



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DEL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO SOBRE LAS ALTERACIONES PROVOCADAS  
POR ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN EL PROCESO DE BIOMINERALIZACIÓN  
Y LOS MECANISMOS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS HUMANAS**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**SAÚL ERNESTO CIFUENTES MENDIOLA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dra. LETICIA MORENO FIERROS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**Dra. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ**

**UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD, HOSPITAL DE PEDIATRÍA,  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2017**



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.

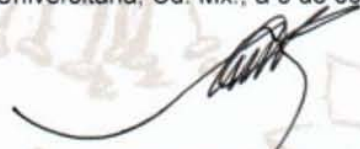
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de agosto de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CIFUENTES MENDIOLA SAUL ERNESTO**, con número de cuenta 308003279, con la tesis titulada "Efecto del ácido docosahexaenoico sobre las alteraciones provocadas por altas concentraciones de glucosa en el proceso de biomineralización y los mecanismos antioxidantes en células osteoblásticas humanas", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN  
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Secretario: DRA. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ  
Suplente: DRA. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA  
Suplente: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 3 de octubre de 2017.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por haberme permitido realizar mis estudios de maestría y brindarme una formación de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por aceptarme dentro del programa de becas para la realización de estudios de posgrado, que me permitió realizar con satisfacción mis estudios de maestría.

Investigación realizada gracias al programa al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) por el financiamiento para la realización de este trabajo con número de proyecto: IA208016.

A la Dra. Ana Lilia García Hernández por dirigir mi trabajo de tesis y guiarme en mi desarrollo académico y profesional.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros y a la Dra. Maricela Rodríguez Cruz, que participaron como miembros de mi comité tutorial por el apoyo y todas sus contribuciones para el correcto desarrollo de este proyecto de investigación y para mi formación académica.

## **AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO TÉCNICO Y USO DE EQUIPOS**

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez de la Facultad de Odontología, U.N.A.M; al Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada (CICATA) unidad Legaría, I.P.N., y al laboratorio de materiales avanzados del Instituto de Física de la U.N.A.M, en especial al Dr. Jesús Arenas Alatorre y a la Dra. María Cristina Zorrilla Cangas, por su asistencia y soporte técnico para la caracterización y análisis estructural de la matriz mineral sintetizada por los osteoblastos humanos.

# ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1. <i>El tejido óseo</i> .....	2
1.2. <i>Diabetes mellitus</i> .....	8
1.3. <i>Diabetes mellitus y las alteraciones sobre el metabolismo óseo</i> .....	10
1.4. <i>El ácido docosahexaenoico</i> .....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>14</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>20</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
7.1. <i>Cultivo Celular</i> .....	21
7.2. <i>Condiciones de cultivo</i> .....	21
7.3. <i>Análisis de la expresión proteica de Col1, OCN y BSP-II en la matriz mineralizada</i> .....	22
7.4. <i>Evaluación de la actividad específica de la fosfatasa alcalina</i> .....	24
7.5. <i>Análisis de las características de la matriz mineral y maduración de los cristales de fosfato de calcio por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	24
7.6. <i>Determinación de la concentración extracelular de RANK-L</i> .....	25
7.7. <i>Determinación de la expresión genética del factor de transcripción NRF2 y las enzimas antioxidantes SOD-1 y GPx-1</i> .....	26
7.8. <i>Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD</i> .....	27
7.9. <i>Análisis estadístico</i> .....	27
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
8.1. <i>El tratamiento con 10 µM de DHA disminuye la sobreproducción de la Col1 provocada por la concentración alta de glucosa y mejora su distribución</i> .....	28
8.2. <i>El tratamiento con 10 µM de DHA disminuye la sobreproducción de OCN provocada por la concentración alta de glucosa a los 21 días de cultivo</i> .....	31
8.3. <i>El tratamiento con DHA incrementa la producción de BSP-II disminuida por la concentración alta de glucosa</i> .....	33
8.4. <i>El DHA atenúa la actividad específica de la ALP incrementada por la concentración alta de glucosa</i> .....	35
8.5. <i>El tratamiento con DHA normaliza la mineralización relativa y disminuye la sustitución de carbonatos incrementada por la concentración alta de glucosa</i> .....	36

8.7.	<i>El tratamiento con 20 <math>\mu</math>M de DHA incrementa la expresión relativa del NRF2 bajo ambas concentraciones de glucosa.</i>	41
8.8.	<i>La actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD no se modifica con los tratamientos experimentales.</i>	44
8.9.	<i>El tratamiento con 20 <math>\mu</math>M de DHA incrementa la expresión relativa de las enzimas SOD-1 y Gpx-1 solo bajo condiciones de normo-glucosa.</i>	46
9.	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
10.	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
11.	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>60</b>
12.	<b>REFERENCIAS</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Proceso de remodelado óseo.....	3
Fig. 2 Proceso de formación ósea.....	6
Fig. 3. Vía RANK-L/RANK/OPG.....	7
Fig. 4. Metabolismo de los ácidos grasos $\omega$ -3.....	13
Fig. 5. Estrategia experimental.....	20
Fig. 6. Efecto del DHA en la concentración y distribución de la colágena tipo I con diferentes concentraciones de glucosa.....	30
Fig. 7. Efecto del DHA en la producción de OCN con diferentes concentraciones de glucosa ...	32
Fig. 8. Efecto del DHA en la producción de BSP-II con diferentes concentraciones de glucosa.	34
Fig. 9. Efecto del DHA en la actividad específica de la ALP con diferentes concentraciones de glucosa.....	35
Fig. 10. Histogramas de la matriz mineral obtenidos por FTIR.....	36
Fig. 11. Efecto del DHA en combinación con diferentes concentraciones de glucosa sobre la mineralización relativa de la matriz orgánica.....	38
Fig. 12. Efecto del DHA en la sustitución de carbonatos en combinación con diferentes concentraciones de glucosa.....	39
Fig. 13. Efecto del DHA en la producción extracelular de RANK-L en combinación con diferentes concentraciones de glucosa.....	41
Fig. 14. Efecto del DHA en la expresión del mRNA de <i>NRF2</i> en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.....	43
Fig. 15. Efecto del DHA en la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa bajo diferentes concentraciones de glucosa.....	44
Fig. 16. Efecto del DHA en la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa bajo diferentes concentraciones de glucosa.....	45
Fig. 17. Efecto del DHA en la expresión del mRNA de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en combinación bajo diferentes concentraciones de glucosa.....	48
Fig. 18. Efecto del DHA sobre las alteraciones causadas por las altas concentraciones de glucosa en la síntesis de matriz orgánica y matriz mineral.....	57
Fig. 19. Posible efecto del DHA sobre las alteraciones provocadas por la concentración alta de glucosa en la señalización intracelular de los osteoblastos y el mecanismo antioxidante.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Desplazamiento FTIR característico para los grupos funcionales representativos de muestras de hueso y matriz mineral. ....	25
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para PCR utilizados para la determinación de la expresión de <i>NRF2</i> , <i>SOD-1</i> y <i>GPx-1</i> . ....	26



## GLOSARIO

**AGE's:** Productos finales de glicación avanzada

**ALA:** Ácido  $\alpha$ -Linolénico

**ALH:** Antígeno leucocitario humano

**ALP:** Fosfatasa alcalina

**ARE:** Elemento de respuesta antioxidante

**BMP:** Proteína morfogenética ósea

**BSP:** Sialoproteína ósea

**CAT:** Catalasa

**Col1:** Colágena tipo I

**COX:** Ciclooxygenasa

**DHA:** Ácido docosahexaenoico

**DM:** Diabetes mellitus

**DMO:** Densidad mineral ósea

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DMT1:** Diabetes mellitus tipo 1

**DMT2:** Diabetes mellitus tipo 2

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**EPA:** Ácido eicosapentaenoico

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

**FTIR:** Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier

**GAD:** Glutamato descarboxilasa

**GPx:** Glutación peroxidasa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogeno

**HAP:** Hidroxiapatita

**hFOb:** Osteoblastos fetales de humano

**HO-1:** Hemo oxygenasa-1

**IGF:** Factor de crecimiento insulínico

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 $\beta$

**IL-6:** Interleucina 6

**LOX:** Lipooxygenasa

**MCP-1:** Proteína quimio atrayente de monocitos 1

**M-CSF:** Factor estimulante de colonias de macrófagos

**MG-CSF:** Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos

**MMP-9:** metaloproteinasa-9 de matriz

**NRF2:** Factor nuclear eritroide 2

**OCN:** Osteocalcina

**OPG:** Osteoprotegerina

**PBS:** Amortiguador salino de fosfatos

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**pNPP:** p-Nitrofenil fosfato

**RANK-L:** Ligando del receptor activador del factor nuclear NF- $\kappa\beta$

**Runx2:** Runt-related transcription factor 2

**SD:** Desviación estándar

**SFB:** Suero fetal bovino

**SN:** Sistema nervioso

**SOD:** Superóxido dismutasa

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TRAP:** Fosfatasa acida resistente al tartrato

**WB:** "Western blot"

**ZnT8:** Transportador de zinc 8

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Se ha reportado que la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) aumenta el riesgo de desarrollar osteopatías como osteoporosis, osteopenia y periodontitis. Se ha observado en modelos *in vitro* con osteoblastos humanos, que la hiperglucemia provoca un aumento en el depósito de mineral, una disminución en la calidad de los cristales depositados, alteraciones en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), y un incremento de citocinas pro-inflamatorias. Por lo que, es importante contar con tratamientos eficaces y accesibles que atenúen los efectos negativos de la concentración alta de glucosa sobre la biomineralización. Proponemos al ácido docosahexaenoico (DHA) como un posible tratamiento adyuvante, debido a que se ha asociado con efectos benéficos en hueso y en la función de los osteoblastos en condiciones fisiológicas. En investigaciones previas realizadas en el laboratorio, observamos que el DHA normaliza la formación y distribución de la matriz mineral, la cantidad de calcio depositado y disminuye la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en osteoblastos humanos cultivados con 24 mM de glucosa y es posible que esta normalización se deba a su efecto antioxidante a través de la vía de NRF2.

**OBJETIVO:** Determinar los efectos del DHA sobre las alteraciones causadas por una concentración alta de glucosa en la síntesis de la matriz extracelular, el proceso de biomineralización y los mecanismos antioxidantes en células osteoblásticas humanas. **MATERIAL Y METODOS:** los experimentos se realizaron en una línea celular de osteoblastos fetales de humano (hFOB 1.19.). Se determinó el efecto del DHA en condiciones de normo-glucosa (5.5 mM de glucosa), y glucosa alta (24 mM de glucosa), sobre la matriz orgánica analizando la síntesis y distribución de la colágena tipo 1 (Col1), a través de la tinción con rojo sirio pícrico; la producción de osteocalcina (OCN), por "InCell Western"; la producción de sialoproteína ósea tipo II (BSP-II), por "western blot", y la actividad específica de la ALP un ensayo enzimático. La calidad del mineral y la forma en la que se mineraliza la matriz orgánica se analizaron por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR), y la concentración extracelular del RANK-L se determinó por ensayos de ELISA. Finalmente, para determinar los mecanismos antioxidantes, se evaluó la expresión del mRNA de *NRF2*, superóxido dismutasa (*SOD*), y glutatión peroxidasa (*GPx*) por RT-PCR, y se evaluó la actividad enzimática de la *SOD* y *GPx* por un ensayo enzimático. **RESULTADOS:** Se observó que el DHA con 24 mM de glucosa normalizó la síntesis y distribución de la Col1, incrementó la producción de BSP-II y disminuyó la actividad de la ALP a niveles basales; sin embargo, no cambió los niveles de OCN en comparación con las células cultivadas solo con 24 mM de glucosa. Con respecto a la calidad del mineral y la mineralización de la matriz orgánica observamos que el DHA en condiciones de glucosa alta, restauró la calidad del mineral y la forma en la que se mineraliza la matriz orgánica y disminuyó parcialmente los niveles del RANK-L. Con respecto al mecanismo antioxidante los datos revelaron que el DHA incrementa la expresión del mRNA del *NRF2* en condiciones de glucosa alta, pero no produjo cambios en la expresión o en la actividad enzimática de las enzimas *SOD* y *GPx*. **CONCLUSIONES:** El tratamiento con DHA contrarresta los efectos adversos de la concentración alta de glucosa en la matriz orgánica, mineral y en la calidad de los cristales; además, es posible que reduzca el estrés oxidativo provocado por las concentraciones altas de glucosa a través de la vía antioxidante del NRF2.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** DMT2 increases the risk of osteopathies such as osteoporosis, osteopenia and periodontitis. It has been observed that hyperglycemia causes an increase of the mineral deposit, a decrease in the quality of deposited crystals, alterations in the activity of the ALP, and an increase of pro-inflammatory cytokines. Therefore, it is important to have effective and accessible treatments that attenuate the negative effects of high glucose concentration on biomineralization. We propose DHA as a possible treatment since it has been associated with beneficial effects on bone and osteoblasts function under physiological conditions. We have previously observed that DHA normalizes the formation and distribution of the mineral matrix, the amount of calcium deposited and decreases the overproduction of ROS in human osteoblasts cultured with 24 mM of glucose and it is possible that this normalization is due to its antioxidant effect through NRF2 pathway. **OBJECTIVE:** To determine the effects of DHA on alterations caused by high glucose concentration in extracellular matrix synthesis, the biomineralization process and antioxidant mechanisms in human osteoblastic cells was determined. **MATERIALS AND METHODS:** The experiments were performed on a human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19.). We determined the effect of DHA on normo-glucose conditions (5.5 mM) and 24 mM of glucose on the organic matrix by analyzing the synthesis and distribution of Col1 by PicroSirius red stain. The production of OCN by InCell Western, the production of BSP-II by western blot and the specific activity of the ALP by an enzymatic assay; the quality of the mineral and the mineralization of the matrix was analyzed by FTIR. Also, extracellular concentration of RANK-L was determined it by ELISA. Then expression of the mRNA encoding *NRF2*, *SOD* and *GPx* by RT-PCR was evaluated to determine the antioxidant mechanisms and the enzymatic activity of SOD and GPx was evaluated by catalysis of its substrate by spectrometry. **RESULTS:** It was observed that DHA prevent the effects of 24 mM of glucose: normalized the synthesis and distribution of Col1, increased the production of BSP-II and normalized the activity of ALP, however, the levels of OCN were not significantly different, compare with cells cultured with 24 mM glucose. In relation to mineral quality and organic matrix mineralization, we observed that DHA with high glucose restored the quality of the mineral and the way in which the organic matrix was mineralized and partially lowered RANK-L levels. Regarding the antioxidant mechanism, the data revealed that DHA increases *NRF2* mRNA expression in high glucose conditions but did not produce changes in the expression or in the enzymatic activity of the SOD and GPx enzymes. **CONCLUSIONS:** DHA treatment counteracts the adverse effects of high glucose concentration on the organic matrix, mineral and crystal quality and might reduce the oxidative stress caused by high glucose concentrations through the antioxidant pathway of NRF2.

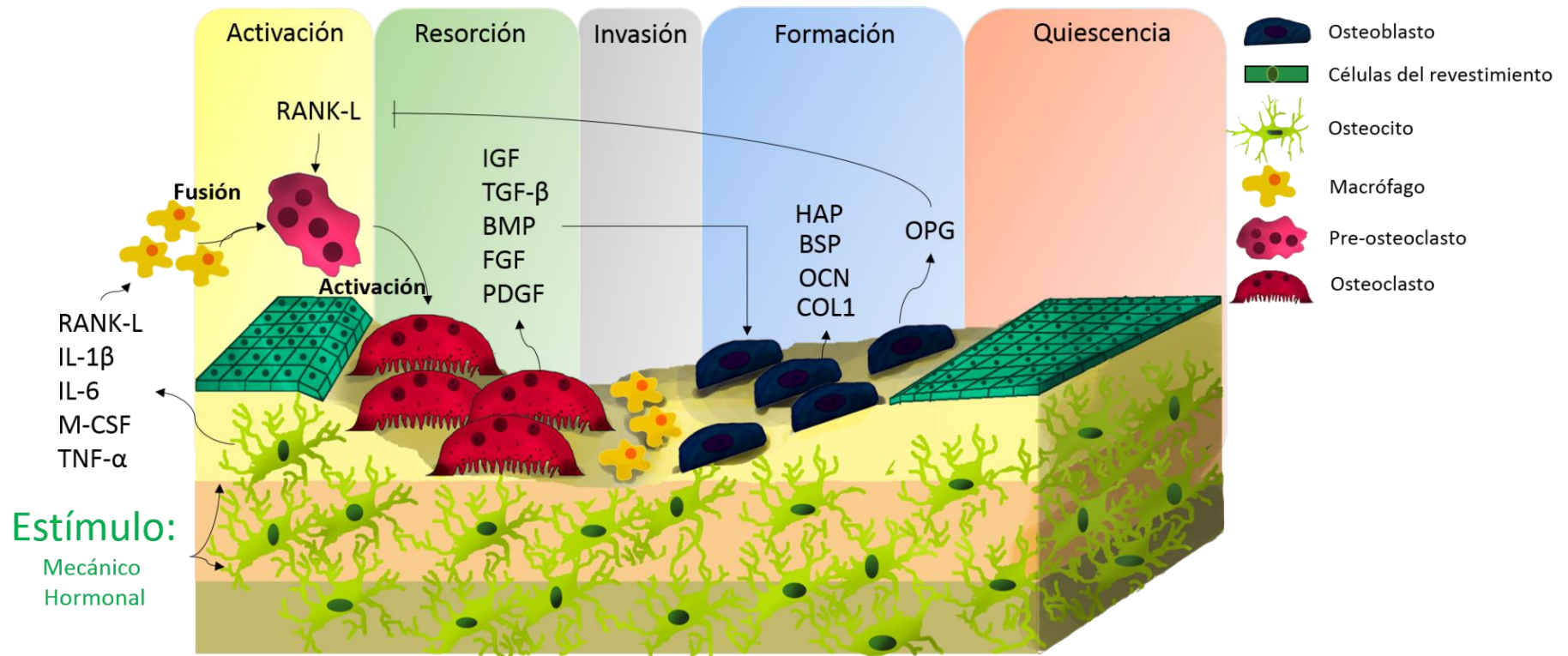
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *El tejido óseo.*

El hueso es un órgano altamente dinámico y especializado que cumple funciones de soporte, de protección y metabólicas (1), y en mamíferos está dividido en hueso cortical o denso y hueso trabecular o poroso (2). Ambos tipos de tejido óseo están constituidos por una parte orgánica, conformada por células específicas del hueso como los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células del revestimiento; una gran variedad de proteínas de las que destacan por su participación en la formación del hueso la colágena tipo I (Col1), y proteínas no colágenas como sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), y proteína morfogenética ósea (BMP) que conforman la matriz extracelular orgánica. Esta matriz orgánica se combina con una matriz inorgánica mineralizada que le confiere rigidez y dureza, compuesta en su mayoría por cristales de hidroxiapatita (HAP:  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) (3, 4).

El hueso depende de una reparación constante denominada remodelado óseo, 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 de esta manera la integridad mecánica del esqueleto y la regulación de la homeostasis del calcio y del fósforo (5, 6). Este proceso está altamente regulado por factores locales y sistémicos, y un desequilibrio significaría la pérdida ósea acelerada o síndromes de compresión (6).

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 osteoide (6, 7), de tal manera que aproximadamente el 20% del esqueleto es reemplazado en un año (7). El proceso de remodelado óseo se puede dividir en cuatro etapas: activación, resorción, invasión y formación (Fig. 1).



**Fig. 1. Proceso de remodelado óseo.** Se esquematizan las cuatro etapas activas del remodelado óseo (activación, resorción, invasión y formación), y la etapa de quiescencia. Un estímulo activa a los osteocitos y osteoblastos para que secreten citocinas que inducen la formación y activación de los osteoclastos, que una vez activados se adhieren al hueso y degradan la matriz orgánica. En esta etapa se liberan factores de crecimiento almacenados en la matriz osteoide que inducen la diferenciación de los pre-osteoblastos. Después comienza la etapa de invasión por células mononucleares que limpian la cavidad de remodelado. Posteriormente los osteoblastos migran a esta cavidad y sintetizan matriz orgánica y matriz mineral compuesta por hidroxapatita. Una vez que la síntesis de matriz osteoide finaliza, los osteoblastos se transforman en células del revestimiento o en osteocitos. **IL-6:** interleucina 6; **IL-1β:** interleucina 1-β; **RANK-L:** ligando del receptor activador del factor nuclear; **TNF-α:** factor de necrosis tumoral alfa; **M-CSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos; **IGF:** factor de crecimiento similar a la insulina; **TGF-β:** factor de crecimiento transformante β; **BMP:** proteína morfogenética ósea; **FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos; **PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas; **Col1:** colágena tipo I; **OCN:** osteocalcina; **BSP:** sialoproteína ósea; **HAP:** hidroxapatita; **OPG:** osteoprotegerina. **Elaboración propia.**

La etapa de activación comienza con un estímulo que puede ser mecánico, físico u hormonal. Este estímulo activa a los osteocitos y osteoblastos para que secreten citocinas como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el ligando del receptor activador del factor nuclear NF- $\kappa$  $\beta$  (RANK-L), factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factores estimulantes de colonias como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (MG-CSF). Todas estas moléculas inducen el reclutamiento y fusión de las células mononucleares para la formación de los osteoclastos y su activación (8-10).

La etapa de resorción comienza una vez que los osteoclastos son activados, lo que ocurre principalmente a través de la unión del RANK-L con su receptor, que activa la vía de NF- $\kappa$  $\beta$  (11). Una vez activados, los osteoclastos se adhieren al hueso a través microvellosidades que forman una estructura denominada borde en cepillo (12), lo cual permite formar un área de sellado en donde secretan hidrogeniones (H<sup>+</sup>) e iones de Cl<sup>-</sup> que facilitan la disolución del mineral y crea las condiciones de pH ideales para la acción de las enzimas lisosomales como catepsina K, la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), y metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9) para degradar la matriz orgánica (10, 13)

Tras finalizar su función, los osteoclastos entran en apoptosis y dejan una cavidad denominada espacio de Howship, el cual puede variar entre 40 y 60  $\mu$ m de profundidad (4). Durante la resorción ósea, se liberan factores de crecimiento como el IGF, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), BMP, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales se almacenan en la matriz osteoide e inducen la maduración de los pre-osteoblastos (13).

Después del proceso de resorción, comienza la etapa de invasión por células mononucleares de tipo macrófágico que limpian la cavidad de remodelado fagocitando los restos celulares y minerales y formando la línea de cementación sobre la que se depositará el hueso nuevo (12).

