



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

**“ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DEL GEN C-FOS,  
METALOPROTEINASA 3 Y 9 EN PACIENTES CON Y SIN DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 CON FRACTURAS”**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL  
GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:  
**EDMUNDO MORALES RAYA**

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. MIGUEL ANGEL FONSECA SÁNCHEZ  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

DR. JESÚS REYNA FIGUEROA  
HOSPITAL CENTRAL SUR PEMEX

**CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2023**



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.

## ÍNDICE

<a href="#">ABREVIATURAS.</a>	3
<a href="#">RESUMEN.</a>	4
1. <a href="#">MARCO TEÓRICO.</a>	
1.1. <a href="#">Epidemiología de las fracturas óseas.</a>	7
1.2. <a href="#">Cicatrización ósea.</a>	7
1.3. <a href="#">Cicatrización ósea y Diabetes Mellitus tipo 2.</a>	9
1.4. <a href="#">Proto-oncogen c-Fos en el tejido óseo.</a>	11
1.5. <a href="#">Metaloproteinasas.</a>	14
1.6. <a href="#">Tratamiento antidiabético y su efecto en el hueso.</a>	16
2. <a href="#">PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</a>	17
3. <a href="#">JUSTIFICACIÓN.</a>	17
4. <a href="#">PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.</a>	18
5. <a href="#">HIPÓTESIS.</a>	18
6. <a href="#">OBJETIVOS.</a>	18
7. <a href="#">METERIAL Y MÉTODO.</a>	
7.1. <a href="#">Diseño del estudio.</a>	19
7.2. <a href="#">Población de estudio.</a>	19
7.3. <a href="#">Tamaño de la muestra.</a>	19
7.4. <a href="#">Variables independientes.</a>	20
7.5. <a href="#">Variables dependientes.</a>	20
7.6. <a href="#">Criterios de inclusión.</a>	21
7.7. <a href="#">Criterios de exclusión.</a>	21
7.8. <a href="#">Criterios de eliminación.</a>	21
7.9. <a href="#">Técnicas de laboratorio.</a>	
7.9.1. <a href="#">Recolección y conservación de la muestra.</a>	21
7.9.2. <a href="#">Estudios de biología molecular.</a>	23
7.9.2.1. <a href="#">Extracción de ácidos nucleicos del hueso fresco.</a>	23
7.9.2.2. <a href="#">Evaluación de la pureza y cuantificación del RNA.</a>	23
7.9.2.3. <a href="#">Evaluación de la integridad del RNA.</a>	23
7.9.2.4. <a href="#">Síntesis de cDNA.</a>	23
7.9.2.5. <a href="#">Almacenamiento de los oligonucleótidos.</a>	24
7.9.2.6. <a href="#">Pre-amplificación de cDNA.</a>	24
7.9.2.7. <a href="#">PCR Tiempo real.</a>	25
7.10. <a href="#">Análisis estadístico.</a>	26
8. <a href="#">Resultados.</a>	27
9. <a href="#">Discusión.</a>	32
10. <a href="#">Conclusiones.</a>	36
11. <a href="#">Ética y Declaración de conflicto de intereses.</a>	37
12. <a href="#">Bibliografía.</a>	37

## ABREVIATURAS

DM2	Diabetes mellitus tipo 2
MMP	Metaloproteinasa
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
RAGE	Receptor de los productos finales de glicación avanzada
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$
RANK	Receptor activador del factor nuclear $\kappa B$
NF- $\kappa B$	Factor nuclear kappa B
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
c-Fos	Protooncogen c-Fos
Fos	Proteína Fos codificada por el gen c-Fos
CSF-1R	Receptor del Factor 1 estimulante de las colonias
PPAR	Receptores para sustancias proliferadoras de peroxisomas
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
GLP	Peptidos similares al glucagón
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado con Run
MAPK	Proteincinasa activada por mitogeno
ERK	Proteincinasa regulada por señales extracelulares
Hb1Ac	Hemoglobina glicosilada.
AP1	Proteína activadora 1
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
NFATc1	Factor nuclear de las células T activadas citoplasmático 1
MEC	Matriz extra celular
DFx	Días transcurridos desde el inicio de la fractura
FC	Fold Change

## RESUMEN

**ANTECEDENTES:** las fracturas son una patología de gran incidencia en el país. Su tratamiento quirúrgico ocupa el número 12 de todas las cirugías realizadas en la red de hospitales de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México. Los pacientes con *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) tienen un incremento del 63% en el tiempo de cicatrización de una fractura. El 36.4% de la población mexicana tiene DM2. El proto oncogen c-fos es considerado un gen temprano inmediato, este se expresa de forma rápida después de un estímulo, llega a su máxima expresión a los 60 min y retorna a su estado basal a los 120 minutos. Este gen es un inductor postrascriptcional de diferentes procesos en el desarrollo y maduración celular. En la cicatrización ósea es de gran importancia para la osteoclastogénesis. La metaloproteinasas 3 y 9 (MMP-3, MMP-9) son enzimas catalíticas que degradan la matriz extracelular y permiten el trabajo de las células en la reparación ósea, estas enzimas tienen un sitio promotor sensible para c-fos que regula la función. En diferentes modelos experimentales, tanto animales como celulares se ha encontrado que estos tres componentes tienen mayor expresión en estados hiperglucémicos, este no se ha corroborado *in vivo* con pacientes humanos.

**OBJETIVO:** analizar y comparar los patrones de expresión de los genes; c-Fos, metaloproteinasa 3 y metaloproteinasa 9 en fracturas de pacientes con DM2 con hiperglucemia persistente y pacientes sin DM2.

**JUSTIFICACIÓN:** existen procesos biológicos de la cicatrización ósea que no están claros, hasta este momento el estudio de los patrones de expresión de c-Fos, MMP3 y MMP9 han sido heterogéneos debido a que solamente se han empleado modelos animales y celulares, y no directamente en pacientes, por lo que con esta investigación conoceremos este aspecto de los procesos.

**METODOLOGÍA:** Observacional, descriptivo, transversal y comparativo. Se analizaron 10 pacientes con fracturas provenientes de un hospital de segundo nivel de la Ciudad de México de población abierta, a los cuales se les tomó biopsia de callo óseo en el momento de la osteosíntesis, se extrajo RNA, con posterior síntesis de DNAc y su análisis de expresión por qPCR.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO:** se compararon los patrones de expresión con el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y el FC de los tres genes, c-Fos, MMP3 y MMP9 de dos grupos independientes

con la prueba de Mann Whitney, el estudio de la correlación entre los tres genes, la hemoglobina glicosilada y los días transcurridos desde el inicio de la fractura se realizó con la prueba de Spearman, se estableció el límite de significancia en 95%,  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS:** se analizaron un total de 10 pacientes, 5 pacientes control (1 mujer y 4 hombres, 41 a 70 años; media  $\pm$  DE,  $52.4 \pm 11.3$  años) y 5 pacientes como casos (3 mujeres y 2 hombres, 34 a 87 años; media  $\pm$  DE,  $62.2 \pm 19.7$  años). Los pacientes con *diabetes mellitus* tipo 2 tenían  $13.3 \pm 11.3$  años de evolución, los cuales tenían un descontrol glicémico  $168.6 \pm 24.1$ , con una hemoglobina glicosilada de  $8.7 \pm 0.39$ . Todos los niveles de RNAm se normalizaron con GAPDH. Se comparó la expresión de genes por medio del  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  de c-Fos, MMP-3 y MMP-9 entre los grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para c-Fos ( $p=0.655$ ) y MMP-9 ( $p=0.180$ ), pero sí para MMP-3 ( $p=0.025$ ). En cuanto al Fold Change (FC), los tres genes presentaron mayor expresión en los casos, c-Fos (FC=1.84), MMP-3 (FC=10.7) y MMP-9 (FC=5.02). La correlación en la expresión entre los genes, c-Fos/MMP-3, c-Fos/MMP-9 no mostraron asociación en ambos grupos. Se encontró asociación entre MMP-3/MMP-9 en el grupo control ( $p=0.000$ ), no así en el grupo de casos. La correlación entre el porcentaje de la hemoglobina glicosilada y la expresión génica en c-Fos y MMP-3 no se encontró asociación. Para MMP-9 en el grupo de los casos se encontró una correlación ( $p=0.000$ ), no así en el grupo control ( $p=0.870$ ). La asociación entre los días transcurridos desde el inicio de la fractura y la expresión de c-Fos fue estadísticamente significativa tanto para casos ( $p=0.005$ ) como para controles ( $p=0.000$ ) con una asociación positiva para los casos (Rho=1) y una asociación negativa para los controles (Rho=-0.975).

**CONCLUSIONES:** a pesar de ser considerado c-Fos un gen de expresión temprana y transitoria con una expresión no mayor de 120 min, se demostró que en pacientes se puede encontrar en todo el proceso cicatrizal óseo, desde la fase de callo blando hasta el día 37 en fase de remodelación ósea. Existe una asociación positiva entre el incremento de la expresión de c-Fos con los días transcurridos desde el inicio de la fractura en los pacientes normoglicémicos, y una asociación negativa en los pacientes con estado hiperglicémico persistente.

Existe una expresión a la alza de los genes c-Fos, MMP-3 y MMP-9, en los pacientes con un estado hiperglicémico persistente en la cicatrización ósea.

**PALABRAS CLAVE:** expresión genética, c-fos, metaloproteinasa 3, metaloproteinasa 9, fractura, hueso, hiperglicemia, *diabetes mellitus* tipo 2.

## **1.- MARCO TEÓRICO**

### **1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS FRACTURAS ÓSEAS**

Las fracturas óseas son una de las principales afecciones presentadas a lo largo de la vida. La última estadística disponible a nivel nacional es del 2001, la cual reportó un egreso hospitalario total de 138,006 pacientes en el sistema Nacional de Salud; de ellos 85,964 fueron hombres y 52,042 mujeres<sup>1</sup>. Los días de estancia hospitalaria fueron de 266,015, esto representaría un costo actualizado de 3,170 millones de pesos a nuestro sistema de salud.<sup>2</sup> Estos datos no considera a los pacientes que recibieron su tratamiento de manera ambulatoria, por lo que las cifras pueden incrementarse notablemente.

