
TRABAJO ORIGINAL

La diabetes altera el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea. Efectos del tratamiento con metformina

Diabetes Decreases the Osteogenic Potential of Bone Marrow Progenitor Cells. Effects of Treatment with Metformin

Tolosa MJ, Chuguransky SR, Schurman L, Sedlinsky C, Cortizo AM¹, McCarthy AD, Molinuevo MS

Grupo de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (GIOMM). Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 115 (1900). La Plata

RESUMEN

En este trabajo, estudiamos el efecto de una Diabetes inducida por destrucción parcial de la masa de células beta pancreáticas, sobre el compromiso osteogénico de células progenitoras de médula ósea (CPMO), y su modulación por el tratamiento oral con Metformina. Para ello utilizamos ratas Sprague Dawley, divididas en cuatro grupos: controles [C], controles tratadas con Metformina [M], diabéticas [D], y diabéticas tratadas con Metformina [DM]. La inducción de Diabetes se realizó, por inyección intraperitoneal sucesiva de ácido nicotínico y estreptozotocina. Sobre los cultivos de CPMO se evaluó la actividad específica de Fosfatasa Alcalina (FAL) y la producción de Colágeno tipo 1 (Col-1) en estado basal y en medio de diferenciación osteogénico luego de 15 días. A los 21 días, se evaluaron los depósitos de mineral extracelular. La FAL y el Col-1 de CPMO basales, no mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales. Al cabo de 15 días, las CPMO de ratas M mostraron un incremento en el Col-1 de 122 % respecto de C; D 30 % respecto de C y DM 68 % respecto de C. La FAL expresó un 171 % para M, 34 % para D; y 125 % para DM todos respecto de C. Luego de 21 días, se observó una disminución en la mineralización de las CPMO de D (65 % respecto del grupo C). El tratamiento con metformina incrementó la mineralización de las CPMO en todos los casos. En conclusión, en nuestro modelo experimental de Diabetes, ésta disminuye el potencial osteogénico de las CPMO, un efecto que es parcialmente revertido por el tratamiento oral con Metformina. Estos hallazgos podrían explicar, al menos en parte, las alteraciones óseas descriptas en el hueso asociadas con la Diabetes. **Rev Argent Endocrinol Metab 49:70-76, 2012**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: diabetes mellitus, células progenitoras de médula ósea, hueso, metformina

ABSTRACT

Diabetes mellitus is associated with an increased incidence of skeletal abnormalities, resulting in lower bone formation and/or remodeling. Osteopenia, osteoporosis and an increased incidence of non-traumatic fractures has been particularly observed in patients with type 2 diabetes. Recently, we have demonstrated that metformin has in vitro and in vivo osteogenic effects: (a) it stimulates the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts in culture, and (b) in non-diabetic rats, it increases the repair of minimal bone lesions and improves femoral trabecular bone microarchitecture. In this study, we evaluated in rats the effect of diabetes induction by a partial destruction of pancreatic beta cells, on the osteogenic commitment of bone marrow progenitor cells (BMPC), and the modulation of this effect by orally administered metformin. We used young male Sprague Dawley rats (200 g), divided into four groups: untreated non-diabetic controls [C], non-diabetic rats treated for 2 weeks with metformin administered in drinking water (100 mg/kg/day) [M], untreated diabetic rats [D], and diabetic rats treated for 2 weeks with metformin (100 mg/kg/day) [DM]. Induction of Diabetes was performed one week prior to treatment with