La etapa de formación comienza con la maduración de los pre-osteoblastos que se induce por factores de crecimiento (IGF, TGF- $\beta$ , BMP, FGF, PDGF) que activan vías de señalización como MAP cinasas, Wnt y SMAD 2/3 (14), que llevan a la translocación de los factores de transcripción Runx2, Dlx5 y Osterix al núcleo. Así mismo, Runx2 induce la transcripción de la Col1, ALP, BSP y OCN (13). El osteoblasto totalmente diferenciado se caracteriza por la co-

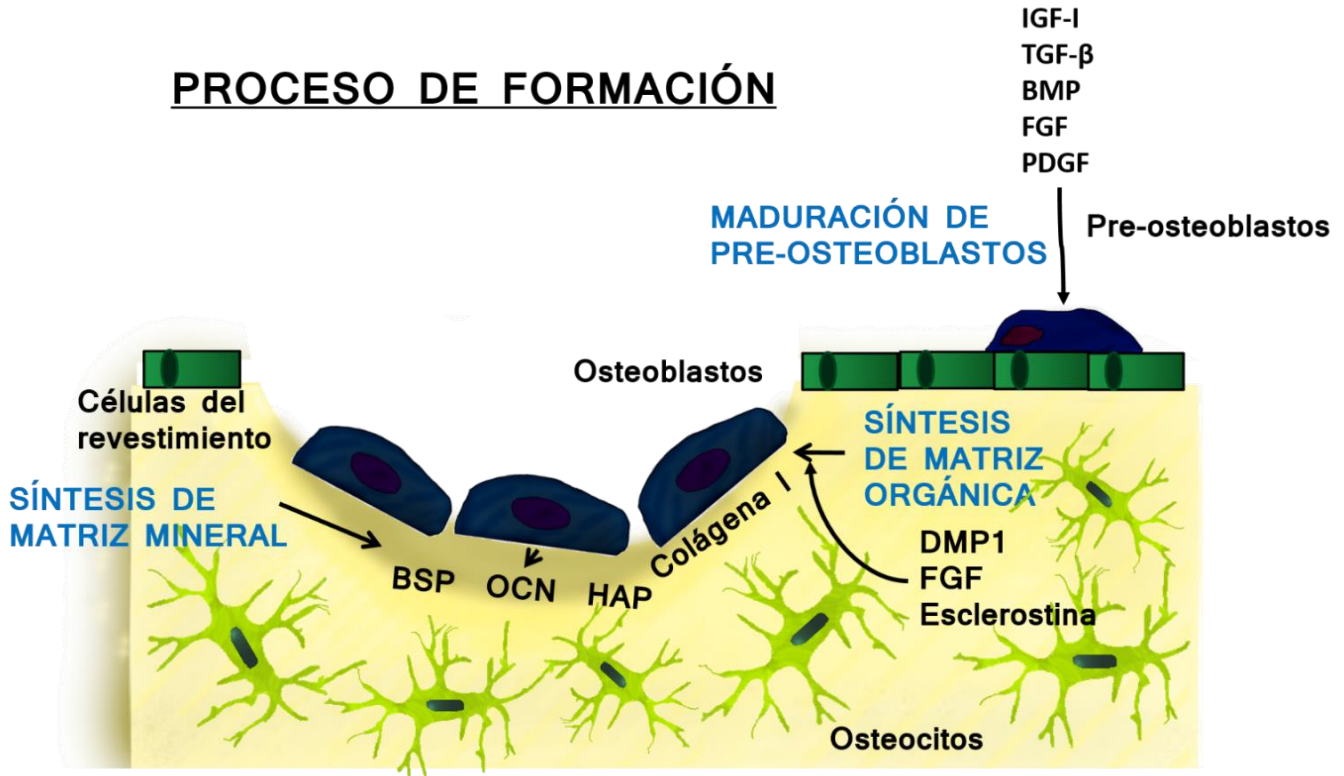
expresión de la fosfatasa alcalina (ALP), y Col1, que son importantes para la síntesis de la matriz orgánica y su posterior mineralización (3, 4).

Una vez que los osteoblastos se han diferenciado, comienzan a sintetizar una matriz orgánica constituida principalmente por Col1, proteoglicanos (decorina), y proteínas como la OCN y BSP, las cuales son altamente afines al calcio y se encargan de nuclear las moléculas de fosfato de calcio para formar y fijar la HAP a la matriz orgánica. Conforme los osteoblastos realizan estas funciones, inhiben la actividad osteoclástica por medio de la liberación de osteoprotegerina (OPG) (6, 13).

Cuando la síntesis de la matriz osteoide 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), el FGF y esclerostina, que controlan la formación de hueso y el metabolismo del fosfato (3, 6, 12) (Fig. 2).



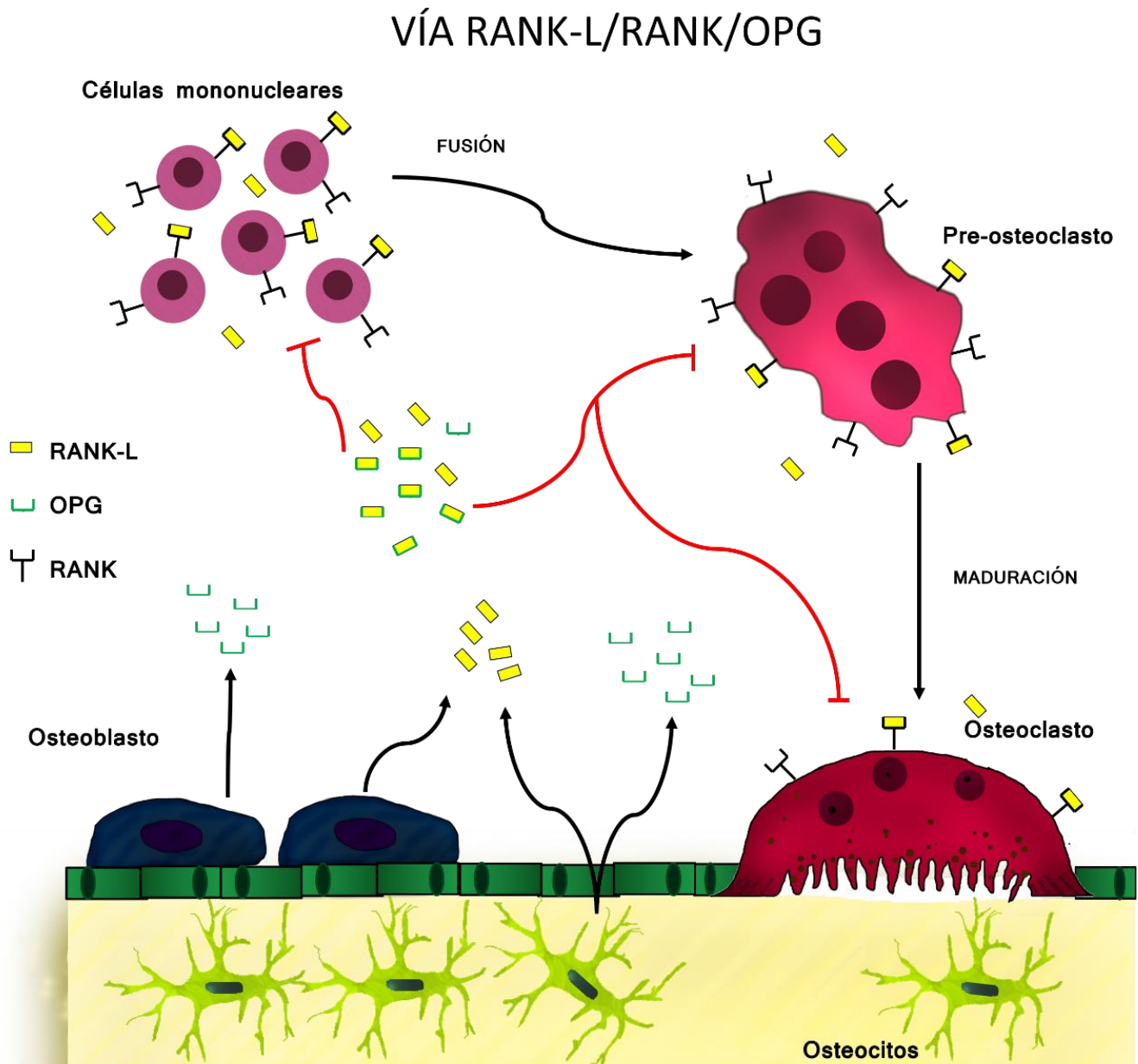
## PROCESO DE FORMACIÓN



**Fig. 2 Proceso de formación ósea.** Esquema en donde se detalla la maduración de los osteoblastos y la formación de la matriz osteoide. El proceso de formación inicia con la maduración de los pre-osteoblastos a osteoblastos inducida por factores de crecimiento. Cuando los osteoblastos están diferenciados, comienzan a sintetizar una matriz orgánica constituida por Col1 y proteínas como la OCN y BSP, que se encargan de nuclear las moléculas de fosfato de calcio para formar y fijar la HAP a la matriz orgánica. Cuando la síntesis de la matriz osteoide finaliza, los osteoblastos se transforman en células del revestimiento o bien, pueden quedar enterrados en el hueso, transformándose en osteocitos que expresan DMP1, el FGF y esclerostina, que controlan la formación de hueso y el metabolismo del fosfato. **IGF-I**: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1; **TGFβ**: factor de crecimiento transformante β; **BMP**: proteína morfogenética ósea; **FGF**: factor de crecimiento de fibroblastos; **PDGF**: factor de crecimiento derivado de plaquetas; **DMP1**: proteína morfogenética de la dentina 1; **BSP**: sialoproteína ósea; **OCN**: osteocalcina; **HAP**: hidroxapatita. **Elaboración propia.**

El proceso de remodelado óseo es regulado principalmente a través de la vía RANK-L/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 los osteoclastos activa su maduración y diferenciación. Por otro lado, también secretan OPG la cual impide que el RANK-L se una a su receptor bloqueando la diferenciación del osteoclasto (3, 4, 6). La pérdida en el balance en la producción de OPG y RANK-L contribuye al desarrollo

de enfermedades óseas como la osteoporosis (15). Esta vía de regulación del remodelado óseo se esquematiza en la figura 3.



**Fig. 3. Vía RANK-L/RANK/OPG.** El RANK-L secretado por los osteocitos y los osteoblastos se une con su receptor en los macrófagos, pre-osteoclastos u osteoclastos, induciendo la fusión, maduración de los precursores de los osteoclastos o activando a los osteoclastos maduros, promoviendo la resorción. Por otro lado, los osteoblastos y osteocitos secretan también OPG, la cual se une al RANK-L impidiendo que este se una con su receptor inhibiendo de esta forma la resorción. **RANK-L:** ligando del receptor activador del factor nuclear; **RANK:** receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$ ; **OPG:** osteoprotegerina. **Elaboración propia.**

## **1.2. Diabetes mellitus.**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por hiperglucemia, resistencia a la insulina y por una deficiencia absoluta o relativa en la secreción de esta hormona (16). Además, se presentan alteraciones en el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y proteínas (17, 18).

La DM es considerada una epidemia a nivel mundial; en el año 2015, se diagnosticaron alrededor de 415 millones de personas con diabetes y tan solo en México en el mismo año, se diagnosticaron alrededor de 11.4 millones de personas diabéticas (19), convirtiéndose en una de las principales preocupaciones del sector salud; ya que además, representa la segunda causa de muerte en nuestro país (20). La DM aumenta el riesgo de desarrollar otros problemas de salud que pueden provocar una discapacidad o la muerte (19), como cardiopatías, retinopatías, neuropatías, osteopatías, falla renal y amputación de las extremidades (21).

De acuerdo con la asociación americana de diabetes (22), 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  $\beta$  pancreáticas y se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina, cetoacidosis e hiperglucemia severa (22). Esta categoría se subdivide en dos grupos:
  - Diabetes autoinmune: caracterizada por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, a la presencia de autoanticuerpos para la insulina, para la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), para las tirosinas fosfatasas IA-2, IA-2b y para el transportador de zinc 8 (ZnT8) de los islotes de Langerhans. También se asocia a genes del antígeno leucocitario humano (ALH) incrementando la respuesta autoinmune y puede desarrollarse debido a factores ambientales aún no definidos (22, 23).
  - Diabetes idiopática: es poco frecuente y se asocia a personas con descendencia africana o asiática. Puede presentarse insulinopenia permanente, cetoacidosis episódica, no se sabe que lo causa, carece de marcadores de autoinmunidad para las células  $\beta$  y no tiene asociación con el ALH (22).

- Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2): representa del 90-95% de las personas con diabetes, se caracteriza por resistencia y deficiencia relativa de insulina y por hiperglucemia. La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes son obesos y con hábitos sedentarios, lo cual provoca el desarrollo de la resistencia a la insulina, el incremento en los niveles de glucosa en sangre y con el paso del tiempo provoca una falla en la función de las células  $\beta$  pancreáticas y el déficit en la producción de la insulina (22, 23).
- Otros tipos específicos de diabetes
  - Defectos genéticos de las células  $\beta$ : se caracteriza por la aparición de hiperglucemia a una edad temprana y por la producción de insulina deteriorada con efectos mínimos o nulos (22).
  - Problemas pancreáticos: cualquier proceso que dañe de forma difusa el páncreas puede causar diabetes tales como pancreatitis, trauma, infección, etc. (22).
  - Endocrinopatías: Varias hormonas (p. ej. 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 regresan a su estado basal (22, 23).
- Diabetes mellitus gestacional: inicia después del tercer trimestre de 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 (22, 24).

### **1.3. Diabetes mellitus y las alteraciones sobre el metabolismo óseo.**

La DM se ha asociado con complicaciones crónicas que afectan a múltiples sistemas incluyendo el hueso (25). Entre las primeras complicaciones esqueléticas provocadas por la DM no controlada incluyen síndrome del pie diabético, artropatía de Charcot, periodontitis, osteopenia y osteoporosis (26). Estas complicaciones pueden ser causadas por la deficiencia y resistencia de insulina, la hiperglucemia, productos finales de glicación avanzada (AGE's), y al incremento en la producción de citocinas y adipocinas (27).

La osteoporosis es la enfermedad ósea metabólica más frecuente en pacientes con DM (26). 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 (28), y se ha mencionado que el 50% de los pacientes con DMT1 desarrollan osteoporosis (29). Por otro lado, los pacientes con DMT2 presentan un incremento de la densidad mineral ósea (DMO) en comparación con los no diabéticos (30); sin embargo, presentan huesos muy frágiles y una mayor incidencia de fracturas que se debe a una disminución de la calidad mineral del hueso y al incremento de AGE's (26, 31).

Se ha propuesto que las alteraciones óseas asociadas a la DMT2 se deben en gran medida al incremento en los niveles de glucosa (31-35), al promover la glicosilación no enzimática de diversas proteínas, principalmente de la colágena tipo 1 (Col1), lo 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 pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y el RANK-L, así como de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que activan e inducen la maduración de los osteoclastos (26, 28, 36).

El incremento en la concentración de glucosa, provoca un aumento en 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 (37). Estas ERO, pueden alterar la actividad osteoblástica a través de una disminución de los marcadores de formación mineral (38), y por otro lado activan a 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 (39).

Otro factor que puede incrementar las complicaciones óseas en pacientes diabéticos es la deficiencia de insulina. En animales de laboratorio, esta deficiencia induce una disminución en la formación de cristales de HAP, en la relación calcio-fosfato y en el IGF-1, lo que podría contribuir al daño óseo (26). Por otro lado, varios estudios sugieren que la DM2 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, mientras que la adiponectina tiene propiedades antiinflamatorias, pero se encuentra disminuida en individuos obesos y diabéticos (26).

#### **1.4. El ácido docosahexaenoico.**

El ácido docosahexaenoico, es un ácido graso poliinsaturado de la familia omega-3 ( $\omega$ -3). Esta familia de ácidos grasos se caracteriza por la presencia de un doble enlace en el tercer carbono desde el extremo metilo terminal y son considerados esenciales, ya que los humanos no poseemos la desaturasa  $\omega$ -3, que es necesaria para añadir un doble enlace en el carbono 15 desde el extremo carboxilo terminal de un ácido graso de cadena larga y por lo tanto no podemos sintetizar el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA; C18: 3  $\Delta$ 9,12,15) que es el precursor de los demás ácidos grasos  $\omega$ -3 (40).

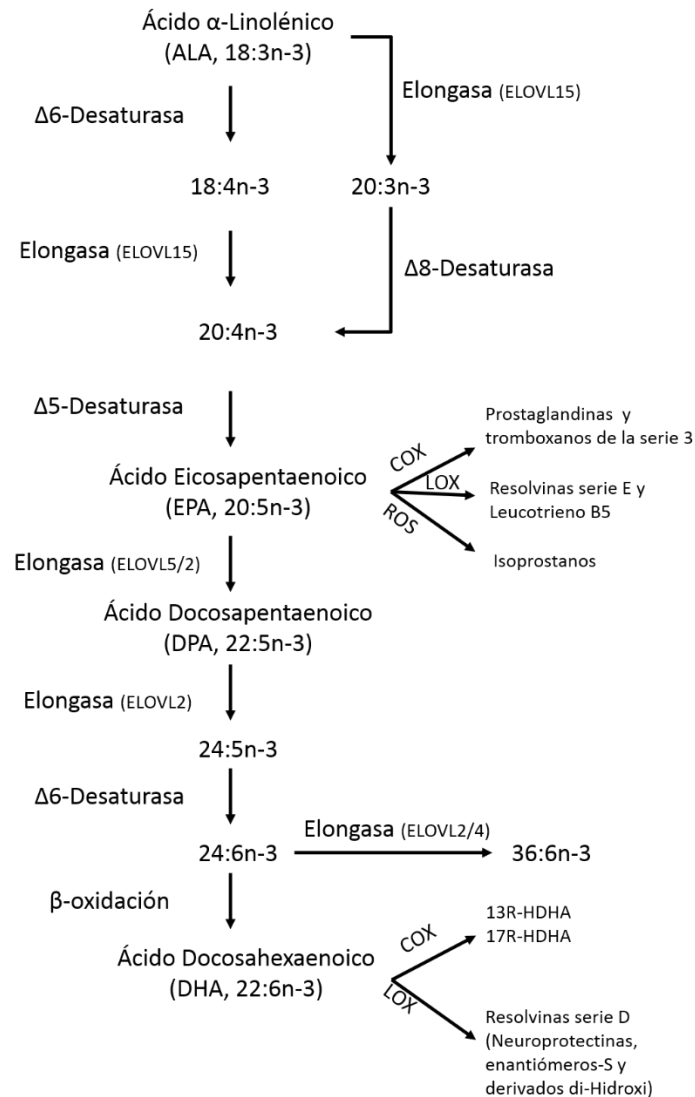
Los ácidos grasos derivados del ALA son el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20: 5  $\Delta$ 5, 8, 11, 14,17), y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22: 6  $\Delta$ 4, 7, 10, 13, 16,19) que son menos abundantes en la dieta, encontrándose principalmente en el aceite de pescado y en unas cuantas semillas (41). El DHA se sintetiza a través de procesos de elongación y desaturación y se metaboliza a través de las vías de la lipooxigenasa (LOX), y ciclooxigenasa (COX) para que se generen docosatrienos, neuroprotectinas y resolvinas de la serie D (Fig. 4), las cuales tienen potentes efectos antiinflamatorios y promueven el correcto funcionamiento del sistema nervioso (SN) (42).

La síntesis de DHA es baja en comparación con otros ácidos grasos poliinsaturados como los del  $\omega$ -6, debido a que existe una competencia por la enzima desaturasa  $\Delta$ 6, de tal manera que una alta ingesta de ácidos grasos  $\omega$ -6 interfiere con la desaturación y elongación del ALA (41, 43).

En los últimos años, el DHA ha tomado importancia terapéutica debido a que su consumo tiene efectos benéficos sobre la salud de diversos sistemas como el nervioso, el cardiovascular y el sistema óseo. Por ejemplo, en el sistema nervioso se ha observado que incrementa su desarrollo en neonatos, puede incrementar la agudeza visual, la diferenciación neuronal, la sinapsis y es capaz de mejorar la salud de pacientes con psicosis, Alzheimer, depresión y retinopatía y neuropatía diabética (44); así mismo, también se han observado efectos benéficos en el sistema cardiovascular, al mejorar la modulación de la función plaquetaria, la función endotelial y la cardiopatía diabética (45).

Con respecto al hueso, se ha observado que puede mejorar la salud general del hueso, incrementando la DMO en humanos (46) y en animales experimentales (47), y mejora el proceso de biomineralización (48); además, se ha asociado con efectos benéficos para el tratamiento de la osteoporosis (49) y la pérdida de hueso alveolar en la enfermedad periodontal (50).

### Metabolismo de los ácidos grasos poli-insaturados $\omega$ -3



**Fig. 4. Metabolismo de los ácidos grasos  $\omega$ -3.** Se esquematiza la síntesis de los AGPI  $\omega$ -3 a través de procesos enzimáticos de desaturación y elongación, así como los principales metabolitos que derivan de cada uno de ellos. **COX:** ciclooxigenasa; **LOX:** lipooxigenasa; **ROS:** especies reactivas de oxígeno. **Modificada de Kruger et al., 2010.**



## 2. ANTECEDENTES

Entre las alteraciones asociadas a la DMT2 y a la hiperglucemia, se encuentra el desarrollo de osteopatías como osteoporosis, osteopenia y la pérdida de hueso alveolar en la periodontitis; por lo que varios estudios, se han enfocado en estudiar las alteraciones que causa el incremento en los niveles de glucosa sobre el metabolismo óseo.

García-Hernández et al., (2012) (39), evaluaron el efecto de concentraciones elevadas de glucosa en la biomineralización y en la expresión de mediadores pro-inflamatorios en células osteoblásticas humanas. Observaron que niveles de glucosa similares a los presentes en pacientes diabéticos crónicos no controlados (24 mM) alteran la síntesis de matriz mineral, al provocar un aumento en el depósito de mineral, con una disminución en la relación Ca/P en los cristales formados disminuyendo su calidad; así mismo, provoca una disminución en la actividad específica de la ALP y un incremento en la expresión del mRNA de IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 y proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1), los cuales están relacionados con el aumento en la reabsorción ósea y en la alteración del proceso de biomineralización, lo que puede repercutir directamente en el desarrollo de osteopatías como la osteoporosis.

Además, el incremento en los niveles de glucosa puede inducir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como la PGE<sub>2</sub>, la cual se ha reportado tiene efectos duales en hueso. Se ha reportado que la administración con 350 nM de PGE<sub>2</sub>, incrementa la actividad de la ALP, la formación de Col1 y la formación de nódulos de mineralización en cultivo primario de osteoblastos de rata (51), y se ha observado que la PGE<sub>2</sub> puede incrementar la osteogénesis y la masa ósea en hueso trabecular en ratas (52, 53).

Por otro lado, la PGE<sub>2</sub> puede incrementar la actividad osteoclástica a través de la inducción de citocinas pro-inflamatorias como el RANK-L y la inhibición en la síntesis de OPG en osteoblastos primarios (54), y se ha reportado que la administración intraperitoneal con 6 mg/Kg de PGE<sub>2</sub> en ratas, incrementa los niveles de OCN en suero, lo cual indica un incremento en la resorción (53).

