



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA BIOMINERALIZACIÓN Y MARCADORES
DE LA INMUNIDAD INNATA EN OSTEÓBLASTOS HUMANOS *IN VITRO*.

T E S I S

QUE PRESENTA

M. en C. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

Tutora:

DRA. LETICIA MORENO FIERROS





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

EL ÉXITO

Reír mucho y a menudo; ganarse el respeto de las personas inteligentes y el aprecio de los niños; merecer el elogio de los críticos sinceros y mostrarse tolerante con las traiciones de los falsos amigos; saber apreciar la belleza y hallar lo mejor en el prójimo; dejar un mundo algo mejor, bien sea por medio de un hijo sano, de un rincón de jardín o de una condición social redimida; saber que al menos una vida ha alentado más libremente gracias a la nuestra: eso es haber triunfado.

RALPH WALDO EMERSON

La gran finalidad de la vida no es el conocimiento, sino la acción.

THOMAS HENRY HUXLEY

No busques hacer las cosas rápidamente. No vayas tras las pequeñas ventajas.

El deseo de hacer las cosas demasiado rápido impide hacerlas a conciencia.

Ir por las pequeñas ventajas impide que se logren las grandes cosas.

CONFUCIO

Agradecimientos

A la Dra. Leticia Moreno, mi tutora y jefa. Gracias por la confianza depositada en mí desde el primer día que pise su laboratorio, por la libertad que me ha dado para formarme y desarrollarme en la investigación. Gracias por la oportunidad de vivir de mi pasión y mi vocación. Muchas gracias por el ejemplo de investigadora trabajadora y exitosa que no deja de lado la complejidad de ser mujer.

Al Dr. Higinio Arzate, muchas gracias por regalarme tu amistad y tu maravilloso ser, gracias por tu confianza y por apoyarme tanto en mi formación.

A la M. en C. Elsa Calleja Quevedo, gracias por mostrarme el mundo de la investigación e influir en que ahora esta sea mi vida.

A la Dra. Patricia Tato, miembro de mi comité tutorial, y los miembros de mi jurado de examen profesional, el Dr. Luis Felipe Jiménez, el Dr. Maximiliano Ibarra, la Dra. Ingeborg Becker, muchas gracias por las aportaciones, en verdad fueron muy enriquecedoras para este trabajo.

A los que fueron y ahora son mis compañeros del laboratorio, el Dr. Marco, la Dra. Verdín, el biólogo Alfredo Medina, al M. en C. Luis Alberto, a Karla, Roberto y Miguel (“el chícharo y sus chicharitos”) a Saul, Scarlett y Daniel (“los chicos nuevos”) y a la Dra. Marissa, muchas gracias por brindarme su amistad, y por sus puntos de vista con los que han contribuido durante mi formación académica.

A mis amigos Nadia, Paty, Isaac, Isabel Ibarra y Damaris gracias por su apoyo cuando más lo he necesitado, por compartir mi estrés y mis muchos proyectos.

A mis padres, Aurelio e Isabel y mis hermanos Elsa, Clemente, muchas gracias por todo su apoyo y amor incondicional, por siempre estar dispuestos a escucharme, por querer compartir mi pasión a la investigación. Sin ustedes mi formación y llegar al final del doctorado no hubieran sido posibles. No me bastarán los días para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mi esposo Gustavo, muchas gracias por ser mi dosis diaria de anti estrés, gracias por tu apoyo, tu confianza y tu fe en mí.

Índice.

Abreviaturas.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	9
CAPITULO I	10
Diabetes Mellitus.	10
Enfermedad periodontal.....	13
Relación entre la diabetes mellitus y enfermedad periodontal.....	14
CAPITULO II	16
Hiperglucemia y metabolismo óseo.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	19
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
CAPITULO III	21
Material y métodos.....	21
Cultivo Celular.	21
Concentraciones de glucosa.....	21
Determinación de la cantidad de calcio depositado en cultivo.	23
Análisis por Energía dispersa de espectroscopia de rayos X (EDX).....	24
Actividad específica de la fosfatasa alcalina.	24
Preparación de ARN y PCR en tiempo real.....	25
Determinación de la expresión de citocinas IL1, IL6, IL10 y TNF alfa.....	27
Detección de TLR -2, -3, -4 y -9.....	27
Análisis estadístico.	29
CAPITULO IV	30
Resultados.....	30
La alta concentración de glucosa incrementa la cantidad de calcio depositado en cultivo.	30
La alta concentración de glucosa incrementa la expresión de moléculas asociadas al proceso de biomineralización.	32
Las altas concentraciones de glucosa disminuyen la actividad específica de la fosfatasa alcalina.	34

La alta concentración de glucosa disminuye la calidad de los cristales de hidroxiapatita en cultivo.....	36
La alta concentración de glucosa incrementa la expresión de RANKL y disminuye la expresión de OPG.....	38
Las células osteoblásticas expresan el TLR-2, -3, -4 y -9.	40
Las altas concentraciones de glucosa y los controles iso-osmóticos aumentan la expresión de los TLRs -2, -3, -4 y -9.....	42
La alta concentración de glucosa incrementa la expresión del ARNm de la IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 y la IL-10.....	46
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
BIBLIOGRAFÍA.....	68
ARTICULOS	75

Abreviaturas

AGEs. Productos de glicación avanzada	MAPK. Proteína cinasa activada por mitógeno
ALP. Fosfatasa alcalina	MCP-1. Proteína quimioatrayente de monocitos 1
ARNm. Ácido ribonucleico mensajero	MMP9. Matriz metaloproteinasas 9
BSP. Sialoproteína ósea	MV. vesículas de matriz
CRP. Proteína C reactiva	OCN. Osteocalcina
CXCL. Quimiocina	OPG. Osteoprotegerina
DAG. Diacilglicerol	OPN. Osteopontina
D-Glu. D(+) glucosa	PAMPS. Patrones moleculares asociados a patógenos
DM. Diabetes mellitus	PCR. Reacción en cadena de la polimerasa
DMEM. Medio modificado de Eagle Dulbecco	PE. Ficoeritrina
DMT1. Diabetes mellitus tipo 1	Pi. Fosfato inorgánico
DMT2. Diabetes mellitus tipo 2	PIP2. Fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato
EDX. Energía dispersa de espectroscopia de rayos X	PKC. Proteína cinasa C
EP. Enfermedad periodontal	PLC. Fosfolipasa C
FITC. Isotiocianato de fluoresceína	PPi. Pirofosfato inorgánico
GADs. Descarboxilasa del ácido glutámico	RAGE. Receptor de los AGEs
HGF. Factor de crecimiento de hepatocitos.	RANKL. Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
HLA. antígeno leucocitario humano o complejo mayor de histocompatibilidad.	ROS. Especies reactivas de oxígeno
HSP60. Proteína de choque térmico 60	Runx2. Runt-related transcription factor 2
ICAs. Anticuerpos antiislotes	SFB. Suero fetal bovino
IL. Interleucina	TLR. Receptor tipo Toll (Toll Like receptor)
IP3. Inositoltrifosfato	TNF-α. Factor de necrosis tumoral alfa
IP3R. Receptor de inositoltrifosfato	TXNIP. Tioredoxina
L-Glu. L(+) glucosa	VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular
LPS. Lipopolisacárido	
Man. Manitol	

Resumen.

Introducción: La diabetes mellitus (DM) puede alterar el remodelado óseo y conducir a complicaciones como la osteopenia u osteoporosis. Por otra parte, la DM aumenta el riesgo de padecer enfermedad periodontal (EP), así como su severidad. La EP es una enfermedad inflamatoria producida por la resorción ósea alveolar. Existen evidencias que sugieren que la inflamación crónica puede contribuir al desarrollo de la DM y sus complicaciones. La hiperglucemia es una característica de la DM que puede contribuir a la inflamación sostenida mediante el incremento de citocinas pro-inflamatorias que causan resistencia a la insulina a través de la activación de TLR 4. Sin embargo, no se saben los mecanismos por los cuales se desarrollan estas complicaciones óseas en la DM. Los estudios realizados sobre el efecto de las altas concentraciones de glucosa en las funciones de los osteoblastos son contradictorios, algunos sugieren aumento o reducción en el proceso de biomineralización. En este trabajo se evaluó el efecto de la alta concentración de glucosa en la biomineralización y mediadores de la inflamación en una línea celular osteoblástica humana. **Material y métodos:** Las células fueron tratadas ya sea con una concentración fisiológica de glucosa (5.5mM) o concentraciones postprandiales de glucosa (8mM) o altas concentraciones de glucosa comparables con los niveles de glucosa de un paciente diabético (12 y 24mM). Se evaluó el efecto sobre i) la cantidad y calidad de los cristales de los depósitos de calcio en cultivo, ii) la expresión de las proteínas asociadas al proceso de biomineralización, b) El ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) y osteoprotegerina (OPG), c) las citocinas IL1, IL6, IL8, MCP-1, TNF alfa y d) de los TLR 2, 3, 4 y 9. **Resultados:** Nuestros resultados muestran que altas concentraciones de glucosa, (12mM y 24mM en particular), alteran el proceso de biomineralización en las células osteoblásticas, lo que provoca: i) un aumento en la biomineralización, ii) incremento en la expresión de los ARNm de osteocalcina, sialoproteína ósea y el factor de transcripción Runx2, iii) disminución en la actividad específica de la fosfatasa alcalina, iv) disminución en la calidad de los cristales de hidroxapatita depositados en cultivo, v) incremento en la expresión de ARNm de RANKL y disminución de OPG, vi) incremento en la expresión del ARNm de IL 1 beta, IL6, IL8, MCP-1 y la IL 10. Además se encontró que tanto las altas concentraciones de glucosa, como los controles iso-osmóticos provocaron la sobre-expresión de los TLR's 2, 3, 4 y 9, lo que sugiere que las células osteoblásticas son susceptibles al estrés osmótico. Estos resultados sugieren que la alta concentración de glucosa pudiera estar actuando como un factor endógeno que altera la biomineralización.

Abstract.

Introduction. Diabetes mellitus (DM) may alter bone remodeling, as osteopenia and osteoporosis are among the complications. Moreover, DM increases the risk and severity of chronic inflammatory periodontal disease, in which bone resorption occurs. Broad evidence suggests that chronic inflammation can contribute to the development of DM and its complications. Hyperglycemia is a hallmark of DM that may contribute to sustained inflammation by increasing proinflammatory cytokines, which are known to cause insulin resistance, via toll-like receptor (TLR) - 4 -mediated mechanisms. However, the mechanisms by which bone-related complications develop in DM are still unknown. Studies done on the effect of high glucose concentrations on osteoblast functions are contradictory because some suggest increases (although others suggest reductions) in the biomineralization process. Therefore, we evaluated the effect of high glucose levels on biomineralization and inflammation markers in a human osteoblastic cell line. **Material and methods.** Cells were treated with either physiological 5.5 mM or increasing concentrations of glucose up to 24 mM, and we determined the following: i) the quantity and quality of calcium-deposit crystals in culture and ii) the expression of the following: a) proteins associated with the process of biomineralization, b) the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), c) cytokines IL1, IL6, IL8, IL10, MCP-1 and TNF alpha, and d) TLRs 2, 3, 4 and 9. **Results.** Our results show that high glucose concentrations (12 mM and particularly 24 mM) alter the biomineralization process in osteoblastic cells and provoke the following: i) a rise in mineralization, ii) an increase in the mRNA expression of RANKL and a decrease of OPG, iii) an increase in the mRNA expression of osteocalcin, bone sialoprotein and the transcription factor Runx2, iv) a diminished quality of the mineral, and v) an increase in the expression of IL1beta, IL6, IL8, MCP-1 and IL10 mRNAs. In addition we found that both high glucose levels and hyperosmotic conditions provoked TLR-2, -3, 4 and 9 overexpression in osteoblastic cells, suggesting that they are susceptible to osmotic stress.

CAPITULO I

Diabetes Mellitus.

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, lo que resulta de defectos en la secreción de insulina y/o en la acción de la insulina.[1]

Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA), se clasifica en:

1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1). Se caracteriza por la destrucción de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y necesidad de tratamiento con insulina para vivir (insulinodependientes).

Se subdividen en dos subgrupos:

- a) Diabetes autoinmune: con marcadores positivos en un 85-95% de los casos, anticuerpos antiisletos (ICAs), anti GADs (decarboxilasa del ac. glutámico) y anti tirosina fosfatasas IA2 e IA2 β . Esta forma también se asocia a genes del antígeno leucocitario humano (HLA o complejo mayor de histocompatibilidad MHC).
- b) Diabetes idiopática: con igual comportamiento metabólico, pero sin asociación con marcadores de autoinmunidad ni de HLA.

2. Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2). Caracterizada por insulino resistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). Los pacientes tienen niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglucemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control, aunque no es indispensable para preservar la vida (insulino-independientes)
3. Otros tipos específicos de Diabetes. Incluyen pacientes con defectos genéticos en la función de la célula beta como las formas llamadas MODY (maturity onset diabetes of the young). Otros pacientes presentan defectos genéticos de la acción de la insulina o patologías pancreáticas (pancreatectomía, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, neoplasia del páncreas, hemocromatosis) o bien endocrinopatías (cushing, acromegalia, glucagonoma, feocromocitoma). Algunos fármacos o tóxicos pueden producir diabetes secundaria (corticoides, ácido nicotínico, asparagina, interferon alfa, pentamidina). Adicionalmente agentes infecciosos (rubeola congénita, coxsachie B, citomegalovirus, parotiditis) o algunas otras enfermedades como los síndromes de Dawn, Klinefelter, Turner, enfermedad de Stiff-man y lipoatrofias pueden causar diabetes.[1]

4. Diabetes Gestacional. Se caracteriza por hiperglucemia, que aparece en el curso del embarazo. Se asocia a mayor riesgo en el embarazo y parto y de presentar diabetes clínica (60% después de 15 años). La diabetes gestacional puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica[1]
5. Intolerancia a la glucosa y glicemia de ayunas alterada. La intolerancia a la glucosa se caracteriza por una respuesta anormal a una sobrecarga de glucosa suministrada por vía oral. Este estado se asocia a mayor prevalencia de patología cardiovascular y a riesgo de desarrollar diabetes clínica (5-15% por año). La glicemia de ayuno alterada se caracteriza por el hallazgo de una glicemia de ayuno entre 100 y 125mg/dl. Su identificación sugiere el realizar una prueba de sobrecarga de glucosa oral para la clasificación definitiva.[1]

La DM se ha convertido en una de las principales epidemias del siglo XXI. Aunque la patogenia de la DM implica complejas relaciones entre factores genéticos y ambientales o adquiridos, recientemente ha adquirido interés la propuesta de que las enfermedades inflamatorias crónicas pueden provocar resistencia a la insulina y contribuir así al desarrollo de la diabetes y sus complicaciones.[2]

Las complicaciones asociadas con la DM incluyen la nefropatía, retinopatía, neuropatía, enfermedad cardiovascular, enfermedad vascular periférica, accidentes cerebrovasculares, enfermedades óseas como la osteoporosis y enfermedad periodontal.[3-4]

Enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal (EP) es una enfermedad crónica inflamatoria que afecta los tejidos de soporte de los dientes, el periodonto. Resulta de una infección crónica provocada por bacterias que se localizan en las superficies dental y radicular. Como resultado de su presencia, el hospedador, intentando eliminarlas, desarrolla una respuesta inflamatoria e inmune que es la causa de la destrucción de los tejidos. La respuesta del hospedador no es sólo resultado de la presencia de las bacterias sino también de sus productos como endotoxinas.[5-6]

El mecanismo fisiopatológico por el cual ocurre esta sucesión de fenómenos tiene explicación en la respuesta inmune del hospedero frente a los microorganismos productores de toxinas (endotoxinas bacterianas) conocidos ampliamente como peridontopatógenos. Estas endotoxinas estimulan las células del sistema inmune de los tejidos peridontales a que expresen varios mediadores inflamatorios entre los cuales está la interleucina 1 (IL1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL). En adición a estos mediadores inflamatorios también se liberan otros productos endógenos como las proteínas de choque térmico 60 (HSP60), proteína C reactiva (CRP), lactoferrina, calprotectina, defensinas, lamininas, proteína quimioatrayente de monocitos, entre otras sustancias potencialmente citotóxicas.[7]

Relación entre la diabetes mellitus y enfermedad periodontal.

