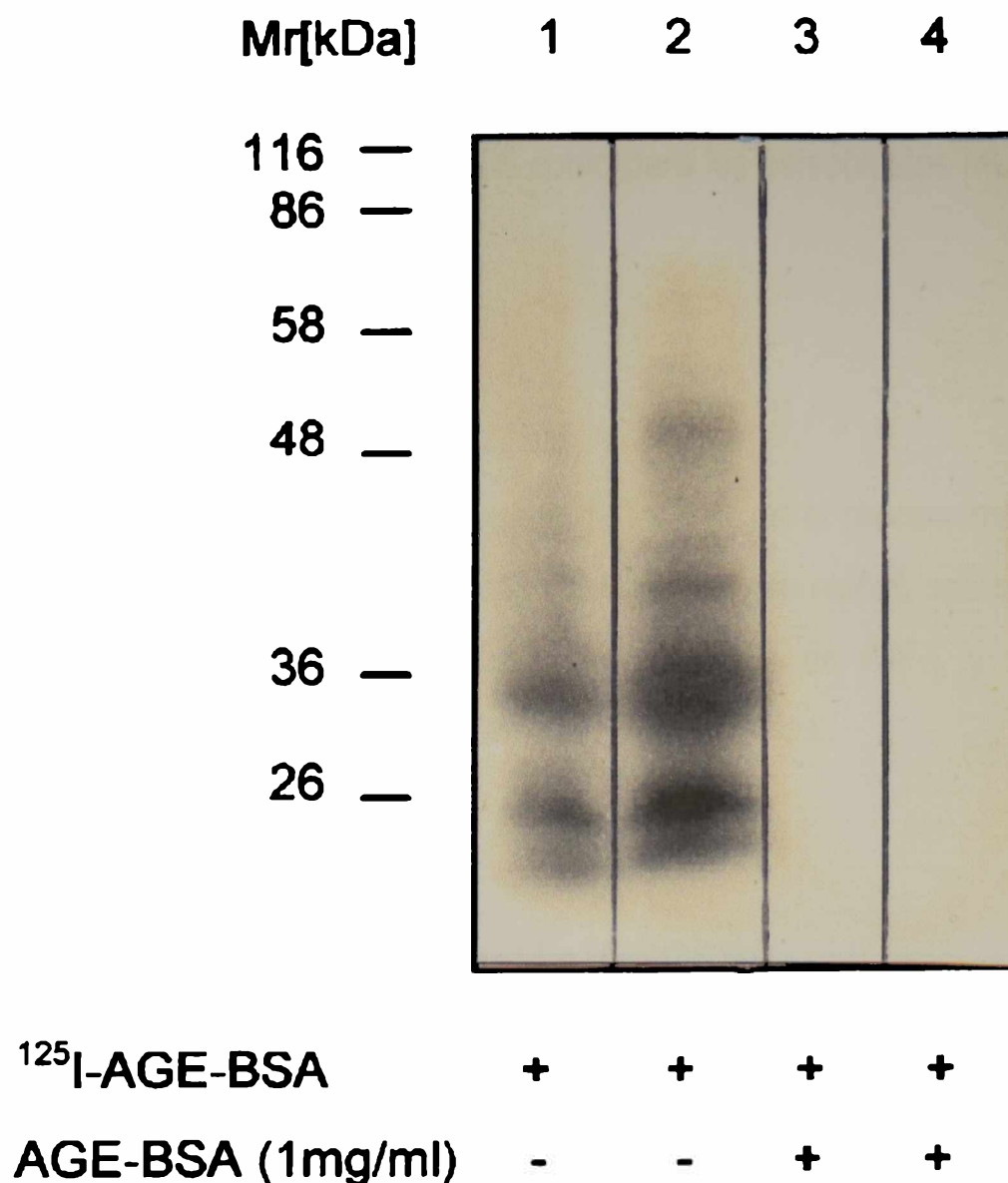


Figura 48. Ensayo de *ligand blot* con ¹²⁵I-AGE-ASB utilizando fracciones sub-celulares enriquecidas en membranas, en presencia o ausencia de un exceso de AGE-ASB no marcado. Las muestras obtenidas de células de osteosarcoma UMR106 (carriles 1 y 3) y osteoblastos MC3T3E1 (carriles 2 y 4) se sometieron a SDS-PAGE, seguido por electrotransferencia a un papel de nitrocelulosa, incubación con ¹²⁵I-AGE-ASB como ligando (2×10^6 cpm / mL medio de incubación; $1,5 \times 10^4$ cpm / ng proteína), y finalmente detección por autorradiografía. Se procesaron simultáneamente marcadores de peso molecular precoloreados. Se confirmó la especificidad de la unión comparando los resultados obtenidos con 0 ó 1.000 μ g / mL de AGE-ASB no marcado.

La unión de ^{125}I -AGE-ASB a estos sitios, tanto en los homogenados celulares totales como en los preparados de membrana, fue desplazada por un exceso de ligando no marcado (**figuras 47 y 48**, carriles 3 y 4). Sin embargo, cuando se realizó el ensayo con homogenados celulares totales en presencia de un exceso de ASB control, se mantuvieron las dos bandas de 45 y 30 kDa, con intensidades similares a las descritas mas arriba. Se obtuvieron patrones similares de proteínas con afinidad por ^{125}I -AGE-ASB, tanto para las células de osteosarcoma UMR106 como para los osteoblastos MC3T3E1 (**figuras 47 y 48**, carriles 1 y 2).

Con el objeto de evaluar la importancia del sistema de los IGF en el mecanismo por el cual los AGE modulan el crecimiento y desarrollo osteoblástico, se realizó una serie de experimentos para determinar la secreción basal y estimulada de IGF-I, y de sus proteínas ligadoras, al medio de cultivo de células osteoblasto-similes.

Ensayos de IGF-I.

(a) Validación del método de eliminación de IGFBP.

Como se ha descrito previamente, la presencia de IGFBP interfiere en el dosaje de IGF por métodos inmunológicos. Por dicha razón, fue necesario eliminar estas proteínas ligadoras del medio de cultivo antes de realizar el radioinmunoensayo para IGF-I. Para ello se utilizó el método de Mohan & Baylink publicado en 1995, que debió ser previamente validado para nuestras condiciones de ensayo.

Tal como se describe en Materiales y Métodos, se sometió al procedimiento de gel-filtración ácida / centrifugación, a una muestra preparada por la mezcla de ^{125}I -IGF-I con una alícuota de suero. Dicha muestra se aplicó a una columna de Bio-Gel para la extracción de IGFBP, y se eluyó por etapas. Luego se midió, en cada fracción recogida, la radioactividad asociada a ^{125}I -IGF-I y la capacidad total de unión de IGF-I (*binding capacity*). Como puede verse en la **figura 49**, el método separa adecuadamente las IGFBP (correspondientes al pico de *binding capacity*) del IGF-I (correspondiente al pico de radioactividad). Por análisis de *binding capacity* de las fracciones correspondientes a

IGF-I, no se encontraron evidencias de la presencia de IGFBP provenientes del suero. De acuerdo a estos resultados, se decidió estandarizar el método adoptando un volumen de 0,25 mL para la eliminación de las IGFBP, y un volumen de 1,5 mL para la elución final del IGF-I. Con la elección de estos volúmenes, la recuperación promedio del IGF-I agregado fue mayor del 90 %.

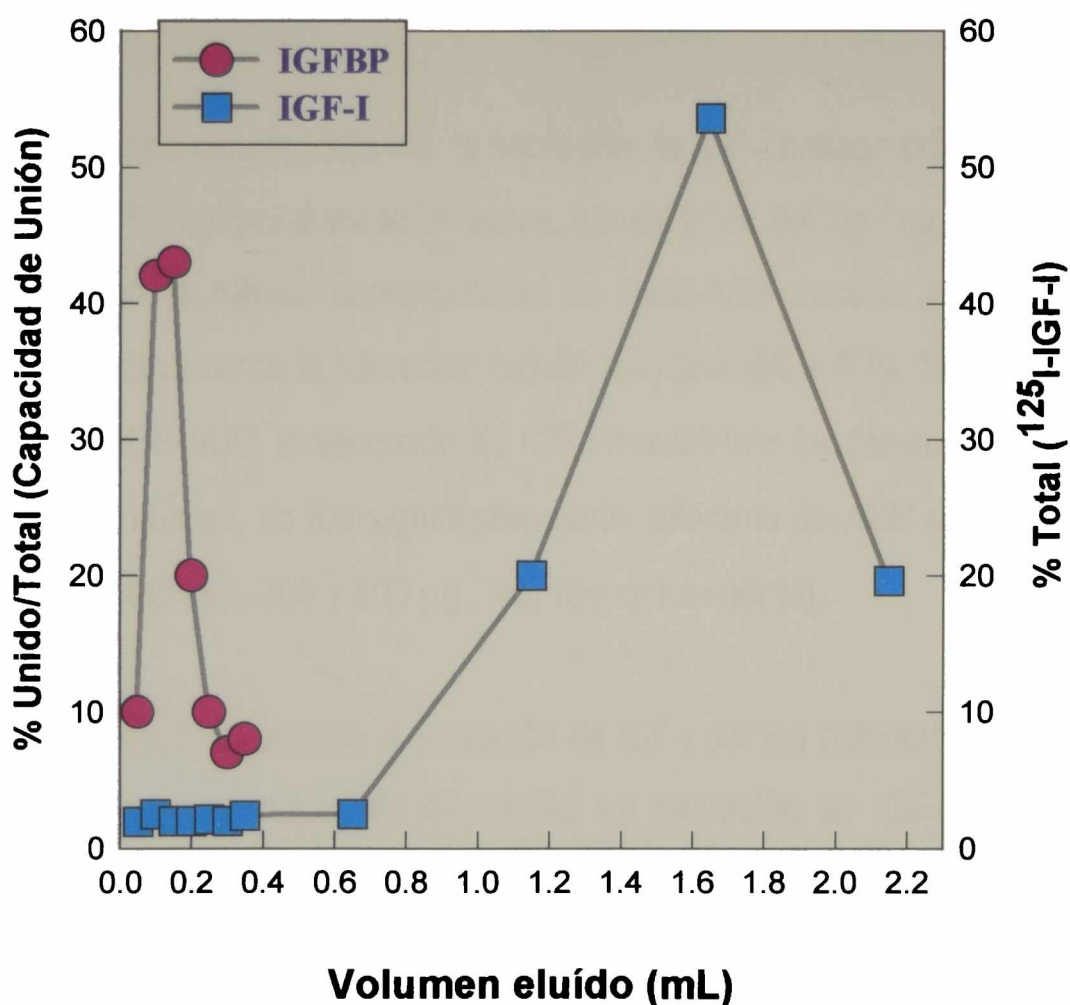


Figura 49. Separación del IGF-I de las IGFBP en una muestra de suero, por extracción con Bio-Gel P-10. Una alícuota de suero se mezcló con ^{125}I -IGF-I y buffer de elución. Dicha mezcla se aplicó a una mini-columna que contenía Bio-Gel P-10 hidratado, y se centrifugó durante 5 minutos como se describe en Materiales y Métodos. La columna se eluyó luego en forma secuencial con 10 x 50 y 10 x 250 μL de buffer de elución. Cada fracción así obtenida se sometió a un ensayo de Capacidad de Unión para evaluar contenido total de IGFBP, y se contó en un contador gamma para la cuantificación de ^{125}I -IGF-I.

(b) Secreción de IGF-I por osteoblastos en cultivo.

Para cada condición (células de osteosarcoma UMR106, y osteoblastos MC3T3E1 en diferentes estadios de desarrollo), las células se incubaron durante 24 horas con cantidades crecientes de AGE-ASB o ASB control. Luego de cada incubación, el IGF-I presente en los medios condicionados se separó de las IGFBP por gel-filtración ácida, y se dosó por RIA. En cada caso, la monocapa celular se solubilizó para dosar su contenido de proteínas. De esta forma, la secreción de IGF-I se normalizó por miligramo de proteína celular total.

En el caso de la línea celular UMR106, la secreción de IGF-I hallada post-incubación con 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ASB control durante 24 horas, fue de $2,5 \pm 0,4 \text{ ng} / \text{mg}$ proteína celular. La incubación con la misma concentración de AGE-ASB durante el mismo tiempo, disminuyó significativamente la secreción celular de IGF-I ($56 \pm 8 \%$ del basal). A 200 y 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de AGE-ASB, la secreción de IGF-I mostró una tendencia a la disminución (**figura 50**). Sin embargo, no fue significativamente diferente de ASB control (72 ± 19 y $80 \pm 23 \%$ del control para 200 y 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente).

En otros experimentos, se estudió la secreción de IGF-I por los osteoblastos MC3T3E1 a través de sus sucesivas etapas de desarrollo. La secreción de IGF-I en condiciones basales (es decir, post-incubación con 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ASB control durante 24 horas) mostró un patrón temporal bifásico (**tabla X**): se observó un mínimo de secreción en los cultivos de 15 días (osteoblastos diferenciados), mientras que los niveles máximos de IGF-I se alcanzaron a los 25 días de cultivo (etapa de mineralización).

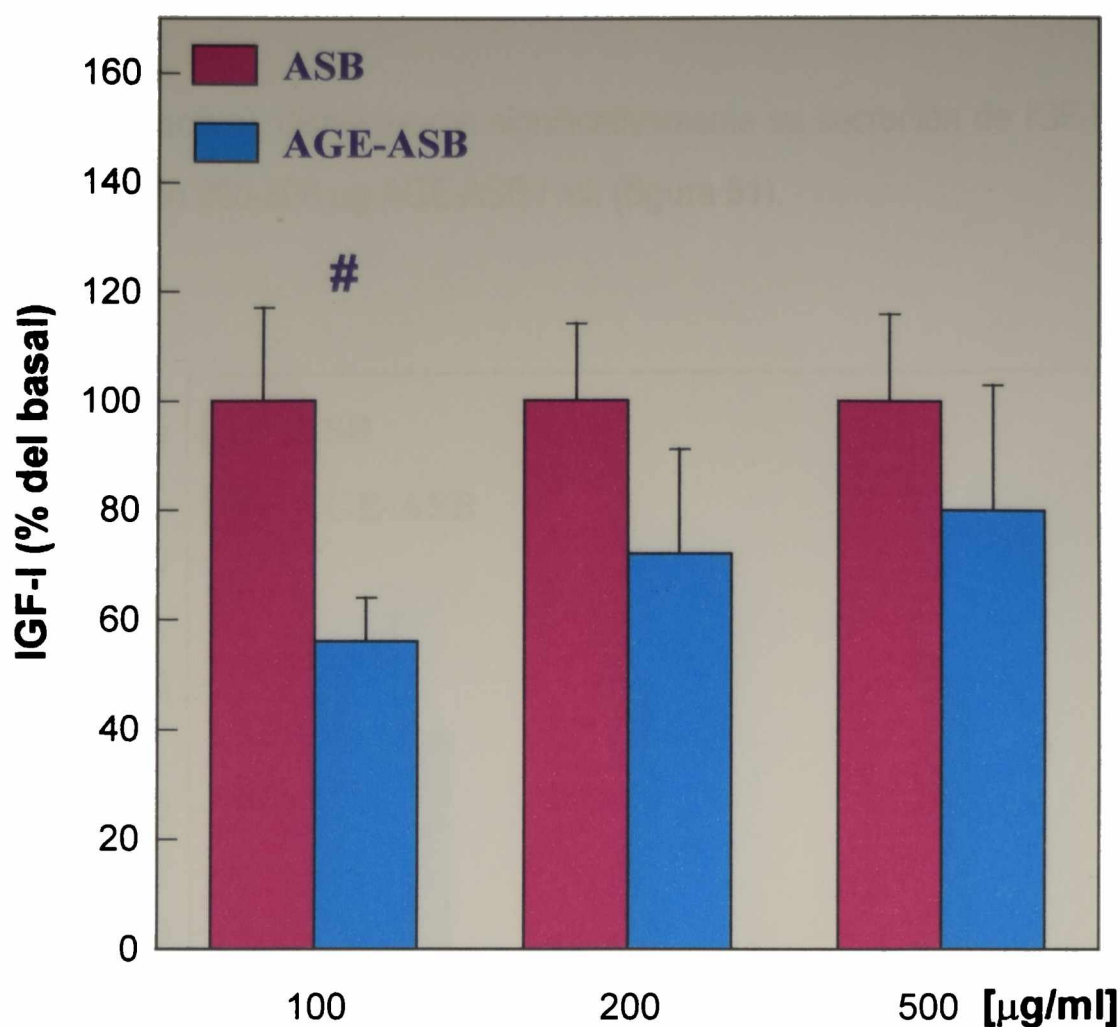


Figura 50. Las células de osteosarcoma UMR106 se cultivaron durante 3 días, y luego se incubaron por 24 horas en DMEM libre de suero con AGE-ASB o ASB control a las concentraciones indicadas en la figura. Los medios condicionados se extrajeron para eliminar las IGFBP, y se analizaron para determinar la concentración de IGF-I. Los resultados se expresan como porcentaje de ASB control, y representan la media \pm SEM. Las diferencias entre AGE-ASB y ASB control son: #, $p < 0,05$.

Tabla X. Secreción basal de IGF-I por células MC3T3E1 en distintas etapas de desarrollo

Estadio de desarrollo celular	IGF-I [ng / mg proteína celular]
Proliferación	10.3 \pm 4.0
Diferenciación	3.5 \pm 1.2
Mineralización	24.0 \pm 1.0

A continuación se investigaron las posibles perturbaciones sobre la secreción basal de IGF-I de las células MC3T3E1, como consecuencia de su exposición durante 24 horas a diferentes concentraciones de AGE-ASB. Dichas células en su etapa preosteoblástica (en

proliferación activa), disminuyeron significativamente su secreción de IGF-I frente a una incubación con 200-500 μg AGE-ASB / mL (figura 51).