Recibido: 05-03-2012 Aceptado: 12-03-2012

Correspondencia: Ana María Cortizo, GIOMM, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115, (1900), La Plata, Bs. As. Argentina. Tel:54-221-4235333 int 33 - e-mail: amcorti@yahoo.com.ar

metformin, by successive intraperitoneal injections with 75 mg/kg body weight of nicotinic acid and 60 mg/kg body weight of streptozotocin. At the end of all treatments, blood samples were obtained to confirm the development of Diabetes, after which the animals were sacrificed by cervical dislocation under anesthesia. Femora and/or tibiae were dissected, and bone marrow cells were collected by flushing the bone diaphysal canal with Dulbecco's modified essential medium (DMEM) under sterile conditions. Adherent cells were grown to confluence in DMEM-10 % fetal bovine serum (FBS), after which we assessed alkaline phosphatase specific activity (ALP) by an enzymatic kinetic method, and type 1 collagen production (Col-1) by a Sirius Red colorimetric method (basal osteoblastic differentiation of BMPC). Subsequently, BMPC were submitted to an osteogenic induction for 15 days with an osteogenic medium (DMEM-10 % FBS containing ascorbic acid and sodium beta-glycerophosphate), after which ALP and Col-1 were evaluated. Basal ALP activity and type 1 collagen production (BMPC without osteogenic differentiation) showed no significant differences between the four experimental groups. After 15 days of culture in osteogenic medium, BMPC from control rats increased their expression of ALP (5 times compared to baseline) and collagen production (11 times compared to baseline). BMPC from diabetic rats after 15 days culture in osteogenic medium, also showed a significant (although smaller) increase in ALP (2-3 fold over basal activity) and collagen production (4-fold compared to baseline). BMPC obtained from rats treated with metformin (groups M and DM) and submitted to osteogenic induction for 15 days, showed an approximately 2-4-fold increase in both ALP and Col-1 (when compared with groups C and D, respectively). After 21 days of osteogenic induction, a decrease was observed in the mineralization of BMPC obtained from group D (65 % of that for group C). Treatment with metformin increased the mineralizing capacity of BMPC in all cases, including a reversal of the inhibitory effect of Diabetes on this parameter. In conclusion, we have found that our model of Diabetes reduces the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells, and that this effect is partially reverted by orally administered metformin. These findings could explain, at least in part, the bone alterations that have been associated with Diabetes mellitus. **Rev Argent Endocrinol Metab 49:70-76, 2012**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: diabetes mellitus, bone marrow progenitor cells, bone, metformin

INTRODUCCIÓN

La Diabetes mellitus es una enfermedad que afecta al 5 % de la población. Está caracterizada por hiperglucemia crónica, la cual es causada por una producción o acción deficiente de insulina. A largo plazo, la Diabetes se asocia con una elevada incidencia de complicaciones macrovasculares (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular y vascular periférico), microvasculares (nefropatía, retinopatía, polineuropatías) y mixtas (pie diabético, alteraciones articulares y óseas)⁽¹⁾. En particular, frecuentemente se observan alteraciones en el metabolismo óseo con desbalances en los niveles de calcio y fosfato, una disminución del contenido mineral y de la densidad mineral ósea (DMO), osteopenia, aumento del riesgo de fracturas, y una disminución en la reparación de lesiones óseas⁽²⁾.

La aparición y progresión de las complicaciones crónicas de la Diabetes puede explicarse, en parte, por la acumulación irreversible de productos de glicación avanzada (AGEs) sobre proteínas de vida media larga, como el colágeno⁽³⁾. Nosotros, hemos demostrado previamente que la acumulación de AGEs sobre el colágeno de tipo 1 (componente mayoritario de la matriz ósea), reduce la capacidad osteogénica

de osteoblastos en cultivo⁽⁴⁾. De ocurrir "in vivo", ésto podría generar una disminución tanto de la formación ósea como del proceso de recambio óseo, con una consecuente reducción en la calidad del hueso.

La metformina es uno de los agentes más comúnmente usados en el tratamiento de síndromes asociados a insulinoresistencia, como son la Diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico y el síndrome de ovario poliquístico. Este fármaco es una biguanida insulinosensibilizante, que disminuye los niveles glucémicos sin afectar en forma directa la secreción de insulina⁽⁵⁾.