Existe amplia evidencia que sugiere que la DM se asocia con una mayor prevalencia (de 3 a 4 veces), extensión y severidad de la enfermedad periodontal. [8-9] Se ha argumentado que el estado inflamatorio presente en la diabetes puede afectar la cavidad oral y aumentar la severidad de la periodontitis, provocando una mayor destrucción de los tejidos [10] y un retraso en la cicatrización de las heridas [11]. De acuerdo con esta propuesta, varias moléculas inflamatorias que se encuentra elevadas en la DM, han sido demostradas ser responsables de inducir resistencia a la insulina. Ejemplo de las moléculas inflamatorias son el TNF- α [12], la resistina [13] y los ácidos grasos libres [14] que también juegan un papel importante en el metabolismo óseo, como el TNF- α que promueve la resorción ósea [10].

Una de las vías de señalización más estudiadas que dan como resultado la síntesis de citocinas proinflamatorias es la vía de los receptores tipo Toll (TLR). Los TLRs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) como el lipopolisacárido (LPS), las lipoproteínas, peptidoglicanos y otros.

Los niveles de expresión de TLR-3 y -4 en el tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica se correlacionan con la severidad de la enfermedad periodontal y con un incremento en la placa bacteriana [15]. Por otra parte, los niveles de expresión de TLR -2, -4 y -9 se incrementan en el tejido gingival en pacientes con diabetes tipo 2 y periodontitis crónica [16]. Estudios recientes han demostrado un incremento en la expresión de TLR-2 y -4, así como su vía de señalización, sus ligandos y la activación funcional en los monocitos de sujetos con diabetes tipo I en comparación con los sujetos controles, que se acentúa aún

más con las complicaciones microvasculares presentes en esta enfermedad [3]. Por lo que se ha propuesto que la inflamación en sujetos con diabetes se comienza a exacerbar debido a mecanismos no microbianos. Además de los productos microbianos exógenos, los TLRs pueden reconocer ligando endógenos tales como células necróticas [17], proteínas de choque térmico Hsp70 y gp96 [18], los oligosacáridos del hialuronato soluble [19], las especies reactivas de oxígeno (ROS)[20] y los productos de la glicación avanzada (AGEs) [21].

Considerando que las personas con hiperglucemia sostenida glican las proteínas para formar AGEs, que son un vínculo importante entre las diversas complicaciones de la diabetes [22], también es posible que los AGEs participen como ligandos endógenos en la activación inicial de los TLRs, antes de la aparición de la diabetes. Más aún, las altas concentraciones de glucosa son capaces de aumentar la expresión de TLR-2 y -4 en los monocitos humanos a través de la activación de MyD88, PKC y la NADPH oxidasa, que incrementa la producción de citocinas proinflamatorias [23].

CAPÍTULO II

Hiper glucemia y metabolismo óseo

Como se mencionó anteriormente, en los pacientes con diabetes las complicaciones relacionadas con alteraciones óseas incluyen la osteopenia, la osteoporosis y la enfermedad periodontal. Se ha establecido previamente una asociación entre la DM no controlada y la pérdida de densidad mineral o calidad ósea. También se ha sugerido que el metabolismo óseo alterado en la DM puede provocar osteopenia. Más aún, se ha implicado a la hiper glucemia en la patogénesis de las enfermedades óseas en la DM. Se ha reportado una disminución de la actividad osteoblástica en modelos animales y en seres humanos [9, 24-25].

Por otra parte algunas de las citocinas proinflamatorias circulantes que se han visto elevadas en pacientes diabéticos (por ejemplo, TNF e interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) [26-30] pueden promover la actividad de los osteoclastos y la resorción ósea mediante la activación de la vía de señalización del receptor activador del NFκ-B (RANK), y su ligando (RANKL). Interesantemente, un mal control glucémico fue correlacionado significativamente con una mayor producción de estas citocinas. Lo que nos indica que existe una estrecha relación entre la periodontitis, la resorción ósea y la DM, siendo el común denominador la inflamación crónica.

Sólo pocos estudios han analizado el efecto de concentraciones altas de glucosa en la respuesta fisiológica e inflamatoria relacionada con los osteoblastos. Los estudios existentes sobre el efecto de la concentración elevada de glucosa en el proceso de biomineralización en los osteoblastos, son contradictorios, ya que se han reportado tanto incrementos, como disminuciones [26, 31]. Por otra parte el

estudio de la expresión de los TLRs y de citocinas en los osteoblastos se había realizado a nivel de ARNm. Se detectó previamente una expresión constitutiva del ARNm de algunos TLRs en algunas líneas celulares de osteoblastos. Existen estudios sobre el efecto de productos bacterianos, tales como el LPS, en osteoblastos, en los que se muestra un incremento en la expresión del ARNm del TLR-2 y algunas quimiocinas (5, 8 y 10), de la interleucina 1 α y MMP9 [32-33], junto con la disminución de la biomineralización.

La biomineralización ósea es un proceso interactivo entre los osteoblastos y su matriz extracelular en la que participan proteínas colágenas y no colágenas como la osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN) que se encargan de la nucleación de los cristales de hidroxiapatita [34]. Otra proteína de suma importancia en el proceso de biomineralización es la fosfatasa alcalina (ALP). Esta es una enzima glucosilada, que se localiza en la porción externa de la membrana citoplasmática [35] y también se encuentra en las vesículas de matriz, las cuales son organelos producidos por las células mineralizantes y están localizadas en la matriz extracelular. Estas estructuras contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita [36]. La ALP es también la responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos, desfosforilando diversas moléculas. La actividad de esta enzima se incrementa cuando comienza la mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un indicador temprano de la biomineralización [37].

El proceso de biomineralización se ve afectado por diferentes patologías, desde infecciones hasta artritis reumatoide en donde además de afectar negativamente la biomineralización, se incrementa el número y la actividad de osteoclastos.

La osteoclastogénesis está controlado por tres proteínas: el receptor RANK, su ligando RANKL y el inhibidor del receptor la osteoprotegerina (OPG)[38]. RANK es expresado por los precursores de los osteoclastos y linfocitos T. El RANKL y OPG son sintetizadas por los osteoblastos de forma constitutiva. El RANKL se une a su receptor RANK promoviendo la maduración y activación de los osteoclastos. El OPG se une al RANKL inhibiendo su unión a su receptor, y la actividad de los osteoclastos. En condiciones de salud el RANKL es suprimido por el OPG de manera equilibrada, esto permite mantener la homeostasis el metabolismo óseo. La expresión de RANKL se incrementa en presencia de mediadores de la inflamación, los cuales están elevados en la enfermedad periodontal y la DM, lo que a su vez provoca la expresión de citocinas por parte de los osteoblastos como la IL-1, IL-6, IL-10, TNF, lo que resulta en la inducción de la osteoclastogénesis y la resorción ósea [39].

Kikuchi *et al.* estimularon osteoblastos humanos con LPS y evaluaron la expresión de OPG y RANKL. El nivel de ARNm y proteína de RANKL se incrementan en relación directa con la concentración de LPS, y lo contrario ocurre con el OPG, el cual disminuye [40].

Sin embargo, el efecto de las concentraciones altas de glucosa en la expresión de TLRs y el sistema RANKL/OPG no ha sido evaluado en los osteoblastos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El hecho de que algunos TLRs reconozcan ligandos endógenos como los AGEs, abre la posibilidad de que la alta concentración de glucosa influya en la respuesta inmune innata y en el metabolismo óseo a nivel periodontal.

Por lo tanto, para determinar si la alta concentración de glucosa juega un papel importante en la enfermedad periodontal, nos propusimos investigar el efecto de concentraciones altas de glucosa sobre marcadores de la inflamación y la biomineralización en células osteoblásticas humanas *in vitro*.

HIPOTESIS

Si las células osteoblásticas humanas son mantenidas con altas concentraciones de glucosa, entonces, se afectara el proceso de biomineralización, así como la expresión de mediadores de la inflamación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si altas concentraciones de glucosa afectan las funciones fisiológicas de las células osteoblásticas como la biomineralización y la expresión de mediadores de la inflamación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En células osteoblásticas con diferentes concentraciones de glucosa:

1. Determinar la cantidad de depósito de calcio en cultivo.
2. Determinar la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP).
3. Determinar la calidad de los cristales depositados en cultivo.
4. Determinar la expresión del ARNm de la sialoproteína ósea (BSP), la osteocalcina (OCN) y el factor de transcripción Runx2, de la osteoprotegerina (OPG), el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), de las Interleucinas -1, -6, -8, -10, del TNF- α y MCP-1
5. Determinar la expresión del TLR-2, -3, -4, y -9

CAPITULO III

Material y métodos

Cultivo Celular.

Se aislaron células derivadas del hueso alveolar y se propagaron como se describe en el artículo de Arzate et al. 1998 [41]. Se seleccionaron aquellas células que mostraron el fenotipo de las células osteoblásticas caracterizadas mediante la determinación de la presencia de osteocalcina (OCN) y la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP) y por ende formadoras de nódulos de mineralización, de acuerdo a los métodos descritos por Kaplow [42] y Arzate et al., respectivamente [41]. Las células osteoblásticas fueron cultivadas en forma rutinaria en Dulbecco modificado de Eagle con 5.5mM de glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, GIBCO, Rockville, MD, EE.UU.) complementado con suero fetal bovino al 10% (laboratorios Microlab S.A. de C.V., D.F. México) y antibióticos (100 U / ml de penicilina, estreptomycin 100µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) Para los experimentos se utilizaron las células en el segundo pasaje. Las células se crecieron a 37°C en una atmosfera de 95% de aire, 5% CO₂ y 100% de humedad

Concentraciones de glucosa.

Las concentraciones de glucosa para este estudio fueron elegidos en función de los niveles de glucosa en sangre de un individuo sano, los niveles de glucosa postprandial y altos niveles de glucosa similares a los observados en la DM. En concreto, la concentración normal de glucosa es de 5.5mM equivalente a

90mg/dl, la postprandial de 8mM corresponde a 144mg/dl y las concentraciones de 12mM y 24mM es aproximadamente 216mg/dl y 432mg/dl respectivamente que utilizamos para determinar los efectos de la alta concentración de glucosa en las células osteoblásticas.

Las células fueron cultivadas durante 24 h, 7 días y 14 días en DMEM-LG que contiene los niveles fisiológicos de glucosa (5.5mM) o en DMEM-LG suplementados con altas concentraciones de glucosa (8, 12 y 24mM). Los cultivos se dividieron en nueve grupos de tratamiento: 1) medio fisiológico con 5.5mM D (+) glucosa, 2) glucosa postprandial de 8mM de D(+) glucosa, 3) medio con alta glucosa con 12mM D(+) glucosa que corresponde con los niveles de pacientes con DM no controlada, 4) medio con muy alta concentración de glucosa con 24mM de D(+) glucosa (invitrogen, GIBCO.) que corresponde a los niveles de pacientes con DM no controlada y complicaciones óseas, 5) medio con 5.5mM de D(+) glucosa y 18.5mM de L(+) glucosa (L-Glc), 6) medio con 5.5mM de D (+) glucosa y 2.5mM de manitol (man), 7) medio con 5.5mM de D(+) glucosa y 6.5mM de manitol (man), 8) medio con 5.5.mM de D(+) glucosa y 18.5mM de manitol (man) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EE.UU.) y 9) medio con 5.5mM de D(+) glucosa y 3µg/ml de lipopolisacararido de *E. coli*. (LPS) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EE.UU.), que es una molécula muy estudiada capaz de estimular varios tipos de células gingivales y células osteoblásticas. Los grupos del 5 al 8 fueron utilizados como grupos controles iso-osmolares y el grupo 9 se utilizó como control positivo. En todos los casos el medio se cambio cada tercer día. Para los experimentos en los que se evaluó la biomineralización (depósitos de calcio, actividad de la ALP y EDX) se utilizó “medio mineralizante” (DMEM-LG complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% mas 50mg/ml de ácido ascórbico y 10mM de β-glicerofosfato y las

concentraciones indicadas de glucosa o manitol). El resto de los experimentos (PCR para citocinas y análisis de los TLRs) se uso DMEM-LG complementado con SFB al 10% y las concentraciones indicadas de glucosa.

Determinación de la cantidad de calcio depositado en cultivo.

Se sembraron 2×10^5 células en cajas de cultivo celular de 12 pozos en “medio mineralizante” (DMEM-LG complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% mas 50mg/ml de ácido ascórbico y 10mM de β -glicerofosfato). Las células se mantuvieron con el estímulo por 7 y 14 días de cultivo. Las células se distribuyeron en cada uno de los nueve grupos de tratamiento que se han descrito anteriormente que contenía diferentes concentraciones de glucosa (5.5, 8, 12 y 24mM o controles iso-osmóticos). Las células se fijaron con metanol frio al 70%. La deposición de mineral se identificó utilizando una solución saturada de alizarina roja al 2% pH 4.1 (Sigma Chemical Co.,St. Louis, MO) la cual fue adicionada a los cultivos celulares que fueron teñidos durante 5 minutos. El exceso de colorante fue eliminado lavando repetidamente con amortiguador de fosfatos (PBS 1X) y las cajas fueron invertidas para su secado. Los pozos con el mineral fijado y teñido fueron documentados con un esteroscopio StemiSVII marca Zeiss (Alemania).

Se realizó la extracción de colorante para la cuantificación de calcio en cultivo según Gregory *et al.* [43], brevemente, las cajas teñidas con alizarina roja se almacenaron a -20 C por 1 hora. A cada pozo se le agregaron 800 μ l al 10% (v/v) de ácido acético y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento, los pozos se rasparon con ayuda de un gendarme y se transfirió el sobrenadante a tubos de microcentrifuga, se les agito vigorosamente por 30 segundos, a la mezcla se la agregaron 500 μ l de aceite mineral, se calentó a 85°C

por 10 minutos e inmediatamente después se le colocó en hielo por 5 minutos. La mezcla se centrifugo a 14000 rpm por 15 minutos. 500µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo nuevo al que se le agrego 200µl de hidróxido de amonio con ácido acético al 10% (v/v) para neutralizar el ácido y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento. Se leyeron alícuotas de 100µl por triplicado en cajas de 96 pozos a 405nm.

Análisis por Energía dispersa de espectroscopia de rayos X (EDX).

Se sembraron 2×10^5 células en cajas de cultivo celular de 12 pozos en “medio mineralizante” (DMEM-LG complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% mas 50mg/ml de ácido ascórbico y 10mM de β -glicerofosfato). Las células se mantuvieron con el estímulo por 7 y 14 días de cultivo. Las células se distribuyeron en cada uno de los nueve grupos de tratamiento que se han descrito anteriormente que contenía diferentes concentraciones de glucosa (5.5, 8, 12 y 24mM o controles iso-osmóticos). Las células se fijaron con metanol frio al 70%. La composición de los minerales en la matriz extracelular que se formó por las células osteoblásticas, se analizó con un microscopio electrónico de barrido Leica-Cambridge 440 equipado con un pentafet de energía dispersa de rayos X. Todos los análisis se llevaron a cabo a 20kV y 300 segundos [44].

Actividad específica de la fosfatasa alcalina.

Se sembraron 2×10^5 células en cajas de cultivo de 25cm² con “medio mineralizante” (DMEM-LG complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% mas 50mg/ml de ácido ascórbico y 10mM de β -glicerofosfato). Las células se mantuvieron con el estímulo por 7 y 14 días de cultivo. La actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP) se determinó según el método de Lowry [45]. La capa

celular se extrajo con una solución con 10mM de Tris-HCL y 0.1% de tritón X-100, pH 7.4. La actividad enzimática se evaluó a través del uso de 8mM de p-nitrofenil fosfato disódico (PNP) como sustrato en una solución con 2mM de MgCl₂ y 0.1M Tris HCL pH 9.8, se incubó por 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por la adición de 50 µl de 0.05N de NaOH. Las muestras se leyeron a 405nm. Las muestras fueron analizadas en condiciones que aseguraran la linealidad con respecto al tiempo y concentración de proteínas. Las concentraciones de las proteínas se determinaron de acuerdo con el ensayo de Bradford, utilizando BSA como el estándar [46].

Preparación de ARN y PCR en tiempo real.

