



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS ÁCIDOS
GRASOS ARAQUIDÓNICO Y DOCOSAHEXAENOICO EN EL
PROCESO DE BIOMINERALIZACIÓN ASOCIADO CON
ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

SAÚL ERNESTO CIFUENTES MENDIOLA

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA LILIA GARCÍA
HERNÁNDEZ**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y a mis abuelos, gracias por todo sin ustedes jamás habría llegado a este camino, esto es fruto de su esfuerzo y dedicación y sin su apoyo jamás habría conocido el amor por el estudio y el amor por la biología. Gracias por todo.

A la Doctora Ana Lilia García Hernández, gracias por permitirme ser su alumno y por la confianza depositada en mí. Gracias por siempre fomentar el desarrollo de habilidades que son fundamentales para el quehacer científico y enseñarme a superarme constantemente como alumno y como persona. También quiero agradecerle por su paciencia y por haber compartido conmigo su conocimiento y experiencia. Es usted una excelente persona y profesora. Muchas gracias por todo doctora.

A mis sinodales la Dra. Leticia Moreno Fierros, la Dra. Martha Salcedo, el Dr. Maximiliano Ibarra y el Dr. Alonso Vilches por su muy valiosa aportación al desarrollo de este trabajo y a mi desarrollo académico.

A mis profesores que durante la licenciatura me brindaron herramientas y conocimientos y por enseñarme el increíble y a la vez impresionante mundo de la biología.

A mis amigos gracias por estar ahí, por apoyarme siempre, por su comprensión y por siempre desearme el éxito.

A mis compañeros de laboratorio y licenciatura que me enriquecieron mucho con sus comentarios, sugerencias y consejos gracias a todos

Gracias a todas las personas que influyeron y me impulsaron a estudiar biología.

Un agradecimiento especial al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento otorgado para realizar este trabajo dentro del proyecto con clave: IA203014

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. La Diabetes mellitus.....	5
1.1.1. Tipos de DM.....	5
1.2. Sistema óseo	6
1.2.1. Remodelación ósea.....	7
1.2.2. Diferenciación osteoblástica.....	10
1.2.3. Regulación del metabolismo óseo	10
1.3. Osteoporosis	11
1.4. Diabetes mellitus y desregulación ósea.....	12
1.5. Los ácidos grasos poli-insaturados	14
2. ANTECEDENTES	17
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
7. MATERIAL Y MÉTODOS	25
7.1. Cultivo celular.....	25
7.2. Condiciones de cultivo.....	25
7.3. Determinación de la formación de nódulos de mineralización y cantidad de calcio depositado en cultivo	26
7.4. Análisis de la formación de mineral por microscopia electrónica de barrido.....	27
7.5. Determinación de la actividad específica de la fosfatasa alcalina	27
7.6. Determinación intracelular de especies reactivas de oxígeno.....	28
7.7. Determinación de la concentración extracelular de nitritos.....	29
7.8. Análisis estadístico	29
8. RESULTADOS	30
8.1. Los ácidos grasos DHA y araquidónico AA reducen la mineralización en condiciones de alta glucosa	30
8.2. El DHA y AA en combinación con alta glucosa incrementan la actividad específica de la fosfatasa alcalina a los 7 días de cultivo en comparación con el grupo con normo-glucosa.....	34
8.3. El AA y DHA reducen la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en combinación con alta glucosa	36
8.4. El AA y DHA incrementan la producción extracelular de nitritos	39
9. DISCUSIÓN	41
10. CONCLUSIONES	50
11. PERSPECTIVAS	51
12. REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

REMODELADO ÓSEO.....	9
VÍA RANKL/RANK/OPG	11
METABOLISMO DE LOS AGPI.....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
EFFECTO DEL DHA Y AA EN LA BIOMINERALIZACIÓN	31
EFFECTO DEL DHA Y AA EN LA CANTIDAD DE CALCIO DEPOSITADO	31
EFFECTO DEL DHA Y AA EN LA BIOMINERALIZACIÓN EN CONDICIONES DE ALTA GLUCOSA	33
EFFECTO DEL DHA Y AA EN LA DEPOSICIÓN DE CALCIO EN CONDICIONES DE ALTA GLUCOSA	33
EFFECTO DEL DHA Y AA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA FOSFATASA ALCALINA.....	35
EFFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE ERO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	37
EFFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE ERO POR ESPECTROFLUOROMETRIA	38
EFFECTO DEL DHA Y AA EN LA PRODUCCIÓN DE NITRITOS	40

ABREVIATURAS

2'7'-DCFH-DA. 2'7'-diclorofluoresceína diacetato	HSP. Proteína de choque térmico
AA. ácido araquidónico	IGF. Factor de crecimiento insulínico
ADMA. Dimetil-arginina asimétrica	IGF-1. Factor de crecimiento similar a la insulina 1
AG. Alta glucosa	INOS. Sintasa de óxido nítrico inducible
AGEs. Productos finales de glicación avanzada	IL. Interleucina
AGPI. Ácidos grasos poliinsaturados	IMF. Intensidad media de fluorescencia
ALA. Ácido α -linolénico	LA. Ácido linoleico
ALH. Antígeno leucocitario humano	LOX. Lipooxigenasa
ALP. Fosfatasa alcalina	LPS. Lipopolisacárido
AMP. Adenosín monofosfato	MAN. Manitol
AMPK. Proteína cinasa activada por AMP	MCP-1. Proteína quimioatrayente de monocitos
BMP. Proteína morfogenética ósea	M-CSF. Factor estimulante de colonias de macrófagos
BMU. Unidad básica multicelular	MEB. Microscopia electrónica de barrido
BSP. Sialoproteína ósea	mRNA. Ácido ribonucleico mensajero
CAM. Calmodulina	MG-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
COX. Ciclooxygenasa	NG. Normo-glucosa
DHA. Ácido docosahexaenoico	NO. Óxido nítrico
DM. Diabetes mellitus	nm. Nanómetro
DMO. Densidad mineral ósea	NOS. Sintasa de óxido nítrico
DMP1. Proteína de la matriz de la dentina 1	ObH. Osteoblastos de humano
DMTI.- diabetes mellitus tipo 1	OCN. Osteocalcina
DMT2. Diabetes mellitus tipo 2	OPG. Osteoprotegerina
eNOS. Sintasa de óxido nítrico endotelial	PH 41-84. Hormona de longitud completa paratiroidea
EPA. Ácido eicosapentaenoico	PG. Prostaglandina
ERO. Especies reactivas de oxígeno	PGE2. Prostaglandina E2
FGF. Factor de crecimiento de fibroblastos	Pi. Fosfato inorgánico
GAD. Glutamato descarboxilasa	PLA2. Fosfolipasa A2
Gluc. Glucosa	pNPP. p-Nitrofenil fosfato
GPx. Glutación peroxidasa	PPi. Pirofosfato
HAP. Hidroxiapatita	PTH. Paratohormona

RANK. Receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$

RANK-L. Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$

RUNX-2. Factor de transcripción relacionado con Runt-2

SER. Serina

SFB. Suero fetal bovino

SOD. Superóxido dismutasa

TGF- α . Factor de crecimiento transformante α

TGF- β . Factor de crecimiento transformante β

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa

Trox. Trolox

VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La hiperglucemia presente en la diabetes mellitus se ha asociado con patologías óseas como la osteoporosis; la cual se caracteriza por pérdida de la densidad mineral, por un incremento de fracturas y por la alteración en el metabolismo óseo. Se ha demostrado que las altas concentraciones de glucosa afectan el proceso de biomineralización al reducir la calidad del mineral, incrementar su formación y alterar la actividad de la fosfatasa alcalina en osteoblastos de humano, lo que puede repercutir directamente en el desarrollo de osteopatías asociadas a diabetes. En este sentido se han buscado tratamientos que puedan contrarrestar los efectos perjudiciales de la alta glucosa en osteoblastos y en el tejido óseo. Se ha propuesto que el enriquecimiento dietético con la relación adecuada de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ω -6 y ω -3 (también llamados n-6 y n-3) tienen efectos benéficos para la salud ósea, de entre los cuales los más importantes con respecto a la salud del hueso son el ácido araquidónico (AA) que representa a los AGPI n-6 y el ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) como representantes de los AGPI n-3. En este sentido, se ha reportado que el DHA puede elevar o conservar la densidad mineral del hueso e inducir la maduración de los osteoblastos, reducir su apoptosis y la necrosis del tejido óseo, mientras que el AA puede reducir la apoptosis de los osteoblastos e inducir la translocación de factor de transcripción RUNX2 involucrado en la actividad osteoblástica, sin embargo también puede promover la resorción ósea a través del incremento de prostaglandina E2 (PGE2) y citocinas pro-inflamatorias. Debido a esto consideramos que los AGPI DHA y AA podrían contrarrestar los efectos negativos de la alta glucosa en osteoblastos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los AGPI DHA y AA en las alteraciones provocadas por altas concentraciones de glucosa en el proceso de biomineralización en osteoblastos de humano. **MATERIAL Y MÉTODOS:** se cultivaron *in vitro* células osteoblásticas humanas con niveles fisiológicos de glucosa (5.5mM) y niveles altos de glucosa (24mM) y se trataron con dos concentraciones de DHA o AA. Para determinar el efecto de estos ácidos grasos en el proceso de biomineralización: i) se determinó la formación de nódulos de mineralización, a través de la tinción con alizarina roja y microscopía electrónica de barrido y se cuantificó la concentración de calcio depositado en cultivo ii) se midió la actividad específica de la fosfatasa alcalina en proteínas totales a través del uso de pNPP como sustrato iv) se determinó la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo y espectrofluorometría y v) la concentración extracelular de nitritos con el reactivo de Griess. **RESULTADOS:** los resultados mostraron que la alta concentración de glucosa incrementa la cantidad de nódulos de mineralización, alteran su distribución en cultivo e incrementa el calcio depositado, en contraste cuando fueron tratadas con DHA o AA bajo las mismas condiciones observamos que la formación de nódulos, la cantidad de calcio y la distribución de los cristales fue similar al grupo con normo-glucosa a los 14 y 21 días. Con respecto a la actividad específica de la fosfatasa alcalina observamos que la alta glucosa altera su actividad incrementándola a los 7 días y disminuyéndola drásticamente a los 14 días, sin embargo ninguno de los ácidos grasos contrarrestó este efecto. Con respecto a la producción de ERO, la alta glucosa incremento su producción de manera muy marcada, en contraste cuando las células fueron tratadas con ambos ácidos grasos bajo las mismas

condiciones de glucosa, observamos una disminución muy significativa de manera similar a como lo hizo el antioxidante Trolox. Cuando determinamos las concentraciones de nitritos observamos que la alta concentración de glucosa inhibe su producción pero cuando se trataron las células con ambos ácidos grasos observamos un incremento. **CONCLUSIONES:** el DHA regula la formación de los nódulos de mineralización y el metabolismo de los osteoblastos ya que normaliza la formación y distribución de la matriz mineral y del calcio depositado en cultivo, disminuye las ERO similar a como lo hace el antioxidante e incrementa la producción de nitritos. En otro sentido el efecto del ácido araquidónico aun no es claro, ya que parece tener efecto sobre las alteraciones en la formación de mineral y las alteraciones metabólicas provocadas por niveles elevados de glucosa al regular la formación y distribución de los cristales de hidroxiapatita y la deposición de calcio, además de inhibir de manera importante las ERO e incrementar la producción de nitritos, sin embargo podría intensificar los efectos adversos de niveles elevados de glucosa con respecto a la calidad del mineral ya que aumenta de manera importante la actividad de la ALP. En general ambos ácidos grasos tienen efectos sobre la biomineralización y el metabolismo de los osteoblastos en condiciones de alta glucosa, sin embargo los efectos del DHA son más alentadores con respecto a su utilización como un futuro tratamiento para tratar la osteopatía diabética.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por aumento crónico en los niveles de glucosa (hiperglucemia) debido a una deficiencia absoluta o relativa de insulina y por la alteración en el metabolismo de los lípidos carbohidratos y proteínas (Ying-Ying *et al.*, 2012; Triana-Mantilla, 2001).

La DM es considerada como una epidemia en muchos países. En el mundo existen alrededor de 387 millones de personas diabéticas representando el 5.1% de la población mundial y tan solo en México se tienen diagnosticados 9 millones personas diabéticas, equivalente al 7.5% de la población nacional (IDF, 2014), convirtiéndose en una de las principales preocupaciones del sector salud ya que además representa la segunda causa de muerte en nuestro país. La DM aumenta el riesgo de desarrollar otros problemas de salud que pueden provocar una discapacidad o la muerte (IDF, 2014), como cardiopatías, retinopatías, neuropatías, osteopatías, falla renal y amputación de las extremidades (Hernández-Ávila *et al.*, 2013).

1.1.1. Tipos de DM

De acuerdo con la asociación americana de diabetes esta enfermedad se clasifica en:

- Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1): representa sólo del 5 al 10% de las personas diabéticas. Es ocasionada por la destrucción de las células β pancreáticas y se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina y por cetoacidosis. Esta categoría se subdivide en dos grupos:
 - Diabetes autoinmune: caracterizada por la destrucción de las células β del páncreas, a la presencia de auto-anticuerpos para la insulina, para la glutamato descarboxilasa (GAD) y para las tirosina fosfatasa IA-2 e IA-2b en un 85-90% de los casos y también se asocia a genes del antígeno leucocitario humano (ALH) incrementando la respuesta autoinmune y puede desarrollarse debido a factores ambientales aún no definidos.
 - Diabetes idiopática: Puede presentarse insulinopenia permanente, cetoacidosis episódica, no se sabe que lo causa, carece de marcadores de autoinmunidad para las células β y no tiene asociación con ALH.

- Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2): representa del 90-95% de las personas con diabetes, se caracteriza por una deficiencia relativa de insulina. La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes son obesos, lo cual provoca resistencia a la insulina.
- Otros tipos específicos de diabetes
 - Defectos genéticos de la célula β : se caracteriza por la aparición de hiperglucemia a una edad temprana y por la producción de insulina deteriorada con efectos mínimos o nulos.
 - Problemas pancreáticos: cualquier proceso que daña de forma difusa el páncreas puede causar diabetes tales como pancreatitis, trauma, infección, etc.
 - Endocrinopatías: Varias hormonas (p.e. la hormona del crecimiento, cortisol, glucagón y epinefrina) pueden antagonizar la acción de la insulina. cantidades excesivas de estas hormonas puede causar diabetes. Se produce en individuos con defectos preexistentes en la secreción de insulina y la hiperglucemia generalmente se resuelve cuando los niveles de la hormona antagonista regresa a su estado basal.
- Diabetes mellitus gestacional: inicia durante el embarazo, se presentan las mismas anomalías fisiológicas que caracterizan a la DMT2. Las mujeres con este tipo de diabetes tienen un alto riesgo de permanecer con la enfermedad después de la gestación (Buchanan y Xiang, 2005).

1.2. Sistema óseo

El hueso es un órgano altamente dinámico y especializado constituido por una matriz extracelular orgánica formada principalmente por proteínas colágenas de tipo I y proteínas no colágenas de las cuales destacan la sialoproteína ósea (BSP), la osteocalcina (OCN) y la proteína morfogenética ósea (BMP) por su participación en la formación de hueso. (Bellido *et al.*, 2014), esta matriz orgánica se combina con una matriz inorgánica mineralizada que le confiere rigidez, compuesta en su mayoría por cristales de hidroxiapatita (HAP: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). Además, en el hueso se encuentran diversos tipos

celulares como los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células del revestimiento las cuales son específicas de este tejido. Este órgano cumple funciones de soporte, estructurales y metabólicas (Eijken, 2007).

1.2.1. Remodelación ósea

El hueso depende de una reparación constante denominada remodelación ósea, que se basa en la acción de las poblaciones de células de resorción (osteoclastos) y formación (osteoblastos) con el fin de reemplazar el hueso viejo por hueso nuevo y asegurar así la integridad del esqueleto. Esta secuencia es altamente regulada por factores locales y sistémicos ya que un desequilibrio significaría la pérdida ósea acelerada o síndromes de compresión (Eriksen, 2010). El remodelado óseo tiene lugar en la Unidad Básica Multicelular (BMU), que la conforman los osteoblastos, osteoclastos, osteocitos, células del revestimiento y la cavidad de remodelado. Este proceso puede durar unos 200 días hasta la formación completa de matriz mineral (Eriksen, 2010) y consta de cuatro etapas: activación, resorción, invasión y formación (Fig. 1.).