Con respecto a la matriz orgánica, el incremento en los niveles de glucosa puede alterar la composición de la matriz extracelular. Saito et al., en 2006 (55), reportaron que en huesos de

ratas diabéticas, se presenta un incremento en el entrecruzamiento de la Col1 provocado por la acumulación de AGE's y observaron una marcada disminución en la rigidez y elasticidad de estas fibras en comparación con ratas sanas, lo que puede contribuir a la disminución de la calidad del hueso y el incremento en el riesgo de fractura. Además, McCarthy et al., en 2001 (56), evaluaron los efectos de la incorporación de Col1 glicada sobre la actividad de osteoblastos MC3T3-E1, observando un incremento en la proliferación celular, una disminución en la actividad de la ALP y una alteración en la distribución del mineral depositado. Lo que indica que las alteraciones en la biomineralización provocadas por el incremento en los niveles de glucosa pueden deberse en parte al incremento en la glicación no enzimática de las proteínas de la matriz extracelular, afectando su estructura, su función y su asociación con otras proteínas como la BSP y OCN.

Así mismo, se ha observado que las concentraciones altas de glucosa, también inducen un incremento en la producción de ERO en células mesangiales, epiteliales (57) y en cultivo primario de osteoblastos de rata (58), y se ha propuesto que pueden ser una de las principales causas en las alteraciones sobre la biomineralización, metabolismo de los osteoblastos y en el remodelado óseo, provocadas por las concentraciones altas de glucosa (59, 60).

El incremento de las ERO puede alterar la actividad osteoblástica a través de una disminución de los marcadores de formación mineral como Runx-2, ALP y BSP en osteoblastos MC3T3-E1 (61), y se ha observado en osteoblastos de conejo que el incremento de ERO, reduce la producción de la Col1, inhibe la translocación de Runx2 al núcleo e incrementa la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, asociado a procesos pro-inflamatorios y al incremento en la resorción (62).

Debido a toda esta evidencia acerca de los efectos negativos de las concentraciones altas de glucosa sobre el metabolismo óseo, la matriz orgánica y la matriz mineral, es importante buscar tratamientos que contrarresten estos efectos negativos en el proceso de biomineralización.

En este sentido, el incremento de DHA en la dieta, eleva la densidad mineral en la espina y cadera de pacientes sanos (46), incrementa la densidad ósea en general, y la densidad y el número de trabéculas óseas en ratones (47), además de inducir la maduración de los osteoblastos, reducir su apoptosis y la necrosis del tejido óseo (42, 63).

Así mismo, en la línea celular MC3T3-E1 de osteoblastos de ratón, se observó que el tratamiento con DHA incrementa la formación de nódulos de mineral sin alterar su distribución (48) y que puede inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL1- $\beta$  e IL-6 en células endoteliales y modelos animales (64) y a su vez inducir la producción de IGF-1 que activa directamente la actividad osteoblástica (65-67).

Con respecto al efecto del DHA bajo concentraciones altas de glucosa en el proceso de biomineralización, también se ha observado efectos positivos. En un estudio previo realizado en el laboratorio, observamos que el tratamiento con DHA es capaz de normalizar la formación y distribución de la matriz mineral, la cantidad de calcio depositado y la sobreproducción de ERO en osteoblastos humanos cultivados con 24 mM de glucosa (68).

Es posible que esta normalización en la mineralización sea en parte por un efecto antioxidante; ya que, la disminución del estrés oxidativo juega un papel importante en el proceso de biomineralización y en el metabolismo de los osteoblastos (61). Se ha visto que el DHA tiene un efecto antioxidante a través de la disminución en la despolarización mitocondrial y posiblemente por un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como Glutación peroxidasa (GPx), y superóxido dismutasa (SOD) (69, 70); estas enzimas, pueden verse incrementadas en respuesta a la translocación del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) que activa la transcripción del elemento de respuesta antioxidante (ARE) que es el principal mecanismo antioxidante de las células. En células endoteliales de humano, se observó que el tratamiento con 100  $\mu$ M de DHA incrementa la expresión proteica del NRF2 y su acumulación en el núcleo, aumenta la transcripción del ARE y el mRNA y la producción proteica de la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1) (71).

Sin embargo, aún se desconoce el efecto del DHA sobre la calidad del mineral depositado, su efecto sobre los marcadores de biomineralización y sobre la síntesis de las proteínas que forman la matriz orgánica con concentraciones altas de glucosa, y si es a través de los mecanismos antioxidantes, que lleva a cabo los efectos normalizadores que observamos previamente (68).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las patologías óseas en los pacientes con DM2, son una de las complicaciones que se presentan con frecuencia en estos pacientes, provocando un riesgo a la salud y la disminución en la calidad de vida. Se ha demostrado que el incremento en los niveles de glucosa afecta el metabolismo óseo y el proceso de biomineralización a través de la inducción de un estado inflamatorio y oxidante. El DHA ha mostrado tener efectos positivos en el metabolismo óseo, en el proceso de biomineralización y se ha visto que tiene potentes efectos antiinflamatorios y antioxidantes, por lo cual podría reducir el desarrollo de las osteopatías diabéticas. Previamente como primer acercamiento, observamos en un cultivo primario de osteoblastos humanos, que el tratamiento con DHA normaliza la biomineralización, el depósito de calcio y la sobreproducción de ERO en combinación con 24 mM de glucosa; sin embargo, aún desconocemos si el DHA tiene algún efecto sobre la calidad de los cristales depositados, la síntesis de matriz orgánica y a través de qué mecanismos reduce el estrés oxidativo en los osteoblastos. Por lo que es importante caracterizar los efectos de DHA sobre las alteraciones que causan las concentraciones altas de glucosa en la biomineralización, para poder determinar si puede mejorar el proceso de formación y poder utilizarlo como un tratamiento adyuvante eficaz para las osteopatías asociadas a diabetes.

## **4. HIPÓTESIS**

El ácido docosahexaenoico contrarresta las alteraciones provocadas por una concentración alta de glucosa en la síntesis de la matriz extracelular, la matriz mineral y la calidad de los cristales depositados y es capaz de inducir los mecanismos celulares antioxidantes.

## 5. OBJETIVOS

### General:

Determinar los efectos del DHA sobre las alteraciones causadas por una concentración alta de glucosa en la síntesis de matriz orgánica, el proceso de biomineralización y los mecanismos antioxidantes en células osteoblásticas humanas.

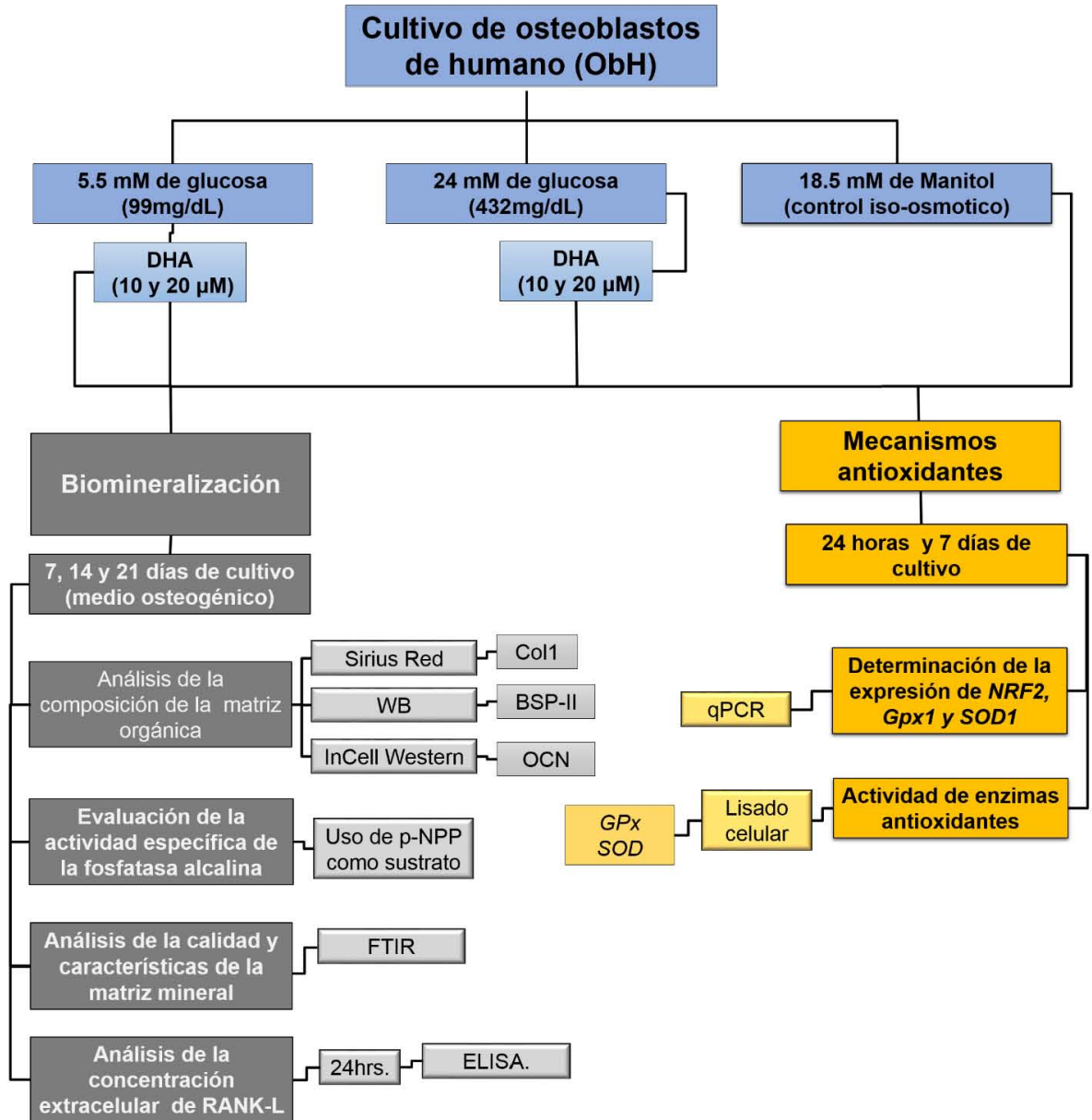
### Específicos

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

1. Analizar la producción proteica de la Col1, BSP-II y OCN en la matriz extracelular.
2. Evaluar la actividad específica de la ALP.
3. Analizar la calidad del cristal depositado y la mineralización de la matriz orgánica.
4. Cuantificar la concentración extracelular del RANK-L.
5. Cuantificar la expresión relativa de *NRF2*.
6. Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD.
7. Cuantificar la expresión relativa de las enzimas antioxidantes *GPx* y *SOD*.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se diseñó una estrategia experimental en donde se resumen los métodos utilizados para la obtención de resultados (Fig. 6).



**Fig. 5.** Esquemización de la estrategia experimental utilizada para la obtención de resultados. **Col1**: Colágena tipo 1; **BSP-II**: sialoproteína ósea tipo 2; **OCN**: osteocalcina; **p-NPP**: p-Nitrofenil fosfato; **FTIR**: espectroscopia infrarroja transformada de Fourier; **WB**: western blot; **ELISA**: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; **qPCR**: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; **NRF2**: Factor nuclear eritroide 2; **GPx**: glutatión peroxidasa; **SOD**: superóxido dismutasa.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. *Cultivo Celular.*

Los experimentos se realizaron en una línea celular de osteoblastos fetales de humano hFOB 1.19 (ATCC, CRL-11372). Las células fueron cultivadas con medio de Eagle modificado por Dulbecco con 5.5 mM 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, estreptomycin 100µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

### 7.2. *Condiciones de cultivo.*

Para los experimentos se utilizaron células en el tercer y cuarto pasaje y se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire, 5% CO<sub>2</sub> 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 niveles altos de glucosa similares a los observados en la DMT2 crónica no controlada. En concreto, la concentración normal de glucosa es de 5.5 mM equivalente a 99 mg/dl, y la concentración alta es de 24 mM equivalente a 432 mg/dl. Las células fueron cultivadas en DMEM-LG que contiene los niveles fisiológicos de glucosa (5.5 mM) o en DMEM-LG adicionado con 18.5 mM de D-glucosa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), para alcanzar una concentración final de 24 mM. Cada concentración de glucosa se combinó además con 10 o 20 µM de DHA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.). Se usó DMEM-LG suplementado con 18.5 mM de manitol (Man) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), como grupo control iso-osmolar con respecto al grupo con glucosa alta. Como control negativo para la generación de ERO se usó el antioxidante Trolox (30 µM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.).

El DHA se solubilizó en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), 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 48 h. La adición del DHA al medio se realizó al momento del cambio para evitar su oxidación.

Se indujo la formación de matriz mineral con medio osteogénico (DMEM-LG suplementado con



SFB al 10% más 50 mg/mL de ácido ascórbico y 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato).

### **7.3. Análisis de la expresión proteica de Col1, OCN y BSP-II en la matriz mineralizada.**

Se determinó la expresión de la Col1 a través de una tinción con rojo sirio pícrico de acuerdo con lo reportado anteriormente (72, 73). Se sembraron  $8 \times 10^4$  células por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos y se mantuvieron con medio DMEM-LG hasta alcanzar la semi-confluencia. Posteriormente se cultivaron con medio osteogénico con 5.5 mM o 24 mM de glucosa y su combinación con DHA (10 o 20  $\mu$ M) durante 7, 14 y 21 días de cultivo. Como control negativo, los osteoblastos se cultivaron sin medio osteogénico. Pasado el tiempo de cultivo, se fijó la monocapa con solución de Bouin (ácido pícrico saturado, formol y ácido acético a una relación 15:5:1 respectivamente) durante 1 h, a temperatura ambiente. Se realizaron lavados repetidos con agua destilada y los pozos se dejaron secar. Posteriormente, se tiñó la monocapa con una solución 1:1 de "Direct red 80" (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), en una solución saturada de ácido pícrico. Se realizaron lavados repetidos con HCl al 0.01 N y se dejaron secar por inversión. Se tomaron micrografías de cada uno de los tratamientos con una magnificación de 10X con un microscopio invertido marca Zeiss (Alemania).

La expresión de OCN se determinó por InCell western. Previamente, se sembraron  $2 \times 10^4$  células por pozo, en cajas de cultivo celular de 96 pozos y se mantuvieron con medio DMEM-LG hasta alcanzar la semi-confluencia. Pasado este tiempo, las células se cultivaron con medio osteogénico con 5.5 mM o 24 mM de glucosa y su combinación con DHA (10 o 20  $\mu$ M) durante 7, 14 y 21 días de cultivo. Se fijó la monocapa celular con etanol al 70% hasta su evaporación. Se bloqueó la inespecificidad con 5% de albumina sérica de bovino (BSA) en amortiguador salino de fosfatos (PBS) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de esto se realizaron lavados repetidos con amortiguador de lavado (0.1% tween 20X en PBS 1X), y se incubó con un anticuerpo policlonal anti-OCN (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU. sc-18319), hecho en chivo a una concentración 1:100 en tris-buffer salino con tween 20X (TBS-T) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron lavados repetidos con amortiguador de lavado y se incubó con un anticuerpo secundario IRDye 680RD anti-chivo IgG (Li-Cor, Lincoln, NB, EE. UU.), a una concentración 1:500 durante 1 h a temperatura ambiente. Como control negativo de unión, se utilizó una monocapa celular incubada solo con el

anticuerpo secundario. La unión se reveló en un escáner infrarrojo (Odyssey CLx Li-Cor, Lincoln, NB, EE. UU.). La intensidad media de fluorescencia se cuantificó con el “software” ImageJ ver. 1.50i. A todos los grupos experimentales se les restó la intensidad media de fluorescencia obtenida del control negativo.

La expresión proteica de BSP-II se determinó por “Western blot” (WB). Para esto se sembraron  $4 \times 10^5$  células por caja en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Las células se mantuvieron con medio DMEM-LG hasta alcanzar la semi-confluencia y se cultivaron con medio osteogénico con 5.5 mM o 24 mM de glucosa y su combinación con DHA (10 o 20 μM) durante 7, 14 y 21 días de cultivo. Posteriormente la monocapa celular se liso con amortiguador de lisis (20 mM HEPES, 1 mM EGTA, 210 mM manitol y 70 mM sacarosa, pH 7.2), y los lisados se centrifugaron a 2890 rpm 5 minutos, el sobrenadante se recuperó y se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Bradford (74). Se tomaron 2 μg de proteínas del lisado total, se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se bloqueó la unión inespecífica con leche al 6% durante 1 h. Después de esto, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo de conejo anti-BSP-II (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU. sc-292393), a una concentración 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario obtenido de chivo conjugado a un fluoróforo con un rango de excitación en el espectro infrarrojo: IRDye 800CW anti-conejo IgG (Li-Cor, Lincoln, NB, EE. UU.). La unión se reveló en un escáner infrarrojo (Odyssey CLx Li-Cor, Lincoln, NB, EE. UU.), se detectó la BSP-II en un peso aproximado de 80 kDa y se cuantificó la expresión de las proteínas por densitometría de imagen en el “software” ImageJ ver. 1.50i. Como control de carga se utilizaron las membranas resultantes de la electro-transferencia teñidas con rojo Ponceau. Como control metodológico, se utilizó a la proteína externa protoxina Cry1Ac con un peso aproximado de 130 kDa, la cual fue agregada a los lisados celulares de cada uno de los grupos experimentales para asegurar que utilizáramos la misma concentración de proteína y descartar que los resultados se vieran alterados por algún error de carga o por la electro-transferencia.

#### **7.4. Evaluación de la actividad específica de la fosfatasa alcalina.**

Se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células por pozo en cajas de cultivo celular de 6 pozos. Las células se trataron con medio osteogénico con 5.5 mM o 24 mM de glucosa y su combinación con DHA (20  $\mu$ M) durante 7 y 14 días de cultivo. Se extrajo la monocapa celular y la matriz mineral con amortiguador de lisis con 10 mM de TrisHCL y 0.1% de tritón X-100, pH 7.4. Las proteínas se separaron con filtros de ultra centrifugación para proteínas >100 KDa (Ammicon Ultra, EMD Millipore, Temecula, CA, EE. UU.). La actividad enzimática se evaluó en la fracción proteica >100 kDa debido a que la fosfatasa alcalina específica de hueso en humanos tiene un peso aproximado de 140 kDa (75). La concentración de proteínas se cuantificó según el método modificado de Lowry (76). La actividad enzimática se evaluó usando 24  $\mu$ g/mL de proteína total con el kit comercial QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay (Bio Assay Systems, Hayward, CA, EE. UU.), usando como sustrato 10 mM de p-Nitrofenilfosfato (pNPP) en una solución con 5 mM de acetato de magnesio en un ambiente alcalino (pH 10.5). Las muestras se leyeron en un lector de placas a 405 nm durante 3 lapsos de 4 minutos cada uno.

#### **7.5. Análisis de las características de la matriz mineral y maduración de los cristales de fosfato de calcio por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR).**

Se sembraron  $8 \times 10^4$  células por pozo en cajas de cultivo celular de 12 pozos. Las células se cultivaron con DMEM-LG hasta alcanzar la semi confluencia. Posteriormente, las células se cultivaron con medio osteogénico con 5.5 mM o 24 mM de glucosa y su combinación con DHA (10 o 20  $\mu$ M) durante 21 días de cultivo. Posteriormente, la matriz mineral se fijó con etanol al 70%. Se desprendió y pulverizó la totalidad de la matriz mineral y las muestras se analizaron en un espectrómetro infrarrojo (FT-IR Spectrum One, Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.), y se obtuvieron los espectros en porcentaje de transmitancia y desplazamiento en  $\text{cm}^{-1}$ . Los histogramas fueron analizados con el “software” essential FTIR Spectroscopy Toolbox 3.5 (Operant LLC, Madison, WI, EE. UU.). A todos los histogramas se les calculó la doble derivada y se corrigieron a la línea base. Posteriormente, se buscaron las bandas de interés correspondientes al grupo  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ , Amida I, Amida III,  $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{CH}_2$  y se realizó un análisis de integración del desplazamiento característico de cada grupo funcional de acuerdo con lo reportado en la literatura (77) (Tabla 1). Se determinó la sustitución de carbonatos al calcular el

radio de las bandas  $850-890\text{cm}^{-1}/900-1200\text{cm}^{-1}$  y la mineralización relativa al calcular el radio entre las bandas:  $900-1200\text{cm}^{-1}/1250-1370$ ,  $900-1200\text{cm}^{-1}/1380-1450\text{cm}^{-1}$  y  $900-1200\text{cm}^{-1}/1600-1700\text{cm}^{-1}$ .

**Tabla 1.** Desplazamiento FTIR característico para los grupos funcionales representativos de muestras de hueso y matriz mineral.

<b>Desplazamiento FTIR (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Grupo funcional característico</b>
<b>850-890</b>	$\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ (carbonatos)
<b>900-1200</b>	$\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (fosfatos)
<b>1020</b>	Apatita no estequiométrica
<b>1030</b>	Apatita estequiométrica
<b>1250-1370</b>	Amida III
<b>1380-1450</b>	$\text{CH}_2$ wag
<b>1600-1700</b>	Amida I
<b>1660</b>	Amida I (triple hélice)
<b>1690</b>	Amida I (doble hélice)

### **7.6. Determinación de la concentración extracelular de RANK-L.**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo en cajas de cultivo celular de 12 pozos. Al siguiente día las células fueron cultivadas con medio DMEM sin rojo fenol con 5.5 mM o 24 mM de glucosa y/o su combinación con 10 o 20  $\mu\text{M}$  de DHA y se dejaron incubar por 24 h. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de RANK-L. El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se realizó de acuerdo con las especificaciones técnicas del kit “RANKL (total), soluble (human) ELISA kit” (Enzo life sciences, Farmingdale, NY, EE. UU.).

### 7.7. Determinación de la expresión genética del factor de transcripción NRF2 y las enzimas antioxidantes SOD-1 y GPx-1.

Se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células por caja, en cajas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>. Posteriormente las células se trataron con medio DMEM sin rojo fenol con 5.5 mM o 24 mM de glucosa y/o su combinación con 10 o 20 μM de DHA y se mantuvieron durante 24 horas y 7 días de cultivo. Se utilizaron como controles positivos en la generación de estrés oxidativo 0.1 y 0.2% de peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y 1 y 5% de DMSO como control positivo para la formación de anión superóxido. Se extrajo el RNA de acuerdo con el método de Trizol (78). Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con el kit “Maxima SYBR-Green/ROX qPCR Master Mix” (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU.), y se determinó la expresión del mRNA del gen que codifica para NRF2, SOD-1 y GPx-1. Se utilizó como gen de referencia la expresión del mRNA de la subunidad ribosomal 18’S.