Se sembraron 5×10^4 células en cajas de cultivo de 25cm² con DMEM-LG. Las células se mantuvieron con el estímulo por 7 y 14 días de cultivo. Para determinar la expresión de moléculas relacionados con la biomineralización se utilizó “medio mineralizante” y las células se cosecharon a los 7 y 14 días de cultivo. Se extrajo el ARN de acuerdo al método de Trizol [47]. Se sintetizó el DNA por medio de la reacción transcriptasa reversa con una concentración de 2µg de ARN total por reacción. Se realizó la PCR con el kit PCR Master Mix (Fermentas, Harrington Court, Canada) para estandarizar la temperatura de alineación y número de ciclos por cada oligo utilizado. Se hizo la PCR en tiempo real con el kit Maxima SYBR-Green/ ROX q PCR Master Mix (Fermentas, Harrington Court, Canada). Se tomo el gen 18S ribosomal como gen constitutivo.

Los oligos utilizados se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm	Ciclos	Tamaño del producto (bp)	Gen Bank Numero de acceso
OCN	F: GGGCTCCCAGCCATTGAT R: CAAAGCCTTTGTGTCCAAGCA	61°C	30	59	X53698.1
BSP	F: AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA R: TCTGCCTCTGTGCTGTTGGT	60°C	30	271	AF052124.1
Runx2	F: ACCCAGAAGGCACAGACAGAAG R: AGGAATCGCCCCTAAATCACT	61°C	30	59	NM_001015051.3
RANKL	F: ACATATCGTTGG ATCACAGCACAT R: CAAAAGGCTGAGCTTCAAGCTT	67°C	40	101	NM_033012
OPG	F: GAACCCAGAGCGAAATACA R: AATGCCTCCTCACACAGGGTAA	63°C	30	217	NM_002546.3
18S Rib	F: GGGAGCCTGAGAAACGGC R: GGGTCGGGAGTGGGTAATTT	60°C	20	93	NR_003286.2
TNF alfa	F: AGCCAGCAGACGCTCCCTCA R: GGGGAGAGAGGGTGGAGCCG	61°C	30	168	NM_000594.2
IL1 beta	F: CAAGGGCTTCAGGCAGGCCG R: TCCCCGCTGGGCCTTCTACC	61°C	30	247	NM_000576.2
IL 6	F: GCTGTCAGCTCACCCCTGCG R: GGGCCCTTCAACCCCATCGC	61°C	30	264	NM_000600.3
IL 10	F: TGCCCACTCCCAACCCCAA R: GCAAGCCTGCAAAGGCAGCG	61°C	30	197	NM_000572.2
IL 8	F: GCTGGCCGTGGCTCTCTTGG R: TCTGTGTTGGCGCAGTGTGGT	61°C	30	183	NM_000584.3
MCP-1	F: GCCAAGGTCGTGGTCGTGCT R: TGCTTGACGTTGGCTCTGGCA	59°C	30	131	NG_021428.1

F: forward

R: reverse

Determinación de la expresión de citocinas IL1, IL6, IL10 y TNF alfa.

Las células osteoblásticas se cultivaron en DMEM-LG, con una densidad de 7×10^4 en cajas de cultivo de 96 pozos. Las células se distribuyeron en cada uno de los siguientes grupos de tratamientos: 5.5mM de D(+) glucosa, 24mM de D(+) glucosa, 5.5mM de D(+) glucosa con 18.5mM de manitol, 5.5mM de D(+) glucosa con 18.5mM de L(+) glucosa y 5.5mM de D(+) glucosa con $3 \mu\text{g/ml}$ de LPS. A las 48 horas de cultivo se recuperaron los sobrenadantes para evaluar la concentración de citocinas. Los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se realizaron de acuerdo a las especificaciones técnicas del kit para detección de cada citocina, IL1 beta de eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.), IL6, TNF-alfa e IL10 de PreproTech (Rocky Hill, NJ, EE.UU.)

Detección de TLR -2, -3, -4 y -9.

Las células osteoblásticas se cultivaron en DMEM-LG, con una densidad de 12×10^3 en cubreobjetos para el análisis por microscopia confocal. Las células se cosecharon a las 24 horas de tratamiento y se fijaron con paraformaldehído al 4% con pH 7.4 durante 10 minutos. Los portaobjetos fueron lavados con PBS. Se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de los TLRs. En breve, la unión inespecífica fue bloqueada con 7% de suero bovino/0.05% Tritón X-100 en PBS, pH 7.0 durante 30 minutos. Para la detección del TLR-3 y TLR-9, se permeabilizaron las células con Cytofix/cytoperm (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.) durante 15 minutos. Los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales con fluorocromos (AbMo) de ratón (m) o de rata(r) contra los TLR humanos usados a una concentración 1:100 en PBS-tritón X-100 0.07% (v/v): (m) AbMo TLR-2 (TLR2.3) ficoeritrina (PE), (m) AbMo TLR-4 (HTA125) FITC (Santa Cruz

Biotechnology, CA, EE.UU.), (m) AbMo TLR-3 (TLR3.7) FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.) y (r) AbMo TLR-9 PE (eBioscience, San Diego Ca, EE.UU). Para los controles de isotipo, (m) AbMo IgG2a FITC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) y (m) AbMo IgG1a PE (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Al final de la incubación los cubreobjetos fueron lavados y deshidratados en alcoholes (70, 80, 90 y 100%) durante 3 minutos cada uno y montados en Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania). Las imágenes de inmunofluorescencia fueron adquiridos mediante un microscopio confocal láser TCS/SP-2 (Leica, Wetzlar, Alemania), Las imágenes se muestran en proyecciones máximas de 5 secciones secuenciales ópticas que fueron escaneadas 20 veces cada una, con un grosor de 0.4 micras por intervalo y capturadas con el objetivo 63X con aceite de inmersión, en el eje z 1.4-NA.

Para el análisis de citometría de flujo de los TLRs, se sembraron 25×10^4 células osteoblásticas en cajas de cultivo de 12 pozos, Las células se distribuyeron en cada uno de los siguientes grupos de tratamientos: 5.5mM de D(+) glucosa, 8mM de D(+) glucosa, 12mM de D(+) glucosa, 24mM de D(+) glucosa, los respectivos controles iso-osmóticos y 5.5mM de D(+) glucosa con $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS. Las células se cosecharon a las 24 h con 0.02% de tripsina-EDTA 0.1%. La unión inespecífica de los anticuerpos se bloqueó con 3% de albúmina sérica bovina (BSA) en suspensión en PBS por 10 minutos, posteriormente se lavados dos veces con PBS-BSA al 0.05%. Usamos los anticuerpos que anteriormente se describieron y el procedimiento de tinción fue similar, excepto que las incubaciones y lavados se realizaron en tubos de microcentrífuga.

Las células se fijaron con paraformaldehído al 1%, pH 7.4. Se adquirieron 3×10^4 eventos con un citómetro BD Biosciences FACS Calibur y analizados utilizando el programa Win-MDI 2.9.

Análisis estadístico.

Todos los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el post-hoc de Dunnett, utilizando el software GraphPad Prism 5, Los datos de los diferentes tratamientos se compararon con el grupo de glucosa fisiológica. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SE). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas a $*p \leq 0.05$ o $**p \leq 0.001$.

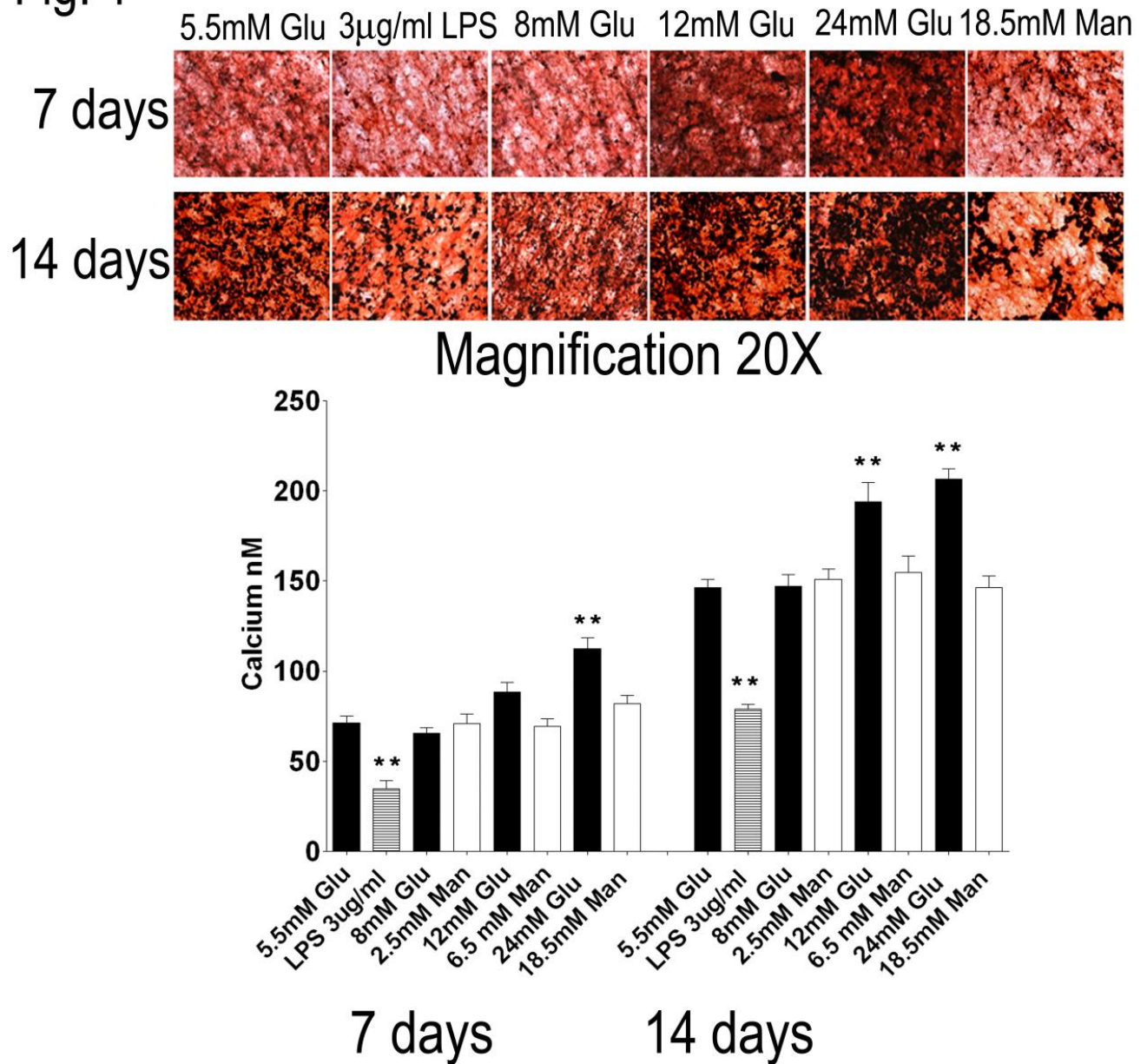
CAPITULO IV

Resultados

La alta concentración de glucosa incrementa la cantidad de calcio depositado en cultivo.

Se analizó el efecto de las altas concentraciones de glucosa en el proceso de biomineralización de las células osteoblásticas cultivada en “medio mineralizante”. Hemos encontrado que las células incubadas con niveles fisiológicos de glucosa (concentración normal de glucosa de 5.5mM) formaron matriz extracelular mineralizada a los 7 y 14 días de cultivo. Las células con niveles de glucosa postprandial (8mM) forman una matriz extracelular mineralizada muy similar a las células cultivadas con concentraciones normales de glucosa (5.5mM). Los depósitos de calcio también se observaron en los grupos iso-osmolares de manitol y L(+) glucosa en los que no observamos cambios significativos en la mineralización comparados contra el grupo de glucosa normal (5.5mM). También observamos que el LPS inhibe el proceso de biomineralización. Interesantemente, encontramos un incremento de la biomineralización con as concentraciones altas de glucosa (12mM y particularmente de 24mM de D(+) glucosa). Estas altas concentraciones de glucosa incrementaron notablemente la cantidad de calcio depositado en cultivo a los 7 y 14 días de cultivo en comparación con los niveles de glucosa fisiológica (5.5mM) (Figura 1)

Fig. 1



Figural. Efecto de LPS, altas concentraciones de D(+) glucosa, y manitol en la biomineralización de células osteoblásticas a los 7 y 14 días de cultivo. Las células fueron fijadas y teñidas con rojo de alizarina. Se realizó la extracción del colorante para cuantificar la cantidad de calcio depositado en cultivo. Se muestran microfotografías representativas. La gráfica representa la media \pm el error estándar (SE) (n=4), *p<0.05, **p< 0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett. Las altas concentraciones de glucosa extracelular incrementan la cantidad de calcio depositado en cultivo.

La alta concentración de glucosa incrementa la expresión de moléculas asociadas al proceso de biomineralización.

Es importante destacar que el aumento de la cantidad de depósitos de calcio en cultivo por altas concentraciones de glucosa se correlaciona con el incremento en la expresión del ARNm de la osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP) y el factor de transcripción Runx2. En comparación con las células cultivadas con concentraciones de glucosa fisiológicas (5.5mM), las células osteoblásticas cultivadas con altas concentraciones de glucosa (12 y 24mM de D(+) glucosa) a los 7 y 14 días de cultivo mostraron un incremento en la expresión del ARNm de la OCN, BSP, proteínas nucleadoras de los cristales de hidroxiapatita y el factor de transcripción Runx2 (runt-related transcription factor 2), también llamado Cbfa. Este factor de transcripción se sobreexpresa durante el proceso de biomineralización [48]. Las células cultivadas con concentraciones de glucosa postprandial (8mM) o con el manitol (controles iso-osmóticos) muestran expresiones similares de ARNm de OCN, BSP y Runx2 al grupo de glucosa fisiológica (5.5mM) (Figura 2).

Fig. 2

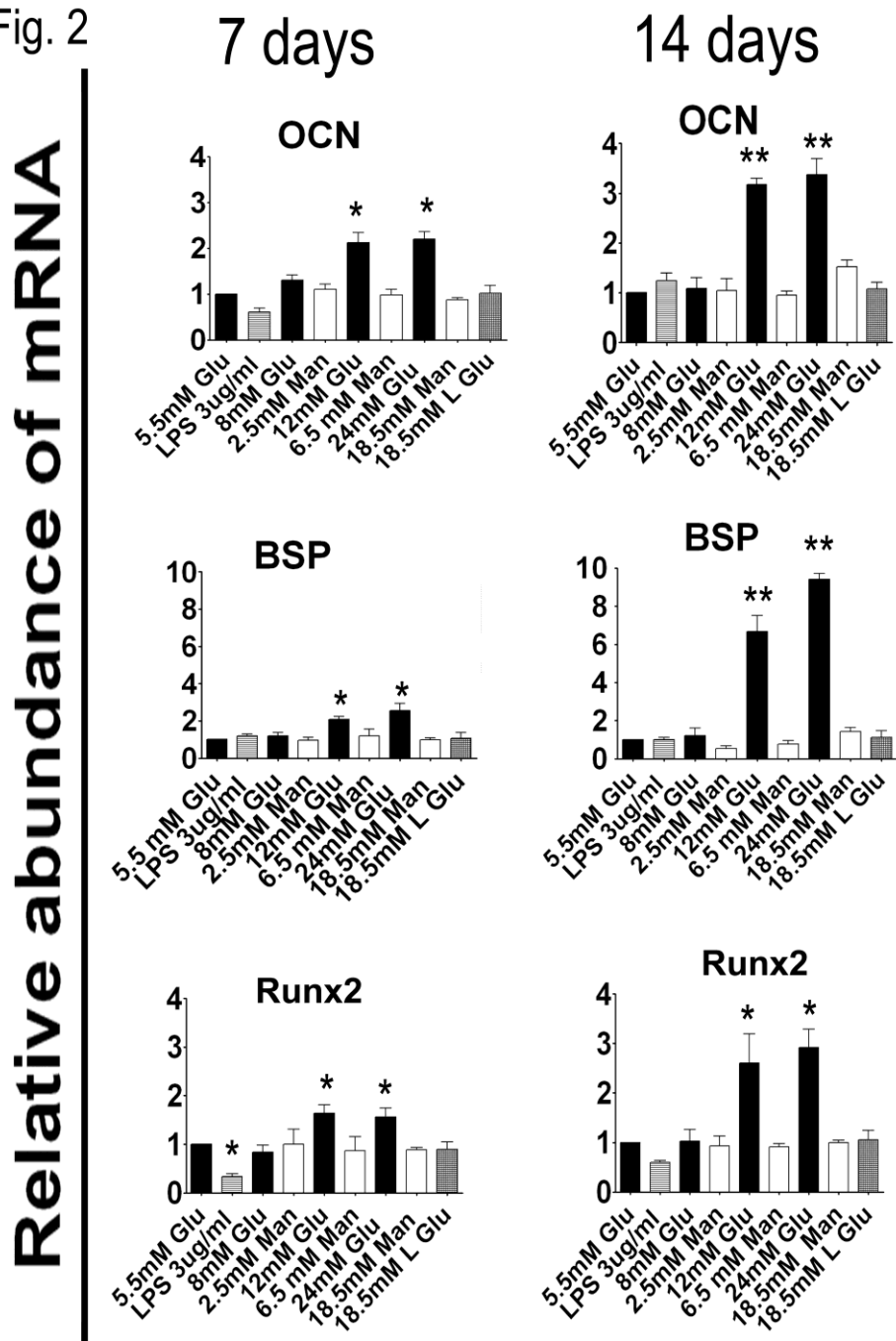


Figura 2. El efecto de LPS, las altas concentraciones glucosa (12mM y 24mM de D(+) glucosa), manitol y L(+) glucosa en la expresión del ARNm de moléculas asociadas con el proceso de biomineralización en las células osteoblásticas a los 7 y 14 días de tratamiento. Se aisló el ARN total y se analizó la expresión de genes por medio del PCR en tiempo real. Los datos se expresan como la abundancia relativa del ARNm con respecto al control, normalizado a 18S rARN. Los gráficos representan la media \pm ES (n=4), * p <0.05, ** p <0.001. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett. Las altas concentraciones de glucosa extracelular incrementan la expresión de osteoclastina (OCN), sialoproteína ósea (BSP) y el factor de transcripción Runx2

Las altas concentraciones de glucosa disminuyen la actividad específica de la fosfatasa alcalina.