La etapa de activación comienza con la estimulación del osteocito que secreta citocinas como interleucina 6 (IL-6) e interleucina 3 (IL-3), hormonas como la paratohormona (PTH), el factor de crecimiento de insulínico (IGF), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factores estimulantes de colonias como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (MG-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear (RANK-L). Estos factores inducen la maduración y fusión de los pre-osteoclastos formando a los osteoclastos maduros.

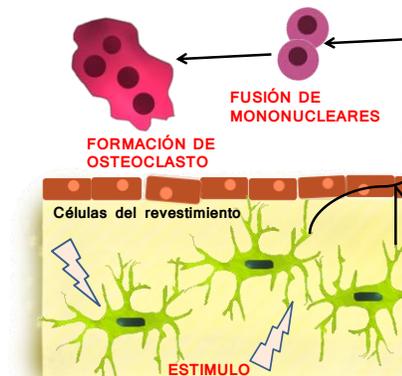
La etapa de resorción comienza cuando los osteoclastos se fijan al hueso y comienzan a reabsorber la matriz mineral a través de la secreción de hidrogeniones (H^+) y de iones de Cl^- que facilitan la disolución del mineral y crea las condiciones de pH ideales para la acción de las enzimas lisosomales que disuelven la matriz orgánica. Tras finalizar su función, los osteoclastos entran en apoptosis y dejan una cavidad denominada espacio de Howship, la cual puede variar entre 40 y 60 μm de profundidad (Bellido *et al.*, 2014; Olmos-Martínez y Gonzales-Macías, 2010).

Posteriormente comienza la etapa de invasión por células mononucleares de tipo macrófago que limpian la cavidad fagocitando los restos celulares y minerales y forman la línea de cementación sobre la que se depositará el hueso nuevo (Olmos-Martínez y Gonzales-Macías, 2010).

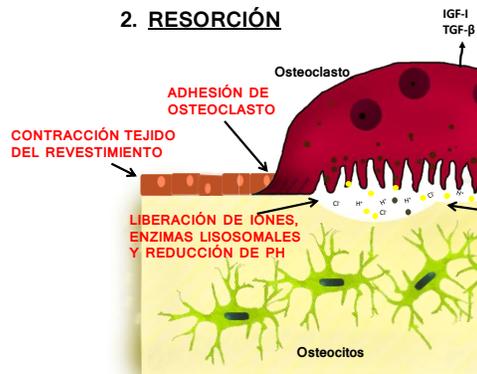
Una vez que el espacio se encuentra listo comienza la maduración de los pre-osteoblastos inducida por factores de crecimiento como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-I) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) secretados por los osteoclastos durante la resorción. Cuando los osteoblastos están maduros sintetizan y depositan la matriz orgánica constituida principalmente por colágeno tipo 1 y posteriormente secretaran la matriz mineral constituida principalmente de cristales de fosfato de calcio que forman la hidroxiapatita y proteínas como la OCN y BSP, las cuales se encargan de fijar las moléculas de fosfato de calcio a la matriz orgánica. Una vez que esta etapa finaliza, alrededor de la mitad de los osteoblastos se transforman en osteoblastos de superficie (células del revestimiento), o bien, pueden quedar enterrados en el hueso, transformándose en osteocitos que expresan moléculas específicas como la proteína de la matriz de la dentina 1 (DMP1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y esclerostina, que controlan la formación de hueso y el metabolismo del fosfato (Eriksen, 2010; Eijken, 2007; Olmos-Martínez y Gonzales-Macías, 2010).

REMODELADO ÓSEO

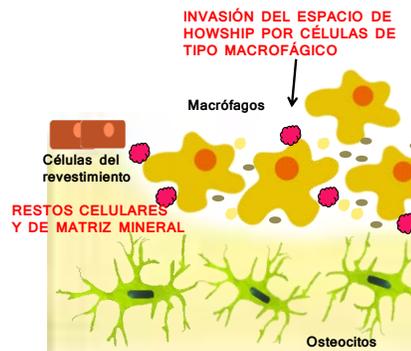
1. ACTIVACIÓN



2. RESORCIÓN



3. INVASIÓN



4. FORMACIÓN

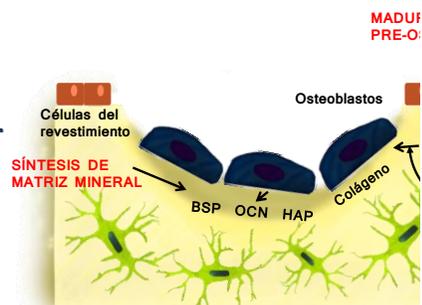


Fig. 1. Remodelado óseo. Resumen de cada una de las etapas ocurridas en el proceso de remodelado óseo.

1.2.2. Diferenciación osteoblástica

La diferenciación y proliferación de los osteoblastos depende de los factores de transcripción Osterix y Runx2 que regulan la proliferación celular y la expresión de los genes que codifican para proteínas asociadas a la mineralización (OCN y BSP), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), RANK-L y proteína de la matriz esclerostina. Además depende también de factores parácrinos y endocrinos como: BMP, factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el IGF, factores angiogénicos como la endotelina-1, hormonas como la PTH y prostaglandinas (PG) (Eijken, 2007).

La acción de la PTH y BMP están estrechamente asociada con la activación de la vía de señalización Wnt, la cual promueve la diferenciación de osteoblastos a partir de progenitores mesénquimales, lo que conduce a una mejora de hueso, mientras que la supresión provoca la pérdida ósea (Eijken, 2007; Bedillo *et al.*, 2014).

El osteoblasto totalmente diferenciado se caracteriza por co-expresión de la fosfatasa alcalina y colágeno tipo I, importantes para la síntesis de la matriz ósea y posterior mineralización (Eijken, 2007; Bedillo *et al.*, 2014).

1.2.3. Regulación del remodelado óseo

La remodelación ósea es regulada principalmente a través de la vía RANKL/RANK/OPG. En esta vía los osteoblastos y osteocitos promueven la diferenciación de los osteoclastos a través de la expresión de RANK-L que al unirse a su receptor en el precursor de osteoclastos activa su maduración y diferenciación. Por otro lado también secretan osteoprotegerina (OPG) la cual impide que el RANK-L se una a su receptor bloqueando la diferenciación del osteoclasto (Eijken, 2010; Bellido *et al.*, 2014; Eriksen, 2010). Cuando el balance en la producción de OPG y RANK-L se pierde puede contribuir al desarrollo de enfermedades óseas como la osteoporosis (Schoppet, 2002). Esta vía de regulación del remodelado se esquematiza en la figura 2.

VÍA RANKL/RANK/OPG

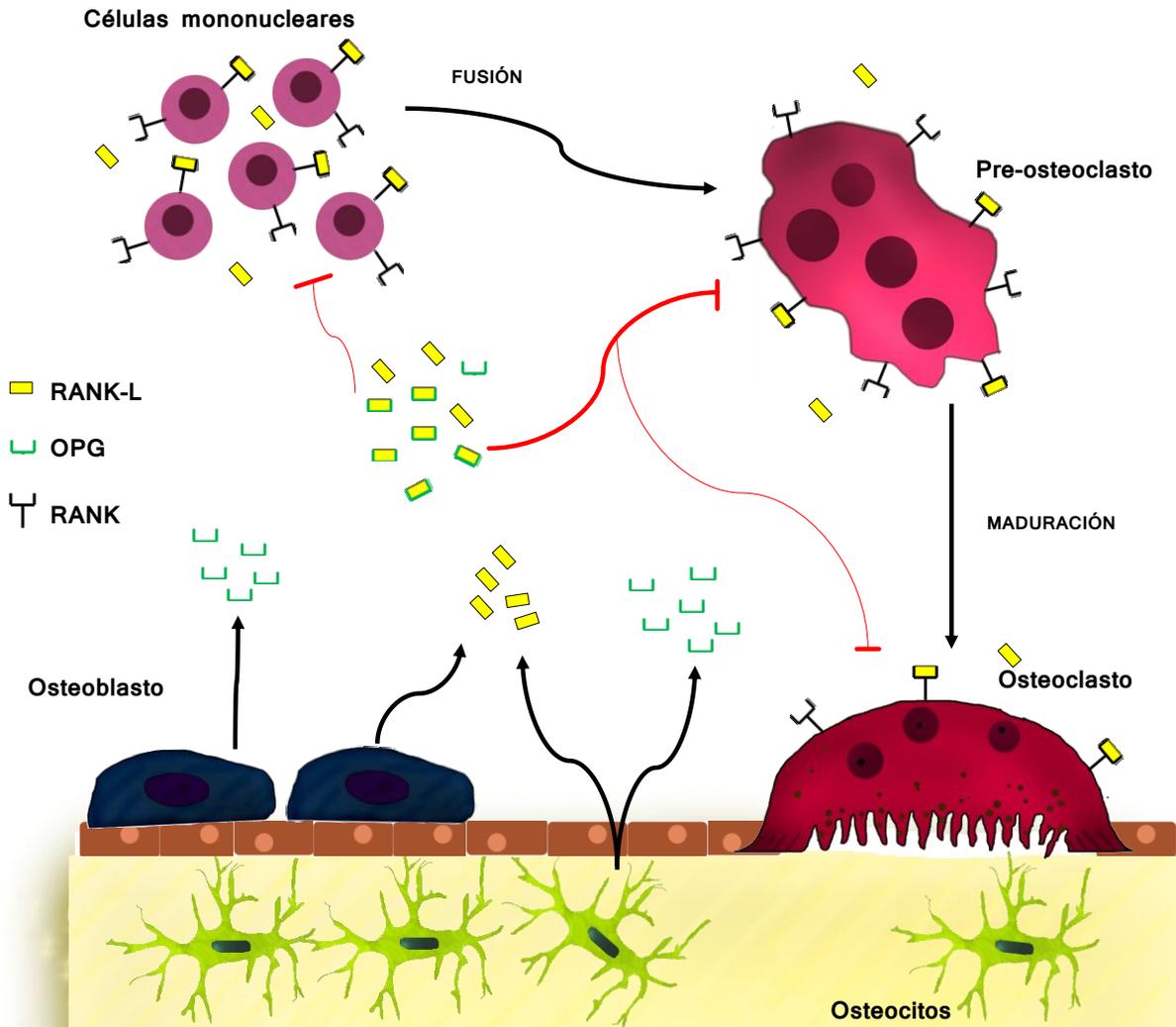


Fig. 2. Vía RANKL/RANK/OPG. El RANKL secretado por los osteocitos y los osteoblastos que al unirse con su receptor inducen la fusión y maduración de los precursores de los osteoclastos, promoviendo la resorción. Por otro lado los osteoblastos y osteocitos secretan también OPG, la cual se une al RANKL impidiendo que este se una con su receptor inhibiendo de esta forma la resorción.

1.3. Osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por pérdida de la densidad mineral y cambios en la micro arquitectura ósea. Es provocada por un incremento de la resorción y disminución de la formación de hueso, lo que aumenta en un 40% el riesgo de padecer fracturas principalmente en columna vertebral, cadera o muñeca, aunque los otros huesos también pueden verse afectados (Rachner *et al.*, 2011; Harvey y Copper, 2006).

Los factores de riesgo para desarrollar osteoporosis incluyen edad, sexo, raza y antecedentes familiares; y existen algunas enfermedades que pueden incrementar el riesgo de desarrollo de osteoporosis como la DM, que afecta la integridad mineral del hueso y condiciones como la menopausia que provoca una disminución considerable en los niveles de estrógenos, que incrementan la incidencia de fracturas en un 40% (El-Heis *et al.*, 2013).

La osteoporosis reduce la calidad de vida de los pacientes, ya que las fracturas y la fragilidad ósea provocan pérdida de la movilidad y autonomía; además aumentan el riesgo de mortalidad ya que frecuentemente son hospitalizados e intervenidos quirúrgicamente y corren el riesgo de padecer complicaciones infecciosas provocado por la inmovilización crónica. (Rachner *et al.*, 2011).

Debido a que la pérdida ósea es asintomática se diagnostica frecuentemente después de la primera fractura y se administran dos tipos de fármacos: los antirresortivos que inhiben la resorción y los anabólicos que estimulan la formación ósea, normalmente suplementados con altas dosis de calcio. Entre los tratamientos antirresortivos se encuentran principalmente los bifosfonatos que son los más ampliamente utilizados por su bajo costo seguidos por el raloxifen y entre los anabólicos la hormona de longitud completa paratiroidea (PTH 1-84) (Rachner *et al.*, 2011).

A pesar de la variedad de medicamentos disponibles para el tratamiento de la osteoporosis, estos solo retrasan el desarrollo de la osteoporosis y presentan múltiples efectos adversos debido a su continua y prolongada administración. Para los bifosfonatos se ha observado que incrementan el desarrollo de osteonecrosis mandibular, irritación esofágica, hipocalcemia y problemas renales; para el raloxifen, enfermedad tromboembólica; para los anabólicos, hipercalcemia, náusea y diarrea, y para el calcio un incremento en el riesgo de padecer enfermedades coronarias (Rachner *et al.*, 2011).

1.4. Diabetes mellitus y desregulación ósea

La DM se ha asociado con complicaciones crónicas que afectan a múltiples sistemas incluyendo el hueso. Entre las primeras complicaciones esqueléticas provocadas por la DM no controlada incluyen síndrome del pie diabético, artropatía de Charcot, osteopenia y osteoporosis. Estas complicaciones pueden ser causadas por la deficiencia y resistencia de insulina, la hiperglucemia, productos finales de glicación avanzada (AGE) e incremento en la producción de citocinas y adipocinas (Hofbauer *et al.*, 2007).

La osteoporosis es la enfermedad ósea metabólica más importante en pacientes con DM (Hofbauer *et al.*, 2007). Los pacientes con DMT1 presentan una reducción en la masa y formación ósea, inhibición de la actividad de los osteoblastos e incremento en la resorción (Schwartz, 2003) y se ha mencionado que el 50% de los pacientes con DMT1 presentan osteoporosis (Adil *et al.*, 2015); mientras que los pacientes con DMT2, presentan un incremento de la densidad mineral ósea (DMO) en comparación con los no diabéticos; sin embargo, presentan huesos muy frágiles y una mayor incidencia de fracturas que se cree puede deberse a una disminución de la calidad mineral del hueso y al incremento de productos de glicación avanzada. Estas anomalías esqueléticas pueden depender del control glucémico, la duración de la DM y la presencia de complicaciones vasculares (Hamann *et al.*, 2012; Hofbauer *et al.*, 2007).

Entre los principales factores que pueden incrementar las complicaciones óseas se encuentra la hiperglucemia ya que promueve la glicosilación no enzimática de diversas proteínas óseas incluyendo el colágeno de tipo I que puede afectar la calidad del hueso, reducir su resistencia e inhibir la expresión fenotípica de los osteoblastos; además la hiperglucemia, puede inducir la resorción ósea a través del incremento en la producción de citocinas que activan e inducen la maduración de los osteoclastos (Hofbauer *et al.*, 2007; Schwartz, 2003).

Por otro lado el incremento en los niveles de glucosa aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden provocar la oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y moléculas señalizadoras, afectando de esta manera múltiples procesos celulares (Turrens, 2003); además se activa la fosfolipasa C que incrementa la salida de calcio lo que se ha relacionado con una disminución en la calidad de los cristales de HAP (García-Hernández *et al.*, 2012).

Otro factor que puede incrementar las complicaciones óseas en pacientes diabéticos es la deficiencia de insulina, ya que se ha observado que esta deficiencia induce una disminución en la formación de cristales de HAP, en la relación calcio-fosfato y en el IGF-1 en animales de laboratorio lo que podría contribuir al daño óseo (Hofbauer *et al.*, 2007). Por otro lado varios estudios sugieren que la DMT2 y la obesidad están estrechamente relacionadas por la actividad del tejido adiposo y sus adipocinas como la leptina, resistina y la adiponectina que pueden tener efecto negativo sobre el metabolismo óseo. La leptina contribuye a una respuesta inflamatoria sistémica, asociada con la aterosclerosis y la

hipertensión arterial y la adiponectina disminuida en individuos obesos y diabéticos tiene propiedades anti-inflamatorias (Hofbauer *et al.*, 2007).