La secuencia de los oligonucleótidos, las temperaturas de alineación y las condiciones bajo las que se realizó el análisis de PCR se describen en la tabla 2.

Se calculó expresión de los genes de interés con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

**Tabla 2.** Secuencias de oligonucleótidos para PCR utilizados para la determinación de la expresión de NRF2, SOD-1 y GPx-1.

Nombre	Secuencia 5’–3’	Tm	Tamaño del producto (pb)	No. de acceso Gen Bank
NRF2	F: GGCTACGTTTCAGTCACTTG	58.5 °C	180	NM_001313904.1
	R: AACTCAGGAATGGATAATAG			
SOD-1	F: ACAGCAGGCTGTACCAAGTGC	60.5 °C	102	NM_000454.4
	R: CACATTGCCCAAGTCTCCAA			
GPx-1	F: CGCCAAGAACGAAGAGATTC	57.5 °C	224	NM_000581
	R: CAACATCGTTGCGACACAC			
18’s Rib	F: GGGAGCCTGAGAAACGGC R: GGGTCGGGAGTGGGTAATTT	60°C	93	NR_003286.2

F: forward

R: reverse

### **7.8. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD.**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo en cajas de cultivo celular de 12 pozos. Al siguiente día las células de uno de los pozos fueron pre-tratadas con  $30 \mu\text{M}$  de Trolox (antioxidante) durante 1 hora como control negativo en la generación de ERO. Posteriormente las células se trataron con medio DMEM sin rojo fenol con  $5.5 \text{ mM}$  o  $24 \text{ mM}$  de glucosa y/o su combinación con  $10$  o  $20 \mu\text{M}$  de DHA y se mantuvieron durante 24 horas y 7 días de cultivo. Como control positivo en la generación de anión superóxido se utilizó 1 y 5% de DMSO y como control positivo en la actividad de la GPx se utilizó  $0.1$  y  $0.2 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Posteriormente, la monocapa celular se liso con amortiguador de lisis y se evaluó la actividad enzimática de acuerdo con las especificaciones técnicas de cada kit. Para la GPx se utilizó el kit comercial “Glutathione peroxidase assay kit” (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.), y para la SOD el kit comercial “superoxide dismutase assay kit” (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

### **7.9. Análisis estadístico.**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se analizó la distribución de los datos y se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 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  $5.5 \text{ mM}$  de glucosa y  $\#p \leq 0.05$  o  $\#\#p \leq 0.001$  cuando se compararon con el grupo con  $24 \text{ mM}$  de glucosa.

## 8. RESULTADOS

### **8.1. *El tratamiento con 10 $\mu$ M de DHA disminuye la sobreproducción de la Col1 provocada por la concentración alta de glucosa y mejora su distribución.***

Se analizó la producción y distribución de la Col1, que participa como un andamio orgánico en donde se depositan las moléculas de fosfato de calcio y en donde se lleva a cabo la nucleación de los cristales, siendo fundamental en la organización y crecimiento de los cristales de HAP y por lo tanto en la micro arquitectura y resistencia ósea (79).

Los resultados mostraron que en condiciones de normo-glucosa, la Col1 se distribuye de manera uniforme en la matriz extracelular a los 7 días de cultivo y que la concentración se incrementa de manera dependiente al tiempo, observándose a los 21 días la formación de cúmulos fuertemente teñidos en comparación con los 7 días de cultivo (Fig. 6). Cuando tratamos a las células bajo condiciones de normo-glucosa con 10  $\mu$ M de DHA, observamos un comportamiento muy similar al control en los tres tiempos evaluados. Mientras que el tratamiento con 20  $\mu$ M de DHA mostró un comportamiento similar al control a los 7 y 14 días de cultivo, pero a los 21 días incrementó la concentración de la Col1 (Fig. 6).

Cuando cultivamos a los osteoblastos con 24 mM de glucosa, observamos un aumento importante en la producción de Col1 con un cambio evidente en la distribución en comparación con el control de normo-glucosa desde los 7 días de cultivo. Estas alteraciones se incrementaron a los 14 días y para los 21 días de cultivo observamos una distribución completamente desordenada con una formación de cúmulos muy densamente teñidos (Fig. 6).

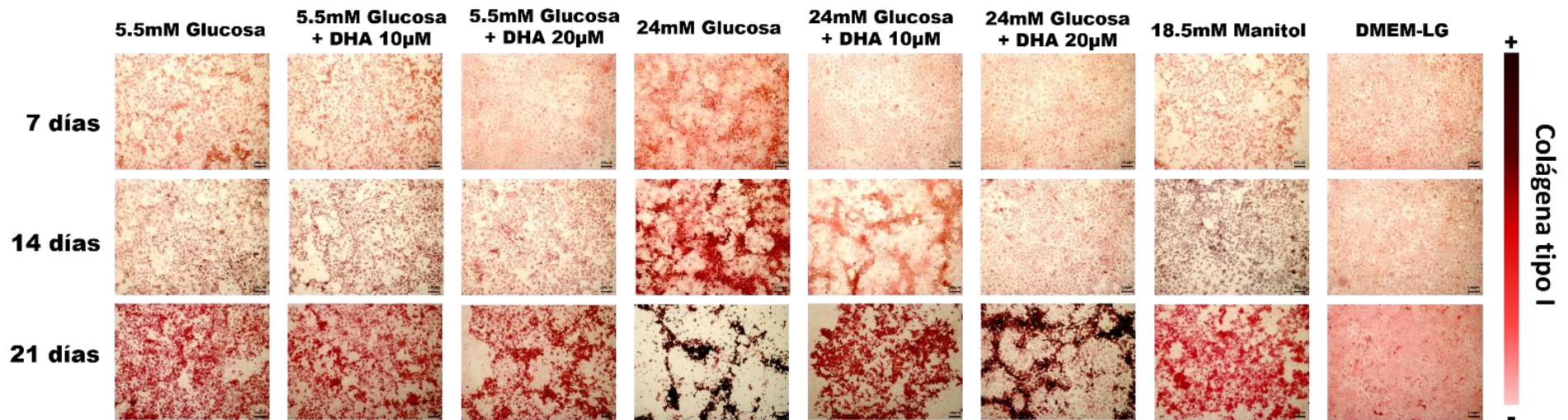
Sin embargo, cuando tratamos las células cultivadas con la concentración alta de glucosa con 10  $\mu$ M de DHA, hubo una disminución en la sobreproducción de la Col1 y una distribución más uniforme desde los 7 días. Esta disminución fue dependiente del tiempo; ya que para los 21 días observamos un comportamiento similar al control de normo-glucosa tanto en la concentración de la Col1 como en su distribución.

Por otro lado, el tratamiento con 20  $\mu$ M de DHA, mostro un comportamiento más similar al control a los 7 y 14 días; sin embargo, a los 21 días de cultivo, hubo un incremento en la producción de Col1 en comparación con el control de normo-glucosa con núcleos densamente

teñidos, aunque con una distribución más uniforme en comparación con el grupo con 24 mM de glucosa (Fig. 6).

El control iso-osmótico con 18.5 mM de manitol se comportó similar al control de normo-glucosa y el control negativo con medio no osteogénico (ver materiales y métodos), mostró una menor concentración con respecto al control de normo-glucosa con una distribución uniforme en los tres tiempos evaluados (Fig. 6).





**Fig. 6. Efecto del DHA en la concentración y distribución de la colágena tipo I con diferentes concentraciones de glucosa.** Se cultivaron a los osteoblastos con medio osteogénico durante 7, 14 y 21 días de cultivo y se tiñeron con el colorante rojo sirio púrico para teñir la Col1. Se muestran micrografías representativas de tres ensayos independientes de los 7, 14 y 21 días de cultivo a una magnificación de 10X.

## **8.2. El tratamiento con 10 $\mu$ M de DHA disminuye la sobreproducción de OCN provocada por la concentración alta de glucosa a los 21 días de cultivo.**

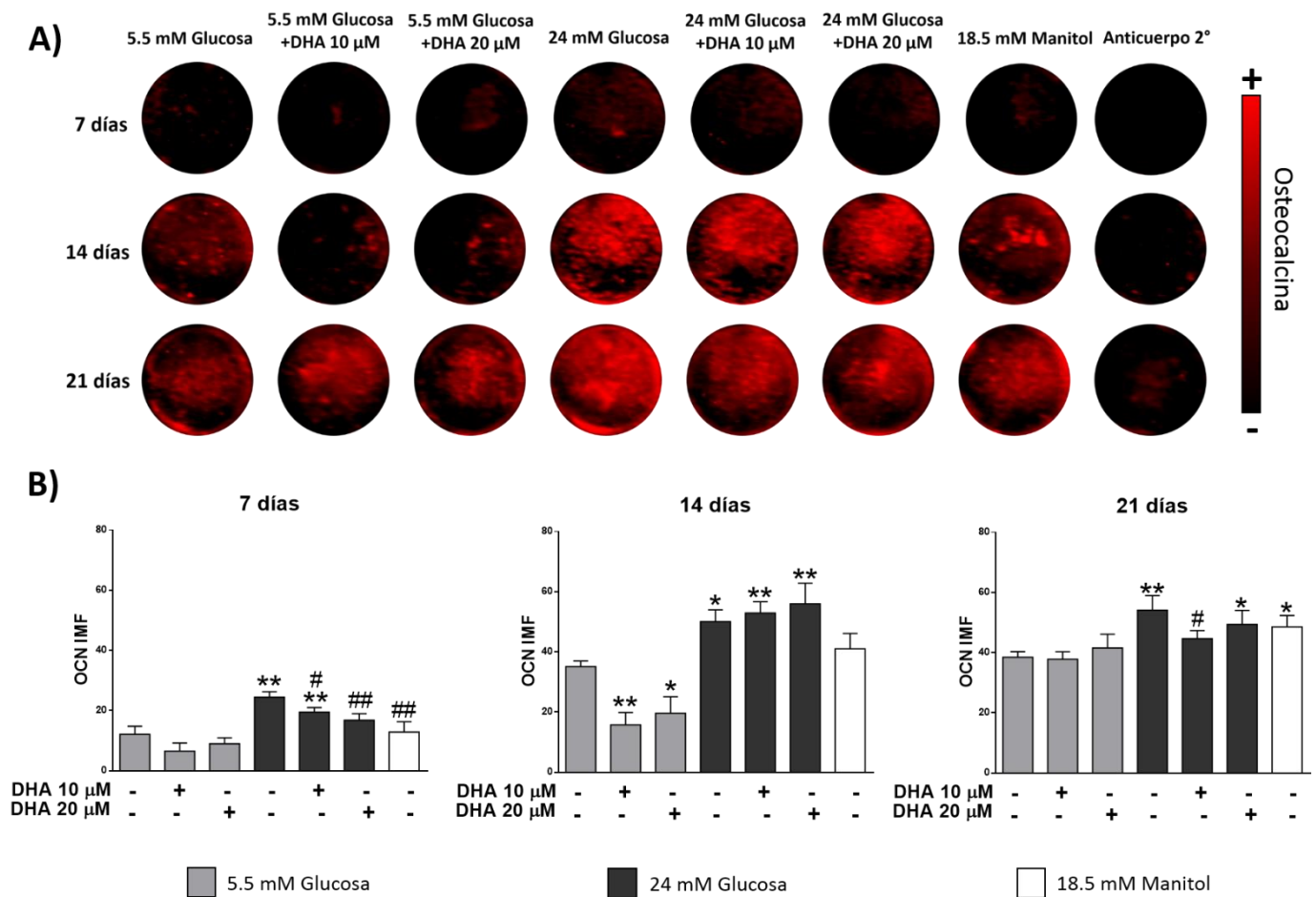
Posteriormente, se determinó la producción de OCN, que participa en la unión de las moléculas de HAP, debido a su alta afinidad por el calcio y se ha descrito que regula el tamaño y la nucleación de los cristales de HAP, además de participar en el anclaje de estos cristales a la matriz de colágena (80).

Los resultados obtenidos por “InCell Western”, mostraron que, en condiciones de normo-glucosa se incrementa la producción de OCN conforme avanza el tiempo de cultivo, observando una mayor concentración de proteína a los 21 días de cultivo, en comparación con los 7 días (21d:  $38.47 \pm \text{SD } 1.82$  vs. 7d:  $12.13 \pm \text{SD } 2.6$ , IMF) (Fig. 7). Cuando tratamos a las células con 10 o 20  $\mu$ M de DHA bajo condiciones de normo-glucosa, no encontramos diferencias significativas en la producción de la proteína a los 7 y 21 días de cultivo en comparación con el grupo cultivado solo con normo-glucosa, aunque disminuyó a los 14 días de cultivo (Fig. 7).

El cultivo con 24 mM de glucosa, incrementó significativamente en la producción de OCN en comparación con el control de normo-glucosa (glucosa alta:  $54.1 \pm \text{SD } 4.8$  vs. normo-glucosa:  $38.47 \pm \text{SD } 1.82$ , IMF), observándose este mismo comportamiento en los tres tiempos evaluados (Fig. 7).

Al tratar a las células con DHA y 24 mM de glucosa, observamos que a los 7 días existe una disminución significativa en la expresión de OCN en comparación con la concentración alta de glucosa (DHA:  $19.49 \pm \text{SD } 1.5$  vs. glucosa alta:  $24.4 \pm \text{SD } 1.8$ , IMF), aunque solo la concentración de 20  $\mu$ M de DHA ( $16.8 \pm \text{SD } 2.1$ , IMF), se comportó de manera similar al control de normo-glucosa ( $12.13 \pm \text{SD } 2.6$ , IMF). A los 14 días de cultivo, distinguimos un incremento similar al presentado por el grupo solo con 24 mM de glucosa para ambas concentraciones de DHA (10  $\mu$ M:  $52.9 \pm \text{SD } 3.73$ ; 20  $\mu$ M:  $55.98 \pm \text{SD } 6.8$  vs. glucosa alta:  $50.03 \pm \text{SD } 3.9$ , IMF); el tratamiento con 10  $\mu$ M de DHA a los 21 días ( $44.6 \pm \text{SD } 2.7$ , IMF), mostró un comportamiento similar al grupo control de normo-glucosa ( $38.47 \pm \text{SD } 1.82$ , IMF), mientras que el tratamiento con 20  $\mu$ M ( $49.37 \pm \text{SD } 4.64$ , IMF), se mantuvo similar al grupo con alta glucosa ( $54.1 \pm \text{SD } 4.8$ , IMF) (Fig. 7).

El control iso-osmótico con 18.5mM de manitol se comportó similar al control de normo-glucosa a los 7 (12.84 ± SD 3.45, IMF), y 14 días (41.01 ± SD 5.09, IMF), pero mostró un incremento a los 21 días de cultivo (48.52 ± SD 3.8, IMF) (Fig. 7).



**Fig. 7. Efecto del DHA en la producción de OCN con diferentes concentraciones de glucosa.** Resultados inmunodetección de OCN a los 7, 14 y 21 días de cultivo. A) imágenes representativas de la concentración de OCN de los diferentes tratamientos obtenidas por InCell Western. B) gráficos de barras que representan la media ± SD de la intensidad media de fluorescencia de tres ensayos independientes, en donde \*P ≤ 0.05% y \*\*P ≤ 0.01% cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y #P ≤ 0.05% y ##P ≤ 0.01% cuando los grupos se compararon con el grupo con la concentración alta de glucosa (24 mM Gluc.).

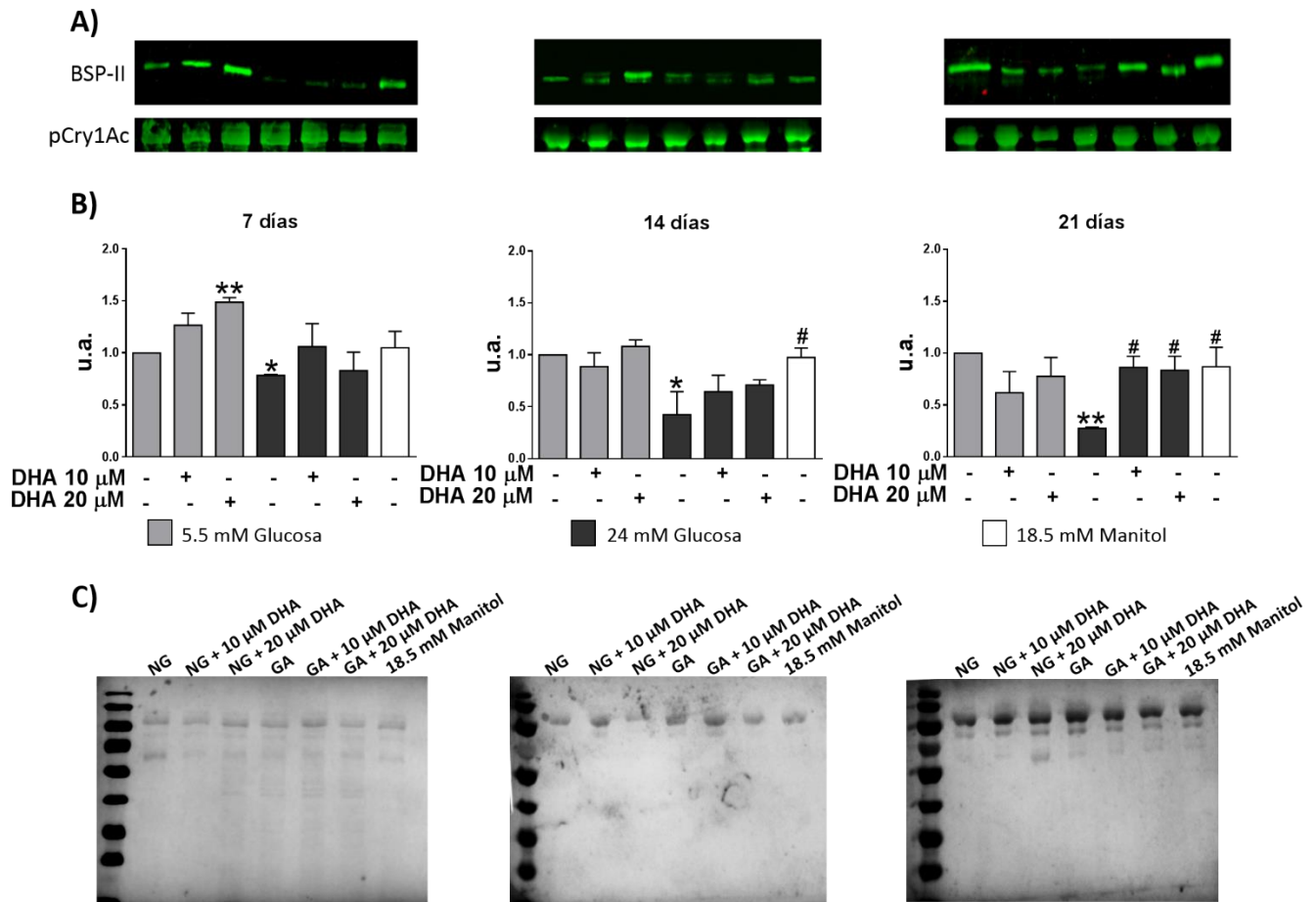
### **8.3. El tratamiento con DHA incrementa la producción de BSP-II disminuida por la concentración alta de glucosa.**

Se analizó el efecto del DHA sobre la expresión proteica de la BSP-II a los 7, 14 y 21 días de cultivo por medio de “Western blot”, debido a que esta proteína participa en la formación de los cristales de HAP y en el anclaje de estos cristales a la matriz orgánica (81).

Encontramos que el tratamiento con 10  $\mu$ M de DHA bajo condiciones de normo-glucosa no altera la producción de BSP-II en los tres tiempos evaluados, mientras que con 20  $\mu$ M de DHA se observó un incremento significativo a los 7 días de cultivo ( $1.48 \pm \text{SD } 0.04$ , U.A.), pero a los 14 y 21 días mostró un comportamiento similar al grupo control de normo-glucosa (14d:  $1.08 \pm \text{SD } 0.06$ ; 21d:  $0.77 \pm \text{SD } 0.18$ , u.a.) (Fig. 8).

El cultivo sólo con 24 mM de glucosa provocó una disminución importante en la producción de BSP-II desde los 7 días ( $0.78 \pm \text{SD } 0.008$ , u.a.) que continuó disminuyendo hasta los 21 días de cultivo ( $0.27 \pm \text{SD } 0.01$ , u.a.) (Fig. 8). Sin embargo, el tratamiento con DHA (10 y 20  $\mu$ M) bajo esta concentración de glucosa, incrementó de manera significativa la expresión de la BSP-II (10  $\mu$ M:  $0.86 \pm \text{SD } 0.1$ ; 20  $\mu$ M:  $0.83 \pm \text{SD } 0.13$ , u.a.), en comparación con el grupo cultivado solo con 24 mM de glucosa ( $0.27 \pm \text{SD } 0.01$ , u.a.), mostrando un comportamiento similar al control de normo-glucosa a los 21 días de cultivo (Fig. 8).

El grupo iso-osmolar con 18.5 mM de manitol no mostró diferencias significativas en comparación al grupo de normo-glucosa (Fig. 8).

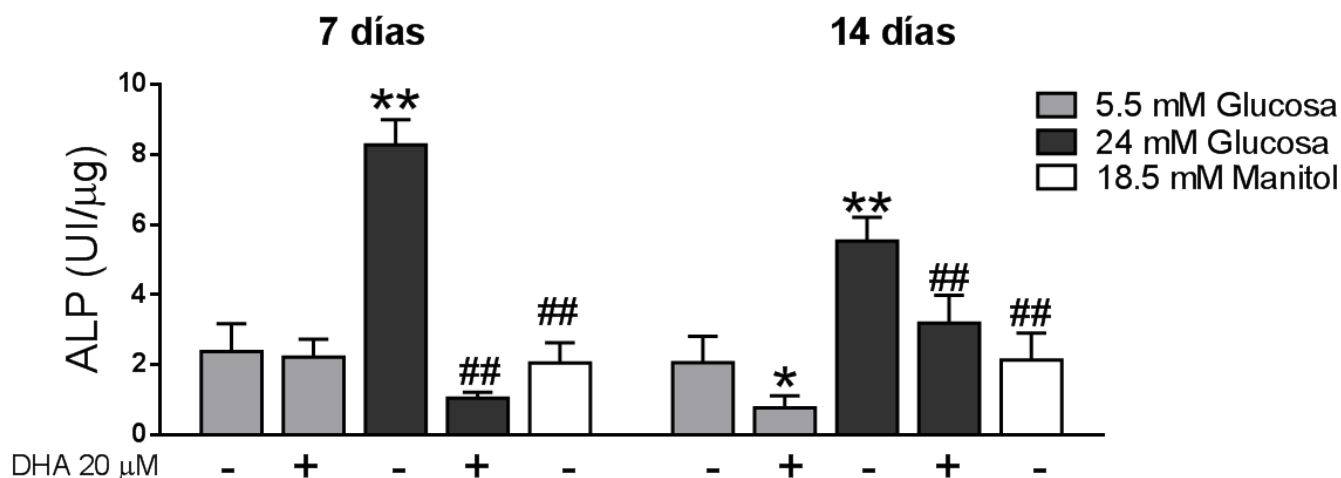


**Fig. 8. Efecto del DHA en la producción de BSP-II con diferentes concentraciones de glucosa.** Inmunoblot de BSP-II detectada por infrarrojo a los 7, 14 y 21 días de cultivo. A) imágenes representativas de los resultados de la expresión de BSP-II y de la protoxina Cry1Ac como control de carga obtenidos por WB. B) resultados obtenidos por densitometría de imagen de la expresión de BSP-II normalizados con respecto al control de normo-glucosa de tres ensayos independientes expresados en unidades arbitrarias (u.a.). C) Imágenes representativas de las membranas de nitrocelulosa teñidas con rojo Ponceau utilizadas como control de carga. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD en donde \* $P \leq 0.05\%$  y \*\* $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y # $P \leq 0.05\%$  y ## $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el grupo con la concentración alta de glucosa (24 mM Gluc.). **NG:** normo-glucosa (5.5 mM); **GA:** glucosa alta (24 mM).