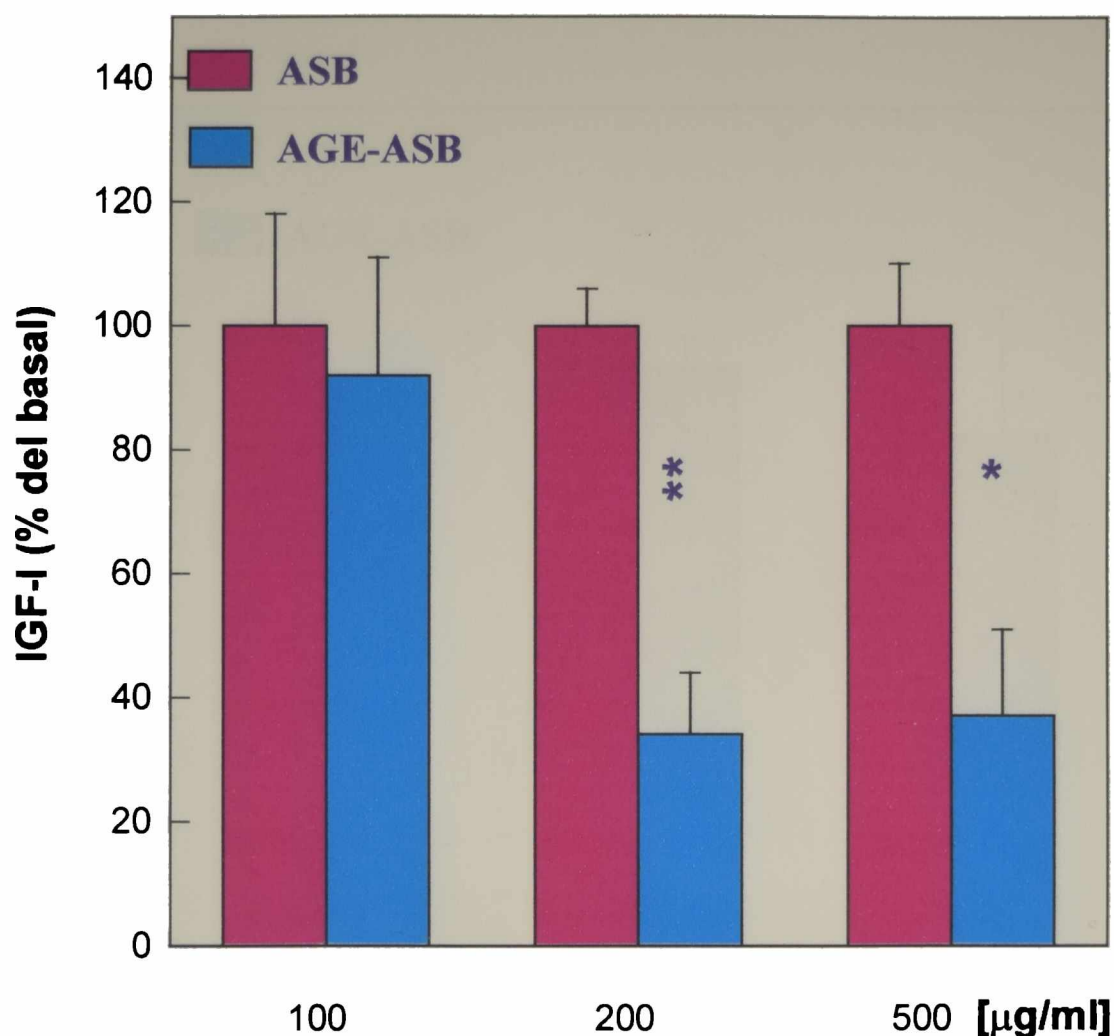


Figura 51. Los osteoblastos MC3T3E1 se cultivaron durante 3 días, y luego se incubaron por 24 horas en DMEM libre de suero con AGE-ASB o ASB control a las concentraciones indicadas en la figura. Los medios condicionados se extrajeron para eliminar las IGFBP, y se analizaron para determinar la concentración de IGF-I. Los resultados se expresan como porcentaje de ASB control, y representan la media \pm SEM. Las diferencias entre AGE-ASB y ASB control son: *, $p < 0,02$; **, $p < 0,002$.

Sin embargo, en la etapa de diferenciación (cultivos de 15 días, osteoblastos fenotípicamente maduros) la incubación con AGE-ASB no indujo cambios significativos en la secreción de IGF-I, respecto de ASB control (105, 80 y 83 % del control para 100, 200 y 500 μg AGE-ASB / mL). Por el contrario, la secreción de IGF-I por osteoblastos

MC3T3E1 en su estadio de mineralización (25 días de cultivo), se vio incrementada significativamente por una incubación de 24 horas con 100-200 μg AGE-ASB / mL (figura 52).

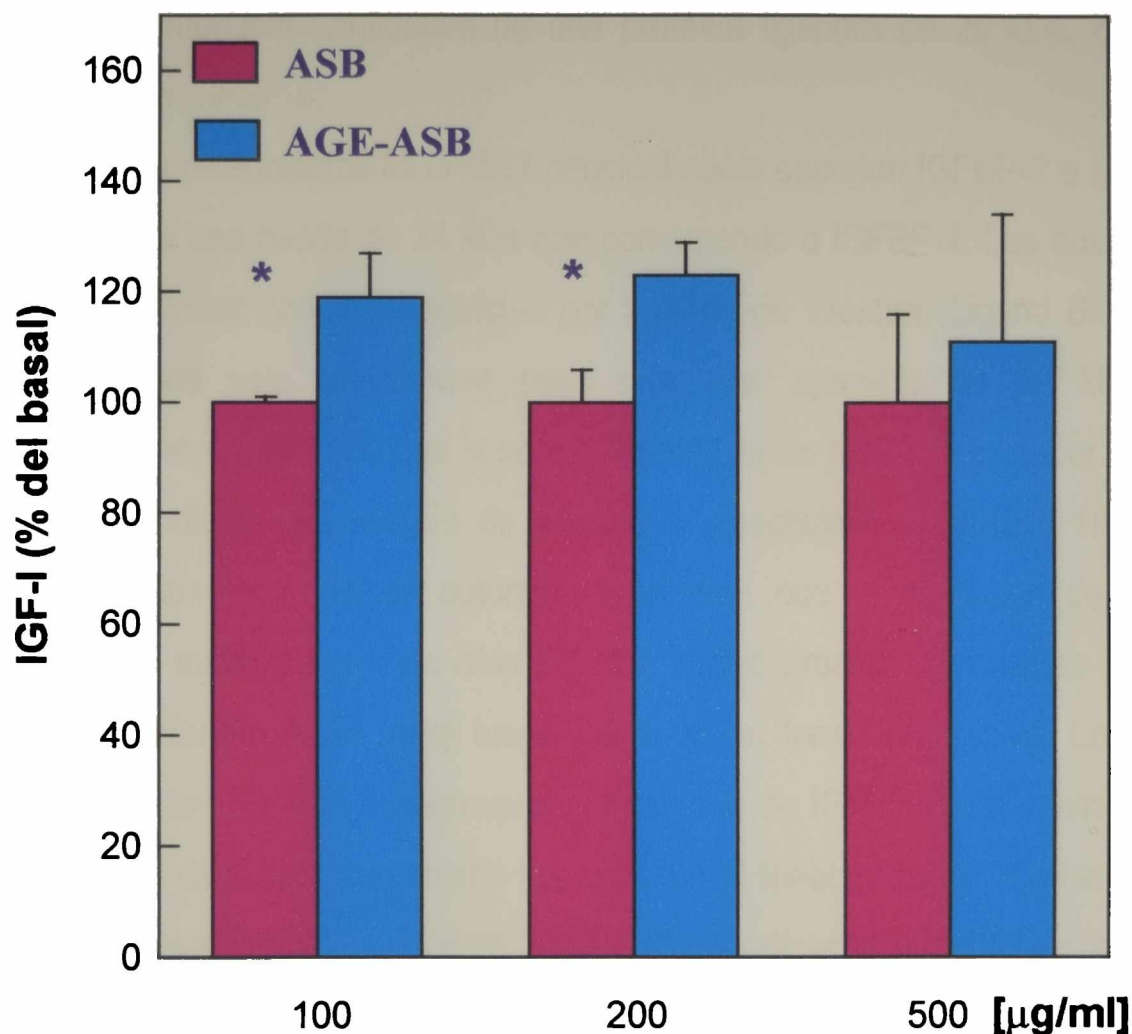


Figura 52. Los osteoblastos MC3T3E1 se cultivaron durante 25 días, y luego se incubaron por 24 horas en DMEM libre de suero con AGE-ASB o ASB control a las concentraciones indicadas en la figura. Los medios condicionados se extrajeron para eliminar las IGFBP, y se analizaron para determinar la concentración de IGF-I. Los resultados se expresan como porcentaje de ASB control, y representan la media \pm SEM. Las diferencias entre AGE-ASB y ASB control son: *, $p < 0,02$.

(c) Secreción de IGFBP por osteoblastos en cultivo.

Se ha encontrado que las líneas celulares osteoblásticas utilizadas en estos experimentos secretan diferentes IGFBP al medio de cultivo. Así, las células UMR106 principalmente sintetizan IGFBP-4, una proteína de 24 kDa que inhibe la acción del IGF-I en la mayoría de los sistemas (Mohan 1989, Topping 1991). Adicionalmente, esta línea celular produce menores cantidades de una proteína ligadora de 29 kDa, que se ha identificado como IGFBP-5.

Por otro lado, los osteoblastos MC3T3E1 principalmente secretan IGFBP-2 e IGFBP-5, y en menor medida una banda de 24 kDa que corresponde a IGFBP-4. Las dos proteínas ligadoras mayoritarias son indistinguibles por análisis de Western Ligand Blot, ya que migran como una sola banda con peso molecular aparente de 29 kDa. Otros investigadores han demostrado que la secreción relativa de IGFBP-2 y -5 por esta línea celular es dependiente del estadio de desarrollo osteoblástico (Thraillkill 1995b). Por estudios de inmuno-blot, dichos autores encontraron que la secreción de IGFBP-5 muestra un pico máximo entre los días 8-14 de cultivo (transición entre las etapas de proliferación y diferenciación), para luego disminuir en forma progresiva. Los mismos autores encontraron también que aunque la secreción de IGFBP-2 era mínima durante los primeros días de cultivo, aumentaba luego en forma lineal hasta los 25 días de cultivo (estadio de mineralización), siendo la proteína ligadora predominante en las etapas finales del desarrollo osteoblástico.

En estos experimentos, para cada condición (células de osteosarcoma UMR106, y osteoblastos MC3T3E1 en diferentes estadios de desarrollo) las células se incubaron durante 24 horas con cantidades crecientes de AGE-ASB o ASB control. Luego de cada incubación, los medios condicionados se concentraron y se sometieron a Western Ligand Blot para la semicuantificación de IGFBP, como se describe en Materiales y Métodos.

En el caso de las células UMR106 incubadas con AGE-ASB o ASB control, el análisis de ligand blot confirmó la secreción predominante de una IGFBP de 24 kDa, así como de una banda minoritaria de 29 kDa (**figura 53-A**). Cuando se cuantificaron las bandas de IGFBP correspondientes a cada condición experimental, se encontró una disminución significativa para 100 µg AGE-ASB / mL (80 % respecto a ASB control) (**figura 53-B**).

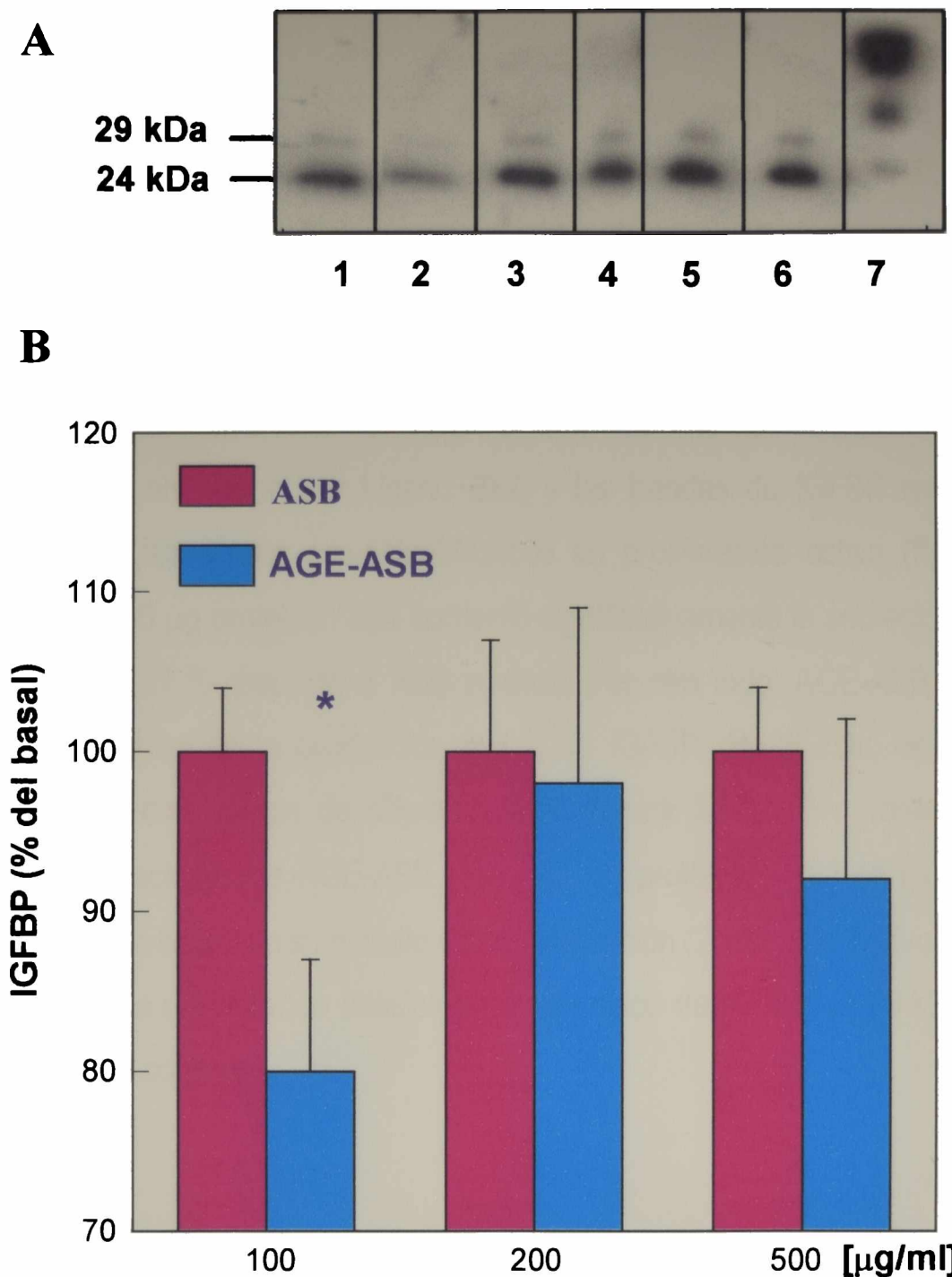


Figura 53. Las células de osteosarcoma de rata UMR106 se incubaron con ASB control (carriles 1, 3 y 5) o con AGE-ASB (carriles 2, 4 y 6), a concentraciones de 100 µg/mL (carriles 1 y 2), 200 µg/mL (carriles 3 y 4) o 500 µg/mL (carriles 5 y 6). (A) Luego de una incubación de 24 horas, los medios condicionados se analizaron para evaluar la presencia de IGFBP por Western Ligand Blot, utilizando ^{125}I -IGF-I como ligando. Carril 7: 10 µL de suero de rata. (B) Los papeles de nitrocelulosa se cortaron en coincidencia con las bandas reveladas por autorradiografía, y se contaron en un contador gamma para su semicuantificación. Los resultados para AGE-ASB se muestran como porcentaje del valor obtenido para el ASB control correspondiente, y se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias entre AGE-ASB y ASB control son: *, $p < 0,05$.

En las células osteoblásticas MC3T3E1, el análisis de Western Ligand Blot mostró una banda mayoritaria de 29 kDa. Este patrón de secreción de IGFBP, que muy probablemente se debió a contribuciones variables de IGFBP-2 y -5, se mantuvo a lo largo de las sucesivas etapas de desarrollo osteoblástico (**figuras 54-A, 55-A y 56-A**). Cultivos de células MC3T3E1 de 3, 15 y 25 días, se incubaron con diferentes concentraciones de AGE-ASB o ASB control durante 24 horas. Los medios condicionados se analizaron por Ligand Blot, y las bandas de IGFBP resultantes se cuantificaron. En las células pre-osteoblásticas en proliferación activa (**figura 54-B**), AGE-ASB (100-500 μg proteína / mL) aumentó significativamente la secreción de IGFBP de 29 kDa (124-127 % respecto a ASB control). Por otro lado, AGE-ASB no provocó cambios significativos en la producción global de IGFBP de 29 kDa, en cultivos de MC3T3E1 de 15 días (etapa de diferenciación) (**figura 55-B**). Sin embargo, cuando distintas concentraciones de AGE-ASB (200-500 μg proteína / mL) se incubaron con cultivos que habían llegado a su estadio de mineralización (25 días de cultivo) (**figura 56-B**), se observó una estimulación bifásica de la secreción de IGFBP de 29 kDa (131-169 % respecto a ASB control).

