



Determinar la presencia de catepsina K y osteocalcina en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas diabetizadas con estreptozotocina sometidas a estrés mecánico.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

Erika Negrete Barajas

Director Dr. José Francisco Gómez Clavel

Dictaminadores Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte
Esp. Pabel Antonio Gómez Hernández
Mtra. Carmen Guadalupe Mondragón Huerta
Dr. Maximiliano Ibarra Barajas

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, Octubre 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la ser mi casa de estudios durante estos años.

Agradezco a mis padres y hermanas por su amor, confianza, apoyo y por ser el cimiento de mi vida personal y profesional.

A Marco por su apoyo incondicional, amor, por estar en cada momento a mi lado.

Al doctor Gómez Clavel por la paciencia enorme que me ha tenido, por la confianza y la oportunidad de realizar este proyecto a su lado.

A mis sinodales de tesis Dra. Cynthia Trejo, Dr. Pabel Gómez, Mtra. Carmen Mondragón y Dr. Maximiliano Ibarra por sus aportaciones a mi trabajo, por su confianza y su apoyo.

A las técnicas Anita y Miriam por su apoyo en la parte histológica de mi investigación y por estar siempre dispuestas a ayudarme en mis dudas.

A mis amigas Diana, Aly y Karen por su apoyo, por ser mis compañeras de aprendizaje y de estrés, por acompañarme en mis logros y fracasos. A Victor por su apoyo, por estar siempre a mi lado, por siempre alentarme a seguir y no rendirme, por ser mi compañero, asistente y mi mejor amigo.

A mis compañeros y nuevos amigos de servicio social por sus porras y apoyo.

A la Clínica Odontológica Aragón y a mis profesores por compartir sus conocimientos y experiencias.

1 Tabla de contenido

2	RESUMEN.....	6
3	ABSTRACT.....	8
4	CAPITULO I	
1	Introducción.....	9
1.1	Justificación.....	11
	CAPITULO II	
2.	Marco teorico	
2.1.	Diabetes y pérdida ósea.....	12
2.2.	Remodelado óseo.....	13
2.3.	Células del hueso.....	13
a)	Osteoblastos.....	13
b)	Osteocitos.....	14
c)	Osteoclastos.....	15
2.4.	Osteólisis osteocitaria.....	16
2.5.	Alteraciones de los osteocitos en presencia de estrés mecánico.....	17
2.6.	Mecanismos de remodelado óseo.....	17
2.7.	Factores reguladores del metabolismo óseo.....	18
2.7.1.	Mediadores químicos.....	18
2.7.1.1.	Parathormona.....	18
2.7.1.2.	Calcitonina.....	18
2.7.1.3.	Vitamina D.....	18
2.7.1.4.	Citocinas.....	18
2.8.	Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo.....	19
2.8.1.	Catepsina K.....	19
2.8.2.	Osteocalcina.....	20
2.9.	Diabetes experimental (Estreptozotocina STZ)	21
2.10.	Características periodontales de la rata	21
	CAPITULO III	
3.1	Objetivo general	21
3.2	Objetivos específicos.....	21

CAPITULO IV

4. Materiales y Métodos.....	23
4.1 Aparatología ortodóncica.....	25

CAPITULO V

5. Resultados.....	29
5.1 Análisis estadísticos H y E.....	29
5.2 Resultados inmunofluorescencia.....	37

CAPITULO VI

6. Discusión.....	47
-------------------	----

CAPITULO VII

7. Conclusiones.....	50
----------------------	----

CAPITULO VIII

8. Referencias bibliográficas.....	51
9. Anexo.....	59

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ALP	fosfatasa alcalina total
ANOVA	análisis de varianza
ARN	ácido ribonucleico
BSAP	fosfatasa alcalina específica del hueso
BGP	proteína de hueso gla
Ca	calcio
CACL2	cloruro de calcio
CaPo4	fosfato de calcio
Cfos	proteína codificada en humanos por el gen <i>fos</i>
CTGF	factor de crecimiento de tejido conectivo
CTX	telopéptido c-terminal del colágeno tipo I
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DM	diabetes mellitus
DMP1	expression of dentin matrix protein 1
DPD	piridinolina (pyd) y deoxipiridinolina
EDTA	ácido etilendiaminetetracético
ENSANUT	encuesta nacional de salud y nutrición
E11/gp38	glicoproteína expresada en los osteocitos
FID	federación internacional de diabetes
FITC	isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5- isotiocianato
GLU	ácido glutámico
GLUT2	transportadora de glucosa
HCL	Hematoxilina y Eosina
H y E	ácido clorhídrico
ICP	telopéptido c-terminal de colágeno tipo I
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IGF I	factor de crecimiento insulínico tipo I
KCL	Cloruro de potasio
MEPE	matrix extracellular phosphoglycoprotein
MIP-1	proteína inflamatoria de macrófagos
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NI-TI	níquel titanio
nm	nanómetros
NTX	telopéptido n-terminal del colágeno tipo I
OB	osteoblastos
OC	osteoclastos
OPG	osteoprogesterina
PBS	buffer fosfato salino
PHEX	Fosfato de regulación de la endopeptidasa neutra
PICP	péptido c-terminal del procolágeno tipo I
PINP	péptido n-terminal del procolágeno tipo I
PTH	paratohormona
RANK	receptor activador del factor nuclear κ b
RANKL	receptor activador for nuclear factor κ b ligado
STZ	estreptozotocina
TGF B	factor de crecimiento transformante beta 1
TNF	factor de necrosis tumoral
TRAP	fosfatasa ácida tartrato resistente

Resumen

Debido a la alta prevalencia de personas que padecen diabetes mellitus y que tienen una predisposición a la pérdida ósea es importante estudiar el tejido óseo el cual es metabólicamente muy activo, el resultado de esta actividad se refleja tanto en el recambio de sus componentes inorgánicos y orgánicos, así como su interacción, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar las características histomorfométricas y la expresión de catepsina K y osteocalcina en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar así como, de los núcleos osteocitarios en ratas con diabetes experimental las cuales se sometieron a estrés mecánico en el área del 1 y 2 molar superiores. Se utilizaron 48 ratas Wistar macho con pesos entre 200 a 250 gr que fueron asignadas en los siguientes 8 grupos: I) Normoglicémico sin estrés mecánico, II) Hiperglicémico sin estrés mecánico, III) Normoglicémico con estrés mecánico de 2 días, IV) Normoglicémico con estrés mecánico de 4 días, V) Normoglicémico con estrés mecánico de 6 días, VI) Hiperglicémico con estrés mecánico de 2 días, VII) Hiperglicémico con estrés mecánico de 4 días, VIII) Hiperglicémico con estrés mecánico de 6 días. La diabetes experimental se indujo mediante una inyección única intraperitoneal de 60 mg/kg de peso corporal de STZ (estreptozotocina), se midió la glucosa a las 48 horas y seis días después del estado hiperglicémico. Se colocó un resorte en forma de U de níquel-titanio de 0.012 de grosor y activado con una fuerza de 10g, entre los primeros y segundos molares maxilares de acuerdo a la técnica descrita por Igarashi et al, 1998. Se disecaron los maxilares superiores y se procesaron histológicamente fijando las muestras en formol 4%, se descalcificaron en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se incluyeron en parafina realizando cortes en el micrótopo (Leica, Weyzlar, Alemania) de 5 μm para la técnica H y E, a un grosor de 4 μm para montar en laminillas tratadas con poli-L-lisina para la técnica inmunohistoquímica. Se realizó la medición del tamaño de las lagunas osteocitarias del hueso alveolar mediante el programa Motic Plus 2.0, en un área de 400x800 μm , con un objetivo de 40x. Para la técnica de inmunofluorescencia se observó si el marcaje era positivo para catepsina K y osteocalcina en las lagunas osteocitarias de hueso alveolar con el uso del microscopio de fluorescencia en un área de 400x800 μm , con un objetivo de 40x.

Resultados

El área de las lagunas osteocitarias de los grupos: I) Normoglicémico sin estrés mecánico, tuvieron una media de 46.889 +/- 7.68 μm , mientras que el grupo II) Hiperglicémico sin estrés mecánico, tuvieron una media de 87.24 +/- 12.89 μm , los grupos IV) Normoglicémico con estrés mecánico de 4 días, tuvieron una media de 64.28 +/- 6.40 μm y el grupo VII) Hiperglicémicas con estrés mecánico de 4 días, tuvieron una media de 86.12 +/- 13.21 μm . Debido a que las medias entre los diferentes días no mostraron diferencias significativa se consideraron como un solo grupo para poder evaluar el efecto del estrés y la hiperglicemia, el promedio total de las lagunas osteocitarias de los grupo VI, VII y VIII (Hiperglicémicas con estrés) tuvieron una media de 85.5 +/- 14.33 μm y los grupos III, IV, V (normoglicémicas con estrés) tuvieron una media de 59.04 +/- 5.6 μm .

Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar las medias del área de las lagunas osteocitarias en los diferentes grupos de 4 días, donde la hiperglicemia afectó significativamente el tamaño de las lagunas osteocitarias ($p < 0.001$) al igual que el estrés mecánico ($p < 0.05$), la interacción también mostró diferencias significativas ($p < 0.01$).

El área del núcleo de los osteocitos en los grupos, I) Normoglicémico sin estrés mecánico, tuvieron una media de 12.79 +/- 3.94 μm , mientras que el grupo II) Hiperglicémico sin estrés mecánico, tuvieron una media de 10.54 +/- 2.72 μm , IV) Normoglicémico con estrés mecánico de 4 días, tuvieron una media de 16.54 +/- 3.98 μm , VII) Hiperglicémico con estrés mecánico de 4 días, tuvieron una media de 9.66 +/- 2.71 μm . Debido a que las medias entre los diferentes días no mostraron diferencias significativa se consideraron como un solo grupo para poder evaluar el efecto del estrés mecánico y la hiperglicemia, el promedio total de los núcleos de los osteocito VI, VII y VIII (Hiperglicémicas con estrés) tuvieron una media de 8.74 +/- 2.76 μm y los grupos III, IV, V (normoglicémicas con estrés) tuvieron una media de 15.70 +/- 3.74 μm .

Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar las medias del área del núcleo del osteocito en los diferentes grupos de 4 días, la hiperglicemia afectó significativamente el área de los núcleos osteocitos ($p < 0.001$) al igual que el estrés mecánico ($p < 0.05$), la interacción también mostró diferencias significativas ($p < 0.01$).

Por los resultados anteriores concluimos que, el osteocito es sensible a la hiperglicemia y al estrés mecánico ya que, durante este estado las lagunas osteocitarias, se modifican en tamaño y forma, así como su núcleo.

Las lagunas osteocitarias de todos los grupos de las ratas hiperglicémicas y el grupo de dos días de estrés mecánico de ratas normoglicémicas expresaron catepsina K, las lagunas de las ratas normoglicémicas sin estrés y las ratas normoglicémicas de 4 y 6 días de estrés mecánico no mostraron inmuno marcaje para catepsina K. Las lagunas de los grupos, de ratas normoglicémicas sin estrés y de los grupos de ratas normoglicémicas con estrés no mostraron inmuno marcaje para osteocalcina. Las lagunas de los grupos de ratas hiperglicémicas mostraron marcaje positivo para osteocalcina.

La expresión de catepsina K en la laguna osteocitaria demuestra la actividad de osteólisis osteocitaria y la expresión de osteocalcina en ratas diabéticas se asocia al daño producido al osteocito por el estado hiperglicémico.

SUMMARY

The aim of this work was to study the histomorphometric characteristics and the expression of cathepsin K and osteocalcin in osteocyte lacuna of alveolar bone as well as the osteocyte nuclei of rats with experimental diabetes which are subjected to mechanical stress, for which were used 48 male Wistar rats weighing between 200-250 g which were assigned in the following groups: I) Normoglycemic without mechanical stress, II) Hyperglycemic without mechanical stress, III) Normoglycemic mechanical stress of 2 days IV) Normoglycemic with mechanical stress 4 days, V) with mechanical stress Normoglycemic 6 days, VI) with mechanical stress Hyperglycemic 2 days VII) with mechanical stress Hyperglycemic 4 days, VIII) with mechanical stress Hyperglycemic 6 days. Experimental diabetes titanium nickel was induced by a single intraperitoneal injection of 60 mg / kg body weight of streptozotocin, glucose at 48 hours, six days after verifying the hyperglycemic state a spring placed in a U-shape was measured 0.012 thick and activated with a force of 10g, which was placed between the maxillary first and second molars according to the technique described by Igarashi et al, 1998. Among the maxillary first molars. maxillae were dissected, which were processed histologically fixing the samples in formaldehyde 4%, decalcified in EDTA and embedded in paraffin making cuts in the microtome (Leica, Weyzlar, Germany) 5 μm for technical H y E and 4 μm mounting flake treated with poly-L-lysine for immunohistochemistry. measuring the size of the osteocyte lacuna in the alveolar bone by Motic Plus 2.0 program was carried out in an area of 400x800 microns with a 40x objective for the technique Inmunofluorescencia was observed if the marking was positive for k cathepsin and osteocalcin the osteocyte lacuna alveolar bone in which use was made of the fluorescence microscope in an area of 400x800 microns with a 40x objective.

RESULT

The area of osteocyte lacuna groups: I) Normoglycemic without mechanical stress, had an average of 46,889 +/- 7.68 μm . The group II) Hyperglycemic without mechanical stress, had an average of 87.24 +/- 12.89 μm , group III) with mechanical stress Normoglycemic 4 days had a mean of 64.28 +/- 6.40 μm , group IV) with mechanical stress Hyperglycemic 4 days, they had an average of 86.12 +/- 13.21 μm .

Two-way ANOVA was used to analyze the mean area of the osteocyte lacuna in the different groups of four days, hyperglycemia significantly affect the size of the osteocyte lacuna ($p < 0.001$) as well as mechanical stress ($p < 0.05$) the interaction also showed significant differences ($p < 0.01$).

The core area of the osteocytes in groups, I) Normoglycemic without mechanical stress, they had an average of 12.79 +/- 3.94 μm . The group II) Hyperglycemic without mechanical stress, had an average of 10.54 +/- 2.72 μm , III) with mechanical stress Normoglycemic 4 days, had an average of 16.54 +/- 3.98 μm , IV) with mechanical stress Hyperglycemic 4 days, they had an average of 9.66 +/- 2.71 μm .

Two-way ANOVA was used to analyze the middle of the core area of osteocytes in the different groups of four days, hyperglycemia significantly affected area osteocytes nuclei ($p < 0.001$) as well as mechanical stress ($p < 0.05$) the interaction also showed significant differences ($p < 0.01$).

The osteocyte is sensitive to mechanical stress hyperglycemia and because during this state osteocyte lacuna are modified in size and shape as well as its core.

The osteocyte lacuna of all groups of hyperglycemic rats and the group two days of mechanical stress of normoglycemic rats expressed cathepsin K, the lacuna in the normoglycemic rats without stress and normoglycemic rats 4 and 6 days of mechanical stress did not show immuno marking for cathepsin K.

The osteocyte lacuna of groups normoglycemic rats without stress and normoglycemic groups stressed rats showed no immunolabeling for osteocalcin. The lacuna in hyperglycemic rats groups showed positive for osteocalcin

1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de diabetes ha aumentado de manera significativa en todo el mundo (FID, 2005). Según cifras del Instituto Nacional de Salud Pública en 2010, la diabetes mellitus causó cerca de 83 000 muertes en México, siendo la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres (Rojas et al, 2015). Las complicaciones asociadas a la diabetes mellitus afectan la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

La diabetes es considerada una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no puede producir suficiente insulina o los tejidos son resistentes al efecto de la insulina, las células de la persona con diabetes no absorben adecuadamente la glucosa, que sigue circulando por el torrente sanguíneo, esta afección es conocida como hiperglucemia y con el tiempo daña los tejidos del cuerpo (Harris et al, 1997). El estado hiperglicémico produce cambios en los tejidos que se expresan a nivel celular y molecular, alterando la función de órganos y tejidos. Uno de los órganos afectados por la diabetes es el hueso (Lozano et al, 2009).

Las complicaciones óseas asociadas a la diabetes producen efectos deletéreos en las personas que la padecen, dentro de las cuales las más comunes son: disminución de la masa ósea, osteoporosis, riesgo aumentado a las fracturas y enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida del hueso alveolar, que conduce, en etapas avanzadas a la pérdida de los dientes, siendo considerada una enfermedad infecciosa-inflamatoria, que es agravada por el estado hiperglicémico, en los epitelios orales produce atrofia del epitelio gingival con disminución en el número de organelos celulares (Hamilton, 1997). La diabetes produce complicaciones vasculares en el periodonto. La hiperglicemia, da lugar a una respuesta inmune defectuosa, como el deterioro de la quimiotaxis de leucocitos y disminución de la actividad microbicida de los polimorfonucleares (Bender, 2003; Cutler et al, 1991; Naguib et al, 2004; Oliver y Tervonen, 1994). Los individuos diabéticos presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas aumentando el riesgo de padecer enfermedad periodontal, provocando una respuesta inflamatoria más intensa (Southerland et al, 2006). Por otra parte, también se ha sugerido que la enfermedad periodontal potencia la intolerancia a la glucosa así como la diabetes no controlada en adultos (Saito et al, 2004).

Debido a la alta prevalencia de personas que padecen diabetes mellitus, que tienen una predisposición de pérdida ósea, es importante estudiar el tejido óseo que es metabólicamente muy activo, el resultado de esta actividad se refleja tanto en el recambio de sus componentes inorgánicos y orgánicos, así como su interacción. Este se puede categorizar en tres componentes micro estructurales: a) células: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, b) matriz orgánica que está compuesta por un 90% de colágeno tipo I, que confiere al hueso su gran resistencia a la tensión, el resto es un medio gelatinoso homogéneo llamado sustancias fundamentales, que está compuesta de líquido extracelular, 25% de proteoglicanos – osteonectina, una fosfoproteína osteopontina, sialoproteínas, además de condroitín-sulfato y ácido hialurónico que ayudan a controlar el depósito de sales de calcio y c) matriz inorgánica formada de iones de CaPo_4 en forma de cristales de hidroxiapatita (Bennett, 1991). Dentro de las células del hueso, son bien conocidas las funciones de los osteoblastos y osteoclastos, sin embargo poco se sabe de la célula más abundante del tejido óseo: Los osteocitos, células no proliferativas que residen en el interior de la matriz ósea mineralizada (Knothe et al, 2004; Noble, 2008; Bonivitch et al, 2007), se encuentran en lagunas presentando largos procesos citoplasmáticos a través de los cuales establecen contacto y se comunican con las células osteoblásticas presentes en la superficie del hueso y con osteocitos vecinos y se conectan a los vasos sanguíneos.

La red celular tridimensional que forman los cuerpos y los procesos citoplasmáticos de los osteocitos es conocida como red osteocitaria. Esta red celular está alojada en lagunas y canalículos en el interior de la matriz ósea, que conforman el sistema lacuno-canalicular (Frost, 1960; Noble, 2008). En el cual se establece comunicación a nivel extracelular por medio del fluido que transcurre por el espacio comprendido entre la membrana plasmática de los osteocitos y la pared de la laguna y los canalículos (espacio periosteocitario) dentro del sistema lacuno-canalicular (Noble, 2008).

Villarino y colaboradores en 2006 (Villarino et al, 2006) reportaron cambios en la forma y número de los osteocitos que conforman el hueso alveolar, así como en las actividades de resorción y aposición óseas, estos estudios evidenciaron un aumento en el número de osteocitos sometidos a apoptosis. Prácticamente no hay información disponible sobre los posibles cambios de los osteocitos en la diabetes. Un reciente estudio in vivo (Ozdemir et al, 2005) mostró las características ultraestructurales de fémur y la tibia de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, en que informó cambios a las 5 semanas, principalmente observable en osteocitos, mostrando un acortamiento de los procesos celulares, formaciones vacuolares en el citoplasma y la ampliación de la matriz no mineralizada.

Knothe y colaboradores en 2004 (Knothe et al, 2004), reportaron que los estímulos físicos inducen a alteraciones en el osteocitos, que son los detectables mediante los cambios en las lagunas y el medio ambiente de los osteocitos (Aarden, 2003; Knothe, 2004; Bozal, 2001; Ferreyra, 2000).

Por lo tanto, se podría esperar que las alteraciones metabólicas inducidas por la diabetes puedan inducir a cambios en los osteocitos. Dentro de este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la histomorfometría de las características celulares y lacunares de los osteocitos de hueso alveolar en ratas con diabetes aguda.

Hay evidencia de que la glicación conduce a modificaciones químicas de proteínas y otras macromoléculas y que esto contribuye a la patogénesis de las complicaciones diabéticas, debido a la unión excesiva de glucosa a las proteínas, mejor descrita como glicación no enzimática de proteínas.

Las funciones clásicas del hueso son: el mantenimiento de la homeostasis del calcio y fósforo, la reparación de daños en el hueso, así como una función estructural que permite la locomoción y proteger órganos vitales. El hueso es un tejido dinámico en constante cambio a través de la remodelación ósea, y que requiere una gran cantidad de energía para realizar esta proceso.

El tejido óseo participa activamente en la homeostasis de los iones de Ca y PO₄ que son necesarios para las funciones de contracción muscular y la conducción nerviosa, modelos recientes en ratones sugieren un nuevo papel para el tejido óseo, participar a través de la osteocalcina en el metabolismo energético, la resistencia a la insulina, la obesidad y el desarrollo de diabetes (González et al, 2014).

La diabetes mellitus contribuye a la pérdida de hueso a través de cambios en la expresión génica de TRAP (fosfatasa ácida tartrato resistente) y catepsina K en los osteoclastos, así como de osteocalcina en osteoblastos, lo que resulta en aumento de la actividad de resorción ósea y disminución de la formación de hueso.

La resorción ósea en los modelos animales diabéticos mostró una disminución de la actividad de los osteoblastos (Villarino et al, 2006).

La resorción ósea, que se lleva a cabo por los osteoclastos, implica la desmineralización, en la que los protones liberados por los osteoclastos solubilizan la matriz inorgánica formada por hidroxiapatita, seguido de la degradación de la matriz orgánica (principalmente colágeno de tipo I) con cisteína proteinasas (Hall TJ et al, 1996). La catepsina K es una cisteína proteasa que se expresa de forma selectiva y altamente por los osteoclastos de resorción ósea y se ha propuesto para desempeñar un papel clave en la resorción ósea (Dodds RA et al, 2001).