En el 2018 la Secretaría de Salud de la Ciudad de México reportó que se atendieron en la consulta externa de los hospitales de esta dependencia, un total de 26,541 pacientes por algún tipo de fractura, ocupan el segundo lugar de las consultas otorgadas en estas unidades hospitalarias, después de la consulta de medicina general <sup>3</sup>.

### **1.2 CICATRIZACIÓN ÓSEA**

El proceso de la cicatrización ósea, inicia con la formación del hematoma en el sitio de la lesión, genera la producción de citosinas y factores de crecimiento, los cuales desencadenan una respuesta inflamatoria con el reclutamiento de células madre mesenquimales con su posterior diferenciación a osteoblastos y osteoclastos. Inicialmente se forma cartílago, el cual posteriormente se mineraliza para formar el hueso, en esta última fase intervienen activamente en forma coincidente tanto osteoblastos y osteoclastos para remodelar el hueso a su forma final.<sup>4</sup>

Este proceso se ha dividido en cuatro fases (Figura 1): fase (I) Inflamación de 0 a 3 días después de la fractura, donde se forma un hematoma con la activación del sistema inmunológico que recluta células multinucleadas. Las de mayor importancia son los macrófagos. Inicia la angiogénesis y aparecen las células osteoprogenitoras, así como osteoblastos y condrocitos; fase (II) de 3 a 6 días posterior a la fractura donde se inicia la formación de la matriz extracelular y la formación del callo blando (cartílago), fase (III) de los 10 a 21 días después de



la fractura, con la formación callo duro (hueso intramembranoso) donde el cartílago se remodela para formar hueso y finalmente la fase (IV) con la remodelación del hueso trabecular formado. <sup>5</sup>

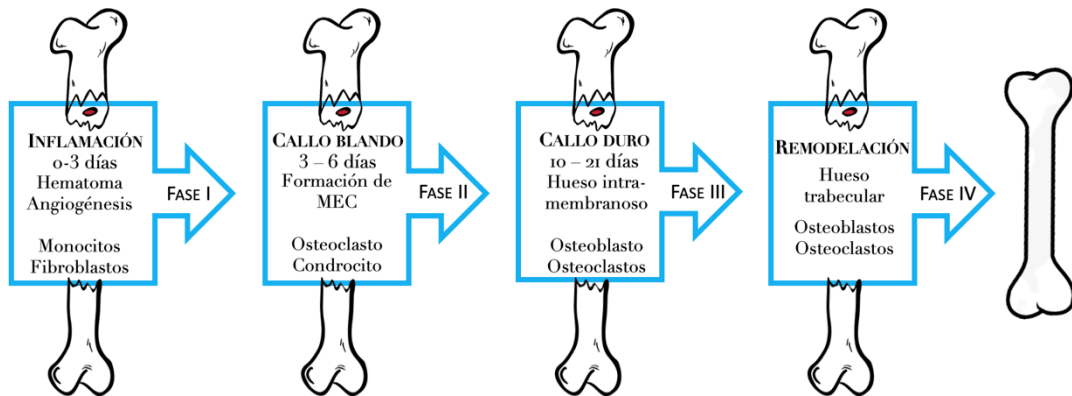


Figura No. 1 Fases de la cicatrización ósea

El crecimiento y mantenimiento de los huesos depende de la función coordinada de osteoblastos y osteoclastos. El osteoblasto deriva de los progenitores mesenquimales, produce la matriz extracelular, con su posterior mineralización; el osteoclasto proviene del linaje de monocitos/macrófagos, este reabsorbe la matriz extracelular ya mineralizada. <sup>6</sup>

El osteoclasto tiene una parte fundamental en la homeostasis ósea, participa tanto en la remodelación como en la cicatrización del hueso. Su regulación aún no es completamente conocida, tanto en su formación (osteoclastogénesis) como en su activación en células maduras. <sup>7</sup>

Existen al menos 24 genes o loci donde se puede regular positiva o negativamente a los osteoclastos, varios de los productos génicos de estos loci aún no se han aclarado con precisión en sus redes reguladoras.

Los mediadores químicos importantes en este proceso de diferenciación, maduración y activación del osteoclasto son; factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de transcripción NF- $\kappa$ B y el receptor activador del ligando del factor nuclear  $\kappa$ -B (RANKL). <sup>8</sup>

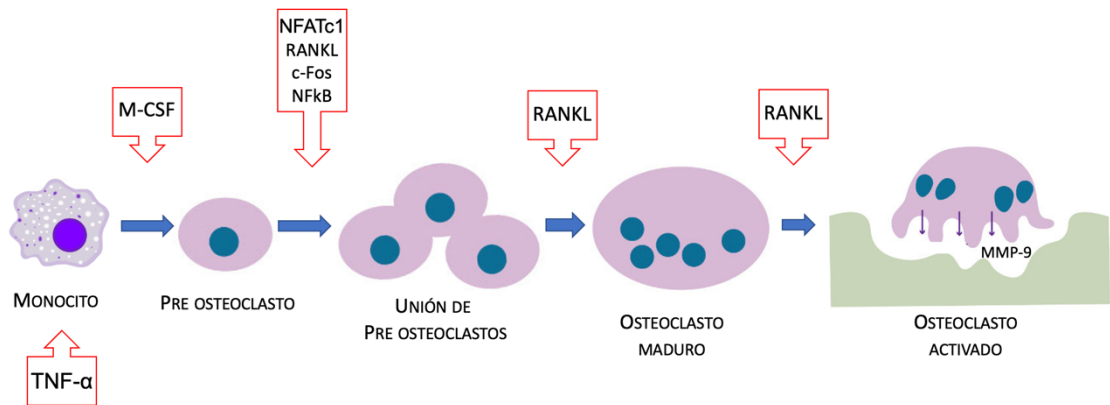


Figura No. 2 Osteoclastogénesis y sus inductores

### 1.3 CICATRIZACIÓN ÓSEA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2021, en la población de 20 años o más, la prevalencia para *diabetes mellitus* fue de 15.8%.<sup>9</sup> Por lo que ya se ha considerado a la *diabetes mellitus* como un problema de salud pública, que incrementa comorbilidades que de ella se derivan.

La hiperglicemia crónica en los pacientes con DM2, es uno de los factores más importantes para el desarrollo de complicaciones relacionadas con esta enfermedad, en diferentes niveles estructurales y funcionales, como son micro y macrovasculares, neurológicas y cicatrizales. Este estado hiperglicémico persistente es medido con mayor precisión por la hemoglobina glicosilada (HbA1c).<sup>10</sup> Se ha demostrado que los pacientes con una Hb1Ac menor de 7.5% se curan más rápido en heridas crónicas. Otros estudios han establecido que los tratamientos intensivos que mantienen la Hb1Ac por debajo de 7.4% reducen significativamente un 42% un evento cardiovascular.<sup>11</sup> Por lo que las guías actuales de tratamiento tienen como objetivo que los pacientes con DM2 mantengan una Hb1Ac menor de 7%.<sup>12</sup> Con lo anterior y con el conocimiento que la hemoglobina glicosilada mide la concentración acumulada a lo largo de la vida del eritrocito, esto es de 120 días<sup>(13)</sup>, en la investigación se tomó como un

estado de hiperglicemia persistente a un valor de hemoglobina glicosilada  $\geq$  de 7.5%.

Los pacientes con DM2 tienen un incremento del 63% en el tiempo de la cicatrización ósea, independientemente del tratamiento antidiabético que lleven, ya sea con insulina (57%) o con dieta e hipoglucemiantes orales (76%). Sin relación al tratamiento antidiabético que reciban los pacientes, el tiempo de la cicatrización ósea se incrementa a diferencia de los pacientes no diabéticos, un 86% para los que requiere reducción abierta, un 42% con reducción cerrada, y el 26% pueden presentar no-uniión.<sup>14</sup>

La hiperglicemia persistente contribuye a múltiples complicaciones, tanto a nivel celular como molecular este proceso se inicia principalmente por la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) y la activación de su receptor (RAGE), que resulta una inducción de estrés a nivel celular, con un constante estado de oxidación y la producción de mediadores inflamatorios, lo que da por resultado una inflamación sistémica.<sup>15</sup>

Este eje AGEs-RAGE-estrés oxidativo tiene influencia directa en las células ósea con repercusión en la cantidad y calidad de hueso formado.

En los pacientes con DM2 con hiperglicemia persistente, la proporción de niveles de RANKL/OPG y TNF- $\alpha$ , se encuentran aumentados. Esto contribuye a una mayor reabsorción ósea, debido a un aumento de la osteoclastogénesis, sin conocer aún de forma precisa las múltiples vías que lo desencadenan. Se ha sugerido que la actividad osteolítica es debida principalmente a la activación de osteoclastos existente.<sup>16</sup>

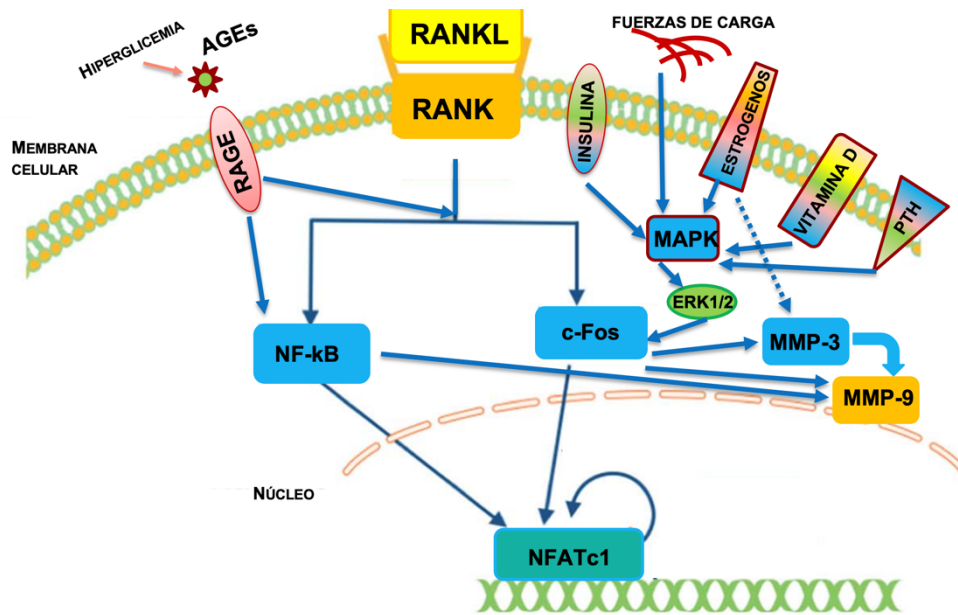


Figura No.3 Simplificación de las diferentes vías inductoras de c-fos, MMP-3 y MMP-9.