Nuestro grupo ha descrito previamente que la metformina ejerce efectos osteogénicos directos sobre osteoblastos en cultivo, promoviendo su proliferación, diferenciación y mineralización⁽⁶⁾. En otros experimentos "in vitro", demostramos que la metformina previene los efectos deletéreos de los AGEs sobre osteoblastos⁽⁷⁾. Recientemente encontramos que esta biguanida administrada por vía oral en ratas no diabéticas, promueve la diferenciación osteoblástica de células progenitoras de médula ósea; y mejora la celularidad y microarquitectura femoral^(8,9) en ratas diabéticas y no diabéticas e incrementa la reparación de lesiones óseas inducidas⁽⁸⁾.

El hueso es un tejido dinámico que continuamente es modelado y remodelado, mediante el acoplamiento preciso y localizado de los procesos de resorción y formación ósea. Ésto requiere la interacción de diferentes tipos celulares como osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo, células progenitoras de médula ósea (CPMO), macrófagos y osteoclastos, en un proceso regulado por una variedad de factores bioquímicos y mecánicos⁽¹⁰⁾.

Las células progenitoras presentes en el microambiente de la médula ósea poseen la capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares, como osteoblastos, condrocitos y adipocitos^(11,13). En este contexto las condiciones metabólicas de la médula ósea pueden determinar el balance biológico entre la osteoblastogénesis y la adipogénesis. Diversos factores endógenos como hormonas y citoquinas, o tratamientos exógenos con ciertos fármacos, pueden afectar este delicado balance alterando la relación entre osteoblastos y adipocitos en la médula ósea⁽⁸⁾.

En este trabajo nos propusimos investigar, empleando un modelo animal, el efecto de la inducción de una Diabetes con destrucción parcial de la masa de células beta pancreáticas, sobre el compromiso osteogénico de células progenitoras de médula ósea (CPMO), así como la posible modulación de este efecto por un tratamiento oral con metformina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo Animal: Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho jóvenes (200-220 gr) mantenidas en un bioterio climatizado (23 °C) con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, alimentados con alimento balanceado estándar y agua "ad libitum". Todos los ensayos con animales fueron realizados de acuerdo a la Guía de Manejo y Uso de Animales de Laboratorio⁽¹⁴⁾, bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales -Disposición ANMAT 5330/97- e internacionales. Asimismo, se tuvieron en cuenta las indicaciones de la guía del NIH para animales de experimentación (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>).

Los animales fueron divididos en cuatro grupos: ratas controles no diabéticas (sin tratamiento) [C], no diabéticas tratadas durante 2 semanas con metformina en el agua de bebida (100 mg/kg/día) [M] (Química Montpellier S.A.), ratas con Diabetes inducida por destrucción parcial de las células beta pancreáticas, sin tratamiento con metformina [D], y diabéticas tratadas 2 semanas con metformina (100 mg/kg/día) [DM]. La inducción de Diabetes se

realizó una semana antes de iniciar el tratamiento con metformina, por inyecciones intraperitoneales sucesivas de 75 mg/kg de ácido nicotínico y 60 mg/kg de estreptozotocina⁽¹⁵⁾. Al finalizar todos los tratamientos se obtuvieron muestras de sangre para confirmar el desarrollo de Diabetes, luego de lo cual los animales se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia.

Parámetros sanguíneos: previo al sacrificio, se extrajo sangre bajo anestesia por punción cardíaca sin someter a los animales a ayuno, y se separó el suero por centrifugación. En el suero se evaluaron, empleando equipos comerciales, los siguientes parámetros: glucosa (Wiener Lab, Argentina), triglicéridos (Wiener Lab, Argentina), colesterol (Wiener Lab, Argentina), insulina (ELISA para insulina de rata, ALPCO, USA) y fructosamina (BioSystems, España).