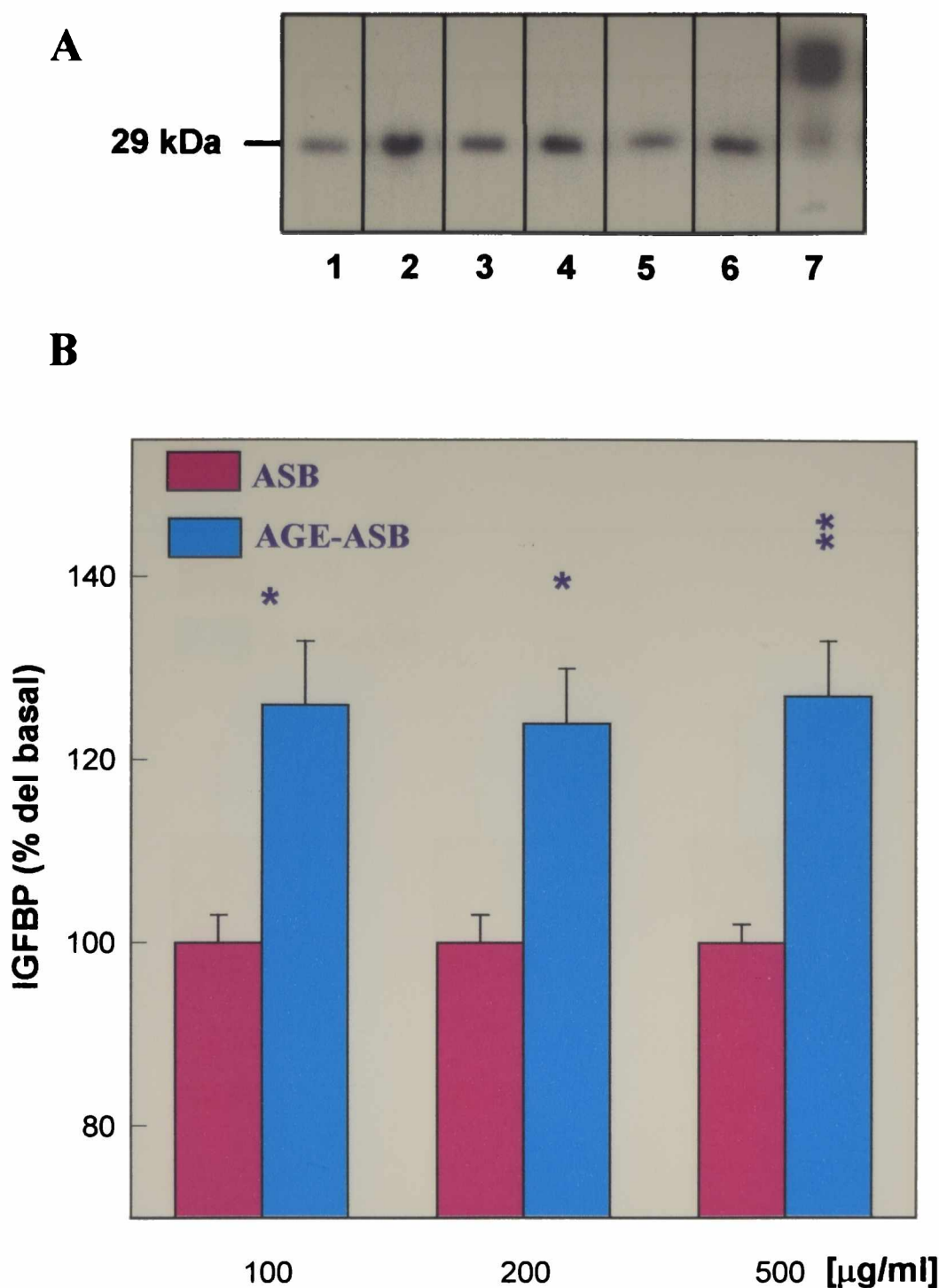


Figura 54. Los pre-osteoblastos MC3T3E1 en proliferación activa (3 días de cultivo) se incubaron con ASB control (carriles 1, 3 y 5) o con AGE-ASB (carriles 2, 4 y 6), a concentraciones de 100 µg/mL (carriles 1 y 2), 200 µg/mL (carriles 3 y 4) o 500 µg/mL (carriles 5 y 6). (A) Luego de una incubación de 24 horas, los medios condicionados se analizaron para evaluar la presencia de IGFBP por Western Ligand Blot, utilizando 125 I-IGF-I como ligando. Carril 7: 10 µL de suero de rata. (B) Los papeles de nitrocelulosa se cortaron en coincidencia con las bandas reveladas por autorradiografía, y se contaron en un contador gamma para su semicuantificación. Los resultados para AGE-ASB se muestran como porcentaje del valor obtenido para el ASB control correspondiente, y se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias entre AGE-ASB y ASB control son: *, $p < 0,02$; **, $p < 0,01$.

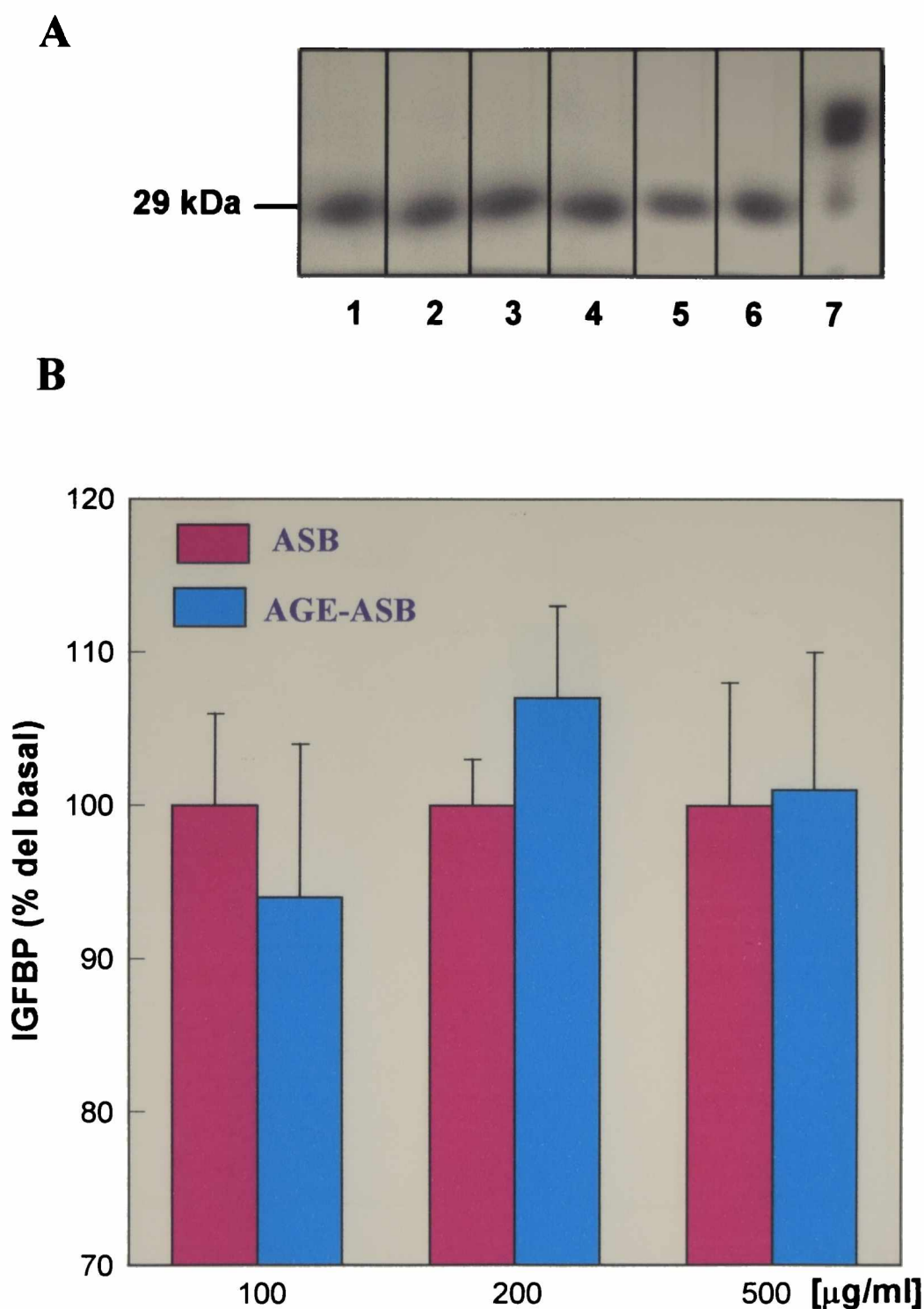


Figura 55. Las células MC3T3E1 de 15 días de cultivo (etapa de diferenciación) se incubaron con ASB control (carriles 1, 3 y 5) o con AGE-ASB (carriles 2, 4 y 6), a concentraciones de 100 µg/mL (carriles 1 y 2), 200 µg/mL (carriles 3 y 4) o 500 µg/mL (carriles 5 y 6). (A) Luego de una incubación de 24 horas, los medios condicionados se analizaron para evaluar la presencia de IGFBP por Western Ligand Blot, utilizando 125 I-IGF-I como ligando. Carril 7: 10 µL de suero de rata. (B) Los papeles de nitrocelulosa se cortaron en coincidencia con las bandas reveladas por autorradiografía, y se contaron en un contador gamma para su semicuantificación. Los resultados para AGE-ASB se muestran como porcentaje del valor obtenido para el ASB control correspondiente, y se expresan como la media \pm SEM.

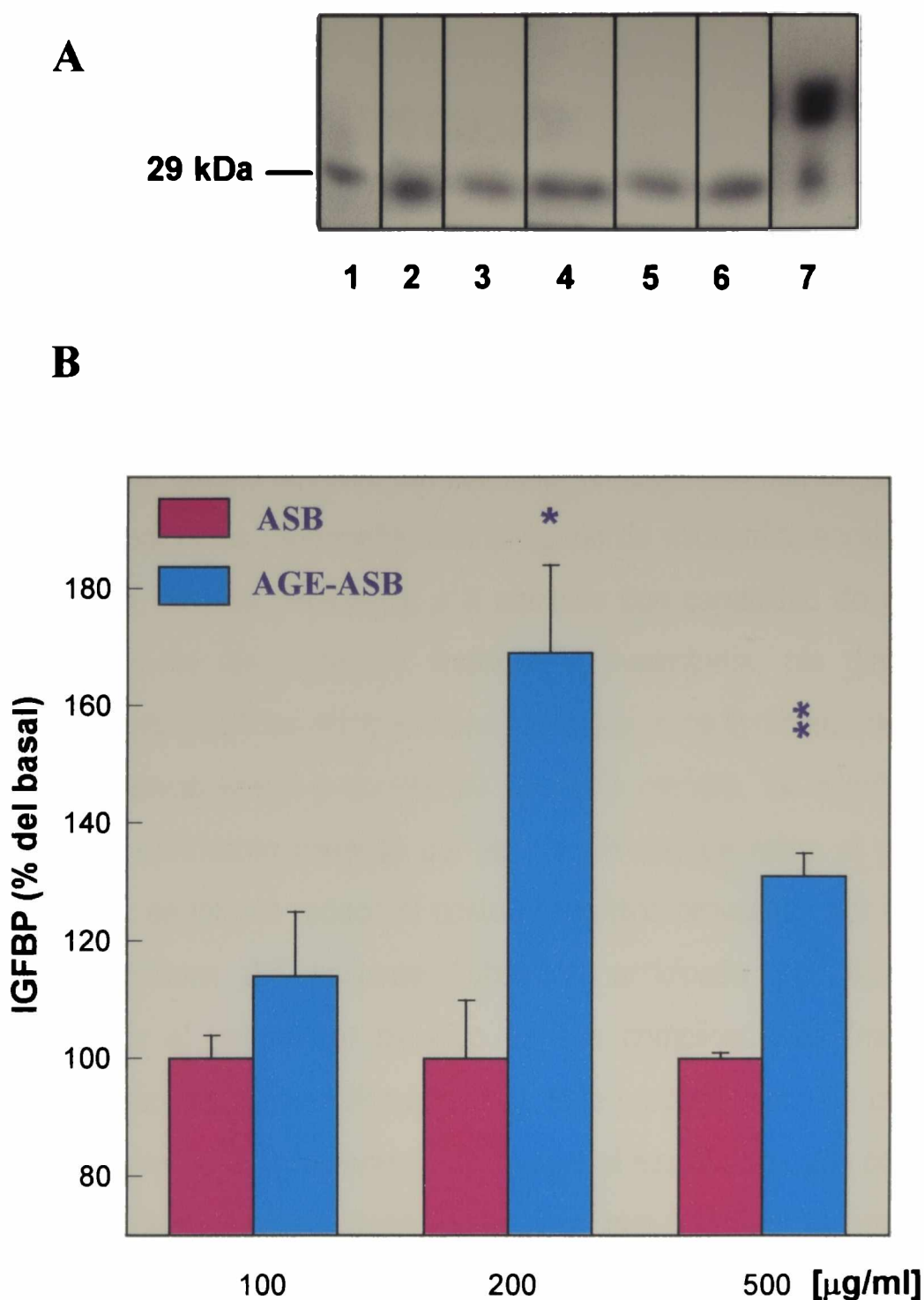


Figura 56. Los osteoblastos MC3T3E1 en estadio de mineralización (25 días de cultivo) se incubaron con ASB control (carriles 1, 3 y 5) o con AGE-ASB (carriles 2, 4 y 6), a concentraciones de 100 µg/mL (carriles 1 y 2), 200 µg/mL (carriles 3 y 4) o 500 µg/mL (carriles 5 y 6). (A) Luego de una incubación de 24 horas, los medios condicionados se analizaron para evaluar la presencia de IGFBP por Western Ligand Blot, utilizando ^{125}I -IGF-I como ligando. Carril 7: 10 µL de suero de rata. (B) Los papeles de nitrocelulosa se cortaron en coincidencia con las bandas reveladas por autorradiografía, y se contaron en un contador gamma para su semicuantificación. Los resultados para AGE-ASB se muestran como porcentaje del valor obtenido para el ASB control correspondiente, y se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias entre AGE-ASB y ASB control son: *, $p < 0,02$; **, $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

La Diabetes mellitus es una enfermedad que afecta al 3-5% de la población. Sus efectos a largo plazo generalmente incluyen el desarrollo de diversas complicaciones crónicas de origen vascular (angiopatías). De las diferentes angiopatías posibles, se han estudiado con mayor detalle aquellas directamente relacionadas con un aumento en la mortalidad de los pacientes (nefropatía, infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente vascular periférico), y a aquellas con capacidad de provocar una discapacidad grave de los pacientes (retinopatía, neuropatía, pie diabético). Esta selectividad en el estudio de las complicaciones crónicas se ha justificado desde el punto de vista de su impacto social y económico. De esta manera, se intenta lograr una disminución en el sufrimiento causado por las complicaciones sobre el paciente y su entorno, y a la vez se intenta reducir el costo económico provocado por la pérdida de productividad prematura del paciente (jubilación anticipada por discapacidad o fallecimiento) o por el tratamiento paliativo de sus complicaciones (mayor tasa de hospitalización, hemodiálisis, rehabilitación, etc.). Este proceso lógico de priorización de las investigaciones, tiene el inconveniente de relegar el estudio de otras complicaciones crónicas de la Diabetes -como las óseas y articulares- que no ponen en riesgo la vida del paciente y por lo general no son incapacitantes.

A la luz de los resultados de muchas de las investigaciones realizadas hasta la fecha, se han propuesto diversas teorías unificadoras que intentan explicar el origen de las complicaciones crónicas de la Diabetes mellitus. Estas teorías paradigmáticas, de las cuales la de los AGE es la más aceptada actualmente, parten del desbalance de uno o más mecanismos troncales. Estos desbalances inducen a mediano plazo alteraciones sistémicas a nivel de la microcirculación y/o de los grandes vasos, y a largo plazo provocan el desarrollo de complicaciones en los tejidos irrigados por los lechos vasculares más afectados.

Previamente al desarrollo del presente trabajo de tesis, varios investigadores plantearon la posibilidad de que las alteraciones óseas asociadas con la Diabetes, pudieran deberse al menos en parte a un aumento en la glicosilación no enzimática de

proteínas del hueso. Así, en un estudio se encontró que el nivel de AGE unido covalentemente al colágeno óseo, aumentaba significativamente en el hueso cortical de ratas diabéticas y/o envejecidas (Tomasek 1994). En otro estudio realizado con ratas diabéticas, se encontró un incremento en la resistencia a la hidrólisis y en el grado de glicación del colágeno óseo, respecto de ratas normales (Locatto 1993). Finalmente, un tercer grupo de investigadores demostró que la formación *in vitro* de AGE sobre una matriz ósea proteica, inhibía su capacidad de formación de hueso endocondral cuando se la implantaba en animales no diabéticos (Fong 1993). En este último trabajo, la inhibición de la formación ósea se demostró por métodos histológicos, y por un descenso en varios marcadores bioquímicos asociados al hueso ectópico formado (contenido de calcio, captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y actividad enzimática de FAL). Toda esta evidencia parece indicar que la acumulación progresiva de AGE sobre proteínas del hueso, podría favorecer el establecimiento de las complicaciones óseas asociadas con Diabetes mellitus.

En principio, los AGE podrían inducir alteraciones en el hueso a través de varios mecanismos: (a) cambios directos en la bioactividad de ciertas proteínas óseas, estructurales o no; (b) alteraciones micro- y macrovasculares similares a las descritas para otros tejidos; (c) cambios inducidos por AGE en el funcionalismo de distintos tipos celulares específicos del hueso; (d) modificación en la concentración local de factores de crecimiento relevantes para el hueso, como respuesta a la acción de los AGE sobre diversas células vasculares y óseas.

Los efectos de los AGE acumulados en el hueso, sobre células vasculares como las endoteliales, musculares lisas y mononucleares, en principio no deberían diferir de los que se han descrito ya para los lechos vasculares de otros tejidos (isquemia y neovascularización en capilares, aterogénesis en vasos de mayor calibre). En un tejido tan vascularizado como el óseo, estas alteraciones podrían limitar la nutrición tisular por debajo de niveles críticos, promoviendo una menor formación y remodelamiento del hueso.