Debido a que la fosfatasa alcalina (ALP) ha sido identificada como un marcador celular de la diferenciación temprana del proceso de biomineralización (40), se evaluó su actividad a los 7 y 14 días de cultivo.

A los 7 días de cultivo, las células osteoblásticas incubadas con 12mM de D(+) glucosa mostraron un incremento en la actividad específica de la ALP en comparación con el grupo de glucosa fisiológica (5.5mM). Por el contrario, las células osteoblásticas incubadas con 24mM de D(+) glucosa y LPS mostraron una disminución de la actividad específica de esta enzima en comparación con el grupo de glucosa norma (5.5mM). Los grupos de manitol y el grupo postprandial de D(+) glucosa (8mM) mostraron actividades de la ALP similares a los del grupo de glucosa normal(5.5mM) (Figura 3)

En varios de los siguientes experimentos, sólo probamos una alta concentración de glucosa (24mM), ya que siempre mostró efectos claros sobre el proceso de biomineralización.

Fig. 3

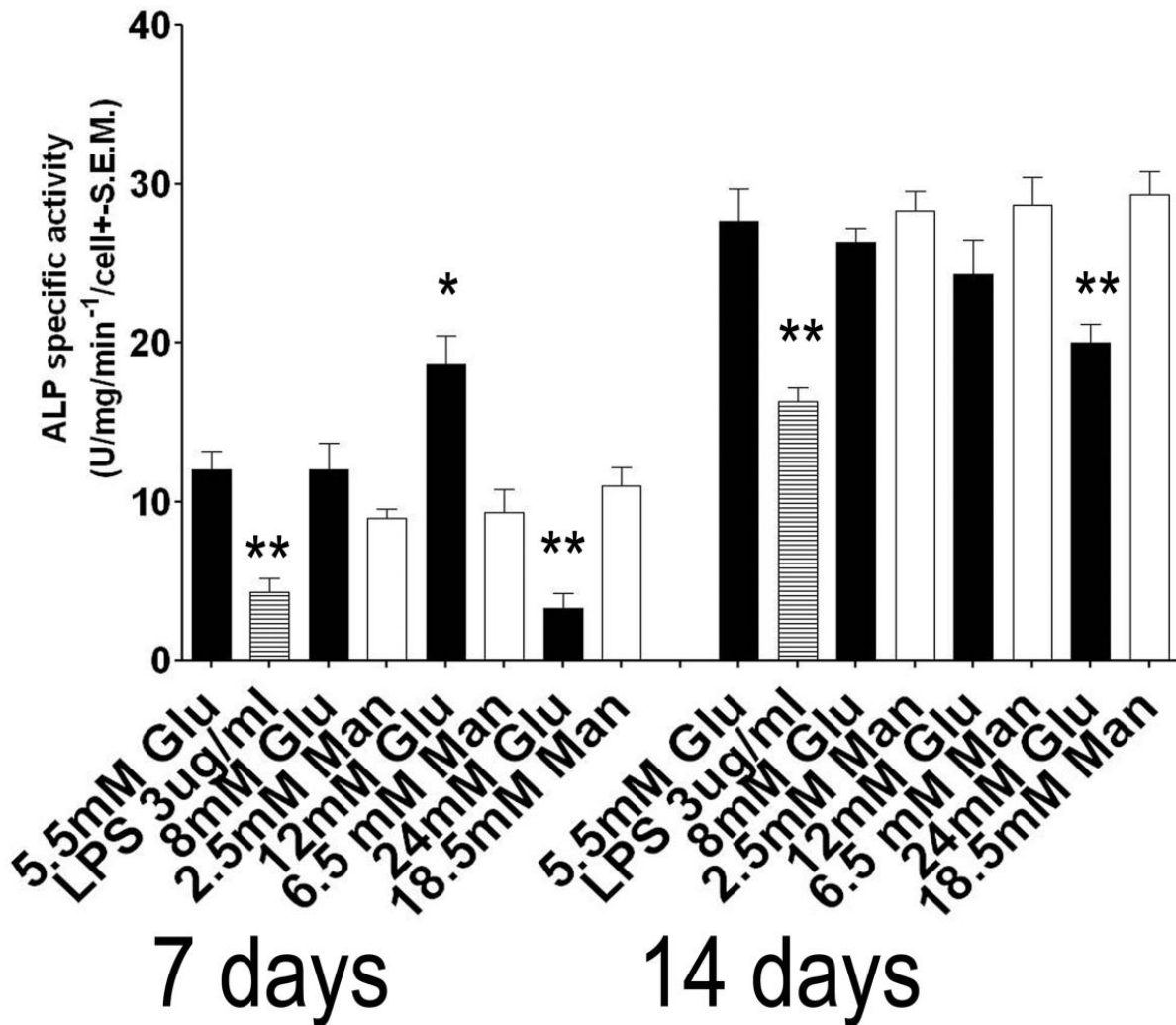


Figura 3. Efecto de las altas concentraciones de glucosa en la actividad específica de la fosfatasa alcalina a los 7 y 14 días de cultivo. Los datos se expresan como U/mg/min⁻¹/cell. El grafico representa la media± ES (n=3), *p<0.05, **p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido por una prueba de Dunnett. El LPS y 24mM de D(+) glucosa disminuyen la actividad específica de fosfatasa alcalina.

La alta concentración de glucosa disminuye la calidad de los cristales de hidroxiapatita en cultivo.

Para caracterizar la calidad del mineral depositado en cultivo, se determinó la relación de calcio y fósforo en los nódulos de mineralización formados en la matriz extracelular por medio de EDX. Nuestros resultados revelaron que las células cultivadas con condiciones de glucosa fisiológica (5.5mM) tienen una relación de Ca/P de 1.48 y 1.60 a los 7 y 14 días, respectivamente. Estos valores son similares a la relación mostrada por la hidroxiapatita fisiológica (Ca/ P de 1.67). Por el contrario, en las células cultivadas con altas concentraciones de D(+) glucosa (24mM), la relación de Ca/ P disminuyó notablemente: 0.78 y 1.29 a los 7 y 14 días, respectivamente. Por otra parte, el tratamiento con LPS también mostró una disminución en la relación Ca/ P, muy parecidas a la relación de Ca/ P encontradas en las células con altas concentraciones de glucosa, (0.77 y 1.41 a los 7 y 14 días, respectivamente). Los valores de la relación Ca/ P observados en los controles iso-osmóticos fueron similares a los mostrados por las condiciones normales de glucosa. (Figura 4).

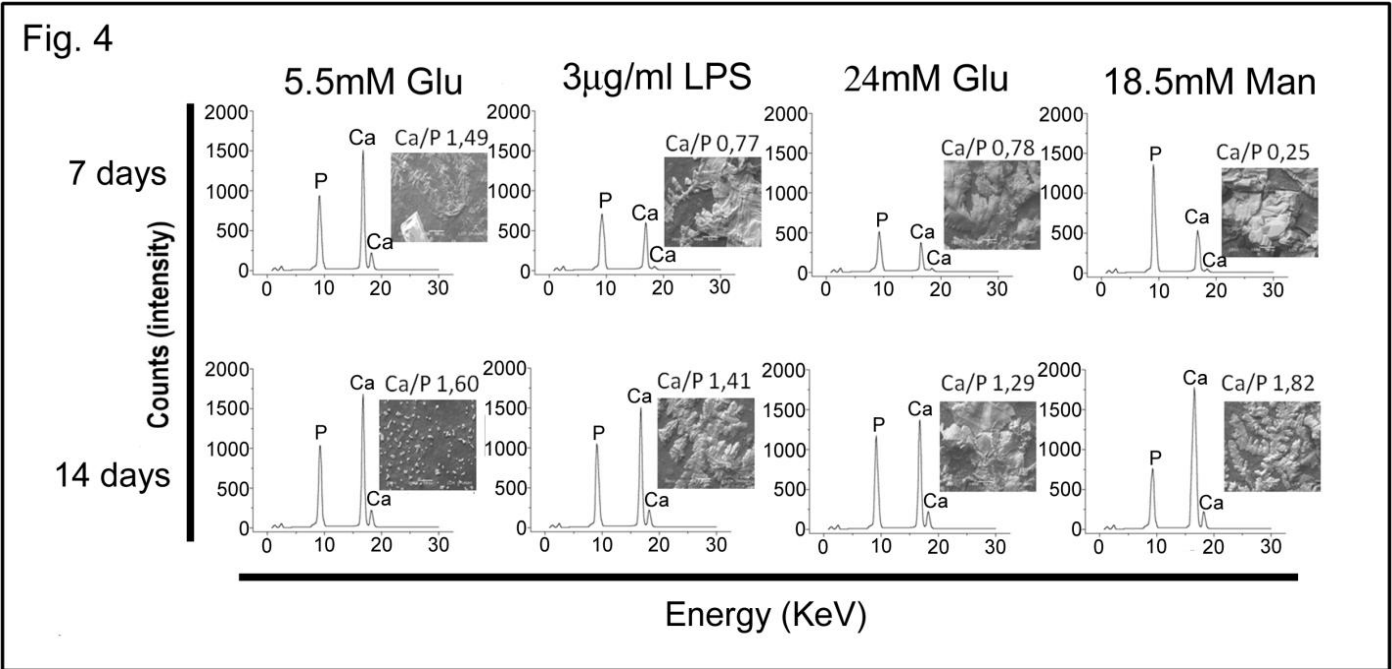


Figura 4. Efecto del LPS y la alta concentración de glucosa en la calidad del mineral formado en cultivo por las células osteoblásticas a los 7 y 14 días de tratamiento. Las células fueron fijadas y analizadas por EDX. En los grupos con concentraciones normales de glucosa mostraron una relación Ca/ P similar a la hidroxiapatita fisiológica (1.67), las altas concentraciones de glucosa extracelular disminuyen la calidad del cristal de hidroxiapatita depositado a los 7 y 14 días de cultivo, similares a los observados con el tratamiento con LPS. En particular, las formas de los cristales de hidroxiapatita entre los diferentes tratamientos difieren. Los cristales formados en altas concentraciones de glucosa y LPS no presentan la forma característica de cristales cúbicos de la hidroxiapatita fisiológica.

La alta concentración de glucosa incrementa la expresión de RANKL y disminuye la expresión de OPG.

En las células osteoblásticas tratadas con altas concentraciones de D(+) glucosa (12 y 24mM) y en los tratados con LPS, se encontró un incremento en la expresión del ARNm del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), pero una disminución en la expresión de ARNm de la osteoprotegerina (OPG) a los 7 y 14 días de cultivo en comparación con las células con concentraciones normales de glucosa (5.5mM). Los tratamientos con manitol (controles iso-osmolares) y el grupo con concentración de D(+) glucosa posprandial (8mM) no provocó ninguna diferencia significativa en la expresión del RANKL u OPG, en comparación con el tratamiento normal de glucosa. (Figura 5)

Fig. 5

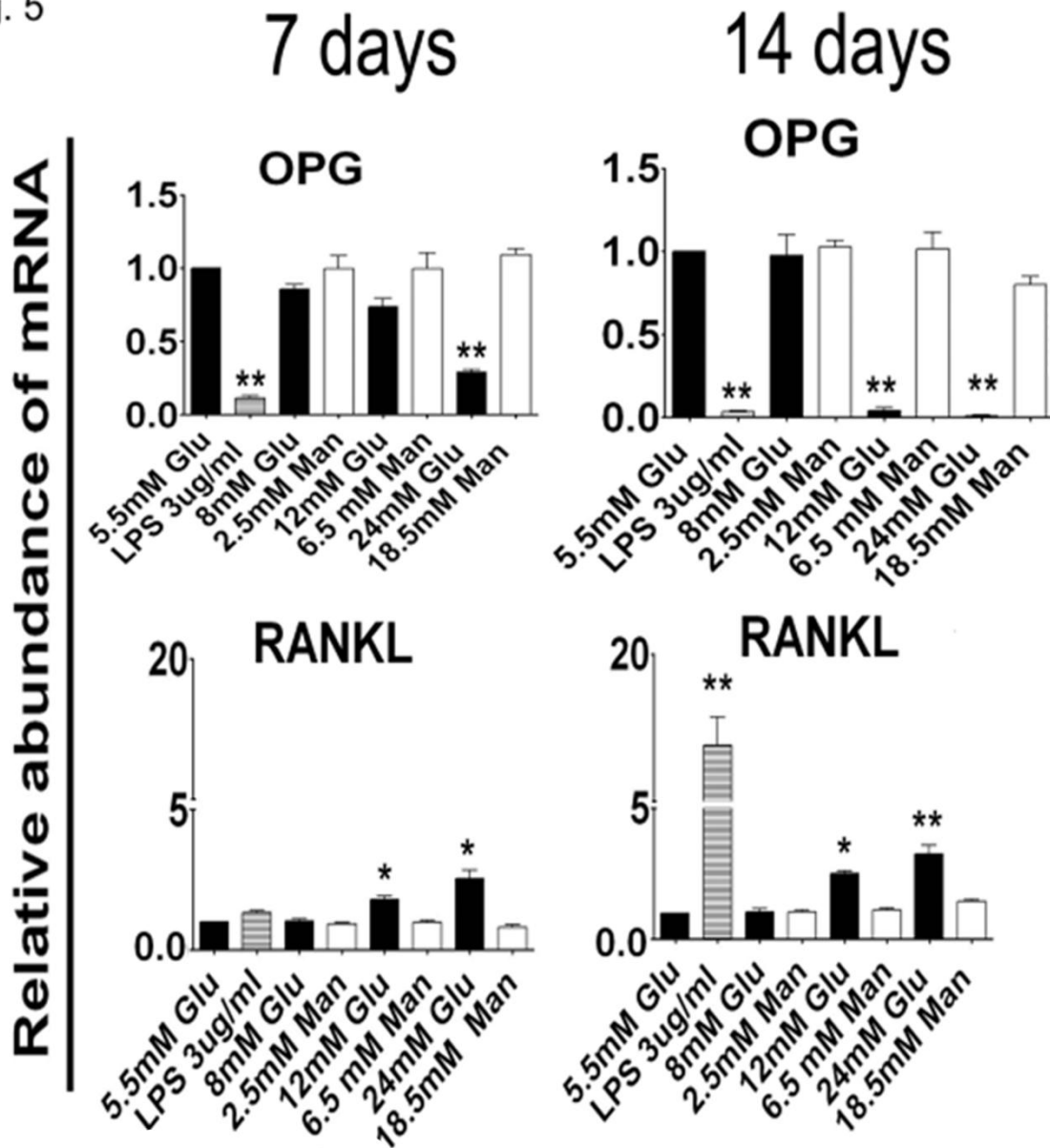


Figura 5. Efecto del LPS, las altas concentraciones de glucosa, y manitol en la expresión de ARNm de la OPG y RNKL en las células osteoblásticas humanas a los 7 y 14 días de cultivo. Se aisló el ARN total y se analizó la expresión génica por medio de PCR en tiempo real. Los datos se expresan como la media \pm ES de la abundancia relativa del ARN de RANKL u OPG con respecto al control, normalizado a 18S (n=4), *p<0.05 **p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett. Las altas concentraciones de glucosa incrementan la expresión de RANKL y disminuyen la expresión de OPG.