La función de resorción ósea está ampliamente descrita como función de los osteoclastos, sin embargo diversos autores han reportado la actividad de resorción en el osteocito y se le ha denominado osteólisis osteocitaria (Qing et al, 2010). Reportaron que los osteocitos pueden expresar marcadores de los osteoclastos como son TRAP y catepsina k bajo ciertas condiciones como la lactancia. También se ha reportado la osteólisis osteocitaria en el hueso alveolar de ardillas que hibernan (Haller and Zimny, 1977). Se ha reportado la presencia de lisosomas en los osteocitos maduros que han sido estimulados con hormona paratiroidea (Belanger et al, 1969).

La mecano transducción en el hueso es un proceso que es influenciado por diversos moduladores como la PTH (parathormona), prostanoïdes y la concentración extracelular de Ca⁺⁺. Se ha postulado que el osteocito transduce los signos de carga mecánica en cambios anabólicos que se pueden medir a través de la expresión de factores de crecimiento como el factor de crecimiento parecido a la insulina y la osteocalcina (Takagaki, 1999).

Objetivo: Describir las características histomorfométricas, así como la expresión de catepsina K y osteocalcina en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar de ratas con diabetes experimental (STZ) que se sometieron a estrés mecánico.

1.1 JUSTIFICACIÓN

La diabetes es una enfermedad de alta prevalencia, que altera la calidad de vida de las personas que la padecen, produciendo cambios deletéreos en diversos órganos; a nivel óseo produce cambios que no han sido del todo estudiados.

Los osteocitos, son células que conforman el 90 - 95% de la población ósea los cuales juegan un papel muy importante en las funciones de regulación de iones como el calcio y fosfato, sin embargo su participación en estos procesos y el efecto de la diabetes en éstas ha sido poco descrito (Bonewald, 2007; Van Bezooijen, 2004).

La estructura y la actividad ósea son el resultado de los procesos de aposición y resorción los cuales son regulados por mediadores del sistema RANK (receptor activador del factor nuclear κ B) – RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B) que se establece entre los osteoblastos y los osteoclastos .

Existen diversos estudios que demuestran que la catepsina K es una enzima clave del proceso de resorción, el ARN (ácido ribonucleico) mensajero de la catepsina k es expresado en los osteoclastos humanos y de ratones (Dodds et al, 2001). La catepsina K se localiza en la superficie activa del osteoclasto, estando ausente en el osteoblasto (Goto et al, 2003; Zaidi et al, 2003). Por otro lado, existen estudios que demuestran que los osteocitos pueden expresar marcadores de los osteoclastos como son TRAP y catepsina K bajo ciertas condiciones como la lactancia y el remodelado de su matriz perilacunar (Qing et al, 2012).

Otra proteína de gran importancia es la osteocalcina, ya que es la principal proteína usada como marcador de la actividad osteoblástica y por tanto, de la formación ósea, es una proteína no colágena secretada por los osteoblastos y la más abundante de la masa ósea, la cual inhibe la acción de los osteoclastos tras inducir un descenso en el número de receptores, aunque se desconoce la trascendencia biológica de esta acción, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Zaidi et al, 2002). Otra de sus funciones es regular la homeostasis del calcio inhibiendo la precipitación de fosfato y calcio evitando así la excesiva mineralización de la matriz ósea, la cual se incorpora en su mayoría a la matriz extracelular del hueso (Molina, 2003) es importante tomar en cuenta la pérdida de hueso y disminución de osteocalcina observada en pacientes diabéticos T1 (Kemink et al, 2000).

La hiperglicemia puede alterar la morfología y la viabilidad de los osteocitos produciendo alteraciones en el recambio óseo que a su vez pueden conducir a la osteopenia característica del estado diabético.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. DIABETES Y PÉRDIDA ÓSEA

La diabetes tipo 1, es causada por una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, que resulta de la destrucción de las células Beta pancreática, este tipo de diabetes es una de las enfermedades sistémicas con mayor prevalencia a nivel mundial por que considerada un problema de salud pública (Galvis, 2012).

Se estima que cada año en el mundo 79.100 menores de 15 años desarrollan diabetes tipo 1. En México la población que padece diabetes es de 6.8 millones de personas. La prevalencia nacional es del 14% en personas de 20 a 79 años de edad, según los datos publicados en el análisis de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006).

La diabetes mellitus T1, está asociada a complicaciones como: pérdida ósea (Bouillon et al, 1995).

La asociación entre diabetes mellitus y la enfermedad periodontal ha sido motivo de estudio durante mucho tiempo. Estudios recientes demuestran que una de las causas principales de la pérdida ósea es la enfermedad periodontal, siendo esta una enfermedad infecciosa-inflamatoria, que lleva a la pérdida total de los tejidos de soporte del diente. Ya que se presenta inicialmente con una inflamación gingival, de la que, si no se eliminan los factores etiológicos, la respuesta inmunológica será más compleja y se alterara el metabolismo de los tejidos periodontales (Navarro et al, 2002; Botero et al, 2009).

Durante el proceso inflamatorio en estado de glicemia están implicados diversos mediadores que promueven la actividad osteoclástica. Algunos, mediadores como la IL-8 (interleucina-8) o la MIP-1 (Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa), ejercen efectos quimiotácticos y favorecen el reclutamiento de oc (osteocalcina) a la zona afectada. Otros favorecen la osteoclastogénesis o la actividad de los osteoclastos maduros. Entre ellos se incluyen tanto péptidos IL-1 (interleucina-1), TNF (factor de necrosis tumoral), IL-6 (Interleucina-6), RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B) como factores no proteicos (óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos, radicales libres (Choy et al, 2001; Garrett, 1990).

2.2. REMODELADO ÓSEO

El remodelado óseo es un proceso fisiológico que involucra funciones celulares dirigidas hacia la resorción y formación de hueso nuevo

Las citocinas responsables de la formación de hueso nuevo son la superfamilia del factor de crecimiento y transformación β (Anaya, 1993).

El remodelado óseo es un proceso complejo que involucra funciones celulares dirigidas hacia la resorción y formación de hueso, la secuencia de remodelado óseo es iniciada por la resorción osteoclástica seguida por la ausencia de células (fase de cambio). Posteriormente los osteoblastos aparecen en la laguna de resorción o de howship y sintetizan la matriz ósea (fase de formación), hasta que se produce el hueso nuevo (osteón) (Anaya, 1993), esto puede observarse en la figura 1.

Etapas del ciclo de remodelado óseo

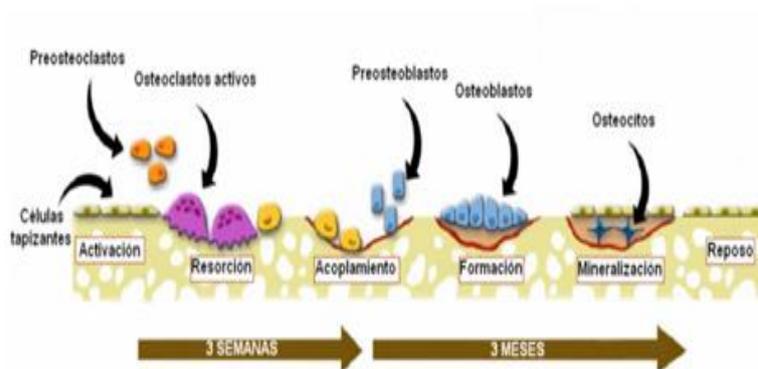


Figura 1. Ilustración del ciclo de remodelado óseo, en la cual se pueden distinguir las etapas de activación, resorción, acoplamiento, formación y mineralización (Manolagas 2000, Parfitt 1984).

2.3. CÉLULAS DEL HUESO

a) Células Osteoblásticas: Estas células son de origen mesenquimatoso cuya función primaria es la formación de una matriz ósea mineralizable. Los OB (osteoblastos) derivan de células mesenquimales; de precursores pluripotenciales presentes en el estroma de la médula ósea, los cuales, dependiendo de diferentes estímulos, tienen capacidad para diferenciarse hacia fibroblastos, adipocitos, células musculares lisas u osteoblastos (Gronthos et al, 1994). También los pericitos o células murales de los vasos sanguíneos pueden diferenciarse a OB (Parfitt, 2000). Los osteoblastos se hallan en contacto directo con las superficies óseas formando grupos compactos de una sola capa de espesor. En la formación del hueso el paso inicial es la secreción por parte de los osteoblastos, de moléculas de colágena.

La mayor parte de los OB desaparecen al finalizar la síntesis osteoide, posiblemente por un fenómeno de apoptosis o muerte celular programada (Jilka RL et al, 1998). Algunos, sin embargo, quedan atrapados dentro de la matriz ósea, transformándose en células de aspecto estrellado, conocidas como osteocitos, o bien, se aplanan y se transforman en las llamadas células de revestimiento ("lining cells"). Estas células tapizan las superficies óseas y a través de la producción de factores locales estimulantes de colonias y citosinas que son secretadas por las células del estroma, tales como las Interleucina-6 e Interleucina-11, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, que parecen jugar un papel importante en la mielopoyesis (Manolagas et al, 1995). Los OB parecen desempeñar un

papel importante no sólo en el control del remodelado óseo sino también en lo que se refiere al intercambio de calcio entre el hueso y el líquido intersticial (véase la Imagen 1).

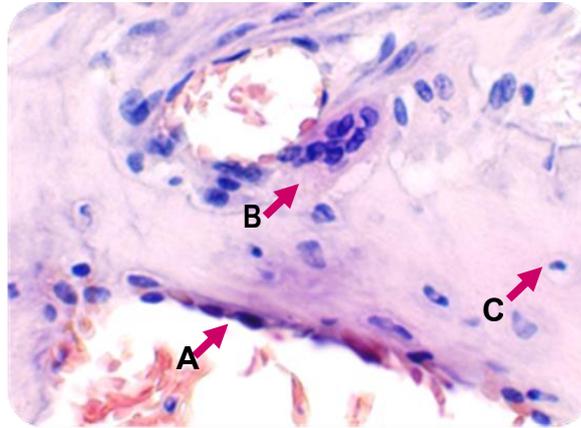


Imagen 1. Corte de hueso alveolar de rata, teñido por técnica H y E, la cual muestra: a) Osteoblastos, b) osteoclasto, c) osteocito. Tomada en microscopio óptico 40x.

b) **Células Osteoclásticas:** Los preosteoclastos son células dotadas de un solo núcleo que se adhieren a las superficies óseas y al fusionarse entre sí, dan lugar a los OC (osteoclastos) (Kameda et al, 1996). Los preosteoclastos expresan en su membrana moléculas de Adhesión perteneciente a la familia de las caderinas que parecen intervenir en la fusión de estas células. En uno de los polos de los OC se encuentra el llamado “borde en cepillo”, donde la membrana celular se pliega varias veces (Kameda et al, 1996).

Fueron llamadas así por Kölliker en 1873, son células multinucleadas diferenciadas, ricas en anhidrasa carbónica y TRAP. Se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos (Kölliker, 1873).

Los osteoclastos comparten una rama común con las células del linaje macrófago-monocítico (Ash P, 1980; Kerby JA, 1992). Para ello se adhieren a la superficie ósea por la llamada zona de sellado (“sealing zone”), que rodea el borde en cepillo (véase la imagen 2).

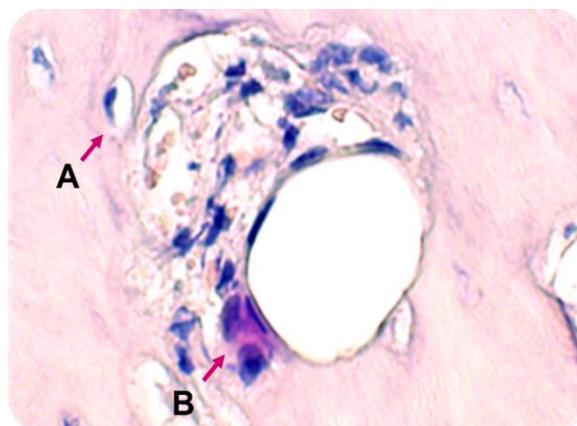


Imagen 2. Corte de hueso alveolar de ratas que muestra: A) Osteocitos, B) Osteoclasto, la cual fue teñida mediante técnica H y E, observada en microscopio óptico a 40x.

c) Osteocitos

El osteocito es la célula más abundante del tejido óseo y constituye cerca del 95% del componente celular de este tejido (Aarden et al, 1994).

Los osteocitos, están incrustados en la matriz ósea, establecen una extensa red de comunicación intracelular y extracelular, Normalmente cerca del 29% de los osteoblastos del hueso trabecular se diferencia en osteocitos, un 6% a células de revestimiento (*lining cells*) y el 65% restante mueren por apoptosis (Qiu S et al ,2000).

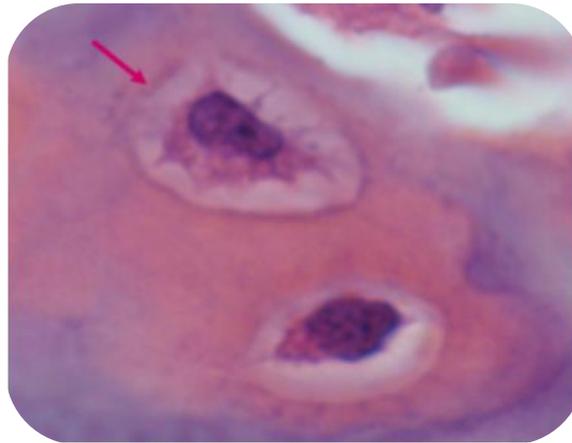


Imagen 3. Muestra de hueso alveolar de rata que muestra la laguna osteocitaria, osteocito y núcleo del osteocito, teñido con técnica H y E.

El espacio en la matriz que rodea las inmediaciones de los osteocitos y los procesos citoplasmáticos, formando la laguna y los canaliculos osteocitarios respectivamente, genera una red tridimensional interconectada a través de la cual transita un líquido intersticial y pequeñas moléculas, aportando así la porosidad característica del hueso (Duncan et al, 1995). A esta red se la conoce como el *sistema lacuno-canalicular* tiene especial importancia en el tránsito metabólico e intercambio de sustancias, así como la nutrición de las células (Knothe et al, 2004). Se especula que las señales enviadas por los osteocitos son las responsables de los cambios que se producen en las células de revestimiento cuando se inicia el remodelado: esas células se despegan de la superficie ósea y constituyen una especie de cúpula que constituye el llamado «espacio de remodelado». En este espacio, relativamente aislado del resto del hueso es donde se inicia la resorción (Erikson EF, 2007) (véase Imagen 3).

Cuadro 1. Proteínas altamente expresadas en osteocitos.

Proteína	Expresión	Función
E11/gp38	Osteocitos tempranos(nuevamente incrustados)	Formar dendritas
DMP1	Osteocitos tempranos y maduros	Homeostasis del fosfato
PHEX	Osteocitos tempranos y maduros	Homeostasis del fosfato
MEPE	Osteocitos tempranos y maduros	Homeostasis del fosfato
Esclerostina	Osteocitos maduros(profundamente incrustados)	Inhibidor del osteoclasto

Recientemente algunos estudios se han realizado sobre las proteínas específicas del osteocito como son: la proteína E11/gp38 muestra su máxima expresión en el osteocito recién incorporado (Zhang et al; 2006, Kato et al; 1997). Las funciones de las proteínas DMP1, PHEX y MEPE están relacionados con la homeostasis del fosfato (Feng et al; 2006, Liu et al; 2006, Rowe et al; 2000). La esclerostina es expresada en los osteocitos y su función es inhibir a los osteoclastos (Poole et al; 2005).

Diversos estudios desde hace más de 100 años, postularon que osteocitos podrían remodelar su matriz extracelular (Fischer, 1920). Por otro lado Michael Parfitt y colaboradores en 1990 (Parfitt et al, 1990), propuso que los osteoblastos mueren por apoptosis y sin embargo, existen estudios que demuestran que los osteocitos pueden expresar marcadores de los osteoclastos como: TRAP (Fosfatasa ácida tartrato resistente), y catepsina K bajo ciertas condiciones, como: la lactancia y el remodelado de su matriz perilacunar (Qing et al, 2010).

La muerte de estas células se da principalmente a través de tres vías, apoptosis, muerte celular por autofagia y necrosis, en condiciones fisiológicas y patológicas. Aunque las células que mueren pueden compartir apoptosis y la autofagia características (Bursch, 2001).

La muerte de los osteocitos por apoptosis. En estudios recientes sugieren que la diabetes puede tener un efecto negativo en el periodonto por el aumento de la formación de osteoclastos y el aumento en la apoptosis de fibroblastos, osteoblastos y osteocitos en el tejido periodontal (Yong-Wei Fu, 2015). El estudio de Yong-Wei Fu en 2015, tiene como resultado un aumento evidente en número de osteocitos apoptóticos en el grupo de ratas que presentan hiperglucemia.

Se considera que los osteocitos desempeñan un papel central en la detección mecánica ósea (Noble, 2008) y que regulan la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos durante la remodelación ósea inducida por cargas mecánicas (Robling et al, 2008).

2.4. OSTEÓLISIS OSTEOCITARIA

En los años 60 y 70 se observó que los osteocitos pueden reabsorber el hueso y aumentar el tamaño de las lagunas. Este concepto se conocía como osteólisis osteocitaria y los estudios sugirieron que es producido en respuesta a la hormona paratiroidea y / o a un aumento de la demanda sistémica de calcio. Sin embargo, este concepto se dejó de usar a finales de los 70, cuando se estableció que los osteoclastos eran las células responsables de la resorción ósea (Wysolmersk, 2013).

Durante la osteólisis osteocitaria, se ha comprobado que la función principal del osteocito es la remodelación ósea, denominada: "osteólisis", ya que la función de los osteoclastos es denominada "osteoclasia" la diferencia radica en que los osteocitos no son células superficiales. Histológicamente, a su alrededor existe una actividad proteolítica localizada, además de la desmineralización de la matriz alrededor de la laguna con aparición de productos de degradación en el espacio perilacunar, aportando así pruebas que confirman la osteólisis. Además de esta actividad; el osteocito joven puede participar en la formación de matriz, aunque menos marcada que en los osteoblastos, esta capacidad disminuye al envejecer la célula (Takagaki, 1999).

La lactancia está asociada con la pérdida ósea reversible ya que, la leche proporciona energía y nutrientes, incluyendo calcio y fósforo, necesarios para el crecimiento esquelético rápido que se produce en el período neonatal (Kovacs, 1997). La demanda adicional de calcio para la producción de leche materna presiona la homeostasis del calcio y, como resultado, la lactancia se asocia con una serie de adaptaciones al calcio y el metabolismo óseo. La succión induce hiperfagia y la secreción de prolactina, que estimula la absorción de calcio por el tracto gastrointestinal (Ajibade et al, 2010; Charoenphandhu et al, 2009). Durante la lactancia, los riñones retienen el calcio, y la excreción urinaria de calcio disminuye a niveles muy bajos (VanHouten, 2005).

Por lo que un poco de calcio se recupera de la orina. Por último, la lactancia es asociada con la pérdida ósea significativa ya que se ha supuesto que gran parte del calcio que se utiliza para la producción de leche proviene del esqueleto (VanHouten, 2005).

2.5. ALTERACIONES DE LOS OSTEOCITOS EN PRESENCIA DE ESTRÉS MECÁNICO.

Se sabe que la presión ejercida en los tejidos al aplicar fuerzas ortodóncicas producen una reacción semejante a la inflamación con la consiguiente reactividad vascular y celular que conducen a la síntesis de moléculas señal, entre ellas las citocinas que inducen la síntesis de prostaglandinas que estimulan la actividad de resorción de los osteoclastos (Yamazaki et al, 1980).

Se ha reportado que los osteocitos responden a estímulos mecánicos e inflamatorios agrandando significativamente el tamaño de sus lagunas a las 24 horas de aplicado el estímulo, cambiando la forma de la laguna la cual se observa de manera redonda (Bozal, 2012). Por ellos se cree que el estrés mecánico ortodóncico induce la síntesis y secreción de prostaglandinas en células locales (Yamazaki et al, 1980; Kansaki et al, 2002).

La aplicación de fuerzas mecánicas a todo el hueso hace que el líquido fluya (in vivo) a través de sistema lacunar-canalicular (Knothe et al, 2000).

Su síntesis y secreción es inducida por las citocinas mediadoras del proceso inflamatorio (Akatsu et al, 1989).

2.6. MECANISMOS DE REMODELADO ÓSEO.

Una vez alcanzada la masa ósea máxima, lo cual ocurre hacia el final de la tercera década de la vida, el mantenimiento de ésta depende de un complejo y equilibrado proceso de remodelación ósea, del cual depende de dos fases fundamentales: la resorción comandada por los osteoclastos (que dura cerca de 3 semanas por sitio, y el depósito de matriz extracelular ósea, sintetizadas por los osteoblastos y que tarda de 3 a 4 meses. En ellas intervienen numerosos factores sistémicos (hormona paratiroidea, metabolitos de la vitamina C, osteocalcina y locales (citocinas, en especial IL-1 y TNF α) de naturaleza inmuno-endocrina, así como elementos de regulación local (Guiton, 1989).

Las células encargadas del proceso de remodelación son: los *osteoblastos* que se encargan de la formación de "hueso nuevo", y los *osteoclastos* encargados de la eliminación de "hueso viejo" (resorción). Cabe mencionar que los precursores mononucleares y fibroblastos juegan un papel importante en el control de la actividad de los osteoclastos (Murria, 1994).

Todo esto se halla bajo la dirección de un sistema de señales hormonales a su vez modulada por factores locales óseos que mantienen un equilibrio (Murria, 1994).

En la actualidad hay mucha información disponible acerca de la fisiología de la remodelación ósea, y de los factores locales y sistémicos que regulan este proceso tan complejo, pero aún no hay suficientes datos sobre lo que ocurre a nivel molecular. Los nuevos avances en la biología molecular han permitido descubrir los mecanismos que se desarrollan a nivel celular en el microambiente óseo (Murria, 1994).