#### 8.4. El DHA atenúa la actividad específica de la ALP incrementada por la concentración alta de glucosa.

Se determinó el efecto del DHA sobre la actividad específica de la ALP, la cual es un marcador de la biomineralización, se encarga de liberar los grupos fosfato para la síntesis de las moléculas de HAP y es un marcador de diferenciación osteoblástica y de síntesis de matriz mineral (82).

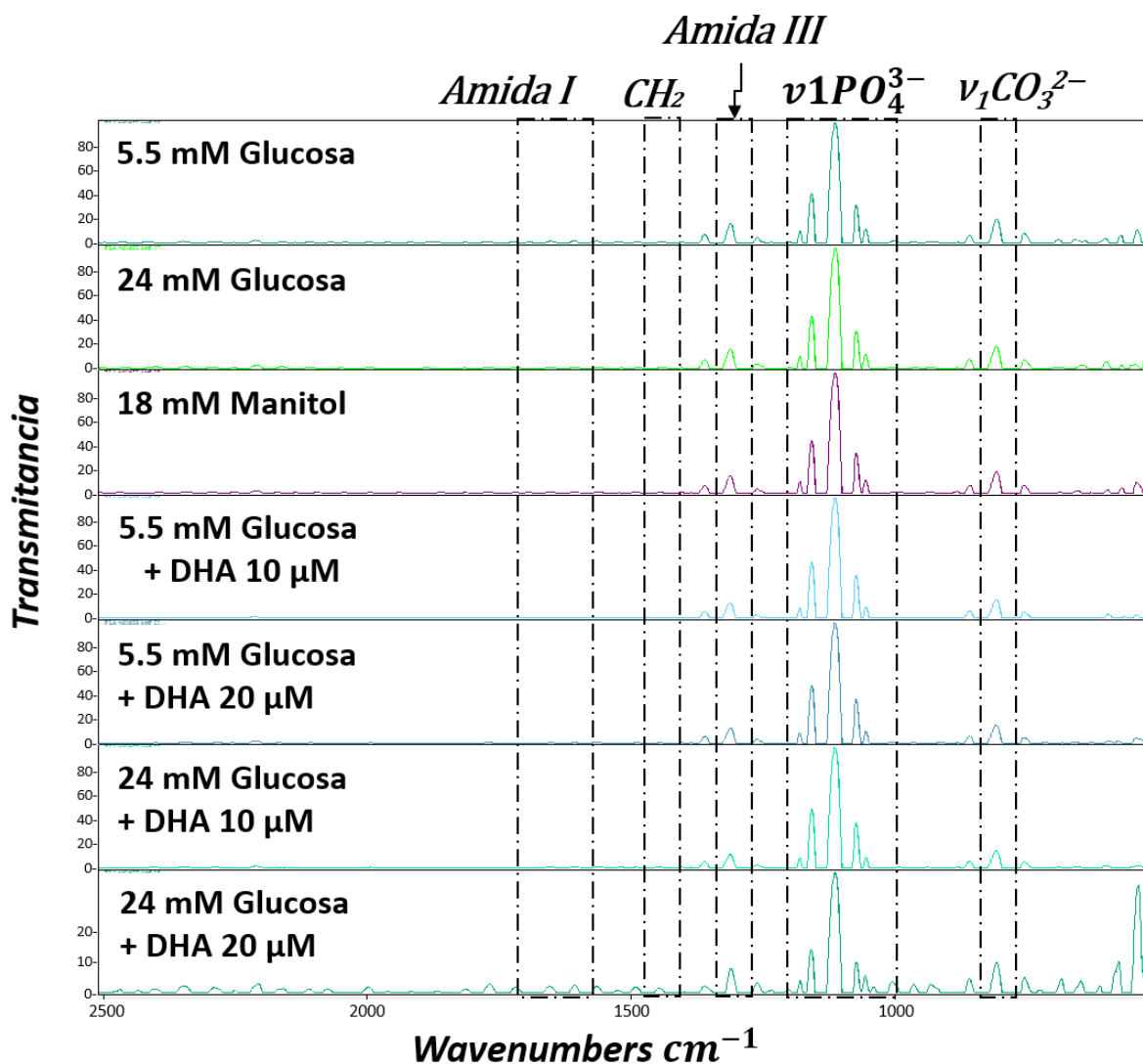
Los resultados obtenidos revelaron que el tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de DHA en combinación con normo-glucosa no modificó la actividad de esta enzima a los 7 y 14 días cultivo, comportándose similar al grupo control de normo-glucosa. Las células con 24 mM de glucosa, incrementaron significativamente la actividad de la ALP en comparación con el grupo de normo-glucosa en los dos tiempos evaluados (glucosa alta, 7d:  $8.27 \pm \text{SD } 0.71$ ; 14d:  $5.53 \pm \text{SD } 0.67$  vs. normo-glucosa, 7d:  $2.38 \pm \text{SD } 0.79$ ; 14d:  $2.06 \pm \text{SD } 0.74$ , UI/ $\mu\text{g}$ ). Mientras que el tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de DHA y la concentración alta de glucosa, disminuyó significativamente la actividad de la ALP comportándose similar al grupo control de normo-glucosa a los 7 y 14 días de cultivo (7d:  $1.06 \pm \text{SD } 0.16$ ; 14d:  $3.19 \pm \text{SD } 0.79$ , UI/ $\mu\text{g}$ ). El grupo iso-osmolar no mostró diferencias significativas en comparación al grupo de normo-glucosa (Fig. 9).



**Fig. 9. Efecto del DHA en la actividad específica de la ALP con diferentes concentraciones de glucosa.** Resultados de la actividad enzimática de la ALP expresadas en UI/ $\mu\text{g}$  de proteína a los 7 y 14 días de cultivo. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD, en donde \* $P \leq 0.05\%$  y \*\* $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y # $P \leq 0.05\%$  y ## $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el grupo con la concentración alta de glucosa (24 mM Gluc.).

**8.5. El tratamiento con DHA normaliza la mineralización relativa y disminuye la sustitución de carbonatos incrementada por la concentración alta de glucosa.**

Para determinar las características estructurales de la matriz mineral y la calidad de los cristales depositados, se obtuvieron los espectros infrarrojos de la totalidad de la matriz mineral a los 21 días de cultivo por FTIR. Los espectros obtenidos mostraron que todos los grupos tienen el mismo desplazamiento de las bandas características para el grupo fosfato de la hidroxiapatita ( $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ ), la colágena (Amida I y Amida III), carbonatos ( $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ ), y el grupo meteno ( $\text{CH}_2$ ) (Fig. 10).



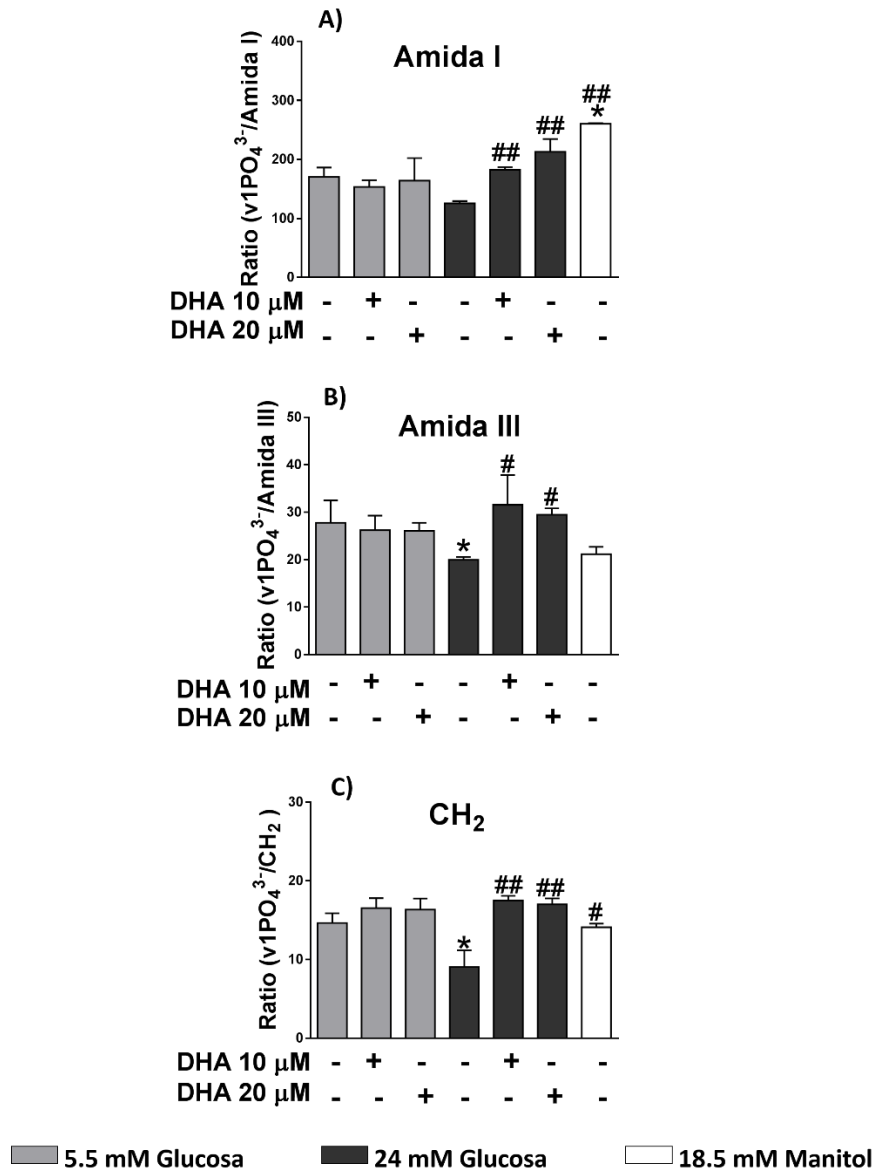
**Fig. 10.** Histogramas representativos obtenidos por FTIR de la matriz mineral a los 21 días de cultivo.

Una vez que se procesaron los histogramas, se obtuvieron los radios de los valores obtenidos del análisis de integración para determinar la mineralización relativa y la sustitución de carbonatos tal como se describe en materiales y métodos.

Los resultados de la mineralización relativa (Fig. 11), revelaron que el tratamiento con 10 y 20  $\mu\text{M}$  de DHA con normo-glucosa, no altera el grado de mineralización de la amida I y III (proteínas colágenas) ni del grupo meteno ( $\text{CH}_2$ ) (biomoléculas en general) comportándose similar al grupo control de normo-glucosa. En las células con 24 mM de glucosa, hubo una menor mineralización estadísticamente significativa de la amida III (glucosa alta:  $19.96 \pm \text{SD } 0.57$  vs. normo-glucosa:  $27.7 \pm \text{SD } 4.7$ ), y del grupo meteno (glucosa alta:  $9.03 \pm \text{SD } 2.12$  vs. normo-glucosa:  $14.66 \pm \text{SD } 1.2$ ); mientras que, el tratamiento con 10 o 20  $\mu\text{M}$  de DHA con 24 mM de glucosa, incrementó la mineralización de la Amida III ( $29.4 \pm \text{SD } 1.31$ ), y el grupo meteno ( $17.01 \pm \text{SD } 0.76$ ), comportándose similar al control de normo-glucosa. El control con 18.5 mM de manitol incrementó la mineralización de la amida I ( $260.29 \pm 1.24$  vs. normo-glucosa:  $170.31 \pm \text{SD } 15.7$ ), mientras que la mineralización de la Amida III y el grupo meteno no mostró diferencias significativas en comparación con el control de normo-glucosa (Fig. 11).

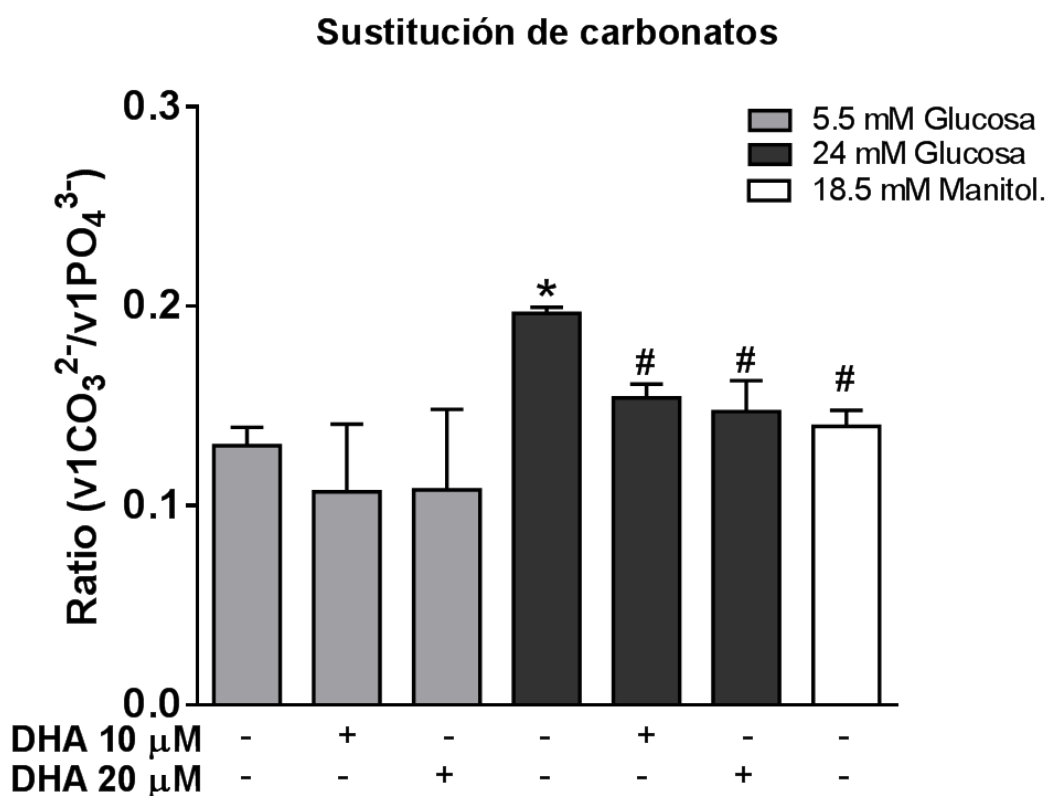


## Mineralización relativa



**Fig. 11. Efecto del DHA en combinación con diferentes concentraciones de glucosa sobre la mineralización relativa de la matriz orgánica.** Resultados del radio obtenido de la división entre los valores calculados de la integración de las bandas correspondientes a v1PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Amida I, Amida III y CH<sub>2</sub> tal como se describe en material y métodos. A) valores de la mineralización relativa de la amida I obtenidos de la relación v1PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/Amida I. B) valores de la mineralización relativa de la amida III obtenidos de la relación v1PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/Amida III y C) valores de la mineralización relativa de las biomoléculas en general obtenidos de la relación v1PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/CH<sub>2</sub>. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD en donde \*P  $\leq$  0.05% y \*\*P  $\leq$  0.01% cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y #P  $\leq$  0.05% y ##P  $\leq$  0.01% cuando los grupos se compararon con el grupo con glucosa alta (24 mM Gluc.).

Para determinar la calidad del mineral se analizó la sustitución de carbonatos (Fig. 12), que indican la madurez y la calidad de los cristales, de tal forma que el incremento en la relación entre carbonatos y el grupo fosfato indica un mineral más inmaduro y de menor calidad. Nuestros resultados mostraron que en condiciones de normo-glucosa el tratamiento con DHA en ambas concentraciones no altera este parámetro. La concentración de glucosa alta, indujo un incremento significativo en la sustitución de carbonatos en comparación con el grupo de normo-glucosa (glucosa alta:  $0.19 \pm \text{SD } 0.003$  vs. normo-glucosa:  $0.13 \pm \text{SD } 0.009$ ), mientras que el tratamiento con 10 o 20  $\mu\text{M}$  de DHA con la concentración alta de glucosa disminuyó la sustitución de carbonatos (20 $\mu\text{M}$  de DHA:  $0.14 \pm \text{SD } 0.015$  vs. glucosa alta:  $0.19 \pm \text{SD } 0.003$ ), dejándolo a un nivel similar al grupo de control de normo-glucosa. El grupo iso-osmótico con 18.5 mM de manitol no mostró cambios significativos en comparación con el control.



**Fig. 12. Efecto del DHA en la sustitución de carbonatos en combinación con diferentes concentraciones de glucosa.** Resultados de la sustitución de carbonatos obtenidos al dividir los valores de la integración de las bandas  $v1CO_3^{2-}/v1PO_4^{3-}$ . Los gráficos representan la media  $\pm$  SD en donde \* $P \leq 0.05\%$  y \*\* $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y # $P \leq 0.05\%$  y ## $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el grupo de glucosa alta (24 mM Gluc.).

**8.6. El tratamiento con DHA previene parcialmente el incremento en la concentración extracelular de RANK-L provocado por la concentración alta de glucosa.**

Se determinó la producción extracelular de RANK-L que es un regulador clave de la osteoclastogénesis y de la resorción, que en hueso es sintetizado por los osteoblastos y osteocitos, y la unión con su receptor (RANK) promueve la diferenciación y proliferación de los osteoclastos y por lo tanto su incremento se asocia a pérdida ósea y fragilidad (3, 4, 6, 83).

Los resultados mostraron que el tratamiento con ambas concentraciones de DHA en combinación con normo-glucosa no altera la concentración del RANK-L, comportándose similar al control de normo-glucosa (Fig. 13).

El tratamiento sólo con 24 mM de glucosa mostró una sobreproducción de RANK-L que fue estadísticamente significativa con respecto al control de normo-glucosa (glucosa alta:  $1227.99 \pm \text{SD } 20.64$  vs. normo-glucosa:  $496.64 \pm \text{SD } 11.79$  pg/mL). El tratamiento con DHA en combinación con la concentración alta de glucosa, disminuyó la sobre producción de RANK-L (20  $\mu\text{M}$  de DHA:  $804.57 \pm \text{SD } 45.74$  vs. glucosa alta:  $1227.99 \pm \text{SD } 20.64$  pg/mL), aunque los niveles de RANK-L permanecieron elevados en comparación con el control de normo-glucosa (20  $\mu\text{M}$  de DHA:  $804.57 \pm \text{SD } 45.74$  vs. normo-glucosa:  $496.64 \pm \text{SD } 11.79$  pg/mL) (Fig. 13).

El control iso-osmótico con 18.5 mM de manitol, mostró diferencias significativas con respecto al grupo de normo-glucosa y al de glucosa alta ( $901.14 \pm \text{SD } 45.3$ ) (Fig. 13).

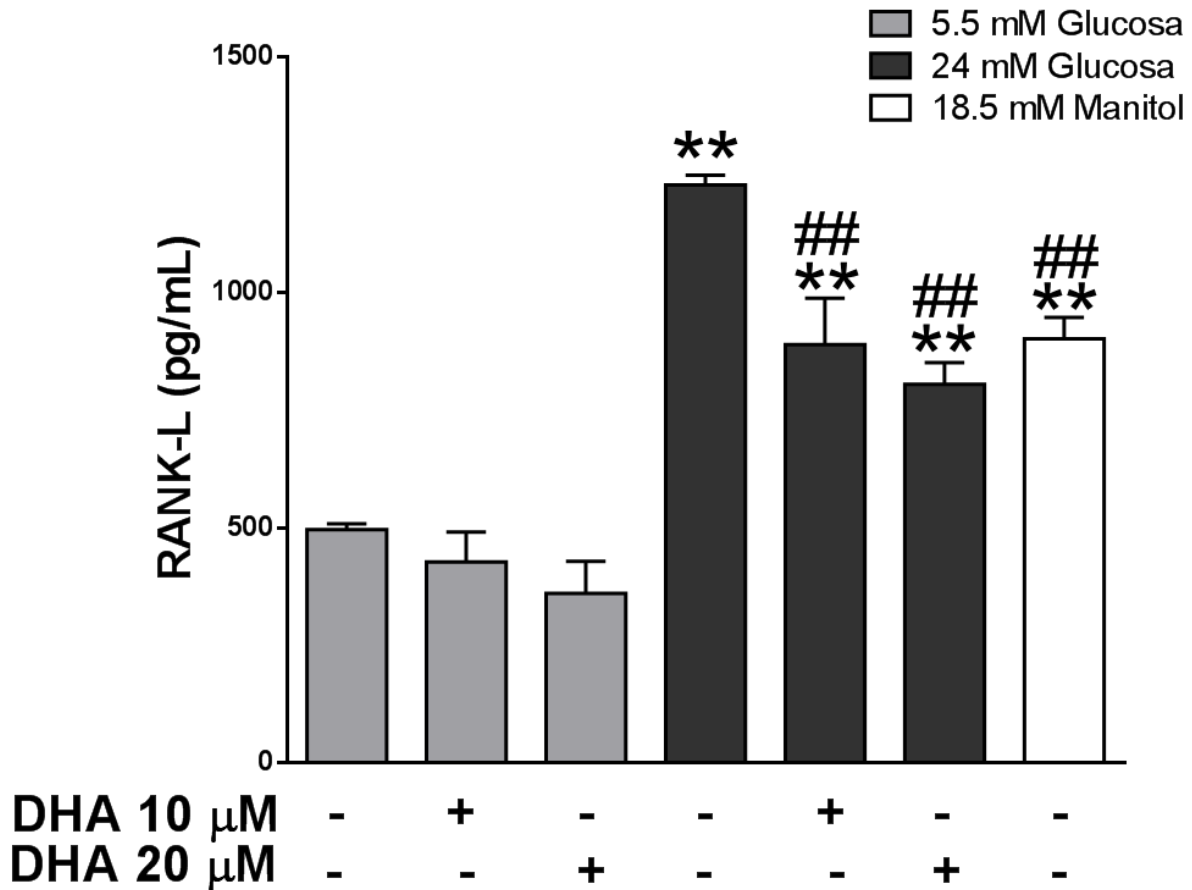


Fig. 13. Efecto del DHA en la producción extracelular de RANK-L en combinación con diferentes concentraciones de glucosa. Resultados de la concentración de RANK-L en el medio extracelular expresados en pg/mL de medio a las 24 horas de cultivo. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de tres ensayos independientes en donde \*P  $\leq$  0.05% y \*\*P  $\leq$  0.01% cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y #P  $\leq$  0.05% y ##P  $\leq$  0.01% cuando los grupos se compararon con el grupo de glucosa alta (24 mM Gluc.).