1.5. Los ácidos grasos poli-insaturados

Los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) como los ω -6 y ω -3 (también llamados n-3 o n-6), se caracterizan por la presencia de más de un doble enlace entre sus carbonos y por un grupo carboxilo terminal. Ambos son considerados ácidos grasos esenciales ya que deben ser obtenidos de la dieta y son componentes de las membranas celulares (Schuchardt *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2004).

Los ácidos grasos n-6 representados por el ácido linoleico (LA; C18: 2 Δ 9, 12) y sus derivados como el ácido araquidónico (AA, C20: 4 Δ 5, 8, 11,14), son abundantes en la naturaleza, encontrándose en las semillas de la mayoría de las plantas y en productos de origen animal (Simopoulos, 2008). Este ácido graso es metabolizado a través de la vía de las ciclooxigenas (COX) y de las lipoxigenasas (LOX), la cual se inicia por acción de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2). La acción de la COX metaboliza al AA en prostaglandinas de la serie 2, tromboxanos y lipoxinas y la LOX en leucotrienos que son mediadores proinflamatorios; además de estas vías el AA puede ser oxidado en presencia de ERO convirtiéndolos en isoprostanos (Kruger *et al.*, 2010) (Fig. 3).

Por otro lado los n-3 representados por el ácido α -linolénico (ALA; C18: 3 Δ 9,12,15) y sus derivados como el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20: 5 Δ 5,8,11,14,17) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22: 6 Δ 4,7,10,13,16,19) son menos abundantes encontrándose principalmente en el aceite de pescado y en unas cuantas semillas (Simopoulos, 2008). El DHA se metaboliza a través de las vías de LOX y COX y produce docosatrienos, neuroprotectinas y resolvinas de la serie D (Fig. 3), las cuales tienen potentes efectos antiinflamatorios, y promueven el correcto funcionamiento del sistema nervioso (Kruger *et al.*, 2010).

Metabolismo de los ácidos grasos poli-insaturados

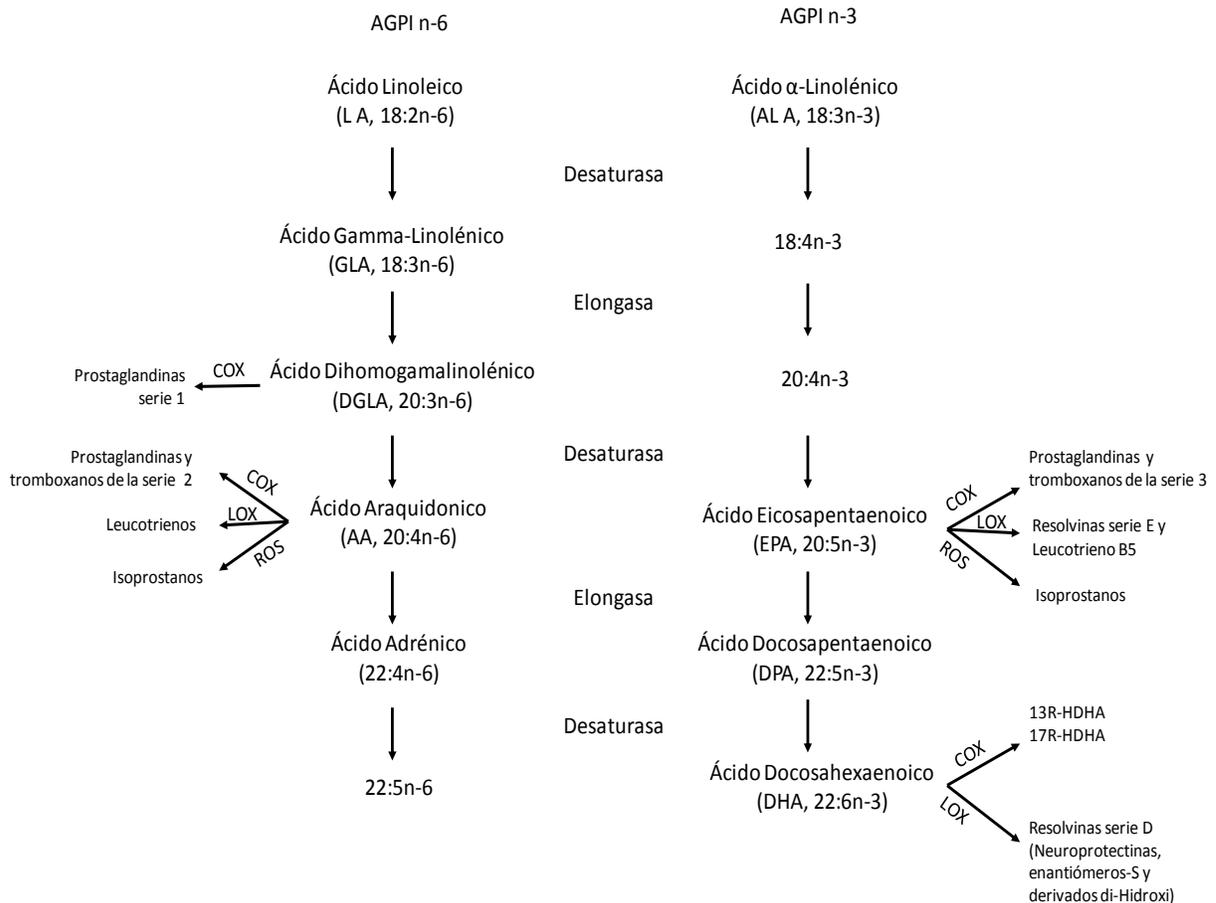


Fig. 3. Metabolismo de los AGPI. Se esquematiza la síntesis de los AGPI n-3 y n-6 a través de procesos enzimáticos de desaturación y elongación, así como los principales metabolitos que derivan de cada uno de ellos. Modificada de Kruger *et al.*, 2010.

Tanto el AA, EPA y DHA denominados también AGPI de cadena larga, son convertidos a partir de sus precursores por procesos de elongación y desaturación (Fig. 3); sin embargo, la síntesis de DHA y EPA es extremadamente lenta y de bajo rendimiento en comparación con AA, esto debido a que existe una competencia por las enzimas de desaturación ($\Delta 6$), de tal manera que una alta ingesta de LA interfiere con la desaturación y elongación de ALA, lo que sugiere que debe existir un balance adecuado en el consumo de ambos tipos de ácidos grasos (Simopoulos, 2008; Schuchardt *et al.*, 2010). Además, un aumento en el consumo de grasas saturadas y ácidos grasos trans interfieren con la desaturación y elongación de LA y ALA (Simopoulos, 2008).

Los AGPI se incorporan a las membranas de las células, donde son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), y docosanoideos (docosatrienos, neuroprotectinas y resolvinas de la serie D) que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la coagulación de la sangre, tono vascular, en el correcto funcionamiento del sistema nervioso central y periférico y otros órganos como el hueso o en las respuestas inflamatorias e inmunológicas (Schuchardt *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2004; Kruger *et al.*, 2010; Carrero *et al.*, 2005).

Además los ácidos grasos n-3 pueden jugar un papel importante en enfermedades metabólicas como DM2 y en el estrés oxidativo y se ha propuesto que puede disminuir la resistencia a la insulina. Además un balance adecuado con los n-6 reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular asociada a diabetes (Nettleton y Katz, 2005; Suresh y Das, 2003)

2. ANTECEDENTES

La diabetes mellitus se ha relacionado con múltiples efectos en el hueso como el incremento en el riesgo de fracturas y disminución de la densidad mineral, lo que puede ocasionar el desarrollo de patologías como la osteoporosis y la osteopenia (Hofbauer *et al.*, 2007).

Varios estudios se han enfocado en estudiar la incidencia de fracturas y los cambios en la densidad mineral ósea en pacientes diabéticos. Se ha observado que los pacientes jóvenes con DMT1 presentan una disminución de la densidad mineral ósea (DMO) de hasta el 6.4% (Heap *et al.*, 2004) y un incremento en el riesgo de fractura cadera de hasta el 12.25% esto en comparación con pacientes sanos (Nicodemus y Folsom, 2001).

Del mismo modo se ha observado que en los pacientes con DMT2 existe un incremento de hasta 1.7 veces en el riesgo de fractura, siendo la fractura de cadera la más común con una incidencia del 29% con respecto a los no diabéticos; sin embargo, a pesar de que la frecuencia de fractura aumenta considerablemente se ha observado que la DMO es mayor en las personas con DMT2, lo que pudiera sugerir un desbalance en el metabolismo y en la formación del hueso, que repercute en huesos más frágiles y en el desarrollo de alguna osteopatía (Bonds *et al.*, 2006; Strotmeyer *et al.*, 2004; Nicodemus y Folsom, 2001).

En este sentido estudios previos realizados en el laboratorio se han enfocado en estudiar el efecto de la DM y de la hiperglucemia sobre el metabolismo óseo: García-Hernández *et al.* (2012), realizaron un estudio en donde evaluaron el efecto de concentraciones elevadas de glucosa en la biomineralización y en la expresión de mediadores proinflamatorios en células osteoblásticas humanas, en este estudio observaron que niveles de glucosa similares a los presentes en pacientes diabéticos crónicos (24mM) alteran la biomineralización y la calidad de los cristales depositados ya que provocan un aumento en el depósito de mineral, una alteración importante en la relación Ca/P en los cristales de HAP, un incremento en la ALP y en la expresión del mRNA que codifica para RUNX2, así mismo observaron un incremento en la expresión del mRNA codificante para IL-1 β , IL-6, IL-8 y proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1), los cuales están relacionados con el aumento en la reabsorción ósea.

Por otro lado Zhang y Yang (2013), observaron en un cultivo primario de osteoblastos de rata que concentraciones altas de glucosa (25mM), inhibe la mineralización, incrementa la

actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP), promueve la diferenciación adipogénica e incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual podría contribuir a un desbalance en el metabolismo óseo.

Debido a la evidencia existente sobre la relación entre la hiperglucemia y el daño óseo, es importante buscar tratamientos que puedan mejorar la salud ósea y que no sean nocivos para el paciente diabético, ya que los tratamientos actuales no resuelven el problema de fondo además de presentar múltiples efectos adversos debido a su continua y prolongada administración.

En este sentido se ha reportado que el enriquecimiento dietético con las concentraciones adecuadas de AGPI n-6 y n-3 es benéfico para la salud ósea, ya que regulan la maduración y la actividad de las células óseas. Los AGPI que mejor se han estudiado con respecto a la salud del hueso son el AA, el EPA y el DHA (Kruger *et al.*, 2010).

En modelos animales se ha demostrado que algunos AGPI de la familia n-3 incrementan la formación ósea y podrían reducir el riesgo de padecer osteoporosis y fracturas (Classen *et al.*, 1995; Schlemmer *et al.*, 1999). En mujeres mayores se ha observado un efecto anti-resorción después de 3 años de suplementar la dieta con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (Van Papendorp *et al.*, 1995; Kruger *et al.*, 1998) y se ha visto que el EPA y el DHA tienen efectos benéficos reduciendo los síntomas de la artritis reumatoide y osteoartritis suprimiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Darlintong y Stone, 2001). También se ha demostrado que una reducción de la proporción entre los AGPI n-6/n-3 puede resultar en un aumento de la resistencia ósea en animales (Classen *et al.*, 1995) y en humanos (Weiss *et al.*, 2005).

En otros estudios, se ha observado que los AGPI n-3 como el DHA pueden regular negativamente la producción de prostaglandina E2 (PGE2) y a su vez inducir la producción de IGF-1 en modelos experimentales con ratones (Bhattacharya *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2005) y cultivo de osteoblastos murinos (Watkins *et al.*, 2003); además los AGPI n-3 reducen la actividad osteoclástica a través del incremento de OPG y una disminución en la producción del RANK-L (Watkins *et al.*, 2001; Kruger *et al.*, 2010). En el mismo sentido, se ha sugerido que este grupo de ácidos grasos pueden tener un papel protector en el estrés oxidativo (Mori *et al.*, 2003).

Así mismo, en otros estudios se ha observado que el DHA puede elevar o conservar la densidad del mineral en ratones y humanos (Watkins *et al.*, 2003) e inducir la maduración

de osteoblastos, reducir su apoptosis y la necrosis del tejido óseo (Kruger *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010).

Por otro lado se ha demostrado que los ácidos grasos n-6 como el AA, incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6, IL1 α , IL1 β , TNF α , M-CSF y las especies reactivas de oxígeno (Darlington y Stone, 2001), a través de la producción de PGE2 (Arikawa *et al.*, 2004; Skillington *et al.*, 2002; Kruger *et al.*, 2010; Coetzee *et al.*, 2007), y que el EPA es capaz de revertir los efectos de la AA (Priante *et al.*, 2002; Priante *et al.*, 2005), esto en diferentes modelos animales y *modelos in vitro* (líneas celulares murinas y de humano).

Shen *et al.* (2008) demostraron que el AA induce la expresión de mediadores proinflamatorios y por el contrario, el EPA tiene un efecto protector en la blastogénesis mediada por la prostaglandina PGE2 y la vía del óxido nítrico (NO) en células estromales de medula ósea de ratón.

Contrariamente, en una línea celular de osteoblastos de humano, Priante *et al.* (2005), demostraron que el AA aumenta las concentraciones de óxido nítrico (NO), indicando que pudiera tener un papel crucial en la regulación del metabolismo óseo y podrían tener efectos benéficos sobre la prevención y tratamiento de la osteopenia y la osteoporosis.

Se ha propuesto que los efectos del NO sobre el metabolismo óseo pueden depender de su concentración local; es decir, a bajas concentraciones producido por la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) promueve la proliferación de osteoblastos y previene la osteoporosis, mientras que las altas concentraciones producidas por la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) puede promover la resorción ósea (Priante *et al.*, 2005; Kruger *et al.*, 2010).

En general, se han observado efectos contrarios entre los ácidos grasos n-3 y n-6 sobre la producción de NO, por ejemplo se ha visto en diferentes líneas celulares de osteoblastos murinos y humanos, que el AA incrementa la actividad de iNOS, mientras que EPA y DHA incrementan la producción del óxido nítrico endotelial (Watkins *et al.*, 2003 Priante *et al.*, 2005; Kruger *et al.*, 2010), lo que sugiere que el DHA podría tener un mejor efecto sobre la formación ósea en comparación con el AA.

Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que el AA inhibe la apoptosis de los osteoblastos (Watkins *et al.*, 2003) y en cuanto a la expresión del factor de transcripción

Runx2 involucrado en la proliferación y maduración de osteoblastos, la formación de la matriz mineral y la formación de los nódulos de mineralización, se ha observado que tanto el AA como el EPA incrementan su expresión en cultivo de células fetales de calvaria. (Watkins *et al.*, 2003)

Aunque las investigaciones actuales apuntan que los AGPI n-3 y n-6 tienen efectos en el metabolismo óseo y que podrían beneficiar la salud ósea, se desconoce si pudieran tener algún efecto benéfico en las alteraciones provocadas por las altas concentraciones de glucosa en células osteoblásticas humanas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las patologías óseas asociadas a la DM son cada vez más frecuentes, representan un riesgo a la salud y disminuyen la calidad de vida de los pacientes diabéticos. Se ha demostrado que las altas concentraciones de glucosa afectan el metabolismo y el proceso de biomineralización de células osteoblásticas humanas y se ha sugerido que estas alteraciones pueden repercutir de manera directa en el desarrollo de patologías como osteoporosis, por lo que se buscan tratamientos que contrarresten los efectos de las concentraciones elevadas de glucosa en osteoblastos humanos. En este sentido los AGPI DHA y AA han mostrado tener efectos positivos en el metabolismo óseo y en el proceso de biomineralización, sin embargo a la fecha se desconoce si pudieran contrarrestar las alteraciones provocadas por las altas concentraciones de glucosa en células osteoblásticas humanas.

4. HIPÓTESIS

Debido a la evidencia que señala que los ácidos grasos poliinsaturados DHA y AA tienen un efecto positivo en el proceso de biomineralización y función de los osteoblastos en condiciones fisiológicas; se espera que el tratamiento con estos ácidos grasos contrarresten los efectos producidos por la alta concentración de glucosa sobre la biomineralización y en los procesos celulares involucrados en la formación de matriz mineral en osteoblastos de humano.