Las células osteoblásticas expresan el TLR-2, -3, -4 y -9.

La expresión constitutiva del ARNm de algunos TLRs en osteoblastos humanos y murinos ha sido reportada previamente (48-51). Los reportes anteriores indican que en algunas líneas celulares osteoblásticas donde no se observa la expresión constitutiva de los TLRs, se induce su expresión con la estimulación de productos bacterianos, especialmente la del ARNm del TLR-2 y -4 (48- 49), La ausencia del TLR-2 en algunas líneas celulares de osteoblastos también se ha documentada (48-51). Para determinar si el aumento de las concentraciones de glucosa modifica la expresión de los TLRs -2, -3, -4 y -9. Se analizó la presencia y localización de estos TLRs por microscopia confocal. Nuestros resultados demuestran una expresión constitutiva del TLR-2, -4 en la superficie celular y la expresión constitutiva del TLR-3 y -9 intracelular.

Fig. 6

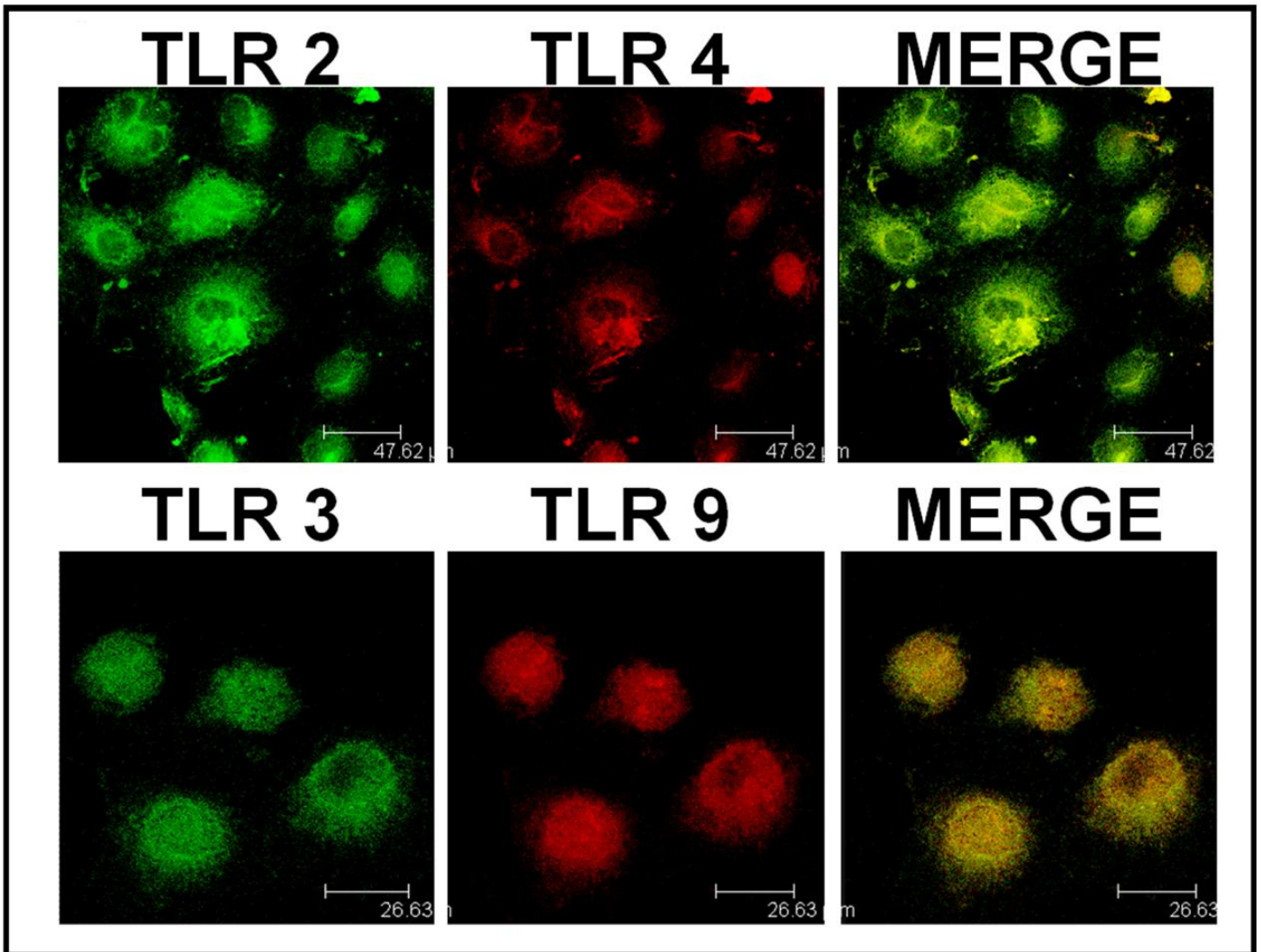


Figura 6. La expresión de TLR -2, -3, -4, -9 en células osteoblásticas humanas.

Las células fueron cultivadas durante 24 horas. Las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorocromos como se describe en la sección de materiales y métodos, se analizaron por microscopía confocal. Nótese la expresión de los TLR-2 y -4 en la superficie celular y la expresión de TLR-3 y -9 en el interior de las células. Se muestran microfotografías representativas.

Las altas concentraciones de glucosa y los controles iso-osmóticos aumentan la expresión de los TLRs -2, -3, -4 y -9.

Se analizó la expresión de los TLRs -2, -3, -4 y -9 a las 12, 24 y 48 horas de tratamiento con 5.5mM de D (+)glucosa o con el aumento de las concentraciones de glucosa hasta 24mM mediante citometría de flujo. Las células osteoblásticas cultivadas con concentraciones de glucosa fisiológicas (5.5mM) y concentraciones postprandiales (8mM) mostraron expresión constitutiva de los TLRs -2, -3, -4 y -9. Las altas concentraciones de D(+) glucosa (12mM y especialmente 24mM de D(+) glucosa) provocan un incremento en la expresión de estos TLRs en comparación con la condición de glucosa normal (5.5mM). Los histogramas de las células colectadas después de 24 horas de tratamiento mostraron una mayor expresión de TLR- 2, -3 y -4 en comparación con las células obtenidas después de 12 y 48 horas de tratamiento. (Figura 7).

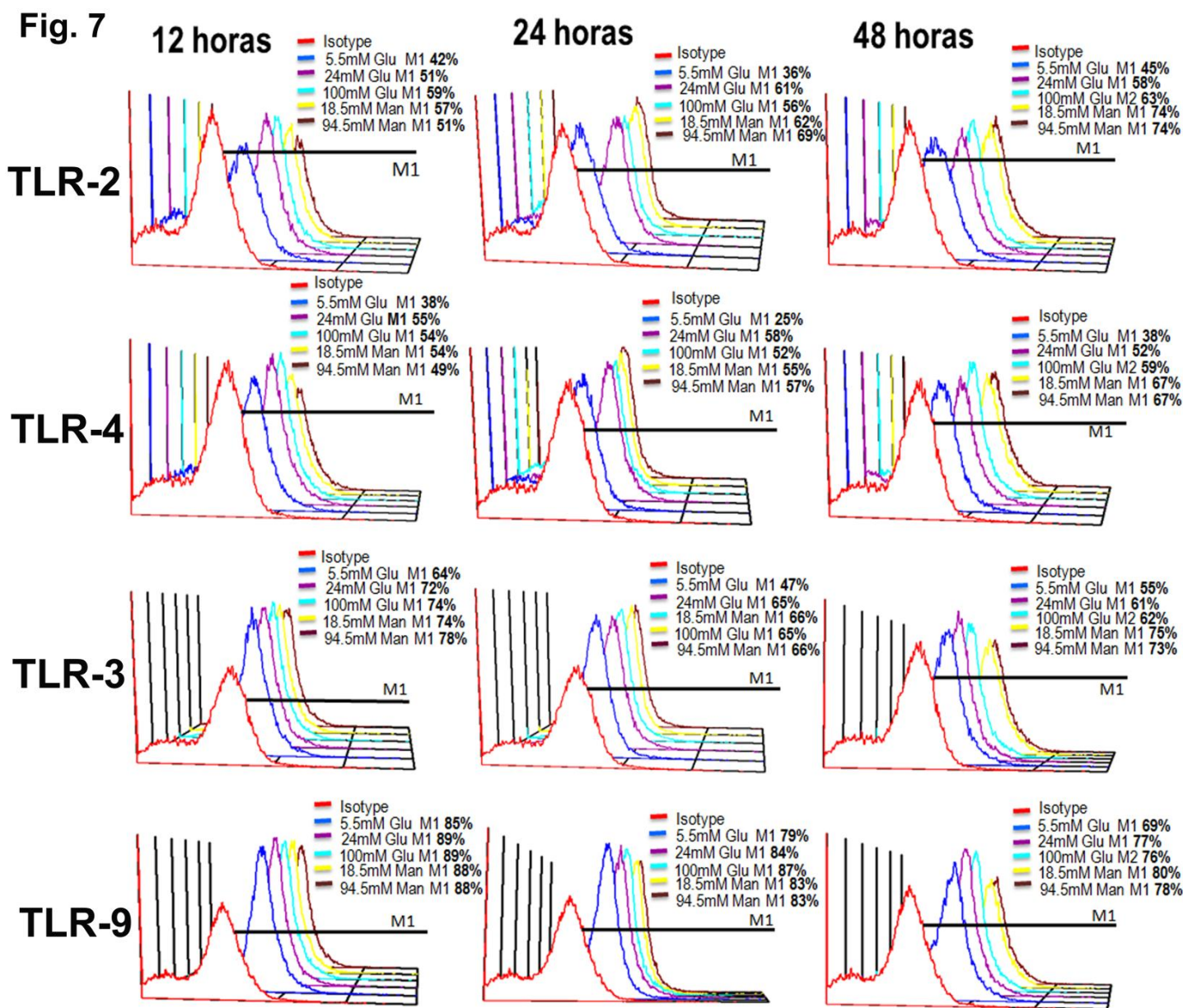


Figura 7. Efecto de la glucosa y manitol en la expresión de TLR-2, -3,-4 y -9 en osteoblastos humanos a las 12, 24 y 48 horas de tratamiento. Se sembraron 25×10^4 células en cajas de 12 pozos. Se tiñeron las células y se analizó por FACS. Se leyeron 30mil eventos. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas a cada TLR. Histogramas representativos de resultados promedio \pm ES n=4. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey. * $p < 0.05$. A las 24 horas de tratamiento se observa una mayor expresión de los TLRs con 24mM de D(+) glucosa que a las 12 y 48 horas.

Inesperadamente, también se observó un incremento en la expresión de TLR-2,-3,-4 y 9 en los grupos de control iso-osmótico (manitol y L(+) glucosa). El tratamiento con LPS provocó un incremento en la expresión de TLR-4, mientras que la expresión de TLR-2, -3 y -9 no mostró cambios en comparación con el grupo control de 5.5mM de glucosa. Las células cultivadas en concentraciones de glucosa normal mostraron una alta expresión constitutiva de TLR-9 (Figura 8)

Fig.8

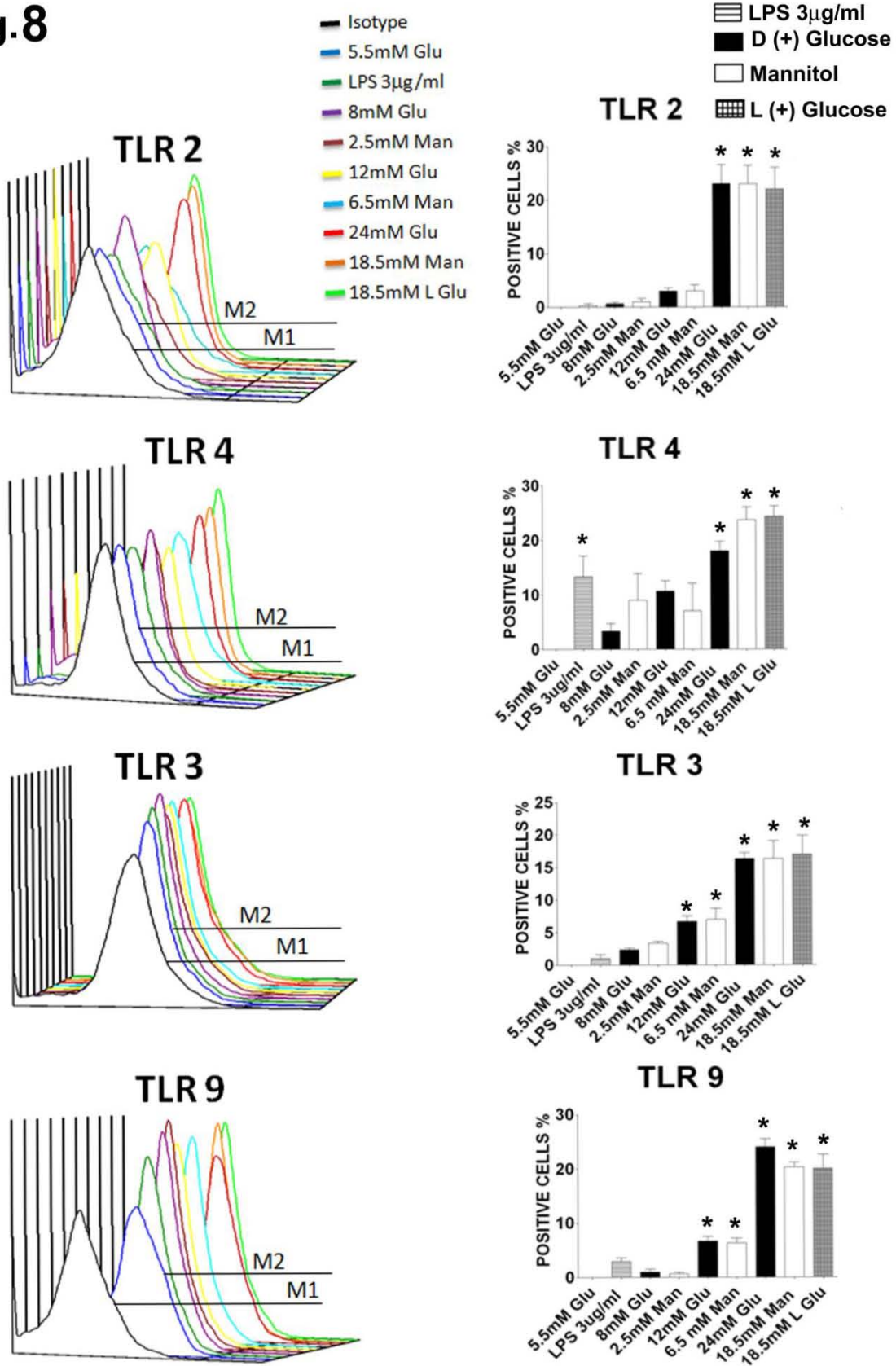


Figura 8. Análisis por citometría de flujo de la expresión de TLR en células osteoblásticas humanas bajo el efecto de LPS y altas concentraciones de glucosa (12mM y 24mM), el manitol y la L(+) glucosa. Las células fueron teñidas y analizadas por FACS. Histogramas representativos que muestran 3×10^4 eventos adquiridos. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas a cada TLR \pm ES. Los porcentajes fueron estimados a partir del marcador del control de isotipo, M1 y del marcador del grupo con concentraciones normales de glucosa (5.5mM), M2. Los gráficos representan el porcentaje de células positivas a cada TLR en comparación con el grupo de 5.5mM de D(+) glucosa (M2) * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett ($n=4$). Las células osteoblásticas humanas cultivadas con concentraciones fisiológicas de glucosa (5.5mM) expresan constitutivamente el TLR-2, -3, -4 y -9. Inesperadamente, los controles iso-osmóticos, tanto manitol como L (+) glucosa, también provocan un incremento en la expresión de los TLRs.