2.7. FACTORES REGULADORES DEL METABOLISMO ÓSEO

2.7.1. MEDIADORES QUÍMICOS

2.7.1.1. Parathormona: Es la hormona que controla la homeostasis del calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Producida en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiante por excelencia, al favorecer la reabsorción. No obstante, en los últimos años se ha descubierto su papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I (factor de crecimiento insulínico tipo 1) y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta 1) (Canalis et al, 1989). Este doble efecto de reabsorción y formación explicaría porque la administración continua de PTH estimula la reabsorción ósea a través de la síntesis del factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimula la formación de hueso, a través de un incremento de los factores de crecimiento anteriormente mencionados y la disminución de la apoptosis de los osteoblastos (Fernández et al, 2006).

2.7.1.2. Calcitonina: Es producida en las células C o parafoliculares de la glándula tiroides, es inhibidora de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, esta acción es transitoria, ya que los osteoclastos parecen volverse “impermeables” a la calcitonina en pocos días (Prieto S, 1999).

2.7.1.3. Vitamina D: Hormona esteroidea favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato, por tanto, la mineralización ósea. Es necesaria para el crecimiento normal del esqueleto. Algunos autores piensan que puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos (Raisz LG, 1993).

2.7.1.4. Citocinas: Son mediadores bioquímicos locales polipeptídicos secretados por células mononucleares que pueden interactuar directa o indirectamente (afectando otras células vecinas) con las células óseas. Son proteínas solubles que controlan la actividad del sistema inmune (Alhashimi et al, 2001).

2.8. MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL METABOLISMO ÓSEO

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son sustancias liberadas a la circulación durante el proceso de formación y/o resorción que reflejan la actividad metabólica del tejido óseo en un momento puntual (Bettica, 1996; Ebeling, 1992; McLaren, 1992; Schneider, 1997; Seibel, 1993; Seibel, 1994).

Los marcadores de remodelado óseo se clasifican en dos grupos: los que reflejan la tasa de formación y los que reflejan la tasa de resorción ósea, estos marcadores se pueden observar en el cuadro 2. Cuando ambos eventos están acoplados, cualquier marcador puede reflejar la tasa global de remodelado óseo. Los marcadores bioquímicos de formación ósea suelen determinarse en sangre mientras que la mayoría de los de resorción ósea se analizan en orina (Molina, 2003).

Cuadro 2. Marcadores bioquímicos del remodelado óseo en el que se muestran los principales marcadores de resorción presentes en orina, suero y ambos suero y orina, así como también los diferentes marcadores de formación presentes en suero.

MARCADORES DE RESORCIÓN	MARCADORES DE FORMACIÓN
ORINA	SUERO
Hidroxiprolina	Fosfatasa alcalina total (ALP)
Piridinolina (Pyd) y deoxipiridinolina (Dpd)	Fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP)
SUERO	Osteocalcina
Fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)	Péptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP)
Telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (ICP)	Péptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP).
SUERO Y ORINA	
Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX)	
Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I (NTx)	

2.8.1. CATEPSINA K

Hasta hace poco se creía que solo la catepsina L y B eran las responsables de la actividad de cisteínas-proteasa de los osteoclastos (Millest, 1997), sin embargo en 1994 se identificó en conejos una nueva cisteíno-proteinasa expresada en el osteoclasto que fue llamada catepsina K (Tezuka et al, 1994).

La catepsina K es una cisteíno proteinasa, es la enzima proteolítica más abundante del osteoclasto y su principal función es la degradación del colágeno tipo 1 en la región helicoidal y telopeptídica tanto a pH ácido como a pH neutro (Garnero et al, 1994).

Esta cisteíno-proteasa se encuentra en el borde rugoso de los osteoclastos y en las lagunas de resorción de la superficie ósea.

La inhibición de esta enzima inhibe la formación de lagunas de resorción osteoclástica a manera de concentración dependiente, por ello se han estudiado inhibidores naturales y sintéticos. Dentro de los inhibidores naturales se encuentra la cistatina proteína con potente actividad inhibidora de las peptidasas (Álvarez et al, 2003) y dentro de los inhibidores sintéticos se encuentra el AAE581 (Negri, 2004).

La catepsina K es altamente activa lisando proteínas de la matriz ósea, como los colágenos tipo I y II y es la primera catepsina capaz de clivar la triple hélice de colágeno dentro de la parte helicoidal intacta de la molécula (Kafienah et al, 1998).

Recientes estudios microscópicos de inmunoluminiscencia e inmunofluorescencia han demostrado la presencia de catepsina K en el borde rugoso de los osteoclastos y en las lagunas de resorción de la superficie ósea (Littlewood et al, 1997).

El aumento de la catepsina K y TRAP (Fosfatasa ácida tartrato resistente) está involucradas en la pérdida de hueso en una fase temprana de la diabetes (Mamiko et al, 2007).

2.8.2. OSTEOCALCINA

La osteocalcina es una proteína característica del hueso y la dentina. Es la proteína no-colágena más abundante en la masa ósea, la cual regula la homeostasis del calcio, Inhibiendo la precipitación de fosfato y calcio evitando así la excesiva mineralización de la matriz ósea (Delmas, 1993).

La osteocalcina es producida por el osteoblasto y posterior a su síntesis, la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso, sin embargo, una fracción es liberada a la circulación donde puede ser medida (Delmas, 1993).

Algunos estudios han demostrado que la osteocalcina es expresada específicamente en los osteoblastos y que es secretada en la circulación, también regula la homeostasis de la glucosa mediante la estimulación de la expresión de insulina en el páncreas y la adiponectina expresión en adipocitos, lo que resulta en la mejora de intolerancia a la glucosa (Kanazawa, 2015). Estos hallazgos sugieren que el metabolismo óseo y el metabolismo de la glucosa se asocian unos con otros a través de la acción de la osteocalcina (Kanazawa, 2015).

En casos como la osteoporosis, o la posmenopausia, donde la resorción y la formación se encuentran desacopladas, por lo que se considera que la osteocalcina puede servir como un marcador de formación ósea (Delmas, 1993).

Motyl en 2009, indujo diabetes experimental con STZ en ratones, después de 5 inyecciones aplicadas una cada día de 40 ó 60 mg de STZ, donde se indujo a patologías óseas, detectando **disminución del nivel sérico de osteocalcina** y del ARN mensajero de osteocalcina en la tibia y del volumen de aposición mineral, también reportó un **aumento de catepsina K** y de la proporción RANKL/OPG (osteoprotegerina) en los ratones a los que administró la dosis alta de STZ.

En dos estudios transversales, los niveles de osteocalcina en sangre fueron significativamente inferiores en los diabéticos que en los controles y los niveles entre los grupos de estudio no diabéticos fueron inversamente proporcionales a la masa grasa y la glucosa en sangre (Kindblom et al, 2009; Pittas et al, 2009). En mujeres postmenopáusicas, los niveles de osteocalcina fueron significativamente inferiores en diabéticos tipo 2 comparados con los controles (Im, J.A. et al, 2008). En un estudio sobre los efectos de una dieta hipercalórica y el ejercicio, se mostró que los niveles plasmáticos de osteocalcina fueron asociados positivamente con sensibilidad a la insulina y negativamente con los triglicéridos en plasma en ayunas (Fernández et al, 2009).

La osteocalcina regula el manejo de la glucosa (Ducy et al, 2000). Esta proteína es el gen más específico de los osteoblastos. La OC se identificó hace muchos años como un componente de la matriz extracelular del hueso donde se une con una alta afinidad a la hidroxiapatita (Hauschka et al, 1989; Lian et al, 1989; Price, 1989), sin embargo, también se secreta en sangre. Se sabe que la osteocalcina puede jugar un papel en la mineralización.

La osteocalcina se sintetiza inicialmente como una pre molécula con tres residuos de GLU (ácido glutámico). Durante modificaciones post-traduccionales, los residuos del ácido glutámico son residuos Gla gamma carboxilado por una carboxilasa gamma, también llamada proteína Gla ósea (BGP). Para la osteocalcina los residuos Gla son responsables de la alta afinidad mineral de la osteocalcina (Hauschka et al, 1989; Price, 1989). Escisiones intracelulares producen la osteocalcina madura final que se secreta. Algunas observaciones sugieren que la disminución de carboxilación por anticoagulantes puede causar una disminución de osteocalcina en sangre de la oc (Hetzl et al, 2006).

2.9. DIABETES EXPERIMENTAL STZ (ESTREPTOZOTOCINA)

El uso de agentes diabetogénicos es ampliamente usado para la inducción de diabetes experimental, uno de estos agentes es la estreptozotocina, que es un antibiótico extraído de *streptomyces achromogenes* que posee propiedades antitumorales y oncogénicas (Kazumi et al, 1978). Su acción citotóxica sobre las células beta pancreáticas es específica, rápida y aparentemente desde la primera hora de su administración, resultando en necrosis celular irreversible (Junod et al, 1967).

El mecanismo de acción de la estreptozotocina es entrar en las células beta del páncreas a través de un transportador de glucosa GLUT2 (transportadora de glucosa), como resultado de esta acción las células beta se someten a la destrucción por necrosis, además la estreptozotocina libera cantidades tóxicas de óxido nítrico que inhiben la actividad de la aconitasa y participan en el daño del ADN (ácido desoxirribonucleico) (Szkudelsk, 2001).

La vía de inducción de diabetes experimental se realiza mediante una dosis única intravenosa de entre 40 y 60 mg/kg en ratas adultas para inducir diabetes mellitus. En la diabetización de animales también se usa aloxan y estreptozotocina, con una dosis de 54 mg/kg (Ganda et al, 1976), también resulta eficaz una dosis similar o mayor después de la primera administración intraperitoneal, ya que una sola dosis por debajo de los 40 mg/kg (Katsumata et al, 1992), por ejemplo, si se administran 50 mg/kg de peso corporal de STZ, luego se inyecta por vía intravenosa a ratas que han sido alimentadas, la glucosa en sangre (determinado 2 semanas después del tratamiento) (Szkudelsk, 2001).

Según estudios de Bedoya y colaboradores en 1996, la STZ deteriora la oxidación de la glucosa, otros autores reportan que disminuye la biosíntesis y la secreción de insulina (Bolaffi et al, 1987; Nukatsuka et al, 1990). Observaron que la STZ suspende la respuesta de las células beta a la glucosa que es absorbida por las células beta pancreática a través del transportador de glucosa GLUT2. Se ha encontrado que para evitar la acción diabetogénica de STZ se necesita de una expresión reducida de GLUT2 (Schnedl et al, 1994; Thulesen et al, 1997). Estudios recientes observaron que STZ restringe la expresión GLUT2 in vivo e in vitro cuando se administra en dosis múltiples.

También se ha demostrado que la STZ inhibe el ciclo de Krebs (Turk et al, 1993) y disminuye sustancialmente el oxígeno, (Nukatsuka et al, 1990).

Según el protocolo de Like y Ossini, en 1976 según resultados obtenidos por histopatología y por química sanguínea se puede concluir que la diabetes Mellitus inducida mediante estreptozotocina es diabetes tipo 1.

2.10 CARACTERÍSTICAS PERIODONTALES DE LA RATA

Por más de cuatro décadas la rata ha sido ampliamente usada en estudios, ya que su estructura periodontal es muy parecida a la del hombre, además de tener varias ventajas como animal de experimentación, su bajo costo y facilidad de manejo. La rata tiene como estructura dental un único incisivo separado por medio de un diastema de los tres molares, este incisivo posee un crecimiento continuo, mediante su uso se asegura el tamaño adecuado dentro de la cavidad oral. Además de su crecimiento continuo, este diente central carece de raíz, motivos por los que no son incluidos en modelos de estudio de enfermedad periodontal. A comparación de los molares, estos cuentan con

epitelio gingival, epitelio del surco, epitelio de unión, fibras colágenas periodontales, cemento celular y acelular y hueso alveolar, teniendo una gran similitud con el periodonto humano. Aunque, cabe destacar la diferencia de que el surco gingival de la rata esta queratinizado, pudiendo impedir el movimiento de los metabolitos bacterianos dentro del tejido conectivo gingival previniendo así la respuesta inflamatoria. Estudios recientes muestran que el material situado en el surco gingival penetra rápidamente en el tejido conectivo por medio del epitelio de unión, anulando así la diferencia entre periodonto de ratas y humanos.

En la 5ª semana de vida, las ratas tienen completa la erupción de todos sus molares, con el progreso de la edad y como consecuencia de los procesos de atrición, los molares migran en sentido distal. Teniendo como resultado el remodelado del hueso interdental y alveolar ([listgarten, 1975](#)).

La densidad mineral del hueso periodontal de soporte aumenta alcanzando su máxima densidad en la 6ª semana y después permanece constante.

En las ratas la destrucción periodontal ocurre rápidamente, pudiendo el aparato de ortodoncia colocado en este estudio, ser un medio acumulativo de placa bacteriana, promoviendo la destrucción periodontal. La pérdida ósea ha sido registrada después de 42 días ([Villarino et al, 2006](#)).

Pocos días después de la inducción, sembrado o contaminación por bacterias se ha encontrado leve sangrado gingival. El epitelio de unión experimenta cambios patológicos graduales, incluyendo la formación de crestas papilares, ulceración y migración apical. En el tejido conectivo aparece un infiltrado celular inflamatorio que contiene linfocitos T y B, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, estos últimos migran a través del epitelio hacia el surco gingival. También se observa daño en las fibras de colágeno y fibroblastos ([Florencia, 2008](#)).

3. Objetivo general

Describir las características histomorfométricas, así como la expresión de catepsina K y osteocalcina en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar de ratas con diabetes experimental que se sometieron a estrés mecánico.

Objetivos específicos

Analizar si existe cambios histomorfométricos en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en los diferentes grupos de estudio mediante la técnica H y E.

Analizar si existe marcaje positivo a catepsina K y osteocalcina, en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar mediante la técnica de inmunofluorescencia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales utilizados en este proyecto fueron tratados de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de Laboratorio.

Para eliminar la variabilidad hormonal, que se presentan en las ratas hembras debido a los ciclos reproductivos, se decidió que el modelo experimental se realizase en ratas macho (Storey, 1954).

Se utilizaron 48 Ratas de la cepa wistar, machos de 200-250gr de peso. Distribuidas aleatoriamente en 8 grupos con 6 ratas por grupo: I) Normoglicémico sin estrés mecánico, II) Hiperglicémico sin estrés mecánico, III) Normoglicémico con estrés mecánico de 2, 4 y 6 días con aparatología, cada grupo formado por 6 ratas, y finalmente, grupo IV) Hiperglicémico con estrés mecánico de 2,4 y 6 días de aparatología, esto puede observarse de manera esquemática en el cuadro 4.

Los diferentes grupos de ratas fueron alojados en el bioterio de la FES Iztacala, con aserrín estéril que garantizo la absorción de orina, excremento y desperdicio de agua, favoreciendo su aislamiento térmico y construcción de nido. Cada caja se identificó. El alimento y el agua fue libre acceso (ad libitum), y se iluminó mediante luz artificial con cambio de ciclos de luz cada 12 horas. La temperatura fue de 18° a 25°C. Con una humedad máxima de 54% y la mínima de 13%. Las ratas fueron marcadas para su identificación mediante marcadores de tinta permanente libres de Xilol, no tóxicos, colocándoles números en la cola dependiendo de cada caso.



Imagen 4. Se muestra: A) Entrada del bioterio de la Fes, Iztacala, B) Las cajas donde se alojaron las ratas durante el proyecto de investigación.

Para la correcta inducción de la diabetes experimental con estreptozotocina, se dejaron en ayunas a las ratas, para posteriormente infiltrar por vía intraperitoneal una dosis única de estreptozotocina, usando como vehículo buffer de citratos, se confirmó la hiperglicemia midiendo los niveles de glucosa a los 2 días posteriores a la inducción tomando como ratas hiperglicémicas aquellas que tuvieran valores arriba de 200 mg/dl (véase cuadro 3).

Cuadro 3. Dosis utilizadas para la inducción de diabetes experimental con STZ, por kg de peso por rata (se realizó mediante una regla de 3).

ESTREPTOZOTOCINA	BUFFER DE CITRATOS
Dosis 60 mg STZ - 1000g X - Peso rata	1 ml buffer de citratos -1000g X - Peso rata

Cuadro 4. Diseño experimental.

Grupo	STZ+ Buffer de citratos	Buffer de citratos	Estrés mecánico
Normoglicémicas		**	Sin estrés
Hiperglicémicas	*		Sin estrés
Normoglicémicas		**	2 días
Normoglicémicas		**	4 días
Normoglicémicas		**	6 días
Hiperglicémicas	*		2 días
Hiperglicémicas	*		4 días
Hiperglicémicas	*		6 días

4.1. APARATOLOGÍA DE ORTODÓNICA.

Las ratas fueron anestesiadas utilizando ketamina como tranquilizante a una dosis de 60 mg/kg y xilacina como anestésico a una dosis de 7 mg/kg, vía intraperitoneal, posteriormente se les colocó un aparato ortodóncico elaborado de alambre Ni-Ti de 0.012 de grosor y activado con una fuerza de 10g, que fue colocado entre los primeros y segundos molares maxilares de acuerdo a la técnica descrita por Igarashi y colaboradores en 1998, (Igarashi et al, 1998) (véase la imagen 5).

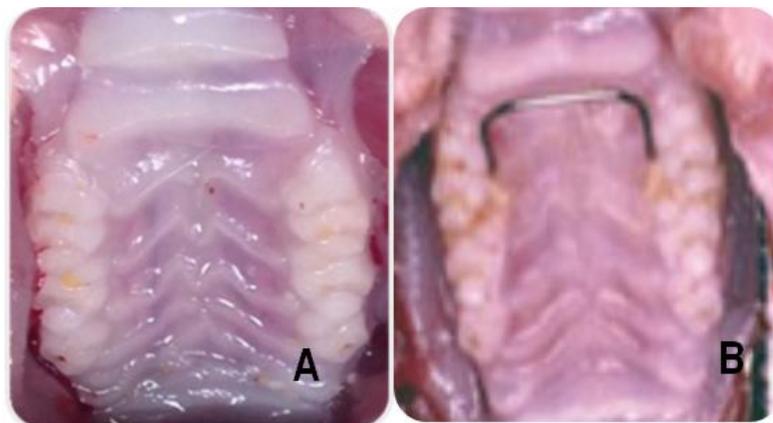


Imagen 5. Muestra del maxilar superior de rata: A) Sin aparatología, B) Con aparatología ortodóncica Ni-Ti de 0.12 grosor.

Cuadro 5. Cuadro que muestra los tiempos de inducción de la diabetes en todos los grupos, así como el estrés mecánico y sacrificio.

Grupo	Duración de diabetes Experimental. STZ+ buffer de citratos	Colocación de vehículo (buffer de citratos).	Duración estrés mecánico	Sacrificio exposición CO2
Normoglicémicas	4 días	4 días
Hiperglicémicas	4 días	4 días
Normoglicémicas	6 días	2 días	8 días
Normoglicémicas	6 días	4 días	10 días
Normoglicémicas	6 días	6 días	12 días
Hiperglicémicas	6 días	2 días	8 días
Hiperglicémicas	6 días	4 días	10 días
Hiperglicémicas	6 días	6 días	12 días

Todos los animales fueron sacrificados por exposición a CO₂. Una vez sacrificados los animales se disecaron los maxilares superiores y se fijaron en formaldehído al 4% durante 48 horas, posteriormente la descalcificación se inició colocando las muestras en cassetes con rejillas los cuales se etiquetaron para poder identificarlos y se sumergieron en EDTA a pH 7.4 durante 30 días en agitación o hasta que radiográficamente se observó la completa descalcificación, en la imagen 6 se muestran las radiografías que se tomaron para corroborar el hecho.

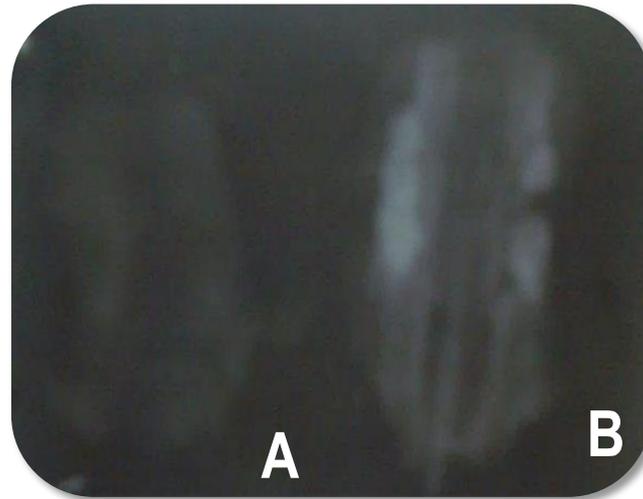


Imagen 6. Radiografía apical tomada en maxilar superior en la que se muestra: A) Maxilar descalcificado, imagen radiolucida y B) Maxilar sin descalcificar, imagen radiopaca (hueso y dientes).

TÉCNICA HISTOLÓGICA

Una vez descalcificados los maxilares se comenzó la técnica histológica mediante la deshidratación de las muestras en alcoholes (70°, 80°, 90°, 96°, 100°), para quitar el exceso de agua, después de la deshidratación de los tejidos comenzamos con la inclusión de las muestras las cuales se sumergieron en parafina 1 (1 hora), parafina 2 (1 hora) y finalmente se colaron las muestras en los cubos de inclusión orientando las muestras horizontalmente y con las caras vestibulares de los molares hacia la base, vaciando parafina de inclusión hasta llenar el cubo, colocando en la parte más superficial del cubo una etiqueta que identificara las muestras, una vez que la parafina se enfrió se retiró del molde y se cortó en forma de pirámide trunca, para comenzar a realizar los cortes en bloque a 5 micras en el micrótopo (Leica, Weyzlar, Alemania), estirando y fijando las muestras mediante ruyter, para que se pudiera fijar bien la muestra al portaobjetos y evitar burbujas se secaron y colocaron los portaobjetos en la plancha a 47°C, una vez fijado el tejido se desparafinaron las muestras metiéndolas en rejillas al horno a 56°C una hora, para eliminar la parafina y finalmente comenzar con la técnica de H y E (anexos). Los cortes fueron observados en microscopio óptico (Motic plus 2.0), para realizar la histomorfometría de las lagunas osteocitarias y los núcleos de los osteocitarios.

La observación histológica se enfocó al septum intrarradicular de las raíces vestibulares de los primeros molares, con el propósito de medir el área de las lagunas osteocitarias del hueso alveolar con ayuda del programa Motic Plus 2.0, los núcleos se tiñen de morado mientras que el citoplasma tiñe de rosa. Se observaron en el microscopio óptico en un área de 400x800 a un objetivo de 40x (véase imagen 7).