Mucho menos predecibles resultan los posibles efectos de los AGE sobre los tipos celulares específicos de hueso, como osteoblastos y osteoclastos. Los resultados obtenidos por el grupo de Fong en 1993, esto es que la acumulación de AGE sobre una matriz proteica extracelular ósea, inhibía el potencial de dicha matriz para la formación

ectópica de hueso, nos permitieron plantear la hipótesis de que un exceso de AGE pudiera afectar el funcionalismo de los osteoblastos. De existir esta alteración, podría deberse a una acción de los AGE a nivel de la proliferación y/o diferenciación osteoblástica, a la pérdida de bioactividad (por modificación química directa) de una proteína de origen osteoblástico implicada en el proceso de formación ósea, o a ambos. Con el objeto de comprobar la factibilidad de esta hipótesis, inicialmente nos propusimos: (1) seleccionar y caracterizar un modelo adecuado de células osteoblásticas en cultivo; (2) seleccionar una proteína que sea sintetizada por los osteoblastos y esté implicada en el proceso de formación ósea, tal como la fosfatasa alcalina (FAL); y otra proteína soluble, abundante y ubicua que no tenga acción sobre las células de hueso *per se*, como la albúmina sérica; (3) inducir la formación de AGE sobre ambas proteínas *in vitro*; (4) evaluar si la glicación de la FAL induce modificaciones en la bioactividad de la misma; (5) evaluar posibles cambios en la proliferación y/o diferenciación de los osteoblastos en cultivo, como consecuencia de su incubación con la albúmina modificada por AGE.

Para llevar a cabo estos experimentos, en primer lugar seleccionamos dos líneas celulares osteoblásticas ampliamente utilizadas por otros investigadores: UMR106 y MC3T3E1.

Las células UMR106 constituyen una línea clonal derivada de un osteosarcoma transplantable de rata, inducido en ratas Sprague-Dawley por inyección de ^{32}P . Estas células transformadas poseen receptores para EGF, y expresan varios marcadores de fenotipo osteoblástico maduro, tales como la síntesis de fosfatasa alcalina ósea y de colágeno de tipo I, y la regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico por PTH, prostaglandinas y esteroides inductores de la resorción ósea (Martin 1976, Partridge 1983). A diferencia de los osteoblastos primarios, no sintetizan osteocalcina ni osteopontina. En nuestras condiciones de cultivo, las células de osteosarcoma UMR106 mostraron una elevada actividad enzimática de FAL.

Las células osteoblásticas MC3T3E1 corresponden a una línea celular no transformada, derivada originalmente de calvaria de ratón neonato (Kodama 1981). Se ha demostrado que el cultivo de estas células en un medio suplementado con β -glicerofosfato y ácido ascórbico, induce su desarrollo a través de etapas muy similares a las observadas tanto en cultivos *in vitro* de osteoblastos primarios, como en osteoblastos

reclutados *in vivo*. Así, durante los primeros días de cultivo estas células proliferan activamente (fase preosteoblástica). Alrededor del día 10 de cultivo sufren un arresto en la proliferación, y comienzan a expresar y secretar marcadores fenotípicos de osteoblastos maduros como FAL, osteocalcina, colágeno de tipo I y otras proteínas de matriz extracelular (osteoblastos diferenciados post-mitóticos). A partir del día 20 de cultivo comienzan a mineralizar la matriz extracelular que sintetizaron (fase mineralizante del cultivo). Finalmente, alrededor del día 30 de cultivo mueren por apoptosis (Quarles 1992). En nuestras condiciones de cultivo, la actividad celular de FAL fue indetectable en los cultivos de preosteoblastos en proliferación activa (3 días de cultivo); comenzó a detectarse en las células diferenciadas (15 días de cultivo); y llegó a un máximo en las células en su etapa de mineralización (25 días de cultivo). La tinción con AgNO_3 demostró la presencia de nódulos minerales extracelulares en cultivos de 25 días, indicando que habían llegado a la fase de mineralización. Sin embargo, este mineral extracelular estaba ausente en los cultivos de 15 días.

Una vez establecido el modelo de células osteoblásticas en cultivo, la siguiente etapa consistió en la selección y glicación *in vitro* de una proteína soluble, abundante y ubicua, que en principio no tenga acción sobre los osteoblastos *per se*, pero que tenga posibilidades de entrar en contacto con estos tipos celulares *in vivo*. La proteína de elección fue la albúmina, ya que constituye un 65% de las proteínas plasmáticas y posee un peso molecular relativamente bajo (60 kDa), por lo cual es frecuente su acumulación extravascular en enfermedades como la Diabetes mellitus que cursan con un aumento en la permeabilidad endotelial. En este sentido, la albúmina glicada ha sido ampliamente utilizada por otros investigadores para estudiar el efecto de los AGE sobre diversos tipos celulares (monocitos / macrófagos, células endoteliales, pericitos, células mesangiales, fibroblastos, células del músculo liso, linfocitos T y células neuronales). En nuestros ensayos, la albúmina sérica bovina (ASB) utilizada se modificó extensamente con AGE por medio de un protocolo ya utilizado previamente por varios investigadores, que consiste en la incubación de ASB con glucosa-6-fosfato 100 mM durante seis semanas a pH, temperatura y esterilidad controladas. Este proceso lleva a la formación de una mezcla de productos de glicación intermedios y avanzados, que se cree que es representativo del espectro de AGE existente *in vivo* (Vlassara 1992). La formación de

estructuras AGE unidas covalentemente a la albúmina (AGE-ASB) se determinó espectrofluorométricamente. Cabe aclarar que dicho método no dosa con precisión las estructuras AGE terminales, ya que los fluoróforos más importantes de los productos de glicación son sus compuestos intermedios (Radoff 1991). Sin embargo, esta metodología ha sido ampliamente utilizada como indicador global de la modificación irreversible de proteínas por AGE (Monnier & Cerami 1981, Monnier 1986, Vlassara 1994, Tomasek 1994). Los resultados fluorométricos obtenidos en nuestros estudios (35% y 6% de fluorescencia relativa para AGE-ASB y ASB control, respectivamente) fueron compatibles con los que se han encontrado asociados al colágeno óseo en otros trabajos, tanto en roedores diabéticos (20-28% de fluorescencia relativa) como en roedores no diabéticos (8-15% fluorescencia relativa).

Subsiguientemente, se procedió a la selección de una proteína que fuera sintetizada por los osteoblastos y que estuviera implicada en el proceso de formación ósea. En este sentido se eligió a la fosfatasa alcalina (FAL), que es una metaloenzima que se encuentra anclada por medio de residuos glicosil-fosfatidil-inosítidos a la superficie externa de la membrana plasmática de varios tipos celulares. La isoenzima ósea de esta proteína es expresada en altos niveles por los osteoblastos diferenciados, y se la ha implicado en el proceso de formación del hueso (en particular, en la mineralización del osteoide o matriz extracelular ósea). Por otro lado, ya que la FAL es una exoenzima que se encuentra expuesta al compartimiento extracelular, es plausible suponer que su actividad y función pudieran verse particularmente afectados *in vivo* por incrementos en los niveles extracelulares de glucosa. Con el objeto de evaluar la racionalidad de esta hipótesis, se estudió el efecto de distintos grados de glicación de la FAL sobre sus propiedades biológicas. Para ello, se incubó la enzima *in vitro* a pH, temperatura y esterilidad controladas, con 100 mM de distintos azúcares (glucosa, fructosa o ribosa) durante diferentes períodos de tiempo (1, 7, 14 ó 35 días). En algunos experimentos, se probaron distintas concentraciones de un mismo azúcar (glucosa) para evaluar una posible dosis-dependencia. En otros ensayos, se coincubó la mezcla de reacción con un inhibidor de la formación de AGE (aminoguanidina). Para cada condición experimental, se determinó la actividad enzimática de la FAL, la presencia de productos de glicación tempranos unidos covalentemente a la enzima (fructosamina o Amadori), la

presencia de AGE-FAL (fluorescencia), el patrón de pesos moleculares de las proteínas presentes (SDS-PAGE), y la movilidad y actividad enzimática de la FAL en una electroforesis sobre acetato de celulosa gelatinizado a pH alcalino (visualización de la banda por un método colorimétrico / enzimático *in situ*).

La acumulación de productos de glicación tempranos y avanzados sobre la FAL, aumentó como función directa del tiempo de incubación, y de la potencia glicosilante del azúcar empleado (ribosa > fructosa > glucosa). Se encontró también una correlación positiva entre los niveles de fructosamina-FAL y de AGE-FAL. Esta correlación es consistente con estudios de otros investigadores, que han demostrado que la velocidad de formación de AGE es dependiente de la concentración de los productos de Amadori en el equilibrio.

Para todos los monosacáridos probados, se observó además una inactivación progresiva de la actividad enzimática de la FAL dependiente del tiempo de incubación. En general, el grado de esta inhibición enzimática se asoció con los niveles de fructosamina y de fluorescencia (AGE) asociados a la FAL. Sin embargo, luego de períodos de incubación cortos (24 horas), se encontraron niveles de fructosamina-FAL visiblemente aumentados, sin que se observaran cambios significativos en su actividad enzimática. Por otro lado, la coincubación durante un tiempo más largo (2 semanas) con aminoguanidina -un inhibidor específico de AGE que no interfiere con la formación de los productos de Amadori- provocó una disminución en la aparición de fluorescencia asociada a AGE, y una recuperación de la actividad enzimática de la FAL. Estas observaciones sugieren que los grupos amino libres inicialmente involucrados en el proceso de glicación de la FAL no se encuentran comprometidos en el sitio activo de la enzima. A medida que progresa la glicación, la disminución observada en la actividad enzimática podría deberse a una o más causas diferentes. Por un lado, podrían glicarse otros grupos amino libres estéricamente menos accesibles, pero que se encuentren comprometidos en el sitio activo. Por otro lado, podrían formarse entrecruzamientos covalentes intra- e intermoleculares como consecuencia de la aparición de ciertas estructuras AGE. Estos entrecruzamientos, a través de cambios conformacionales de la FAL, podrían limitar el acceso de los sustratos al sitio activo de la enzima, o podrían impedir una adecuada interacción entre los monómeros de FAL. De todas formas, ya que

no se encontraron diferencias en los patrones de peso molecular de las distintas muestras (por análisis de SDS-PAGE), debe descartarse la formación de entrecruzamientos intermoleculares.

Varios investigadores han demostrado que la glicosilación no enzimática induce alteraciones en las propiedades estructurales de las proteínas estudiadas. En la mayoría de estos casos, los principales sitios de glicación son los grupos ϵ -amino libres de los residuos de lisina. Esto podría darse también en el caso de la FAL, ya que posee 17 residuos de lisina, provocando entonces un aumento relativo de la carga superficial negativa de la proteína. Esto a su vez podría inducir un incremento en la movilidad electroforética de la FAL en un medio alcalino. Estas suposiciones se ven apoyadas por los resultados hallados: en una electroforesis sobre acetato de celulosa en medio alcalino, la movilidad de la banda de FAL aumentó en una forma dependiente del tiempo de incubación. Así, los cambios en la relación de frentes de corrida (ΔR_f), correlacionaron en forma directa con los niveles de fructosamina-FAL y AGE-FAL.

En pacientes diabéticos mal compensados, no es infrecuente hallar concentraciones de glucosa plasmática del orden de 20-30 mM. A este entorno hiperglucémico podría entonces estar expuesta la FAL anclada a la superficie externa de la membrana plasmática del osteoblasto, que de hecho representa la isoenzima ósea biológicamente activa. En este contexto, se estudió el efecto de glucosa 30 mM sobre ciertos parámetros de la FAL. Luego de una incubación de 5 semanas, se halló una inhibición de la actividad enzimática de la FAL, así como la aparición de fluorescencia específica de AGE-FAL. La modificación de estos parámetros fue un 69% y 67%, respectivamente, de aquellos encontrados luego de incubar la FAL durante 5 semanas con glucosa 100 mM. Así, resulta interesante hipotetizar que en pacientes diabéticos pobremente controlados, un incremento en la glicosilación no enzimática de la FAL ósea unida a membrana podría contribuir a un déficit en la formación y/o remodelado del hueso, debido a una menor capacidad de mineralización del osteoide secretado por los osteoblastos.

A continuación, se investigaron los posibles cambios en la proliferación y/o diferenciación de células osteoblásticas en cultivo, como consecuencia de su incubación con AGE-ASB. Los resultados obtenidos demostraron que los AGE solubles podían

ejercer un efecto directo sobre el desarrollo de las células osteoblásticas. Aunque la mayoría de estos efectos mediados por AGE-ASB fueron relativamente pequeños, se encontraban en el mismo orden de magnitud que los que se pueden observar luego de la incubación de UMR106, MC3T3E1 o cultivos de osteoblastos primarios, con factores de crecimiento o compuestos insulino-miméticos (Lau 1988, Davidai 1992, Cortizo & Etcheverry 1995).

Se encontró que el efecto de AGE-ASB sobre la proliferación osteoblástica dependía del tiempo de incubación. Así, no se observaron cambios en el crecimiento de ninguna de las dos líneas celulares luego de una incubación relativamente corta (24 horas). Sin embargo, después de periodos de cultivo intermedios (2 ó 3 días para las células UMR106 o MC3T3E1, respectivamente), se encontró un aumento transitorio en la proliferación celular. Finalmente, hubo un descenso significativo en la proliferación de ambas líneas osteoblásticas cuando se extendía la incubación con AGE a más de 3 ó 5 días para las células UMR106 o MC3T3E1, respectivamente. Estos resultados sugieren que los AGE solubles inicialmente podrían inducir un efecto mitogénico transitorio sobre los osteoblastos, seguido a más largo plazo por una disminución en la progresión osteoblástica. Los cambios observados en la proliferación celular también fueron dependientes de la concentración de AGE-ASB utilizada: se observó una respuesta bifásica (curva tipo campana) para las células UMR106, mientras que para las MC3T3E1 el efecto fue dosis-respuesta.

La diferenciación osteoblástica, evaluada a través de la actividad celular de FAL, también se vio afectada por la presencia, tiempo de incubación y dosis de AGE-ASB. Los osteoblastos expuestos a AGE-ASB inicialmente aumentaron su actividad específica de FAL (esto se observó con un tiempo de incubación de 24 ó 72 horas para las células UMR106 o MC3T3E1, respectivamente). Al prolongar el tiempo de cultivo, se observó una desaparición de este aumento inicial de la FAL, seguido finalmente por un descenso significativo en la actividad específica de la FAL para el caso de las células UMR106. Los cambios observados en la actividad enzimática de FAL también dependieron de la concentración de AGE-ASB utilizada. Así, se observó una respuesta bifásica (tipo campana) en el caso de las células MC3T3E1, mientras que para la línea UMR106 el efecto fue de tipo dosis-respuesta.

En las células de osteosarcoma UMR106, se midió además el grado de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en presencia o ausencia de AGE-ASB. Esto se llevó a cabo con el objeto de evaluar el posible rol del Ca^{2+} en la regulación AGE-dependiente de la proliferación y diferenciación osteoblástica. En este modelo, AGE-ASB indujo una disminución en la captación celular de calcio luego de 24 horas de cultivo. Dado que el ensayo de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ representa un balance entre los mecanismos de entrada de Ca^{2+} a la célula (por medio de canales de calcio) y las vías de extrusión de Ca^{2+} (principalmente Ca^{2+} -ATPasa y en menor medida el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$) (Exton 1988), cualquiera de estos mecanismos podría ser el blanco de regulación por AGE-ASB en las células UMR106.

Así, en nuestros estudios el efecto provocado por el agregado de AGE exógeno soluble (AGE-ASB) a un cultivo de osteoblastos, puede dividirse en dos etapas. A tiempos cortos de incubación, induce un aumento transitorio en la proliferación y diferenciación osteoblástica, y un descenso en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Sin embargo, al extender la incubación a tiempos más largos –situación que podría ocurrir en el hueso de pacientes diabéticos- la presencia de AGE-ASB se asocia con una disminución en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. *In vivo*, la inhibición crónica de estos dos parámetros de desarrollo osteoblástico, podría desembocar en una disminución de la formación y/o el remodelado óseo. Estos resultados son compatibles con los de otros investigadores ya mencionados (Fong 1993), quienes encontraron que la formación *in vitro* de AGE sobre una matriz ósea proteica, disminuía su capacidad para inducir la formación *in vivo* de hueso endocondral, en animales no diabéticos dos semanas post-implantación subcutánea. Los resultados de nuestro trabajo también están de acuerdo con estudios recientes de histomorfometría ósea dinámica, realizados en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 (Krakauer 1995). Estos autores mostraron una reducción del 75% en la velocidad de formación ósea, que se debía a una disminución del 70% en la velocidad de aposición de la matriz ósea proteica, y a un retraso temporal en la mineralización de dicha matriz, lo cual atribuyeron a un déficit en el reclutamiento y/o funcionalismo de los osteoblastos.

En forma simultánea con el desarrollo de nuestro proyecto, otros grupos de investigadores han profundizado el estudio del efecto de la acumulación de AGE-

proteínas sobre varios parámetros funcionales del tejido óseo (o de sus tipos celulares característicos). Aunque los modelos experimentales que utilizaron estos grupos fueron diferentes a los que empleamos nosotros, en líneas generales sus resultados no se contradicen con nuestros hallazgos.