La alta concentración de glucosa incrementa la expresión del ARNm de la IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 y la IL-10.

El aumento de la expresión del ARNm de varias quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz (MMP9) (38-39) y la IL-1 α (52) han sido reportados en osteoblastos humanos estimulados con ligandos bacterianos. En base a estos antecedentes decidimos examinar si la alta concentración de glucosa (24mM) modifica la expresión de citocinas proinflamatorias en las células osteoblásticas. Los resultados por PCR en tiempo real revelaron una expresión basal del ARNm de la IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 y TNF- α en el grupo de glucosa fisiológica. Se observó que la alta concentración de D (+) glucosa incrementa la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y MCP-1 en comparación con la condición normal de glucosa y los controles iso-osmóticos. El LPS también indujo la sobreexpresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, aunque fue menor que la observada con las altas concentraciones de D (+) glucosa (Figura 9).

Fig.9

Relative abundance of mRNA

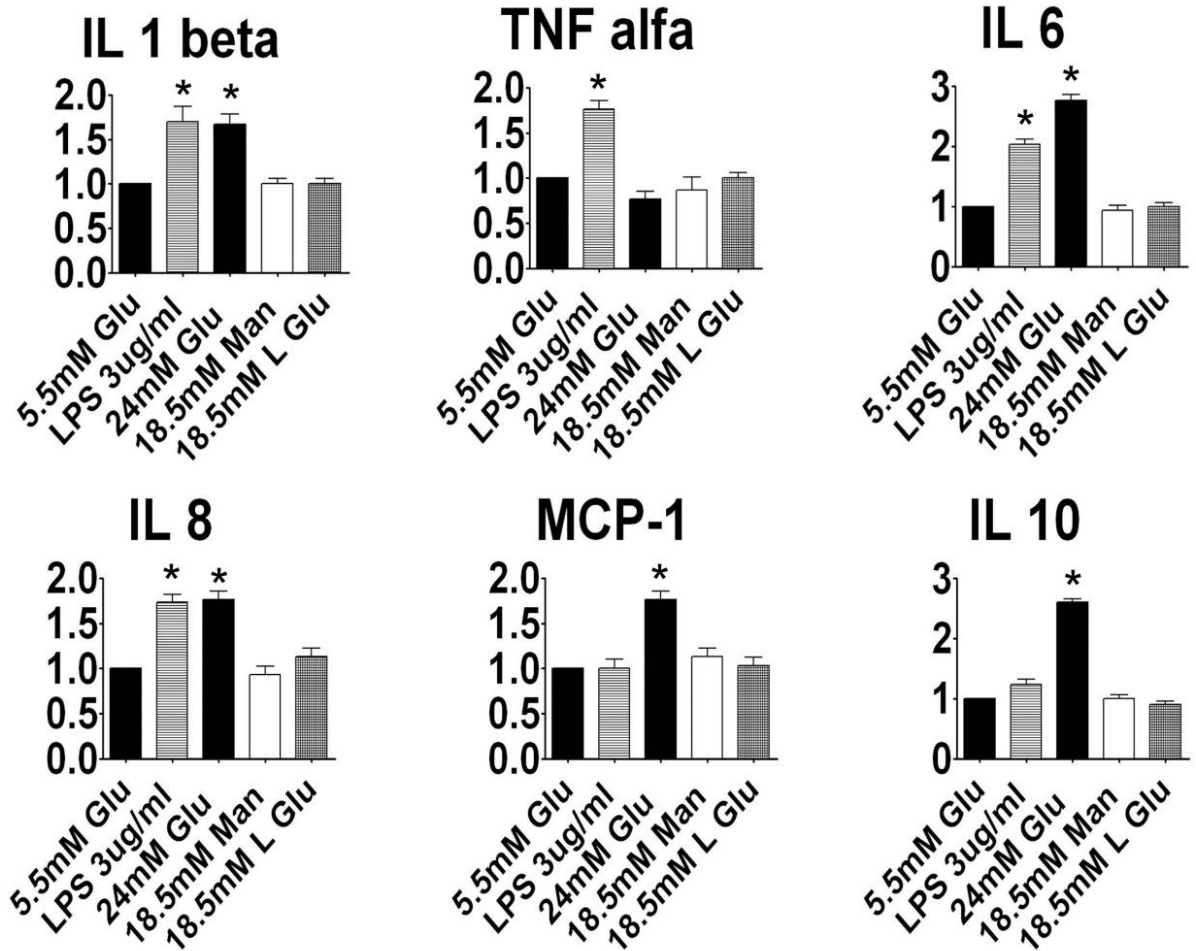


Figura 9. Efecto de LPS, 24mM de glucosa, manitol y L (+) glucosa en la expresión del ARNm de la IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-10 después de 40 horas de tratamiento. Se aisló el ARN total y se analizó la expresión génica por medio de PCR en tiempo real. Los datos se expresan como la media \pm ES de la abundancia relativa del ARN de cada citocina con respecto al control, normalizado a 18S (n=4), *p<0.05 **p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett. Las altas concentraciones de glucosa extracelular incrementan la expresión del ARNm de la IL-1 β , TNF- α y la IL-6, los controles iso-osmóticos se comportaron de manera similar a la condición de glucosa fisiológica.

Contrariamente a los resultados por PCR en tiempo real, por ELISA no pudimos detectar niveles importantes de la IL-6 e IL-1 β en los sobrenadantes de cultivos de células osteoblásticas. Sólo después de la estimulación con LPS se detectaron bajos niveles de dos citocinas, 300ng/ml de TNF- α y 800ng/ml de IL-10 (Tabla 2).

TABLA 2. NIVELES DE CITOCINAS DETECTADOS POR ELISA EN EL SOBRENADANTE DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS CULTIVADAS.

	IL 1 β ng/ml	IL 6 ng/ml	TNF α ng/ml	IL10 ng/ml
5.5mM Glu	0	0	0	300
LPS 3 μ g/ml	0	0	300	800
24mM Glu	0	0	0	300
18.5mM Man	0	0	0	0

Se sembraron 7×10^4 células por pozo (100 μ l de volumen) los sobrenadantes se recuperaron a las 48 horas de estimulación con los tratamientos indicados.

DISCUSIÓN

Los estudios *in vitro* existentes sobre el efecto de la hiperglucemia en el proceso de biomineralización son contradictorios. Se han reportado tanto incrementos como disminuciones. En este estudio encontramos un aumento en la biomineralización en células osteoblásticas humanas provocada por concentraciones altas de glucosa (12mM y particularmente 24mM D(+) glucosa). El proceso de biomineralización es afectado ya que disminuye la calidad del mineral y se modifica la expresión de genes de proteínas implicadas en la biomineralización y en los procesos inflamatorios. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Li et al [49], Botolin & McCabe [50] quienes encontraron que una alta concentración de D(+) glucosa aumentó la cantidad de mineral depositado por osteoblastos cultivados. Nuestros resultados difieren de algunos estudios, ya que probaron concentraciones más altas de glucosa que nosotros en osteoblastos de rata. Zhen et al. observaron que la concentración de 44mM de glucosa provocó una marcada reducción de la mineralización [51] y que el uso de 33 y 49.5mM de glucosa disminuyen la proliferación y la expresión de la OCN [52]. En contraste con nuestros resultados, otros estudios en los que probaron concentraciones similares a las que nosotros usamos (15 y 24mM) reportaron una disminución en el proceso de biomineralización [31, 53]. Por otra parte algunos informes sugieren que la alta concentración de glucosa incrementa la proliferación de los osteoblastos. Weil et al. [54] no encontraron un efecto sobre la capacidad proliferativa ni su capacidad productiva en factores parácrinos de crecimiento, como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF2), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en células madre mesenquimales. Sin embargo, observaron que la alta

concentración de glucosa influye en una amplia variedad de rutas y funciones celulares. Los efectos contradictorios de las altas concentraciones de glucosa entre los diferentes estudios sobre el proceso de biomineralización pueden ser debido a la heterogeneidad del origen de las células, las diferencias de las condiciones experimentales y las diferentes concentraciones de glucosa probadas.

Nuestros resultados muestran que la mineralización se ve alterada por las altas concentraciones de glucosa, lo que se confirmó cuando evaluamos la expresión de las proteínas asociadas al proceso de biomineralización. Se encontró que las altas concentraciones de D(+) glucosa (12mM y 24mM) incrementaron la expresión de la BSP, OCN y el factor de transcripción RunX2 a los 7 y 14 días de cultivo. Los controles iso-osmóticos (manitol y L (+) glucosa) no afectaron la expresión de estas moléculas, lo que indica que no tienen impacto sobre la biomineralización y que los efectos observados se deben a las altas concentraciones de glucosa.

Nuestros resultados podrían explicarse si la glucosa estuviera actuando como un factor endógeno que regula el metabolismo óseo. De hecho, en otros modelos experimentales se ha reportado que los altos niveles de glucosa en sangre pueden conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [55], y las ROS pueden activar la fosfolipasa C (PLC). Por lo tanto, esta enzima podría catalizar la degradación de la fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), un fosfolípido en la membrana celular, llevando a la formación del diacilglicerol (DAG) y la liberación de inositoltrifosfato (IP₃). El IP₃ puede entonces unirse a su receptor (IP₃R) en el retículo endoplásmico provocando una liberación de reserva de calcio de la célula. El calcio actúa como un segundo mensajero que activa la calmodulina, que a su vez causa activación corriente debajo de cascadas de

señalización de cinasas, para translocar al núcleo factores de transcripción como Osterix, Runx2 y Creb, Osterix y Runx2 pueden llevar a cabo la transcripción de moléculas asociadas con el proceso de biomineralización, como OCN y BSP [56]. En esta red de señalización también podría estar involucrado el gen de la proteína sensible a la glucosa de interacción tioredoxina (TXNIP), que es inducida por niveles altos de glucosa en las células mesenquimales, como ha demostrado Li et al [49]. El TXNIP podría afectar a la funcionalidad y capacidad de regeneración de estas células.

Nuestros datos coinciden con los informes que indican que el LPS disminuye la biomineralización en los osteoblastos. Ohno et al. [33] encontraron que después de una agresión bacteriana, los osteoblastos producen un microambiente inflamatorio que provoca una disminución en la formación de hueso. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de nuestros resultados muestran efectos contrarios entre las altas concentraciones glucosa y LPS en la biomineralización, en el ensayo de la actividad específica de la ALP, ambos tratamientos (LPS y 24mM de glucosa) disminuyen la actividad específica de esta enzima a los 7 y 14 días de cultivo.

En relación con el efecto de la alta concentración de glucosa en la actividad específica de la ALP, nuestros datos coinciden con el estudio de Zhen et al, quienes observaron que la actividad de la ALP se incrementaba en los osteoblastos con tratados con 11mM de glucosa, pero disminuía con 22 y 44mM de glucosa, en comparación con 5.5mM de glucosa [49]. Estos resultados contrastan con los de Gopalakrishnan et al. [57] quienes encontraron que las altas concentraciones de glucosa incrementan la actividad de la ALP en osteoblastos. Los estudios de Gopalakrishnan et al. [57] y Zhen et al. [51]

también encontraron que la reducción de la actividad de la ALP provocado por las altas concentraciones de glucosa fue restaurada cuando las células fueron tratadas con insulina y metformina, respectivamente. Nuestros resultados del efecto del LPS en la activación de la ALP en los osteoblastos coinciden o contrastan con otros estudios que analizan el efecto de los productos bacterianos en las funciones de los osteoblastos. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Shoji et al [58] en el que se encontró un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ALP en SAOS-2, una línea celular de osteosarcoma osteoblástica, pero contrastan con Mo et al [59] quien demostró que una expresión prolongada de LPS en células mesenquimales incrementa la actividad de la ALP.

EL ALP hidroliza el pirofosfato inorgánico (PPi) para generar fosfato inorgánico (Pi) [60]. El equilibrio entre las concentraciones de PPi y Pi se cree que es fundamental en la biomineralización. PPi inhibe directamente en osteoblastos cultivados la capacidad de depositar mineral, especialmente los cristales de hidroxiapatita de fosfato de calcio básico en la matriz pericelular en el hueso [61]. La degradación de PPi parece ser necesario para la mineralización [62] para comenzar la mineralización dentro de las vesículas de matriz (MV). La propagación de los cristales de hidroxiapatita fuera de las MV está mediada en parte por la unión de Pi al calcio asociado a los proteoglicanos de la matriz extracelular [63], al mismo tiempo parece ser marcadamente suprimida por PPi [64]. Sin embargo, el PPi se une y promueve la estabilización de la hidroxiapatita ya formada. Por lo tanto este complejo sistema sobre los efectos de PPi y Pi en relación con la actividad de ALP y mineralización podrían explicar la disminución de la ALP y la mineralización observada en los osteoblastos estimulados con LPS.

Por el contrario, los efectos de las altas concentraciones de glucosa que incrementan el depósito de calcio en cultivo, así como la expresión de OCN, BSP y Runx2, pero disminuyendo la actividad específica de la ALP, siguieron que el depósito de mineral en el cultivo se podría estar llevando a cabo de manera desordenada afectando la calidad de los cristales de hidroxiapatita depositados. Para analizar esto decidimos estudiar el efecto de 24mM de D(+) glucosa en la calidad de los cristales de hidroxiapatita depositados en el cultivo por medio de EDX.

Los resultados del EDX mostraron que las células osteoblásticas cultivadas en las condiciones de glucosa normal son capaces de producir cristales de hidroxiapatita similares a los que se forman fisiológicamente con una relación Ca/P de 1.67. La relación Ca/P detectados en los cristales formados con 5.5mM de glucosa fue de 1.6 a los 14 días de cultivo. Por el contrario, la alta concentración de glucosa (24mM) indujo la formación de cristales de baja calidad, ya que los valores de la relación Ca/P fueron menores que el valor de la hidroxiapatita fisiológica, sobre todo a los 7 días de cultivo (0.78 y 1.29 a los 7 días y 14 días respectivamente). Por otra parte, los valores de la relación Ca/P registrados por la alta concentración de glucosa y LPS fueron muy similares (0.77 y 1.41 a los 7 días y 14 días, respectivamente). El manitol no parece afectar la formación de cristales de hidroxiapatita. Por lo que sabemos, no existen reportes previos sobre el efecto de agentes bacterianos o las altas concentraciones de glucosa en la composición de cristales de fosforo y calcio.

En conjunto, estos resultados indican que la alta concentración de D(+) glucosa induce una mayor tasa de mineralización, pero el mineral que se forma no es de buena calidad o está en un estado inmaduro. Particularmente los bajos

valores de la relación Ca/P se registraron en el 7mo día de cultivo, pero la diferencia con respecto a la condición normal de glucosa fue más pequeña a los 14 días de cultivo. Para confirmar estos resultados, se requieren de más estudios cinéticos sobre este proceso.

En algunos estudios se ha demostrado que los osteoblastos son capaces de expresar el ARNm de algunas citocinas proinflamatorias y quimiocinas ante un estímulo bacteriano [32-33]. Dasu et al. [23] demostraron que una alta concentración de glucosa incrementa la producción de IL-1, IL6 y TNF- α en los monocitos. Sin embargo, el efecto de altas concentraciones de glucosa en la expresión de citocinas proinflamatorias y su relación con la formación de mineral, no se había estudiado antes en las células osteoblásticas.