5. OBJETIVOS

General:

Caracterizar los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados DHA y AA en las alteraciones causadas por una alta concentración de glucosa en el proceso de biomineralización de células osteoblásticas humanas.

Particulares:

En células osteoblásticas humanas cultivadas en condiciones de normo-glucosa o alta glucosa y tratadas con AA o DHA:

1. Analizar la formación de nódulos de mineralización y determinar la concentración de calcio depositado en cultivo.
2. Evaluar la actividad específica de la fosfatasa alcalina
3. Determinar la producción intracelular de ERO
4. Determinar la concentración de nitritos en el medio extracelular

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se diseñó una estrategia experimental en donde se incluyó cada uno de los métodos a seguir para la obtención de resultados (Fig. 4), más adelante se describirá con profundidad los materiales y métodos utilizados.

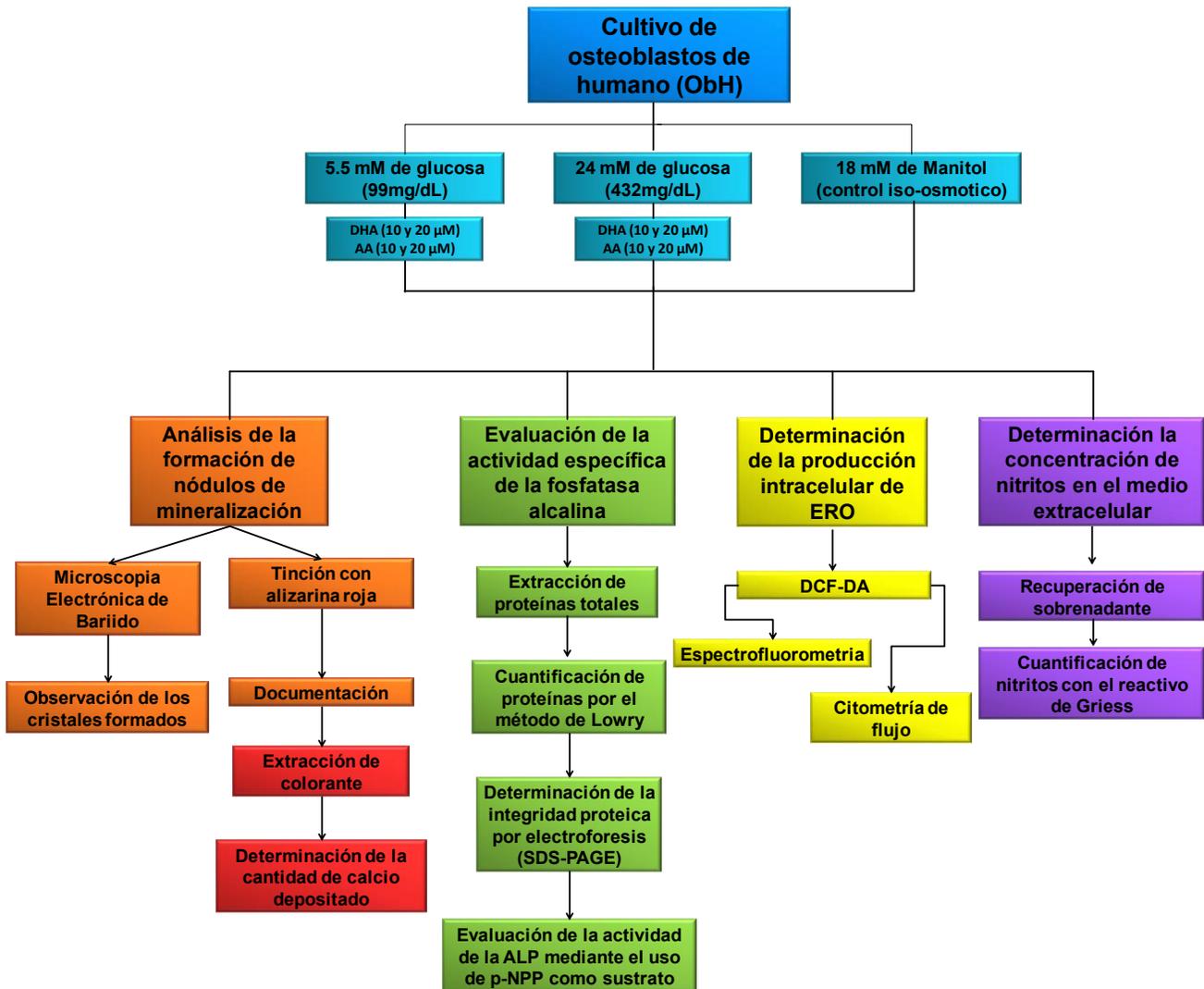


Fig. 4. Esquematación de la estrategia experimental utilizada para cumplir los objetivos de este proyecto.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Cultivo Celular.

Los experimentos se realizaron con una línea celular de osteoblastos de humano derivada de hueso alveolar de tercer molar (Arzate *et al.* 1998). Las células osteoblásticas fueron cultivadas en forma rutinaria en medio Dulbelco modificado de Eagle con 5.5mM de glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, GIBCO, Rockville, MD, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (laboratorios Microlab S.A. de C.V., D.F. México) y antibióticos (100U/ml de penicilina, estreptomina 100µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

7.2. Condiciones de cultivo

Para los experimentos se utilizaron las células en el tercer y cuarto pasaje y se crecieron a 37°C en una atmosfera de 95% de aire, 5% CO₂ y 100% de humedad. Las concentraciones de glucosa para este estudio se tomaron en función de los niveles de glucosa en sangre de un individuo sano y altos niveles de glucosa similares a los observados en la DM crónica no controlada. En concreto, la concentración normal de glucosa es de 5.5mM equivalente a 99mg/dl, y la concentración alta es de 24mM equivalente a 432mg/dl. Las células fueron cultivadas en DMEM-LG que contiene los niveles fisiológicos de glucosa (5.5mM) o en DMEM-LG adicionado con 18.5mM de D-glucosa para alcanzar una concentración final de 24mM (invitrogen, GIBCO). Cada concentración de glucosa se combinó además con 10 o 20µM de ácido araquidónico (AA) o de ácido docosahexaenoico (DHA). Se usó DMEM-LG suplementado con 18.5mM de manitol (Man) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EE.UU.) como grupo control iso-osmolar con respecto al grupo con alta glucosa y como control negativo en la biomineralización el lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) a una concentración de 3µg/mL. Como control positivo para la producción de especies reactivas de oxígeno se usó peróxido de hidrogeno (H₂O₂) a una concentración de 30mM y como control negativo, el antioxidante Trolox (30µM). Los ácidos grasos se solubilizaron en DMSO al momento del cambio de medio. La concentración de DMSO final en el medio fue de 0.01% con el fin de evitar el efecto tóxico en las células. El cambio de medio con las distintas condiciones se realizó cada 3^{er} día. La adición de los ácidos grasos al medio en la concentración deseada se realizó al momento del cambio para evitar su oxidación.

Para la determinación de la formación de los nódulos de mineralización, la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP) y el análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB), las células se cultivaron en medio osteogénico (DMEM complementado con SFB al 10% mas 50mg/mL de ácido ascórbico y 10mM de β -glicerofosfato).

7.3. *Análisis de la formación de nódulos de mineralización y determinación de la cantidad de calcio depositado en cultivo*

Se sembraron 8×10^4 células en cajas de cultivo celular de 12 pozos. Al siguiente día las células fueron cultivadas con concentraciones normales de glucosa (5.5mM) o altas concentraciones de glucosa (24mM) y/o su combinación con 10 o 20 μ M de DHA o AA usando como control de inhibición el LPS y se mantuvieron durante 7, 14 y 21 días de cultivo. Las células se fijaron con metanol frío al 70% y se identificó la deposición de mineral utilizando una solución saturada de alizarina roja al 2% pH 4.1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) que tiene afinidad por el calcio, la cual se adicionó a los cultivos celulares durante 60 minutos. El exceso de colorante se eliminó lavando repetidamente con amortiguador de fosfatos (PBS). Las cajas fueron invertidas para su secado. Los pozos con el mineral fijado y teñido fueron documentados con un microscopio invertido marca Zeiss (Alemania).

Para la cuantificación del calcio depositado en cultivo, se extrajo el colorante con ácido acético al 10% y se procesaron los sobrenadantes de acuerdo a lo reportado por García-Hernández *et al.*, (2012) y se realizó una curva de concentraciones conocidas de alizarina roja y se obtuvo la absorbancia en un espectrofotómetro a una λ de 405 nm.

La concentración de calcio se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{[\] \text{ alizarina} * \mu\text{g Ca equivalentes a 1Mol de alizarina}}{\text{mM alizarina}} * \text{volumen total de muestra}$$
$$\text{volumen de muestra analizado}$$

En donde

- [] alizarina= la concentración de alizarina en mM calculada a partir de la absorbancia con un análisis estadístico de regresión
- $\mu\text{g Ca equivalentes a 1 Mol de Alizarina} = 320.56 \text{ g/Mol}$.
- mM alizarina= 40mM
- Volumen total de la muestra= 800 μ L
- Volumen de muestra tomado para el análisis= 60 μ L

La fórmula simplificada es la siguiente:

$$\left(\frac{[\text{Alizarina}] * 320.56}{40} \times 800 \right) = \mu\text{g Ca por pozo de cultivo}$$

7.4. *Análisis de la formación de mineral por microscopia electrónica de barrido*

Se sembraron 2×10^5 células en portaobjetos redondos en cajas de cultivo celular de 24 pozos. Al siguiente día las células fueron cultivadas con medio osteogénico con 5.5mM o 24mM de glucosa y/o su combinación con 10 o 20 μ M de DHA o AA usando como control negativo el LPS y se mantuvieron por 14 días de cultivo. Las células se fijaron con metanol frío al 70% por 5 minutos y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos con buffer de lavado (0.48g fosfato de sodio monobásico y 2.84g fosfato de sodio dibásico en 100ml de agua destilada). Se realizó la deshidratación de la monocapa celular con alcoholes crecientes (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) cada uno por 10 minutos. Al final se dejó secar completamente para cubrirlas con oro coloidal por medio de “sputtering” que permite la conducción adecuada de los electrones en la muestra y poder observar los cristales formados con el microscopio (Leica-Cambridge 440). El análisis se realizó a 20kV durante 300 segundos y se tomaron microfotografías representativas de cada tratamiento.

7.5. *Evaluación de la actividad específica de la fosfatasa alcalina*

Se sembraron 1.5×10^5 células en cajas de cultivo de 25 cm² y se esperó 48 horas hasta que alcanzaran la semi-confluencia. Las células se trataron con medio osteogénico con 5.5mM o 24mM de glucosa y su combinación con DHA (20 μ M), AA (20 μ M) y LPS (3 μ g/mL) durante 7 y 14 días de cultivo. La actividad específica de la enzima se evaluó con el kit comercial QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay (Bioassay). Brevemente, se extrajo la capa celular y la matriz mineral con amortiguador de lisis con 10mM de Tris-HCL y 0.1% de tritón X-100, pH 7.4. Se cuantificó la cantidad de proteína total según el método modificado de Lowry (Lowry *et al.*, 1954). Se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE para corroborar la integridad de las proteínas. La actividad enzimática se evaluó usando 24 μ g/mL de proteína total de cada condición experimental, usando como

sustrato 10mM de p-Nitrofenilfosfato (pNPP) en una solución con 5mM de acetato de magnesio en un ambiente alcalino (pH 10.5). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro con lector de placas a 405nm durante 3 lapsos de 4 minutos cada uno.

Para calcular la actividad de la enzima se siguió la siguiente fórmula de acuerdo a las especificaciones del fabricante:

$$\text{la muestra} \times \text{tiempo} \sim \dots$$

7.6. Determinación de la producción intracelular de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Para determinar la producción de ERO se sembraron 2×10^4 células en cajas de cultivo celular de 96 pozos. Las células se dejaron adherir toda la noche. Al siguiente día las células del control negativo fueron pre-tratadas con 30 μ M de Trolox (antioxidante) durante 1 hora. Posteriormente las células se mantuvieron con medio DMEM sin rojo fenol con concentraciones normales de glucosa (5.5mM) o altas concentraciones de glucosa (24mM) y/o su combinación con 10 o 20 μ M de DHA o AA y se mantuvieron durante 24 horas en incubación. 30 min antes del término de incubación se agregó el peróxido de hidrogeno. Al término de las 24 horas se agregó la sonda fluorescente 2' 7'-diclorofluoresceína diacetato (2'7'-DCFH-DA) a una concentración de 15 μ M durante 30 min. La 2'7'-DCFH-DA es un colorante permeable celular, que florece al reaccionar con radicales hidroxilo, peróxido de hidrogeno o peroxinitritos, al oxidarse con estos reactivos la 2'7'-DCFH-DA se desesterifica a 2'7'-Diclorofluoresceína, la cual es altamente fluorescente a una λ con 485nm de excitación y 530nm de emisión.

Para la obtención de resultados se obtuvo la absorbancia en un espectrofluorómetro (FLX-800, Biotech Technologies) a una λ con 485nm de excitación y 530nm de emisión.

Para corroborar los resultados obtenidos se determinó la producción de ERO por citometría de flujo. Se sembraron 1.5×10^5 células en cajas de cultivo celular de 12 pozos. Al siguiente día las células de uno de los pozos fueron pre-tratadas con 30 μ M de Trolox (antioxidante) durante 1 hora como control negativo. Posteriormente las células se trataron con medio DMEM sin rojo fenol con concentraciones normales de glucosa (5.5mM) o altas concentraciones de glucosa (24mM) y/o su combinación con 10 o 20 μ M de DHA o AA y se mantuvieron durante 24 horas en incubación. 30 min antes del término

de incubación se agregó el peróxido de hidrogeno a un pozo con células. Al término de las 24 horas se agregó la sonda fluorescente 2' 7'- diclorofluoresceína diacetato (2'7'-DCFH-DA) a una concentración de 15 μ M durante 60 min.

La intensidad media de fluorescencia se analizó por citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) y el software de captura BD Cell Quest. Pro v.5.1.1 (Beckton Dickinson) Se capturaron 10,000 eventos. Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa FlowJo 7.6 calculando la intensidad media de fluorescencia (IMF)

7.7. Determinación de la concentración de nitritos en el medio extracelular

Se sembraron 1.5×10^5 células en cajas de 12 pozos con medio DMEM. Al siguiente día se trataron con medio DMEM sin rojo fenol con concentraciones normales de glucosa (5.5mM) o altas concentraciones de glucosa (24mM) y/o su combinación con 10 o 20 μ M de DHA o AA usando como control positivo el LPS. Las células se mantuvieron durante 24 horas en incubación. Transcurrido el tiempo, se recuperó el sobrenadante y se congelo a -70°C hasta su análisis. Los nitritos se midieron en el sobrenadante del cultivo con el reactivo de Griess, el cual se basa en la acidificación del NO_2^- para producir un agente nitrosante y en la reacción de este agente con ácido sulfanílico para producir ión diazonium, que se unirá al N-(1-naphthyl) etilenediamina para formar un cromóforo que absorbe la luz a 540-570 nm.

Se realizó una curva de concentraciones conocidas de nitritos, la que utilizo para interpolar los valores obtenidos por espectrofotometría a una λ de 549 nm de cada muestra problema.

7.8. Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado. Todos los datos se analizaran mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el post-hoc de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism 6. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si * $p \leq 0.05$ o ** $p \leq 0.001$ cuando se compararon con el grupo solo con 5.5mM de glucosa y # $p \leq 0.05$ o ## $p \leq 0.001$ cuando se compararon con el grupo con 24mM de glucosa.

8. RESULTADOS

8.1. *Los ácidos grasos DHA y AA reducen la mineralización en condiciones de alta glucosa*

Con el objetivo de determinar el efecto del DHA y AA en la biomineralización en osteoblastos de humano, se analizó la formación de nódulos de mineralización, se determinó la concentración de calcio en cultivo y se analizó la formación de cristales formados por medio de microscopia electrónica de barrido (MEB).