#### 1.4 PROTO-ONCOGEN C-FOS EN EL TEJIDO ÓSEO

El gen *c-fos* codifica la proteína nuclear *Fos* que participa en la regulación transcripcional de numerosos genes, así mismo este requiere ser modificado post transcripcionalmente, principalmente por fosforilación, estas vías pueden ser por la proteincinasa y/o adenilciclasea. <sup>17</sup> Una cascada importante para su inducción es la cascada de proteincinasa activada por mitógeno (MAPK) y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) que se trasladan al núcleo para fosforilar y potenciar su actividad postranscripcional.<sup>18</sup>

Inicialmente, *c-fos*, se demostró que solo se encontraba expresado de forma breve y transitoria en el periodo embrionario, pero posteriormente se observó que tenía una expresión regular en áreas con constante remodelación degenerativa, como en las zonas de mineralización ósea y el estrato granuloso-espinoso de la piel. <sup>19 20</sup>

La proteína *Fos* es requerida durante la transición de G0 a G1 en el ciclo celular para el crecimiento exponencial en la fase S. <sup>19,21</sup>

Su inducción es rápida y transitoria, aparece minutos después de su estímulo, aproximadamente a los 5 min<sup>19</sup>, llega a su nivel máximo a los 30-60 min y es indetectable después de los 120 min.<sup>22</sup>

Los estudios experimentales han arrojado diferentes resultados, esto depende del modelaje empleado; en cultivos celulares se ha demostrado que su expresión es inducida para la proliferación celular, pero no es esencial para la viabilidad de la mayoría de las células con excepción de las células óseas, gametogénicas y en ciertas respuestas neuronales.<sup>19,23</sup> En los modelos murinos de cicatrización ósea, la expresión de *c-fos* participaba de forma rápida y transitoria. Con una disminución de su expresión en el callo blando, esto es posterior a los 7 días y con una disminución aún más significativa después de los 12 días en el callo duro perióstico, por lo que se pensó inicialmente que solo tenía función a nivel de los osteoblastos.<sup>24</sup>

La proteína Fos se dimeriza con Jun, denominada Proteína Activadora 1 (AP1), de esta manera se potencializa la afinidad en los sitios promotores del DNA para *c-fos*.<sup>23</sup> La inducción de AP1 (*c-fos*) en osteoblastos, puede iniciarse por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), hormona paratiroidea<sup>25,26</sup> y 1,25-dihidroxi vitamina D,<sup>27</sup> también por parte de la insulina, todos ellos conducen a un aumento en la activación celular de AP-1.<sup>28,29</sup>

Investigaciones posteriores encontraron que Fos (Figura 2) participaba en la diferenciación osteoclástica, en la vía de señalización de RANKL-RANK, se encuentra una regulación positiva y específica a este tipo celular, ya que, al encontrarse RANK en otras células, se observó que el entorno óseo era esencial para su función. Estos estudios sugirieron que la participación de Fos involucraba dos pasos; la inducción de la expresión de RANK en precursores de osteoclastos y en la transducción de señales inductoras de osteoclastos de RANK y CSF-1R.<sup>30,31</sup>

Los estudios del efecto de la DM2 sobre los osteoclastos son controvertidos y variados; la DM2 agrava la pérdida ósea a través de una mayor reabsorción osteoclástica, una disminución de la formación ósea, así como un menor

recambio óseo. Los estudios *in vitro* indican que la concentración de glucosa inhibe RANKL, mediando la diferenciación y función de los osteoclastos. Esta variedad de resultados, depende de los modelos empleados (murinos o celulares), de la región anatómica estudiada y/o el linaje celular utilizado para el modelaje.<sup>32, 33</sup>

RANKL interacciona con el receptor RANK que activa la señalización de NF- $\kappa$ B en los osteoclastos, con la activación para reabsorción ósea. Se ha observado que NF- $\kappa$ B es regulada positivamente en *diabetes mellitus*. Este induce el factor nuclear de células T activadas citoplasmático 1 (NFATc1) el cual tiene un papel positivo en la osteoclastogénesis. La sobre expresión de c-fos en NF- $\kappa$ B induce la expresión de NFATc1 y la consiguiente formación de osteoclastos en ausencia de RANKL.<sup>34,35</sup>

Por otro lado, *c-fos* participa en la formación, mantenimiento y remodelación de la matriz orgánica ósea, esta es sintetizada por los osteoblastos y su reabsorción por los osteoclastos. Esta matriz orgánica está formada principalmente por proteínas, un 90% de colágeno, (>95% Tipo I, <5% Tipo V, 1% Tipo III y XII) el 10% restante es por proteoglicanos, osteocalcina, glicoproteínas, factores de crecimiento y proteínas procedentes del plasma.<sup>36, 37, 38</sup>

Una parte fundamental de la cicatrización ósea es la “respuesta de carga”, esto es una aplicación de fuerzas en el sitio de fractura, lo que da tensión al citoesqueleto con un aumento en el Ca<sup>2+</sup> libre intracelular, induce la MAPK con la regulación positiva de la expresión de c-fos, este hecho sucede en varios tipos de células; cardíacas, musculares, endoteliales, osteocitos y osteoblastos.<sup>39, 40,</sup>

41

## 1.5 METALOPROTEINASAS

En la fase de remodelación ósea, las metaloproteinasas (MMP), intervienen en el recambio activo de la matriz extracelular, un requisito previo para la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. Específicamente, durante la curación ósea, posterior a un trauma, tendrán que “limpiar” la zona para iniciar la formación de un nuevo hueso.

La MMP-3 (estromelisina-1) degrada proteoglicanos, se ha localizado en osteoblastos, fibroblastos y osteocitos. La MMP-3 inducida por estimulación por osteoblastos es una enzima clave para la degradación del colágeno en la superficie ósea, este hecho es necesario para el reclutamiento de osteoclastos y la resorción ósea, por lo que su regulación de forma positiva tiene efecto protector para el hueso.<sup>6,42</sup>

MMP-9 (gelatinasa B) tiene una activación por parte de MMP-3,<sup>43</sup> ésta se expresa en los osteoclastos, una de sus funciones principales es la angiogénesis y la eliminación del cartílago,<sup>6, 44</sup> permitiendo la adhesión e invasión celular.<sup>45</sup> MMP-9 se encuentra expresada a lo largo de todo el proceso de la regeneración ósea, principalmente en osteoclastos. Se ha observado en estudios con modelos murinos, que la ausencia de esta metaloproteinasa, conduce a defectos en la reparación ósea, por la falta de un adecuado remplazo del cartílago por hueso, con la presencia de islas cartilaginosas residuales, da como resultado alteraciones en las propiedades biomecánicas del callo, la causa probablemente de este evento es por un retraso en la diferenciación en los osteoclastos, con un incremento de los osteoblastos y de la angiogénesis.<sup>5,46</sup> En los pacientes con DM2, la hiperglicemia constante genera un estrés oxidante, con aumento sostenido de la expresión de MMP-9. Las concentraciones elevadas de MMP-9 podría ser un biomarcador importante para evaluar los trastornos asociados en la diabetes. <sup>47</sup>

En cuanto a MMP-3 se ha observado que es responsable en la disminución de la diferenciación de osteoclastos y un incremento de los osteoblastos.<sup>48</sup> Otros estudios establecen que debido a la disminución de los osteoclastos se ve

disminuida la expresión de MMP-3. <sup>49</sup> Se regula de forma positiva para facilitar la cicatrización de las heridas, principalmente relacionada con la migración celular, y esta regulación es modulada por c-fos. <sup>50</sup>

La inducción de la expresión de MMP-3 se reduce un 50% en ausencia de c-fos, lo que sugiere que este es un factor pivote y altamente específico para la regulación de esta metaloproteinasa.

Otro componente que puede inducir la expresión de MMP-3 es el 17- $\beta$ -estradiol.<sup>23</sup>

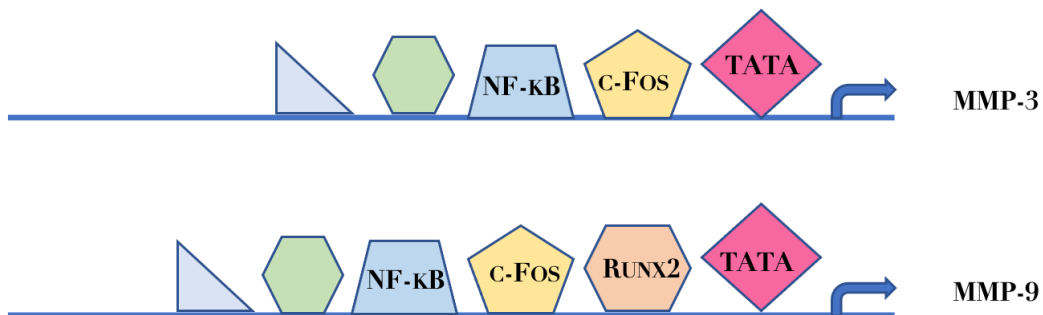


Figura No. 4 Elementos reguladores en los sitios promotores de la MMP. Sus posiciones son relativas. Los elementos vacíos representan el resto de los inductores conocidos.