Aislamiento y cultivo de CPMO: Las CPMO se obtuvieron por medio del lavado con medio de cultivo del canal medular diafisario de fémures y/o tibias de las ratas de todas las condiciones: C, M, D, DM⁽⁸⁾. Las células adherentes fueron cultivadas en "Dulbecco's modified essential medium" (DMEM) adicionado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB; Natocor, Córdoba, Argentina) y penicilina/estrep-tomicina, a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ hasta alcanzar la confluencia. A partir de este momento las células fueron replaquetadas en platos de cultivo, para ser diferenciadas a osteoblastos. **Diferenciación osteogénica de las CPMO:** Luego de que las células llegaran a confluencia, se indujo su diferenciación a osteoblastos usando un medio de diferenciación conteniendo 25 mg/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β-glicerolfosfato durante 0, 15 o 21 días. Tanto a 0 como a 15 días se evaluó la actividad de Fosfatasa Alcalina (FAL) y la producción de colágeno tipo 1 (Col - 1); y luego de 21 días se cuantificó la formación de nódulos de mineralización.

Actividad de fosfatasa alcalina: La monocapa de células se lavó con PBS y se solubilizó en Triton-X100 al 0,1 %. Una alícuota del extracto celular se usó para determinar proteínas por el método de Bradford⁽¹⁶⁾. La actividad de Fosfatasa Alcalina se midió espectrofotométricamente utilizando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como sustrato. El p-nitrofenol (producto coloreado de la hidrólisis) se determinó por absorbancia a 405nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en buffer pH 10,4 durante un período de tiempo predeterminado⁽¹⁷⁾. Los resultados se expresaron como nmoles p-NPP/ mg de Proteína/ minuto.

Producción de colágeno tipo 1: La producción de colágeno tipo 1 se determinó utilizando un microensayo colorimétrico mediante la técnica de Sirius Red⁽¹⁸⁾: Las células se fijaron con solución fijadora de Bouin (Ácido. Pírico: formaldehído 35 %: Acido. Acético glacial- 15:5:1) durante 1h. Se lavó la monocapa celular con Ácido Clorhídrico 0,1 N y se tiñó con una solución de Sirius Red por 1h. El material teñido se disolvió en 1 ml de Hidróxido de Sodio 0,1 N y se midió la absorbancia a 550 nm. Los resultados se expresaron como μg de colágeno / 100 μg de proteína.

Mineralización: Los depósitos de calcio extracelular (nódulos de mineralización) se evaluaron luego de 21 días de cultivo en un medio de diferenciación osteoblástico. Luego de fijar con formalina y teñir con Rojo de Alizarina S⁽¹⁹⁾, los depósitos de calcio teñidos se extrajeron con 1 ml de solución de hidróxido de sodio 0,1N y la densidad óptica se midió a 548 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) del basal.

Análisis estadístico: Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por el test de ANOVA (one-way) y el test de Turkey. Se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efecto de la diabetes y de la metformina sobre los parámetros bioquímicos.

El tratamiento con ácido nicotínico y estreptozotocina produjo un estado metabólico compatible con una Diabetes con destrucción parcial de las células beta - pancreáticas. La tabla I muestra los resultados de los parámetros sanguíneos posprandiales promedio (glucemias, trigliceridemias, colesterolemia, insulinemia y fructosamina) para cada uno de los cuatro grupos de ratas

Los valores de glucemia mostraron un incremento significativo en el grupo diabético (D) (270 %) respecto del control. El grupo que solo recibió metformina (M) no presentó cambios significativos respecto del grupo control; mientras que en el grupo diabético tratado con metformina (DM) se observó una reversión parcial del efecto de la diabetes (185 % respecto del control), lo que se correlaciona con los efectos de esta droga normoglucemiante, así como con la existencia de una reserva pancreática de insulina (y posiblemente con resistencia periférica a su acción) en este modelo de Diabetes.