Los resultados obtenidos en la formación de nódulos de mineralización muestran que el tratamiento con el DHA en ambas concentraciones (10 y 20 μ M) con normo-glucosa se comporta de manera similar al grupo control (5.5mM) a los 7 y 14 días de cultivo e incrementa la formación de nódulos de mineralización a los 21 días de cultivo con un efecto más pronunciado con 20 μ M de DHA (Fig. 5), sin embargo para la cuantificación de calcio en la matriz extracelular, el tratamiento con 10 μ M de DHA no mostro cambio con respecto al control de normo-glucosa a los 7, 14 o 21 días y a la concentración de 20 μ M se observó una disminución significativa del contenido de calcio a los 14 y 21 días (Fig. 6). Las microfotografías obtenidas por medio de MEB, muestran que el tratamiento con DHA incrementa el número de cristales formados, aunque son de menor tamaño que el grupo de normo-glucosa (Fig. 5).

La combinación de AA con normo-glucosa mostro un comportamiento similar al control a la concentración de 10 μ M, mientras que a la concentración de 20 μ M se observó una disminución en la formación de nódulos de mineralización a los 14 y 21 días de cultivo, de manera similar al grupo tratado con LPS (Fig. 5), sin embargo la cuantificación de calcio mostró un aumento significativo con la concentración de 10 μ M a los 14 y 21 días de cultivo y a la concentración de 20 μ M a los 21 días de cultivo con respecto al grupo control (5.5mM) (Fig. 6). Las imágenes tomadas por MEB muestran un incremento en el número de cristales formados y de menor tamaño en comparación con el grupo de normo-glucosa (Fig. 5).

Cuando las células fueron tratadas con LPS, se observó una inhibición en la formación de los nódulos de mineralización pero con un incremento en la concentración de calcio a los 21 días, se observa además una diferencia en la forma en que se dispone la matriz

mineral. Las microfotografías muestran una menor cantidad de cristales formados con respecto al grupo control (5.5mM) (Fig. 5 y 6).

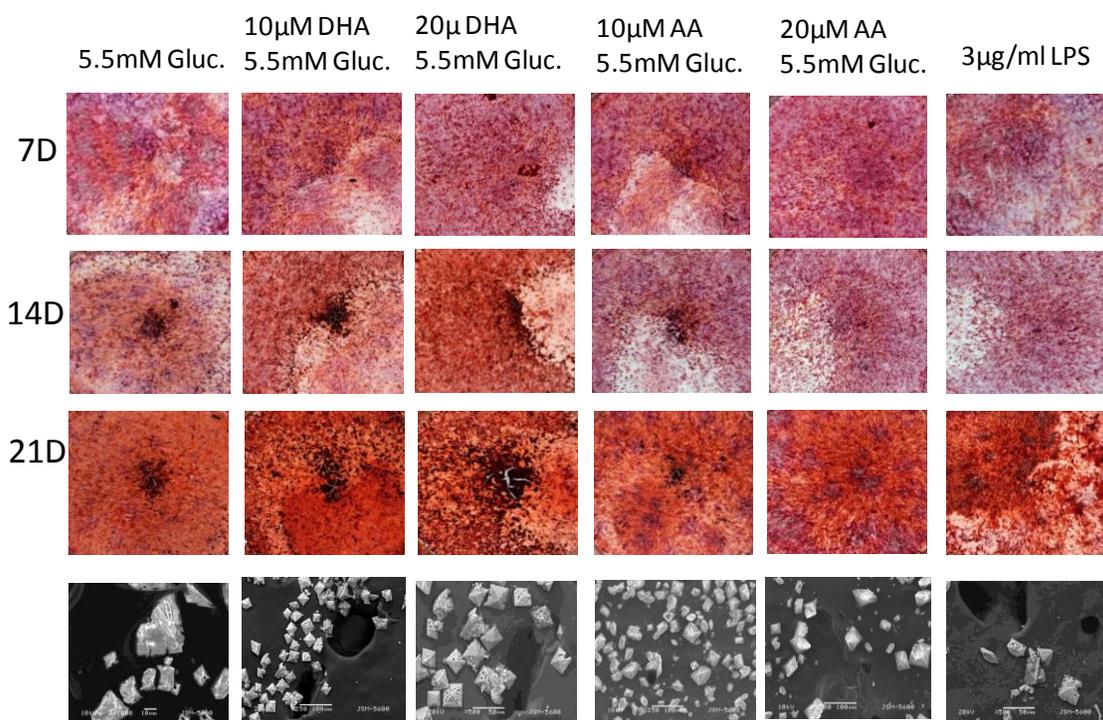


Fig. 5. Efecto del DHA y AA en la biomineralización. En la parte superior se observan fotografías representativas de la matriz mineral formada en los pozos de cultivo celular teñidos con alizarina roja a los 7, 14 y 21 días de cultivo. En la parte inferior se observan microfotografías de los cristales formados a los 14 días de cultivo tomadas en microscopio electrónico de barrido. Mientras más intenso es el color rojo mayor es la cantidad de nódulos de mineral.

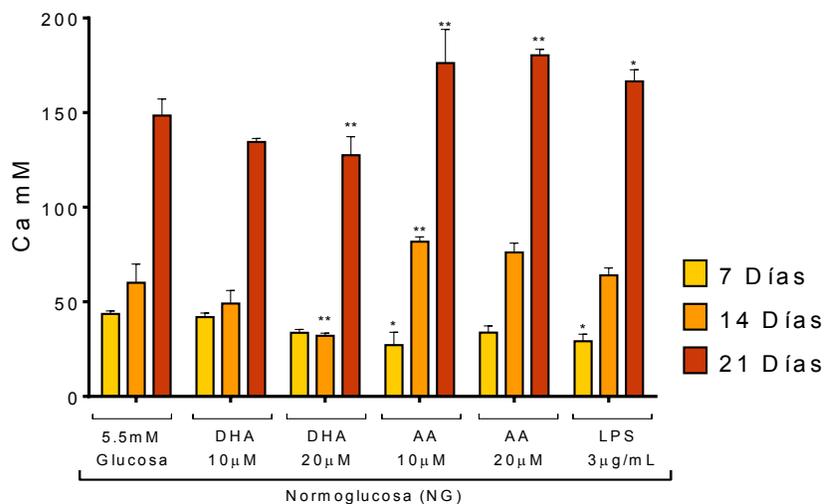


Fig. 6. Efecto de los ácidos grasos DHA y AA en condiciones de normo-glucosa (5.5mM) en la cantidad de calcio depositado en la matriz extracelular a los 7, 14 y 21 días de cultivo. * $p \leq 0.05\%$ y ** $p \leq 0.01\%$ cuando los grupos se compararon con el grupo control (5.5mM de glucosa).

Cuando las células fueron tratadas con alta concentración de glucosa (24mM), se observó un incremento significativo en la formación de nódulos de mineralización y de calcio depositado en cultivo en comparación con el grupo de normo-glucosa (Fig. 7 y 8). El efecto encontrado con 24mM de glucosa sobre la formación de nódulos de mineralización no se debe a un estrés osmótico ya que el control 18.5mM Man se comportó de manera similar al grupo con 5.5 mM de glucosa a los 7 y 21 días de cultivo; sin embargo, observamos diferencias a los 14 y 21 días de cultivo con respecto al calcio depositado (Fig. 7 y 8).

Tanto el DHA y AA en ambas concentraciones (10 y 20 μ M) con 24mM de glucosa disminuyeron la formación de nódulos de mineralización y el calcio depositado en cultivo en comparación con el grupo de 24mM de glucosa (Fig. 7 y 8). Este efecto se aprecia mejor cuando las células son tratadas con DHA a la concentración de 10 μ M que además se observa similar al grupo con 5.5mM de Gluc. a los 14 y 21 días de cultivo (Fig. 7).

Estos resultados concuerdan con lo representado en las microfotografías en donde se aprecia una disminución en el número de cristales formados con ambos ácidos grasos en combinación con alta glucosa, aunque son de menor tamaño al grupo control (5.5mM Gluc.) (Fig. 7).

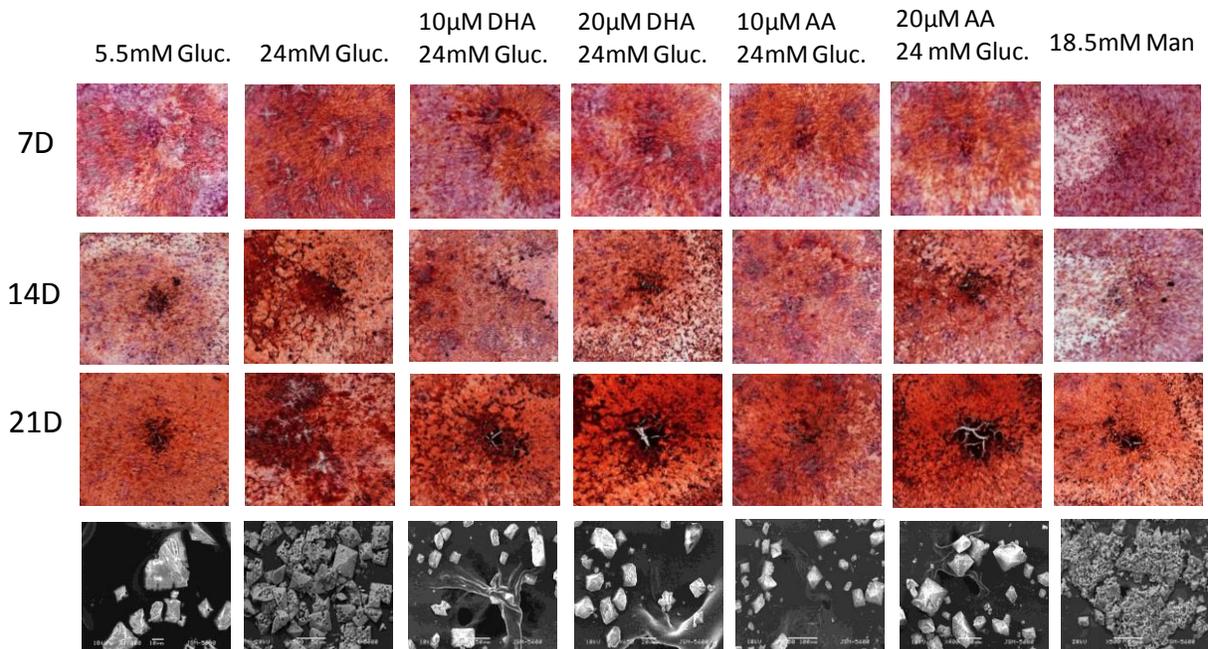


Fig. 7. Efecto del DHA y AA en la biomineralización en condiciones de alta glucosa. En la parte superior se observan fotografías representativas de la matriz mineral formada en los pozos de cultivo celular, previamente teñida con alizarina roja. Se muestra el efecto de los ácidos grasos AA y DHA en combinación con alta glucosa (24mM) en la formación de los nódulos de mineralización durante 7, 14 y 21 días de cultivo. En la parte inferior se observan microfotografías representativas de los cristales formados a los 14 días de cultivo tomadas en microscopio electrónico de barrido. Mientras más intenso es el color rojo mayor es la cantidad de nódulos de mineral.

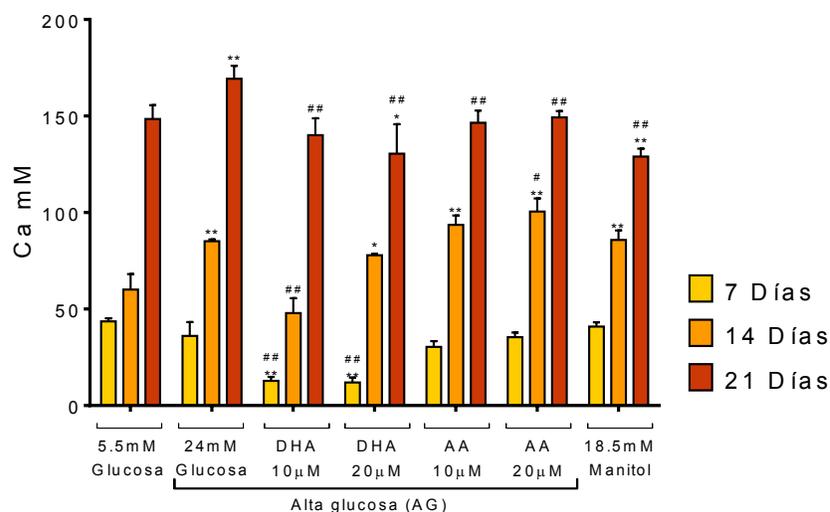


Fig. 8. Efecto de los ácidos grasos DHA y AA en condiciones de alta glucosa (24 mM) en la deposición de calcio extracelular. Resultados de la extracción de calcio a los 7, 14 y 21 días de cultivo. * $p \leq 0.05\%$ y ** $p \leq 0.01\%$ cuando los grupos se compararon con el grupo control (5.5mM de glucosa) y # $p \leq 0.05\%$ y ### $p \leq 0.01\%$ cuando los grupos se compararon con el grupo de alta glucosa (24mM)

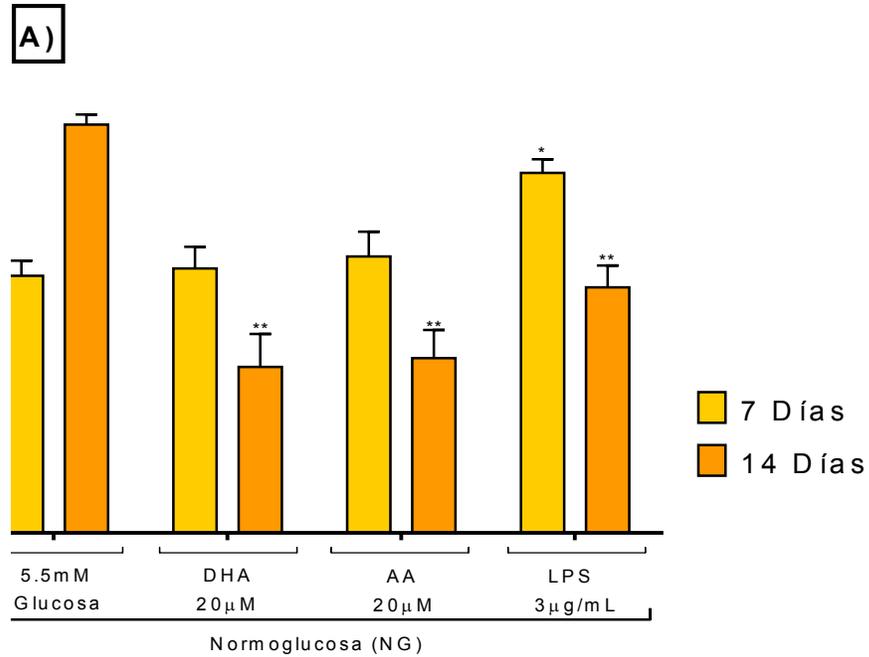
8.2. *El DHA y AA en combinación con alta glucosa incrementan la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP) a los 7 días de cultivo en comparación con el grupo tratado con normo-glucosa.*

Debido a que la fosfatasa alcalina es un marcador temprano importante de la mineralización y por la función que desempeña en este proceso complejo, determinamos la actividad específica de esta enzima con el fin de caracterizar de manera completa el efecto de los ácidos grasos en el proceso de biomineralización.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con DHA y AA en combinación con normo-glucosa no modifican la actividad enzimática de la ALP a los 7 días de tratamiento, mientras que a los 14 días ambos ácidos grasos disminuyeron de manera significativa la actividad de esta enzima en comparación con el grupo de normo-glucosa (Fig. 9-A). El tratamiento con LPS mostro un incremento en la actividad de la enzima a los 7 días y una disminución a los 14 días.

Por otro lado la alta concentración de glucosa incrementa significativamente la actividad de la ALP a los 7 días de tratamiento en comparación con el grupo de normo-glucosa, pero lo disminuye drásticamente a los 14 días de cultivo, sin embargo este efecto podría deberse a estrés osmótico ya que el grupo con manitol se comportó diferente al control de normo-glucosa a los 14 días (Fig. 9-B).

La combinación de AA o DHA con 24mM de glucosa incrementó significativamente la actividad de la ALP en comparación con el grupo de 5.5mM de glucosa a los 7 días de cultivo. A los 14 días se observó una disminución de la actividad enzimática, mientras que con respecto al grupo con alta glucosa solo el AA a una concentración de 20 μ M mostro un incremento a los 7 días de cultivo (Fig. 9-B).