### 8.7. El tratamiento con 20 $\mu\text{M}$ de DHA incrementa la expresión relativa del NRF2 bajo ambas concentraciones de glucosa.

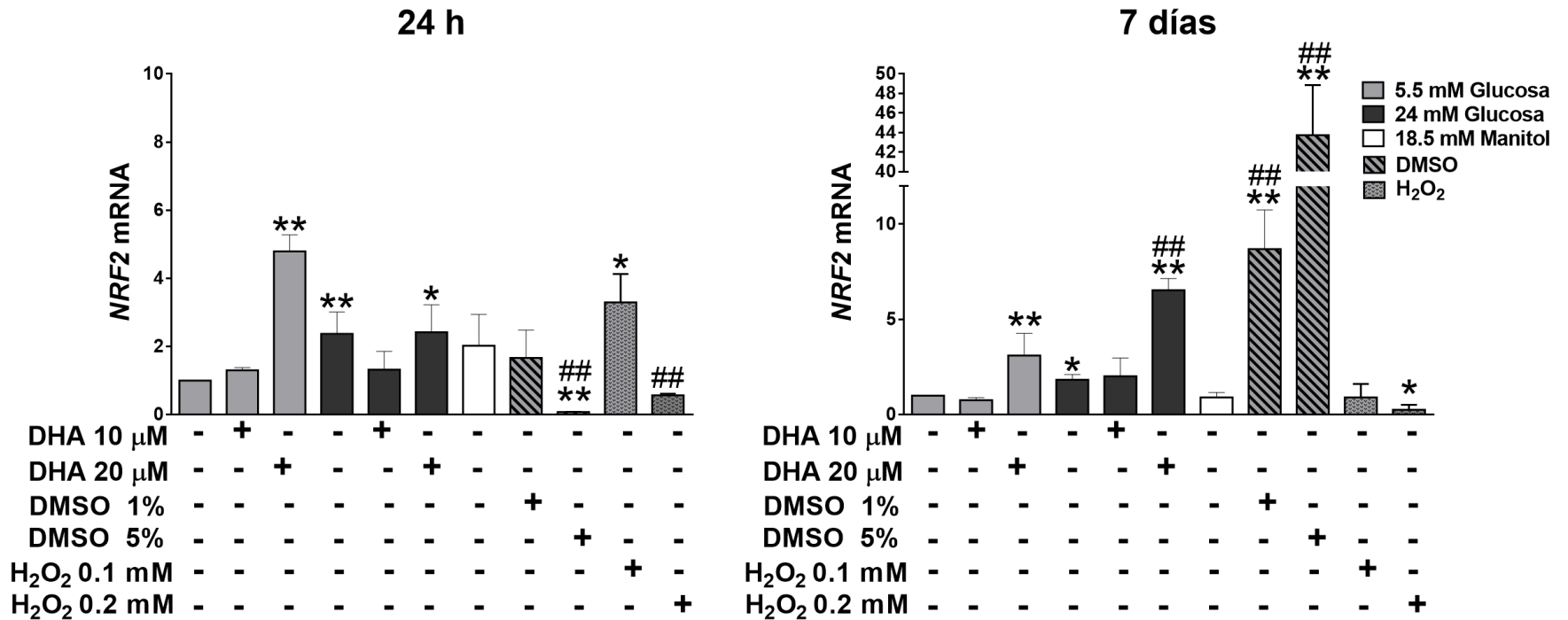
Para evaluar el mecanismo antioxidante del DHA bajo concentraciones altas de glucosa, se cuantificó la expresión del mRNA del factor de transcripción *NRF2* debido a que activa la transcripción del ARE, para la transcripción de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes SOD, GPx, catalasa (CAT), y HO-1 y se ha descrito que la vía Keap1-NRF2 es el principal regulador de la respuesta celular frente al estrés oxidativo causado por las ERO (84).

Los resultados obtenidos de la PCR en tiempo real mostraron que el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de DHA en combinación con normo-glucosa, no afecta la expresión del mRNA de *NRF2* a las 24 horas y 7 días de cultivo; mientras que, a la concentración de 20  $\mu\text{M}$  observamos un incremento desde las 24 horas manteniéndose hasta los 7 días (24h:  $4.79 \pm \text{SD } 0.48$ ; 7d:  $3.1 \pm \text{SD } 1.1$ ) (Fig. 14).

El cultivo solo con 24 mM de glucosa mostró un incremento significativo en la expresión del *NRF2* en los dos tiempos evaluados (24h:  $2.37 \pm \text{SD } 0.64$ ; 7d:  $1.82 \pm \text{SD } 0.27$ ). Cuando tratamos a las células con DHA con la concentración alta de glucosa, no encontramos cambios en la expresión del factor de transcripción a las 24 horas, pero a los 7 días observamos un incremento significativo con la concentración de 20  $\mu\text{M}$  de DHA, con respecto al control de normo-glucosa y al grupo con glucosa alta (20  $\mu\text{M}$  de DHA:  $6.53 \pm \text{SD } 0.61$  vs, glucosa alta:  $1.82 \pm \text{SD } 0.27$ ) (Fig. 14).

El control iso-osmótico con 18.5 mM de manitol no mostró cambios con respecto al control de normo-glucosa y al de alta glucosa en los dos tiempos evaluados (24h:  $2.02 \pm \text{SD } 0.9$ ; 7d:  $0.90 \pm \text{SD } 0.25$ ) (Fig. 14).

Los grupos tratados con DMSO mostraron que a las 24 horas de cultivo la concentración de 1% se mantiene similar al control de normo-glucosa ( $1.6 \pm \text{SD } 0.82$ ), y a la concentración de 5% se observó una disminución que solo mostró diferencias significativas con respecto al grupo cultivado con 24 mM de glucosa ( $0.07 \pm \text{SD } 0.02$ ). Por otro lado, a los 7 días se observó un incremento importante en la expresión del *NRF2* con ambas concentraciones, aunque con la concentración de 5% se observa una mayor expresión en comparación con el grupo tratado con 1% de DMSO (5% DMSO:  $43.73 \pm \text{SD } 5.13$  vs. 1% DMSO:  $8.68 \pm \text{SD } 2.06$ ) (Fig. 14).

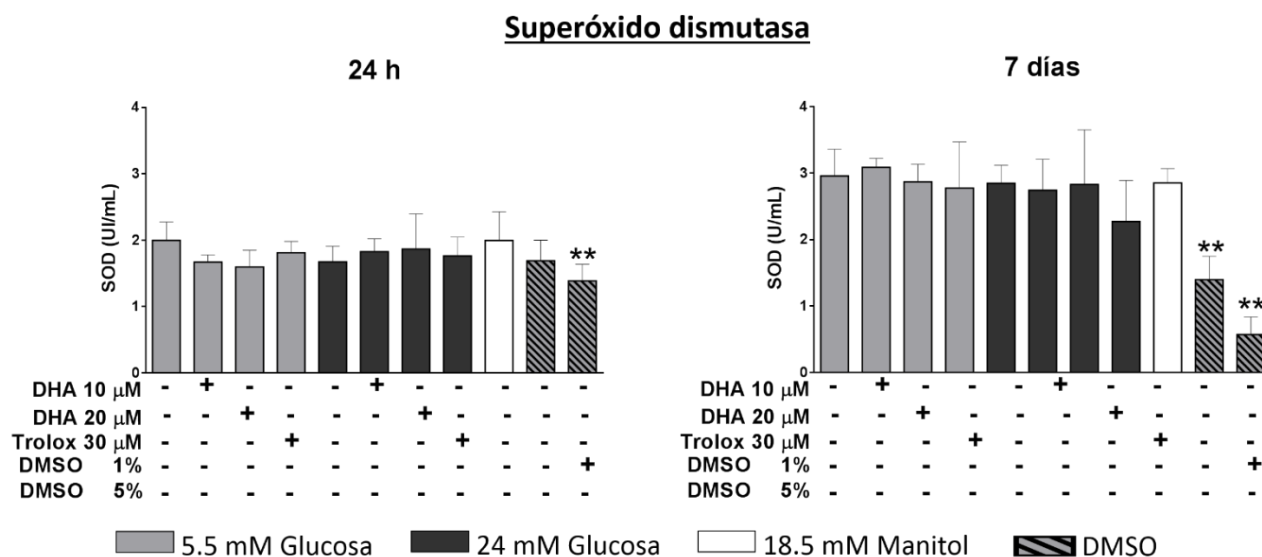


**Fig. 14. Efecto del DHA en la expresión del mRNA de *NRF2* en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.** Resultados obtenidos por PCR en tiempo real, en donde se observa la expresión del mRNA del factor de transcripción *NRF2* bajo diferentes tratamientos experimentales a las 24 horas y 7 días de cultivo. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD en donde \* $P \leq 0.05\%$  y \*\* $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y # $P \leq 0.05\%$  y ## $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el grupo de glucosa alta (24 mM Gluc.).

### 8.8. La actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD no se modifica con los tratamientos experimentales.

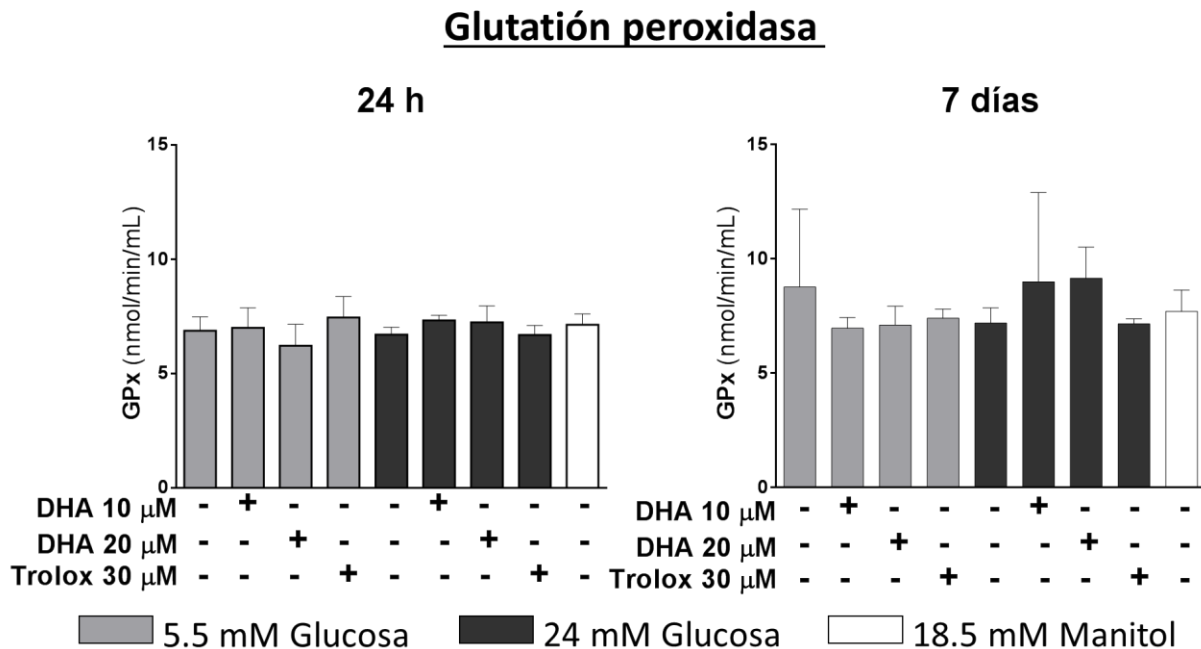
Con el fin de determinar el producto de la expresión del factor de transcripción NRF2 bajo los diferentes tratamientos, se determinó la actividad enzimática de la SOD y de la GPx; porque se ha sugerido que el DHA es capaz de incrementar la actividad de ambas enzimas y que este es uno de sus posibles mecanismos de acción (69, 70).

Se realizó el análisis de la actividad de la SOD y la GPx a las 24 horas y a los 7 días de cultivo. Los resultados de la actividad enzimática de la SOD mostraron que, aunque existe actividad enzimática basal en ambos tiempos evaluados, solo se encontraron diferencias significativas en los grupos tratados con DMSO (Fig. 15); observándose que el grupo con 1% de DMSO no mostró cambios a las 24 horas de cultivo (1% DMSO:  $1.68 \pm \text{SD } 0.31$  vs. normo-glucosa:  $1.99 \pm \text{SD } 0.27$ , UI/mL), pero disminuyó la actividad de la enzima a los 7 días ( $1.38 \pm \text{SD } 0.25$ , UI/mL). La concentración de 5% de DMSO mostró una disminución en la actividad de la SOD desde las 24 horas con una disminución más evidente a los 7 días de cultivo.



**Fig. 15. Efecto del DHA en la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa bajo diferentes concentraciones de glucosa.** Resultados de la actividad enzimática expresados en UI/mL 24 horas y 7 días de cultivo. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de tres ensayos independientes en donde \* $P \leq 0.05\%$  y \*\* $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y # $P \leq 0.05\%$  y ## $P \leq 0.01\%$  cuando los grupos se compararon con el grupo de glucosa alta (24 mM Gluc.). No se observaron cambios estadísticamente significativos entre ninguno de los grupos analizados.

Al igual que con los resultados de SOD, la actividad de la GPx, no mostró cambios entre ninguno de los grupos analizados en los dos tiempos evaluados, aunque todos presentaron una actividad enzimática basal (Fig. 16).



**Fig. 16. Efecto del DHA en la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa bajo diferentes concentraciones de glucosa.** Resultados de la actividad enzimática expresados en nmol/min/mL a las 24 horas y 7 días de cultivo. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de tres ensayos independientes en donde \*P  $\leq$  0.05% y \*\*P  $\leq$  0.01% cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y #P  $\leq$  0.05% y ##P  $\leq$  0.01% cuando los grupos se compararon con el grupo de glucosa alta (24 mM Gluc.). No se observaron cambios estadísticamente significativos entre ninguno de los grupos analizados.



### **8.9. El tratamiento con 20 $\mu$ M de DHA incrementa la expresión relativa de las enzimas SOD-1 y Gpx-1 solo bajo condiciones de normo-glucosa.**

Determinamos la expresión del mensajero que codifica para la SOD y la GPx; ya que observamos que los diferentes tratamientos inducían cambios en la expresión relativa de *NRF2*, pero sin alterar la actividad de las enzimas antioxidantes.

Los resultados de la expresión del mRNA de la enzima SOD, mostraron que el tratamiento con 10  $\mu$ M de DHA en condiciones de normo-glucosa no cambia la expresión del mensajero, mientras que con la concentración de 20  $\mu$ M observamos un incremento importante a las 24 horas de cultivo ( $6.44 \pm \text{SD } 0.93$ ). Por otro lado, a los 7 días observamos que ambas concentraciones de DHA reducen la expresión con respecto al control de normo-glucosa (10  $\mu$ M DHA:  $0.43 \pm \text{SD } 0.08$ ; 20  $\mu$ M DHA:  $0.46 \pm \text{SD } 0.08$ ) (Fig. 17-A).

El cultivo con 24 mM de glucosa no alteró la expresión de la SOD a las 24 horas de cultivo, mientras que a los 7 días observamos una disminución estadísticamente significativa ( $0.26 \pm \text{SD } 0.07$ ) (Fig. 17-A).

El tratamiento con ambas concentraciones de DHA con glucosa alta, no mostró cambios en comparación con el grupo con glucosa alta ni en comparación con el de normo-glucosa a las 24 horas de cultivo. A los 7 días de cultivo el tratamiento con 10  $\mu$ M de DHA no alteró la expresión del mensajero mientras que con 20  $\mu$ M observamos un incremento significativo con respecto al grupo con glucosa alta comportándose similar al control de normo-glucosa (20  $\mu$ M DHA:  $0.72 \pm \text{SD } 0.22$  vs. glucosa alta:  $0.26 \pm \text{SD } 0.07$ ) (Fig. 17-A).

El grupo control iso-osmótico no mostró cambios en la expresión de esta enzima a las 24 horas de cultivo, mientras que a los 7 días se observó una disminución significativa con respecto al control de normo-glucosa ( $0.4 \pm \text{SD } 0.03$ ) (Fig. 17-A).

Se utilizó 5% de DMSO, que fue la concentración con la que vimos mayor respuesta en la actividad enzimática y la expresión del *NRF2*; sin embargo, no mostró un incremento significativo en la expresión de la SOD, aunque se observa una tendencia a incrementar a las 24 horas de cultivo (Fig. 17-A).

Con respecto a la expresión de la GPx, observamos que el tratamiento con 10  $\mu$ M de DHA se comportó similar al control normo-glucosa, mientras que la concentración de 20  $\mu$ M, incrementó

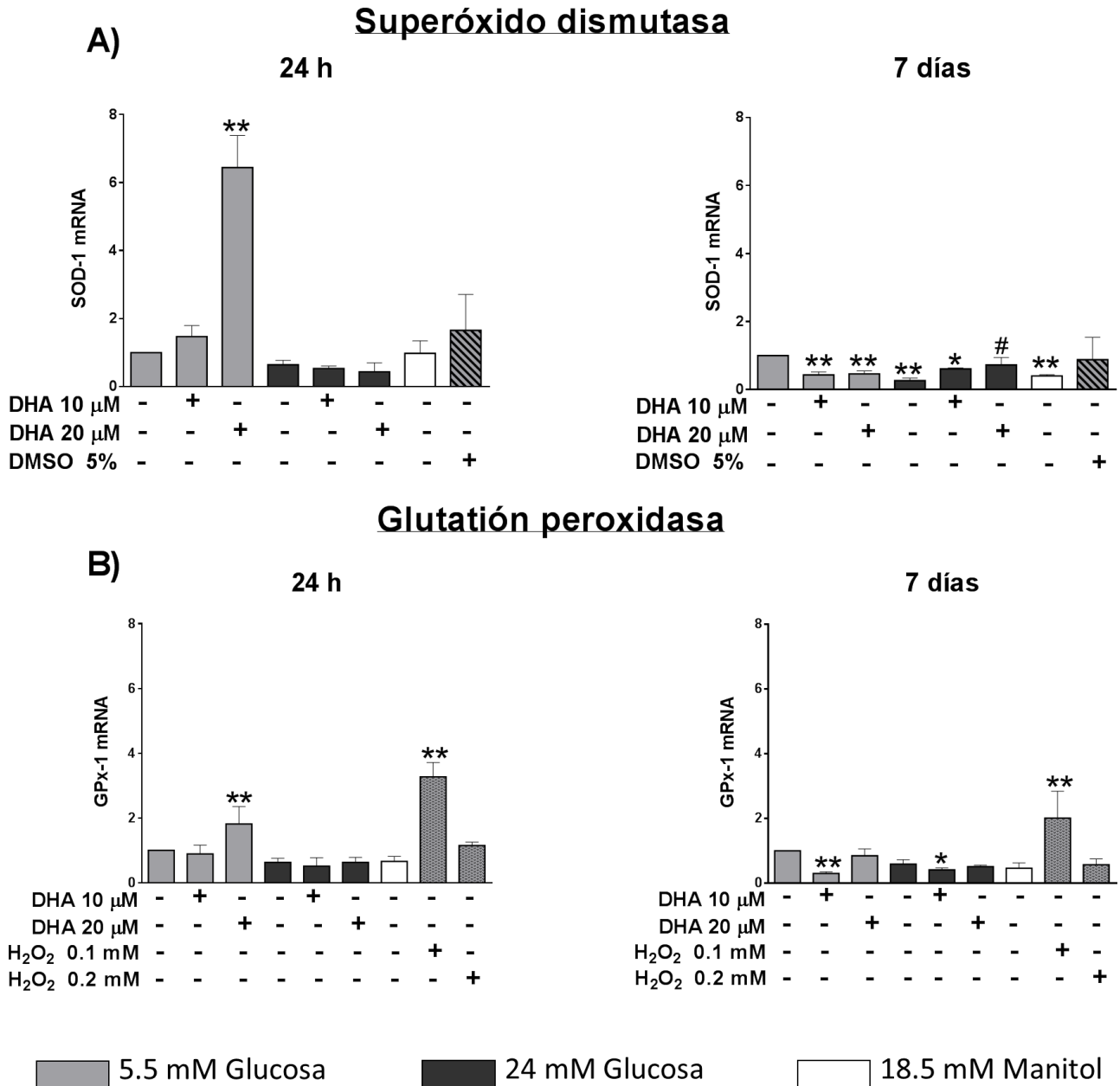
de manera significativa la expresión a las 24 horas de cultivo ( $1.81 \pm \text{SD } 0.5$ ). Por otro lado, a los 7 días de cultivo observamos que la concentración de  $10 \mu\text{M}$  de DHA redujo la expresión en comparación con el grupo control de normo-glucosa ( $0.3 \pm \text{SD } 0.05$ ), y con la concentración de  $20 \mu\text{M}$  observamos un comportamiento similar al control ( $0.84 \pm \text{SD } 0.2$ ) (Fig. 17-B).

El cultivo con  $24 \text{ mM}$  de glucosa no alteró la expresión del mensajero de la GPx; comportándose similar al control de normo-glucosa en ambos tiempos evaluados (24h:  $0.61 \pm \text{SD } 0.12$ ; 7d:  $0.59 \pm \text{SD } 0.13$ ) (Fig. 17-B).

Cuando tratamos a las células cultivadas con  $24 \text{ mM}$  de glucosa con el DHA, observamos un comportamiento similar al grupo con glucosa alta para ambas concentraciones del ácido graso y solo la concentración de  $10 \mu\text{M}$  a los 7 días de cultivo, mostró una disminución con respecto al control de normo-glucosa ( $0.4 \pm \text{SD } 0.06$ ) (Fig. 17-B).

El grupo control iso-osmótico no mostró diferencias significativas en ambos tiempos evaluados en comparación con el grupo de normo-glucosa y de alta glucosa (24h:  $0.65 \pm \text{SD } 0.15$ ; 7d:  $0.46 \pm \text{SD } 0.04$ ) (Fig. 17-B).

El grupo tratado con  $0.1 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incrementó la expresión del mensajero a las 24 horas ( $3.26 \pm \text{SD } 0.44$ ), y 7 días de cultivo ( $2 \pm \text{SD } 0.83$ ); mientras que, con la concentración de  $0.2 \text{ mM}$  se comportó similar al control de normo-glucosa en ambos tiempos (24h:  $1.14 \pm \text{SD } 0.1$ ; 7d:  $0.56 \pm \text{SD } 0.17$ ) (Fig. 17-B).