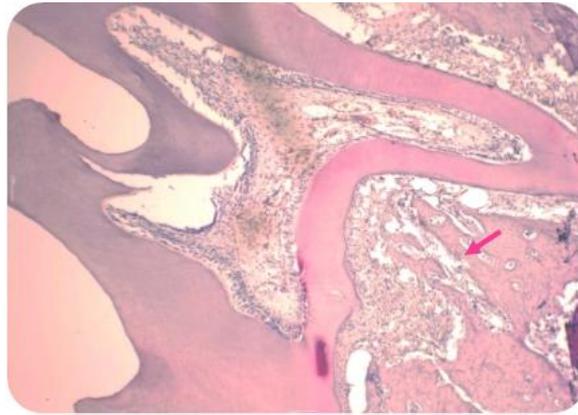


Imagen 7. Imagen que muestra corte sagital del primer molar superior de rata, en el que el área de interés para la observación histológica es el septum interarticular. Técnica H y E, aumento 10x.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

En esta técnica se realizaron los primeros pasos de la técnica histológica para H y E, sin embargo los cortes en bloque se realizaron para la inmunofluorescencia a 4 micras mediante el micrótopo (Leica, Weyzlar, Alemania), montando los cortes en laminillas tratadas con poli-L-lisina y estirados para su fijación en la tina de flotación la cual debe de estar a 56°C, se desparafinaron las muestras y se comenzó la realización de la técnica de inmunofluorescencia (anexos). Los cortes fueron observados en el microscopio de fluorescencia, para observar si el marcaje era positivo o negativo para catepsina k y osteocalcina.

La observación del marcaje se enfocó en el septum interradicular de las raíces vestibulares de los primeros molares, con el propósito de observar fluorescencia en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar, las cuales se marcan positivas color verde(fitc) y azul los núcleos (dapi).

Los anticuerpos que utilizamos fueron los siguientes (véase cuadro 6 y 7).

Cuadro 6. Anticuerpo (Anti-Cathepsin K)

Anticuerpo Primario	Anti-Cathepsin K antibody ab19027 (Santa Cruz Biotechnology)	Concentración: 1:200	
Origen	Rabbit polyclonal		
Específico	Mouse, Rat, Human, Zebrafish		
Anticuerpo Secundario	FITC (Isotiocianato de fluoresceína)	Concentración 1:200	Excitación: 492 nm Emisión: 518 nm
Montaje	DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)	Concentración 1:100	Excitación: 358 nm Emisión: 461 nm

Cuadro 7. Anticuerpo (Osteocalcin)

Anticuerpo Primario	Osteocalcin FL-100: Sc-30044- Anticuerpo Policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology)	Concentración: 1:200	
Origen	Rabbit polyclonal		
Específico	Rat		
Anticuerpo Secundario	FITC (Isotiocianato de fluoresceína)	Concentración: 1:200	Excitación: 492 nm Emisión: 518 nm
Montaje	DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)	Concentración 1:100	Excitación: 358 nm Emisión: 461 nm

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante 3 pruebas estadísticas t de student, ANOVA y ANOVA de 2 vías, para responder a la pregunta de porque se realizaron diferentes análisis y no solo uno es por lo siguiente.

El análisis de t de student, se realizó para ver si existía diferencia significativa entre las ratas normoglicémicas e hiperglicémicas sin estrés, el análisis de ANOVA se realizó entre los grupos de ratas normoglicémicas e hiperglicémicas de 2, 4 y 6 días debido a que estas contaban con más de 2 grupos, y finalmente agrupamos las ratas normoglicémicas de 2, 4 y 6 días, así como de las ratas hiperglicémicas de 2, 4 y 6 días para poder realizar el análisis de ANOVA de 2 vías y ver si existía interacción entre el estrés mecánico y la hiperglicemia.

5. RESULTADOS

Área de la laguna osteocitaria.

Los resultados obtenidos en esta investigación en cuanto al área de las lagunas osteocitarias del hueso alveolar arrojaron los siguientes datos:

- I) Normoglicémicas sin estrés mecánico mostraron una media de 46.88 +/- 7.68
- II) Hiperglicémicas sin estrés mecánico mostraron una media de 87.24 +/- 12.89
- III) Normoglicémicas con estrés mecánico de 2 días mostraron una media de 57.09 +/- 9.10
- IV) Normoglicémicas con estrés mecánico de 4 días mostraron una media de 64.28 +/- 6.40
- V) Normoglicémicas con estrés mecánico de 6 días mostraron una media de 55.77 +/- 8.43
- VI) Hiperglicémicas con estrés mecánico de 2 días mostraron una media de 86.20 +/- 15.33
- VII) Hiperglicémicas con estrés mecánico de 4 días mostraron una media de 86.12 +/- 13.21
- VIII) Hiperglicémicas con estrés mecánico de 6 días mostraron una media de 83.92 +/- 18.04

ANÁLISIS DE LAS MEDIAS DEL ÁREA DE LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DE RATAS NORMOGLICÉMICAS E HIPÉRGLICÉMICAS SIN ESTRÉS.

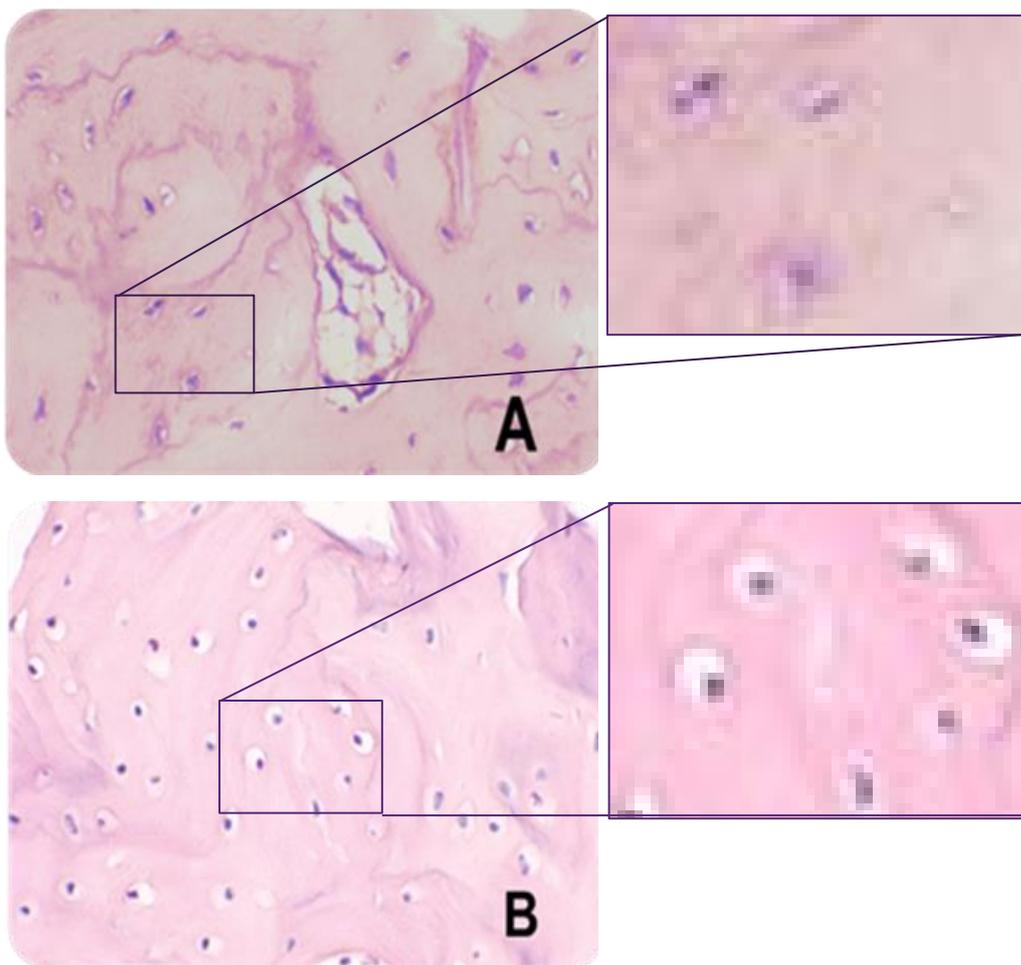
El tamaño de la laguna osteocitaria del hueso alveolar de ratas hiperglicémicas mostraron una media de 87.24 +/- 12.893 μm en comparación con las ratas normoglicémicas que mostraron una media de 46.88 +/- 7.68 μm (Cuadro 8).

Cuadro 8. Área de las lagunas osteocitarias de ratas sin estrés mecánico.

	Grupo	N	Media del área de la laguna osteocitaria (μm)	Desviación estándar
I)	Normoglicémicas sin estrés mecánico.	6	46.88	+/- 7.68
II)	Hiperglicémicas sin estrés mecánico.	6	87.24 *	+/- 12.89

*Diferencia Significativa t de student, $p < 0.01$

IMAGEN 8. LAGUNAS OSTEOCITARIAS DE HUESO ALVEOLAR DE RATAS NORMOGLICÉMICAS E HIPERGLICÉMICAS SIN ESTRÉS MECÁNICO.



Se observa corte de hueso alveolar de ratas: A) Ratas normoglicémicas con lagunas osteocitarias ovoides poco visibles, con núcleos osteocitarios grandes, B) Ratas hiperglicémicas con lagunas osteocitarias notablemente amplias y redondeadas, con núcleos osteocitarios picnóticos. Técnica H y E, ampliación 40x.

ANÁLISIS DE LAS MEDIAS DEL ÁREA DE LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DE RATAS NORMOGLICÉMICAS CON ESTRÉS DE 2, 4 Y 6 DÍAS.

Las áreas de las **lagunas osteocitarias** del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés, que fueron sometidas a estrés mecánico durante 2, 4 y 6 días, tuvieron una media 59.2 +/- 8.8 μm (Cuadro 9).

Cuadro 9. Area de las lagunas osteocitarias en ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 2, 4 y 6 días.

	Grupo	Estrés mecánico	N	Media del área de la laguna osteocitaria (μm)	Desviación estándar
III)	Normoglicémicas con estrés	2 Días	6	57.09	+/- 9.10
IV)	Normoglicémicas con estrés	4 Días	6	64.28	+/- 6.40
V)	Normoglicémicas con estrés	6 Días	6	55.77	+/- 8.43

ANOVA, p= 0.014

ANÁLISIS DE LAS MEDIAS DEL ÁREA DE LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DE RATAS HIPERGLICÉMICAS CON ESTRÉS MECÁNICO DE 2, 4 Y 6 DÍAS.

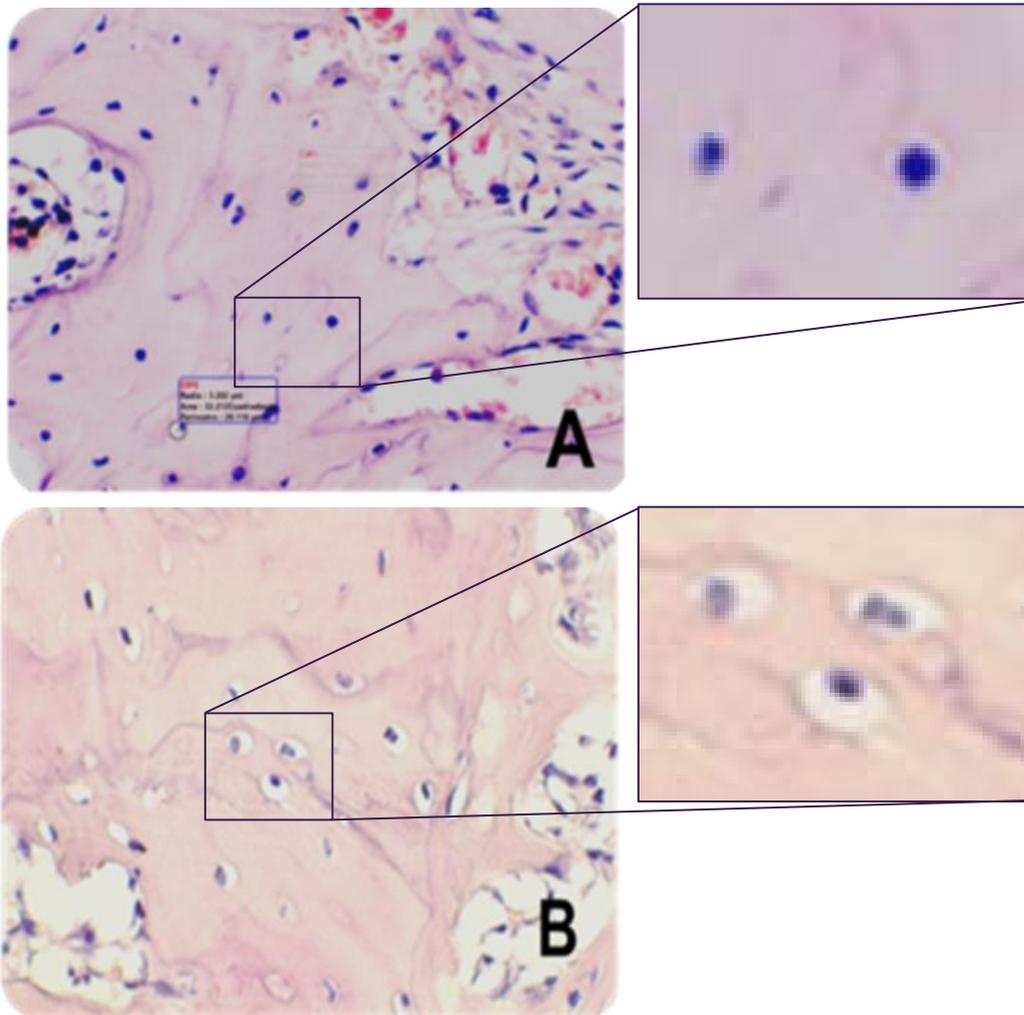
Áreas de las **lagunas osteocitarias** de hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés las cuales fueron sometidas a estrés mecánico durante 2, 4 y 6 días, que tuvieron una media 85.35 +/- 15.63 μm (Cuadro 10).

Cuadro 10. Area de la lagunas osteocitarias de ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 2, 4 y 6 días.

	Grupo	Estrés mecánico	N	Media del área de las lagunas osteocitarias (μm)	Desviación estandar
VI)	Hiperglicémicas con estrés	2 Días	6	86.20	+/- 15.33
VII)	Hiperglicémicas con estrés	4 Días	6	86.12	+/- 13.21
VIII)	Hiperglicémicas con estrés	6 Días	6	83.92	+/- 18.04

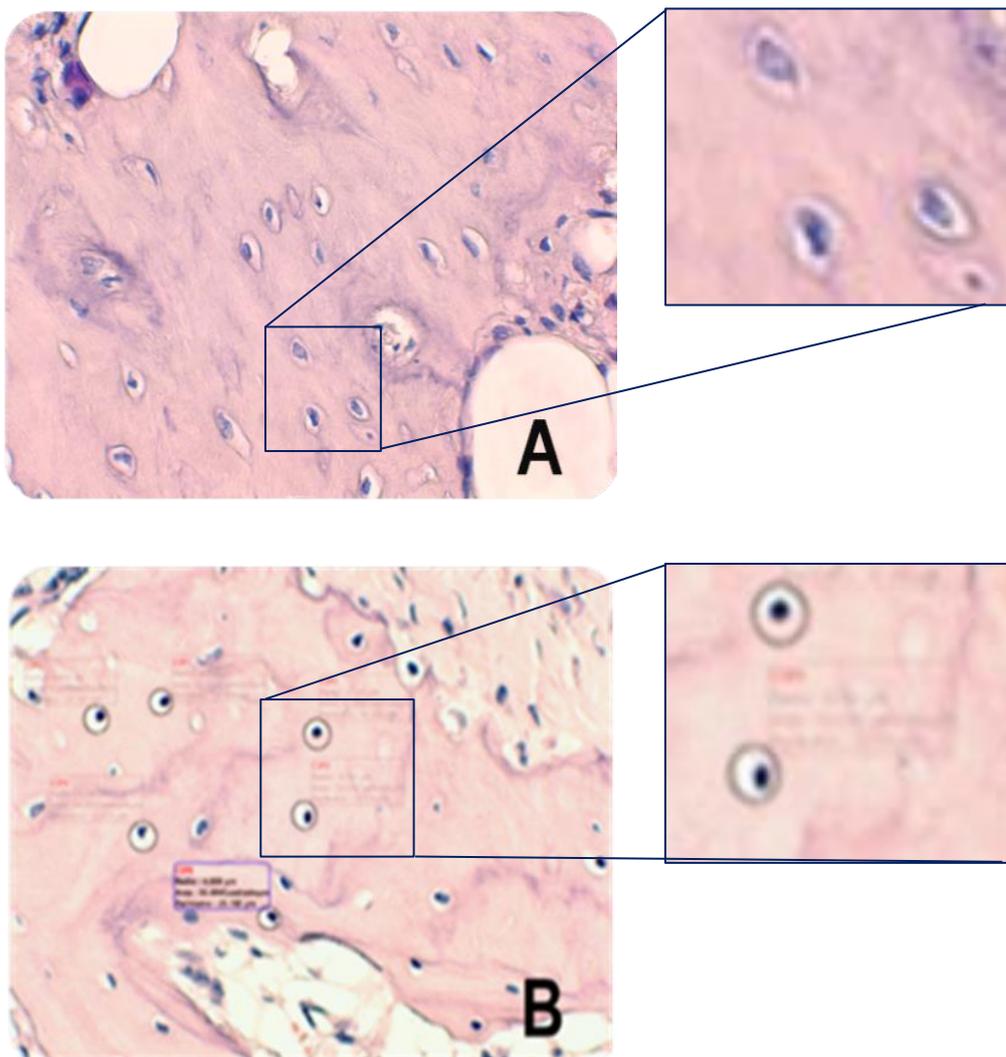
ANOVA , p= 0.852

IMAGEN 9. LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR DE RATAS CON ESTRÉS MECÁNICO DE 2 DÍAS.



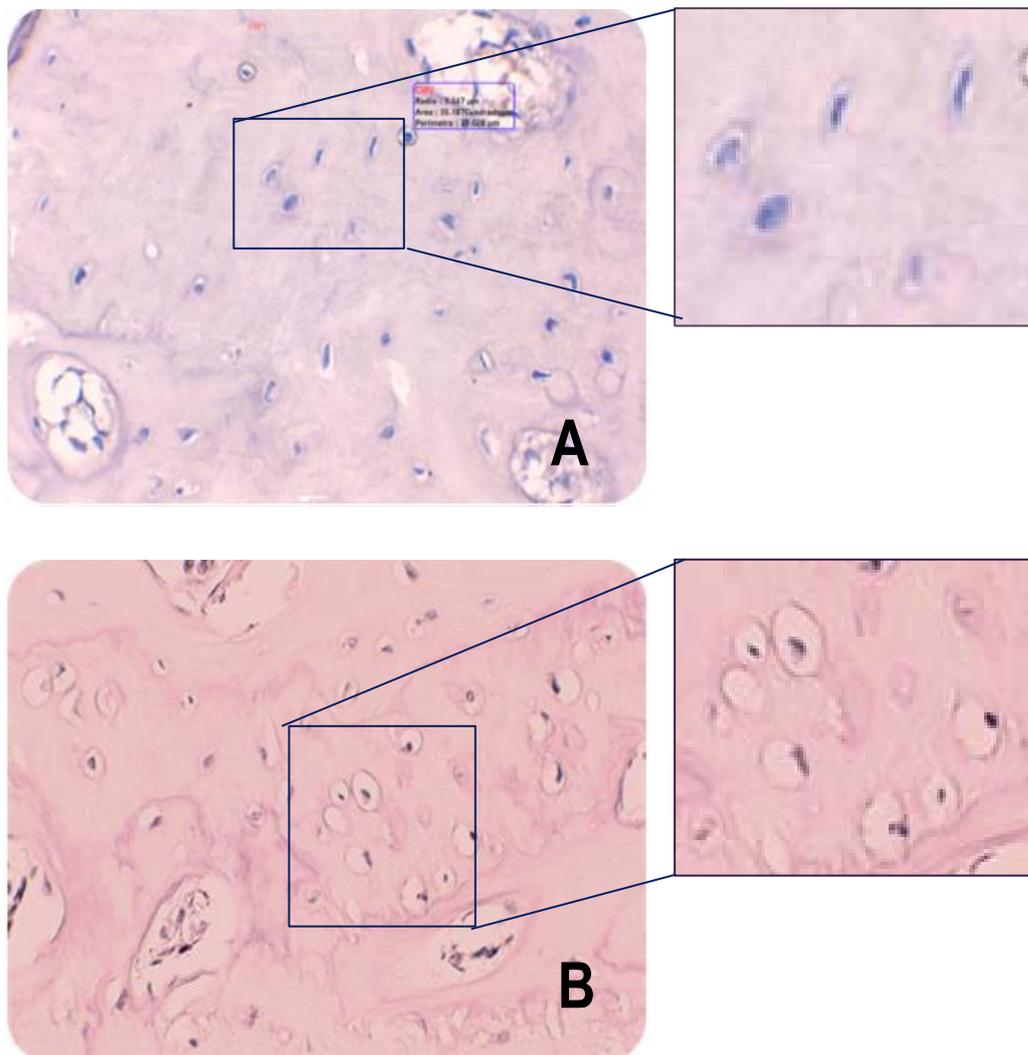
Cortes de hueso alveolar, que muestran el área de las lagunas osteocitarias así como de los núcleos osteocitarios: A) Ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 2 días, donde se observa la laguna osteocitaria de forma ovoide y el núcleo del osteocito grande. La relación del núcleo del osteocito y la laguna es de 25.6 %. B) Ratas hiperglicémica con estrés mecánico de 2 días donde se muestran las lagunas en forma redonda y los núcleos de los osteocitos picnóticos, la relación núcleo-laguna es de 9.6%. Tinción H y E (40X).

IMAGEN 10. LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR DE RATAS CON ESTRÉS MECÁNICO DE 4 DÍAS.



Cortes de hueso alveolar, que muestran el área de las lagunas osteocitarias así como los núcleos osteocitarios: A) Ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 4 días donde se observan las lagunas osteocitarias de forma oval y el núcleo del osteocito grande, La relación del núcleo del osteocito y la laguna es de 25.7%, B) Ratas hiperglicémica con estrés mecánico de 4 días donde se observan las lagunas osteocitarias en forma redonda, y los núcleos de los osteocitos se observan picnóticos, la relación núcleo-laguna es de 11.14%. Tinción H y E (40X).