B)

##

Fig. 9. Efecto del DHA y AA sobre la actividad específica de la fosfatasa alcalina. Resultados de la medición de la actividad de la ALP, expresadas en UI/μg de proteína en donde se muestra: (A) resultados obtenidos de los ácidos grasos (DHA y AA) (20μM) y LPS (3μg/mL) en combinación con normo-glucosa (5.5mM) y (B) los resultados obtenidos de los ácidos grasos (DHA y AA) (20μM) en combinación con alta glucosa (24mM). Gráficas que expresan la media ± SD de 3 ensayos independientes. *p ≤ 0.05% y **p ≤ 0.01% cuando los grupos se compararon con el grupo control (5.5mM de glucosa) y #p ≤ 0.05% y ##p ≤ 0.01% cuando los grupos se compararon con el grupo de alta glucosa (24mM).

8.3. *El AA y DHA reducen la producción intracelular de ERO en condiciones de alta glucosa.*

Una de las alteraciones provocadas por la alta concentración de glucosa que se ha relacionado de forma importante con las alteraciones en el proceso de biomineralización es el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Por lo que evaluamos el efecto del DHA y AA en la formación de estas especies.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo (Fig. 10) y espectrofluorometría (Fig. 11), muestran que la alta concentración de glucosa incrementa significativamente la producción de ERO en comparación con el grupo control, este incremento es menor al control positivo con H_2O_2 , pero mayor al incremento provocado por la presencia del LPS. El efecto encontrado con 24mM de glucosa no se debe a un estrés osmótico ya que el control iso-osmolar (18.5mM Man) se comportó de manera similar al grupo con 5.5 mM de glucosa (Fig. 10 y 11).

El DHA y el AA en condiciones de normo-glucosa no tienen efecto en la producción de ERO (Fig. 10-A y 11-A); sin embargo, ambos ácidos grasos AA y DHA a 10 y 20 μ M con 24mM de glucosa disminuyó significativamente la producción de ERO (Fig. 10-B y 11-B) y esta disminución es similar al grupo tratado con 30 μ M del antioxidante Trolox, el cual se utilizó como control negativo para la producción de ERO (Fig. 10 y 11).

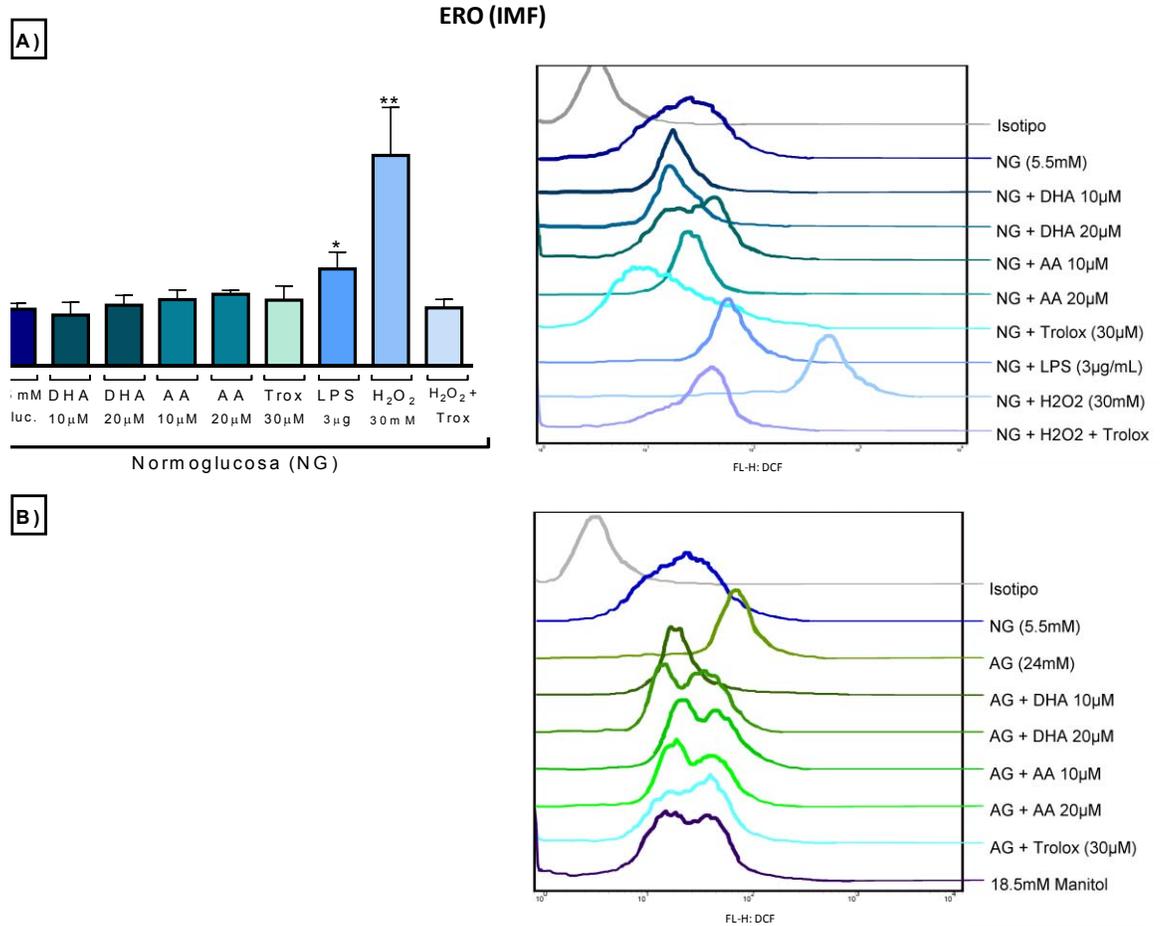


Fig. 10. Efecto de los diferentes tratamientos utilizados en la producción intracelular de ERO por citometría de flujo. Resultados de la medición intracelular de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo, expresadas en IMF en donde se muestra: (A) resultados obtenidos de los diferentes tratamientos (DHA, AA, Trox. y H_2O_2) con normo-glucosa (**NG**: 5.5mM) y (B) los resultados obtenidos de los ácidos grasos (DHA y AA) con alta glucosa (**AG**: 24mM). A la derecha se aprecian histogramas representativos y a la izquierda graficas que expresan la media \pm SD de 4 ensayos independientes. * $p \leq 0.05\%$ y ** $p \leq 0.01\%$ cuando los grupos se compararon con normo-glucosa (5.5mM) y # $p \leq 0.05\%$ y ## $p \leq 0.01\%$ en comparación con alta glucosa (24mM).

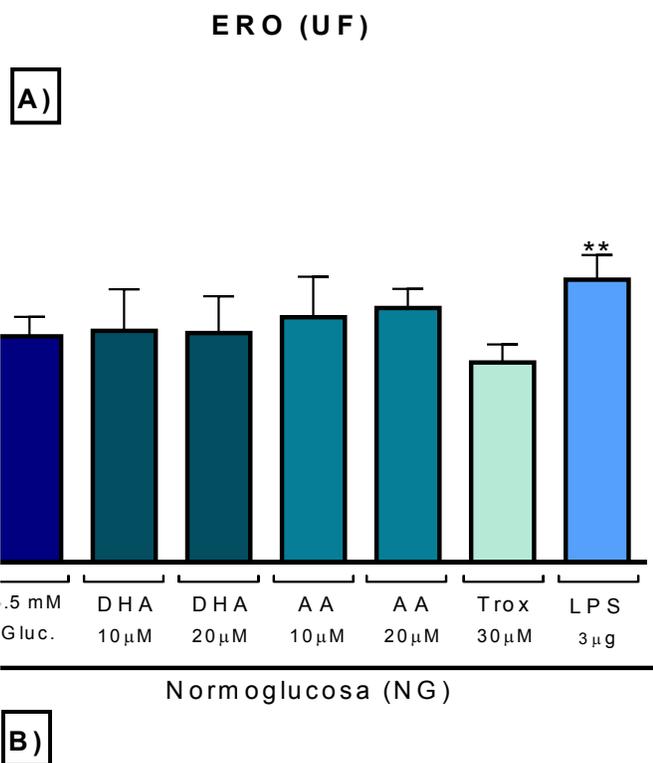


Fig. 11. Efecto de los diferentes tratamientos utilizados en la producción intracelular de ERO. Resultados de la medición intracelular de especies reactivas de oxígeno por espectrofluorimetría, expresadas en nanómetros (nm) en donde se muestra: A) los tratamientos con DHA, AA, Trox. y H₂O₂ en normo-glucosa (**NG**: 5.5mM) y (B) los tratamientos con DHA y AA en alta glucosa (**AG**: 24mM). Graficas que expresan la media ± SD de 4 ensayos independientes. *p ≤ 0.05% y **p ≤ 0.01% cuando los grupos se compararon con el grupo control (5.5mM de glucosa) y #p ≤ 0.05% y ##p ≤ 0.01 cuando los grupos se compararon con el grupo de alta glucosa (24mM).

8.4. *El AA y DHA incrementan la producción extracelular de nitritos.*

Con el objetivo de determinar el efecto de los ácidos grasos AA y DHA en la producción de NO, se midió los nitritos (NO_2^-) en el medio extracelular ya que estos son los metabolitos estables de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos muestran que la alta concentración de glucosa (24mM) disminuye significativamente la producción de nitritos en comparación con el grupo con normo-glucosa (5.5 mM); y es similar al grupo tratado con LPS, pero menor a la disminución provocada por el H_2O_2 . El efecto encontrado en el grupo tratado con 24mM de glucosa no se debe a un estrés osmótico (Fig. 12).

Se observó que el grupo tratado con DHA a la concentración de 20 μM incrementa los nitritos en condiciones de normo-glucosa; mientras que, cuando las células fueron tratadas con DHA a 10 μM y ambas concentraciones de AA no se observaron diferencias con respecto al grupo control (5.5mM).

La combinación de ambos ácidos grasos (AA y DHA) en ambas concentraciones (10 y 20 μM) con 24mM de glucosa fueron similares al grupo control (5.5mM) e incrementaron significativamente la producción de nitritos en comparación con el grupo de 24mM (Fig. 12). Este incremento parece ser dependiente a la concentración de los ácidos grasos y en los grupos tratados con 20 μM de AA el incremento fue más evidente comparado con el grupo de normo-glucosa y alta glucosa, y fue similar al grupo tratado con el antioxidante Trolox (Fig. 12).

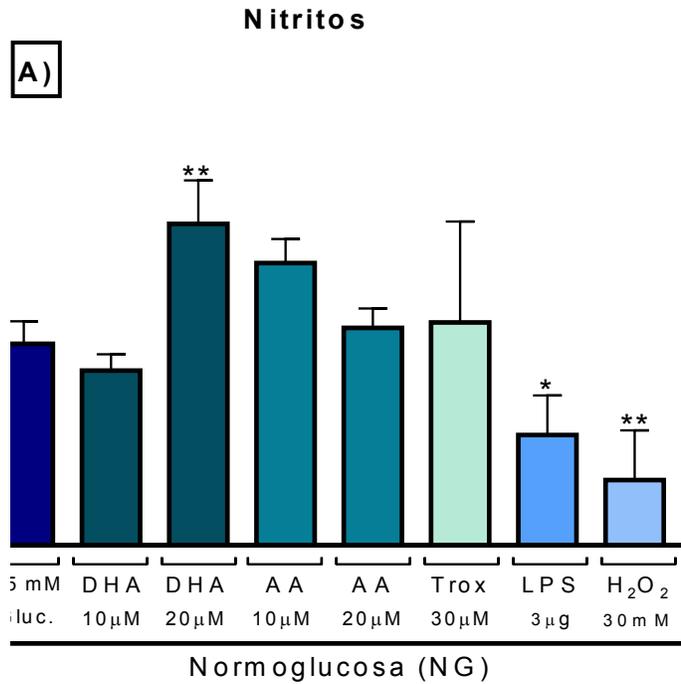


Fig. 12. Efecto del DHA y AA en la producción de nitritos. Resultados de la concentración de nitritos en el medio extracelular en donde se muestra: (A) resultados obtenidos de los diferentes tratamientos (DHA, AA, Trox. y H₂O₂) en combinación con normo-glucosa (5.5mM) y (B) los resultados obtenidos de los ácidos grasos (DHA y AA) en combinación con alta glucosa (24mM). Graficas que expresan la media \pm SD de 4 ensayos independientes. * $p \leq 0.05\%$ y ** $p \leq 0.01\%$ cuando los grupos se compararon con el grupo control (5.5mM de glucosa) y # $p \leq 0.05\%$ y ## $p \leq 0.01\%$ en comparación con alta glucosa (24mM).

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó el efecto de un AGPI n-6 (AA) y un AGPI n-3 (DHA) en las alteraciones provocadas por una alta concentración de glucosa en el proceso de biomineralización en células osteoblásticas.

Existe una relación entre la diabetes mellitus y el desarrollo de patologías óseas como osteoporosis y osteopenia al encontrar un incremento en el riesgo de fractura y alteraciones en la densidad mineral del hueso en pacientes con diabetes mellitus (Hofbauer *et al.*, 2007; Nicodemus y Folsom 2001). Nosotros encontramos que la alta glucosa (24mM) provoca un incremento en la formación y deposición de calcio, además de alteraciones en la forma y en la distribución de los cristales en la matriz mineral (Fig. 7 y 8), esto concuerda con otros estudios previos realizados en el laboratorio en donde observaron que la concentración de 24mM de glucosa aumenta la cantidad de mineral depositado, pero disminuye su calidad y además afecta la actividad enzimática de la ALP y la expresión de RANK-L y citocinas proinflamatorias (García-Hernández *et al.*, 2012). Y en el mismo sentido se ha demostrado que aun en concentraciones más bajas (15mM) afecta la formación nódulos de mineralización (Balint *et al.*, 2001).

Sin embargo otros estudios como el de Zhang y Yang (2013), reportan que altos niveles de glucosa (25.5mM) inhiben la biomineralización. Estos efectos contradictorios probablemente se deban a diferencias en las líneas celulares; sin embargo, todos concuerdan en que las altas concentraciones de glucosa alteran el proceso de biomineralización y la actividad de los osteoblastos de forma negativa.

Por otro lado se ha reportado que el enriquecimiento dietético con los AGPI AA y DHA es benéfico para la salud ósea, ya que regulan la maduración y la actividad de las células óseas (Kruger *et al.*, 2010).

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con DHA en condiciones de normoglucoza (5.5mM) incrementa la formación de nódulos de mineralización a los 21 días de cultivo (Fig. 5), pero reduce la concentración de calcio en cultivo (Fig. 6), lo cual sugiere que la relación Ca/P está alterada.

En este sentido a pesar de que existen pocos estudios con respecto al efecto de este ácido graso en la formación de nódulos de mineralización se ha reportado que el DHA tiene un efecto benéfico sobre la densidad mineral ósea e incrementa la concentración de

calcio, fosfato, zinc y magnesio en fémur de conejos (Mustafa-Alnouri, 2014), mantiene la micro arquitectura ósea en neonatos de ratón (Fallon *et al.*, 2014) y aumenta la DMO en humanos (Schlemmer *et al.*, 1999). Así mismo se ha reportado en modelos *in vitro* que los ácidos grasos n-3 inducen la expresión y regulación del factor de transcripción RUNX-2, asociado a la diferenciación y activación de los osteoblastos y al incremento en la producción de OCN y BSP a través de la modulación negativa de la PGE2 (Watkins *et al.*, 2003) lo anterior podría explicar el incremento en la formación de mineral, a través de la modulación de PGE2 y RUNX-2.

Cuando se trataron a las células con DHA en alta glucosa (24mM) observamos que se disminuye la formación de nódulos de mineralización y la cantidad de calcio, y se comportó de manera muy parecida al grupo de normo-glucosa, lo que indica, que el DHA parece regular la deposición y la mineralización bajo altas concentraciones de glucosa (Fig. 7 y 8).