**Fig. 17. Efecto del DHA en la expresión del mRNA de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en combinación bajo diferentes concentraciones de glucosa.** Resultados obtenidos por PCR en tiempo real, en donde se observa: **A)** el efecto del DHA en la expresión del mRNA de la enzima SOD-1 bajo dos concentraciones de glucosa a las 24 horas y 7 días de cultivo y **B)** el efecto del DHA en la expresión del mRNA de la enzima GPx-1 bajo dos concentraciones de glucosa a las 24 horas y 7 días de cultivo. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD en donde \*P  $\leq$  0.05% y \*\*P  $\leq$  0.01% cuando los grupos se compararon con el control (5.5 mM Gluc.), y #P  $\leq$  0.05% cuando los grupos se compararon con el grupo con glucosa alta (24 mM Gluc.).

## 9. DISCUSIÓN

En este estudio determinamos por primera vez el efecto del DHA sobre las alteraciones causadas por las concentraciones elevadas de glucosa en la síntesis y características de la matriz orgánica, la calidad del mineral depositado y los mecanismos antioxidantes celulares en osteoblastos humanos, con el fin de conocer si el DHA podría mejorar el proceso de formación ósea bajo niveles de glucosa elevados.

Lo primero que evaluamos fue el efecto del DHA sobre la síntesis de las proteínas de la matriz orgánica, que tienen una participación directa en la síntesis de la matriz mineral y en la calidad de los cristales. Primero, nos enfocamos en determinar el efecto del DHA sobre la síntesis y distribución de la Col1, que forma un andamio en donde ocurre la interacción entre la Col1 con proteínas no colágenas como la BSP-II y la OCN, que inducen la nucleación de los cristales de HAP y los fijan a la matriz extracelular orgánica (79).

Encontramos que, en condiciones mineralizantes la Col1 se incrementa con respecto al tiempo y se forman cúmulos densamente teñidos (Fig. 6), lo que está asociado al incremento en la actividad de los osteoblastos y a la síntesis de la matriz mineral; ya que, se ha descrito que durante el proceso de biomineralización, se incrementa la síntesis de la Col1 y se concentra en los sitios de nucleación del mineral (85). Esto lo comprobamos con el grupo sin medio osteogénico, en donde no hubo un cambio en la concentración de la Col1 en los tres tiempos evaluados y no se formaron los cúmulos densamente teñidos (Fig. 6), indicando que nuestro modelo con medio osteogénico, es el adecuado para estudiar la mineralización biológica.

El tratamiento con ambas concentraciones de DHA con normo-glucosa nos indicó, que el DHA por sí mismo no induce cambios en la síntesis de Col1 bajo condiciones fisiológicas comportándose similar al control.

Por otro lado, el tratamiento solo con 24 mM de glucosa, incrementó de manera importante la producción de la Col1, con una distribución completamente desordenada y con cúmulos muy densamente teñidos (Fig. 6). Estos resultados coinciden con reportes previos que han reportado, que niveles elevados de glucosa, inducen un incremento en la expresión proteica de la Col1, asociado a cambios en el metabolismo intracelular y cambios en la actividad osteoblástica provocados en parte por hiperosmolaridad (86-88), que puede ser a través de un

incremento en la activación de la vía de p38 que se activa en respuesta al estrés (88); sin embargo, nosotros no observamos que el manitol incrementara la síntesis de la Col1 (Fig. 6), por lo que en nuestro modelo, el incremento de la Col1 puede deberse a otros mecanismos como la formación de AGE's.

En un modelo murino de DMT2 inducido con estreptozocina, se observó que los ratones diabéticos presentaban andamios de colágena alterados, con las fibras de colágena desordenadas y una ramificación evidente con la formación de racimos; mientras que, en los ratones sanos las fibras de colágena se encontraban distribuidas de manera uniforme en todas las direcciones y además, observaron que los andamios de los ratones diabéticos presentaban una mayor concentración de AGE's (89). Lo que nos sugiere que la acumulación de AGE's podría tener una participación directa en las alteraciones sobre la distribución y la concentración de la Col1 provocadas por la glucosa alta; ya que se ha reportado que la acumulación de AGE's provoca cuadros de fibrosis en los pacientes diabéticos (90). Además, los cambios en la distribución de la Col1 se pueden asociar con las alteraciones en la distribución de los cristales depositados que observamos previamente (68).

El tratamiento con 10  $\mu$ M de DHA con glucosa alta, redujo la sobreproducción y los cambios en la distribución de la Col1 (Fig. 6), lo que se relaciona con la mejora en la distribución del mineral que observamos con anterioridad (68). Sin embargo, con 20  $\mu$ M de DHA la concentración de la Col1 se mantuvo elevada, aunque mejoró la distribución de la proteína (Fig. 6). Por lo que esta concentración de DHA podría tener efectos anabólicos en la formación de la matriz extracelular. Se ha reportado que este ácido graso puede incrementar la síntesis de Col1 (91); sin embargo, creemos que el incremento en la concentración de la Col1, podría estar mediado por vías distintas a las activadas por las concentraciones altas de glucosa (p38), o a una disminución en la glicación de la colágena; pero a la fecha, no hemos encontrado reportes que indiquen que el DHA pudiera disminuir la formación de AGE's en la matriz extracelular ósea.

Con respecto a la producción de OCN, la BSP-II y la actividad enzimática de la ALP, que son proteínas necesarias para la mineralización de la matriz extracelular, encontramos que el DHA con normo-glucosa no afecta la producción de OCN y BSP-II a los 21 días de cultivo (Fig. 7 y 8), indicando que el DHA bajo estas condiciones no induce cambios en la síntesis de matriz mineral ni en la nucleación de los cristales a tiempos largos. Sin embargo, a los 7 y 14 días de

cultivo, observamos cambios en la producción de BSP-II y de OCN, lo que nos sugiere que el DHA podría estar regulando la expresión de estas proteínas de manera independiente. La actividad de la ALP, se mantuvo a niveles basales en ambos tiempos evaluados (Fig. 9), por lo que el DHA por sí solo, podría no alterar la concentración de fosfato disponible para la formación de la HAP.

El cultivo solo con 24 mM de glucosa incrementó la producción de OCN (Fig. 7), y la actividad de la ALP (Fig. 9); sin embargo, encontramos una inesperada disminución en la producción de BSP-II (Fig. 8), que sugiere que la nucleación de los cristales de HAP podría encontrarse inhibida, debido a que se ha demostrado que esta proteína induce la nucleación de los cristales de HAP y los une a la matriz de colágena (92). En ratones BSP<sup>-/-</sup> se observó una reducción en la longitud de los huesos largos y el espesor del hueso cortical, pero con una mayor densidad en el hueso trabecular, lo que indica que la disminución de BSP altera el crecimiento óseo y la mineralización (93). En otro modelo con ratones BSP<sup>-/-</sup> se observó que la inhibición de BSP-II, promueve el incremento de osteopontina, que inhibe la nucleación de los cristales al unirse a la HAP y bloqueando la unión de nuevas moléculas de HAP, inhibiendo por completo la síntesis de matriz mineral (94).

Por lo que, la concentración alta de glucosa podría provocar una acumulación de fosfato de calcio e hiper calcificación de la matriz extracelular, a través del incremento en la actividad de la ALP, la inhibición de la BSP-II, el incremento de OCN y de los depósitos de calcio observados previamente (68), lo cual se asocia directamente a una disminución de la calidad de la matriz mineral, que coincide con lo observado previamente (39).

El tratamiento con DHA con glucosa alta, restauró los niveles de OCN, BSP-II y la actividad de la ALP (Fig. 7, 8 y 9). Lo que nos sugirió que el DHA podría estar promoviendo la nucleación de los cristales y de esta manera, mejorar la calidad del mineral aún bajo condiciones de glucosa alta. Por lo tanto, nos enfocamos en analizar la calidad del mineral depositado. Para esto, se analizó la sustitución de carbonatos y la forma en la que se mineraliza la matriz orgánica por FTIR.

Este método se basa en la absorción de la radiación infrarroja durante las transiciones vibracionales de los grupos funcionales en la muestra y permite estudiar las características estructurales del hueso y de los cristales de fosfato de calcio (77).

Lo primero que analizamos fue la mineralización relativa (Fig. 11), que indica cómo se lleva a cabo la mineralización de la matriz orgánica y está relacionada con la resistencia ósea y la distribución del mineral (2). Nuestros resultados mostraron que el DHA por sí solo no altera la mineralización de la matriz orgánica (Fig. 11), coincidiendo con lo encontrado en los resultados del análisis de la distribución de la Col1 (Fig. 6), y con la distribución de los cristales que observamos previamente (68).

La concentración alta de glucosa disminuyó la mineralización de la colágena (amida III), y del grupo meteno que corresponde a las biomoléculas en general (Fig. 11), indicando alteraciones en la distribución de los cristales y que la matriz orgánica no se mineraliza de manera homogénea. Sin embargo, las células tratadas con ambas concentraciones de DHA mostraron un comportamiento similar al control de normo-glucosa (Fig. 11). Por lo que, el DHA mejora la síntesis de las proteínas que constituyen la matriz orgánica y normaliza la forma en la que se lleva a cabo la mineralización de las proteínas de la matriz extracelular y esto podría verse reflejado en un incremento en la resistencia ósea en los pacientes con DMT2.

Posteriormente, para conocer la calidad del mineral, analizamos la sustitución de carbonatos (Fig. 12), debido a que los carbonatos proporcionan estabilidad a los cristales inmaduros en formación y son sustituidos por los fosfatos una vez que están maduros; de tal manera que, a mayor concentración de carbonatos, los cristales son más inmaduros y de menor calidad; mientras que, menor concentración de carbonatos representa cristales maduros y de buena calidad (2). Lo que observamos con este análisis, es que el DHA con normo-glucosa no modifica la madurez ni la calidad de los cristales (Fig. 12), lo cual era de esperarse; ya que bajo estas condiciones no produce cambios en la producción de BSP-II y OCN, que están estrechamente relacionadas con la nucleación, madurez y calidad de los cristales (13).

La concentración alta de glucosa incrementó la sustitución de carbonatos (Fig. 12), lo que indica de manera directa una disminución en la calidad de los cristales y coincide con la inhibición de BSP-II y el incremento de OCN y de la actividad de la ALP, confirmándonos que la glucosa alta, provoca cúmulos de calcio en la matriz extracelular y no un incremento en la formación de la HAP, además de disminuir la calidad de los cristales como ya se ha observado previamente (39).

De manera importante, el tratamiento con ambas concentraciones de DHA con glucosa alta, disminuyó el incremento de la sustitución de carbonatos provocado por la concentración alta de glucosa, a un nivel similar al control de normo-glucosa (Fig. 12). Por lo que el DHA incrementa la calidad de los cristales formados bajo condiciones de glucosa alta. Este efecto en la calidad, está relacionado con el efecto normalizador del DHA en la síntesis de BSP-II, OCN y de la ALP, indicando que el DHA contrarresta las alteraciones provocadas por la concentración elevada de glucosa en la biomineralización, la síntesis de matriz orgánica y en la calidad del mineral depositado. Estos hallazgos obtenidos se esquematizan en la figura 18.

Una vez que observamos que el DHA es capaz de mejorar el proceso de formación de la matriz mineral. Nos preguntamos si el DHA podría tener efecto sobre la resorción ósea bajo condiciones de glucosa alta. Una forma indirecta de determinar este efecto es a través de la producción del RANK-L. En este sentido, el DHA con normo-glucosa no alteró la concentración extracelular del RANK-L (Fig. 13); indicando que por sí solo, no induce la actividad osteoclástica.

El cultivo con 24 mM de glucosa incrementó la concentración del RANK-L (Fig. 13), que podría resultar en la activación de los osteoclastos. Este hallazgo coincide con resultados previos en donde se ha observado que las concentraciones altas de glucosa incrementan la cantidad del RANK-L soluble (39, 87, 95); sin embargo, el control iso-osmótico incrementó la concentración del RANK-L (Fig. 13), por lo que el incremento que observamos con 24 mM de glucosa puede deberse parcialmente al estrés osmótico, sin embargo, por lo que sabemos, no se ha reportado que la hiperosmolaridad afecte la síntesis del RANK-L.

El tratamiento con DHA con glucosa alta, disminuyó la sobreproducción de RANK-L provocada por la concentración alta de glucosa (Fig. 13). Esta disminución puede deberse a los efectos antiinflamatorios reportados para el DHA. En modelos animales, se ha observado que la suplementación dietética con DHA reduce los niveles de RANK-L (96) y en un estudio con osteoblastos MC3T3-E1/4, se observó que el tratamiento con DHA normaliza la producción de RANK-L a niveles similares al control aun cuando las células se encontraban bajo un estado proinflamatorio inducido con PGE<sub>2</sub> (97). Probablemente el DHA reduce la síntesis de RANK-L bajo concentraciones altas de glucosa a través de la modulación de la PGE<sub>2</sub>, por lo que sería importante determinar esta relación.



Hasta el momento, nuestros resultados indican que el DHA es capaz de contrarrestar las alteraciones sobre la biomineralización inducidas por la concentración alta de glucosa; sin embargo, aún no sabemos a través de qué mecanismos intracelulares provoca estos efectos.

Creemos que uno de estos mecanismos podría ser el efecto antioxidante; debido a que previamente observamos que el DHA disminuye la sobreproducción de ERO provocada por las concentraciones altas de glucosa (68) y a que se ha sugerido, que el estrés oxidativo puede ser una de las principales causas en las alteraciones sobre la biomineralización, metabolismo de los osteoblastos y en el remodelado óseo, provocadas por las concentraciones altas de glucosa (59, 60). Además, la sobreproducción de ERO disminuye los marcadores de formación mineral en osteoblastos MC3T3-E1 (38, 61) y reduce la producción de la Col1, la translocación de Runx2 al núcleo e incrementa la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (62).

Se ha reportado que el DHA puede tener efecto antioxidante a través del incremento en la expresión del factor de transcripción *NRF2* que se une al ARE (71), para iniciar la transcripción de los genes en donde son codificadas las enzimas SOD, GPx, CAT y HO-1 (98). Por lo que determinamos la expresión del *NRF2* y la expresión y actividad enzimática de las SOD y GPx bajo dos concentraciones de glucosa.

Los resultados mostraron que, solo el tratamiento con 20  $\mu$ M de DHA con normo-glucosa incrementó la expresión relativa del *NRF2* en ambos tiempos evaluados y de las enzimas *SOD* y *GPx* a las 24 h (Fig. 14 y 17). Estos resultados, coinciden con reportes previos que han observado que el DHA es capaz de inducir la expresión del NRF2 en fibroblastos (99) y neuronas (100) de humano. Además, se ha visto que el DHA puede provocar el incremento proteico de NRF2, inducir su acumulación en el núcleo, disminuir su degradación, incrementar la transcripción del ARE e incrementar la producción proteica y el mRNA de la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1), a través de una producción momentánea de ERO, que induce la activación de la vía de NRF2/HO-1 en células endoteliales de humano (71), lo que nos indica que el DHA por sí solo induce una respuesta antioxidante. Sin embargo, a tiempos largos, la actividad antioxidante podría estar mediada por la HO-1 como se ha reportado previamente (71) y no a través del incremento en la expresión de la SOD y GPx; ya que además, no observamos un incremento en la actividad de ambas enzimas (Fig. 15 y 16).

Los grupos tratados con DMSO (1 y 5%) que fue un control utilizado para la generación anión superóxido, incrementaron la expresión del mRNA de *NRF2* (Fig. 14), pero no indujo la expresión de *SOD* (Fig. 17), y disminuyó la actividad enzimática (Fig. 15), lo que indica que el DMSO inhibe las enzimas antioxidantes, provocando un estado oxidante crónico, que se asocia a los efectos tóxicos y a la inducción de la muerte celular por apoptosis como se ha descrito con anterioridad (101). Como era de esperarse, el grupo tratado con  $H_2O_2$  mostró un incremento en la expresión del *NRF2* (Fig. 14), que coincidió con el incremento mostrado en la expresión de la *GPx* (Fig. 17).

El cultivo con 24 mM de glucosa incrementó la expresión de *NRF2* (Fig. 14), lo que indica que las células están respondiendo al incremento del estrés oxidativo provocado por la concentración alta de glucosa y coincide con lo reportado por otros autores que han observado que las concentraciones elevadas de glucosa, incrementan la producción de *NRF2* como mecanismo de respuesta antioxidante en células endoteliales (102, 103) y epiteliales (104). Sin embargo, no observamos cambios en la actividad enzimática ni en la expresión del mensajero para ambas enzimas (Fig. 15, 16 y 17).

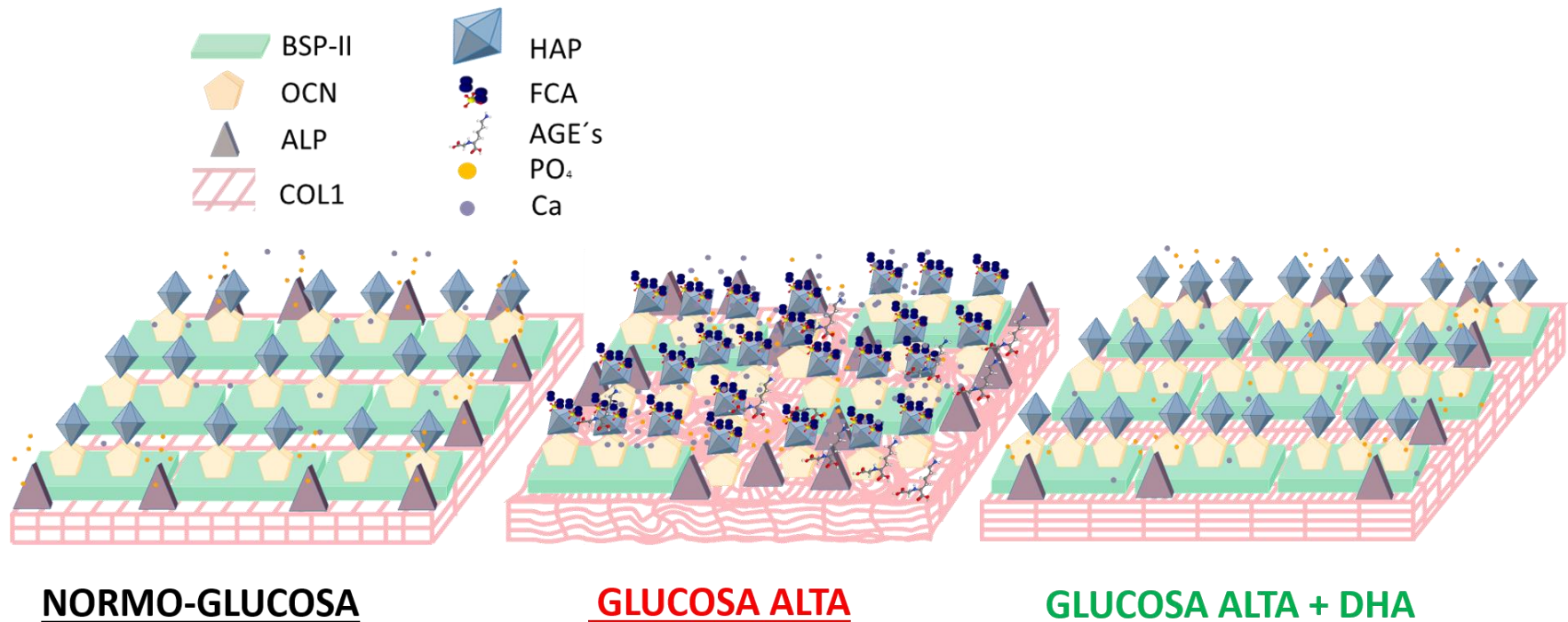
Estos resultados difieren con otro estudio en donde se observó en células endoteliales, epiteliales y vasculares que el cultivo con 20 mM de glucosa, incrementa la expresión genética de la *SOD* y *GPx*, y que este incremento puede ser proporcional al incremento de ERO, sin alteraciones evidentes en la actividad enzimática (105). Pero en estudios más recientes, se ha observado que las concentraciones altas de glucosa, inducen la acumulación de *NRF2* en el citoplasma, disminuyendo de manera significativa la concentración nuclear (103, 104), lo que coincide con la nula respuesta en la expresión del mRNA y de la actividad de ambas enzimas observado únicamente con el grupo solo con 24 mM de glucosa. Por lo tanto, la alta concentración de glucosa puede provocar que el *NRF2* no se esté translocando al núcleo y de esta manera no se esté induciendo la transcripción del ARE y en consecuencia no se expresen las enzimas *SOD* y *GPx* y la célula no sea capaz de reducir las ERO.