Tanto MMP-3 como MMP-9 tienen una activación postranscripcional por c-fos.<sup>51</sup> En modelos murinos con DM2 se ha observado una mayor actividad de la MMP-9 relacionada por *c-fos* (AP-1) y por la vía RANKL <sup>52,53</sup> o vía de las proteincinasas activadas por mitógenos, conocida como vía MAPK/ERK. ERK1/2 tiene un papel de gran importancia para activar y estabilizar AP1 por incremento en su fosforilación, con niveles altos de glucosa, con resultado de una mayor expresión de MMP-9.<sup>53</sup> En heridas de pacientes con DM2 que presenta alteraciones en su cicatrización se ha observado que los productos finales de glicosilación avanzada (AGE) incrementan la expresión de MMP-9 en los queratinocitos, con una inhibición significativamente en su migración y proliferación, esto asociado con una degradación excesiva de la matriz extracelular. <sup>54</sup>



## 1.6 TRATAMIENTO ANTIDIABÉTICO Y SU EFECTO EN EL HUESO

La metformina tiene un efecto protector en el hueso, en modelos animales que se les realizó ovariectomía, aumentan la diferenciación de osteoblastos por la vía del factor de transcripción Runx2, por la cascada reguladora de AMPK, y disminuye la de los osteoclastos, estos últimos por una disminución del factor de transcripción RANKL.

Las tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona), cuyo mecanismo de acción es por la activación de los receptores para sustancias proliferadoras de peroxisomas (PPAR), en su dos isoformas PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2 suprimen la diferenciación de osteoblastos y aumenta la expresión de RANKL con resultado de incremento de osteoclastogénesis, con un incremento en la resorción ósea.

Las incretinas, los péptidos similares al glucagón (GLP-1, GLP-2) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), en México el único comercializado es la liraglutida, se ha demostrado que tanto los osteoblastos como los osteoclastos expresan receptores para las incretinas GIP y GLP, los estudios clínicos aún no son concluyentes en algunos estudios se reporta que la liraglutina reduce el riesgo de fracturas vertebrales y la exenatida aumenta el riesgo, en estudios preclínicos con modelos experimentales mostraron que la exendina-4 inhibió la resorción ósea al aumentar RANKL y promovió la formación ósea debido a los osteoblastos.<sup>55</sup>

En modelos celulares experimentales de osteoblastos, cuando los estimularon con GIP, se reportó un incremento de hasta un 40% de la inducción de la expresión de c-Fos y si se agregaba ATP extracelular se incrementaba 4 veces la inducción.<sup>56,57</sup>

## **2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las fracturas óseas son una de las patologías más frecuentes, así como la creciente prevalencia de la DM2 con sus respectivas complicaciones, ambas situaciones clínicas reunidas en un paciente pueden conducir a una alteración en la cicatrización ósea, incrementando el tiempo de su curación.

Muchos de los estudios de las vías metabólicas y genéticas de la cicatrización ósea han permanecido en estudios experimentales con resultados heterogéneos.

El gen *c-fos* es un proto oncogén de acción inmediata temprana, que en la cicatrización ósea participa principalmente en la osteoclastogénesis, tanto en la diferenciación como en la activación de osteoclastos ya maduros, se ha observado que este gen es inducido por productos finales de la glicación avanzada (eje AGEs-RAGE) en estados de hiperglicemia persistente, este gen asimismo tiene sitios específicos en la zona promotora de las MMP-3 y MMP-9. Por lo que en estados de hiperglicemia persistente la vía AGEs-RAGE induce la expresión de *c-fos* y este la de las MMP-3 y MMP-9, dan por resultado a un aumento de la osteoclastogénesis, que condiciona resorción ósea, y el incremento de MMP-9 inhibe significativamente la migración y proliferación celular, con una degradación excesiva de la matriz extracelular.

La regulación a la alza de estos tres genes *c-fos*, MMP-3 y MMP-9 por los productos finales de la glicación avanzada, daría por resultado a una mayor resorción ósea por aumento de la osteoclastogénesis, alteración en la migración y proliferación celular en el sitio de fractura y una degradación excesiva de la matriz extracelular, da como resultado un aumento del tiempo de la cicatrización ósea. Por lo que en esta investigación se analiza los patrones de expresión de estos tres componentes en pacientes con fracturas, con DM2 estados de hiperglicemia persistente y pacientes sin DM2 normoglucémico.

## **3.- JUSTIFICACIÓN**

Con este estudio se quiere explorar la expresión del gen *c-fos* y de las Metaloproteinasas 3 y 9 en fracturas en pacientes con DM2 en estados hiperglicémicos persistentes, así como en pacientes sin DM2 normoglucémicos, ya que hasta este momento los únicos estudios en este tema se han realizado

en modelos experimentales murinos y celulares, con gran heterogenidad de resultados. Estos han encontrado un incremento de su expresión, debido a los productos finales de la glicación avanzada en estados hiperglucémicos, lo que pudiera ser una vía importante para el retardo en la cicatrización ósea en los pacientes con DM2, de esta manera se generara conocimiento en la expresión de estos genes *in vivo* con humanos.

#### **4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existirá una expresión a la alza de c-fos, MMP-3 y MMP-9 en pacientes con DM2 en un estado hiperglicémico persistente con fracturas en comparación con pacientes no DM2 normoglicémicos?

#### **5. HIPÓTESIS**

**Si** existe un estado hiperglicémico persistente en los pacientes con DM2 al sufrir una fractura, **entonces** se observará un perfil de expresión de c-FOS y MMP-3, MMP-9 mayor que pacientes normoglicémicos sin DM2.

#### **6.- OBJETIVOS**

##### **6.1. GENERAL:**

Analizar los patrones de expresión del gen c-fos, y las MMP-3 y MMP-9 en fracturas de pacientes con DM2 y pacientes normoglicémicos sin DM2.

##### **6.2. ESPECÍFICOS:**

- Analizar el nivel de expresión de *c-fos* con relación a los días transcurridos de la fractura a la toma de la biopsia.
- Analizar la relación de la hemoglobina glicosilada con el nivel de expresión de *c-fos*, *MMP-3* y *MMP-9*.
- Analizar la relación de la expresión de *c-fos* con el nivel de expresión de *MMP-3* y *MMP-9*
- Analizar la relación de la expresión de la *MMP-3* con el nivel de expresión de *MMP-9*

## **7.- MATERIAL Y MÉTODO:**

### **7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO:**

- Observacional.
- Descriptivo.
- Transversal.
- Comparativo.

### **7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO:**

- Pacientes que ingresan al servicio de urgencias médicas de un hospital de segundo nivel de población abierta de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México con diagnóstico de fractura cerrada.

### **7.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

Al ser un estudio exploratorio y al no existir estudios previos de este tipo se consideró una muestra a conveniencia para la investigación

- 5 Pacientes con fractura cerrada y DM2 con estado hiperglicémico persistente.
  - 5 Pacientes con fractura cerrada sin DM2.
  - Total de 10 pacientes se integraron al estudio.
- 
- Con un cálculo del tamaño de la muestra para dos grupos independientes de acuerdo a una proporción donde no se cuenta previamente un estudio sobre nuestras variables dependientes a estudiar en fracturas, con una proporción esperada del 50% con el software *G-Power Version 3.1.9.7 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)*, con un tamaño del efecto de 0.5, un error  $\alpha$  de 0.05, un poder  $b$  de 0.80, sería cada grupo de 64 pacientes en un total de 128 pacientes.

#### 7.4 VARIABLES INDEPENDIENTES:

INDEPENDIENTES	DEFINICIÓN TEÓRICA	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	UNIDADES
<b>GLUCOSA EN SANGRE</b>	Medida de concentración de glucosa libre en una muestra de sangre en ayuno.	Examen preoperatorio	Cuantitativa	Continua	mg/dl
<b>HBA1c</b>	Medida de la concentración de heteroproteína, de la unión de la hemoglobina con glúcido	Examen preoperatorio	Cuantitativa	Continua	%
<b>TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA FRACTURA</b>	Tiempo transcurrido desde la pérdida de la continuidad ósea hasta la osteosíntesis	Tiempo transcurrido desde la fractura hasta la toma de la muestra.	Cuantitativa	Discontinua	Días

#### 7.5 VARIABLES DEPENDIENTES:

DEPENDIENTES	DEFINICIÓN TEÓRICA	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	UNIDADES
<b>c-Fos</b>	Protooncogen celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión rápida	Expresión del protooncogén	Cuantitativa	Continua	Folds
<b>METALOPROTEINASA 9</b>	Enzima proteasa, que requiere metales para su actividad, participan en la formación de la matriz extracelular	Expresión de la gelatinasa.	Cuantitativa	Continua	Folds
<b>METALOPROTEINASA 3</b>	Enzima proteasa, que requiere metales para su actividad, participan en la formación de la matriz extracelular	Expresión de la estromelinasa.	Cuantitativa	Continua	Folds

## **7.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- Pacientes con fractura cerrada.
- Paciente que acepto tratamiento quirúrgico con reducción abierta y fijación interna con material de osteosíntesis.
- Paciente que firmo el consentimiento informado y acepté la toma de biopsia del callo óseo.
- Mujeres con postmenopausia sin tratamiento de reemplazo hormonal.
- Paciente que se integraron como caso: DM2 con  $Hb1Ac \geq 7.5\%$
- Paciente que se integraron como control: sin DM2 normoglicémico
- 

## **7.7 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Tener enfermedades inflamatorias o inmunológicas que requieran tratamiento inmunomodulador o esteroideo.
- Infección de tejidos blandos.
- Enfermedad conocida o con sintomatología paratiroidea.
- Tratamiento de reemplazo hormonal por menopausia.
- Tratamiento con liraglutida (Tiazolidinediona).
- 

## **7.8. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:**

- Muestra insuficiente; determinada por la pureza, integridad y cuantificación del RNA (según las características determinadas en el apartado 7.9.2.2 de Procedimientos)

## **7.9 TÉCNICAS DE LABORATORIO:**

### **7.9.1 PACIENTES – RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS**

- a) El procedimiento debe realizarse en condiciones libres de ARNasa. Usar guantes estériles en todo momento, para manipular la muestra, los tubos estériles, los reactivos y el instrumental.
- b) Durante el procedimiento quirúrgico, el cirujano, al realizar la limpieza de los extremos óseos a coaptar, procede a legar, retirando callo óseo con fragmento óseo, el cual se desecha como rutina.
- c) El tejido proporcionado por el cirujano en un recipiente estéril, se le realiza lavado con solución salina 0.9% para retirar sangre.

- d) Con pinzas Adson estériles se coloca la 0.3 gr. de muestra en el tubo Eppendorf con 700  $\mu$ l de solución de TRIzol.
- e) Colocar el tubo en una hielera con refrigerantes para transportarlo.
- f) Congelar la muestra a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta ser transportado al laboratorio de Biología Molecular del HGMEI en un lapso no mayor de 48 horas.