Este mismo patrón se observa en las trigliceridemias: el grupo D presentó un aumento significativo (200 % respecto el control), en tanto el grupo DM normalizó completamente el valor de triglicéridos en sangre.

Los valores de insulinemia muestran que las ratas diabéticas tenían una disminución marcada en su secreción aunque con valores mensurables. El tratamiento con metformina no modificó significativamente la insulinemia, tanto en animales diabéticos como no diabéticos (Tabla 1).

La evaluación de la fructosamina, una medida de la glicación no enzimática de proteínas séricas, demostró un aumento significativo en el grupo D

TABLA I. Parámetros Bioquímicos séricos (no en ayunas) en los diferentes grupos experimentales

Grupo	Glucemia (mg/ml)	Insulinemia (ng/ml)	Triogliceridemia (mg/ml)	Fructosamina ($\mu\text{mol/l}$)	Colesterolemia (mg/ml)
Control	168 \pm 8	1,26 \pm 0,17	62 \pm 7	147 \pm 26	46 \pm 2
Metformina	176 \pm 10	1,09 \pm 0,3	52 \pm 7 ^c	190 \pm 13	45 \pm 1
Diabéticas	453 \pm 40 ^a	0,20 \pm 0,09 ^a	252 \pm 34 ^{c,d}	239 \pm 12 ^e	51 \pm 5
Diabéticas + Metformina	309 \pm 19 ^a	0,37 \pm 0,12 ^b	58 \pm 15	236 \pm 16 ^e	56 \pm 7

Los valores se expresan como la media \pm SEM de las determinaciones.

^a $p < 0,001$ vs. Control

^b $p < 0,05$ vs. Metformina

^c $p < 0,05$ vs. Control

^d $p < 0,05$ vs. Diabética

^e $p < 0,01$ vs. Control

(160 % respecto de C), el cual no fue revertido por el tratamiento oral con metformina en el grupo de ratas diabéticas (Tabla 1).

En cuanto al colesterol no hubo diferencias significativas en ninguno de los cuatro grupos.

Efectos ex vivo en las CPMO de la diabetes y el tratamiento con metformina.

En condiciones basales (células sin diferenciar), los marcadores osteoblásticos expresados en las CPMO (producción de colágeno tipo 1 (Gráfico 1) y actividad enzimática de fosfatasa alcalina (gráfico 2)) no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en cultivo.

Sin embargo, luego de 15 días de diferenciación osteoblástica, el grupo D mostró una disminución significativa respecto del grupo C en la producción de colágeno tipo 1 (30 % del C). Por otro lado, el tratamiento oral con metformina indujo un aumento significativo en la expresión de colágeno en el grupo M (122 % del C), mientras que en el grupo DM se generó una reversión parcial del efecto de la Diabetes (68 % del C) (Gráfico 1).

Al cuantificar la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, se observó un patrón similar que para el colágeno: el grupo D expresó una importante disminución de este parámetro (34 % respecto del grupo C) y el grupo M evidenció un notable incremento en este marcador osteoblástico (171 %

respecto de C). Por último, en el grupo DM la metformina mostró una reversión significativa de los efectos de la Diabetes sobre la FAL (125 % respecto de C) (Gráfico 2).

Luego de 21 días de diferenciación osteoblástica se cuantificaron los depósitos de nódulos de mineralización (Gráfico 3; Figura 1). Se observó una disminución en los depósitos de mineral en el grupo D (65 % del C) y un aumento en los depósitos de nódulos de mineralización del grupo M (130 % respecto de C). Por último, en el grupo DM se observó que el tratamiento con metformina revirtió los efectos de la Diabetes sobre este parámetro (140 % respecto del control) (Gráfico 3).