Cuando las células fueron cultivadas con DHA y 24 mM de glucosa, observamos un incremento significativo en la expresión del *NRF2* con el grupo tratado con 20  $\mu$ M de DHA, pero sin mostrar cambios en la expresión y actividad de ambas enzimas (Fig. 14, 15, 16 y 17). Lo que nos hizo pensar que el DHA puede incrementar la respuesta celular antioxidante bajo condiciones de

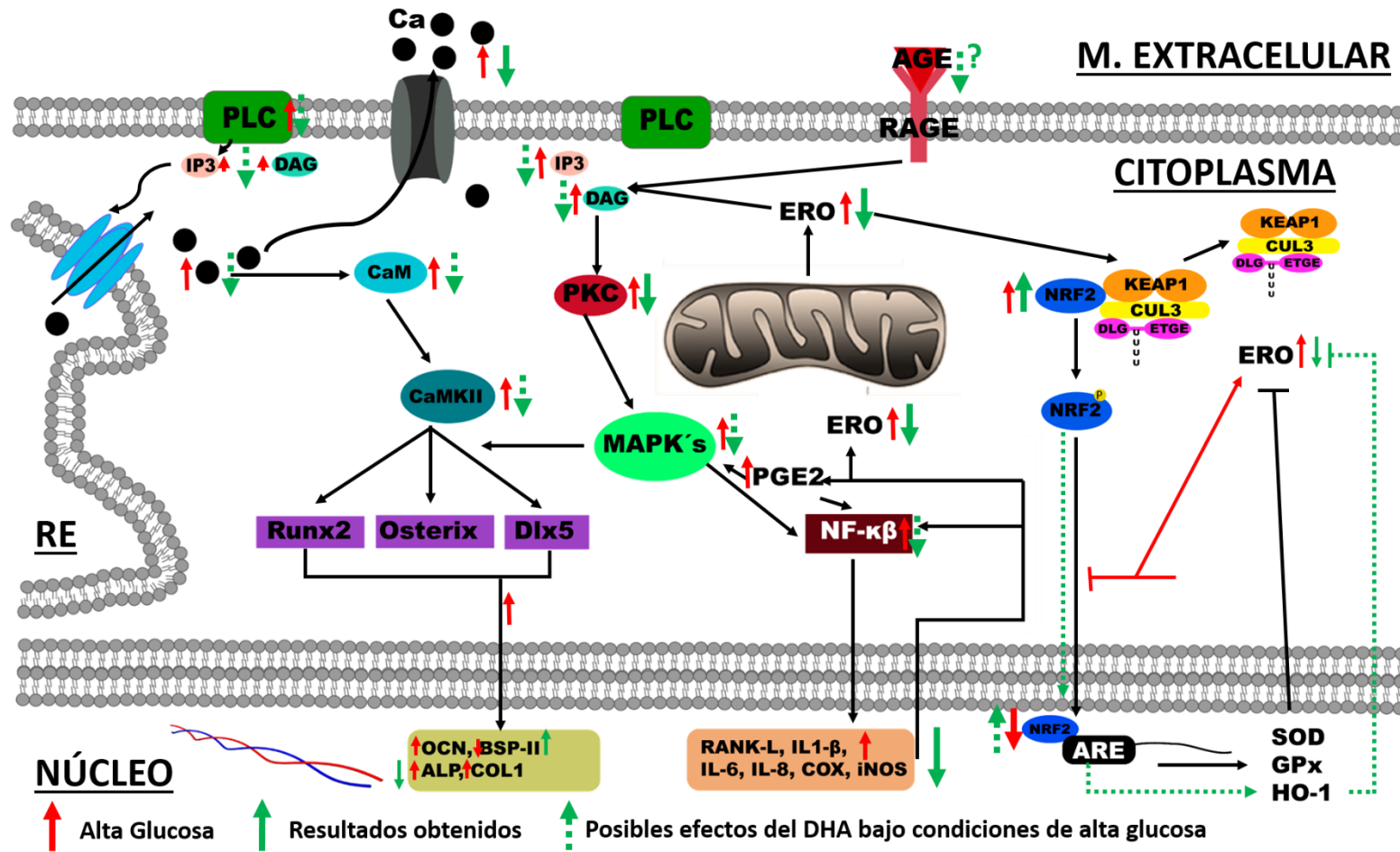
estrés oxidativo a través del incremento en la expresión del NRF2 y que este incremento es dependiente del tiempo; sin embargo, el efecto del DHA en el estrés oxidativo, parece no estar mediado por las enzimas SOD y GPx, porque no mostraron ningún cambio en la expresión ni en la actividad en ambas enzimas.

Sin embargo, existe la posibilidad de que el DHA tenga el efecto antioxidante a través de la vía NRF2/HO-1, ya que se ha reportado que esta vía antioxidante es altamente activada en presencia de DHA (71). Se ha visto que la HO-1 juega un papel muy importante en la disminución de las especies reactivas de oxígeno, sobre todo en la generación mitocondrial de superóxido (106, 107), el cual es una de las principales ERO generadas en las células bajo condiciones de glucosa elevada (108). Por estas razones, proponemos que el DHA podría estar disminuyendo la sobreproducción de ERO a través de la vía NRF2/HO-1, por lo que es importante determinar en un futuro la expresión y actividad de esta enzima bajo nuestras condiciones experimentales.

Aunque no encontramos evidencia experimental que sustente que las enzimas SOD y GPx participan en la disminución del estrés oxidativo, no se descarta la participación de la vía de NRF2 en la disminución del estrés oxidativo, y sobre la normalización sobre la síntesis de matriz extracelular orgánica y mineral y sobre la función de los osteoblastos.



**Fig. 18. Efecto del DHA sobre las alteraciones causadas por las altas concentraciones de glucosa en la síntesis de matriz orgánica y matriz mineral.** En condiciones de normo-glucosa los osteoblastos sintetizan una matriz de colágena organizada y uniforme sobre la cual se une la BSP-II y la OCN para formar un complejo proteico en donde se va a nuclear los cristales de fosfato de calcio para formar la HAP. Cuando los osteoblastos se encuentran en concentraciones altas de glucosa la producción de colágena se incrementa y se distribuye de manera desordenada provocando cambios en la interacción entre la BSP-II, OCN y Col1. Además, se provoca una disminución de BSP-II y un incremento de OCN lo que disminuye la nucleación y formación de la HAP y sumado al incremento en la concentración de calcio y de la actividad de la ALP se favorece la formación de cúmulos de fosfato de calcio disminuyendo la calidad de la matriz mineral. El tratamiento con DHA con concentraciones altas de glucosa, mejora la distribución de la colágena y restaura los niveles de BSP-II manteniendo elevados los niveles de OCN, normaliza la actividad de la ALP y la liberación de calcio, lo que favorece la formación de la HAP y restaura la calidad de la matriz mineral. **BSP-II:** sialoproteína ósea tipo 2; **OCN:** osteocalcina; **ALP:** fosfatasa alcalina; **COL1:** colágena tipo 1; **HAP:** hidroxiapatita; **FCA:** fosfato de calcio amorfo; **AGE's:** productos finales de glicación avanzada; **PO<sub>4</sub>:** fosfato; **Ca:** calcio. **Elaboración propia.**



**Fig. 19. Posible efecto del DHA sobre las alteraciones provocadas por la concentración alta de glucosa en la señalización intracelular de los osteoblastos y el mecanismo antioxidante.** Las líneas negras representan el flujo normal de las diferentes vías de señalización; las flechas rojas indican los efectos de la concentración alta de glucosa observados en el laboratorio (39, 68) y por otros autores citados a lo largo del texto; las flechas verdes sólidas representan los resultados generados en este trabajo sobre el efecto del DHA con 24 mM de glucosa y las flechas verdes punteadas representan las hipótesis planteadas en esta investigación. **PLC:** fosfolipasa C; **IP3:** inositol trifosfato; **DAG:** diacilglicerol; **CaM:** calmodulina; **CaMKII:** calmodulina cinasa 2; **OCN:** osteocalcina; **BSP-II:** sialoproteína ósea tipo 2; **ALP:** fosfatasa alcalina; **COL1:** colágena tipo 1; **PKC:** proteína cinasa C; **MAPK's:** proteínas cinasas activadas por mitógeno; **PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E<sub>2</sub>; **ERO:** especies reactivas de oxígeno; **ER:** retículo endoplásmico; **RANK-L:** Ligando del receptor activador del factor nuclear NF-κβ; **COX:** ciclooxigenasa; **iNOS:** sintasa de óxido nítrico; **KEAP1:** Kelch-like ECH-associated protein 1; **ARE:** elemento de respuesta antioxidante; **SOD:** superóxido dismutasa; **GPx:** glutatión peroxidasa; **HO-1:** hemo oxigenasa 1; **AGE's:** productos finales de glicación avanzada; **RAGE:** receptor de los productos finales de glicación avanzada. **Elaboración propia.**

## **10. CONCLUSIONES**

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que el tratamiento con DHA contrarresta los efectos adversos de la concentración alta de glucosa al normalizar la producción de las proteínas Col1 y BSP-II, normalizar la actividad enzimática de la ALP, incrementar la nucleación de mineral y la calidad de los cristales depositados y es posible que reduzca el estrés oxidativo provocado por las concentraciones altas de glucosa a través de la vía antioxidante del NRF2. Por lo que el DHA podría ser un tratamiento adyuvante prometedor para tratar las osteopatías desarrolladas por las altas concentraciones de glucosa en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

## 11. PERSPECTIVAS

Es importante continuar investigando el mecanismo antioxidante del DHA bajo concentraciones altas de glucosa, evaluando la vía de NRF2/HO-1 para determinar si es a través de esta enzima que disminuye del estrés oxidativo; y a su vez, buscar la manera de estudiar si existe una relación directa entre la vía de NRF2/ARE y los efectos normalizadores del DHA sobre la biomineralización.

Una vez que hemos determinado que el DHA contrarresta las alteraciones provocadas por la glucosa alta en osteoblastos humanos, es importante investigar cuales son los efectos que tiene este ácido graso sobre el tejido óseo en un modelo *in vivo* de DMT2, para determinar si puede contrarrestar el desarrollo de las osteopatías diabéticas, la fragilidad, el riesgo de fractura y sobre la homeostasis y el remodelado óseo.

Es necesario investigar la formación de AGE's y su asociación con los efectos negativos sobre la síntesis de matriz orgánica y mineral provocado por la concentración alta de glucosa y determinar si el DHA puede participar en la regulación o inhibición de los efectos provocados por estos AGE's sobre los osteoblastos.

Así mismo, para continuar buscando el mecanismo de acción del DHA, es importante determinar el efecto de este ácido graso sobre la producción de los mediadores pro-inflamatorios en condiciones de glucosa alta; debido a que, el efecto anti-inflamatorio puede ser uno de los mecanismos por el cual el DHA mejora la biomineralización e inhibe el incremento de la resorción ósea y junto con el efecto antioxidante puede ser un posible blanco para el tratamiento de las patologías óseas asociadas a diabetes.

Es de gran relevancia estudiar el efecto del DHA sobre las vías de señalización que inducen inflamación, estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo del calcio que se sabe se encuentran activadas por la concentración alta de glucosa en osteoblastos.

## 12. REFERENCIAS

1. Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(9):1649-57.
2. Goodyear SR, Gibson IR, Skakle JM, Wells RP, Aspden RM. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. *Bone.* 2009;44(5):899-907.
3. Eijken HJM. Human osteoblast differentiation and bone formation: growth factors, hormones and regulatory networks: Erasmus University Rotterdam; 2007.
4. Bellido T, Plotkin LI, Bruzzaniti A. Chapter 2 - Bone Cells A2 - Burr, David B. En: Allen MR, editor. *Basic and Applied Bone Biology.* San Diego: Academic Press; 2014. p. 27-45.
5. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(10):1714-25.
6. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(4):219-27.
7. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(6):846-52.
8. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(3):233-45.
9. Bonewald LF. The role of the osteocyte in bone and nonbone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2017;46(1):1-18.
10. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(3):171-80.
11. Abu-Amer Y. NF-kappaB signaling and bone resorption. *Osteoporos Int.* 2013;24(9):2377-86.
12. González Macías J, Olmos Martínez J. Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2010;2:5-17.
13. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746.
14. Roy B. Biomolecular basis of the role of diabetes mellitus in osteoporosis and bone fractures. *World J Diabetes.* 2013;4(4):101-13.
15. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):549-53.
16. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and its effect on bone and fracture healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(5):327-35.
17. Wu YY, Yu T, Zhang XH, Liu YS, Li F, Wang YY, et al. 1,25(OH)2D3 inhibits the deleterious effects induced by high glucose on osteoblasts through undercarboxylated osteocalcin and insulin signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012;132(1-2):112-9.
18. Triana-Mantilla ME. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 2001;2(2):131-41.
19. IDF. *IDF Diabetes Atlas.* 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.
20. INEGI. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2015.
21. Hernandez-Avila M, Gutierrez JP, Reynoso-Noveron N. [Diabetes mellitus in Mexico. Status of the epidemic]. *Salud Publica Mex.* 2013;55 Suppl 2:S129-36.
22. ADA. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2017;40(Supplement 1):S11-S24.
23. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am.* 2015;99(1):1-16.
24. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 2005;115(3):485-91.



25. Shanbhogue VV, Mitchell DM, Rosen CJ, Bouxsein ML. Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(2):159-73.
26. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res.* 2007;22(9):1317-28.
27. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(4):208-19.
28. Schwartz AV. Diabetes mellitus: does it affect bone? *Calcif Tissue Int.* 2003;73(6):515-9.
29. Adil C, Aydin T, Taspinar O, Kiziltan H, Eris AH, Hocaoglu IT, et al. Bone mineral density evaluation of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Phys Ther Sci.* 2015;27(1):179-82.
30. Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmus L, D'Erasmus E. Bone damage in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(11):1151-7.
31. Hamann C, Kirschner S, Gunther KP, Hofbauer LC. Bone, sweet bone--osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(5):297-305.
32. Rahman MM, Cibere J, Anis AH, Goldsmith CH, Kopec JA. Risk of type 2 diabetes among osteoarthritis patients in a prospective longitudinal study. *Int J Rheum Dis.* 2014;2014.
33. Paraschiv C, Covalea C, Miron E, Ghiuru R, Esanu I, Manea P, et al. Clinical forms of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Oral Rehabil.* 2014;6(1).
34. Farr JN, Khosla S. Determinants of bone strength and quality in diabetes mellitus in humans. *Bone.* 2016;82:28-34.
35. Okazaki R, Inoue D. Mechanism for the Development of Bone Disease in Diabetes: Abnormal Glucose Metabolism. En: *Musculoskeletal Disease Associated with Diabetes Mellitus: Springer;* 2016. p. 43-61.
36. Kwon H, Lim W, Kim J, Jeon S, Kim S, Karna S, et al. Effect of 635 nm irradiation on high glucose-boosted inflammatory responses in LPS-induced MC3T3-E1 cells. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):717-24.
37. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335-44.
38. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(4):509-19.
39. Garcia-Hernandez A, Arzate H, Gil-Chavarria I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone.* 2012;50(1):276-88.
40. Jeromson S, Gallagher IJ, Galloway SD, Hamilton DL. Omega-3 fatty acids and skeletal muscle health. *Mar Drugs.* 2015;13(11):6977-7004.
41. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(6):674-88.
42. Kruger MC, Coetzee M, Haag M, Weiler H. Long-chain polyunsaturated fatty acids: selected mechanisms of action on bone. *Prog Lipid Res.* 2010;49(4):438-49.
43. Schuchardt JP, Huss M, Stauss-Grabo M, Hahn A. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur J Pediatr.* 2010;169(2):149-64.
44. Lauritzen L, Brambilla P, Mazzocchi A, Harslof LB, Ciappolino V, Agostoni C. DHA effects in brain development and function. *Nutrients.* 2016;8(1).
45. Cottin SC, Sanders TA, Hall WL. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc.* 2011;70(2):215-31.
46. Hogstrom M, Nordstrom P, Nordstrom A. n-3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO2 Study. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(3):803-7.
47. Fallon EM, Nazarian A, Nehra D, Pan AH, O'Loughlin AA, Nose V, et al. The effect of docosahexaenoic acid on bone microstructure in young mice and bone fracture in neonates. *J Surg Res.* 2014;191(1):148-55.
48. Coetzee M, Haag M, Kruger MC. Effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on differentiation and mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(1):3-11.

49. Moon H-J, Kim T-H, Byun D-W, Park Y. Positive correlation between erythrocyte levels of n-3 polyunsaturated fatty acids and bone mass in postmenopausal Korean women with osteoporosis. *Ann Nutr Metab.* 2012;60(2):146-53.
50. Tabbaa M, Golubic M, Roizen MF, Bernstein AM. Docosahexaenoic acid, inflammation, and bacterial dysbiosis in relation to periodontal disease, inflammatory bowel disease, and the metabolic syndrome. *Nutrients.* 2013;5(8):3299-310.
51. Kaneki H, Takasugi I, Fujieda M, Kiri M, Mizuochi S, Ide H. Prostaglandin E2 stimulates the formation of mineralized bone nodules by a cAMP-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial osteoblasts. *J Cell Biochem.* 1999;73(1):36-48.
52. Saponitzky I, Weinreb M. Differential effects of systemic prostaglandin E2 on bone mass in rat long bones and calvariae. *J Endocrinol.* 1998;156(1):51-7.
53. Machwate M, Harada S, Leu C, Seedor G, Labelle M, Gallant M, et al. Prostaglandin receptor EP4 mediates the bone anabolic effects of PGE2. *Mol Pharmacol.* 2001;60(1):36-41.
54. Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo J-T, et al. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol.* 2004;172(4):2504-10.
55. Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int.* 2006;17(10):1514-23.
56. McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol.* 2001;2:16.
57. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S241-5.
58. Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications.* 2010;24(5):334-44.
59. Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009;15(10):468-77.
60. Zhang Y, Yang JH. Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2013;114(11):2595-602.
61. Arai M, Shibata Y, Pugdee K, Abiko Y, Ogata Y. Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *IUBMB Life.* 2007;59(1):27-33.
62. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(1):197-207.
63. Yuan J, Akiyama M, Nakahama K, Sato T, Uematsu H, Morita I. The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010;92(1-4):85-90.
64. Darlington LG, Stone TW. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr.* 2001;85(3):251-69.
65. Bhattacharya A, Rahman M, Sun D, Fernandes G. Effect of fish oil on bone mineral density in aging C57BL/6 female mice. *J Nutr Biochem.* 2007;18(6):372-9.
66. Cohen SL, Moore AM, Ward WE. Flaxseed oil and inflammation-associated bone abnormalities in interleukin-10 knockout mice. *J Nutr Biochem.* 2005;16(6):368-74.
67. Watkins BA, Li Y, Lippman HE, Feng S. Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003;68(6):387-98.
68. Cifuentes-Mendiola SE. 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. Tlantepantla de Baz, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
69. Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol Res.* 2008;57(6):451-5.

70. Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(5):2252-9.
71. Yang YC, Lii CK, Wei YL, Li CC, Lu CY, Liu KL, et al. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF-kappaB pathways. *J Nutr Biochem.* 2013;24(1):204-12.
72. Tullberg-Reinert H, Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor  $\beta$ 2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol.* 1999;112(4):271-6.
73. Luppen CA, Smith E, Spevak L, Boskey AL, Frenkel B. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J Bone Miner Res.* 2003;18(7):1186-97.
74. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
75. Bourrat C, Radisson J, Chavassieux P, Azzar G, Roux B, Meunier PJ. Activity increase after extraction of alkaline phosphatase from human osteoblastic membranes by nonionic detergents: influence of age and sex. *Calcif Tissue Int.* 2000;66(1):22-8.
76. Buell MV, Lowry OH, Roberts NR, Chang ML, Kappahn JI. The quantitative histochemistry of the brain. V. Enzymes of glucose metabolism. *J Biol Chem.* 1958;232(2):979-93.
77. Figueiredo M, Gamelas J, Martins A. Characterization of bone and bone-based graft materials using FTIR spectroscopy. *Infrared Spectroscopy-Life and Biomedical Sciences: InTech;* 2012.
78. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;2010(6):pdb. prot5439.
79. Nudelman F, Lausch AJ, Sommerdijk NA, Sone ED. In vitro models of collagen biomineralization. *J Struct Biol.* 2013;183(2):258-69.
80. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone.* 2016;82:42-9.
81. Wuttke M, Muller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36839-48.
82. Millan JL, Whyte MP. Alkaline phosphatase and hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(4):398-416.
83. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues. *Mol Med Rep.* 2015;11(5):3212-8.
84. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 2013;1:45-9.
85. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1992;7(2):235-46.
86. Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem.* 2006;99(2):411-24.
87. Cunha JS, Ferreira VM, Maquigussa E, Naves MA, Boim MA. Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell Tissue Res.* 2014;358(1):249-56.
88. Zayzafoon M, Botolin S, McCabe LR. P38 and activating transcription factor-2 involvement in osteoblast osmotic response to elevated extracellular glucose. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37212-8.
89. Shi P, Liu H, Deng X, Jin Y, Wang Q, Liu H, et al. Label-free nonenzymatic glycation monitoring of collagen scaffolds in type 2 diabetic mice by confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Opt.* 2015;20(2):27002.
90. Yuen A, Laschinger C, Talior I, Lee W, Chan M, Birek J, et al. Methylglyoxal-modified collagen promotes myofibroblast differentiation. *Matrix Biol.* 2010;29(6):537-48.
91. Casado-Diaz A, Santiago-Mora R, Dorado G, Quesada-Gomez J. The omega-6 arachidonic fatty acid, but not the omega-3 fatty acids, inhibits osteoblastogenesis and induces adipogenesis of human mesenchymal stem cells: potential implication in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2013;24(5):1647-61.

92. Vincent K, Durrant MC. A structural and functional model for human bone sialoprotein. *J Mol Graph Model*. 2013;39:108-17.
93. Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2008;205(5):1145-53.
94. Alford AJ, Hankenson KD. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*. 2006;38(6):749-57.
95. Farhat GN, Strotmeyer ES, Newman AB, Sutton-Tyrrell K, Bauer DC, Harris T, et al. Volumetric and areal bone mineral density measures are associated with cardiovascular disease in older men and women: the health, aging, and body composition study. *Calcif Tissue Int*. 2006;79(2):102-11.
96. Green KH, Wong SC, Weiler HA. The effect of dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on femur mineral density and biomarkers of bone metabolism in healthy, diabetic and dietary-restricted growing rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004;71(2):121-30.
97. Poulsen RC, Wolber FM, Moughan PJ, Kruger MC. Long chain polyunsaturated fatty acids alter membrane-bound RANK-L expression and osteoprotegerin secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2008;85(1-2):42-8.
98. Deshmukh P, Unni S, Krishnappa G, Padmanabhan B. The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys Rev*. 2017;9(1):41-56.
99. Gruber F, Ornelas CM, Karner S, Narzt MS, Nagelreiter IM, Gschwandtner M, et al. Nrf2 deficiency causes lipid oxidation, inflammation, and matrix-protease expression in DHA-supplemented and UVA-irradiated skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2015;88(Pt B):439-51.
100. Zhang, Wang S, Mao L, Leak RK, Shi Y, Zhang W, et al. Omega-3 fatty acids protect the brain against ischemic injury by activating Nrf2 and upregulating heme oxygenase 1. *J Neurosci*. 2014;34(5):1903-15.
101. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*. 2014;28(3):1317-30.
102. Wang F, Pu C, Zhou P, Wang P, Liang D, Wang Q, et al. Cinnamaldehyde prevents endothelial dysfunction induced by high glucose by activating Nrf2. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(1):315-24.
103. Zhong ZY, Tang Y. Upregulation of periostin prevents high glucose-induced mitochondrial apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(1):71-80.
104. Zhou L, Xu DY, Sha WG, Shen L, Lu GY, Yin X, et al. High glucose induces renal tubular epithelial injury via Sirt1/NF-kappaB/microR-29/Keap1 signal pathway. *J Transl Med*. 2015;13:352.
105. Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*. 1996;45(4):471-7.
106. Chao XD, Ma YH, Luo P, Cao L, Lau WB, Zhao BC, et al. Up-regulation of heme oxygenase-1 attenuates brain damage after cerebral ischemia via simultaneous inhibition of superoxide production and preservation of NO bioavailability. *Exp Neurol*. 2013;239:163-9.
107. Sun J, Ren X, Simpkins JW. Sequential upregulation of superoxide dismutase 2 and heme oxygenase 1 by tert-butylhydroquinone protects mitochondria during oxidative stress. *Mol Pharmacol*. 2015;88(3):437-49.
108. Shah A, Xia L, Goldberg H, Lee KW, Quaggin SE, Fantus IG. Thioredoxin-interacting protein mediates high glucose-induced reactive oxygen species generation by mitochondria and the NADPH oxidase, Nox4, in mesangial cells. *J Biol Chem*. 2013;288(10):6835-48.