IMAGEN 11. LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR DE RATAS CON ESTRÉS MECÁNICO DE 6 DÍAS.



Cortes de hueso alveolar, que muestran el área de las lagunas osteocitarias así como los núcleos osteocitarios: A) Ratas Normoglicémicas con estrés mecánico de 6 días donde se observan las lagunas osteocitarias de forma oval y el núcleo del osteocito grande, La relación del núcleo del osteocito y la laguna es de 25.7%, B) Ratas Hiperglicémica con estrés mecánico de 6 días donde se observan las lagunas osteocitarias en forma redonda, y los núcleos de los osteocitos se observan picnóticos, la relación núcleo-laguna es de 11.14%. Tinción H y E (40X).

Área de los núcleos osteocitarios.

El tamaño de los núcleos osteocitarios del hueso alveolar del grupo de ratas normoglicémicas sin estrés tuvieron una media de 12.79 +/- 3.94 μm , el tamaño de los núcleos osteocitarios de las ratas hiperglicémicas e hiperglicémicas con estrés mecánico tuvieron dimensiones menores y los núcleos osteocitarios de las ratas que fueron sometidas a estrés mecánico aumentaron de tamaño.

ANÁLISIS DE LAS MEDIAS DE LOS NÚCLEOS OSTEOCITARIOS DE RATAS NORMOGLICÉMICAS E HIPERGLICÉMICAS SIN ESTRÉS.

El área de los **núcleos osteocitarios** del hueso alveolar en los grupos de ratas normoglicémicas mostraron una media de 12.79 +/- 3.94 μm y en ratas hiperglicémicas mostraron una media de 10.54 +/- 2.72 μm (Cuadro 11).

Cuadro 11. Área de los núcleos osteocitarios del hueso alveolar en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas.

	Grupo	N	Media del área de los núcleos osteocitarios μm	Desviación estándar
I)	Normoglicémicas sin estrés mecánico.	6	12.79	+/- 3.94
II)	Hiperglicémicas sin estrés mecánico.	6	10.54 *	+/- 2.72

*Diferencia Significativa t de student, $p < 0.01$

ANÁLISIS DE LAS MEDIAS DE LOS NÚCLEOS OSTEOCITARIOS DE RATAS NORMOGLICÉMICAS CON ESTRÉS.

En el cuadro se muestran las áreas de los núcleos osteocitarios del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés las cuales fueron sometidas a estrés mecánico durante 2, 4 y 6 días, que tuvieron una media 15.64 +/- 3.64 μm (Cuadro 12).

Cuadro 12. Área de los núcleos osteocitarios de hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés.

	Grupo	Estrés mecánico	N	Media del área de los núcleos osteocitarios (μm)	Desviación estándar
III)	Normoglicémicas con estrés	2 Días	6	14.66	+/- 3.15
IV)	Normoglicémicas con estrés	4 Días	6	16.54	+/- 3.98
V)	Normoglicémicas con estrés	6 Días	6	15.91	+/- 3.55

(ANOVA, p=0.226)

ANÁLISIS DE LAS MEDIAS DE LOS NÚCLEOS OSTEOCITARIOS DE RATAS HIPERGLICÉMICAS CON ESTRÉS.

En el cuadro se muestran las áreas de los **núcleos osteocitarios** del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés las cuales fueron sometidas a estrés mecánico de 2, 4 y 6 días, que tuvieron una media 8.68 +/- 2.77 μm (Cuadro 13).

Cuadro 13. Área de los núcleos osteocitarios de hueso alveolar de ratas hiperglicémicas con estrés mecánico.

	Grupo	Estrés mecánico	N	Media del área de los núcleos osteocitarios (μm)	Desviación estándar
VI)	Hiperglicémicas con estrés	2 Días	6	8.34	+/- 3.30
VII)	Hiperglicémicas con estrés	4 Días	6	9.66	+/- 2.71
VIII)	Hiperglicémicas con estrés	6 Días	6	8.23	+/-2.09

(ANOVA, p=0.174)

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERGLICÉMIA Y/O ESTRÉS EN LA DIMENSIÓN DE LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS.

La prueba de ANOVA de dos vías muestra que la condición de la hiperglicemia ($p > 0.001$) y el estrés mecánico ($p > 0.05$) afectan de manera significativa el tamaño de la laguna osteocitaria, también la interacción de las dos variables, modifica el área de la laguna osteocitaria de manera significativa ($p = 0.001$). (Véase anexos).

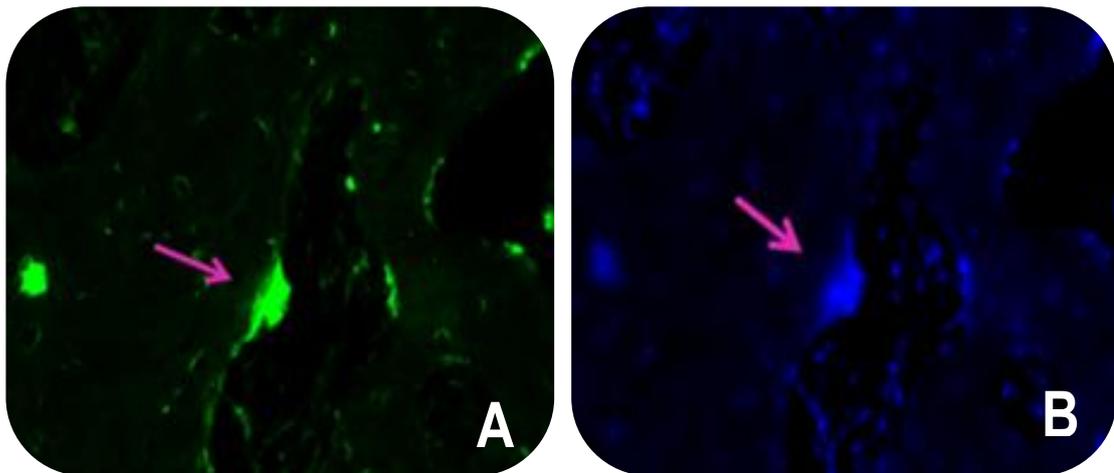
ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA HIPERGLICÉMIA Y/O ESTRÉS EN LA DIMENSIÓN EN LOS NÚCLEOS OSTEOCITARIOS.

La prueba de ANOVA de dos vías muestra que la hiperglicemia ($p > 0.001$) modifica el área del núcleo del osteocito y el estrés mecánico ($p > 0.05$) no afecta de manera significativa el tamaño del núcleo del osteocito, aunque la interacción, estrés e hiperglicemia si es si modifican el tamaño del núcleo del osteocito de manera significativa ($p > 0.001$). (Véase anexos).

5.2. INMUNOLocalIZACIÓN DE CATEPSINA K Y OSTEOCALCINA EN LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR.

CATEPSINA K

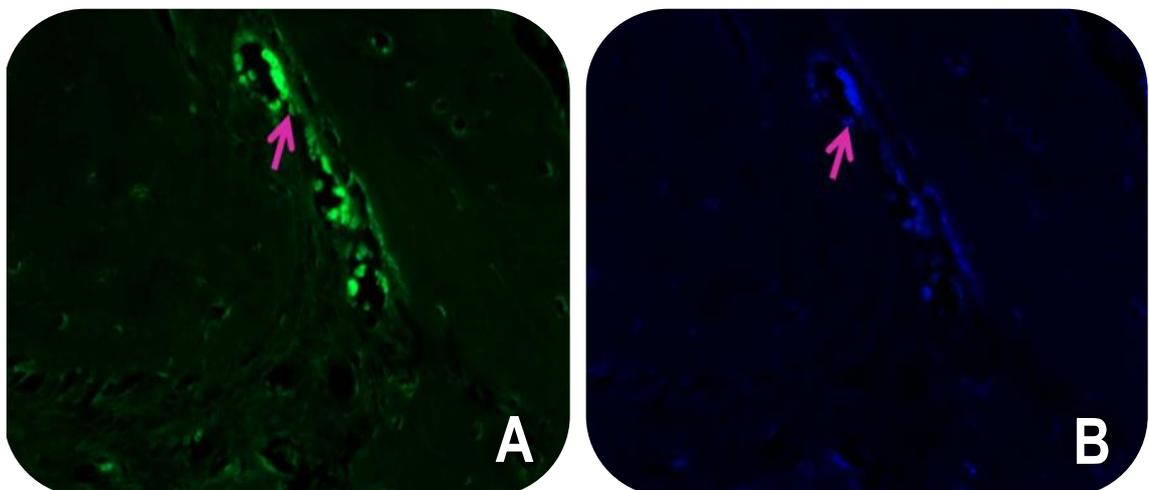
IMAGEN 12. Se observan osteoclasto positivo a catepsina K, dapi marca los núcleos



Corte de hueso alveolar de ratas, teñidas mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se observa: anticatapsina K- FITC (verde) y DAPI (azul), Aumento 40x.

OSTEOCALCINA

IMAGEN 13. Se observan osteoblastos positivos a osteocalcina, los núcleos teñidos con Dapi.



Corte de hueso alveolar de ratas, teñidas mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se observa: antiosteocalcina – FITC(verde) DAPI (azul), Aumento 40x.

INMUNOLocalIZACIÓN DE CATEPSINA K EN LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR.

Cuadro 14. Al microscopio de fluorescencia, se observó la inmunolocalización positiva y negativa de catepsina K en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar, en los diferentes grupos de ratas.

MARCAJE POSITIVO

hiperglicémicas sin estrés mecánico
hiperglicémicas con estrés mecánico de 2 días
hiperglicémicas con estrés mecánico de 2 días
hiperglicémicas con estrés mecánico de 2 días
normoglicémicas con estrés mecánico de 2 días

MARCAJE NEGATIVO

normoglicémicas sin estrés mecánico
normoglicémicas con estrés mecánico de 4 días
normoglicémicas con estrés mecánico de 6 días

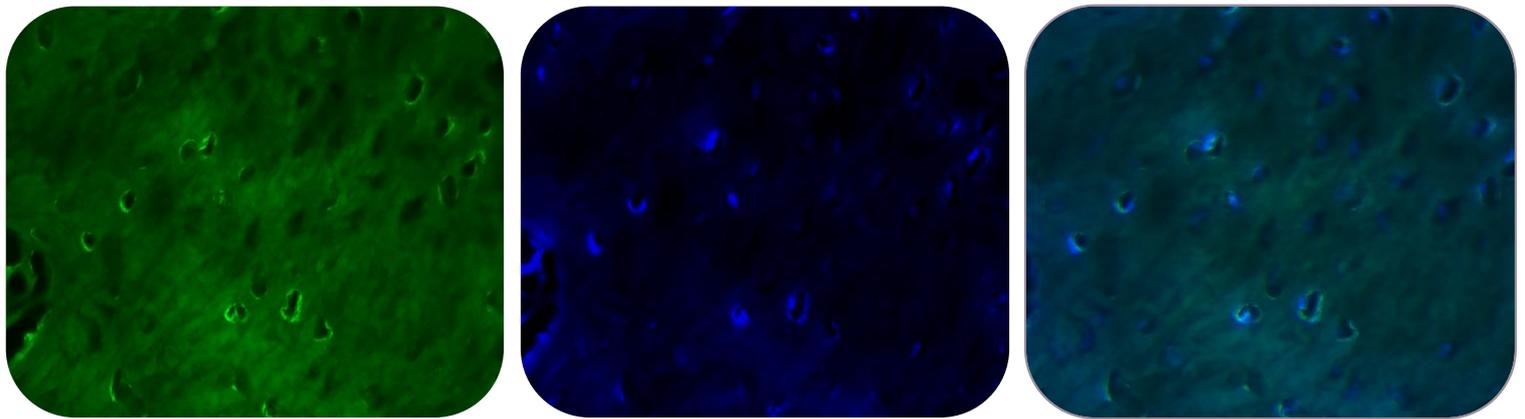


IMAGEN 14. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas sin estrés mecánico para catepsina K, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

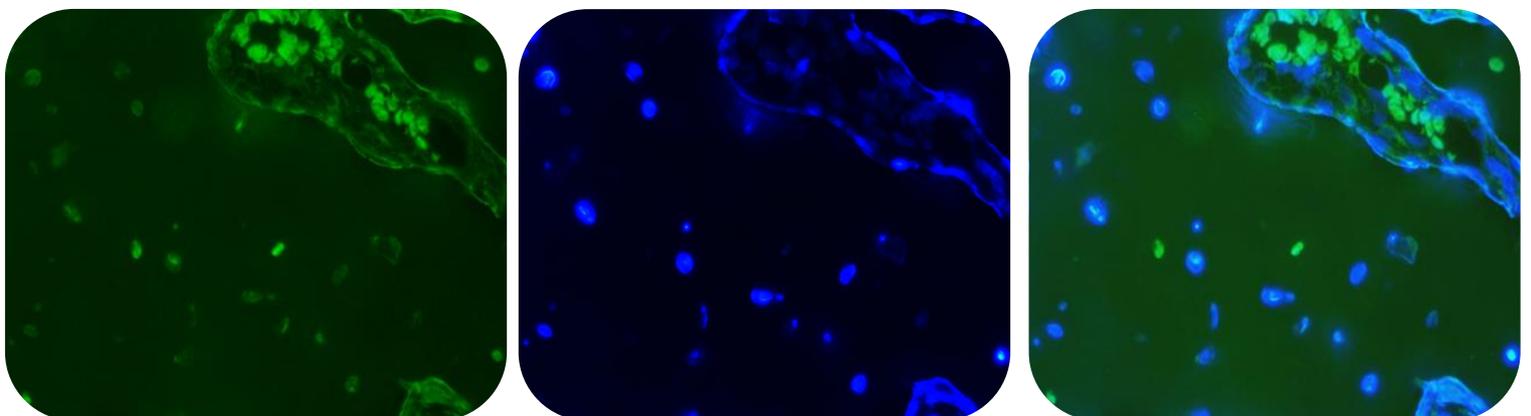


IMAGEN 15. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 2 días positivos para catepsina K, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

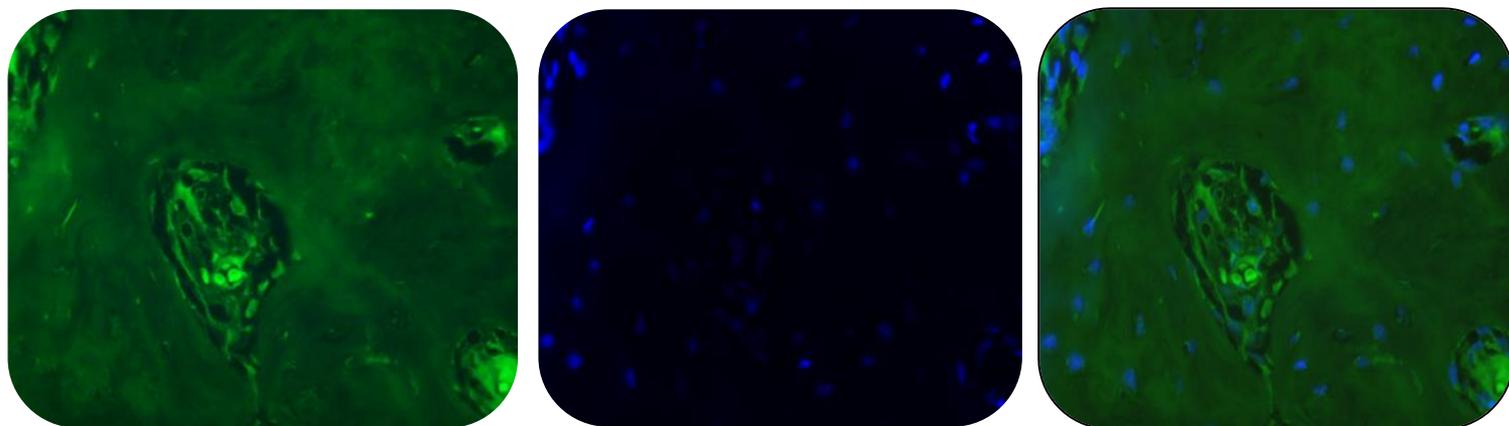


IMAGEN 16. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 4 días positivos para catepsina K, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

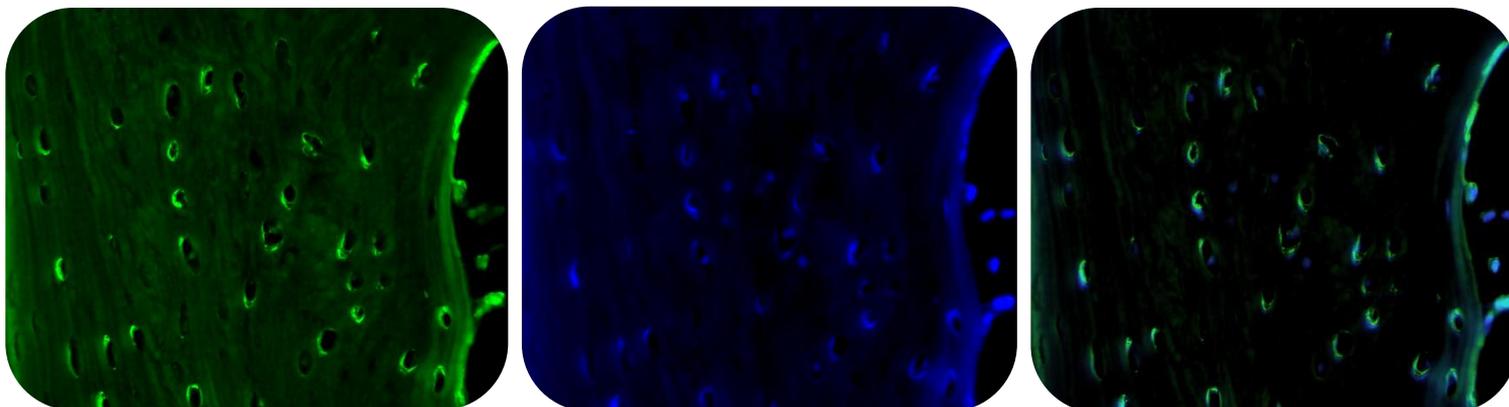


IMAGEN 17. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 6 días para catepsina k, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

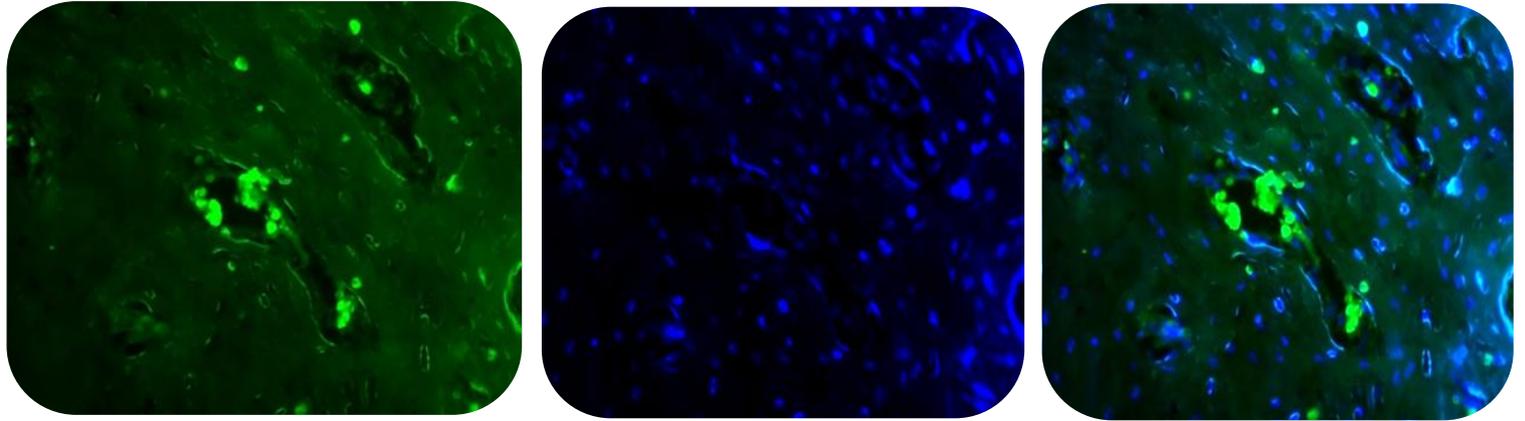


IMAGEN 18. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 6 días positivos para catepsina K, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

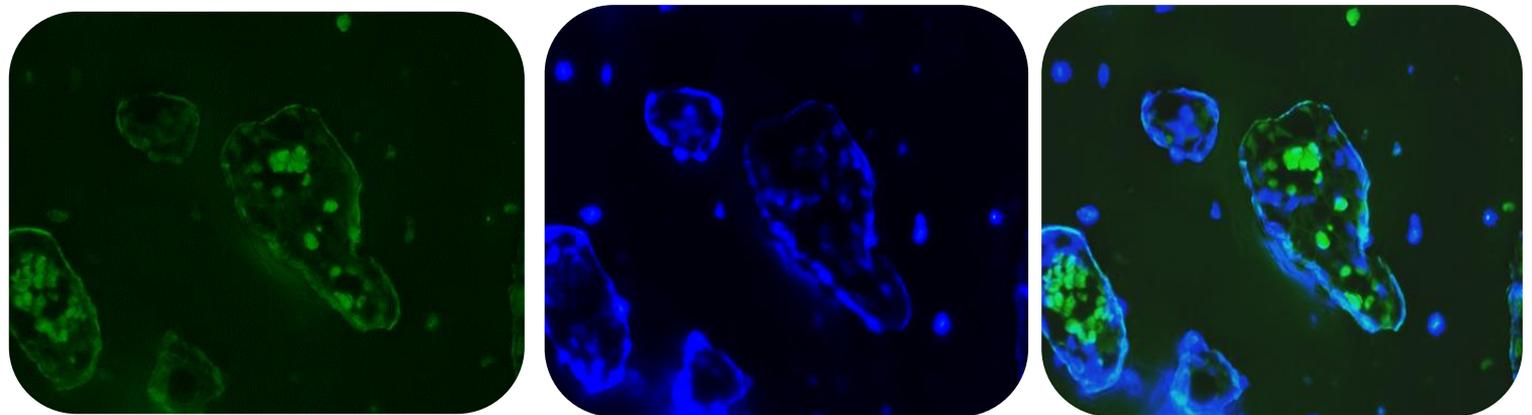


IMAGEN 19. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 2 días para catepsina K, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

INMUNOLocalIZACIÓN NEGATIVA DE CATEPSINA K EN LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR.