Así por ejemplo, Katayama y col. investigaron la acumulación de AGE en el tejido óseo de ratas Sprague-Dawley normales o diabéticas, en función de su edad. En estos experimentos, encontraron un aumento dependiente del envejecimiento en el contenido de AGE del colágeno tipo I femoral de las ratas normales, que se incrementaba aún más en los animales diabéticos (Katayama 1996). Estos autores también estudiaron el comportamiento de diferentes tipos de células osteoblásticas, al ser crecidas sobre una matriz de colágeno tipo I (col-I) o de AGE-col-I. En su primera serie de experimentos, cultivaron células de calvaria fetal de rata (corresponde a un cultivo enriquecido en osteoblastos, pero no puro) durante diferentes períodos de tiempo sobre col-I nativo o glicado, induciendo su diferenciación con el agregado de β -glicerofosfato y ácido ascórbico (Katayama 1996). A tiempos cortos de cultivo (48 horas), AGE-col-I aumentó la proliferación celular, mientras que incubaciones más prolongadas con AGE-col-I indujeron un descenso tanto en la diferenciación osteoblástica (actividad de FAL y secreción de osteocalcina) como en su capacidad de formación de nódulos de mineralización. En otros experimentos, cultivaron la línea de células preosteoblásticas transformadas UMR201-10B durante 48 horas sobre un gel de col-I o de AGE-col-I (Katayama 1997). De acuerdo con los resultados obtenidos en estos ensayos, concluyeron que la glicación del colágeno tipo I disminuye la capacidad que posee esta proteína de matriz extracelular para promover la diferenciación de preosteoblastos hacia osteoblastos maduros. En una tercer serie de experimentos, cultivaron el sub-clon de células de osteosarcoma UMR106-06 durante 24 horas sobre una matriz de col-I o de AGE-col-I (Celic 1998). La incubación de esta línea sobre colágeno glicado, inhibió el contenido celular de los ARN mensajeros específicos para la osteopontina y para el receptor de PTH/PTHrP, respecto del colágeno no glicado. Dado que el proceso de maduración osteoblástica se asocia con un aumento en la expresión de osteopontina y del receptor de PTH/PTHrP, los resultados obtenidos se interpretaron como evidencia de que la acumulación de AGE sobre una matriz extracelular ósea podría interferir con la

diferenciación de los osteoblastos *in vivo*. Cabe destacar una diferencia fundamental entre este diseño experimental y el nuestro: esto es, la proteína seleccionada para modificar con AGE. El colágeno de tipo I, que es una proteína de gran importancia fisiológica por constituir más del 85% de la matriz extracelular ósea, tiene diversas acciones directas sobre los osteoblastos a través de varias clases de receptores celulares como los de integrinas (en especial $\alpha_2\beta_1$). Por ello, es muy difícil poder discriminar si las diferencias observadas entre col-I y AGE-col-I se deben a efectos directos de los AGE actuando a través de sus propios receptores, o a modificaciones estructurales del propio colágeno que alteren su interacción con los receptores de integrinas. Por el contrario, al ser la albúmina una proteína que en principio no posee un efecto directo sobre los osteoblastos ni receptores celulares específicos, toda diferencia observada entre ASB y AGE-ASB puede atribuirse a un efecto directo de los AGE, por ejemplo, vía RAGE u otro receptor específico.

Paul y Bailey también investigaron el efecto de una matriz de colágeno tipo I nativa (col-I) o modificada por metilglioxal (MG) -un precursor dicarbonílico de algunas estructuras AGE- sobre la adhesión y *spreading* de las células de osteosarcoma MG63, y encontraron que MG-col-I inducía una disminución en ambos parámetros (Paul & Bailey 1999). Debido a que el metilglioxal reacciona en gran medida con los residuos de arginina para formar compuestos de imidazolona, estos autores postularon que los efectos encontrados se debían a la modificación de los residuos de arginina presentes en la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que se encuentra incluida en la estructura primaria del colágeno tipo I. Sin embargo, otros autores han encontrado que el RGD no es una secuencia relevante para el reconocimiento celular del colágeno tipo I (Statz 1991, Takeuchi 1996). De todas formas, en teoría la modificación de este tripéptido podría interferir con la unión de dicha proteína a receptores de integrinas como $\alpha_5\beta_1$.

Takagi y col. estudiaron el efecto de ASB o AGE-ASB sobre el comportamiento en cultivo de dos tipos diferentes de osteoblastos (Takagi 1997). En el caso de cultivos primarios derivados de explantes de hueso humano incubados entre 2 y 8 días (enriquecidos en osteoblastos, pero no cultivo puro), la presencia de AGE-ASB se asoció con un aumento en la expresión de IL-6 (ARN mensajero y proteína), pero no se observaron cambios en la proliferación celular o en la actividad enzimática de FAL. En

este cultivo, demostraron además por RT-PCR la presencia de ARN mensajero específico para RAGE, pero no pudieron precisar si provenía de los osteoblastos o de otro tipo celular minoritario. También realizaron estudios similares con osteoblastos MC3T3E1 en su estadio de proliferación, en los cuales la presencia de AGE-ASB provocó simultáneamente un incremento en la secreción de IL-6 y en la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B. En este sentido, cabe destacar que la activación de NF- κ B también ocurre luego del reconocimiento de los AGE por su receptor RAGE.

Miyata y col. investigaron el comportamiento de dos tipos diferentes de células osteoblásticas en cultivo, al ser incubadas con β_2 -microglobulina nativa (β_2m) o modificada con AGE (AGE- β_2m) (Miyata 1996). La elección de la β_2m se debió a que es una proteína soluble que se acumula en depósitos amiloides en las articulaciones de la muñeca, en pacientes hemodializados que presentan síndrome de túnel carpiano (esta acumulación es particularmente rica en AGE- β_2m). En el caso de cultivos de calvaria de ratón neonato, la presencia de AGE- β_2m se asoció con un aumento en el eflujo de calcio celular, que provocaba una disminución en la captación celular neta de calcio. También realizaron estudios similares con osteoblastos MC3T3E1 en su estadio de proliferación, en los cuales una incubación con AGE- β_2m indujo un aumento en la secreción de IL-1 (el estimulador más potente de la resorción ósea que se conoce). En otra serie de experimentos, estos investigadores cultivaron células óseas de ratón sin fraccionar sobre cortes delgados de dentina, en presencia de β_2m o AGE- β_2m (Miyata 1997). Luego de 4 días de incubación, la presencia de AGE- β_2m se asoció con un incremento en la cantidad de osteoclastos activos y de lagunas de resorción. Este incremento en la actividad osteoclástica podría haberse debido tanto a la acción directa de los AGE sobre estas células multinucleadas o sobre sus precursores mononucleares, como a un efecto indirecto mediado por otros tipos celulares (por ejemplo, un aumento inducido por AGE en la secreción osteoblástica de citoquinas estimulantes de la resorción ósea como IL-1 e IL-6).

En conjunto, los resultados de todos estos investigadores así como los alcanzados en el presente trabajo de tesis, indican que las células osteoblásticas frente a una exposición crónica con AGE en exceso: (1) disminuyen su capacidad de proliferación; (2) disminuyen la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica

como fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina; (3) disminuyen su formación de nódulos de mineralización; y (4) aumentan la secreción de citoquinas estimulantes de la resorción ósea como IL-1 e IL-6. Las proteínas modificadas por AGE provocan además un incremento tanto en la cantidad de osteoclastos activos como en el número de placas de resorción ósea (lagunas de Howship). La sumatoria de estos efectos es compatible con las alteraciones óseas descritas en individuos diabéticos: un déficit en la incorporación de masa ósea en niños en edad de crecimiento con Diabetes tipo 1 descompensada; y un aumento en el riesgo de fracturas de estrés en el esqueleto apendicular o periférico de pacientes con Diabetes tipo 2 de edad avanzada.

Todos los resultados reseñados hasta este punto respecto de los efectos de los AGE sobre el desarrollo osteoblástico, concuerdan en líneas generales con las complicaciones óseas que pueden observarse en pacientes diabéticos, y señalan a este tipo celular como responsable principal de dichas alteraciones del hueso. Sin embargo, desde el punto de vista de la fisiología del osteoblasto, los trabajos realizados han sido mayormente descriptivos. Esto es, todos han encontrado una disminución del funcionalismo osteoblástico inducido por AGE, pero en ninguno de ellos se investigó el mecanismo molecular a través del cual podrían estar actuando estos productos de glicación avanzada de proteínas.

Se han descripto proteínas ligadoras específicas para las estructuras AGE, en varios tipos celulares (monocitos / macrófagos, células endoteliales, pericitos, células mesangiales, fibroblastos, células del músculo liso, linfocitos T y células neuronales). Estas proteínas ligadoras asociadas a membrana, que pueden o no presentar características de receptor, contribuyen a diversas funciones celulares, tales como el reconocimiento específico y la degradación intracelular de proteínas modificadas por AGE (es decir, el recambio de proteínas envejecidas). Se han aislado y caracterizado varias clases de receptores de AGE, entre los que se destacan RAGE (un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas de 35 kDa), oligosacaril-transferasa-48 (OST-48 o p60), 80K-H o p90 (un sustrato de la proteína-quinasa C), galectina-3 (una lectina de tipo S de 30-35 kDa, con afinidad por β -galactósidos) y los receptores *scavenger* (expresados principalmente por monocitos / macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas). En algunos tipos celulares, la ocupación de estos receptores por estructuras AGE

induce la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, lo cual a su vez puede provocar una alteración en el funcionalismo de la propia célula o de las células circundantes. Dependiendo del tipo celular involucrado, el reconocimiento celular de AGE mediado por su receptor específico puede asociarse con procesos muy variados (quimiotaxis, angiogénesis, estrés oxidativo, adhesión y activación celular, apoptosis, proliferación y diferenciación celular, regulación de la hemostasia y de la permeabilidad endotelial).

Al comparar los resultados obtenidos para nuestro sistema con lo observado en otros tipos celulares, llegamos a la conclusión de que era muy probable que los efectos AGE-dependientes detectados sobre el desarrollo osteoblástico pudieran deberse en gran parte a la existencia de un sistema de receptores específicos para AGE en estas células. Este razonamiento nos impulsó a desarrollar la siguiente etapa del presente trabajo de tesis, es decir: (a) investigar la posible existencia de receptores (o sitios de unión) específicos para las estructuras AGE, en las células osteoblásticas en cultivo UMR106 y MC3T3E1; (b) analizar las características funcionales (parámetros cinéticos y masas moleculares) de los sitios de unión específicos para AGE que pudieran encontrarse, así como su regulación en función del grado de diferenciación osteoblástico; (c) estudiar la posibilidad de que estos receptores osteoblásticos realicen funciones de captación y degradación de AGE-proteínas.

Los resultados obtenidos en estos experimentos, indicaron que las líneas celulares osteoblásticas UMR106 y MC3T3E1 expresan sitios de unión para AGE en sus membranas, y que estos sitios reconocen en forma específica a las proteínas glicadas. La evidencia que apoya estos hallazgos es variada. Ambas líneas celulares unen AGE-ASB de forma saturable, mostrando una unión semi-máxima entre 35-120 μg AGE-ASB / mL. Esta unión es específica para proteínas modificadas por AGE, ya que no se observó desplazamiento del radioligando (^{125}I -AGE-ASB) cuando se lo coincubó con un exceso de ASB control. Por otro lado, estas células muestran una afinidad por AGE-ASB que oscila entre $0,4\text{-}1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, es decir de una magnitud comparable a la que se ha descrito para las células mesangiales renales ($2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), pero un orden de magnitud menor que la correspondiente a otras células como monocitos / macrófagos, células endoteliales, linfocitos T y células musculares lisas ($1,0\text{-}7,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Finalmente, la

densidad de sitios de unión para AGE-proteínas encontrada en los osteoblastos MC3T3E1 y UMR106 oscila entre $1,5-2,0 \times 10^7$ sitios / célula, que es uno o dos órdenes de magnitud mayor que la que se ha descrito para otros sistemas celulares.

Los parámetros cinéticos que hallamos en nuestros estudios (es decir, la afinidad y densidad celular de los receptores) sugieren que los efectos AGE-dependientes encontrados en la proliferación y diferenciación osteoblástica, podrían haber sido inducidos a través de la ocupación de los sitios de unión para AGE. Así, AGE-ASB comenzó a provocar alteraciones en el desarrollo osteoblástico respecto de ASB control, a dosis de entre 50-200 μg proteína / mL. Sugestivamente, este rango de concentraciones es aproximadamente igual que los niveles de AGE-ASB necesarios para lograr una unión semi-máxima de los AGE a sus sitios de reconocimiento (receptores) osteoblásticos. Por lo tanto, en el rango de concentraciones en que AGE-ASB ejerce su bioactividad sobre los osteoblastos MC3T3E1 y UMR106, sus sitios de unión celular se encuentran significativamente ocupados, pudiendo mediar dicha bioactividad.

En otros experimentos, los receptores de AGE osteoblásticos se caracterizaron por análisis de *ligand blot*. Estos estudios confirmaron la presencia de varias proteínas con afinidad por AGE-ASB asociadas a membrana, con masas moleculares aparentes de 50, 45-40, 30, 25 y 18 kDa, siendo mayoritarias las de 30 y 25 kDa. Dichas proteínas fueron ratificadas como proteínas ligadoras específicas para AGE, ya que su unión a ^{125}I -AGE-ASB pudo desplazarse con un exceso de AGE-ASB no radioactivo, pero no con un exceso de ASB control (no glicado).

La proteína ligadora predominante en nuestros estudios (es decir, la de 30 kDa), podría ser estructuralmente similar tanto a galectina-3 (un receptor de AGE de 32 kDa) como a RAGE (una proteína ligadora de AGE de 35 kDa aislada de tejido pulmonar bovino). En tal sentido, es interesante notar que en cultivos primarios de hueso humano enriquecidos en osteoblastos, se evidenció por análisis de RT-PCR la presencia de ARN mensajero específico para RAGE, aunque no se pudo precisar en este estudio si provenía de los osteoblastos o de otro tipo celular minoritario (Takagi 1997). Estos mismos autores también encontraron que la incubación de osteoblastos MC3T3E1 con AGE-ASB inducía la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, es decir el mismo mecanismo de señalización observado luego del reconocimiento de los AGE por

su receptor RAGE en células endoteliales. Por otro lado, otros investigadores han analizado membranas celulares hepáticas por estudios de *ligand blot* con ^{125}I -AGE-ASB (Li 1996), encontrando un patrón de proteínas ligadoras muy similar al que nosotros hallamos para las células osteoblásticas. Sin embargo, estos autores pudieron identificar a los receptores mayoritarios de su sistema como OST-48 y 80K-H. Así, son diversas las proteínas ligadoras de AGE que podrían estar presentes en las membranas de los osteoblastos MC3T3E1 y UMR106. En este sentido, es de destacar que resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio usando anticuerpos específicos, sugieren que los receptores RAGE y galectina-3 se hallan presentes en ambas líneas celulares.

En otros ensayos, estudiamos la posibilidad de que estos receptores osteoblásticos específicos para AGE, llevaran a cabo funciones de captación y degradación de AGE-proteínas. Los resultados de nuestros experimentos indican que las células MC3T3E1 y UMR106 no sólo poseen la capacidad de unir AGE-ASB en su membrana plasmática, sino que a 37°C activamente internalizan y degradan estas proteínas modificadas. Ambas líneas osteoblásticas acumulan y lentamente degradan ^{125}I -AGE-ASB en forma específica, con una cinética que sigue de cerca en cada caso a la velocidad de captación de AGE-ASB. El hecho de que estos osteoblastos puedan unir, internalizar y degradar proteínas modificadas por AGE, sugiere un rol para los receptores osteoblásticos de AGE en el recambio de la matriz extracelular ósea sobre-modificada por productos de glicación. Otros investigadores llevaron a cabo ensayos en los que incubaron células óseas de ratón sin fraccionar sobre cortes delgados de dentina, en presencia de $\beta_2\text{m}$ o AGE- $\beta_2\text{m}$ (Miyata 1997). En estos experimentos, la presencia de AGE- $\beta_2\text{m}$ (1,0 μM) se asoció con un incremento en la cantidad de osteoclastos activos y de lagunas de resorción. El aumento en la actividad osteoclástica pudo haber sido tanto por acción directa de los AGE sobre estas células multinucleadas o sobre sus precursores mononucleares, como por un aumento inducido por AGE en la secreción osteoblástica de citoquinas estimulantes de la resorción ósea como IL-1 e IL-6. En base a sus resultados, dichos autores postularon la participación de las estructuras AGE en el remodelado de la matriz ósea proteica envejecida. En nuestros experimentos con osteoblastos MC3T3E1 y UMR106, los receptores para AGE hallados mostraron una unión semi-máxima de AGE-ASB a concentraciones de 0,6-2,0 μM . Así, los niveles de

AGE que estimulan la degradación de la matriz por osteoclastos ($1,0 \mu\text{M}$), también podrían ser suficientes para ocupar significativamente los receptores presentes en osteoblastos (y por ende activar las funciones de internalización y degradación). Por esta razón, es probable que los mecanismos mediados por ambos tipos celulares sean importantes para el recambio de proteínas de matriz extracelular ósea envejecidas, que se acumulan fisiológicamente en individuos de edad avanzada, y en forma acelerada en situaciones patológicas como Diabetes mellitus e insuficiencia renal.

En nuestros estudios de desplazamiento realizados con osteoblastos, encontramos por análisis de Scatchard que las células MC3T3E1 en su etapa de proliferación, mostraban una afinidad cuatro veces mayor por el radioligando (^{125}I -AGE-ASB) que las células de osteosarcoma UMR106 ($1,7$ versus $0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Sin embargo, no se hallaron diferencias entre ambas líneas en la densidad celular de sitios. Estos resultados sugieren la existencia de una dependencia entre el grado de diferenciación osteoblástico, y la capacidad de estas células para la unión específica de AGE. Con el objeto de investigar esta hipótesis, estudiamos la regulación de los sitios de unión para AGE presentes en las células MC3T3E1, luego de inducir su diferenciación con ácido ascórbico y β -glicerofosfato. Así, encontramos que a medida que aumentaba el grado de diferenciación de los osteoblastos, disminuía progresivamente la constante de afinidad de sus receptores para AGE.