## **7.9.2 ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR:**

### **7.9.2.1 Extracción de ácidos nucleicos del hueso fresco.**

- a) Descongelar sobre hielo la muestra previamente conservada en el tubo Eppendorf con 700  $\mu$ l de TRIzol.
- b) Añadir 200  $\mu$ l de cloroformo y resuspender durante 15s y reposar por 5 min.
- c) Centrifugar a 11500 RPM por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- d) Se forman tres capas; la capa acuosa superior (transparente) contiene el RNA, fase intermedia blanca que contiene proteínas y lípidos y la fase rosa/purpura que contiene restos de tejido y DNA.
- e) Aspirar con cuidado el sobrenadante (transparente), transferir toda la fase acuosa en un tubo nuevo.
- f) Agregar 350  $\mu$ l de Isopropanol y mezclar suavemente.
- g) Incubar la muestra a temperatura ambiente durante 15 min para precipitar el RNA.
- h) Centrifugar a 11,500 RPM por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- i) Retirar sobrenadante, manteniendo mucha precaución de conservar el pellet.
- j) Lavar el pellet conservado en el tubo añadiendo 500  $\mu$ l de Etanol 75% previamente enfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- k) Centrifugar a 8000 RPM por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$
- l) Retirar sobrenadante, manteniendo extremo cuidado con el pellet.
- m) Secar a temperatura ambiente hasta que no existan rastros del etanol.
- n) Disolver el pellet y dispersar con la micropipeta en 30  $\mu$ l agua libre de nucleasas y almacenar a  $-30 - 70^{\circ}\text{C}$

### **7.9.2.2. Evaluación de la pureza y cuantificación del RNA.**

- a) Con el espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX se coloca 1µl de la muestra.
- b) El espectrofotómetro permite la cuantificación y proporciona un escaneo espectral que se puede usar para detectar contaminación por proteínas o solventes.
- c) El espectrofotómetro realiza la cuantificación en ng/µl
- d) La absorbancia para determinar contaminantes será la lectura de la densidad óptica en A260/A280, la cual debe ser de  $>1.7 <2.0$

### **7.9.2.3. Evaluación de la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa.**

- a) Se analiza la degradación del ARN ribosomal de 18s y 28s en un gel de agarosa.
- b) Se evalúa la ausencia de “manchas” de las bandas del RNA
- c) Se prepara un gel de agarosa al 1% en Buffer TAE 1x más intercalante de Midori green.
- d) Mezcla 1 µl de RNA + 1µl de buffer de carga con tampón de carga y caliente a 65°C durante 5 min.
- e) Se ejecuta a 10V por cm entre electrodos en el tanque de electroforesis.
- f) Se visualizan las bandas en el gel en un transiluminador UV con cámara digital.

### **7.9.2.4. Síntesis de cDNA con el Kit de transcripción QuantiTect Rev. (50) de QIAGEN**

- 1. Eliminación de DNA genómico
  - a) Buffer de lavado de gDNA (7xGA) 2µl
  - b) RNA (> 1ng)
  - c) Agua libre de ARNasa
  - d) Volumen total de reacción 14 µl



- e) Incubar 42°C por 5 minutos y luego colocarlo inmediatamente en hielo
- 2. Reacción de transcripción inversa
  - a) Se prepara y se trabaja la mezcla maestra de transcripción inversa en hielo.
  - b) Transcriptasa inversa Quatiscript 1µl
  - c) Buffer Quantiscript RT 5x (contiene Mg<sup>2+</sup> y dNTPs) 4 µl
  - d) RT Primer Mix 1 µl
  - e) RNA 14µl
  - f) Volumen final de la reacción 20 µl
  - g) Incubar en el termociclador durante 15 min a 42°C
  - h) Incubar en el termociclador durante 3 min a 95°C para inactivar la transcriptasa inversa.
  - i) Evaluación de la pureza y cuantificación del cDNA por espectrofotometría.
  - j) Realizar una dilución con 90 µl de agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 120µl.
  - k) Colocar en hielo y proceder a realizar qPCR.
  - l) Se puede almacenar a -20°C

**7.9.2.5. Re suspensión y almacenamiento de los oligonucleótidos (sondas).**

- a) Centrifugar el tubo para asegurar que su contenido se encuentra en el fondo.
- b) Agregar agua inyectable.
- c) Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- d) Almacenarlos a -4°C.

**7.9.2.6. Pre-amplificación de cDNA por RT-PCR (PCR punto final)**

- a. Se realiza una mezcla para cada muestra estudiada y para cada uno de los genes a determinar su expresión. (c-Fos, MMP-3, MMP-9 y el gen normalizador GAPDH)
- b. Agua molecular 13.9µl

- c. Buffer 5  $\mu$ l
- d.  $Mg^{2+}$  1.5  $\mu$ l
- e. dNTPs 0.3  $\mu$ l
- f. Oligonucleótidos (sondas) reconstituidos (Tabla 1)
  - i. Forward 1  $\mu$ l
  - ii. Revers 1  $\mu$ l
- g. cDNA 2  $\mu$ l
- h. Polimerasa 0.3  $\mu$ l
- i. Volumen final 25  $\mu$ l
- j. Las condiciones del termociclador (MaxyGene II de Axygen) fueron con las siguientes características: 5 min a 96°C continuando con 8 ciclos de 60°C por 40 s, 72°C por 5 min, 4°  $\infty$ .
- k. Con el producto se realiza qPCR o se almacena a -20°C.

#### **7.9.2.7. qPCR SYBR Green I (PCR Tiempo real)**

- a. En una placa de reacción para qPCR se utilizará un posillo para la determinación de cada uno de los genes a determinar más el control negativo para cada una de las muestras. Un total de 50 posillos para la determinación.
- b. En cada posillo se colocará con un volumen final de 10  $\mu$ l
  - i. SYBER Green I 5  $\mu$ l
  - ii. Agua inyectable 3  $\mu$ l
  - iii. Oligonucleótido
    - 1. Forward 0.5  $\mu$ l
    - 2. Revers 0.5  $\mu$ l
  - iv. cDNA templado de la pre-amplificación 1  $\mu$ l
- c. Las condiciones del termociclador (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System de BIO-RAD) con las siguientes características: 95°C por 3 min posterior con 40 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 30 s.

Tabla 1. Gen y nucleotidos empleados

GEN	REFERENCIA NCBI	SECUENCIA DEL CEBADOR	
c-Fos	NM_005252	FORWARD	GAGAGCTGGTAGTTAGTAGCATGTTGA
		REVERSE	AATCCAATAATGAACCCAATAGATTAGTTA
MMP-3	NM_002422	FORWARD	GCCAGGGATTAATGGAGATG
		REVERSE	GAGTGCTCCAGGGTCCTT
MMP-9	NM_004994	FORWARD	GGTGATTGACGACGCCTTTG
		REVERSE	CTGTACACGCGAGTGAAGGT
GABDH	NM_002046	FORWARD	TGGCATATCTCTTATTAAGGGGG
		REVERSE	ACTTCTCATCAGCCACCTCG

### 7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la prueba de normalidad de la distribución de las variables con la prueba Kolmogorov-Smirnov, la comparación de dos grupos independientes de los niveles de expresión de RNAm se llevó a cabo con la prueba de Mann-Whitney. La correlación entre la expresión entre los genes y con el porcentaje de hemoglobina glicosilada, los días transcurridos de inicio de la fractura y entre cada gen se estimó por la prueba de Spearman. El límite de significancia se fijó en 5%  $p < 0.05$ , al haber planteado una hipótesis de dos colas se usa la significancia bilateral. (El análisis de datos se realizó con el software SPSS, versión 26 SPSS, Chicago, IL, EE. UU.).

## 8.- RESULTADOS.

### 8.1 PACIENTES

En el estudio se incluyeron 10 pacientes, estos fueron 5 pacientes en el grupo de casos, caracterizados por tener una fractura ósea y DM2 con una hemoglobina glicosilada mayor de 7.5 %, considerado como un estado hiperglicémico persistente, (3 mujeres y 2 hombres, 34 a 87 años; media  $16 \pm$  DE,  $62.2 \pm 19.7$  años) y 5 pacientes en el grupo control caracterizados por presentar fractura ósea y no tener DM2 (1 mujer y 4 hombres, 41 a 70 años; media  $\pm$  DE,  $52.4 \pm 11.3$  años), ambos grupos fueron homogéneos y no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.320$ ) por lo que se consideran comparables. Los pacientes fueron incluidos de manera consecutiva en un lapso de 8 meses, se reclutaron en un hospital de segundo nivel de población abierta de la Ciudad de México.

El tiempo de evolución de la fractura fue para el grupo de casos de 8 a 35 días (media  $\pm$  DE , $14.4 \pm 11.5$ ) y el grupo control de 6 a 37 días (media  $\pm$  DE , $16.8 \pm 12.5$ ), ambos grupos fueron homogéneos y no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.805$ ).

Tabla 2. Características demográficas por grupos.

	CONTROL n= 5	CASOS n= 5	$p < 0.05$
<b>EDAD (años)</b>	$52.4 \pm 11$	$62.2 \pm 19.7$	0.320
<b>SEXO (M/H)</b>	1/4	3/2	-
<b>DIAS FRACTURADO</b>	$16.8 \pm 12.5$	$14.4 \pm 11.5$	0.805

Los valores son media  $\pm$  desviación estándar.

### 8.2 CARACTERÍSTICAS GLUCÉMICAS

Uno de los objetivos de esta investigación fue conocer el impacto de la expresión de los genes de c-fos, MMP-3 y MMP-9 en el trayecto de la cicatrización ósea en pacientes con DM2 con estado hiperglicémico persistente en comparación con pacientes sin DM2 normoglicémicos, los resultados se reportan con su mediana

y su desviación estándar: los casos tuvieron  $13.3 \pm 11.3$  años de evolución, los cuales tuvieron una glicemia de  $168.6 \pm 24.1$  mg/dl y una hemoglobina glicosilada de  $8.7 \pm 0.39$  %.

Ambos grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.009$ ), lo que nos permitió inferir, que las diferencias observadas en los patrones de expresión de los genes analizados, están directamente relacionadas con el estado hiperglicémico presentado por los pacientes del grupo de casos, a diferencia del grupo control normoglicémico.