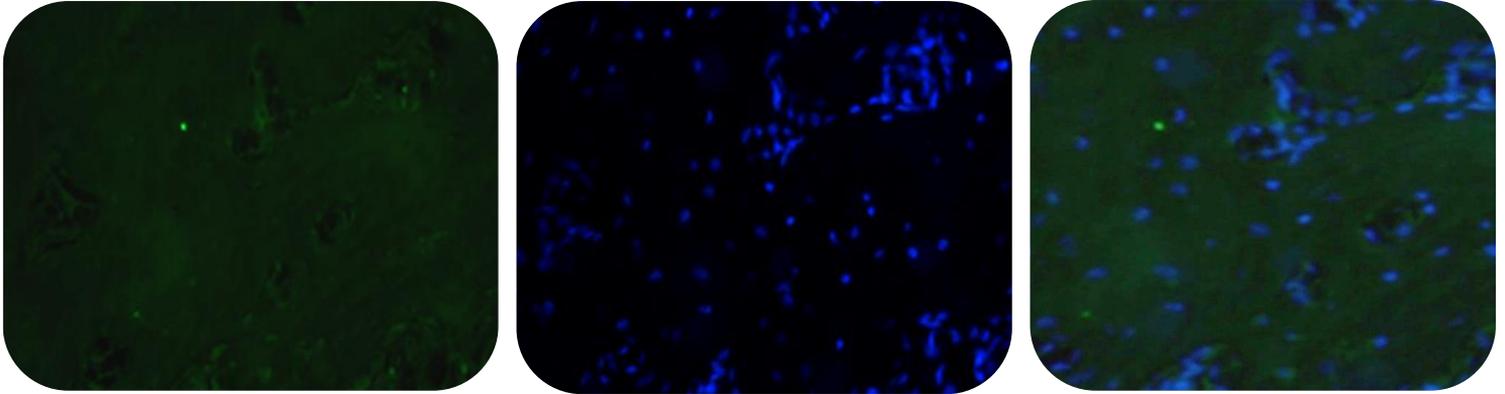


IMAGEN 20. Inmunolocalización negativa en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas sin estrés mecánico para catepsina K, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

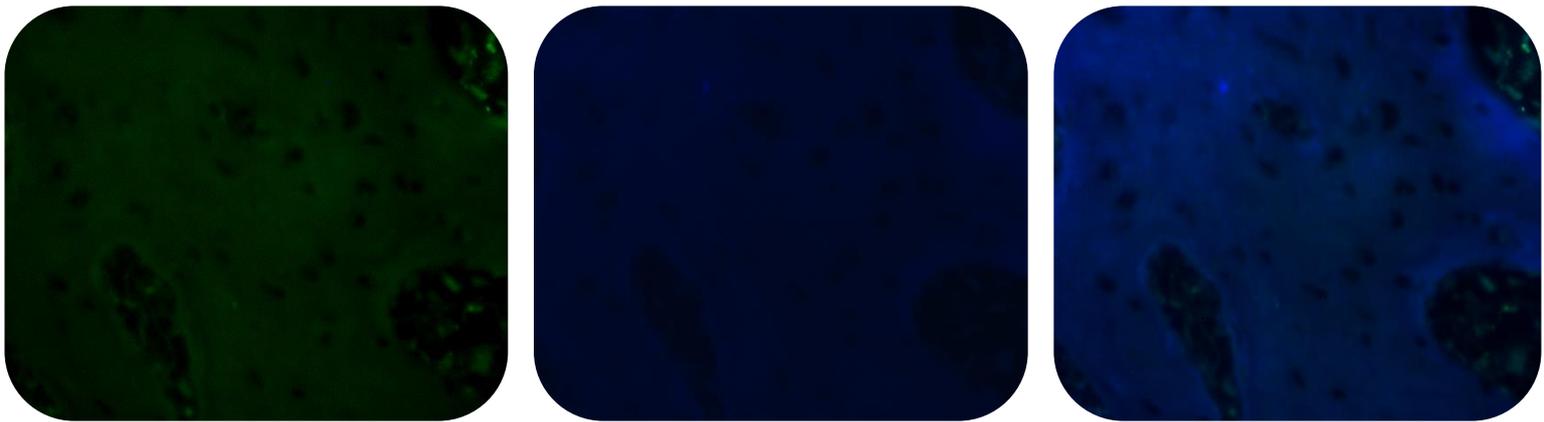


IMAGEN 21. Inmunolocalización negativa en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 4 días para catepsina k, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

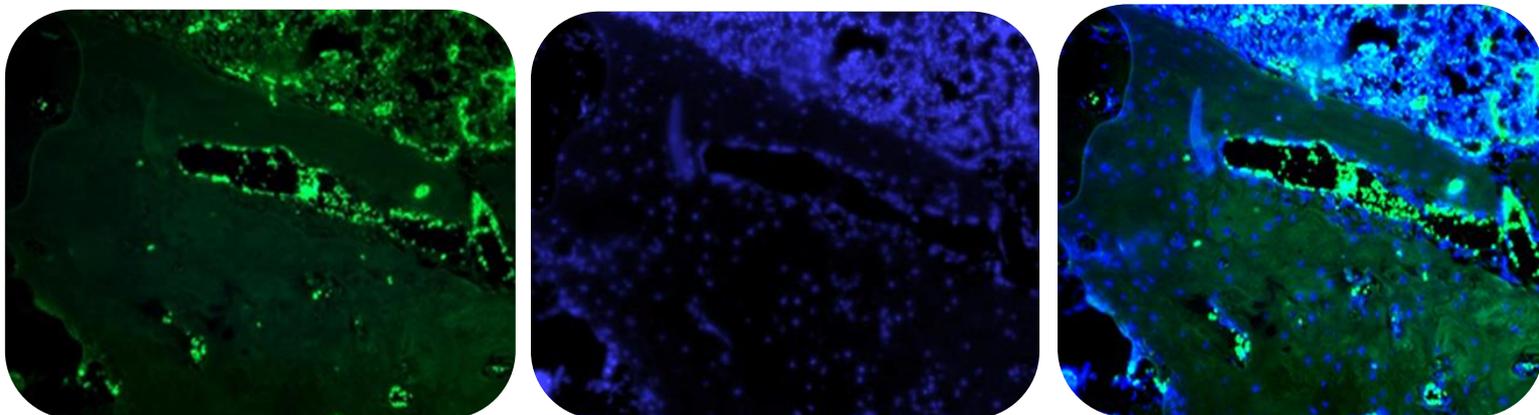


IMAGEN 22. Inmunolocalización negativa en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 6 días para catepsina K marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

INMUNOLocalIZACIÓN DE OSTEOCALCINA EN LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR.

Cuadro 15. Al microscopio de fluorescencia, se observó marcaje positivo y negativo para osteocalcina en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar, en los diferentes grupos de ratas.

MARCAJE POSITIVO

Hiperglicémicas sin estrés mecánico
Hiperglicémicas con estrés mecánico 2 días
Hiperglicémicas con estrés mecánico 4 días
Hiperglicémicas con estrés mecánico 6 días

MARCAJE NEGATIVO

Normoglicémicas sin estrés mecánico
Normoglicémicas con estrés mecánico de 2 días
Normoglicémicas con estrés mecánico de 4 días
Normoglicémicas con estrés mecánico de 6 días

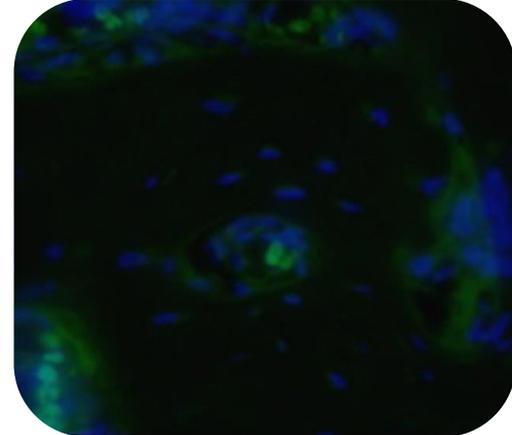
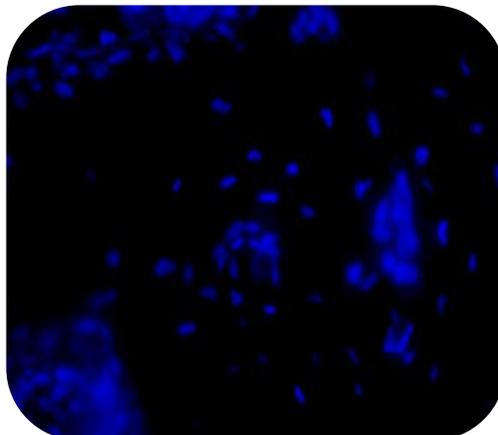
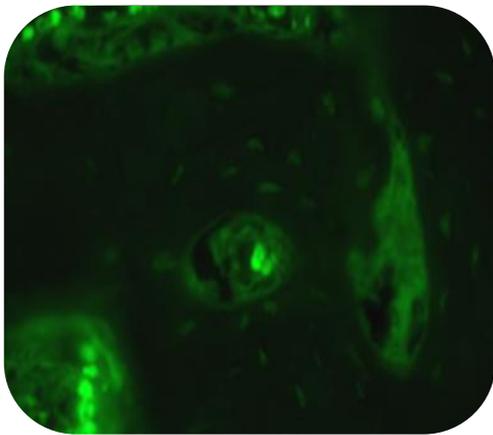


IMAGEN 23. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas sin estrés mecánico para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

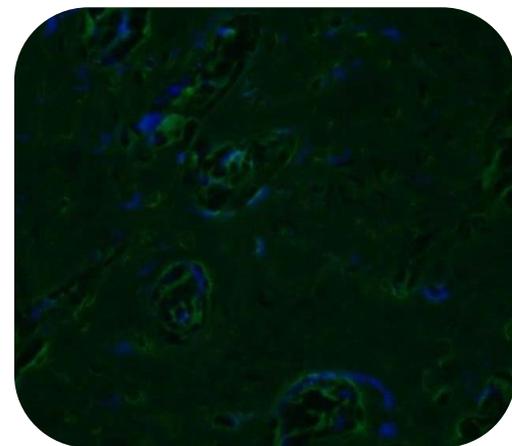
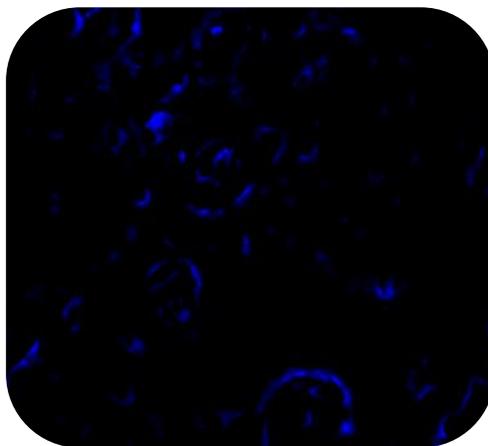
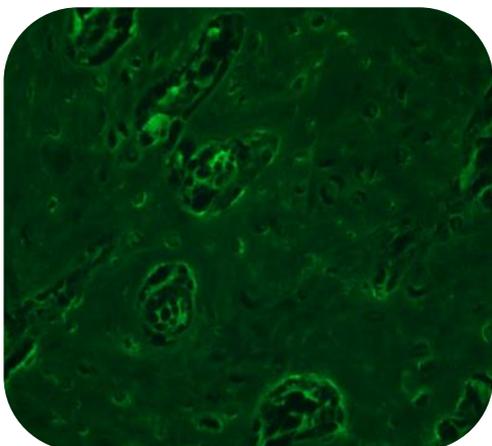


IMAGEN 24. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 4 días para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

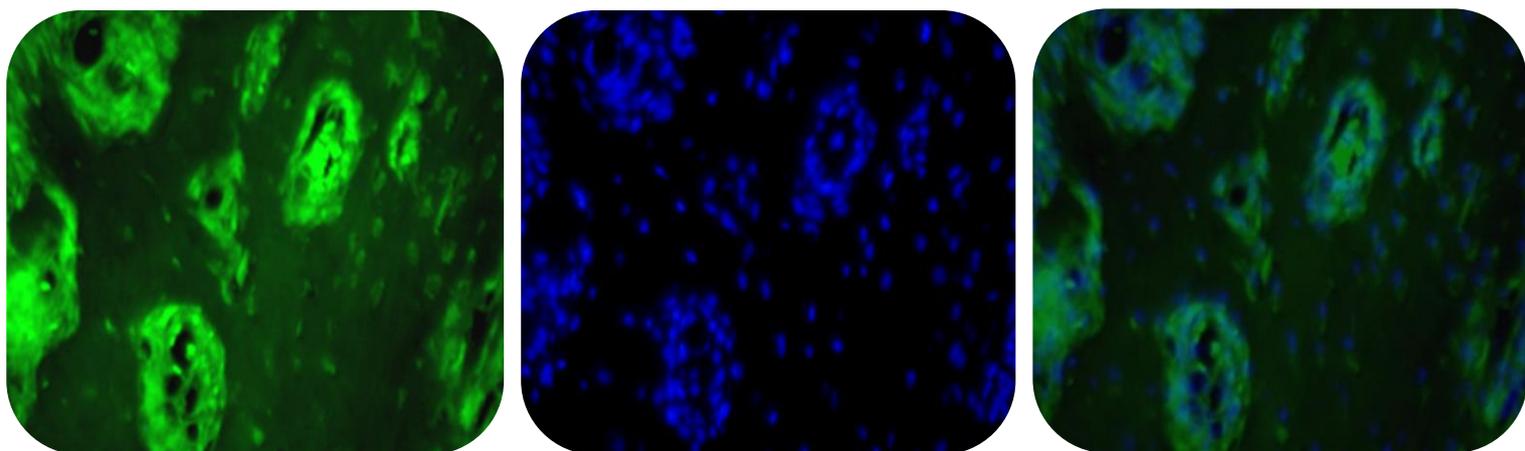


IMAGEN 25. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 4 días para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

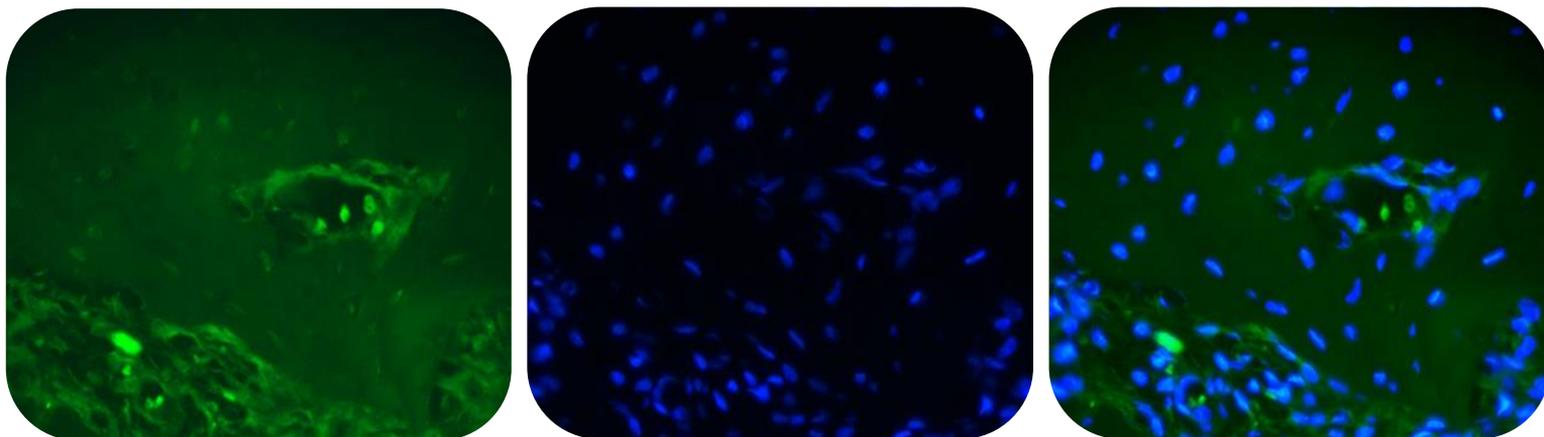


IMAGEN 26. Inmunolocalización positiva en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas hiperglicémicas con estrés mecánico de 6 días para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge (combinación de ambos). Ampliación 40x.

INMUNOLocalIZACIÓN NEGATIVA PARA OSTEOCALCINA EN LAS LAGUNAS OSTEOCITARIAS DEL HUESO ALVEOLAR.

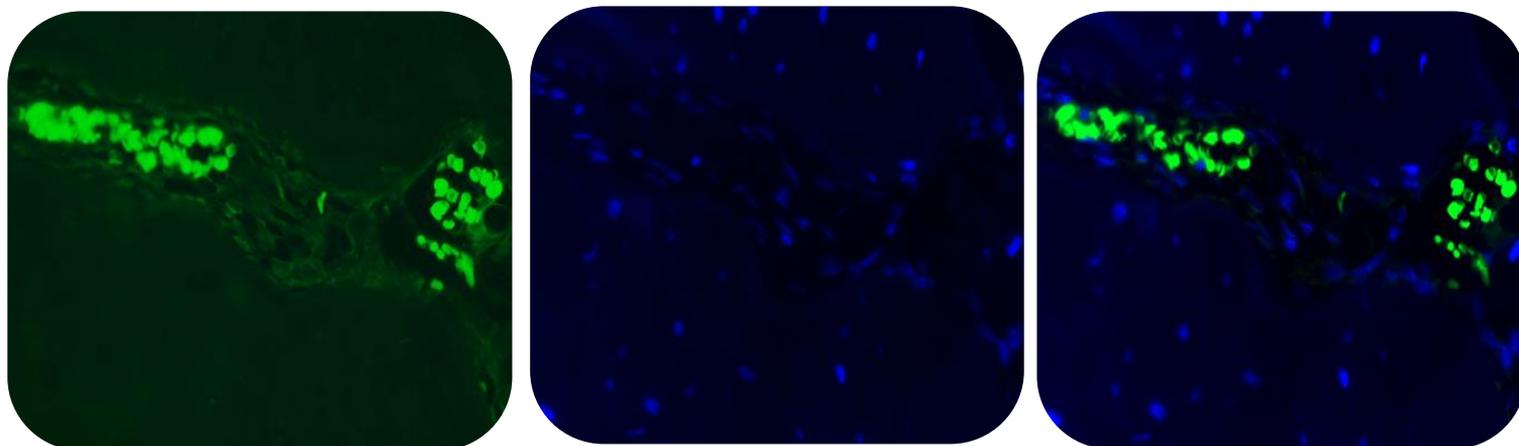


IMAGEN 27. Inmunolocalización negativa en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas sin estrés mecánico para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

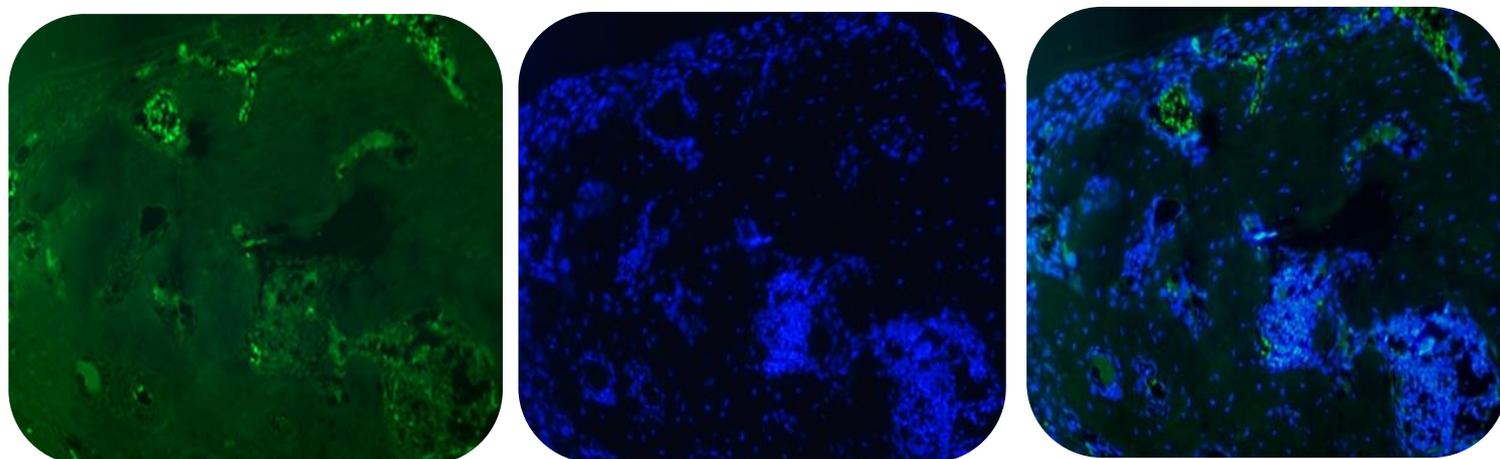


IMAGEN 28. Inmunolocalización negativa en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 2 días para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