DISCUSIÓN

Nuestras observaciones previas y actuales sugieren que la metformina puede inducir el compromiso de células osteoprogenitoras hacia el linaje osteoblástico y a la formación de hueso, ejerciendo efectos directos sobre células óseas. Se ha reportado previamente que el mecanismo de acción de la metformina puede ocurrir por diversas vías de señalización: MAPK, e/iNOS y AMPK, así como también incrementando la expresión del factor de transcripción específico de osteoblastos Runx2/Cbfa1^(7,8).

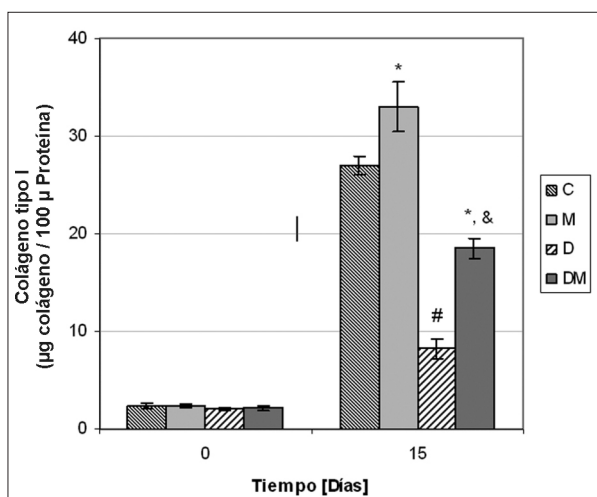


Gráfico 1. Producción de colágeno tipo 1. Efecto de la diabetes y del tratamiento oral con metformina sobre la capacidad de las CPMO de producir colágeno tipo 1. Las CPMO aisladas de cada grupo de ratas se cultivaron a diferentes tiempos en medio osteogénico como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como: μg de colágeno / $100\mu\text{g}$ de proteína, los cuales se muestran como la media \pm SEM, $n = 12$. * $p < 0,01$ vs. C; # $p < 0,001$ vs. C; & $p < 0,001$ vs. D.

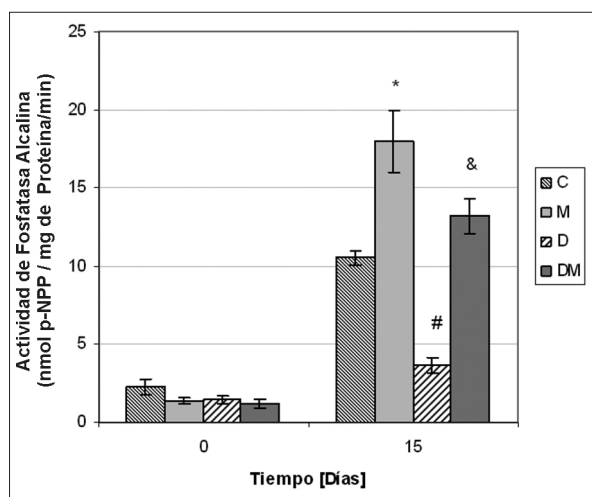


Gráfico 2. Actividad de Fosfatasa Alcalina. Efecto de la Diabetes y del tratamiento oral con metformina sobre la Actividad específica de fosfatasa alcalina (FAL). Las CPMO aisladas de cada grupo de ratas se cultivaron durante diferentes períodos de tiempo en medio osteogénico. La actividad específica de FAL se expresa como: $\text{nmol p-NPP} / \text{mg de proteína} / \text{min}$, y se muestra como la media \pm SEM. * $p < 0,001$ vs. C; # $p < 0,01$ vs. C; & $p < 0,001$ vs. D.