Esta relación inversa de la afinidad con el desarrollo, podría deberse a que dichas proteínas asociadas a membrana cumplieran *per se* un papel fisiológico en el proceso de maduración osteoblástico (es decir, independiente de su unión a AGE). En este sentido, se ha encontrado que en otras células como las mesangiales y monocitos / macrófagos, un aumento en el nivel de expresión de galectina-3 se asocia con envejecimiento celular o con modificaciones en su fenotipo (Pugliese 2000, Liu 1995). En forma similar, se ha descubierto que el receptor RAGE tiene alta afinidad por una proteína llamada anfoterina (de expresión elevada en el sistema nervioso central), y que el reconocimiento RAGE-anfoterina induce la formación de neuritas en células neuronales en cultivo (Hori 1995). Otros autores han hallado también una relación entre el grado de diferenciación celular y la expresión de receptores para AGE. En un estudio con células derivadas de pulmón, se demostró que la presencia de ARN mensajero específico para RAGE correlaciona con la

existencia de un fenotipo alveolar maduro, sugiriendo que en el epitelio pulmonar la expresión de este receptor podría depender del grado de diferenciación celular (Katsuoka 1997). En otro trabajo, se encontró que la expresión de RAGE (ARN mensajero y proteína) se encontraba muy disminuida en células de carcinoma pulmonar, respecto del tejido pulmonar normal (Schraml 1997). Estos investigadores han sugerido que la inhibición de la expresión de RAGE podría estar involucrada en la formación de tumores pulmonares. En virtud de todas estas evidencias, es razonable suponer que proteínas como galectina-3 y/o RAGE podrían ser reguladores fisiológicos de la diferenciación de los osteoblastos (independientemente de su acción vía AGE). Si esto fuera así, una acumulación de AGE en la matriz extracelular ósea podría interferir con el proceso de desarrollo osteoblástico a través de dos mecanismos: indirectamente, por inhibición competitiva de la unión de estos receptores a sus ligandos fisiológicos; y directamente, a través del reconocimiento AGE-receptor.

En principio, aunque los mecanismos de señalización intracelulares post-receptor podrían ser los mismos para ambas situaciones (reconocimiento de AGE o de los ligandos fisiológicos del receptor), es importante señalar que probablemente no sea así. Por ejemplo, en el caso del receptor RAGE presente en la membrana plasmática celular, el reconocimiento de AGE-proteínas induce una perturbación redox en el microentorno del receptor, que culmina con un aumento en la expresión de grupos de proteínas específicos del tipo celular en cuestión. Esto se deduce de la observación de que las consecuencias de la unión AGE-RAGE (pero no las consecuencias del reconocimiento anfoterina-RAGE) pueden bloquearse en cultivo por medio del agregado de antioxidantes como el ácido lipoico, sugiriendo la existencia de un mecanismo de señalización celular mediado por la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Yan 1994b, Hori 1995). Persiguiendo esta hipótesis, Lander y col. recientemente descubrieron que los ROS generados en las cercanías de los AGE anclados a RAGE, pueden reaccionar con la proteína G p21^{ras} oxidando su residuo de cisteína en la posición 118. Esta oxidación provoca el reclutamiento de la fosfatidil-inositol-3'-quinasa (PI3K), y posterior activación tanto de la proteína-quinasa B (PKB) como de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), ERK1 y ERK2. Esta cascada de señales intracelulares provoca la activación del factor nuclear NF- κ B, que regula la transcripción de diversos genes

(Lander 1997, Deora 1998). Dichos autores proponen a esta cascada como un mecanismo de señalización intracelular general, que se activaría en cualquier situación que involucre un aumento de ROS en las cercanías de la membrana plasmática (por ejemplo, la acumulación extracelular de AGE).

En el caso de las células osteoblásticas, la unión AGE-receptor podría modificar la expresión de diversos genes, provocando entonces el descenso AGE-dependiente que hemos descrito en varias etapas de maduración de los osteoblastos. En este sentido, cabe destacar que los procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo óseo se encuentran fuertemente influidos, en una forma autocrina y paracrina, por los factores de crecimiento insulino-símiles (IGF-I e IGF-II) y sus proteínas ligadoras (IGFBP). Estos polipéptidos son sintetizados abundantemente por los osteoblastos (McCarthy 1989, Lakatos 1993), y se acumulan en la matriz ósea (Canalis 1988, Bautista 1991). *In vitro*, los IGF pueden modular la expresión del fenotipo osteoblástico (Pfeilschifter 1990, Thiebaud 1990), y estimular la proliferación de osteoblastos en cultivo (Hook 1988). *In vivo*, el agregado exógeno de IGF induce un aumento tanto en el proceso de formación ósea, como en la masa ósea trabecular (Baylink 1993). Adicionalmente, múltiples IGFBP pueden modular las acciones de los IGF sobre células osteoblásticas (Andress & Birnbaum 1992, Chen 1993). De hecho, tanto la abundancia relativa de las diferentes IGFBP como su afinidad por los IGF, muy probablemente sean determinantes importantes de la bioactividad de los IGF sobre el crecimiento y desarrollo óseo (Mohan 1995). Recientemente se ha encontrado una asociación entre la diferenciación osteoblástica progresiva de las células MC3T3E1, y cambios temporales en su expresión de IGF-I e IGFBP (Thraikill 1995b). Esta asociación parece implicar al sistema de los IGF en una regulación autocrina / paracrina del crecimiento y desarrollo osteoblástico.

Dada la importancia del sistema de los IGF en el desarrollo osteoblástico tanto *in vivo* como *in vitro*, nos propusimos desarrollar la fase final del presente trabajo de tesis: es decir, investigar el papel de este sistema (IGF-I e IGFBP) en los efectos inducidos por AGE-ASB sobre la proliferación y diferenciación de los osteoblastos MC3T3E1 y UMR106. En consecuencia, examinamos la influencia de AGE-ASB sobre la secreción de IGF-I e IGFBP por estas células en cultivo, a través de sus diferentes etapas de desarrollo osteoblástico. Cabe destacar que estudiamos la secreción de IGF-I porque es

el factor de crecimiento insulinosímil predominante en el tejido óseo de ratas y ratones, mientras que en el hueso humano predomina el IGF-II.

Varios investigadores han demostrado que los osteoblastos en cultivo secretan diferentes IGFBP. En particular, las células de osteosarcoma UMR106 sintetizan mayoritariamente IGFBP-4, una proteína de 24 kDa que inhibe la acción del IGF-I en la mayoría de los sistemas estudiados (Topping 1991, Mohan 1995). Estas células producen además menores cantidades de IGFBP-5, una proteína ligadora de 29 kDa. En nuestros experimentos con esta línea celular, bajas concentraciones de AGE-ASB (100 μ g / mL) inhibieron simultáneamente la secreción de IGF-I y una proteína ligadora de 24 kDa (IGFBP-4), pero no afectaron la secreción de la IGFBP de 29 kDa. Es difícil poder predecir en qué sentido estas alteraciones afectarían los niveles de IGF-I biodisponible (libre). Sin embargo, dado que la disminución relativa del IGF-I total (44 %) fue mayor que la de IGFBP-4 (20 %), es probable que existiera un descenso en la concentración de IGF-I libre disponible para interactuar con los receptores de IGF de tipo I. Por otro lado, ya habíamos visto que 100 μ g / mL de AGE-ASB eran suficientes tanto para ocupar una proporción significativa de los receptores celulares para AGE, como para provocar una disminución a largo plazo en la actividad enzimática de FAL y en la proliferación celular. Así, resulta interesante especular que en esta línea osteoblástica la ocupación de receptores celulares específicos para AGE pudiera provocar una disminución en la concentración de IGF-I libre, y que esta disminución fuera en último término responsable de los efectos biológicos observados.

La utilización de los osteoblastos MC3T3E1 nos permitió progresar en la comprobación de nuestra hipótesis. En este estudio, las células MC3T3E1 secretaron niveles basales de IGF-I, que fueron del mismo orden que la concentración del IGF-II producido por cultivos de células osteoblásticas derivadas de calvaria humana (Malpe 1997). Además, hallamos cambios temporales bifásicos en la secreción celular basal de IGF-I, de acuerdo con lo encontrado previamente tanto para osteoblastos MC3T3E1 (Thraillkill 1995b) como para cultivos primarios de osteoblastos (Bimbaum 1995). Así, observamos niveles mínimos de IGF-I en los cultivos de 15 días (células diferenciadas), intermedios a los 3 días de cultivo (células en proliferación activa), y máximos en cultivos mineralizados (25 días).

Los osteoblastos MC3T3E1 secretan varias IGFBP, de las cuales las mayoritarias son IGFBP-2 e IGFBP-5, y la minoritaria es de 24 kDa y corresponde a IGFBP-4. Las dos proteínas ligadoras mayoritarias son indistinguibles entre sí por análisis de *ligand blot*, dado que ambas migran como una sola banda con un peso molecular aparente de 29 kDa. Otros investigadores han encontrado que la secreción relativa de IGFBP-2 y -5 por esta línea celular, depende del estadio de diferenciación osteoblástico (Thraillkill 1995b). Por análisis de inmuno-*blot*, estos autores observaron un pico de secreción de IGFBP-5 entre los días 8-14 de cultivo (período en el cual esta proteína ligadora era la mayoritaria), luego de lo cual sus niveles disminuían progresivamente en función del tiempo de incubación. Por otro lado, la concentración de IGFBP-2 aumentaba constantemente hasta el día 25 de cultivo (células mineralizadas), siendo la proteína ligadora predominante en esta última etapa del desarrollo osteoblástico. En nuestros ensayos estas células secretaron proteínas ligadoras de 29 kDa, probablemente correspondientes a cantidades variables de IGFBP-2 y -5, aunque no pudimos comprobar por análisis de *ligand blot* la secreción de la proteína ligadora de 24 kDa.

En nuestra serie de experimentos con células MC3T3E1 en proliferación activa (3 días de cultivo), AGE-ASB indujo una disminución significativa en la secreción de IGF-I, y un aumento en los niveles de las IGFBP de 29 kDa. Se ha encontrado en varios sistemas celulares que IGFBP-2 inhibe los efectos mitogénicos del IGF-I. Además, estudios recientes han demostrado que IGFBP-5 secretada al medio condicionado (pero no unida a la matriz extracelular), también puede inhibir el efecto mitogénico del IGF-I en células de músculo liso (Parker 1998). En este sentido, es de destacar que los osteoblastos MC3T3E1 secretan muy bajas cantidades de proteínas de matriz extracelular durante su fase de proliferación activa (Quarles 1992). Así, en esta etapa del desarrollo osteoblástico ambas proteínas ligadoras de 29 kDa deberían ejercer efectos inhibitorios sobre la proliferación celular inducida por IGF-I. Teniendo en cuenta que AGE-ASB induce en estas células preosteoblásticas, por un lado una gran disminución en la secreción de IGF-I, y por otro lado un aumento en los niveles de IGFBP de 29 kDa, es razonable suponer que exista un descenso en la concentración de IGF-I libre disponible para interactuar con los receptores para IGF de tipo I. Esto provocaría una disminución en la replicación

osteoblástica, lo cual es compatible con el descenso que hemos encontrado en la proliferación de MC3T3E1 preosteoblásticas, inducido a largo plazo por AGE-ASB.

Cuando los osteoblastos MC3T3E1 alcanzaron su etapa de diferenciación (15 días de cultivo), no se observaron efectos significativos de AGE-ASB sobre la secreción de IGF-I o IGFBP. Adicionalmente en este estadio de desarrollo osteoblástico, no se detectaron efectos de AGE-ASB sobre la actividad enzimática de FAL asociada a la monocapa celular.

Finalmente, en cultivos de 25 días (células MC3T3E1 mineralizadas) AGE-ASB aumentó la secreción osteoblástica tanto de IGF-I como de las IGFBP de 29 kDa. El efecto sobre la secreción de IGFBP mostró una dependencia bifásica (tipo campana) respecto de la dosis de AGE-ASB utilizada. Este mismo tipo de curva se encontró para la modulación de la actividad de FAL hallada en osteoblastos mineralizados incubados con AGE-ASB, sugiriendo la posibilidad de una relación de causa / efecto entre ambos fenómenos. En este estadio de maduración osteoblástica terminal, la banda de 29 kDa que detectamos por análisis de *ligand blot* probablemente esté mayoritariamente integrada por la proteína inhibitoria IGFBP-2, de acuerdo con los resultados obtenidos por *inmuno-blot* por otros autores (Thraikill 1995b). En nuestros estudios con MC3T3E1 mineralizadas, AGE-ASB provocó un aumento en la secreción de IGF-I (19-23 % por encima del control) relativamente menor que el aumento en las IGFBP de 29 kDa (31-69 % por encima del control). Es difícil poder predecir el efecto global que pudieran provocar estas modificaciones aparentemente contrapuestas del sistema de los IGF. Si esta proteína ligadora fuera IGFBP-2, podría prevalecer un efecto inhibitorio sobre las acciones del IGF-I, disminuyendo entonces la concentración de IGF-I libre disponible para interactuar con los receptores de IGF de tipo I. Por otro lado, si los AGE estuvieran provocando un aumento en la secreción de IGFBP-5 (que ahora sí podría unirse a regiones aniónicas de la matriz extracelular, y potenciar entonces los efectos celulares del IGF-I), las consecuencias sobre los niveles de IGF-I libre podrían ser inversas. De todas formas, cualquiera sea el efecto final de los AGE sobre la concentración de IGF-I biodisponible en esta etapa de maduración osteoblástica terminal, podría atribuirse a dicho efecto la disminución AGE-dependiente en la expresión de varios parámetros del fenotipo osteoblástico maduro como FAL, osteocalcina, osteopontina y la formación de

nódulos de mineralización, que se desprenden de los resultados de nuestros estudios, y del trabajo de otros autores (Katayama 1996, Katayama 1997).

En resumen, hemos encontrado que la presencia de AGE-ASB *versus* ASB control sólo provoca una modulación del sistema de los IGF en las etapas del desarrollo osteoblástico en que se observan concomitantemente alteraciones del crecimiento celular. Así, puede observarse que las células MC3T3E1 en su etapa de diferenciación (15 días de cultivo) incubadas con AGE-ASB, no mostraron diferencias en su secreción de IGF-I e IGFBP respecto de ASB control. A su vez, en dicho estadio celular tampoco se pudieron observar alteraciones inducidas por AGE en el efecto biológico medido (actividad de FAL). Por el contrario, AGE-ASB indujo una alteración del sistema IGF / IGFBP tanto en la línea celular UMR106, como en las células MC3T3E1 en sus estadios de proliferación y mineralización. Esta modulación del sistema de los IGF podría ser un factor clave para la disminución AGE-dependiente de la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, que hemos observado al inicio y al final de su secuencia madurativa.

Nuestro modelo experimental parece confirmar la hipótesis de que los efectos biológicos de los AGE que hemos descrito en osteoblastos en cultivo, podrían iniciarse a través del reconocimiento de las estructuras AGE por sus receptores celulares específicos. La ocupación de estos receptores modularía al sistema de los IGF, y estos factores de crecimiento desregulados inducirían finalmente un retraso en la maduración osteoblástica en forma autocrina / paracrina. Dado que los efectos biológicos AGE-dependientes que encontramos en nuestro modelo de células en cultivo, son similares a los hallados por otros autores en hueso y/o células óseas tanto *in vitro* como *in vivo* (inclusive en estudios con pacientes diabéticos), parecería razonable extrapolar los resultados que hemos obtenido a estos otros sistemas. De esta manera, estamos proponiendo por primera vez un mecanismo que correlaciona la hiperglucemia crónica (acumulación de AGE) con las complicaciones óseas descritas en pacientes con Diabetes mellitus (disminución de la formación y/o remodelado del hueso), a través de alteraciones en la biología celular del osteoblasto.

CONCLUSIONES

- En nuestras condiciones de cultivo, las líneas celulares seleccionadas (UMR106 y MC3T3E1) demostraron ser un modelo adecuado para el estudio de los osteoblastos en sus etapas progresivas de desarrollo.
- Los protocolos que utilizamos para la obtención de proteínas solubles modificadas por AGE, así como los métodos usados para evaluar dicha glicación, fueron eficientes y reproducibles.
- La glicación *in vitro* de la fosfatasa alcalina (FAL) se asoció con alteraciones estructurales y con una disminución de su bioactividad. Debido a que la FAL es una proteína sintetizada por osteoblastos e involucrada en el proceso de mineralización del osteoide, su glicosilación no enzimática *in vivo* podría contribuir a un déficit en la formación y/o remodelado óseo.
- El agregado de AGE soluble (AGE-ASB) a osteoblastos UMR106 y MC3T3E1 en cultivo, provoca alteraciones en el crecimiento celular. A tiempos cortos de incubación, induce un aumento transitorio en la proliferación y diferenciación osteoblástica, y un descenso en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Al extender la incubación a tiempos más largos, la presencia de AGE-ASB se asocia con una disminución en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, situación análoga a la que se ha descrito *in vivo* para pacientes diabéticos, e *in vitro* para otros modelos de células óseas.
- Las líneas celulares osteoblásticas UMR106 y MC3T3E1 expresan receptores asociados a membrana, que participan específicamente en el reconocimiento y la degradación de proteínas modificadas por AGE como AGE-ASB. Estos receptores poseen pesos moleculares aparentes, constantes de afinidad y densidad celular, similares a los descritos en otros tipos celulares. La afinidad de los receptores por AGE se encuentra regulada diferencialmente en función del grado de desarrollo osteoblástico (a mayor diferenciación celular, menor afinidad de los receptores).

- La presencia de AGE-ASB *versus* ASB control, sólo provoca una modulación del sistema IGF / IGFBP en las etapas del desarrollo osteoblástico en que se observan concomitantemente alteraciones del crecimiento celular (es decir, en los estadios de proliferación y mineralización, pero no en el de diferenciación). Estos cambios inducidos por AGE en el sistema de los IGF, son compatibles con un descenso en los niveles de IGF-I biodisponible (libre), y podrían así contribuir a un mecanismo general que explique la disminución en el funcionalismo de los osteoblastos, como se ha descrito *in vivo* para pacientes diabéticos, e *in vitro* para células óseas cultivadas en presencia de proteínas modificadas por AGE.