Este es el primer reporte del que nosotros sabemos sobre el efecto del DHA en la alteración de la biomineralización por altas concentraciones de glucosa. Es posible que los efectos del DHA en la regulación de la biomineralización bajo altas concentraciones de glucosa sean debido a la forma en cómo se regula el calcio y las vías de señalización en las que participa. Por un lado se sabe que la alta concentración de glucosa incrementa la salida de calcio intracelular y que este a su vez puede inducir la activación de la calmodulina que lleva a la translocación al núcleo de factores de transcripción como Runx2 y Osterix que se encargan de la transcripción de proteínas de la mineralización como BSP y OCN, lo que resulta en un incremento de la mineralización pero esta se lleva a cabo de forma desordenada y por lo tanto la calidad del mineral formado es menor (García-Hernández *et al* 2012). El hecho de que el DHA este regulando la concentración de calcio en la matriz mineral bajo altas concentraciones de glucosa, de forma que normaliza la concentración de calcio alcanzando niveles parecidos al grupo con 5.5mM de glucosa y que los cristales formados sean también parecidos al control indican que el DHA podría estar favoreciendo la formación adecuada de los cristales aún en altas concentraciones de glucosa, sin embargo aún no se sabe el o los procesos por los cuales este teniendo este efecto, por lo que es importante determinar la calidad del mineral formado y determinar la expresión de las proteínas asociadas al proceso de biomineralización como la BSP, OCN y los factores de transcripción Runx2 y Osterix, así como determinar el

arreglo de la matriz de colágeno extracelular que provee el ambiente adecuado para la nucleación de los cristales de hidroxapatita.

Se determinó también los efectos del ácido araquidónico y observamos que en combinación con normo-glucosa disminuye la formación de nódulos de mineralización a los 14 y 21 días de cultivo e incrementa la concentración de calcio con ambas concentraciones a los 21 días de cultivo (Fig. 5 y 6).

Es posible que este efecto inhibitorio en la biomineralización, pueda deberse a una sobreproducción de PGE2 en los osteoblastos inducida por la adición exógena de AA, la cual se sabe inhibe la biomineralización (Kruger *et al.*, 2010), y el incremento en la concentración de calcio posiblemente esté afectando de manera negativa la calidad de los cristales de HAP lo cual podría resultar en el desarrollo de patologías óseas.

Cuando las células se trataron con este ácido graso con alta glucosa (24 mM) se observó una disminución en la formación de nódulos de mineralización, en el tamaño de los cristales y en el depósito de calcio con respecto al grupo con alta glucosa pero de manera similar al grupo con normo-glucosa (Fig. 7 y 8).

Este también es el primer reporte sobre los efectos del AA en osteoblastos humanos bajo altas concentraciones de glucosa. Los efectos inhibitorios sobre la biomineralización producidos por el AA en alta glucosa observados en este estudio parecen indicar que este ácido graso afecta de manera directa el metabolismo óseo probablemente a través de la producción de PGE2 la cual en altas concentraciones afecta negativamente la síntesis del IGF-I que induce la translocación de RUNX-2 en el núcleo y la expresión de proteínas como la ALP, la OCN y la BSP (Watkins, 2001). Sin embargo, existen otros reportes en lo que se observa que la administración de PGE2 a bajas concentraciones incrementa el área y la aposición de mineral en hueso trabecular y en el endostio de ratas e incrementa la formación de nódulos de mineralización en células osteoblásticas (Keila *et al.*, 2001). Por lo que el papel del AA en el metabolismo óseo bajo altas concentraciones de glucosa no es claro.

Además es necesario considerar que el AA también puede incrementar la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α y M-CSF y del RANK-L, que incrementan la actividad osteoclástica (Arikawa *et al.*, 2004; Skillington *et al.*, 2002; Kruger *et al.*, 2010; Coetzee *et al.*, 2007), lo que podría contribuir a las alteraciones provocadas por la hiperglucemia en pacientes con DM. Por lo que sería importante evaluar en un

futuro las concentraciones de PGE2, citocinas proinflamatorias y la calidad del mineral depositado en osteoblastos tratadas con AA en condiciones de alta glucosa.

En cuanto a la actividad enzimática de la ALP, la cual es responsable de hidrolizar al pirofosfato orgánico (PPi) para liberar el fosfato (Pi) y su actividad se considera un marcador temprano de la biomineralización (García-Hernández *et al.*, 2012). Observamos que con alta concentración de glucosa, la actividad de esta enzima se incrementa con respecto al grupo control a los 7 días de cultivo, mientras que a los 14 disminuye (Fig. 9), sin embargo es posible que este efecto este asociado a estrés osmótico, debido a que este grupo mostro cambios importante en la actividad de esta enzima. Sin embargo es comportamiento observado con 24mM de glucosa coincide con estudios previos, en donde observaron que 25.5mM de glucosa incrementa la actividad de la ALP a los 5 días de cultivo en osteoblastos primarios de rata; lo que contribuye al incremento en la formación de nódulos de mineralización (Zhang y Yang, 2013). Por lo que es posible que el incremento en la biomineralización encontrado en nuestro estudio bajo condiciones de alta glucosa se deba en parte al incremento en la actividad de esta enzima. Sin embargo también se ha reportado una disminución en la actividad de la ALP en osteoblastos tratados con alta glucosa a los 7 y 14 días de cultivo, aun cuando la deposición de mineral fue mayor, lo que podría contribuir a la perdida en la calidad de los cristales de HAP (García-Hernández *et al.*, 2012).

Cuando las células fueron tratadas con el DHA con normo-glucosa no se observaron cambios a los 7 días, sin embargo se inhibió a los 14 días (Fig. 9-a). Esto coincide con lo reportado por Coetze *et al.*, (2009), que observaron que cuando las células osteoblásticas eran tratadas con DHA a una concentración de 20µM la actividad de la ALP disminuía significativamente con respecto al control a los 14 días de cultivo pero no a los 7 días, posiblemente el pico de la actividad enzimática se encuentre a tiempos más tempranos.

Por otro lado cuando las células fueron tratadas con DHA (20µM) con alta glucosa (24mM), observamos que no hay cambios a los 7 y 14 días de cultivo con respecto al grupo con 24mM de glucosa (Fig. 9-b), sin embargo al observar los resultados obtenidos en la biomineralización y cuantificación de calcio en donde observamos un comportamiento similar al grupo con normo-glucosa es posible que este alterando la calidad de los cristales, por lo que consideramos importante cuantificar la calidad del cristal depositado y la actividad de la ALP a tiempos tempranos.

Cuando tratamos a los osteoblastos con AA a una concentración de 20 μ M con normoglucosa, observamos un comportamiento similar al DHA bajo las mismas condiciones (Fig. 9-a). en este sentido se ha reportado que al igual que el DHA, el AA no presenta cambios en la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina a los 6 días de cultivo, pero a los 14 días se ha observado inhibición en la actividad de esta enzima con la misma concentración de AA que nosotros ocupamos (Coetze *et al.*, 2009).

Por el contrario cuando combinamos el AA con alta concentración de glucosa (24mM) observamos un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina aun mayor que en el grupo tratado solo con alta glucosa a los 7 días de cultivo, pero a los 14 días observamos una disminución (Fig. 9-b). Estos resultados nos sugieren que el AA en combinación con alta glucosa incrementa la liberación de Pi, sin embargo esto podría afectar la calidad de la HAP ya que observamos una inhibición en el depósito de calcio y los cristales observados por microscopia de barrido son muy pequeños.

En otro sentido se cuantifico la producción de ERO en el medio intracelular ya que se ha relacionado de forma importante con las alteraciones en el proceso de biomineralización es el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas ERO provocan daños en el metabolismo celular, ya que causan oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y moléculas señalizadoras, (Turrens, 2003) y se ha sugerido que la sobreproducción de ERO puede afectar la calidad de los cristales de HAP (García-Hernández *et al.*, 2012). Por lo que se evaluó el efecto de los ácidos grasos DHA y AA en la producción de ERO en osteoblastos de humano por dos metodologías diferentes, citometría de flujo y espectrofluorometría.

En nuestros resultados observamos un comportamiento similar en la producción de ERO cuando las evaluamos por citometría de flujo y espectrofluorometría, por lo que cualquiera de los dos métodos representan una buena opción para la medición intracelular de ERO bajo las condiciones utilizadas (Fig. 10 y 11).

Con respecto a nuestros resultados encontramos que la alta concentración de glucosa incrementa la producción ERO de manera similar a como lo hace el peróxido de hidrogeno y el LPS los cuales ya se ha reportado que inducen el estrés oxidativo (Park *et al.*, 2004) (Fig. 10 y 11).

Se ha reportado que en condiciones de alta concentración de glucosa la actividad metabólica mitocondrial aumenta, produciendo un desequilibrio de la cadena de transporte de electrones causando un incremento en el deslizamiento de estos, dando como resultado la hiper-polarización mitocondrial y la sobreproducción de ERO y que además esta desregulación puede estar relacionada a intermediarios de la glucólisis la cual esta hiper-activada en condiciones de alta glucosa (Yu *et al.*, 2011).

Cuando las células fueron tratadas con ambos ácidos grasos en normo-glucosa (5.5mM) (Fig. 10-a y 11-a), no se observaron diferencias significativas en la producción de ERO. En contraste cuando se adicionaron estos ácidos grasos en combinación con alta glucosa se observó una inhibición significativa en la producción de ERO de manera similar a como lo hizo el antioxidante Trolox y además este efecto parece ser dependiente a la concentración de los ácidos grasos (Fig. 10-b y 11-b). Esto sugiere que probablemente estos ácidos grasos puedan estar actuando como antioxidantes o influyendo en la activación de los mecanismos antioxidantes propios de la célula.

Schönfeld y Wojtczak (2007), observaron que el AA es capaz de inhibir las ERO debido a su acción protonofora en la mitocondria en el complejo 1 (NADH-deshidrogenasa), de esta forma es posible que permita que la cadena de transporte de electrones regrese a su estado normal y de así inhibir el efecto perjudicial producido por la alta glucosa.

Con respecto al DHA se ha visto que tiene efectos antioxidantes; Rotstein *et al.* (2003) en un cultivo de neuronas de retina de rata observaron que el DHA tenía un efecto inhibitor en la producción de ERO y la apoptosis inducida por estas, y sugieren que es probable que este efecto se deba a la modulación de la fluidez de la membrana mitocondrial bloqueando de esta manera el desacoplo de la cadena de electrones y por otro lado es posible que active los mecanismos antioxidantes propios de la célula.

Sin embargo también se ha reportado que ambos ácidos grasos, pueden secuestrar las ERO debido a la presencia de las insaturaciones y su ubicación en las membranas mitocondriales, lo cual se ha sugerido de alguna manera podría desencadenar los mecanismos antioxidantes de la célula a través de la inducción de enzimas anti oxidativas como la SOD (superóxido dismutasa) y GPx (glutación peroxidasa) y/o liberarse de las membranas, reaccionar con las ERO y sufriendo peroxidación lipídica (Richard *et al.*,

2008; Rotstein *et al.*, 2003; Schönfeld y Wojtczak, 2007; Wang *et al.*, 2004), por lo que sería importante evaluar los mecanismos por los cuales estos ácidos grasos inhiban las ERO en presencia de alta glucosa o de un ambiente oxidante ya sea por peroxidación lipídica o por inducción enzimática.

Además la inhibición de las ERO por parte del DHA y el AA bajo altas concentraciones de glucosa en las células osteoblásticas, puede ser un mecanismo de acción por medio del cual el DHA y AA tengan efecto en la biomineralización al inhibir la activación de la fosfolipasa C y de este modo inhibir la salida de calcio intracelular. Por lo que también sería importante evaluar la actividad de la Fosfolipasa C, la GPx y la SOD.

En este estudio también se evaluó el efecto del DHA y AA en la producción de óxido nítrico (NO) la cual es una molécula que dependiendo de su concentración en hueso, puede regular el metabolismo óseo. Cuando se encuentra en bajas concentraciones, promueve la activación de los osteoblastos e inhibición de los osteoclastos (Riancho *et al.*, 1995). Este NO es liberado por los osteoblastos y regula directamente la actividad osteoclástica, modulando la expresión de citocinas pro-inflamatorias, incrementando el estrés oxidativo o produciendo un desequilibrio en la vía RANK/RANKL/OPG, lo que sugiere un papel importante sobre la osteoclastogénesis y la resorción ósea cuando se encuentra en altas concentraciones (Kruger *et al.*, 2010). Sin embargo se conoce muy poco sobre el efecto de la alta glucosa y su combinación con DHA o AA en la producción de NO en osteoblastos.

Nosotros observamos que con alta concentración de glucosa (24mM) los nitritos disminuyen al igual que con los grupos con peróxido de hidrogeno y LPS (Fig. 12). En otros estudios en células del sistema vascular, se ha demostrado que altas concentraciones de glucosa puede reducir las concentraciones de NO por medio del aumento de la degradación oxidativa producido por el aumento en la producción de ERO formando peroxinitritos, lo cual no es detectable por el método que utilizamos y concuerda con lo observado con LPS y peróxido de hidrogeno. Por otro lado esta inhibición puede ocurrir por aumento de la dimetil-arginina asimétrica (ADMA) la cual es un inhibidor competitivo endógeno de la NO sintasa (NOS) producido en el citoplasma de todas las células incluyendo osteoblastos y esta ADMA se ha visto que puede incrementarse en condiciones de alta glucosa (Lin *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2001).

En estudios experimentales se ha observado que la adición exógena de ADMA inhibe la producción de NO en tejido arterial (Böger, 2004) y en macrófagos J774 estimulados con LPS (Böger, 2004). Lo anterior podría sugerir que los efectos de las altas concentraciones de glucosa (24mM) y LPS sobre la inhibición del NO en estas células podría deberse al incremento de la ADMA, sin embargo se necesitan realizar más estudios al respecto.

Con respecto a las células tratadas con ambos ácidos grasos (DHA y AA) en condiciones de normo-glucosa (5.5mM), en las dos concentraciones utilizadas parecen incrementar los nitritos aunque solos se observaron diferencias significativas con DHA a la concentración de 20µM (Fig. 12-a), y por otro lado en combinación con alta glucosa observamos que tanto el AA como el DHA incrementan la concentración de nitritos similar a como lo hace el Trolox y más aún que el grupo con normo-glucosa (24mM) (Fig. 12-b).

Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente en otros estudios. Priante *et al.*, 2005, reportan que el AA incrementa la producción de nitritos en osteoblastos de humano a través de la sobreexpresión de iNOS la cual es inducida por el aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 y 6 y TNF-α en los osteoblastos. Sin embargo se esperaría que el LPS también lo incrementara ya que se sabe que estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias en estas células (García-Hernández *et al.*, 2012).

Además se ha propuesto que concentraciones elevadas de NO asociado a iNOS puede incrementar la resorción ósea mediante la promoción de la formación y actividad de los osteoclastos y la supresión de la proliferación de osteoblastos, además de incrementar la formación de ERO y se ha informado que el AA, incrementa la expresión del mRNA de la iNOS (Priante *et al.*, 2005; Kruger *et al.*, 2010). Por lo que es importante determinar la expresión de la sintasa de óxido nítrico y mediadores inflamatorios como la IL-6, TNFα y MCP-1.

Por otro lado el DHA se ha reportado que puede incrementar la expresión de eNOS, el cual se ha asociado con la promoción de la proliferación de osteoblastos y en la prevención de la osteoporosis (Priante *et al.*, 2005; Kruger *et al.*, 2010).

El incremento de nitritos en los grupos tratados con DHA coinciden con otros estudios en donde se ha reportado que este ácido graso incrementa la expresión de eNOS, a través

del aumento en la fosforilación de la Serina 1177 (Ser1177) en eNOS (Gousset-Dupont *et al.*, 2007), por un aumento en la actividad de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), AKT/cinasa y la proteína de choque térmico 90 (HSP90) (Stebbins *et al.*, 2008).

Se ha observado que la (AMPK) fosforila a eNOS en la Ser1177, la cual activa a esta enzima (eNOS), y se ha observado que la secuencia de aminoácidos que rodea a la Ser1177 se asemeja al sitio de reconocimiento de AKT/cinasa lo cual sugiere que la AKT/cinasa puede fosforilar y activar directamente a eNOS incrementando su actividad en la célula. (Michell *et al.*, 1999). Por otro lado la proteína HSP90 también regula la fosforilación de la eNOS en Ser1177 y modula la posterior producción de NO endotelial. HSP90 mantiene a la enzima en un estado acoplado en el que eNOS produce óxido nítrico y no anión superóxido, de este modo la producción de óxido nítrico es proporcional a la fosforilación de eNOS (Amour *et al.*, 2009).