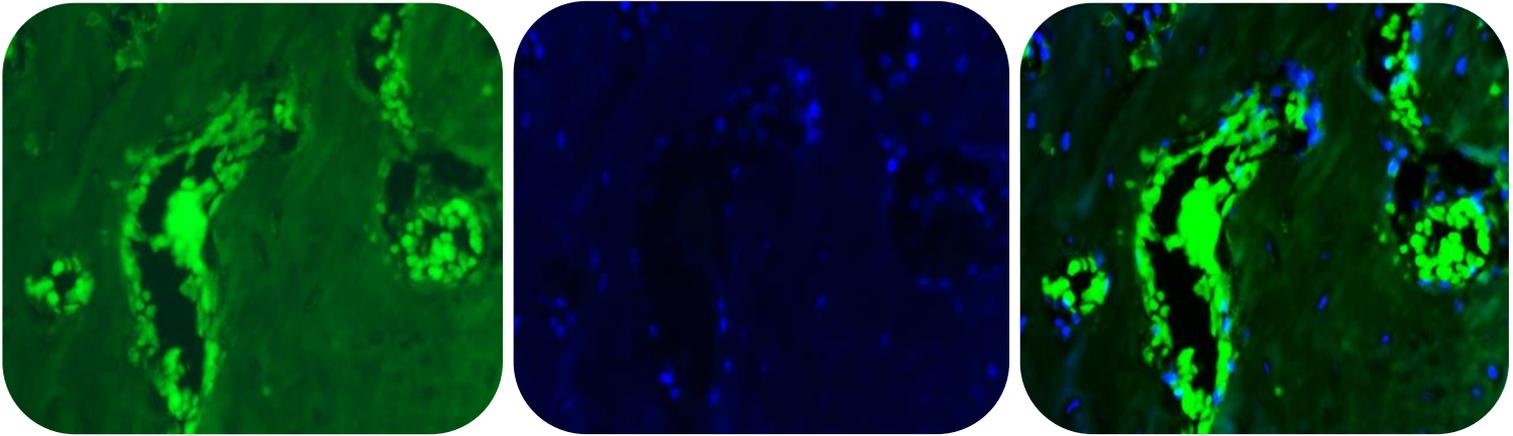


IMAGEN 29. Inmunolocalización negativa en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 4 días para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

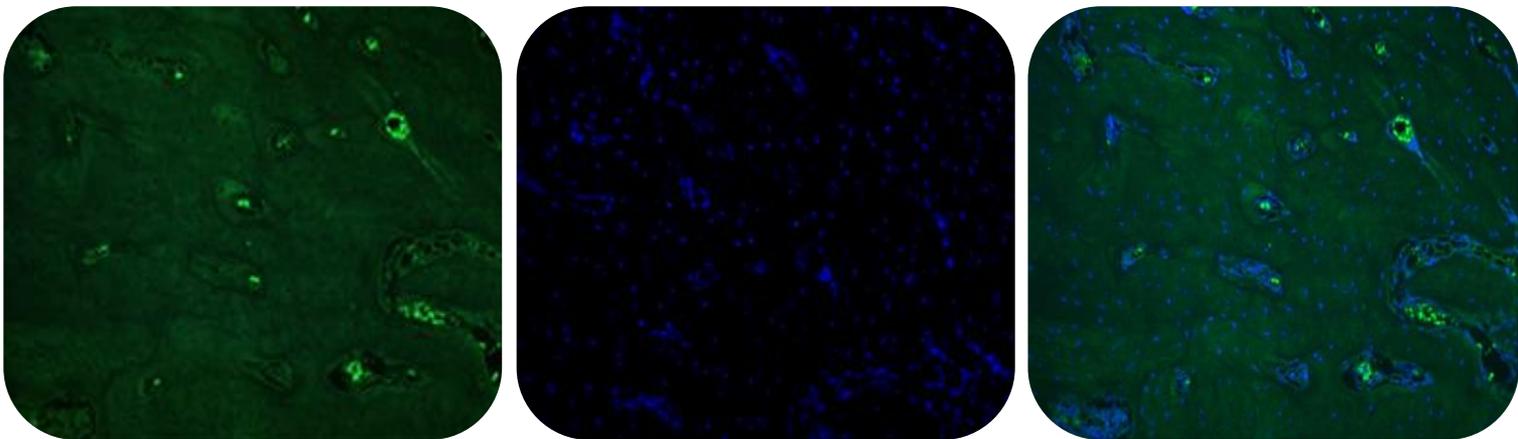


IMAGEN 30. Inmunolocalización negativa en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas normoglicémicas con estrés mecánico de 6 días para osteocalcina, marcando fitc (verde), dapi (azul) positivo para los núcleos y merge. Ampliación 40x.

6. DISCUSIÓN

Tradicionalmente la actividad del tejido óseo ha sido estudiada tomando en cuenta la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos, sin embargo la célula que constituye la población más numerosa del tejido óseo es el osteocito, por lo que los cambios metabólicos que sufra pueden tener más impacto en los procesos de remodelación y participación en la regulación de los iones de calcio y fosfato, así como participar en el metabolismo energético.

La relativa inaccesibilidad a los osteocitos en la matriz mineralizada que presentado un reto para su estudio y ha obstaculizado el avance científico. Hoy en día existe un renovado interés en entender la biología de estas células que ha dado un impulso para el desarrollo de nuevas estrategias para observarlas en su medio natural (Knothe Tate, 2004).

El modelo que utilizamos en esta tesis para valorar el efecto de la diabetes y el estrés mecánico en el hueso alveolar que rodea a los molares maxilares nos permitió registrar los cambios que ocurren en la población de osteocitos.

Por otro lado, el modelo que empleamos en la inducción de diabetes a partir de la administración de estreptozotocina por vía intraperitoneal produjo de manera confiable niveles elevados de glucosa en sangre en los animales de experimentación reproduciendo las características de la diabetes tipo I (Chatzigeorgiou et al, 2009). Los niveles de glucemia a las 48 horas posteriores a la administración alcanzaron niveles en promedio de 517.2 mg/dL en comparación con los animales normoglicémicos que en promedio tuvieron 97.4 mg/dL.

Las condiciones que modificamos para producir cambios en las características de los osteocitos, la hiperglucemia asociada a la diabetes mellitus, así como el estrés mecánico que se asocia al movimiento ortodóncico, indujeron cambios en el tamaño de la laguna osteocitaria y el núcleo de los osteocitos.

El agrandamiento de las lagunas osteocitarias ha sido reportado ya en diferentes condiciones, como en pacientes con osteodistrofia renal (Bonucci et al, 1975), en ratas enviadas al espacio (Iagodovskii et al, 1977), en el hueso alveolar de ardillas de Richardson después de la hibernación (Haller et al, 1977) y en ratones tratados con prednisona (Lane et al, 2006).

En nuestro estudio, los osteocitos de los animales testigos poseen núcleos grandes que ocupan el 26.65% de la laguna osteocitaria, que a su vez tienen un tamaño promedio de $47 \pm 7.69 \mu\text{m}$ mientras que el modelo con diabetes los osteocitos posee núcleos en promedio más pequeños que ocupan 11.49% de la laguna osteocitaria, que a su vez tiene un tamaño de $87 \pm 12.9 \mu\text{m}$. Las lagunas osteocitarias de los grupos sometidos a estrés mecánico de ratas normoglicémicas poseen núcleos grandes que ocupan el 25.7% de la laguna osteocitaria, y que presentaron una media de $64.28 \pm 6.4 \mu\text{m}$, y el grupo de ratas hiperglicémicas sometidas a estrés mecánico de 4 días poseen núcleos grandes que ocupan el 11.14% de la laguna osteocitaria, con una media de $86.1 \pm 13.2 \mu\text{m}$ en tamaño.

Los datos que obtuvimos están en el rango de las mediciones reportadas por Qing y colaboradores en 2012, en su estudio ellos miden la laguna osteocitaria en hueso vertical cortical, de ratas vírgenes y reportaron que la laguna mide $24.6 \mu\text{m}$, mientras que en las ratas que amamantan observaron un aumento que reportaron que llega a ser de $91.1 \pm 13.9 \mu\text{m}$ en tamaño.

Dallas y colaboradores en el 2013, (Dallas et al, 2013) reportaron que el cuerpo celular de un osteocito que está encerrado dentro de una laguna que mide de 15 a 20 micras de diámetro, y que los procesos de las células pasan a través de la matriz ósea a través de los canalículos, miden aproximadamente 250 a 300 nm de diámetro.

Nuestros datos demuestran que las lagunas osteocitarias del hueso alveolar se ven aumentadas durante la hiperglucemia, coincidiendo así con el estudio de Villarino y colaboradores en 2006, (Villarino et al, 2006), que reportaron que las lagunas osteocitarias del grupo testigo (normoglicémicas) midieron 58 μm en promedio, y las lagunas de las ratas diabéticas midieron 62 μm , y que después del tratamiento con insulina disminuyeron a 44 μm .

El modelo de estrés mecánico de Igarashi en 1998, (Igarashi et al, en 1998), induce efectivamente la formación de osteoclastos y además, produce cambios en las poblaciones celulares que conforman el periodonto de los molares de la rata incluyendo a los osteocitos del hueso alveolar. La ventaja de utilizar el resorte en U de níquel titanio de 0.012 pulgadas es que no producimos hialinización en el ligamento periodontal (necrosis aséptica) ya que la fuerza se distribuye a otras estructuras como es la sutura palatina (Cova, 2008).

Nuestros resultados no coinciden con los reportados por Villarino y colaboradores (Villarino et al, 2011), ya que este autor reportó una disminución de las áreas de erosión en osteocitos cuando se comparan a las ratas diabéticas con las ratas testigo, aunque el tiempo en el que aplicó el estrés ortodóncico es diferente, ya que ellos lo realizaron a las seis semanas posteriores a la inducción de la diabetes con estreptozotocina, en cambio en nuestro estudio se colocó el resorte en "U" 8 días después de la detección de la hiperglucemia, por lo que los resultados que reportamos son los correspondientes a el efecto inicial de la diabetes.

En nuestro estudio, el diámetro de las lagunas osteocitarias fue mayor en el grupo de ratas diabetizadas sin estrés mecánico en comparación con las ratas normoglicémicas.

Evidencias actuales sugieren que los osteocitos son claves en la coordinación de la formación y la resorción óseas y en el micro daño como el inducido en nuestro modelo, donde el estrés mecánico estimuló la función de los osteocitos para inducir la diferenciación osteoclástica (Matsumoto et al, 2013). Los osteocitos del hueso alveolar responden a la carga mecánica expresando factores de crecimiento como el Factor de crecimiento del tejido conectivo CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo) (Yamashiro et al, 2001), y regulan la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos durante la remodelación inducida por carga mecánica. Fujihara en sus estudios (Fujihara et al, 2006) detectó la presencia de osteocitos positivos a osteopontina después de aplicar estrés mecánico. Robling y colaboradores en 2008 (Robling et al, 2008), observaron que la carga mecánica disminuye la expresión de esclerostina en los osteocitos estimulando la osteogénesis.

El aumento en el diámetro de las lagunas osteocitarias implica la remodelación de la matriz perilacunar y puede ser atribuido a la actividad de enzimas involucradas en la resorción ósea en los osteocitos como la fosfatasa ácida y la catepsina K, como fue reportado en ratas en condiciones de lactación por Qing y colaboradores en 2010 (Qing et al, 2010).

Está demostrado que los osteocitos juegan un papel esencial durante el remodelado óseo. Algunas proteínas que inducen resorción ósea como TRAP y catepsina k son capaces de inducir actividad de los osteoclastos y la posterior actividad de reabsorción ósea (Fukumoto, 2009).

La osteocalcina se localiza principalmente en la matriz ósea y cantidades pequeñas que se detectan en la sangre por lo que su concentración en el plasma se consideran marcadores de formación ósea (Delmas et al, 2000).

Se ha postulado que la función de la osteocalcina es inhibir la mineralización (Ducy et al, 2006), probablemente para prevenir que el osteocito quede completamente embebido en la matriz mineralizada (Kavukcuoglu et al, 2009). Esta proteína también puede estar sobre expresada en los animales diabéticos y conducir al aumento de tamaño en las lagunas osteocitarias (Fukumoto, 2009).

En nuestro estudio el grupo de ratas diabéticas se observó una expresión incrementada de osteocalcina en las lagunas osteocitarias, mientras que en las ratas normoglicémicas sin o con estrés mecánico no hubo expresión.

Motyl y colaboradores en 2009 (Motyl et al, 2009), reportaron que altas dosis de STZ, además de provocar una rápida elevación de los niveles de glucosa en sangre también indujo un aumento en la expresión de catepsina K, así como una disminución del volumen óseo y la aposición mineral, y disminución en la expresión de osteocalcina.

A diferencia del hueso alveolar de otros sitios del cuerpo, el hueso alveolar tiene un patrón único de la remodelación continua que pueden responder en mayor medida a los efectos de la tensión mecánica. Por lo tanto, se podría suponer que con el fin de mantener la integridad del diente, la tensión mecánica aún podría participar en la formación de hueso de la pared alveolar, incluso en el metabolismo mineral de los huesos en el estado diabético (Mishima, 2002).

7. CONCLUSIONES

En nuestro modelo, la hiperglucemia induce a un aumento importante en el tamaño de las lagunas osteocitarias, así como una disminución en el tamaño del núcleo de los osteocitos.

El estrés mecánico induce un aumento del tamaño de las lagunas osteocitarias y a un aumento no significativo del tamaño del núcleo del osteocito.

La catepsina K no se expresa en la laguna osteocitaria del hueso alveolar interradicular de las ratas normoglicémicas sin estrés mecánico, y en cambio, si se expresa en todos los grupos de ratas hiperglicémicas con o sin estrés mecánico y en el grupo de ratas normoglicémicas con estrés de 2 días.

La osteocalcina no se expresó en la laguna osteocitaria del hueso alveolar interradicular de todos los grupos normoglicémicos (con y sin estrés), mientras que en los grupos de ratas hiperglicémicas se expresó fuertemente en la laguna osteocitaria del hueso alveolar interradicular.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocyte in bone. *J Cell Biochem.* 1994 Jul; 55(3):287-99.
- Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Meyer MB, Pike JW, Christakos S. Evidence for role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D (3) 1alpha hydroxylase gene by prolactin. *Endocrinology.* 2010 Jul; 151(7):2974-84.
- Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita L, Murota S, Nagata N, Takatani O, Suda T. Prostaglandins promote osteoclast like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5' monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Miner Res.* 1989 Feb; 4(1):29-35.
- Alhashimi N, Lars F, Pongsri B, Moiz B. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines, *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 Mar; 119(3):307-12.
- Anaya JM, Remodelado óseo Osteoporosis y artritis reumatoidea, *Acta Médica Colombiana*; Vol. 18 N° 6 - Noviembre-Diciembre, 1993.
- Bedoya F, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets, 1996 Apr 15; 52(4):344-7.
- Belanger L F. Osteocytic Osteolysis, *Calc. Tis Res.* (1969) 4: 1.
- Bettica P, Taylor AK, Talbot J, Moro L, Talamini R, Baylink DJ. Clinical performances of galactosyl hydroxylysine, pyridinoline, and deoxypyridinoline in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Feb; 81(2):542-6.
- Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci.* 1991 May ;99 (Pt 1):131-9.
- Bolaffi JL, Nagamatsus S, Harris J, Grodsky GM. Protection by thymidine, an inhibitor of polyadenosine diphosphate ribosylation, of streptozotocin inhibition of insulin secretion. *Endocrinology.* 1987 May; 120(5):2117-22.
- Bonewald LF. Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab.* 2007 Jun; 5(6):410-1.
- Bonucci E, Gherardi G, Mioni G. Clinico-morphological correlations in uremic osteodystrophy of patients with conservative and hemodialytic treatment with special regard to the ultrastructure. *Minerva Nefrol.* 1975 Mar-Jun ; 22(2-3):99-108.
- Bonivitch AR, Bonewald LF, Nicolella DP. Tissue strain amplification at the osteocyte lacuna: a microstructural finite element analysis. *J Biomech.* 2007; 40(10):2199-206.
- Botero JE, Bedoya E. Determinantes del Diagnóstico Periodontal, *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 3(2); 94-99, 2010.
- Bozal CB, Fiol JA, Ubios AM. Early osteocyte response to bone resorption stimuli. *Acta Odont Latinoamer, Acta Odontol Latinoam.* 2001; 14(1-2):24-9.

- Bozal C, Luciana M, Sánchez, Ángela M, Ubios. The Lacuno-Canalicular System (ICS) and osteocyte network of alveolar bone by confocal laser scanning microscopy (clsm), *Acta Odontol Latinoam*. 2012; 25(1):123-31.
- Bouillon R, Bex M, Van Herck E, Laureys J, Doms L, Lesaffre E, Ravussin E. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Apr; 80(4):1194-202.
- Bursch W, the autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2001 Jun; 8(6):569-81.
- Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am*, *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1989 Dec; 18(4):903-18.
- Charoenphandhu N, Nakkrasae LI, Kraidith K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Thongon NI, Krishnamra N. Two-step stimulation of intestinal Ca (2+) absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Sep; 297(3):E609-19.
- Cova CN. Estandarización de un modelo de disyunción palatina en ratas (descripción histológica). Tesis para obtener el título de Cirujana Dentista. FES Iztacala, UNAM, 2008.
- Cho Y. A histologic study of the alveolar bone remodeling on the periosteal side incident to experimental tooth movement. *Dentistry in Japan* 1997; 33: 79-82.
- Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell and more. *Endocr Rev*. 2013 Oct; 34(5):658-90.
- Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis.. *Osteoporos Int*. 2000; 11 Suppl 6:S2-17.
- Delmas PD1, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J; Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation]. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int*. 2000; 11 Suppl 6:S2-17.
- Dodds RA, James IE, Rieman D, Ahern R, Hwang SM, Connor JR, Thompson SD, Veber DF, Drake FH, Holmes S, Lark MW, Gowen M. Human Osteoclast Cathepsin K is Processed Intracellularly Prior to Attachment and bone Resorption. *J Bone Miner Res*. 2001 Mar; 16(3):478-86.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996 Aug 1; 382(6590):448-52.
- Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*. 1995 Nov; 57(5):344-58.
- Ebeling PR, Peterson JM, Riggs BL. Ebeling PR1, Peterson JM, Riggs BL. Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res*. 1992 Nov; 7(11):1243-50.

- Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res.* 2007 Jan; 22(1):1-6.
- Fernández-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gómez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete JM, Frühbeck G, Martínez C, Idoate F, Salvador J, Forga L, Ricart W, Ibañez J. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jan; 94(1):237-45.
- Fernández, Hernández G, Alobera MA, del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E47-51
- Ferreyra RS, Ubios AM, Gendelman H, Cabrini RL. Enlargement of periosteocytic lacunae associated to mechanical forces. *Acta Odontol Latinoam*, 2000; 13(1):31-8.
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1; 105(13):5266-70.
- Frost HM. In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg Am.* 1960 Jan; 42-A:138-43.
- Fukumoto S, Martin TJ. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Jul;20(5):230-6
- Galvis M, Montoya YP, Saldarriaga A. Diabetes y enfermedad periodontal: hacia un modelo clínico bidireccional. *Revista Nacional de Odontología - Volumen 8, Número 14 - enero-junio 2012*
- Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976 Jul; 25(7):595-603.
- García MF. Estudio de la dinámica ósea mandibular y de los procesos reabsortivos de la cresta alveolar en ratas diabéticas y controles. *UNR Journal*, 2008, Año 01. Volumen 01.
- Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR . Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1990 Mar;85(3):632-9
- Garnero P, Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk. *Osteoporosis. Int*, 2000; 11 Suppl 6:S55-65.
- Goto A, Tsukamoto I. Increase in tartrate-resistant acid phosphatase of bone at the early stage of ascorbic acid deficiency in the ascorbate-requiring osteogenic disorder shionogi (ODS) rat. *Calcif Tissue Int.* 2003 Aug; 73(2):180-5.
- Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult bone marrow contain the osteogenic precursors, *Blood.* 1994 Dec 15; 84(12):4164-73.
- Guyton A. *Tratado de fisiología médica. 7ª edición.* México. Editorial Interamericana, 1989.
- Hall TJ. A reappraisal of the effect of extracellular calcium on osteoclast resorption. *Biochem Biophys Res Commun, Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jul 15; 202(1):456-62.
- Haller AC, Zimny ML. Effects of hibernation on interradicular alveolar bone. *J Dent Res.* 1977 Dec; 56(12):1552-7.

- Harris MI, Classification and diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Prim Care*. 1988 Jun; 15(2):205-25.
- Hamilton AI, Blackwood HJ. Insulin deficiency and cell proliferation in oral mucosal epithelium of the rat. *J Anat*. 1977 Dec; 124(Pt 3):757-63.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol, Physiol Rev*. 1989 Jul; 69(3):990-1047.
- Hetzel PG, Glanzmann R, Hasler PW, Ladewick A, Buhner C. Coumarin embryopathy in an extremely low birth weight infant associated with neonatal hepatitis and ocular malformations. *Eur J Pediatr*. 2006 Jun; 165(6):358-60.
- Iagodovskii VS, Trifanidi LA, Gorokhova GP. Effect of space flight on rat skeletal bones and optical light and electron microscopic study. *Kosm Biol Aviakosm Med*. 1977 Jan-Feb; 11(1):14-20.
- Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda Saeki S, Mitani H. Diurnal variation in tooth movement in response to orthodontic force in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1998 Jul; 114(1):8-14.
- Im JA, Yu BP, Jeon JY, Kim SH. Relationship between osteocalcin and glucose metabolism in postmenopausal women. *Clin Chim Acta*. 2008 Oct; 396(1-2):66-9.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 2014. <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/la-carga-mundial?language=es> 05.09.13 (último acceso: 02 de 2014).
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*. 1998 May;13(5):793-802
- Kafienah W, Bromine D, Buttle DJ, Croucher LJ, Holiander AP. Human Cathepsin k Cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the Triple Helix. *Biochem J*. 1998 May 1; 331 (Pt 3):727-32.
- Kameda T, Miiyazaka K, Mori Y, Yuasa T, Schiokava M, Nakamaru Y, Mano H, Hakeda Y, Kameda A, Kumegawa M. Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Mar 27; 220(3):515-9.
- Kanazawa, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. Relationships between serum adiponectin levels versus bone mineral density, bone metabolic markers, and vertebral fractures in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2009 Feb;160(2):265-73
- Kansaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator nuclear factor kappa B ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*. 2002 Feb; 17(2):210-20.
- Katsumata K, Katsumata Jr, Katsumata Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats.. *Horm Metab Res*. 1992 Nov; 24(11):508-10.
- Kavukcuoglu NB, Patterson P, Mann AB. Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009 Aug;2(4):348-54
- Kazumi T, Yoshino G, Fujii S, Baba S. Tumorigenic Action of Streptozotocin on the Pancreas and Kidney in Male Wistar Rats, *Cancer Res*. 1978 Jul;38(7):2144-7.

- Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest.* 2000 May;23(5):295-303.
- Kindblom, JM. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res.* 2009 May;24(5):785-91
- Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jan;36(1):1-8.
- Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev.* 1997 Dec; 18(6):832-72.
- Lane NE, Yao W, Balooch M, Nalla RK, Balooch G, Habelitz S, Kinney JH, Bonewald LF. Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2006 Mar;21(3):466-76
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferrer M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais – Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton, *Cell.* 2007 Aug 10;130(3):456-69
- Lian J, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Shalhoub V, Collart D, Zambetti G, Stein G. Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Feb; 86(4):1143-7.
- Like AA, Rossini AA. Streptozotocin induced pancreatic insulinitis new model of diabetes mellitus. *Science.* 1976 Jul 30; 193(4251):415-7.
- Littlewood EA, Kokubo T, Ishibashi O, Inaoka T, Wlodarski B, Gallagher JA, Bilbe G. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone.* 1997 Feb; 20(2):81-6.
- Listgarten MA, Ricker FH, Laster L, Shapiro J, Cohen DW. Vascular basement lamina thickness in the normal and inflamed gingiva of diabetics and non-diabetics. *J Periodontol.* 1974 Sep; 45(9):676-84.
- Lozano I, Fernández, Esbrit, Álvarez-arroyo. Diabetes mellitus y pérdida de masa ósea, Review Article, *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 2007, Volume 16, Issue 2, pag 29- 44.
- Mamiko H, Shimono M, Fujii K, Tsukamoto I. Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats, *Bone.* 2007 Dec; 41(6):1045-50
- Manolagas SC, Jilka BL. Bone Marrow, Cytokines and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995 Feb 2; 332(5):305-11.
- Matsumoto T, Imura T, Ogura K, Moriyama K, Yamaguchi A. The role of osteocytes in bone resorption during orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2013 Apr;92(4):340-5
- McLaren AM, Hordon LD, Bird HA, Robins SP. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in patients with osteoporosis and the effects of bone fracture. *Ann Rheum Dis.* 1992 May; 51(5):648-51.

- Millest AJ, Breen SA, Loveday BE, Clarkson PN, Simpson CA, Waterton JC, Johnstone D.. Effects of inhibitor of cathepsin L on bone resorption in thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats. *Bone*. 1997 May; 20(5):465-71.
- Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat.. *Arch Oral Biol*. 2002 Dec; 47(12):843-9.
- Molina. Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis, *Rev Mex Patol Clin*, Vol. 58, Núm. 3, pp 113-137.
- Motyl, Laura R, McCabe. Streptozotocin, Type I Diabetes Severity and Bone, *Biol Proced Online*. 2009 Mar 6;11:296-315
- Murria RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell V. Bioquímica de Harper. México. Editorial El manual moderno, 1994.
- Navarro AB, Almeida F, Bascones A. Relación entre diabetes mellitus y enfermedad periodontal, *Av Periodon Implanto*. 2002; 14, 1: 9-19.
- Negri AL. Catepsina k: Un nuevo blanco molecular en el tratamiento de la resorción ósea aumentada, *REEMO*. Vol. 13. Núm. 6. Noviembre 2004.
- Noble BS. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):106-1
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn*. 1990 Apr; 13(4):259-62.
- Oliver Richard, Tervonen, Tellervo. Diabetes—A Risk Factor for Periodontitis in Adults. *J Periodontol*. 1994 May; 65(5 Suppl):530-8.
- Ozdemir S, Ayaz M, Can B, Turan B. Effect of selenite treatment on ultrastructural changes in experimental diabetic rat bones. *Biol Trace Elem Res*. 2005 Nov; 107(2):167-79.
- Parfitt AM. Bone-forming cells in Clinical Conditions. In: BK H, ed. *Bone. The Osteoblast and Osteocyte*, Boca Raton, FL: Telford Press and CRC Press, 1990, vol. 1.
- Parfitt AM. The mechanism of coupling. *Bone*. 2000 Apr; 26(4):319-23.
- Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic henotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Mar; 94(3):827-32.
- Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología Humana*, 2ª edición. Madrid: McGrawHill-Interamericana, 1999.
- Price PA. Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res*. 1989;21(1-4):51-7; discussion 57-60
- Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jähn K, Kato S, Wysolmerski J. Demonstration Of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res*. 2012 May;27(5):1018-29

- Qing H, Divieti P, Barry K, Dusevich V, Wysolmerski J, Bonewald L. PTHR1 in Osteocytes Plays a Major role in Perilacunar Remodeling through the Activation of “Osteoclastic” Genes in Osteocytes. *J Bone Min Res*, 2010.
- Qiu S, Palnitkar S, Rao DS, Parfitt AM. Is osteocyte density affected by osteoblastic changes in bone remodeling . *J Bone Miner Res*, 2000.
- Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec; 8 Suppl 2:S457-65.
- Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5866-75
- Rojas MR, Jiménez A, Franco A, Aguilar CA, Rojas. Epidemiología de la diabetes mellitus en México. En Aguilar Salinas. Acciones para enfrentar a la diabetes. Documento de postura. Academia Nacional de Medicina de México, México, 2015. Disponible en <http://www.anmm.org.mx/publicaciones/CAnivANM150/L15-Acciones-para-enfrentar-a-la-diabetes.pdf>
- Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int*. 2006 Oct;17(10):1514-23
- Seibel MJ, Cosman F, Shen V, Gordon S, Dempster DW, Ratcliffe A, Lindsay R. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis.. *J Bone Miner Res*. 1993 Jul; 8(7):881-9.
- Seibel MJ, Woitge H, Scheidt-Nave C, Leidig-Bruckner G, Duncan A, Nicol P, Ziegler R, Robins SP. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen in population-based screening for overt vertebral osteoporosis: results of a pilot study. *J Bone Miner Res*. 1994 Sep; 9(9):1433-40.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994 Nov; 43(11):1326-33.
- Schneider DL, Barrett-Connor EL. Urinary N- telopeptide levels discriminate normal, osteopenic, and osteoporotic bone mineral density. *Arch Intern Med*. 1997 Jun 9; 157(11):1241-5.
- Stein Gmora E, Guarneros Saldaña LM, Hernández Moreno E. Mecanismos celulares de la prostaglandina E1 en relación con la inducción de la destrucción ósea en ratas, *Rev ADM*. 1986 Jan-Feb; 43(1):2-8.
- Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone*. 2004 Oct; 35(4):828-35.
- Szkudelski t, kandulska k, okulicz M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells, *Physiol Res*. 1998; 47(5):343-6.
- Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz. M. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, *Physiol Res*. 2001; 50(6):537-46.
- Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction athways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*. 1999; 17(1):57-60.

- Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS. Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology*. 1997 Jan; 138(1):62-8.
- VanHouten J, Joshua N. Maternal calcium and bone metabolism during lactation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, December 2005 - Volume 12 - Issue 6 - pp 477-482
- Van Bezooijen R.L. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist, *J Exp Med*. 2004 Mar 15;199(6):805-14.
- Villarino ME, Sanchez LM, Bozal CB, Ubios AM. Influence of short-term diabetes on osteocytic lacunae of alveolar bone. A histomorphometric study. *Acta Odontol Latinoam*. 2006; 19(1):23-8.
- Villarino ME, Lewicki M, y Ubiosc AM. Bone response to orthodontic forces in diabetic. *AJO-DO. Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011 Apr;139(4 Suppl):S76-82
- Wysolmersk. Osteocytes remove and replace perilacunar mineral during reproductive cycles. *Bone*. 2013 Jun; 54(2):230-6.
- Yamasaki K, Miura F, Suda T. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movements in rats. *J Dent Res*. 1980 Oct; 59(10):1635-42.
- Yamashiro T, Fukunaga T, Kobashi N, Kamioka H, Nakanishi T, Takigawa M, Takano-Yamamoto T. Yamashiro T, Fukunaga N, Kamioka H, Nakanishi T, Takigawa M. Mechanical stimulation induces CTGF expression in rat osteocytes. *J Dent Res*. 2001 Feb; 80(2):461-5.
- Yong-Wei Fu, Hong-Bing HE. Apoptosis of periodontium cells in streptozotocin- and ligature-induced experimental diabetic periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand*. 2013 Sep;71(5):1206-15
- Zaidi M, Blair C, Moonga BS, Abe E, Huang CL. Osteoclastogenesis bone resorption and osteoclast –based therapeutics. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr; 18(4):599-609.

9. ANEXOS

Preparación para Formaldehído al 4%

El formaldehído (polímero sólido del formaldehído) es un fijador no coagulante que permite conservar detalles estructurales finos, obteniendo muy buena penetración estructural.

Formaldehído(Sigma)	4 gr
	80ml. (después de ajustar pH aforar a 100ml)
PBS o H ₂ O	100ml

Preparación para EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético al 7%)

Después de fijado el tejido lavar con agua por mínimo 1 hora para eliminar el fijador.

Colocar la muestra en un mínimo de 20 volúmenes en la solución descalcificante (EDTA) y colocarlo en el Termoagitador.

Hacer cambios cada 48 horas hasta que el hueso este en consistencia de tejido blando.

EDTA sódico	7gr
Agua destilada	80ml

Nota: Mezclar y poner en agitación, adicionar NaOH 1 N hasta que se disuelva el EDTA.

-Ajustar el pH con HCL 1 N a 7.4 y aforar a 100ml,

-Las muestras son colocadas en cajas con rejillas agitando con la mosca y el agitador magnético.

-Este procedimiento será revisado cada 48 horas durante 2 o 3 semanas o hasta asegurar que los tejidos han sido descalcificados al 100%

- Para corroborar la descalcificación de los tejidos se tomara una radiografía de cada muestra de tejido utilizando como testigo ya sea un tope de lima para endodoncia o bien una parte de maxilar sin descalcificar para poder observar la diferencia entre estos.

PASOS PARA LA TÉCNICA HISTOLÓGICA (H y E).

Preparación de los alcoholes

Grados del alcohol	Alcohol	Agua destilada
Alcohol 96°	100ml	
Alcohol 70°	73 ml	Aforar a 100 ml
Alcohol 80°	84 ml	Aforar a 100 ml
Alcohol 90°	94 ml	Aforar a 100 ml

Tren de Alcoholes para deshidratar las muestras para la técnica H y E.

Grados del alcohol	Tiempo de sumergir las muestras por alcohol.
Alcohol 70°	1 hora
Alcohol 80°	1 hora
Alcohol 90°	1 hora
Alcohol 100°	1 hora
Alcohol Amílico	1/2 hora (Nota: No dejar más tiempo).

Cortes histológicos.

Para realizar los cortes del tejido en este caso maxilar de rata (hueso), se cortaron en micrótopo (Leica, Weyzlar, Alemania).

Técnica	Grosor Corte	Expansión del corte
HyE	5 micras	Ruyter
Inmunofluorescencia	3 micras	Baño de Flotación a 35°C (Agua de grifo, sin grenetina en Portaobjetos tratados con poli-L-lisina).

Inclusión en parafina.

Una vez terminado el Tren de alcoholes (deshidratación), se procederá a hacer la inclusión.

Horno a temperatura de 55°C

PARAFINA	Tiempo en que las muestras se sumergen.
Parafina 1	1 hora
Parafina 2	1 hora
Parafina de inclusión	Se colocan los cubos metálicos, se orientan las muestras y verter parafina de inclusión

Nota: Dejar enfriar por 24 horas y desmoldar.

Preparación ruyter

(Adhesivo que fija los cortes de tejido al portaobjeto, para la técnica H y E).

Solución A

Agua destilada 80ml
Albumina glicerinada

Solución B

Acetona 20ml
Benzoato de metilo 20 gotas

Nota: Adicionar sol.A a Sol.B (en este orden) gota a gota MUY LENTAMENTE.
Guardar 4°C



Preparación de Poli-lysina

Poli-lysina (Sigma P-8960)	10ml
Agua	90ml

Nota: Solución 1:10 en agua destilada
Solución de trabajo es estable de 2-8°C, Duración máxima 3 meses.

Preparación de PBS 1X

Ingredientes	PBS 1X	PBS 10X
Na Cl	80 mg	8g
KCl	2g	0.2g
KH ₂ PO ₄	2.4g	0.2g
Fosfato de potasio monobásico		
Na ₂ KPO ₂	14.46g	1.15g
Fosfato sódico di básico		
H ₂ O Bidestilada	800ml	Aforar a 1000ml

Nota: Ajustar PH 7.4 con NaOH y aforar a 1000 ml
1 Litro de Pbs 1x 900ml de agua destilada por 100ml de PBS 10x

Tinción H y E.

Desparafinado en horno 56°C		1 hra
Desparafinado de las muestras mediante soluciones.	Xilol I	5 min
	Xilol II	5 min
Hidratación de las muestras	OH 100°	3 min
	OH 90°	3 min
	OH 80°	3 min
	OH 70°	3 min
	Agua destilada	5 min
Tinción de núcleos	Hematoxilina	8 min
Lavado del exceso de Hematoxilina	Agua de grifo	1 min
Tinción del citoplasma (contraste)	Eosina	8 min
Lavado del exceso de Eosina	OH 70°	1min
	OH 80°	2min
	OH 90°	3 min
	OH 100°	5 min
Eliminación de alcohol	Xilol I	3min
Aclarado de los tejido	Xilol II	5min

Determinar la presencia de catepsina K y osteocalcina en las lagunas osteocitarias del hueso alveolar en ratas diabetizadas con estreptozotocina sometidas a estrés mecánico.



Preparación buffer de citratos

Solución A (Ácido cítrico).	Solución B (Citrato de sodio)
9.605g a 500ml	12.905g a 500ml

Preparación Proteinasas K (recuperación antigénica).

	1Lt	100ML
Tris Base	0.10g	0.61
EDTA	0.37g	0.037g
CaCl ₂	0.56g	0.056g
Tritón X-100	5ml	500ml
Agua destilada	1000ml	100ml

Preparación Tritón 0.25%

250 micrólitros de tritón en 100 ml de Tritón

Preparación de Glicina

0.37535 gr de Glicina 50ml de PBS

ANTICUERPO PRIMARIO

1.- ANTI-CATEPSINA K

Anticuerpo Primario	Anti-Cathepsin K antibody ab19027 (Santa Cruz Biotechnology)
Origen	Rabbit polyclonal
Específico	Mouse, Rat, Human, Zebrafish
Anticuerpo Secundario	FITC (Isotiocianato de fluoresceína) concentración 1:200 Espectro de excitación: 492 nm Espectro de emisión: 518 nm
Montaje	DAPI concentración 1:200

2.- ANTI-OSTEOCALCINA

Osteocalcina de anticuerpos (FL- 100) es una IgG policlonal de conejo proporcionado a 200 mg / ml epítipo correspondiente a los aminoácidos 1-100.

Anticuerpo Primario	Osteocalcin FL-100: Sc-30044-Anticuerpo Policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology)
Origen	Rabbit polyclonal
específico	Rat
Anticuerpo Secundario	FITC (Isotiocianato de fluoresceína) concentración 1:200 Espectro de excitación: 492 nm Espectro de emisión: 518 nm
Montaje	DAPI concentración 1:200

ANTICUERPO SECUNDARIO

1.-FITC

Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato, también llamado FITC por sus siglas en inglés (Fluorescein IsoTioCyanate) es una molécula que pertenece al grupo de los colorantes de xanteno. Es un fluorocromo derivado de la fluoresceína.

Espectro de excitación: 492 nm
Espectro de emisión: 518 nm

Concentración usada: (1:200)

MONTAJE

2.-DAPI

DAPI ó (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN.

Espectro de excitación: 358 nm (Ultravioleta)

Espectro de emisión: 461 nm (azul)

Concentración usada: (1:200)

TÉCNICA INMUNOFLUORESCENCIA

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación.

Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (longitud de onda más corta) en luz de menor energía (longitud de onda más larga). Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación características; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores).

La inmunofluorescencia se utiliza esencialmente en la detección de auto anticuerpos y anticuerpos contra antígenos de superficie de células y tejidos.

Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes. Se aprecia si hubo unión del anticuerpo con el antígeno por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta. Este procedimiento (inmunofluorescencia directa) tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo de cada uno de los anticuerpos necesarios para cada una de las sustancias a investigar. Para evitar esto, lo que se hace es tratar el tejido o células con antisueros anti-antígeno producidos, por ejemplo, en conejo y secundariamente anti inmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo (inmunofluorescencia indirecta).

Pasos a seguir para la técnica de Inmunofluorescencia.

Pasos	Tiempo
Desparafinar en el horno 60°C	2hrs
Hidratar	
Xilol I	5min
Xilol I	5min
Alcohol 100	3 min
Alcohol 90	3 min
Alcohol 80	3 min
Alcohol 70	3 min
Agua	3 min
PBS	3 lavados de PBS durante 5 min c/u
Recuperación Antigenica: Proteinasa K	20 min
PBS	3 lavados de PBS durante 5 min c/u
Tritón 0.25% en PBS	15 min
PBS	3 lavados de PBS durante 5 min c/u
Bloqueo : Glicina 0.01M en PBS	1hra (Vaso Coplin de vidrio)
Incubación anticuerpo primario: Catepsina k dilución 1:200	Dejar toda la noche en cama húmeda con PBS.
PBS	3 lavados de PBS durante 5 min c/u
Incubación anticuerpo secundario: FITC dilución 1:200	2 horas(No luz)
PBS –TWEEN 0.05%	lavado
MONTAJE : DAPI	Una gota por muestra
VECTASHIELD	Una gota por muestra aprox 50 microlitros por muestra

Nota: Guardar las muestras en el refrigerador.

Con ayuda del microscopio de fluorescencia se identificaron las lagunas osteocitarias que dieron positivo a la reacción de osteocalcina y catepsina k (células de color verde FITC), para justificar que no se trababa de eritrocitos se montó con DAPI (tíne color azul) para la tinción de los núcleos osteocitarios. Se observaron en un área de 400x800 en un objetivo de 40x.



Imagen 31. Se observa microscopio de fluorescencia de la unidad de investigación biomédica (UBIMED), Fes Iztacala.

ANOVAS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuadro 16. En el cuadro se muestran las áreas de las **lagunas osteocitarias** de hueso alveolar en ratas normoglicémicas las cuales fueron sometidas a estrés mecánico de 2, 4 y 6 días, que tuvieron una media $59.2 \pm 8.8 \mu\text{m}$. Así como la prueba de ANOVA ($p= 0.014$).

Grupo	Estrés mecánico	N	Media del área de la laguna osteocitaria (μm)	Desviación estándar
Normoglicémicas con estrés	2 Días	6	57.0944	+/- 9.106
Normoglicémicas con estrés	4 Días	6	64.281	+/- 6.403
Normoglicémicas con estrés	6 Días	6	55.776	+/- 8.4304

ANOVA P=0.0

Cuadro 17. En el cuadro se muestran las áreas de los **núcleos osteocitarios** de hueso alveolar en ratas hiperglicémicas las cuales fueron sometidas a estrés mecánico de 2, 4 y 6 días, que tuvieron una media 8.68 +/- 2.77 μm . Así como la prueba de ANOVA ($p= 0.174$) que muestra que no hubo diferencias significativas.

Grupo	Estrés Mecánico	N	Media del área de los núcleos osteocitarios (μm)	Desviación Estandár
Hiperglicémicas con estrés	2 Días	6	8.34	+/- 3.30
Hiperglicémicas con estrés	4 Días	6	9.66	+/- 2.71
Hiperglicémicas con estrés	6 Días	6	8.23	+/- 2.09

ANOVA $p= 0.174$

Cuadro 18. Se realizó la Prueba de *t de student que muestra una diferencia significativa <0.001 en los **núcleos osteocitarios** del hueso alveolar en los grupos de ratas normoglicémicas e hiperglicémicas sin estrés mecánico.

Grupo	N	Media del área de los núcleos osteocitarios	Desviación Estandár
Normoglicémicas sin estrés mecánico.	6	12.79 *	+/- 3.94
Hiperglicémicas sin estrés mecánico.	6	10.54 *	+/- 2.72

*Diferencia Significativa t de student <0.001

Cuadro 19. En el cuadro se muestran las áreas de las **lagunas osteocitarias** de hueso alveolar en ratas hiperglicémicas las cuales fueron sometidas a estrés mecánico de 2, 4 y 6 días, que tuvieron una media 85.35 +/- 15.63 μm . Así como la prueba (ANOVA $p=0.852$)

Grupo	Estrés mecánico	N	Media del Área de las lagunas osteocitarias (μm)	Desviación Estándar
Hiperglicémicas con estrés	2 Días	6	86.20	+/- 15.33
Hiperglicémicas con estrés	4 Días	6	86.12	+/- 13.21
Hiperglicémicas con estrés	6 Días	6	83.92	+/- 18.04

ANOVA P= 0.852

Cuadro 20. En el cuadro se muestran las áreas de **los núcleos osteocitarios** de hueso alveolar en ratas normoglicémicas las cuales fueron sometidas a estrés mecánico de 2, 4 y 6 días, que tuvieron una media 15.64 +/- 3.64 μm . Así como la prueba de ANOVA ($p= 0.226$).

Grupo	Estrés mecánico	N	Media del área de los núcleos osteocitarios (μm)	Desviación Estándar
Normoglicémicas con estrés	2 Días	6	14.66	+/- 3.15
Normoglicémicas con estrés	4 Días	6	16.54	+/- 3.98
Normoglicémicas con estrés	6 Días	6	15.91	+/- 3.55

ANOVA $p=0.226$

ANÁLISIS DE ANOVA DE DOS VÍAS

Cuadro 21. Condición de la hiperglicemia y el estrés y la afección en las lagunas osteocitarias.

Prueba de los efectos Inter-sujetos

Variable Dependiente : **Laguna Size**

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	44370.543a	3	14790.181	98.458	.000
Intersección	714628.380	1	714628.380	4757.282	.000
Hiperglicemia	40691.763	1	40691.763	270.885	.000
stress	1000.529	1	1000.529	6.661	.011
Hiperglicemia+stress	1856.189	1	1856.189	12.357	.001
Error	28541.379	190	150.218		
Total	1078757.688	194			
Total corregida	72911.922	193			

a.R cuadrado= .609 (R cuadrada corregida .602)

Cuadro 22. Condición de la hiperglicemia y el estrés así como la afección en de estos en el núcleos del osteocito.

Prueba de los efectos Inter-sujetos

Variable Dependiente : **Núcleo del osteocito**

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1815.378 a	3	605.126	57.899	.000
Intersección	20947.258	1	20947.258	2004.265	.000
Hiperglicemia	785.242	1	785.242	75.133	.000
stress	9.754	1	9.754	.933	.335
Hiperglicemia+stress	207.730	1	207.730	19.876	.000
Error	1985.755	190	10.451		
Total	31850.094	194			
Total corregida	3801.132	193			

a.R cuadrado= .478 (R cuadrada corregida .469)