BIBLIOGRAFÍA

- Andress DL & Birnbaum RS 1992 Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J Biol Chem* **267** 22467-22472.
- Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, Takahashi K, Shichiri M & Horiuchi S 1995 Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation endproducts of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* **230** 408-415.
- Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS & Lian JB 1990 Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* **143** 213-221.
- Atkinson MA & MacLaren NK 1994 The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* **331** 1428-1436.
- Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R, Geusens P & Nijs J 1988 Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in Diabetes mellitus. *Diabetes* **37** 8-12.
- Banerjee M & Lebovitz H 1989 Insulin sensitive and insulin resistant variants in IDDM. *Diabetes* **38** 784-792.
- Barsano CP & Baumann G 1989 Editorial: simple algebraic and graphic methods for the apportionment of hormone (and receptor) into bound and free fractions in binding equilibria; or how to calculate bound and free hormone? *Endocrinology* **124** 1101-1106.
- Bautista CM, Baylink DJ & Mohan S 1991 Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: a potential candidate for fixing IGF-II in human bone. *Biochem Biophys Res Commun* **176** 756-763.
- Baxter RC 1990 Gycosaminoglycans inhibit formation of the 140 kDa insulin-like growth factor-binding protein complex. *Biochem J* **271** 773-777.
- Baxter RC, Martin JL & Beniac VA 1989 High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. *J Biol Chem* **264** 11843-11848.

- Baylink DJ, Finkelman RD & Mohan S 1993 Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* **8** S565-S572.
- Baynes JW & Thorpe SR 1999 Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48** 1-9.
- Baynes JW 1991 Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40** 405-412.
- Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, Bucala R & Vlassara H 1995 Formation of immunochemical advanced glycation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* **44** 824-829.
- Beisswenger PJ, Moore LL, Brinck-Johnsen T & Curphey TJ 1993 Increased collagen-linked pentosidine levels and advanced glycosylation end products in early diabetic nephropathy. *J Clin Invest* **92** 2212-2217.
- Berelowitz M & Eugene HG 1996 Non-insulin-dependent diabetes mellitus secondary to other endocrine disorders. En *Diabetes mellitus*, pág. 496-502. Editores: D LeRoith, SI Taylor & JM Olefsky. New York, Lippincott-Raven.
- Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M & Nawroth PP 1997 Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* **96** 2262-2271.
- Birnbaum RS, Bowsher RR & Wiren KM 1995 Changes in IGF-I and -II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts. *J Endocrinol* **144** 251-259.
- Blakesley VA, Scrimgeour A, Esposito D & LeRoith D 1996 Signalling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signalling? *Cytokine & Growth Factor Rev* **7** 153-159.
- Borch-Johnsen K & Deckert T 1997 Complications of diabetes: the changing scene. En *International Textbook of Diabetes mellitus*, segunda edición, pág. 1283-1292. Editores: KGMM Alberti, P Zimmet, RA DeFronzo & H Keen (Honorary). Chichester, John Wiley & Sons Ltd.

- Bradford M 1976 Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-254.
- Brewer MT, Stetler GL, Squires CH, Thompson RC, Busby WH & Clemmons DR 1988 Cloning, characterization and expression of a human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **152** 1289-1297.
- Brown AL, Chiariotti L, Orlowski CC, Mehlman T, Burgess WH, Ackerman EJ, Bruni CB & Rechler MM 1989 Nucleotide sequence and expression of a cDNA clone encoding a fetal rat binding protein for insulin-like growth factors. *J Biol Chem* **264** 5148-5154.
- Brownlee M 1997 Glycation of macromolecules. En *International textbook of diabetes mellitus*, segunda edición, pág. 745-755. Editores: KGMM Alberti, P Zimmet, RA DeFronzo & H Keen (Honorary). Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Brownlee M, Vlassara H & Cerami A 1985 Non-enzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* **34** 938-941.
- Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A & Vlassara H 1994 Modification of low-density lipoprotein contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** 9441-9445.
- Bucala R, Tracey KJ & Cerami A 1991 Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* **87** 432-438.
- Bucala R, Vlassara H & Cerami A 1992 Advanced glycosylation endproducts. En *Post-translational modifications of proteins*, pag. 53-79. Editores: JJ Harding & MJC Crabbe. Boca Raton, CRC Press.
- Butkiewicz EK, Leibson C, O'Brien PC, Palumbo PJ & Rizza RA 1995 Insulin therapy for diabetic ketoacidosis. *Diabetes Care* **18** 1187-1190.
- Cameron NE & Cotter MA 1997 Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes* **46** (Suppl. 2) S31-S37.
- Canalis E, McCarthy TL & Centrella M 1988 Isolation of growth factors from adult bovine bone. *Calcif Tissue Int* **19** 346-351.
- Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, Schatz DA, Riley WJ, Malone J, Schwartz S, Quattrin T & MacLaren NK 1995 Age and family relationship accentuate the risk of

- IDDM in relatives of patients with insulin dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **80** 3739-3743.
- Celic S, Katayama Y, Chilco PJ, Martin TJ & Findlay DM 1998 Type I collagen influence on gene expression in UMR106-06 osteoblast-like cells is inhibited by genistein. *J Endocrinol* **158** 377-388.
- Chen TL, Chang LY, DiGregorio DA, Perlmen AJ & Huang YF 1993 Growth factor modulation in insulin-like growth factor binding proteins in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* **130** 1382-1389.
- Chen Y, Shu H, Ji C, Casinghino S, Kim K, Gundberg CM, Centrella M & McCarthy TL 1998 Insulin-like growth factor binding proteins localize to discrete cell culture compartments in periosteal and osteoblast cultures from fetal rat bone. *J Cell Biochem* **71** 351-362.
- Chibber R, Molinatti PA, Rosatto N, Lambourne B & Kohner EM 1997 Toxic action of advanced glycation end products on cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells: relevance to diabetic retinopathy. *Diabetologia* **40** 156-164.
- Clemmons DR 1997 Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine & Growth Factor Rev* **8** 45-62.
- Clemmons DR, Elgin RG, Han VK, Casella SJ, D'Ercole AJ & Van Wyk JJ 1986 Cultured fibroblast monolayers secrete a protein that alters the cellular binding of somatomedin-C / insulinlike growth factor I. *J Clin Invest* **77** 1548-1556.
- Cohen P, Graves HC, Peehl D, Kamasei M, Giudice LC & Rosenthal RG 1992 Prostate specific antigen PSA is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma 2. *Clin Endocr Metab* **75** 1046-1054.
- Cortizo AM & Etcheverry SB 1995 Vanadium derivatives act as growth factor-mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol Cell Biochem* **145** 97-102.
- Cortizo AM, Lee PDK, Cédola NV, Jasper H & Gagliardino JJ 1998 Relationship between non-enzymatic glycosylation and changes in serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* **35** 85-90.
- Czech MP 1989 Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* **59** 235-238.

- D'Ercole AJ, Underwood LE, Van Wyk JJ, Decedue CJ & Foushee DB 1976 Specificity, topography and ontogeny of the somatomedin C receptor in mammalian tissue. En *Growth hormone and related peptides*, pág. 190-205. Editores: A Pecile & R Muller. Amsterdam, Excerpta Medica.
- Davidai J, Lee A, Schuartz Y & Hazum E 1992 PDGF induces tyrosine phosphorylation in osteoblast-like cells: relevance to mitogenesis. *Am J Physiol* **263** E205-E209.
- DCCT (Diabetes Control and Complications Trial Research Group) 1993 The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **329** 977-986.
- De Leeuw I & Abs R 1977 Bone mass and bone density in maturity-type diabetes measured by the ¹²⁵I photon-absorption technique. *Diabetes* **26** 1130-1135.
- Deora AA, Win T, Vanhaesebroeck B & Lander HM 1998 A redox-triggered ras-effector interaction. *J Biol Chem* **273** 29923-29928.
- Drop SLS, Kortleve DJ & Guyda HJ 1984 Isolation of a somatomedin-binding protein from preterm amniotic fluid. Development of a radioimmunoassay. *J Clin Endocr Metab* **59** 899-907.
- Ducy P, Schinke T & Karsenty G 2000 The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289** 1501-1504.
- Durham SK, Kiefer MC, Riggs BL & Conover CL 1994 Regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 by a specific insulin-like growth factor binding protein-4 proteinase in normal human osteoblast-like cells: implications in bone cell physiology. *J Bone Miner Res* **9** 111-117.
- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Baillie KE, Lyons TJ, McCance DR & Baynes JW 1993 Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* **91** 2463-2469.
- Encyclopædia Britannica 1999, Multimedia Edition. Supportive and connective tissues: CONNECTIVE TISSUES: Bone.
- Engelgau MM, Thompson TJ, Herman WH, Boyle JP, Aubert RE, Kenny SJ, Badran A, Sous ES & Ali MA 1997 Comparison of fasting and 2-hour glucose and HbA_{1c} levels for diagnosing diabetes: diagnostic criteria and performance revisited. *Diabetes Care* **20** 785-791.

- Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D & Vlassara H 1989 Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* **170** 1387-1407.
- Expert Committee for the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus of the American Diabetes Association 1997 Report of the Expert Committee for the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* **20** 1-15.
- Exton JH 1988 Mechanisms of action of calcium-mobilizing agonists: some variations on a young theme. *FASEB J* **2** 2670-2676.
- Fong Y, Edelstein D, Wang EA & Brownlee M 1993 Inhibition of matrix-induced bone differentiation by advanced glycation end-products in rats. *Diabetologia* **36** 802-807.
- Fowlkes J, Enghild JJ, Suzuki N & Nagase H 1994 Matrix metalloproteases degrade insulin-like growth factor binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* **269** 25742-25746.
- Fraker PJ & Speck JC 1978 Protein and cell-membrane iodinations with a sparingly soluble chloramine, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* **80** 849-855.
- Freinkel N, Ogata E & Metzger BE 1990 The offspring of the mother with diabetes. En *Ellenberg and Rifkin's Diabetes mellitus: theory and practice*, cuarta edición, pág. 651-660. Editores: H Rifkin & D Porte, Jr. New York, Elsevier Science Publishing Co.
- Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K & Fougèrouse F 1992 Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **356** 162-164.
- Fu M-X, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW & Thorpe SR 1996 The advanced glycation end-product, N^ε-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* **271** 9982-9986.
- Fujimoto WY, Leonetti DL, Kinyoun JL, Shuman WP, Stolov WC & Wahl PW 1987 Prevalence of complications among second-generation Japanese-American men

- with diabetes, impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. *Diabetes* **36** 730-739.
- Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ & D'Ercole AJ 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normal individuals and patients with pituitary disease by immunoassay. *J Clin Invest* **60** 648-657.
- Gabbitas B & Canalis E 1998 Insulin-like growth factors sustain insulin-like growth factor-binding protein-5 expression in osteoblasts. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* **275(38)** E222-E228.
- Garg UC & Hassid A 1989 Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **83** 1774-1777.
- Giardino I, Edelstein D & Brownlee M 1994 Non-enzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: a model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* **94** 110-117.
- Gruppuso PA, Gorden P, Kahn CR, Comblath M, Zeller WP & Schwartz R 1984 Familial hyperproinsulinemia due to a proposed defect in conversion of proinsulin to insulin. *N Engl J Med* **311** 629-634.
- Hamman RF 1997 Epidemiology of microvascular complications. En *International textbook of diabetes mellitus*, segunda edición, pág. 1293-1319. Editores: KGMM Alberti, P Zimmet, RA DeFronzo & H Keen (Honorary). Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Higashi T, Sano H, Saishoji T, Ikeda K, Jinnouci Y, Kanzaki T, Morisaki N, Rauvala H, Shichiri M & Horiuchi S 1997 The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes* **46** 463-472.
- Hirai M & Shimizu N 1990 Purification of two distinct proteins of approximate Mr 80,000 from human epithelial cells and identification as proper substrates for protein kinase C. *Biochem J* **270** 583-589.
- Hogan M, Cerami A & Bucala R 1992 Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. *J Clin Invest* **90** 1110-1115.
- Hook JM, Centrella M & Canalis E 1988 Insulin-like growth factor-I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* **125** 254-259.

- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D, Schmidt AM 1995 The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* **270** 25752-25761.
- Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M & Binoux M 1990 Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150 kDa complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **71** 797-805.
- Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S & Binoux M 1986 Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Ann Biochem* **154** 138-143.
- Hotta N 1995 New approaches for treatment in diabetes: aldose reductase inhibitors. *Biomed Pharmacother* **49** 232-243.
- Iino K, Yoshinari M, Yamamoto M, Kaku K, Doi Y, Ichikawa K, Iwase M & Fujishima M 1996 Effect of glycated collagen on proliferation of human smooth muscle cells *in vitro*. *Diabetologia* **39** 800-806.
- Imani F, Horii Y, Suthanthiran M, Skolnik EY, Makita Z, Sharma V, Sehajpal P & Vlassara H 1993 Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon γ : role in tissue remodeling. *J Exp Med* **178** 2165-2172.
- Ishide H, Seino Y, Matsukura S, Ikeda M, Yawata M, Yamashita G, Ishizuka S & Imura H 1985 Diabetic osteopenia and circulating levels of vitamin D metabolites in type 2 (non-insulin-dependent) Diabetes. *Metabolism* **34** 797-801.
- Ishii H, Daisuke K & King JL 1998 Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* **76** 21-31.
- Johnson RN, Metcalf PA & Baker JR 1982 Fructosamine: a new approach to estimation of serum glycosyl protein. *Clinica Chimica Acta* **127** 87-95.
- Jones JI & Clemmons DR 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16** 3-34.

- Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Camacho-Hubner C & Clemmons DR 1993a Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J Cell Biol* **121** 679-687.
- Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Wright G & Clemmons DR 1993b Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the $\alpha_5\beta_1$ integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** 10553-10557.
- Kanai M, Goke M, Tsunekawa S & Podolsky DK 1997 Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem* **272** 6621-6628.
- Katayama Y, Akatsu T, Yamamoto M, Kugai N & Nagata N 1996 Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res* **11** 931-937.
- Katayama Y, Celic S, Nagata M, Martin TJ & Findlay DM 1997 Nonenzymatic glycation of type I collagen modifies interaction with UMR 201-10B preosteoblastic cells. *Bone* **21** 237-242.
- Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, Imuta H, Fujiwara M, Kanma H & Yamashita K 1997 Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun* **238** 512-516.
- Kelleher DJ & Gilmore R 1997 DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** 4994-4999.
- Khoury JE, Thomas CA, Loike JD, Hickman SE, Cao L & Silverstein SC 1994 Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scavenger receptors. *J Biol Chem* **269** 10197-10200.
- Kirstein M, Aston C, Hintz R & Vlassara H 1992 Receptor-specific induction of Insulin-like growth factor-I in human monocytes by advanced glycosylation endproduct-modified proteins. *J Clin Invest* **90** 439-446.
- Klahr S, Schreiner G & Ichikawa I 1988 The progression of renal disease. *New Engl J Med* **318** 1657-1666.
- Kodama H, Amagai Y, Sudo H, Kasai S & Yamamoto S 1981 Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn J Oral Biol* **23** 899-901.

- Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW & Parfitt AM 1995 Bone loss and bone turnover in diabetes mellitus. *Diabetes* **44** 775-782.
- Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M & Resnick D 1993 Molecular flypaper, host defense and atherosclerosis – structure, binding-properties and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* **268** 4569-4572.
- Laemmli UK 1970 Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
- Lakatos P, Caplice MD, Khanna V & Stern PH 1993 Thyroid hormones increase insulin-like growth factor-I content in the medium of rat bone tissue. *J Bone Miner Res* **8** 1475-1481.
- Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern DM & Schmidt AM 2000 Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* **105** 1117-1124.
- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA & Schmidt AM 1997 Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21^{ras}-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* **272** 17810-17814.
- Lau K-HW, Tanimoto H & Baylink DJ 1988 Vanadate stimulates bone cell proliferation and bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology* **123** 2858-2867.
- Levin ME, Boisseau BC & Avioli LV 1976 Effects of Diabetes mellitus on bone mass in juvenile and adult-onset Diabetes. *New Engl J Med* **294** 241-245.
- Li J & Schmidt AM 1997 Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* **272** 16498-16506.
- Li JJ, Dickson D, Hof PR & Vlassara H 1998 Receptors for advanced glycosylation endproducts in human brain: role in brain homeostasis. *Mol Med* **4** 46-60.
- Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Bannerjee D & Vlassara H 1996 Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** 11047-11052.

- Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY & Henderson Jr. WR 1995 Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* **147** 1016-1028.
- Locatto ME, Abrazon H, Caferra D, Fernández MC, Alloatti R & Puche RC 1993 Growth and development of bone mass in untreated alloxan diabetic rats. Effects of collagen glycosylation and parathyroid activity on bone turnover. *Bone Miner* **23** 129-144.
- Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R & Adamis AP 1998 Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* **101** 1219-1224.
- Lyons TJ & Jenkins AJ 1997 Glycation, oxidation and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev* **5** 365-391.
- Maillard LC 1912 Action des acides aminés sur les sucres: formation des melanoides par voie méthodique. *C R Acad Sci* **154** 66-68.
- Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Friedman EA, Cerami A & Vlassara H 1991 Advanced glycosylation endproducts in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* **325** 836-842.
- Malpe R, Baylink DJ, Linkhart TA, Wergedal JE & Mohan S 1997 Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, IGF binding proteins (IGFBP)-3, -4 and -5 levels in the conditioned media of normal human bone cells are skeletal site-dependent. *J Bone Miner Res* **12** 423-430.
- Manolagas SC 2000 Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Rev* **21** 115-137.
- Martin JL & Baxter RC 1986 Insulin like growth factor binding protein from human plasma, purification and characterization. *J Biol Chem* **261** 8754-8760.
- Martin JL & Baxter RC 1992 Insulin-like growth factor binding protein-3: biochemistry and physiology. *Growth Regulation* **2** 88-99.
- Martin TJ 1976 Parathyroid hormone responsive adenylate cyclase in induced osteogenic rat sarcoma. *Nature* **260** 436-438.