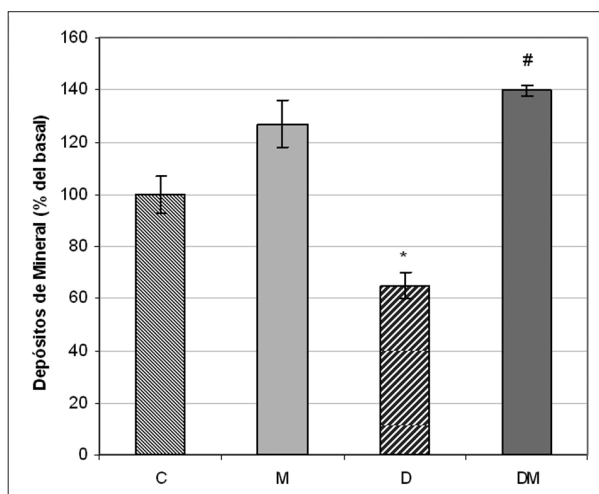


Gráfico 3. Efecto de la Diabetes y del tratamiento oral con metformina sobre la capacidad de las CPMO de mineralizar la matriz extracelular (depósitos de mineral). Las CPMO obtenidas de cada grupo de ratas se cultivaron durante 21 días en medio osteogénico. Los resultados se expresan como % del basal, y se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,001$ vs. D.

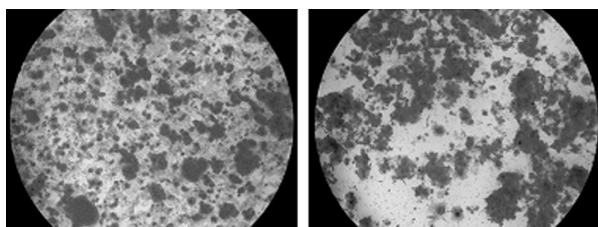


Figura 1. Nódulos de mineral: La monocapa celular se fijó con formalina y se tiñó con Rojo de Alizarina, luego de 21 días de cultivo en medio osteogénico. Objetivo: $\times 10$.

En este trabajo, a las ratas se les indujo Diabetes mediante un tratamiento con estreptozotocina y nicotinamida. En este modelo de destrucción parcial de la masa de células beta pancreáticas, la nicotinamida previene parcialmente la depleción de NAD inducida por la estreptozotocina sobre las células beta, disminuyendo así su efecto tóxico⁽¹⁵⁾. De esta manera, se observó una disminución parcial en su secreción de insulina. Los parámetros bioquímicos: glucemia, trigliceridemia, insulínemia y fructosamina en sangre fueron compatibles con el estado diabético descrito previamente. En el caso de la fructosamina no se observó una reversión a los niveles normales luego del tratamiento con metformina, probablemente debido a la vida media de la albúmina, en relación con el tiempo del ensayo.

Según Owen⁽²⁰⁾ debido a las diferencias en el metabolismo de la droga entre las especies, son necesarias concentraciones altas de metformina en rata, para alcanzar concentraciones plasmáticas similares a las encontradas en humanos, y así ejercer su efecto normoglucémico en ratas diabéticas. De esta manera, se seleccionó la dosis de metformina a utilizar en los estudios “in vivo”.

En nuestro modelo de Diabetes, se observó una disminución del potencial osteogénico de las CPMO, efecto que fue parcial o totalmente revertido por el tratamiento oral con metformina, como se evidenció en la producción de colágeno tipo 1, actividad específica de fosfatasa alcalina y en la producción de nódulos de mineral.

Los productos de glicación avanzada (AGEs) se forman por reacciones de glicosilación no enzimática entre grupos amino de proteínas, lípidos, o ácidos nucleicos, con azúcares reductores o intermediarios carbonílicos. Estas reacciones ocurren aceleradamente en situaciones como la Diabetes descompensada, en el síndrome metabólico y durante el envejecimiento fisiológico. Nuestro grupo y otros investigadores hemos descrito previamente que la interacción entre los AGEs y su receptor específico RAGE induce apoptosis de osteoblastos y de CPMO^(4,21). Dichas observaciones, así como nuestros presentes resultados sobre los efectos de la Diabetes experimental sobre el potencial osteogénico de CPMO, podrían explicar, al menos en parte, las alteraciones óseas observadas frecuentemente en pacientes con Diabetes mellitus.