Nuestros resultados muestran que, la alta concentración de glucosa incrementa la expresión del ARNm de la IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 y la IL-10 en células osteoblásticas, mientras que los controles iso-osmóticos tuvieron un comportamiento similar a la condición normal de glucosa. Una de las muchas consecuencias de la hiperglucemia es la formación de productos de glicación avanzada (AGEs). En este caso, la unión de los AGEs a su receptor (RAGE) en las células osteoblásticas podría activar la PLC, lo que da lugar a la producción del diacilglicerol (DAG) que sumado al DAG generado por las ROS, también puede activar la PKC. Esta vía activa las MAPK, lo que lleva a la activación de diferentes factores de transcripción, como el NF κ B y AP1, que se translocan al núcleo para transcribir los genes que codifican para las citocinas proinflamatorias [55, 65]. Esto sugiere que la alta concentración de glucosa en las células osteoblásticas podría regular la expresión de citocinas proinflamatorias por una

intercomunicación entre las vías de señalización como la PKC-MAPK, con las ROS o el incremento de los AGEs y su receptor.

Aunque se encontró que la alta concentración de D(+) glucosa incrementa la expresión del ARNm de varias citocinas proinflamatorias, no pudimos detectar la expresión de las citocinas IL-1 β o IL-6 a nivel de proteína. Dos posibles explicaciones se dan para este hecho. En primer lugar, la alta concentración de glucosa podría afectar a la traducción del ARNm a proteína. En apoyo a esta teoría, Kim et al [66] encontraron que las altas concentraciones de glucosa afectó la expresión de los genes tirosil ARNt sintetasa en las células osteoblásticas y sugirió que la condición de hiperglucemia puede desempeñar un papel importante en el proceso de síntesis de proteínas y podría afectar el metabolismo óseo. En segundo lugar, los osteoblastos no son una fuente importante de citocinas proinflamatorias. Apoyando esta teoría, Delphino et al [67] evaluaron la producción de citocinas en osteoblastos infectados con *Brucella spp.* Sin embargo, tampoco pudieron detectar niveles significativos de IL-1, IL-6 y TNF- α por el método de ELISA, sólo pudieron detectar muy bajas concentraciones de las quimiocinas IL-8 y MCP-1. Asai et al detectaron la inducción del ARNm de IL-6, IL-8, MCP-1 en una línea celular osteoblástica humanas, SAOS-2 por la estimulación con lípido A sintético del *E. coli*, pero no con otros compuestos bacterianos (peptiglicano de *S. aureus* y fimbrias de *P. gingivalis*) [68]. Estos resultados que muestran la expresión de citocinas sólo a nivel del ARNm o con baja detección de proteínas de quimiocinas como IL-8 o de citocinas como TNF- α , los cuales sólo se produjeron después de la estimulación de algunos productos bacterianos, sugieren que los osteoblastos pueden no representar una fuente importante de citocinas *in vivo* [68]. Por lo tanto, durante la enfermedad

periodontal, las quimiocinas y citocinas pueden ser producidas principalmente por las células epiteliales, lo que contribuye al reclutamiento de células del sistema inmune como los macrófagos y leucocitos junto con los fibroblastos, que a diferencia de los osteoblastos, pueden representar una fuente importante de citocinas proinflamatorias en el microambiente gingival. Otra posible explicación de la incapacidad para detectar las citocinas en los sobrenadantes por ELISA es que estas pudieran estar siendo degradadas por las el sistema ubiquitina-proteosoma.

Es bien sabido que la vía de señalización principal, responsable de la síntesis de citocinas proinflamatorias es la de los TLRs.

En osteoblastos, se había reportado previamente que después de la estimulación con ligandos bacterianos, la expresión del ARNm de algunos TLRs aumenta [33, 40, 69]. Algunos TLRs, por ejemplo, 4 y 2, pueden reconocer ligando endógenos, incluyendo las ROS [20] o los AGEs [21], lo que podría estar regulando la expresión de los TLRs. La expresión de los TLRs en los osteoblastos y la posible regulación de su expresión, ya sea debido a las altas concentraciones de glucosa o estrés osmótico no se había analizado anteriormente. En consecuencia, nuestros resultados ponen de manifiesto por primera vez la expresión constitutiva a nivel de proteína del TLR-2,-4 en la superficie celular y del TLR-3 y -9 dentro de las células osteoblásticas humanas. Estos resultados sugieren que las células osteoblásticas podrían estar involucradas en el reconocimiento del sistema inmune innato en el tejido óseo.

Inesperadamente, se encontró que tanto las altas concentraciones de D (+) glucosa y los controles iso-osmóticos (manito y L-glucosa), incrementaron la expresión de los TLR-2, -3, -4, y -9. Esto sugiere que el incremento en la

expresión de los TLRs puede ser debido al estrés osmótico. Por consiguiente, cuando Botolin & McCabe [50] investigaron el efecto de la hiperglucemia crónica en la expresión de la ALP y colágeno I en osteoblastos de ratón utilizando concentraciones similares de manitol a las que nosotros usamos en este estudio como control iso-osmótico, observaron que los osteoblastos son sensibles al estrés osmótico durante 12 a 48 horas de cultivo. Después de 48 horas, los osteoblastos son capaces de adaptarse a las altas concentraciones de manitol, por lo que después de las 48 horas los resultados observados son debidos a la alta concentración de glucosa. En este sentido, nosotros observamos que a las 24 horas de tratamiento nuestros controles iso-osmóticos y las altas concentraciones de glucosa tuvieron un efecto similar en la expresión de los TLR-2, -3, -4 y -9, mientras que a tiempos más largos a los que medimos la expresión del ARNm de citocinas proinflamatorias (48 horas), los controles iso-osmóticos se comportaron de manera muy similar a la concentración de 5.5mM de glucosa. Por lo tanto el estrés osmótico puede afectar la respuesta metabólica de las células osteoblásticas. Una posible explicación a estos inesperados resultados podría ser que ligandos endógenos de los TLRs aun no identificados estén participando en mecanismos de activación del estrés osmótico que conducen a la sobreexpresión del TLR-2, -3, -4 y -9.

Nuestros resultados también indican que la expresión de TLR-4 en los osteoblastos es inducida por la estimulación con LPS, mientras que la expresión constitutiva de TLR-2, -3 y -9 se mantuvo constante. Estos resultados coinciden parcialmente con los datos de reportes previos en los que mostraron la sobreexpresión de los ARNm del TLR-2 y -4 y el incremento en la expresión de quimiocinas CXCL5, CXCL8 y CXCL10 y de la MMP9 [32-33] e IL-1 α en

osteoblastos humanos estimulados con LPS de *E. coli*. Nuestros resultados difieren en parte con un reporte realizado en osteoblastos de ratón, porque a pesar de que se constató que tanto el ARNm del TLR-2 y-4 se expresa de forma constitutiva, el ARNm del TLR-2, pero no el TLR-4 fue inducido tras la estimulación con LPS. Además, en este estudio se observó la expresión constitutiva del ARNm del TLR-3 y -6, que no fueron influenciados por el tratamiento con LPS, aunque el factor de diferenciación de osteoclastos (una citocina de la familia del TNF) fue inducido [40]. Del mismo modo, se demostró que la expresión de CXCL10 puede ser estimulado en los osteoblastos por *Salmonella* parcialmente mediada a través del TLR-4. También se observó que la expresión del ARNm del TLR-2 es inducida por una bacteria, mientras que la expresión constitutiva del ARNm del TLR-4 se mantuvo sin cambios por el estímulo bacteriano [70].

En el presente estudio, el análisis de los efectos de las altas concentraciones de glucosa en las citocinas y la expresión de TLRs fue evaluada en las células osteoblásticas cultivadas en medio no mineralizante, similar a la mayoría de los estudios en los que evalúan los efectos de otros factores (bacteria o componentes bacterianos) sobre la expresión y función de los TLRs y su respuesta (expresión de citocinas y quimiocinas) en los osteoblastos. Sería interesante determinar si la magnitud de los efectos observados en la expresión de los TLR y la expresión de citocinas se ve alterada en células osteoblásticas cultivadas en medio mineralizante frente a las cultivadas en medio no mineralizante. En un estudio realizado en células estromales mesenquimales osteoprogenitoras, Mo et al. [59] mostraron niveles basales muy bajos de la expresión génica del TLR-2 y -4 que se incrementaba gradualmente durante la

osteogénesis. En contraste con nuestros resultados en los que mostramos un aumento en la expresión del TLR-4 inducido por el LPS, se ha encontrado en otros estudios que el LPS disminuye la expresión del ARNm del TLR-2 y -4 en el día 12 de diferenciación. Es importante señalar que en el estudio de Mo et al.[59] para la inducción de la osteogénesis, las células fueron tratadas con medio condicionante similar al usado por nosotros. La única diferencia consistió en el uso de 100nM de dexametasona, lo que podría explicar la diferencia entre ambos resultados.

La aposición y reabsorción ósea son reguladas por las osteocinas OPG y RANKL. La regulación de estas citocinas esta mediada por los osteoblastos, ya que son responsables de su síntesis [71]. Kikuchi et al. [40] reportaron que la estimulación de osteoblastos de ratón con LPS induce la expresión de RANKL a través de TLR-4. Por el contrario, Zou et al [69] demostraron que la regulación de RANKL en osteoblastos fue a través de TLR-9. Sin embargo, el efecto de las altas concentraciones de glucosa en la expresión de RANKL y OPG no se había estudiado antes.

Nuestros resultados son consistentes con los de Kikuchi et al [40], que mostró que el LPS incrementa la expresión del RANKL y disminuye la expresión de OPG. Esto confirma que la infección bacteriana puede provocar la resorción ósea. En este estudio hemos demostrado por primera vez que las altas concentración de D (+) glucosa (12mM y 24mM) incrementan la expresión de RANKL, mientras disminuyen la expresión de OPG, lo que sugiere que las altas concentraciones de glucosa puede afectar el proceso de biomineralización a través de RANKL y OPG, sin embargo, se requieren de estudios complementarios para confirmar esta teoría.

Las altas concentraciones de D(+) glucosa, a través de la generación de ROS, podría conducir a una alta expresión de RANKL [72]. Apoyando esta hipótesis, Maggio et al. [73] reportaron que los aniones superóxido, radicales hidroxilo y H_2O_2 parecen estar asociados con la osteoporosis en mujeres mayores. Walsh et al. [74] sugieren que las ROS podrían actuar como un segundo mensajero en la osteoclastogénesis a través de la NADPH oxidasa 1 (Nox). Singh et al. [75] explica que probablemente las ROS promueven la vía de señalización de MAPK de manera similar a lo que ocurre en los linfocitos B.

Varios estudios clínicos han reportado el impacto de la diabetes en el proceso patológico de la inflamación y la pérdida de masa ósea, sin embargo, los mecanismos por los cuales estas complicaciones se presentan, aun son desconocidos [76-80]. Los resultados aquí mostrados sugieren que la hiperglucemia puede afectar directamente la biomineralización asociada al proceso inflamatorio en los osteoblastos.

Se debe tener en cuenta que la diabetes mellitus es una enfermedad compleja. De hecho parece que los dos tipos de diabetes pueden afectar las funciones óseas de forma diferente.

Generalmente, se observa que la diabetes tipo 1 causa una disminución en la densidad del mineral óseo, mientras que en la diabetes tipo 2 se ha reportado una densidad ósea mayor o normal [81-82]. La hiperglucemia y la glucosuria son síntomas típicos de la DMT1 y DMT2 y pueden favorecer el desarrollo de la hipercalciuria, que puede conducir a un balance negativo del calcio, lo que lleva a la pérdida de densidad ósea. Sin embargo, como en otros tejidos, la hiperglucemia puede afectar al sistema óseo a través de diversos mecanismos, como el aumento de las ROS, la vía de los polioles, la glicación de las proteínas

claves en la formación de hueso [83-84]. Investigaciones clínicas y básicas indican que en la DMT1 existe una modulación de los osteoblastos en lugar de afectar la actividad de los osteoclastos. Tanto los adipocitos y los osteoblastos se derivan una célula madre común mesenquimal pluripotencial. La evidencia experimental en un modelo de DMT1 en ratón indica una mayor diferenciación de adipocitos y la acumulación de grasa, con una disminución en la diferenciación de los osteoblastos y disminución en la formación de hueso [50]. La actividad de los osteoblastos puede también ser alterada en la DMT1 debido a las deficiencias tanto en el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y la insulina. Estas hormonas son importantes para el mantenimiento de la masa ósea [85]. Además, los niveles séricos de osteocalcina disminuyó en los pacientes con DMT1 y en ratones diabéticos [86]. La amilina es un péptido secretado por las células β pancreáticas. La deficiencia de amilina en la DMT1 se ha asociado a efectos negativos en el hueso, provocando osteopenia en ratones con DMT1 inducida por estreptozotocina. También se ha visto que la administración de la amilina mejora los índices de densidad ósea [87]. La desregulación de las adiponectinas como grelina, leptina y adiponectina ha sido reportada como una posible causa de la pérdida ósea en la DMT1 [88]. No está claro si el proceso inmune está asociado a la DMT1 y si esto puede influir en los efectos perjudiciales de la DMT1 en el hueso, que puede ser debido a la mayor presencia de células T activadas que producen un incremento de las citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento que pueden afectar el metabolismo óseo [87]. Los factores que pueden contribuir a la fragilidad de los huesos en la DMT2 incluyen una pérdida rápida de hueso, una disminución de la densidad cortical, las diferencias en la geometría del hueso, la acumulación de microdaños en los sitios de remodelación

ósea y la acumulación de AGEs. En contraste con la DMT1, la resistencia periférica a la insulina y la hiperinsulinemia caracterizan las deficiencias en tolerancia a la glucosa en la DMT2, con posibles efectos anabólicos en el hueso. La resistencia a la insulina y el aumento del tejido adiposo observado con frecuencia en la DMT2 pueden estar asociados con el aumento de la inflamación y por lo tanto con un mayor recambio óseo [25].

En resumen, nuestros resultados muestran que la alta concentración de glucosa extracelular probablemente actúa como un factor endógeno que altera la biomineralización, aumenta la cantidad y reduce la calidad del mineral. Nuestros resultados también sugieren que las células osteoblásticas parecen ser susceptibles al estrés osmótico que podría regular la expresión de TLRs a tiempos cortos.

CONCLUSIONES

- 1) La concentración de 24mM de glucosa extracelular pudiera estar actuando como un factor endógeno que altera la biomineralización ya que:
 - a) eleva la cantidad de mineral depositado en cultivo.
 - b) eleva la expresión de OCN, BSP y el factor de transcripción Runx2.
 - c) disminuye la actividad específica de la ALP
 - d) disminuye la calidad del mineral depositado en cultivo a los 7 y 14 días de cultivo.
 - e) eleva la expresión de RANKL y disminuye la expresión de OPG.
 - f) incrementa la expresión de ARNm de IL1beta, IL6, IL8, MCP-1 e IL10.
- 2) Los osteoblastos no secretan IL1 beta, IL6 detectables por ELISA, aunque si se secretan niveles bajos de TNF α y IL10.
- 3) Los osteoblastos expresan constitutivamente los TLR 2, 3, 4 y 9.
- 4) El manitol, la L glucosa y la concentración de 24mM de glucosa incrementan la expresión de los TLR 2, 3 y 4.

PERSPECTIVAS

El posible efecto de las altas concentraciones de glucosa en los osteoblastos de resume en el esquema 1.

La hiperglucemia es una condición característica de la DM dando como resultado la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que en los diferentes tejidos ocasiona estrés oxidativo [55]. Además del estrés oxidativo, la formación de AGEs, la resistencia a la insulina y la incapacidad de la secreción de insulina, se han relacionado con las complicaciones de la DM en diferentes tejidos [89-92].

Algunos TLRs como el -4 y el -2 pueden reconocer ligandos endógenos que también regulan su expresión como proteínas de shock térmico, la fibronectina en condrocitos [93], especies reactivas de oxígeno [20] o AGEs [21].

Se tiene la hipótesis que las complicaciones de la DM son debido al estrés celular y disfunción que causa la hiperglucemia en la mitocondria por medio del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que lleva a un estrés oxidativo.