Es posible que el efecto que nosotros observamos en este trabajo con ambos ácidos grasos sobre la producción de NO se deba a los mecanismos antes mencionados, sin embargo es importante que se tome en cuenta que la mayoría de estos estudios se realizan sobre células cardiovasculares y no existen estudios en osteoblastos, por lo que sugerimos realizar estudios más a fondo con respecto a estas vías de fosforilación de eNOS y la actividad de AMDA en osteoblastos para poder dilucidar mejor el o los mecanismos por los cuales estos ácidos grasos estén teniendo el efecto observado en este trabajo en modelo experimentales con células óseas.

10. CONCLUSIONES

- El ácido docosahexaenoico regula la formación de los nódulos de mineralización y el metabolismo de las células osteoblásticas humanas debido a que:
 - Normaliza la formación y distribución de la matriz mineral y de calcio depositado en cultivo.
 - Disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno similar al tratamiento con el antioxidante Trolox.
 - Incrementa la producción extracelular de nitritos.
- El efecto del ácido araquidónico aún no es claro ya que parece tener efecto sobre las alteraciones sobre la formación de mineral y el metabolismo de los osteoblastos provocadas por niveles elevados de glucosa debido a que:
 - Regula la formación y distribución de los cristales de hidroxiapatita y la deposición de calcio.
 - Inhibe de manera importante la producción de especies reactivas de oxígeno.
 - Incrementa la producción de nitritos.
 - Por otro lado este ácido graso podría intensificar los efectos adversos de niveles elevados de glucosa con respecto a la calidad del mineral ya que:
 - Aumenta de manera importante la actividad de la ALP.

En general ambos ácidos grasos tienen efectos sobre la biomineralización y el metabolismo de los osteoblastos en condiciones de alta glucosa, sin embargo los efectos del DHA son más alentadores con respecto a su utilización como un posible tratamiento para tratar la osteopatía diabética en un futuro.

11. PERSPECTIVAS

Es importante investigar los mecanismos por los cuales el AA y el DHA estén teniendo los efectos reportados en este trabajo sobre la biomineralización para dilucidar si su efecto puede perjudicial o benéfico. Para esto sería de gran relevancia determinar la calidad de los cristales de hidroxiapatita producidos por los osteoblastos tratados con DHA o AA en combinación con ambas concentraciones de glucosa así como evaluar la actividad de la ALP a tiempos más tempranos.

Sería relevante estudiar los mecanismos por los cuales ambos ácidos grasos inhiben la producción de ERO en este tipo celular ya que se ha sugerido que el estrés oxidativo producido por la hiperglucemia puede ser un blanco terapéutico. En este sentido sería importante evaluar el efecto de estos ácidos grasos sobre las enzimas antioxidantes celulares y sobre el transporte en la cadena de electrones.

Además estudiar la actividad enzimática de las sintasas de óxido nítrico con los ácidos grasos en combinación con ambas concentraciones de glucosa para determinar la enzima por la cual afectan específicamente la producción de NO ya que permitiría entender mejor el papel del DHA y AA en el tratamiento de patologías óseas.

Es importante determinar el efecto de estos ácidos grasos sobre la producción de PGE2 y mediadores proinflamatorios en osteoblastos bajo condiciones de alta glucosa ya que se han propuesto como importantes para el metabolismo óseo y como un posible blanco para el tratamiento de patologías óseas asociadas a diabetes.

Así mismo sería de gran interés estudiar el efecto de una mezcla de DHA y AA sobre la biomineralización y producción de NO y ERO en condiciones de alta glucosa.

12. REFERENCIAS

Adil, C., Aydın, T., Taşpınar, Ö., Kızıltan, H., Eriş, A. H., Hocaoglu, I. T., Poşul, S., Kepekci, M., Denizli, E. y Güler, M. (2015). Bone mineral density evaluation of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physical Therapy Science*. 27(1): 179-182.

American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37 (Supplement 1): 81-90.

Amour, J., Brzezinska, A. K., Weihrauch, D., Billstrom, A. R., Zielonka, J., Krolikowski, J. G., Bienengraeber, M. W., Warltier, C. D., Pratt, P.F. y Kersten, J. R. (2009). Role of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase during early anesthetic and ischemic preconditioning. *Anesthesiology*. 110(2): 317.

Arikawa, T., Omura, K. y Morita, I. (2004). Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*. 200(3): 400-406.

Arzate, H., Alvarez-Pérez, M. A., Aguilar-Mendoza, M. y Alvarez-Fregoso, O. (1998). Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *Journal of periodontal research*. 33(5): 249-258.

Balint, E., Szabo, P., Marshall, C. F. y Sprague, S. M. (2001). Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*. 28(1): 21-28.

Bellido, T., Plotkin, L. I. y Bruzzaniti, A. (2014). Bone cells. En Burr, D. y Allen, M. (Eds.) *Basic and Applied Bone Biology*. Elsevier. Pp. 27-45.

Bhattacharya, A., Rahman, M., Sun, D. y Fernandes, G. (2007). Effect of fish oil on bone mineral density in aging C57BL/6 female mice. *Journal of nutritional biochemistry*. 18(6): 372-379.

Böger, R. H. (2004). Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *Journal of nutrition*. 134(10): 2842-2847.

Bonds, D. E., Larson, J. C., Schwartz, A. V., Strotmeyer, E. S., Robbins, J., Rodriguez, B., Johnson, K. y Margolis, K. L. (2006). Risk of fracture in women with type 2 diabetes: the

Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 91(9): 3404-3410.

Coetze, M., Haag, M., y Kruger, M. C. (2009). Effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on differentiation and mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Cell biochemistry and function*. 27(1): 3-11.

Carrero, J. J., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J. J. y López-Huertas, E. (2005). Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*. 20: 63-69.

Claassen, N., Potgieter, H. C., Seppa, M., Vermaak, W. J., Coetzer, H., Van Papendorp, D. H. y Kruger, M. C. (1995). Supplemented gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid influence bone status in young male rats: effects on free urinary collagen crosslinks, total urinary hydroxyproline, and bone calcium content. *Bone*. 16(4): 385-392.

Coetzee, M., Haag, M., Joubert, A. M. y Kruger, M. C. (2007). Effects of arachidonic acid, docosahexaenoic acid and prostaglandin E2 on cell proliferation and morphology of MG-63 and MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 76: 35-45.

Cohen, S. L., Moore, A. M., y Ward, W .E. (2005). Flaxseed oil and inflammation-associated bone abnormalities in interleukin-10 knockout mice. *Journal of nutritional biochemistry*. 16(6): 368-374.

Eijken, M. (2007). *Human Osteoblast Differentiation and Bone Formation: Growth Factors, Hormones and Regulatory Networks*. Doctoral dissertation, Erasmus MC: University Medical Center Rotterdam.

El-Heis, M. A., Al-Kamil, E. A., Kheirallah, K. A., Al-Shatnawi, T. N., Gharaibia, M. y Al-Mnayyis, A. (2013). Factors associated with osteoporosis among a sample of Jordanian women referred for investigation for osteoporosis. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 19(5): 459-464.

Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 11(4): 219-227.

Fallon, E. M., Nazarian, A., Nehra, D., Pan, A. H., O'Loughlin, A. A., Nose, V. y Puder, M. (2014). The effect of docosahexaenoic acid on bone microstructure in young mice and bone fracture in neonates. *Journal of Surgical Research*. 191(1): 148-155.

García-Hernández, A., Arzate, H., Gil-Chavarría, I., Rojo, R., y Moreno-Fierros, L. (2012). High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*. 50: 276-288.

González-Macías, J., y Olmos-Martinez, J. M. (2010). Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2: 5-17.

Gousset-Dupont, A., Robert, V., Grynberg, A., Lacour, B., y Tardivel, S. (2007). The effect of n-3 PUFA on eNOS activity and expression in Ea hy 926 cells. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 76(3): 131-139.

Hamann, C., Kirschner, S., Günther, K. P. y Hofbauer, L. C. (2012). Bone, sweet bone: osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 8(5): 297-305.

Hasturk, H., Kantarci, A., Ohira, T., Arita, M., Ebrahimi, N., Chiang, N., Petasis, N. A., Levy, B. D., Serhan, C. N. y Van Dyke, T. E. (2006). RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *Journal Federation of American Societies for Experimental Biology*. 20(2): 401-403.

Harvey, N. y Copper, C. (2006). The epidemiology of osteoporotic fractures. En Arden, N. (Ed.). *Osteoporosis*. Londres: Remedica. Pp: 1-26.

Heap, J., Murray, M. A., Miller, S. C., Jalili, T. y Moyer-Mileur, L. J. (2004). Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Journal of pediatrics*. 144(1): 56-62.

Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P. y Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus in Mexico: Status of the epidemic. *Salud Pública de México*. 55: 129-136.

Hofbauer, L. C., Brueck, C. C., Singh, S. K. y Dobnig, H. (2007). Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 22(9): 1317-1328.

IDF (2014). IDF diabetes atlas. International Diabetes Federation. 6° edición. Actualización del 2014. Revizado el 10 de marzo del 2015, de http://www.idf.org/sites/default/files/5E_IDFAtlasPoster_2012_EN.pdf

Keila, S., Kelner, A. y Weinreb, M. (2001). Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity *in vivo* and *in vitro*. *Journal of endocrinology*. 168: 131-139.

Kruger, M. C., Coetzee, M., Haag, M. y Weiler, H. (2010). Long-chain polyunsaturated fatty acids: Selected mechanisms of action on bone. *Progress in Lipid Research*. 49: 438-449

Kruger, M. C., Coetzer, H., De Winter, R., Gericke, G. y Van Papendorp, D. H. (1998). Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging Clinical and Experimental Research*. 10(5): 385-394.

Lin, K., Ito, A., Asagami, T., Tsao, P., Adimoolam, S., Kimoto, M. y Cooke, J. (2002). Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 106(8): 987-992.

Lowry, O. H ., Buell, M. V., Roberts, N. R., Chang, M. L. W. y Kappahn, J. I. (1958). The quantitative histochemistry of the brain V. Enzymes of glucose metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 232(2): 979-994.

Michell, B. J., Griffiths, J. E., Mitchelhill, K. I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., Ortiz de Montellano, P., Kemp, B. E. y Pearson, R. B. (1999). The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current biology*. 9(15): 845-848.

Mustafa-Alnouri, D., El-Din, M. F. S. y Al-Khalifa, A. S. (2014). The effect of long-term supplementation with different dietary ω -6/ ω -3 ratios on mineral content and ex vivo prostaglandin E2 release in bone of growing rabbits. *Nutrition research and practice*. 8(4): 360-367.

Mori, T. A., Woodman, R. J., Burke, V., Puddey, I. B., Croft, K. D. y Beilin, L. J. (2003). Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free radical biology and medicine*. 35(7): 772-781.

Nettleton, J. A., y Katz, R. (2005). n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *Journal of the American Dietetic Association*. 105(3): 428-440.

Nicodemus, K. K. y Folsom, A. R. (2001). Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes care*. 24(7): 1192-1197.

Priante, G., Bordin, L., Musacchio, E., Clari, G. y Baggio, B. (2002). Fatty acids and cytokine mRNA expression in human osteoblastic cells: a specific effect of arachidonic acid. *Clinical Science*. 102(4): 403-409.

Priante, G., Musacchio, E., Pagnin, E., Cal, L. y Baggio, B. (2005). Specific effect of arachidonic acid on inducible nitric oxide synthase mRNA expression in human osteoblastic cells. *Clinical Science*. 109: 177-182.

Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J., Stobart, K. y Lazarus, C. M. (2004). Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature biotechnology*. 22(6): 739-745.

Rachner, T. D., Khosla, S., y Hofbauer, L. C. (2011). Osteoporosis: now and the future. *The Lancet*. 377(9773): 1276-1287.

Riancho, J. A., Salas, E., Zarrabeitia, M. T., Olmos, J. M., Amado, J. A., Fernández-Luna, J. L. y González-Macías, J. (1995). Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. 10(3): 439-446.

Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P. y Visioli, F. (2008). Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research*. 57(6): 451-455.

Rotstein, N. P., Politi, L. E., German, O. L. y Girotti, R. (2003). Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science*. 44(5): 2252-2259.

Schlemmer, C. K., Coetzer, H., Claassen, N. y Kruger, M. C. (1999). Oestrogen and essential fatty acid supplementation corrects bone loss due to ovariectomy in the female Sprague Dawley rat. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 61(6): 381-390.

Schönfeld, P. y Wojtczak, L. (2007). Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1767(8): 1032-1040.

Schoppet, M., Preissner, K. T., y Hofbauer, L. C. (2002). RANK ligand and osteoprotegerin paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 22(4): 549-553.

Schuchardt, J. P., Huss, M., Stauss-Grabo, M. y Hahn, A. (2010). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *European journal of pediatrics*. 169(2): 149-164.

Schwartz, A. V. (2003). Diabetes mellitus: does it affect bone?. *Calcified Tissue International*. 73(6): 515-519

Shen, C. L., Peterson, J., Tatum, O. y Dunn, D. (2008). Effect of Long-Chain n-3 polyunsaturated fatty acid on inflammation mediators during osteoblastogenesis. *Journal of Medicinal Food*. 11: 105-110.

Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 233(6): 674-688.

Skillington, J., Choy, L. y Derynck, R. (2002). Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *The Journal of cell biology*. 159: 135-146.

Stebbins, C. L., Stice, J. P., Hart, C. M., Mbai, F. N., y Knowlton, A. (2008). Effects of dietary decosahexaenoic acid (DHA) on eNOS in human coronary artery endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 13(4): 261-268.

Strotmeyer, E. S., Cauley, J. A., Schwartz, A. V., Nevitt, M. C., Resnick, H. E., Zmuda, J. M., Bauer, D., Tylavsky, F. A., Rekenire, N., Harris, T. B. y Newman, A. B. (2004). Diabetes is associated independently of body composition with BMD and bone volume in older white and black men and women: The Health, Aging, and Body Composition Study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 19(7): 1084-1091.

Suresh, Y., y Das, U. N. (2003). Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: effect of ω -3 fatty acids. *Nutrition*. 19(3): 213-228.

Triana-Mantilla, M. (2001). La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Revista Cubana de Angiología y Circulación Vascolar*. 2(2):131-41

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of physiology*. 552(2): 335-344.

Van Papendorp, D. H., Coetzer, H. y Kruger, M. C. (1995). Biochemical profile of osteoporotic patients on essential fatty acid supplementation. *Nutrition Research*. 15(3): 325-334.

Wang, C., Chung, M., Lichtenstein, A., Balk, E., Kupelnick, B., DeVine, D., Lawrence, A. y Lau, J. (2004). Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Evidence report/technology assessment*. (94): 1-8.

Watkins, B. A., Li, Y., Lippman, H. E. y Feng, S. (2003). Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 68(6): 387-398.

Watkins, B. A., Lippman, H. E., Le Bouteiller, L., Li, Y., y Seifert, M. F. (2001). Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Progress in lipid research*. 40: 125-148.

Weiss, L. A., Barrett-Connor, E. y Von Mühlen, D. (2005). Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *The American journal of clinical nutrition*. 81(4): 934-938.

Xiao, Z. S., Quarles, L. D., Chen, Q. Q., Yu, Y. H., Qu, X. P., Jiang, C. H. y Zhou, H. H. (2001). Effect of asymmetric dimethylarginine on osteoblastic differentiation. *Kidney international*. 60(5): 1699-1704.

Ying-Ying, W., Tao, Y., Xiao-Hui, Z., Yan-Shan, L., Feng, L., Yan-Ying, W., Yong-Yue, W. y Ping, G. (2012). 1,25(OH)₂D₃ inhibits the deleterious effects induced by high glucose on osteoblasts through undercarboxylated osteocalcin and insulin signaling. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 132: 112-119.

Yu, T., Jhun, B. S. y Yoon, Y. (2011). High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxidants & redox signaling*, 14(3): 425-437.

Yuan, J., Akiyama, M., Nakahama, K. I., Sato, T., Uematsu, H., y Morita, I. (2010). The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro. *Prostaglandins and other lipid mediators*. 92(1): 85-90.

Zhang, Y. y Yang, J. H. (2013). Activation of the PI3K/Akt Pathway by Oxidative Stress Mediates High Glucose Induced Increase of Adipogenic Differentiation in Primary Rat Osteoblasts. *Journal of Cell Biology*. 114: 2595-2602.