Significativamente, hemos podido verificar en nuestro modelo de Diabetes con disminución en la reserva pancreática de insulina, que el tratamiento oral con metformina puede prevenir parcial o totalmente varios efectos antiosteogénicos de dicha patología metabólica. Este fármaco probablemente esté promoviendo la diferenciación osteoblástica de las CPMO, a través de la fosforilación/activación de AMPK y subsecuente inducción del factor de transcripción osteogénico Runx-2, como hemos demostrado previamente en ratas no diabéticas tratadas oralmente con metformina⁽⁸⁾.

Si nuestros resultados actuales pudieran extrapolarse a un entorno clínico, estarían indicando un mecanismo plausible para explicar el efecto protector óseo (reducción en la frecuencia de fracturas) que han reportado otros autores en estudios de corte con pacientes bajo tratamiento con metformina⁽²²⁾.

Agradecimientos: Estos estudios fueron parcialmente subsidiados por la Universidad Nacional de La Plata, Agencia Nacional de Promoción Científica y tecnológica (PICT1083), CONICET (PIP0035) y Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CICPBA). MJT es becario de la CICPBA, SRC es becaria de la ANPCYT, AMC es miembro de la Carrera de Investigador de la CICPBA, MSM es miembro de la Carrera de Investigador del CONICET y ADM es Profesor de la UNLP.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Brownlee M.** Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43:836-41, 1994
2. **Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC.** A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 52:1502-10, 2003
3. **McCarthy AD.** Glicación, glicoxidación y estrés carbonílico: relevancia en las complicaciones vasculares de la Diabetes Mellitus. *Rev Argent Endocrinol Metab* 37:141-63, 2000
4. **McCarthy AD, Etcheverry, S, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio D, Cortizo AM.** Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol* 2:16, 2001
5. **Strack T.** Metformin: a review. *Drugs Today (Barc)* 44:303-14, 2008
6. **Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L.** Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol* 536:38-46, 2006
7. **Schurman L, McCarthy AD, Sedlinsky C, Gangoiti MV, Arnol V, Bruzzone L, Cortizo AM.** Metformin reverts deleterious effects of advanced glycation end-products (AGEs) on osteoblastic cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116:333-40, 2008
8. **Molinuevo MS, Schurman L, McCarthy AD, Cortizo AM, Tolosa MJ, Gangoiti MV, Arnol V, Sedlinsky C.** Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res* 25:211-21, 2010
9. **Sedlinsky C, Molinuevo MS, Cortizo AM, Tolosa MJ, Felice JI, Sbaraglini ML, Schurman L, McCarthy AD.** Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol* 668:477-85, 2011
10. **Hill PA.** Bone remodelling. *Br J Orthod* 25:101-7, 1998
11. **Nuttall ME, Gimble JM.** Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 4:290-94, 2004
12. **Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F.** Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 295:395-406, 2004
13. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science, Osiris Therapeutics* 284:143-14, 1999
14. **Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals.** In: *The Biological Council of Animal Research and Welfare* Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992
15. **Tahara A, Matsuyama-Yokono A, Nakano R, Someya Y, Shibasaki M.** Hypoglycaemic effects of antidiabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103:560-68, 2008
16. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54, 1976
17. **Cortizo AM, Etcheverry SB.** Vanadium derivatives act as growth factor-mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol Cell Biochem* 145:97-102, 1995
18. **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 beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol* 112:271-76, 1999
19. **Ueno A, Kitase Y, Moriyama K, Inoue H.** MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biol* 20:347-55, 2001
20. **Owen MR, Doran E, Halestrap AP.** Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 348:607-14, 2000
21. **Kume S, Kato S, Yamagishi S, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, Okawa T, Kojiro M, Nagata K.** Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res* 20:1647-58, 2005
22. **Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L.** Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus and the impact of insulin and oral antidiabetic medications on relative fracture risk. *Diabetologia* 48:1292-99, 2005.