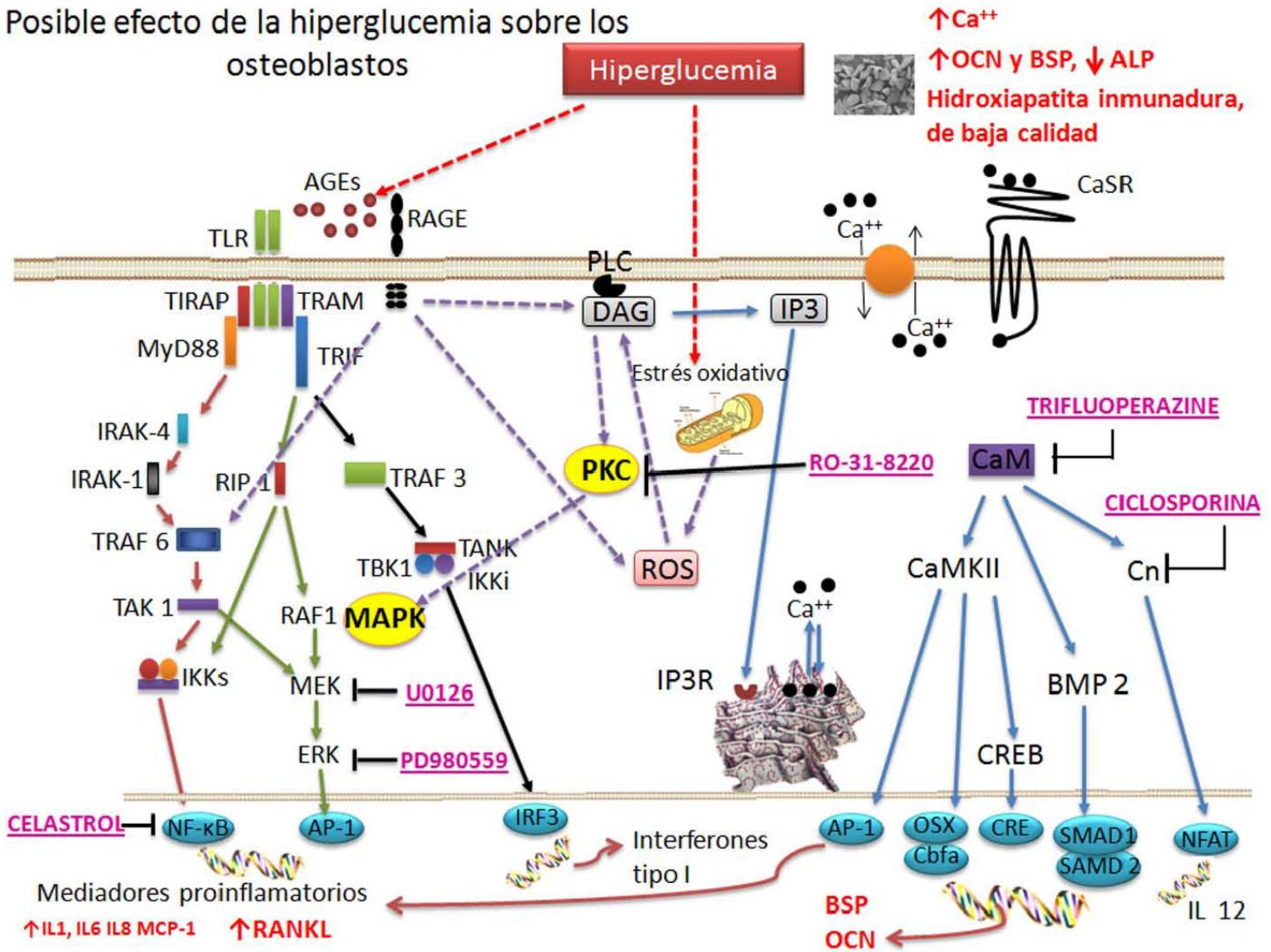
Una vía posible en los osteoblastos humanos es que los AGEs se unen a su receptor (RAGE), se activa la PLC. Esta da origen al diacilglicerol (DAG) que sumado al DAG originado por las ROS activa la PKC, la cual activa la vía de las MAPK que conlleva a la activación de diferentes factores de la transcripción como el NFkB y el AP1. Estos se translocan al núcleo y llevan a cabo la transcripción de genes que codifican para proteínas proinflamatorias. [55, 65]

Esto es apoyado por las investigaciones de Ogawa *et al.* [94], en la que evidenciaron que los AGEs inhiben la mineralización en osteoblastos a través del incremento de sus receptores inducidos por la glucosa y la investigación de Lalla *et al.* [95] en la que observaron que bloqueando el RAGE se disminuía la pérdida de hueso asociada a la periodontitis en ratones diabéticos.

Sería interesante analizar si en osteoblastos humanos la alta concentración de glucosa pudiera regular la expresión de los TLRs por un entrecruzamiento de vías de señalización PKC-MAPKs, especies reactivas de oxígeno o el aumento de AGEs, RAGEs, así como por el estrés osmótico.

Sería importante medir la producción de ROS en células osteoblásticas e investigar estas vías de señalización involucradas en la hiperglucemia y el metabolismo óseo.

Posible efecto de la hiperglucemia sobre los osteoblastos



Las líneas rojas punteadas indican las hipótesis de Evans *et al.* 2002 y Tsan & Gao 2004 sobre el efecto de la hiperglucemia. Las líneas moradas punteadas indican las hipótesis planteadas en este trabajo. Las letras en rojo indican los resultados generados en este trabajo. Los compuestos en color rosa son bloqueadores a diferentes niveles de las vías de señalización que podrían usarse como estrategia para investigar que vías están participando en este proceso.

AGEs: Productos de glicación avanzada, **RAGE**: Receptor de los productos de glicación avanzada, **Ca⁺⁺**: calcio, **CaSR**: receptor sensible al calcio, **PLC**: fosfolipasa C, **TLR**: receptores tipo Toll, **TIRAP**: proteína adaptadora que contiene un dominio receptor a la interleucina 1 de los Toll, **TRAM**: molécula adaptadora relacionada con TRIF, **MyD88**: gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88, **TRIF**: adaptador que contiene un dominio de unión a TIR, **IRAK**: cinasa asociada al receptor de IL-1, **RIP**: cinasa reguladora de las señales extra celulares, **TRAF**: factores asociados al receptor del TNF, **TAK**: cinasa activadora del TGF- β , **ERK**: cinasa regulada por señales extracelulares, **IKK**: inhibidor de la cinasa I- κ Bs, **MAPK**: proteína cinasa activada por mitígeno, **TBK1**: proteínas cinasas de unión a TAK-1, **IKKi**: inhibidor I- κ B Kinases, **DAG**: diacilglicerol, **PKC**: proteína cinasa C, **ROS** especies reactivas de oxígeno, **IP3R**: receptor del inositol trifosfato, **CaMKII**: cinasa II de la calmodulina, **CaM**: calmodulina, **Cn**: calcineurina, **BMP 2**: proteína morfogenética del hueso 2, **CREB**: elemento de unión en respuesta al AMPc, **NF κ B**: factor nuclear κ B, **AP-1**: proteína activadora 1, **IRF 3**: factor regulador del interferon 3, **OSX**: osterix, **Cbfa o Runx2**: runt-related transcription factor 2, **CRE**: factor de transcripción en respuesta al AMPc, **NFAT**: factor activador de células T, **OCN**: osteocalcina, **BSP**: sialoproteína ósea, **RANKL**: ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B, **IL** interleucina, **MCP-1**: proteína quimioatrayente de monocitos 1.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Geneva WHODoNDS. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. In; 1999.
- [2] Herder C, Illig T, Rathmann W, Martin S, Haastert B, Muller-Scholze S, Holle R, Thorand B, Koenig W, Wichmann HE, Kolb H. Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen* 2005;67 Suppl 1: S115-21.
- [3] Devaraj S, Tobias P, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes. *Cytokine* 2011.
- [4] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11: 98-107.
- [5] Williams RC. Periodontal disease. *N Engl J Med* 1990;322: 373-82.
- [6] Graves DT. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis* 1999;28: 482-90.
- [7] Díaz Caballero A, ATL, Simancas Pallares M. Proteínas expresadas durante la periodontitis crónica. Revisión de la literatura. *Avances en Periodoncia* 2009;21: 10.
- [8] Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, Knowler WC. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care* 1990;13: 836-40.
- [9] Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol* 1998;69: 76-83.
- [10] Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24: 8-16.
- [11] Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrad S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 2001;159: 513-25.
- [12] Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 4854-8.
- [13] Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409: 307-12.
- [14] Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994;93: 2438-46.

- [15] Sarah SM, Tamilselvan S, Kamatchiammal S, Suresh R. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis. *Indian J Dent Res* 2006;17: 114-6.
- [16] Rojo-Botello NR, Garcia-Hernandez AL, Moreno-Fierros L. Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2011.
- [17] Wong FS, Wen L. Toll-like receptors and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1150: 123-32.
- [18] Retzlaff C, Yamamoto Y, Hoffman PS, Friedman H, Klein TW. Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. *Infect Immun* 1994;62: 5689-93.
- [19] Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002;195: 99-111.
- [20] Ryan KA, Smith MF, Jr., Sanders MK, Ernst PB. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004;72: 2123-30.
- [21] Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004;76: 514-9.
- [22] Hajishengallis G, Tapping RI, Harokopakis E, Nishiyama S, Ratti P, Schifferle RE, Lyle EA, Triantafilou M, Triantafilou K, Yoshimura F. Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus. *Cell Microbiol* 2006;8: 1557-70.
- [23] Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes* 2008;57: 3090-8.
- [24] Collin HL, Uusitupa M, Niskanen L, Kontturi-Narhi V, Markkanen H, Koivisto AM, Meurman JH. Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1998;69: 962-6.
- [25] Merlotti D, Gennari L, Dotta F, Lauro D, Nuti R. Mechanisms of impaired bone strength in type 1 and 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20: 683-90.
- [26] Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292: E740-7.
- [27] Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346: 739-45.

- [28] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116: 3015-25.
- [29] El-seweidy MM, El-Swefy SE, Ameen RS, Hashem RM. Effect of age receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in stz diabetic rats. *Pharmacol Res* 2002;45: 391-8.
- [30] Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Lett* 1999;453: 283-7.
- [31] Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone* 2001;28: 21-8.
- [32] Bar-Shavit Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity* 2008;41: 195-203.
- [33] Ohno T, Okahashi N, Morisaki I, Amano A. Signaling pathways in osteoblast proinflammatory responses to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23: 96-104.
- [34] Gehron P. Cell-mediated calcification in vitro. Florida, Estados Unidos; 1992.
- [35] Low MG. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1989;988: 427-54.
- [36] Sela JS, Z. Swain, L.D. Boyan, B.D. The role of matrix vesicles in calcification. In: press C, editor. Bonucci E. Calcification in biological systems. Florida, Estados Unidos 1992.
- [37] Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1192: 190-200.
- [38] Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Rey JM, Garcia-Garcia A. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109: 679-86.
- [39] Leibbrandt A, Penninger JM. RANK(L) as a key target for controlling bone loss. *Adv Exp Med Biol* 2009;647: 130-45.
- [40] Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, Yamamoto G, Hishikawa T, Noguchi T, Yoshikai Y. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol* 2001;166: 3574-9.
- [41] Arzate H, Alvarez-Perez MA, Aguilar-Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *J Periodontal Res* 1998;33: 249-58.

- [42] Kaplow LS. A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* 1955;10: 1023-9.
- [43] Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329: 77-84.
- [44] Cuisinier FJ, Glaisher RW, Voegel JC, Hutchison JL, Bres EF, Frank RM. Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction. *Ultramicroscopy* 1991;36: 297-305.
- [45] Lowry OH, Roberts NR, Leiner KY, Wu ML, Farr AL. The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods. *J Biol Chem* 1954;207: 1-17.
- [46] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-54.
- [47] Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* 2010;2010: pdb prot5439.
- [48] Coussens AK, Hughes IP, Morris CP, Powell BC, Anderson PJ. In vitro differentiation of human calvarial suture derived cells with and without dexamethasone does not induce in vivo-like expression. *J Cell Physiol* 2009;218: 183-91.
- [49] Li YM, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Limbert C, Seufert J, Kassem M, Schutze N, Jakob F, Ebert R. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363: 209-15.
- [50] Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem* 2006;99: 411-24.
- [51] Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications* 2010;24: 334-44.
- [52] Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, Otani S. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone* 1998;22: 17-23.
- [53] Kim HS, Park JW, Yeo SI, Choi BJ, Suh JY. Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells in vitro. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;74: 41-7.
- [54] Weil BR, Abarbanell AM, Herrmann JL, Wang Y, Meldrum DR. High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296: R1735-43.
- [55] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52: 1-8.

- [56] Wang L, Nancollas GH. Pathways to biomineralization and biodemineralization of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls. *Dalton Trans* 2009: 2665-72.
- [57] Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J, Aruldas MM, Srinivasan N. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. *Biochem Cell Biol* 2006;84: 93-101.
- [58] Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka H, Suzuki N, Takeichi O, Sugaya A, Maeno M. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E2 and the receptor Ep4 in osteoblasts. *Life Sci* 2006;78: 2012-8.
- [59] Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biol* 2008;9: 52.
- [60] Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281: C1-C11.
- [61] Johnson K, Moffa A, Chen Y, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R. Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *J Bone Miner Res* 1999;14: 883-92.
- [62] Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys* 1984;231: 1-8.
- [63] Poole AR, Matsui Y, Hinek A, Lee ER. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat Rec* 1989;224: 167-79.
- [64] Anderson HC, Hsu HH, Morris DC, Fedde KN, Whyte MP. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am J Pathol* 1997;151: 1555-61.
- [65] Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 2007;583: 9-24.
- [66] Kim JH, Kim YY, Kim SJ. High glucose inhibits gene expression of tyrosyl-tRNA synthetase in osteoblast cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009;31: 639-44.
- [67] Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. *Infect Immun* 2009;77: 984-95.
- [68] Asai Y, Hirokawa Y, Niwa K, Ogawa T. Osteoclast differentiation by human osteoblastic cell line SaOS-2 primed with bacterial lipid A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38: 71-9.

- [69] Zou W, Amcheslavsky A, Bar-Shavit Z. CpG oligodeoxynucleotides modulate the osteoclastogenic activity of osteoblasts via Toll-like receptor 9. *J Biol Chem* 2003;278: 16732-40.
- [70] Gasper NA, Petty CC, Schrum LW, Marriott I, Bost KL. Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2002;70: 4075-82.
- [71] Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 2005;83: 170-9.
- [72] Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005;106: 852-9.
- [73] Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 1523-7.
- [74] Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 2006;24: 33-63.
- [75] Singh DK, Kumar D, Siddiqui Z, Basu SK, Kumar V, Rao KV. The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca²⁺ and an oxidant signal. *Cell* 2005;121: 281-93.
- [76] Forsen L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trondelag Health Survey. *Diabetologia* 1999;42: 920-5.
- [77] Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 2001;24: 1192-7.
- [78] Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol* 2005;76: 418-25.
- [79] Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1990;121: 532-6.
- [80] Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30: 182-92.
- [81] Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995;44: 775-82.
- [82] Weinstock RS, Goland RS, Shane E, Clemens TL, Lindsay R, Bilezikian JP. Bone mineral density in women with type II diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 1989;4: 97-101.
- [83] McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *J Cell Biochem* 2007;102: 1343-57.

- [84] Giaccari A, Sorice G, Muscogiuri G. Glucose toxicity: the leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes - mechanisms and potentials for treatment. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19: 365-77.
- [85] Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Bohm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol* 1998;159: 297-306.
- [86] Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology* 2005;146: 3622-31.
- [87] Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 2007;22: 1317-28.
- [88] Reid IR. Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int* 2008;19: 595-606.
- [89] Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern TS, King GL. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase Cbeta-null mice. *Diabetes* 2006;55: 3112-20.
- [90] Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jirousek MR, King GL. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest* 1996;98: 2018-26.
- [91] King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol* 2008;79: 1527-34.
- [92] Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 2007;55: 498-510.
- [93] Su SL, Tsai CD, Lee CH, Salter DM, Lee HS. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1beta and fibronectin fragments in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13: 879-86.
- [94] Ogawa N, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. The combination of high glucose and advanced glycation end-products (AGEs) inhibits the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through glucose-induced increase in the receptor for AGEs. *Horm Metab Res* 2007;39: 871-5.
- [95] Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;105: 1117-24.

ARTICULOS

1. Rojo-Botello NR, García Hernández AL, Moreno –Fierros L. Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* (2011), doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01405.x
2. García-Hernández AL, Arzate H, Gil-Chavarria I, Rojo-Botello NR, Moreno-Fierros L. High glucose concentration alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone* (2011), doi:10.1016/j.bone.2011.10.032.