Tabla 3. Concentraciones glucémica por grupos.

	CONTROL n= 5	CASOS n= 5	$p < 0.05^*$
<b>GLICEMIA (mg/dl)</b>	$90.6 \pm 11.2$	$168.6 \pm 24.1$	0.009
<b>HEMOGLOBINA GLICOSILADA (%)</b>	$4.7 \pm 0.43$	$8.7 \pm 0.39$	0.009
<b>AÑOS DE EVOLUCIÓN DM2</b>	0	$13.3 \pm 11.3$	0.005

Los valores son media  $\pm$  desviación estándar.

### 8.3 EXPRESIÓN GÉNICA DE C-FOS, MMP-3 Y MMP-9

La expresión de los genes analizados son unos de los varios participantes en el proceso de la cicatrización ósea, los patrones de expresión, se analizaron por RT- qPCR, el cDNA analizado provino de callo óseo obtenido en el momento de realizar la osteosíntesis de las fracturas. Los valores obtenidos se reportaron en términos de  $\Delta Ct$  de c-Fos, MMP-3 y MMP-9 y se normalizaron con la expresión del gen constitutivo o de referencia GAPDH. Se comparó la expresión por medio del  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  de c-Fos, MMP-3 y MMP-9 entre ambos grupos (Tabla 4). Al encontrarnos con datos con una distribución no normal, se decidió realizar una prueba no paramétrica utilizando la U de Mann-Whitney. Los resultados identificaron diferencias significativas para el gen MMP-3 ( $p=0.025$ ) entre el grupo de casos y control, pero no presentó diferencias estadísticamente significativas para la expresión génica para c-Fos ( $p=0.655$ ) y MMP-9 ( $p=0.180$ ). Debido a que el número muestral para ambos grupos es reducido, al ser un estudio exploratorio, decidimos reforzar nuestros datos y ampliar su análisis, por

lo que recurrimos a la unidad de cambio (Fold change) de la expresión de los genes estudiados (c-fos, MMP-3 y MMP-9) en comparación con el gen constitutivo (GABDH); los pacientes del grupo de casos presentaron mayor expresión en los genes estudiados, esto fue para c-Fos 1.84 veces, más que los controles, MMP-3 10.7 veces mas y MMP-9 5.02 veces más con respecto al grupo control. A pesar de que los cambios en la expresión génica relativa ( $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ), no presentó una diferencia estadísticamente significativa, solo para MMP-3 entre los dos grupos ( $p = 0.025$ ), sí se presentó una regulación a la alza (FC) de estos genes en un estado hiperglicémico persistente, principalmente de las metaloproteinasas.

Tabla 4. Descripción de los niveles de RNAm por grupos para c-Fos, MMP-3, MMP-9

	CONTROL n= 5	CASOS n= 5	$p < 0.05^*$	FC
<b>c-Fos</b>	0,520 (0.090 – 0.520*)	2.12 (0.685 – 8.445**)	0.655	1.84
<b>MMP-3</b>	0.960 (0.330 – 0.960*)	12.3 (5.075 - 22.11**)	0.025	10.7
<b>MMP-9</b>	0.420 (0.350 – 0.420*)	6.08 (1.86 – 12.66**)	0.180	5.02

Todos los valores de RNAm son  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  normalizados a GABDH (FC=1).

Los valores son mediana (percentiles 25, 50\*, 75\*\*)

FC, Fold change

\*Prueba U de Mann-Whitney

Con la finalidad de observar la influencia de la expresión de c-fos sobre las metaloproteinasas y la asociación de c-fos con los días transcurridos de la fractura, se procedió a realizar la prueba de Spearman.

En cuanto a la asociación con c-fos y MMP-3 y MMP-9 no existió asociación estadísticamente significativa, tanto en casos como en controles. Por el contrario, y de manera interesante, se encontró asociación con el nivel de expresión de MMP-3 y MMP-9 ( $p=0.000$ ,  $Rho=1$ ) en el grupo control, no así en los casos. En cuanto al nivel de asociación con la expresión de c-Fos en relación

con los días transcurridos de inicio de la fractura y, por lo tanto, en el proceso de la cicatrización ósea, en la prueba estadística de Spearman existe una asociación positiva ( $p=0.000$  Rho= 1) en los controles, y una asociación negativa en los casos ( $p=0.005$  Rho= -0.975) (Figura 5).

Tabla 5. Correlación de niveles de RNAm de c-Fos/MMP-3, c-Fos/MMP-9, MMP-3/MMP-9, DFx/c-Fos.

	CONTROL n= 5		CASOS n= 5	
	$p$	Rho	$p$	Rho
<b>c-Fos/ MMP-3</b>	0.667	(0.500)	0.873	(-0.100)
<b>c-Fos/ MMP-9</b>	0.667	(0.500)	0.285	(0.600)
<b>MMP-3/MMP-9</b>	0.000**	(1.0)	0.188	(0.700)
<b>DFx/c-Fos</b>	0.000**	(1.0)	0.005*	(-0.975)

Todps los valores de RNAm se normalizaron a GABDH.

Las comparaciones se evaluaron mediante la prueba de Spearman.

En parentesis el nivel de correlación de Spearman (Rho) \*  $p<0.05$  \*\*  $p<0.01$

$p<0.05$

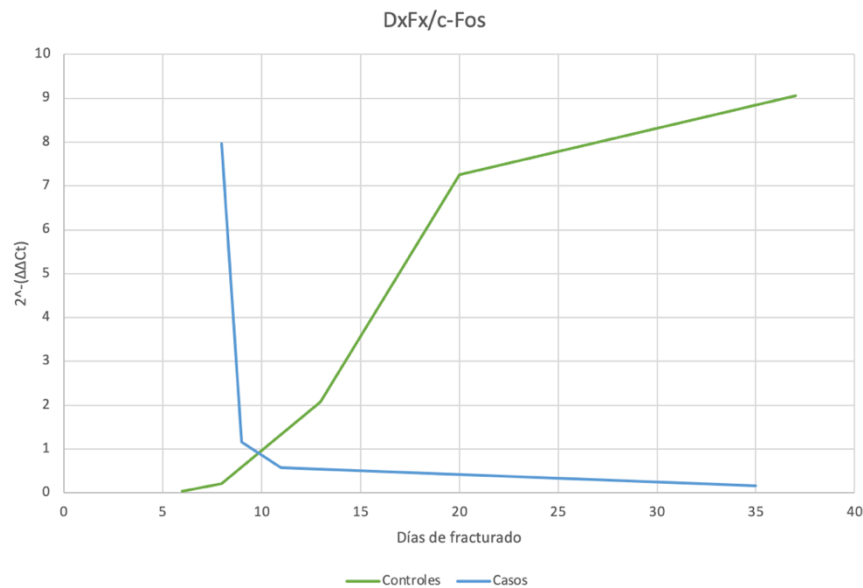


Figura 5.- Asociación con los días transcurridos de la fractura con la expresión de c-fos.

Para estudiar el efecto del estado hiperglicémico persistente, considerado por el porcentaje de la hemoglobina glicosilada  $\geq$  de 7.5%, se realizó la correlación entre esta y los genes c-fos, MMP-3 y MMP-9. No se encontro asociación con el porcentaje de HB1Ac y la expresión de c-fos y MMP-3 tanto en casos como en

controles. En cuanto a la asociación entre Hb1Ac y MMP-9 se demostró asociación positiva, estadísticamente significativa en los casos ( $p=0.000$  Rho = 1) no así en los controles.

Tabla 6 Correlación de %Hb1Ac con niveles de RNAm c-Fos, MMP-3, MMP-9

	CONTROL n= 5	CASOS n= 5
<b>HB1Ac /c-Fos</b>	0.667 (-0.500)	0.285 (0.600)
<b>HB1Ac/MMP-3</b>	0.667 (0.500)	0.188 (0.700)
<b>HB1Ac/MMP-9</b>	0.667 (0.500)	0.000 (1)**

Todos los valores de RNAm se normalizaron a GABDH.

Las comparaciones se evaluaron mediante la prueba de Spearman,

En parentesis el nivel de correlacion de Sperman (Rho) \*  $p<0.05$  \*\*  $p<0.01$

$p<0.05$

## 8.- DISCUSIÓN.

El crecimiento y mantenimiento de los huesos, así como su cicatrización, depende de la función coordinada de células y de sus mediadores químicos para la diferenciación y activación de estas, <sup>5-7</sup> también son necesarias enzimas proteolíticas para la formación y el recambio de la matriz extracelular ósea, dentro de este grupo de proteínas se encuentran las metaloproteinasas, la MMP-3 y MMP-9 son las principales con efecto directo en la cicatrización ósea. <sup>6, 44, 45, 46, 48</sup> Todos estos procesos son mediados al menos por 24 genes que pueden regular positiva o negativamente estas redes. <sup>8</sup>

Estas redes reguladoras de la cicatrización ósea se ven alteradas en los pacientes con DM2, con un incremento de hasta un 63% en el tiempo de la cicatrización ósea. <sup>14</sup>

Uno de los componentes de estas redes mediadoras es el gen c-fos, el cual participa en la regulación transcripcional de numerosos genes y es fundamental para la formación y maduración de osteoblastos y osteoclastos, así como del mantenimiento y remodelación de la matriz orgánica ósea <sup>24,36-38</sup>

El proto oncogen c-fos se ha estudiado en numerosas investigaciones, tanto en modelos celulares <sup>31,58-60</sup> como murinos, <sup>30,61-64</sup> su diversidad de condiciones establecidas para su desarrollo, han dado variabilidad de resultados, <sup>18</sup> hasta ahora no se ha realizado un estudio de este gen *in vivo* en humanos con fracturas, así como su expresión en estados hiperglicémicos persistentes, por lo



que esta investigación llevó la tarea en estudiar su expresión en esas condiciones.

El hallazgo más importante en el presente estudio fue haber encontrado la expresión de c-fos en todo el trayecto de la cicatrización ósea, principalmente en el grupo normoglicémico (control), esto se observa en la gráfica interponiendo la expresión del gen c-fos en relación con los días transcurridos desde el inicio de la fractura en la que se tomaron las biopsias, estas oscilaron entre el día 6 hasta el 37 y se realizó la comparación entre ambos grupos (Figura 5). Este gen se ha considerado de expresión temprana y transitoria con un pico máximo a los 30-60 minutos posterior del estímulo y llega a ser casi imperceptible a los 120 minutos según Ransone *et al.*,<sup>22</sup> contrariamente a ello se encontró un incremento de la expresión de c-fos, conforme aumentan los días transcurridos desde el inicio de la fractura en los pacientes del grupo control, existiendo una notable diferencia con el grupo de casos con un estado hiperglicémico persistente, donde la mayor expresión de c-fos es solo al inicio de la fractura con un rápido descenso a partir del día 9, este aumento de su expresión inicial es aún mayor que en los controles.

En cuanto al nivel de expresión de c-Fos el FC presentó una expresión a la alza de 1.84 veces más en los casos, esta fue más próximo al inicio de la fractura y fue disminuyendo conforme transcurrían los días, a diferencia de los controles cuya expresión incrementa conforme avanza el tiempo desde el inicio de la fractura, esto se representa en la Figura 5.

La expresión de c-Fos en los casos asemeja a los estudios de Kreisberg *et al.*<sup>59</sup> en un modelo celular, donde demostró que concentraciones elevadas de glucosa incrementan la expresión de c-fos, hasta 48 h posterior a la adición de glucosa al cultivo celular. Uno de los posibles factores de esta alza en los estados hiperglicémicos persistentes podría ser la producción de radicales libres y AGEs<sup>15</sup> así como la activación de las vías proinflamatorias, con la producción de factor nuclear- $\kappa$ B, la proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK), produciendo una inflamación crónica de bajo grado,<sup>65</sup> y estos factores son iniciadores para la expresión de c-fos<sup>18</sup> (Figura 1), lo que puede dar una mayor expresión de c-fos en los primeros días de la fractura, en los pacientes del grupo

de casos, debido a que ellos tienen de forma basal una concentración mayor de factores inductores de c-fos.

En los casos, se presentó un descenso de la expresión de c-fos, después del día 9, lo que concuerda con los estudios de Ohta S, Yamamuro *et al.*, en un modelo murino, el cual no encontraba su expresión en el callo blando posterior a los 7 días, y una disminución significativa después de los 12 días en el callo duro, <sup>24</sup> existió una diferencia en los controles, donde se observó un incremento de la expresión de este gen, esto considerablemente a partir del día 20, que de acuerdo con el proceso de la cicatrización ósea, en este periodo de tiempo, ya se está formado el hueso intramembranoso,<sup>5</sup> el cual tiene mayor capacidad para una respuesta de carga, Peake *et al.* y Liedert *et al.*, encontraron en células óseas, que la aplicación de tensión en el citoesqueleto se producía una regulación positiva de la expresión de c-fos. <sup>39,41</sup>

Lo anterior se corroboró por medio del estudio de correlación de Spearman donde se observó en los casos una asociación negativa de los días transcurridos con la expresión de c-Fos ( $p = 0.005$  Rho= -0.975) y una asociación positiva en los controles ( $p=0.000$  Rho= 1). Con el antecedente de que el 86% de los pacientes con DM2 presentan un incremento del tiempo de la cicatrización ósea.<sup>14</sup> La divergencia que presentan las curvas de la expresión de c-fos en la línea del tiempo (Figura 5) entre los casos y controles, la asociación negativa en los casos y la positiva en los controles, podemos proponer, que el grupo de casos presenta un retraso en la cicatrización ósea y con ello a una falta de respuesta a la carga en el sitio de fractura con una menor expresión de c-Fos, como propone Peake *et al.* y Liedert *et al.*, en modelo celular, nosotros lo corroboramos *in vivo*.

Unos de los componentes importantes para la cicatrización ósea, son las metaloproteinasas, las cuales participan en el recambio activo de la matriz extracelular, angiogénesis y quimiotaxis celular.<sup>51</sup> Esta investigación incluyó dos tipos, la MMP-3 y la MMP-9.

Se encontró una expresión a la alza de estas dos enzimas proteolíticas, MMP-3 tuvo una expresión 10.7 (FC) veces mayor en los casos que en los controles (mediana Controles = 0.420 Casos = 6.08  $p=0.180$ ) (Tabla 4), esta es producida principalmente por los osteoblastos, degrada proteoglicanos y participa en la

resorción ósea, principalmente por la activación de los osteoclastos según los reportes de Jeahn F *et al.* <sup>42</sup>

Kupczyk *et al.*, describieron que esta metaloproteinasa se presenta en altas concentraciones en heridas de difícil cicatrización, como en pacientes con DM2, <sup>66</sup> lo que puede explicar la expresión a la alza, en los pacientes con estado hiperglicémico persistente del grupo de casos, esto conduce a un aumento de la resorción ósea en el sitio de fractura retardando el proceso de cicatrización.

En cuanto a la MMP-9 tuvo una expresión a la alza en los casos de 5.02 (FC) veces mayor que en los controles (mediana; Controles = 0.960 Casos = 12.3  $p=0.180$ ), aunque el incremento en su  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  no fue estadísticamente significativo, esta metaloproteinasa se expresa principalmente en osteoclastos, la cual elimina el cartílago y produce angiogénesis, esta elevación concuerda con Zhang *et al* <sup>54</sup> donde establece que los productos finales de glucosilación avanzada (AGEs) incrementan la expresión de MMP-9, con alteraciones en la cicatrización en los pacientes con estados hiperglicémicos persistentes, este hecho se comprobó con el estudio de correlación de Spearman, el cual tuvo una asociación positiva entre el porcentaje de la Hb1Ac y la expresión de MMP-9 ( $p=0.000$  Rho= 1).

Se ha establecido que la MMP-9 tiene un sitio promotor para MMP-3 que regula su expresión,<sup>43</sup> para comprobar esto se hizo un estudio de asociación de Spearman, donde se encontró que en el grupo control existió asociación de la expresión de MMP-3 y MMP-9 ( $p= 0.000$  Rho= 1), no así en los casos ( $p=0.188$  Rho 0.700), esto puede deberse a que la regulación de MMP-9 en los casos es más por vías de los AGEs, <sup>67</sup> que por la MMP-3 de forma directa como se observó en los controles.

Estas dos metaloproteinasas tienen una región de activación postranscripcional por c-fos,<sup>50,51</sup> no se encontró asociación entre la expresión de c-fos con MMP-3 y MMP-9, tanto en el grupo de casos como de controles (Tabla 5), ya que estas presentaron una expresión a la alza en el grupo de casos (Tabla 4), lo que nos hace pensar que la vía de su activación es principalmente por los AGEs y la vía de MAPK <sup>53</sup> en los pacientes con un estado hiperglicémico persistente.

## 10.- CONCLUSIONES

- La investigación fue un estudio exploratorio, ya que hasta ahora todos los estudios realizados habían sido con modelos experimentales, no existían análisis directamente en humanos, por lo que el número muestral fue reducido en ambos grupos, nuestros datos nos permitieron sugerir diferentes hechos biológicos en la expresión de los genes estudiados, tanto en un estado normoglicémico como en un estado hiperglicémico persistente, estas observaciones nos permitirán realizar un cálculo muestral más adecuado, para un estudio que nos permita confirmar con mayor fiabilidad estadística nuestros actuales hallazgos.
- El protooncogen c-fos a pesar de ser considerado un gen de expresión temprana y transitoria, en el proceso de la cicatrización ósea en humanos, se encontró en todo el trayecto de la consolidación ósea en pacientes normoglicémicos.
- Existe una asociación positiva con el incremento de la expresión de c-fos con los días transcurridos desde el inicio de la fractura en los pacientes normoglicémicos, y una asociación negativa en los pacientes con estado hiperglicémico persistente.
- Se comprobó que existe una expresión a la alza de los genes c-fos, MMP-3 y MMP-9, en los pacientes con un estado hiperglicémico persistente en la cicatrización ósea.
- Se encontró que en los pacientes normoglicémicos existe una asociación positiva con la expresión de MMP-3 y MMP-9.
- Se determinó una asociación positiva con el porcentaje de la Hb1AC y la expresión a la alza de MMP-9.

## 11.- ÉTICA Y DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES:

El estudio fue realizado de acuerdo con las normas éticas de las Declaraciones de Helsinki y Estambul, y fue aprobado por el *Comité de Ética en Investigación de la Secretaría de Salud de la CDMX* el 14 de mayo 2021 No. de registro 1001-010-007-2.

Se consideró un estudio de riesgo mínimo, ya que lo que corresponde como muestra, es el callo óseo blando, que siempre se desecha al realizar el procedimiento de osteosíntesis. No se realizó ningún procedimiento expresamente para la toma de muestra, solo los pacientes ya protocolizados debidamente por el cirujano, para realizar osteosíntesis.

Se invitó a los pacientes a participar en la investigación, explicando el fin de la misma, el procedimiento y la confidencialidad de sus datos. Todos firmaron el consentimiento bajo información.

Ninguno de los participantes de esta investigación tuvo intereses económicos externos

## 12.- BIBLIOGRAFIA

1. INEGI. Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social. INEGI. 2003;20.
2. Tecnico, Honorable Consejo MtroMARC. Costos Unitarios por Nivel de Atención Médica actualizados al año 2023. Diario Oficial de la Federación [Internet]. 2023;1–5. Available from: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5672661&fecha=29/11/2022#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5672661&fecha=29/11/2022#gsc.tab=0)
3. Secretaria de Salud Ciudad de Mexico. Egenda Estadística 2018. 2018; Available from: <https://www.salud.cdmx.gob.mx/storage/app/media/Agenda2018.pdf>
4. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. Vol. 13, Current Osteoporosis Reports. 2015. p. 327–35.
5. Paiva KBS, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. Arch Biochem Biophys. 2014 Nov 1;561:74–87.

6. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2002;2(4):389–406.
7. Sun Y, Li J, Xie X, Gu F, Sui Z, Zhang K, et al. Recent Advances in Osteoclast Biological Behavior. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(December):1–19.
8. Boyle WJ, Simonet WS LDL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* [Internet]. 2003;423:337–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature01658>
9. Reveles F, Reyes R, Tlapale Vázquez Diseño formación A, Pablo Luna J, Montiel A. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. 2021.
10. Dhatariya KK, Li Ping Wah-Pun Sin E, Cheng JOS, Li FYN, Yue AWY, Gooday C, et al. The impact of glycaemic variability on wound healing in the diabetic foot – A retrospective study of new ulcers presenting to a specialist multidisciplinary foot clinic. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Jan 1;135:23–9.
11. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2008 Oct 9;359(15):1577–89.
12. Association AD. Standards of Medical Care in Diabetes—2022 Abridged for Primary Care Providers. *Clinical Diabetes* [Internet]. 2022 Jan 1;40(1):10–38. Available from: <https://doi.org/10.2337/cd22-as01>
13. Sikaris K. The Correlation of Hemoglobin A1c to Blood Glucose. *J Diabetes Sci Technol* [Internet]. 2009;3(3):429–38. Available from: [www.journalofdst.org](http://www.journalofdst.org)
14. Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1988;232:210–6. Available from: [clinorthop/Abstract/1988/07000/The\\_Influence\\_of\\_Diabetes\\_Mellitus\\_on\\_the\\_Healing.28.aspx](http://clinorthop/Abstract/1988/07000/The_Influence_of_Diabetes_Mellitus_on_the_Healing.28.aspx)
15. Takenaka K, Yamagishi S ichi, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T. Role of Advanced Glycation End Products (AGEs) in Thrombogenic Abnormalities in Diabetes. *Curr Drug Targets*. 2011;12(14):2096–102.
16. Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF $\alpha$  potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology*. 2002;143(3):1108–18.
17. Verma M, Sassone-Corsi P. Proto-Oncogene fos: Complex but Versatile Regulation. *Cell*. 1987;51(4):513–4.
18. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002;4(5):E131–6.
19. Piechaczyk M, Blanchard JM. C-Fos Proto-Oncogene Regulation and Function. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. 1994;17(2):93–131.
20. Dalhäuser AK, Rössler OG, Thiel G. Regulation of c-Fos gene transcription by stimulus-responsive protein kinases. *Gene*. 2022 May 5;5(821):146–284.

21. Trouche D, Robin P, Sassone-Corsi P, Farrar WL, Harel-Bellan A. The Dyad Symmetry Element Is the Molecular Target for c-fos Induction and Inhibition During K 562 Differentiation Along Mutually Exclusive Lineages. *Blood* [Internet]. 1991;77(1):55–63. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/77/1/55/604265/55.pdf>
22. Ransone LJ, Verma IM. Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol* [Internet]. 1990;6:539–57. Available from: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
23. Hu E, Mueller E, Oliviero S, Papaioannou VP, Johnson R, Spiegelman BM. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO Journal*. 1994;13(13):3094–103.
24. Ohta S, Yamamuro T, Lee K, Okumura H, Kasai R, Hiraki Y, et al. Fracture healing induces expression of the proto-oncogene c-fos in vivo Possible involvement of the Fos protein in osteoblastic differentiation. *FEBS Lett*. 1991;284(1):42–5.
25. Lee K, Deeds JD, Chiba S, Un-No M, Bond AT, Segre G v. Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: In situ localization of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids. *Endocrinology*. 1994;134(1):441–50.
26. Aslan D, Andersen MD, Gede LB, de Franca TK, Jørgensen SR, Schwarz P, et al. Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. Vol. 72, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2012. p. 14–22.
27. Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(SUPPL. 2):40–2.
28. Thiel G, Wagner L, Ulrich M, Rössler OG. Immediate-early transcriptional response to insulin receptor stimulation. *Biochem Pharmacol*. 2021 Oct 1;192(114696).
29. Müller I, Endo T, Thiel G. Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. *J Cell Biochem*. 2010 Aug 15;110(6):1481–94.
30. Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, et al. Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci*. 2012;125(12):2910–7.
31. Matsuo K, Ray1 N. Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c-Fos: new insight into osteoimmunology. *Keio J Med*. 2004;53(2):78–84.
32. Hu Z, Ma C, Liang Y, Zou S, Liu X. Osteoclasts in bone regeneration under type 2 diabetes mellitus. *Acta Biomater*. 2019;84:402–13.
33. Kim SJ, Kahn CR. Insulin stimulates phosphorylation of c-Jun, c-Fos, and Fos-related proteins in cultured adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(16):11887–92.
34. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- $\kappa$ B-mediated regulation of osteoclastogenesis. *Endocrinology and Metabolism*. 2015;30(1):35–44.

35. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251–64.
36. Fernández Tresguerres I, Alobera Gracia M, Canto Pingarrón M, Blanco Jérez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 2006;11(1):47–51.
37. Meyrueis JP, Cazenave A. Consolidación de las fracturas. EMC - Aparato Locomotor [Internet]. 2004;37(3):1–19. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-935X\(04\)70532-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-935X(04)70532-8)
38. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(2):92–8.
39. Peake MA, Cooling LM, Magnay JL, M Thomas PB, el Haj AJ. Selected Contribution: Regulatory pathways involved in mechanical induction of c-fos gene expression in bone cells. *J Appl Physiol* [Internet]. 2000;89(6):2498–507. Available from: <http://www.jap.org>
40. Zhou L, Xue C, Chen Z, Jiang W, He S, Zhang X. c-Fos is a mechanosensor that regulates inflammatory responses and lung barrier dysfunction during ventilator-induced acute lung injury. *BMC Pulm Med*. 2022 Dec 1;22(9).
41. Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct 13;349(1):1–5.
42. Jehan F, Zarka M, de la Houssaye G, Veziere J, Ostertag A, Cohen-Solal M, et al. New insights into the role of matrix metalloproteinase 3 (MMP3) in bone. *FASEB Bioadv*. 2022 Aug 1;4(8):524–38.
43. Galleguillos C. M, Carrillo G. R, Flores G, Adarmes A. H. Metaloproteinasas y Osteoartritis. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2013;28(1):19–24.
44. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*. 1998;93(3):411–22.
45. Tokuhara CK, Santesso MR, de Oliveira GSN, Ventura TMDS, Doyama JT, Zambuzzi WF, et al. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. *Journal of Applied Oral Science*. 2019;27:e20180596.
46. Colnot C, Thompson Z, Micalu T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*. 2003 Sep;130(17):4123–33.
47. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD Ia, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 2;21(24):1–53.
48. Ganguly SS, Hostetter G, Tang L, Frank SB, Saboda K, Mehra R, et al. Notch3 promotes prostate cancer-induced bone lesion development via MMP-3. *Oncogene*. 2020;39(1):204–18.



49. Zhang Q, Gong W, Ning B, Nie L, Wooley PH, Yang SY. Local gene transfer of *opg* prevents joint damage and disease progression in collagen-induced arthritis. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
50. Ye G, Feng Y, Mi Z, Wang Du, Lin S, Chen F, et al. Expression and functional characterization of *c-fos* gene in chinese fire-bellied newt *cynops orientalis*. *Genes (Basel)*. 2021;12(2):1–11.
51. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* [Internet]. 2010;1803(1):3–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.07.004>
52. Mishra M, Flaga J, Kowluru RA. Molecular Mechanism of Transcriptional Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 in Diabetic Retinopathy. *J Cell Physiol*. 2016;231(8):1709–18.
53. Lang J, Yang C, Liu L, Li L, Wu L, Liu Y, et al. High glucose activates ERK1/2 to stabilize AP1 and increase MMP9 expression in diabetic foot ulcers. *Exp Cell Res*. 2021;403(1):2–8.
54. Zhang J, Yang C, Wang C, Liu D, Lao G, Liang Y, et al. AGE-induced keratinocyte MMP-9 expression is linked to TET2-mediated CpG demethylation. *Wound Repair and Regeneration*. 2016 May 1;24(3):489–500.
55. Meier C, Schwartz A v., Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone*. 2016 Jan 1;82:93–100.
56. E.L. Pacheco-Pantoja, J.P. Dillon, P.J.M. Wilson, L. Ranganath, W.D. Fraser, J.A. Gallagher. Extracellular ATP, signalling through P2 receptors, synergises with glucose-dependent insulinotropic polypeptide to induce *c-fos* in osteoblastic cells. *Bone*. 2009 Jun;44:S355–6.
57. Pacheco-Pantoja EL, Dillon JP, Wilson PJM, Fraser WD, Gallagher JA. *c-Fos* induction by gut hormones and extracellular ATP in osteoblastic-like cell lines. *Purinergic Signal*. 2016 Dec 1;12(4):647–51.
58. Sassone-Corsi P, & VIM. Modulation of *c-fos* gene transcription by negative and positive cellular factors. *Nature*. 1987;326(6112):507–10.
59. Kreisberg JI, Radnik RA, Ayo SH, Garoni J, Saikumar P. High glucose elevates *c-fos* and *c-jun* transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int*. 1994;46(1):105–12.
60. Miao' GG, Curran' T. Cell Transformation by *c-fos* Requires an Extended Period of Expression and Is Independent of the Cell Cycle. *Mol Cell Biol*. 1994;14(6):4295–310.
61. Miller AD, Curran T, Verma IM. *c-fos* protein can induce cellular transformation: A novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell*. 1984;36(1):51–60.
62. Jacenko O. *c-fos* and bone loss: a proto-oncogene regulates osteoclast lineage determination. *Bioessays* [Internet]. 1995;17(4):277–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.950170402>
63. Grigoriadis AE, Wang Z qi, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch H a, et al. *c-Fos*: A Key Regulator of Osteoclast-

- Macrophage Lineage Determination and Bone Remodeling. *Science* (1979). 1994;266:443–8.
64. Matsuo K, Owens JM, Tonko M, Elliott C, Chambers TJ, Wagner EF. Fos/1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat Genet.* 2000;24(2):184–7.
  65. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020.
  66. Kupczyk D, Bilski R, Studzińska R, Woźniak A. Assessment of the concentration of selected metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-13) in patients with ulcers as a complication of type 2 diabetes. *Postepy Dermatol Alergol.* 2022;39(1):59–65.
  67. Lang J, Yang C, Liu L, Li L, Wu L, Liu Y, et al. High glucose activates ERK1/2 to stabilize AP1 and increase MMP9 expression in diabetic foot ulcers. *Exp Cell Res.* 2021 Jun 1;403(1):112550.