- Mathiassen B, Nielsen S, Ditzel J & Rodbro P 1990 Long-term bone loss in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med* **227** 325-327.
- McCance DR, Hanson RL, Charles MA, Jacobsson LTH, Pettitt DJ, Bennett PH & Knowler WC 1994 Comparison of tests for glycated haemoglobin and fasting and two-hour plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes. *BMJ* **308** 1323-1328.
- McCarthy TL, Centrella M & Canalis E 1989 Insulin-like growth factor (IGF) and bone. *Connect Tissue Res* **20** 277-282.
- McNair P, Madsbad S, Christiansen C, Faber OK, Transbol I & Binder C 1978 Osteopenia in insulin-treated Diabetes mellitus. Its relation to age at onset, sex and duration of disease. *Diabetologia* **15** 87-90.
- McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW & Hayes JR 1992 Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **35** 771-776.
- Miyata T, Kawai R, Taketomi S & Sprague SM 1996 Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption.. *Nephrol Dial Transplant* **11**[5] 54-57.
- Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K & Taketomi S 1997 Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* **8** 260-270.
- Miyata T, Oda O, Inagi R, Iida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K & Kinoshita T 1993 β_2 -microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest* **92** 1243-1253.
- Mohan S & Baylink DJ 1995 Development of a simple valid method for the complete removal of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins from IGFs in human serum and other biological fluids: comparison with acid-ethanol treatment and C₁₈ - Sep-Pak separation. *J Clin Endocrinol Metab* **80** 637-647.

- Mohan S, Bautista CM, Wergedal J & Baylink DJ 1989 Isolation of inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell conditioned medium: a potential local regulator of IGF function. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** 8338-8342.
- Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser U, Dony C, Lang K & Baylink DJ 1995 Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* **270** 20424-20431.
- Monnier VM & Cerami A 1981 Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* **211** 491-493.
- Monnier VM, Kohn RR & Cerami A 1984 Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* **81** 583-587.
- Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P & Kohn RR 1986 Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med* **314** 403-408.
- Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I & Numano F 1995 The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann NY Acad Sci* **748** 562-570.
- Murphy LJ 1998 Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocr* **21** 97-107.
- Nachtigal M, Al-Assaad Z, Mayer EP, Kim K & Monsigny M 1998 Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **152** 1199-1208.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YCE, Elliston K, Stern D & Shaw A 1992 Cloning and expression of a cell-surface receptor for advanced glycosylation endproducts of proteins. *J Biol Chem* **267** 14998-15004.
- Newman B, Selby JV, Slemenda C, Fabsitz R & Friedman JD 1987 Concordance for type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* **30** 733-738.
- Ng KW, Romas E, Donnan L & Findlay DM 1997 Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **11** 1-22.
- Nilsen FC 1992 The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor-II. *Prog Growth Factor Res* **4** 257-290.

- Okajima T, Nakamura K, Zhang H, Ling N, Tanabe T, Yasuda T & Rosenfeld RR 1992 Sensitive colorimetric bioassay for insulin-like growth factor (IGF) stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. *Endocrinology* **130** 2201-2212.
- Owen Jr. WF, Hou FF, Stuart RO, Kay J, Boyce J, Chertow GM & Schmidt AM 1998 β_2 -microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney Int* **53** 1365-1373.
- Pandit MK, Burke J, Gustafson AB, Minocha A & Peiris AM 1993 Drug-induced disorders of glucose tolerance. *Ann Int Med* **118** 529-540.
- Paresce DM, Ghosh RN & Maxfield FR 1996 Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* **17** 553-565.
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr., Chow WS, Stern D & Schmidt AM 1998 Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for AGE (sRAGE). *Nat Med* **4** 1025-1031.
- Parker A, Rees C, Clarke J, Busby Jr. WS & Clemmons DR 1998 Binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5 to smooth muscle cell extracellular matrix is a major determinant of the cellular response to IGF-I. *Mol Biol Cell* **9** 2383-2392.
- Partridge NC, Alcorn D, Michelangeli VP, Ryan G & Martin TJ 1983 Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Res* **43** 4308-4312.
- Paul RG & Bailey AJ 1999 The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions. *Int J Biochem Cell Biol* **31** 653-660.
- Pfeiffer A & Schatz H 1995 Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **103** 7-14.
- Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RG, Minne HW & Ziegler R 1990 Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor-I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor. *Endocrinology* **127** 69-75.
- Pugliese G, Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Lenti L, Sale P, Gradini R, Liu F-T & Di Mario U 2000 The diabetic milieu modulates the advanced glycation

- end product-receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin-3 expression. *Diabetes* **49** 1249-1257.
- Pugliese G, Pricci F, Romeo G, Pugliese F, Mene P, Giannini S, Cresci B, Galli G, Rotella CM, Vlassara H & Di Mario U 1997 Upregulation of mesangial growth factor and extracellular matrix synthesis by advanced glycation end products via a receptor-mediated mechanism. *Diabetes* **46** 1881-1887.
- Quarles LD, Yahay DA, Lever LW, Caton R & Wenstrup RJ 1992 Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Min Res* **7** 683-692.
- Radoff S, Makita Z & Vlassara H 1991 Radioreceptor assay for advanced glycosylation end products. *Diabetes* **40** 1731-1738.
- Raisz LG, Kream BE & Lorenzo JA 1998 Metabolic bone disease. En *Williams Textbook of Endocrinology*, novena edición, pág. 1211-1239. Editores: JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg & P Reed Larsen. Philadelphia, WB Saunders Co.
- Reardon W, Ross RJM, Sweeney MG, Luxon LM, Pembrey ME, Harding AE & Trembath RC 1992 Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* **340** 1376-1379.
- Reaven GM, Bernstein R, Davis B & Olefsky JM 1976 Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *Am J Med* **60** 80-88.
- Rechler MM & Nissley SP 1990 Insulin-like growth factors. En *Peptide growth factors and their receptors*, pág. 263-282. Editores: MH Sporn & AB Roberts. Berlin, Springer-Verlag.
- Rechler MM 1993 Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm* **47** 1-114.
- Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR & Baynes JW 1995 N^ε-(carboxymethyl) lysine is a dominant advanced glycation end-product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* **34** 10872-10878.
- Reiter EO & Rosenfeld RG 1998 Normal and aberrant growth. En *Williams Textbook of Endocrinology*, novena edición, pág. 1427-1507. Editores: JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg & P Reed Larsen. Philadelphia, WB Saunders Co.
- Requena JR, Ahmed MU, Fountain CW, Degenhardt TP, Reddy SR, Perez C, Lyons TJ, Jenkins AJ, Baynes JW & Thorpe SR 1997 Carboxymethylethanolamine: a

- biomarker of phospholipid modification during the Maillard reaction *in vivo*. *J Biol Chem* **272** 17473-17479.
- Rhone DP & Mizuno F 1972 Separation of isoenzymes of alkaline phosphatase by substrate-gel imprint after electrophoresis on cellulose acetate. *Clin Chem* **18** 662-665.
- Rohrbach DH, Hassel JR, Kleinman HK & Martin GR 1982 Alterations in basement membrane (heparan sulphate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* **31** 185-188.
- Rosenbloom AL 1997 Connective tissue disorders in Diabetes. En *International textbook of diabetes mellitus*, segunda edición, pág. 1517-1531. Editores: KGMM Alberti, P Zimmet, RA DeFronzo & H Keen (Honorary). Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Rosenbloom AL, Lezotte DC, Weber FT, Gudat J, Heller DR, Weber ML, Klein S & Kennedy BB 1977 Diminution of bone mass in childhood Diabetes. *Diabetes* **26** 1052-1055.
- Ryle C, Leow CK & Donaghy M 1997 Nonenzymatic glycation of peripheral and central nervous system proteins in experimental diabetes mellitus. *Muscle & Nerve* **20** 577-584.
- Santiago JV, McAlister WH, Ratzan SK, Bussman Y, Haymond MW, Shackelford G & Weldon VY 1977 Decreased cortical thickness and osteopenia in children with Diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **45** 845-848.
- Schenk RK, Felix R & Hofstetter W 1993 Morphology of connective tissue: bone. En *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects*, primera edición, pág. 85-101. Editores: PM Royce & B Steinmann. New York, Wiley-Liss Inc.
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Carndall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J & Stern D 1995 Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **96** 1395-1403.
- Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TE, Simionescu M & Stern D 1994 The endothelial cell binding site for advanced glycation endproducts consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* **269** 9882-9888.

- Schnider SL & Kohn RR 1981 Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and non-enzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Invest* **67** 1630-1635.
- Schraml P, Bendik Y & Ludwig CU 1997 Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* **57** 3669-3671.
- Schuyler MR, Niewoehner DE, Inkley SR & Kohn RR 1976 Abnormal lung elasticity in juvenile diabetes mellitus. *Am Rev Resp Dis* **113** 37-41.
- Sell DR, Lapolla A, Odetti P, Fogarty J & Monnier VM 1992 Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* **41** 1286-1292.
- Sereday M, Olivera EM & Gagliardino JJ 1998 Criterios de diagnóstico y clasificación de la diabetes: su impacto socioeconómico. En *Diabetes tipo 2 no insulino dependiente: su diagnóstico, control y tratamiento*, pág. 13-24. Coordinadores: JJ Gagliardino & A Fabiano. Buenos Aires, editado por la Sociedad Argentina de Diabetes A.C.
- Sharma K & Ziyadeh FN 1997 Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Sem Nephrol* **17** 80-92.
- Shimasaki S, Shimonaka M, Zhang HP & Ling N 1991 Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP in rat and human. *J Biol Chem* **266** 10646-10653.
- Shimomura H & Spiro RG 1987 Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes: decreased levels of heparan sulphate proteoglycan and laminin. *Diabetes* **36** 374-381.
- Shinoda T, Hayase F, Van Chuyen N & Kato H 1993 Uptake of proteins modified with 3-deoxyglucosone, a Maillard reaction intermediate, by the type I macrophage scavenger receptor. *Biosci Biotechnol Biochem* **57** 1826-1831.
- Skolnik EY, Yang Z, Makita Z, Radoff S, Kirstein M & Vlassara H 1991 Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodelling and diabetic nephropathy. *J Exp Med* **174** 931-939.

- Smedsrod B, Melkko J, Araki N, Sano H & Horiuchi S 1997 Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J* **322** 567-573.
- Statz ND, Fok KF, Zutter MM, Adams SF, Rodriguez BA & Santoro SA 1991 Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha-2 beta-1 integrin in collagen. *J Biol Chem* **266** 7363-7367.
- Stein GS & Lian JB 1993 Molecular mechanism mediating proliferation / differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Rev* **14** 424-442.
- Tager H, Given B, Baldwin D, Mako M, Markese J, Rubinstein A, Olefsky J, Kobayashi M, Kolterman O & Poucher R 1979 A structurally abnormal insulin causing human diabetes. *Nature* **281** 122-125.
- Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, Motomura T, Hashimoto K, Yamamoto H, Sato B, Okada S & Kishimoto T 1997 Advanced glycation endproducts stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells. *J Bone Miner Res* **12** 439-446.
- Takeuchi Y, Nakayama K & Matsumoto T 1996 Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* **271** 3938-3944.
- Tarsio JF, Reger LA & Furcht LT 1988 Molecular mechanisms in basement membrane complications of diabetes: alterations in heparin, laminin and type IV collagen association. *Diabetes* **37** 532-540.
- Taylor SI 1992 Lilly lecture: molecular mechanisms of insulin resistance: lessons from patients with mutations in the insulin receptor gene. *Diabetes* **41** 1473-1490.
- Teitelbaum SL 2000 Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289** 1504-1508.
- Thiebaud D, Ng KW, Findlay DM, Harker M & Martin TJ 1990 Insulin-like growth factor-I regulates mRNA levels of osteonectin and pro-alpha 1(I)-collagen in clonal preosteoblastic calvarial cells. *J Bone Miner Res* **5** 761-767.
- Thornalley PJ 1998 Cell activation by glycated proteins: AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* **44** 1013-1023.

- Thraill KM, Quarles ID, Nagase H, Suzuki K, Serra DM & Fowlkes JL 1995a Characterization of insulin-like growth factor binding protein-5 degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology* **136** 3527-3534.
- Thraill KM, Siddhanti SR, Fowlkes JL & Quarles LD 1995b Differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts is associated with temporal changes in the expression of IGF-I and IGFBPs. *Bone* **17** 307-313.
- Tomasek JJ, Meyers SW, Basinger JB, Green DJ & Shew RL 1994 Diabetic and age-related enhancement of collagen-linked fluorescence in cortical bones of rats. *Life Sci* **55** 855-861.
- Torring O, Firek AF, Heath H 3rd & Conover CA 1991 Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide stimulate insulin-like growth factor-binding protein secretion by rat osteoblast-like cells through an adenosine 3',5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology* **128** 1006-1014.
- Tsuji H, Iehara N, Masegi T, Imura M, Ohkawa J, Arai H, Ishii K, Kita T & Doi T 1998 Ribozyme targeting of receptor for advanced glycation end products in mouse mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **245** 583-588.
- Tuomilehto J & Rastenyte D 1997 Epidemiology of macrovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. En *International textbook of diabetes mellitus*, segunda edición, pág. 1559-1583. Editores: KGMM Alberti, P Zimmet, RA DeFronzo & H Keen (Honorary). Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) 33 1998 Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* **352** 837-853.
- UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) 34 1998 Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *Lancet* **352** 854-865.
- UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) 38 1998 Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ* **317** 703-713.

- UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) 39 1998 Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ* **317** 713-720.
- Unger RH & Foster DW 1998 Diabetes mellitus. En *Williams Textbook of Endocrinology*, novena edición, pág. 973-1060. Editores: JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg & P Reed Larsen. Philadelphia, WB Saunders Co.
- Vallance P, Collier J & Moncada S 1989 Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* **338** 997-1000.
- Van Daele PLA, Stolk RP, Burger H, Algra D, Grobbee DE, Hofman A, Birkenhager JC & Pols HAP 1995 Bone density in non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Rotterdam study. *Ann Intern Med* **122** 409-414.
- Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckman JS, Velho G, Lathrop GM & Froguel P 1995 A gene for maturity-onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nature Genet* **9** 418-423.
- Vissing H, Aagaard L, Tommerup N & Boel E 1994 Localization of the human gene for advanced glycosylation-specific receptor (AGER) to chromosome 6p 21.3. *Genomics* **24** 606-608.
- Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K & Cerami A 1994 Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** 4766-4770.
- Vlassara H 1997 Recent progress in advanced glycation endproducts and diabetic complications. *Diabetes* **46** (Suppl. 2) S19-S25.
- Vlassara H, Brownlee M & Cerami A 1981 Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** 5190-5192.
- Vlassara H, Brownlee M & Cerami A 1985a Recognition and uptake of human diabetic peripheral nerve myelin by macrophages. *Diabetes* **34** 553-557.
- Vlassara H, Brownlee M & Cerami A 1985b High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **82** 5588-5592.

- Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA & Pasagian A 1988 Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* **240** 1546-1548.
- Vlassara H, Bucala R & Striker L 1994 Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* **70** 138-151.
- Vlassara H, Fuh H, Donnelly T & Cybulsky M 1995a Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* **1** 447-456.
- Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A & Bucala R 1992 Exogenous advanced glycosylation endproducts induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** 12043-12047.
- Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT & Cerami A 1995b Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* **1** 634-646.
- Wautier J-L, Wautier M-P, Schmidt A-M, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan S-D, Brett J, Guillausseau P-J & Stern D 1994 Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** 7742-7746.
- Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D & Schmidt AM 1996 Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* **97** 238-243.
- Werner H, Adamo M, Roberts CT & LeRoith D 1994 Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action. *Vitam Horm* **48** 1-58.

- Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C & Tilton RG 1993 Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* **42** 801-813.
- Wiske PS, Wentworth SM, Norton JA, Epstein S & Johnston C 1982 Evaluation of bone mass and growth in young diabetics. *Metabolism* **31** 848-854.
- Witztum JL 1997 Role of modified lipoproteins in diabetic macroangiopathy. *Diabetes* **46** (Suppl. 2) S112-S114.
- Wolff SP & Dean RT 1987 Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* **245** 243-250.
- Woo HJ, Shaw LM, Messier JM & Mercurio AM 1990 The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem* **265** 7097-7099.
- Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M & Bell GI 1996 Mutations in the hepatocyte factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY 1). *Nature* **384** 458-460.
- Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y & Yamamoto H 1998 Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* **41** 1435-1441.
- Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M & Yamamoto H 1997 Advanced glycation endproducts-driven angiogenesis *in vitro*: induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **272** 8723-8730.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Mighelli A, Nawroth P, Stern D & Schmidt AM 1996 RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382** 685-691.
- Yan SD, Chen X, Schmidt A-M, Brett J, Godman G, Zou Y-S, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, Perry G, Yen S-H & Stern D 1994a Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Acad Sci USA* **91** 7787-7791.

- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D & Stern D 1994b Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* **269** 9889-9897.
- Yan SD, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T, Chen X, Godman GC, Stern D & Schmidt AM 1997 Amyloid- β peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** 5296-5301.
- Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M & Vlassara H 1991 Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* **174** 515-524.
- Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS & Furthmayr H 1986 Models of the self-assembly of basement membrane. *J Histochem Cytochem* **34** 93-102.
- Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay R, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M & Lang DA 1994 Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and detection of insulin dependency. *Diabet Med* **11** 299-303.
- Zoukourian C, Wautier MP, Chappey O, Dosquet C, Rohban T, Schmidt AM, Stern D & Wautier JL 1996 Endothelial cell dysfunction secondary to the adhesion of diabetic erythrocytes: modulation by iloprost. *Int Angiol* **15** 195-200.

PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO ORIGEN EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

McCarthy AD 1995 Glicosilación no enzimática de proteínas: su rol en las complicaciones crónicas de la Diabetes y el envejecimiento. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **29** 173-190.

McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L & Cortizo AM 1997 Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **170** 43-51.

McCarthy AD, Cortizo AM, Giménez Segura G, Bruzzone L & Etcheverry SB 1998 Non-enzymatic glycosylation of alkaline phosphatase alters its biological properties. *Molecular and Cellular Biochemistry* **181** 63-69.

Cortizo AM & McCarthy AD 1998 Factores de crecimiento insulino similares: estructura, bioactividad y métodos de ensayo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **32** 471-516.

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

McCarthy AD 2000 Glicación, glicoxidación y estrés carbonílico: relevancia en las complicaciones vasculares de la Diabetes mellitus. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* **37** 141-163.

McCarthy AD, Etcheverry SB & Cortizo AM 2001 Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetologica* (en prensa).



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas