



Miranda Díaz C<sup>1</sup>, Giner García M<sup>1,2</sup>, Montoya García MJ<sup>2</sup>, Vázquez Gámez MA<sup>2</sup>, Moruno R<sup>2</sup>, Miranda García MJ<sup>1</sup>, Pérez Cano R<sup>1,2</sup>

1 Unidad de Osteoporosis. U.G.C. de Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Sevilla

2 Departamento de Medicina - Facultad de Medicina - Universidad de Sevilla

# Estudio génico (OPG, RANKL, Runx2 y receptores AGE) en cultivos de osteoblastos humanos de pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 y fractura de cadera. Influencia de los niveles de glucosa y AGEs

Correspondencia: Cristina Miranda Díaz - Unidad de Osteoporosis. U.G.C. de Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Avda. Dr. Fedriani, s/n - 41009 Sevilla (España)  
Correo electrónico: crismirandadiaz@yahoo.es

Fecha de recepción: 11/07/2011

Fecha de aceptación: 12/12/2011

*Trabajo becado por la SEIOMM para asistir al 32 Congreso de la ASBMR (Toronto, 2010)*

## Resumen

**Introducción:** La diabetes *mellitus* (DM) tipo 2 se asocia a un mayor riesgo de fractura osteoporótica. Se han señalado múltiples factores como posibles mecanismos responsables, entre ellos las alteraciones en el remodelado óseo que podrían estar inducidas por las variaciones de glucosa circulante o por la presencia de productos finales de glicosilación no oxidativa (AGEs). El objetivo del presente trabajo ha sido valorar si dichas variaciones generan alteraciones en la expresión de genes relacionados con la diferenciación y actividad osteoblástica (OPG, RANKL, Runx2 y AGER) en el cultivo primario de osteoblastos humanos (hOB).

**Material y método:** Han sido estudiados 12 pacientes pertenecientes a tres grupos: 4 con fractura osteoporótica, 4 con fractura osteoporótica y DM tipo 2 y 4 osteoartrosicos no osteoporóticos ni diabéticos (grupo control), con una edad media de:  $80 \pm 8$ ,  $84 \pm 10$  y  $66 \pm 11$  años, respectivamente. Se realizaron cultivos primarios de hOB a partir de hueso trabecular a los que se sometió a diferentes estímulos durante 24 h. El estudio génico se realizó mediante PCR *real-time*.

**Resultados:** La expresión génica de RANKL se vio aumentada en el grupo diabético, aunque no de manera significativa, en la condición de cultivo alta en glucosa y en la condición alta en glucosa suplementado con AGEs (1,9 y 4,6 veces mayor *vs.* condición control; 2,3 y 4,4 veces *vs.* grupo control, respectivamente). La ratio RANKL/OPG se mantuvo constantes en el grupo control, sin embargo en el grupo diabético se vio incrementada ante todas las condiciones experimentales. En el caso de Runx2 encontramos un incremento significativo de expresión en el grupo diabético con respecto al grupo control en la condición alta en glucosa y AGEs (OA =  $1,08 \pm 0,43$ ; OP+DM =  $3,33 \pm 0,73$ ;  $p = 0,039$ ). No se observaron cambios significativos en la expresión de OPG y AGER con respecto a la condición control, para ninguna de las condiciones de cultivo, en ninguno de los grupos de pacientes.

**Conclusiones:** La presencia de un ambiente hiperglicémico y AGEs altera la expresión génica de RANKL, ratio RANKL/OPG y Runx2 en cultivos de osteoblastos procedentes de pacientes diabéticos con fractura de cadera. Estas variaciones podrían generar alteraciones en el remodelado óseo que podría explicar, al menos en parte, la menor resistencia ósea y el aumento de incidencia de fracturas no traumáticas en estos pacientes.

**Palabras clave:** osteoporosis, fractura, diabetes *mellitus*, osteoblastos.



## Gene study (OPG, RANKL, Runx2 and AGE receptors) in human osteoblast cultures from patients with diabetes mellitus type 2 and hip fracture. Influence of glucose and AGE levels

### Summary

**Introduction:** Diabetes mellitus (DM) type 2 is associated with a higher risk of osteoporotic fracture. Many factors have been indicated as possible mechanisms responsible for this, among which are changes in bone remodelling which may be induced by variations in circulating glucose or by the presence of non-oxidative advanced glycosylation end products (AGEs). The aim of this work has been to evaluate whether these variations generate changes in the expression of genes related to osteoblast differentiation and activity (OPG, RANKL, Runx2 and AGER) in primary cultures of human osteoblasts (hOB).

**Material and methods:** 12 patients were studied, belonging to three groups: 4 with osteoporotic fracture, 4 with osteoporotic fracture and DM type 2, and 4 patients with osteoarthritis, but who were not osteoporotic or diabetic (control group), with an average age of  $80 \pm 8$ ,  $84 \pm 10$  and  $66 \pm 11$  years, respectively. Primary cultures of hOB from trabecular bone were carried out, to which were applied different stimuli over 24 hours. The gene study was carried out using real-time PCR.

**Results:** The genetic expression of RANKL was seen to increase in the diabetic group, although not to a significant degree, in the cultures which were high in glucose and high in glucose supplemented by AGEs (1.9 and 4.6 times higher vs control conditions; 2.3 and 4.4 times vs control group, respectively). The RANKL/OPG ratio stayed constant in the control group, however, in the diabetic group an increase was seen in all experimental conditions. In the case of Runx2 we found a significant increase in expression in the diabetic group with respect to the control group in the culture high in glucose and AGEs (OA =  $1.08 \pm 0.43$ ; OP+DM =  $3.33 \pm 0.73$ ;  $p = 0.039$ ). No significant changes in the expression of OPG and AGER with respect to the control condition were observed for any of the culture conditions, in any of the patient groups.

**Conclusions:** The presence of a hyperglycaemic environment and AGEs alters the genetic expression of RANKL, of the RANKL/OPG ratio and Runx2 in osteoblast cultures from diabetic patients with hip fractures. These variations could generate changes in bone remodelling which could explain, at least partly, the lower bone resistance and the increase in the incidence of non-traumatic fractures in these patients.

**Key words:** osteoporosis, fracture, diabetes mellitus, osteoblasts.

### Introducción

Las fracturas osteoporóticas tienen una elevada prevalencia en países desarrollados. Entre ellas, las de cadera son las más devastadoras por su elevada mortalidad y escaso número de pacientes que consiguen recuperar una actividad funcional que les permita ser independientes. La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica también frecuente en la población, con elevada morbilidad y mortalidad, cuya prevalencia aumenta con la edad, igual que ocurre con la osteoporosis<sup>1</sup>.

En los pacientes con DM tipo 2 (DM2) se ha podido comprobar que, a pesar de presentar valores de masa ósea incrementados, existe una incidencia de fracturas osteoporóticas de hasta 2,8 veces superior a la población general, postulándose que la propia enfermedad o las complicaciones que origina pueden alterar el remodelado óseo esquelético, afectando la formación y/o la resorción ósea y con ello la resistencia ósea<sup>2</sup>. Entre los mecanismos que se considera pueden estar implicados en esta menor resistencia ósea se incluyen: el déficit o resistencia a la insulina, la hiperglucemia a la que se ve sometido el hueso y el microambiente de la médula ósea, las mayores concen-

traciones de los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs) y su efectos sobre las proteínas de la matriz ósea<sup>3,4</sup>, la producción alterada de adipocinas y citoquinas y su efecto negativo sobre las células óseas y, finalmente, el daño que el sistema neuromuscular puede ejercer sobre el esqueleto, conduciendo a la mayor propensión a las caídas en estos pacientes<sup>5</sup>. A pesar de que son muchos los factores postulados, son escasos los estudios que analizan la importancia de cada uno de ellos, así como el mecanismo de acción íntimo sobre el deterioro del metabolismo óseo<sup>6,7</sup>.

En el proceso de formación ósea las señales que determinan la diferenciación, replicación y supervivencia de las células osteoblásticas van a ser críticas para un correcto metabolismo óseo. Entre estas señales van a ser determinantes genes incluidos en el sistema OPG/RANK/RANKL, otros como Runx2 y puede que también los responsables de receptores de productos finales de glicosilación no oxidativa (AGER). En la DM puede estar alterado el número de células formadoras de hueso, su actividad, así como la respuesta de estas células a factores locales o sistémicos que contribuyen al remodelado óseo<sup>8</sup>.



OPG/RANK/RANKL es el principal sistema de intercomunicación entre células de estirpe osteoclástica y osteoblástica, a través del cual actúan gran parte de los medicamentos sistémicos, citoquinas y factores de crecimiento que influyen en el remodelado óseo<sup>9</sup>.

Runx2 es uno de los factores de transcripción multifuncional que controla el desarrollo del esqueleto a través de la regulación de la diferenciación de condrocitos y osteoblastos, dirige a las células mesenquimales multipotenciales hacia el linaje osteoblástico<sup>10</sup> y desencadena la expresión de la mayoría de genes que codifican las proteínas de matriz extracelular. Ratones Runx2<sup>-/-</sup> muestran una falta total de hueso desde el nacimiento<sup>11</sup>.

El receptor para productos finales de la glicosilación (AGER) se une a una gran variedad de ligandos estructural y funcionalmente no emparentados, incluyendo a los AGEs, como la pentosidina y la carboximetil-lisina. La unión de AGEs-AGER promueve una sobreexpresión de AGER, llevando a un estado permanente de activación celular, lo cual se cree que contribuye a la patología de desórdenes crónicos tales como la diabetes<sup>12</sup>. Los AGEs se forman lentamente con la edad ante niveles fisiológicos de azúcares, además de estar aumentados en ambientes hiperglicémicos, como en el caso de la diabetes, donde se asocia también a complicaciones inflamatorias crónicas<sup>13,14</sup>. Éstos se unen a los receptores de membrana (AGER) en la superficie de células de estirpe osteoblástica, desencadenando señales intracelulares que conducen a respuestas tales como la expresión de RANKL, promoviendo la diferenciación y activación de osteoclastos y con ello, la reabsorción ósea<sup>15</sup>, además de inducir la apoptosis osteoblástica<sup>16</sup>.

La influencia de la hiperglicemia o AGEs en la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo ha sido previamente estudiada en modelos animales, en líneas celulares, y en cultivos primarios de osteoblastos procedentes de pacientes con artrosis<sup>17,18</sup>, pero no con enfermedad diabética, como es el caso del presente estudio.

Dado que hasta el momento existe un conocimiento muy escaso de la influencia de la DM2 sobre el metabolismo óseo y no se sabe cómo los niveles altos de glucosa y/o AGEs pueden influir sobre las células osteoformadoras y la expresión de estos genes (OPG, RANKL, Runx2 y AGER), nos hemos planteado el presente estudio que tiene como objetivo principal analizar estos aspectos en pacientes con DM2 y fractura de cadera no traumática.

## Materiales y métodos

### *Sujetos de estudio*

Hemos incluido a 12 pacientes pertenecientes a tres grupos de estudio: 4 pacientes con fractura de cadera no traumática y DM2 (grupo OP+DM formado por 4 mujeres), 4 pacientes con fractura de cadera no traumática sin DM (grupo OP formado por 2 mujeres y 2 hombres), y 4 pacientes sometidos a artroplastia de cadera por problemas de

osteoartritis sin antecedentes de osteoporosis ni DM2, como grupo de referencia (grupo OA formado por 3 mujeres y 1 hombre).

Los criterios de inclusión para el grupo OP+DM fue padecer DM2 con un mínimo de tiempo desde el diagnóstico de al menos 5 años, así como presentar fractura de cadera por fragilidad, por caída de altura inferior a la del individuo, sin mecanismo de aceleración. Para los pacientes del grupo OP, presentar fractura de cadera por fragilidad sin síndrome diabético. Y por último, los del grupo de referencia OA, no haber sido diagnosticados previamente de osteoporosis ni diabetes, ni tuvieran antecedentes de fractura por fragilidad desde la edad de 50 años. Fueron criterios de exclusión para todos los grupos el tomar medicamentos con influencia sobre el metabolismo óseo (corticoides, anticonceptivos, antirreabsortivos, inmunosupresores, glitazona) o con enfermedad endocrina o sistémica con influencia sobre el remodelado óseo, así como el tratamiento de enfermedad tumoral en los últimos 10 años.

El periodo de recogida de muestras fue de 6 meses y todas procedían del Servicio de Traumatología y Ortopedia del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito y el ensayo fue aprobado por la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria del Hospital. Además, se les realizó un cuestionario sobre la edad, años de menopausia en las mujeres, hábitos tóxicos (alcohol y tabaco), ingesta semicuantitativa de calcio mediante encuesta de toma diaria de productos lácteos y derivados (estimándose cada vaso de leche como 200 mg de calcio, yogur o similares como 200 mg y porción de queso como 200 mg), antecedentes personales y familiares de primer grado de fracturas, toma de fármacos de forma crónica y enfermedades concomitantes. A los pacientes del grupo OP+DM se les incluyó además los años de evolución de enfermedad, tratamientos hipoglicemiantes y presencia/ausencia de complicaciones crónicas propias de la enfermedad diabética, tales como retinopatía, nefropatía o arteriopatía. A todos se les midió la talla, el peso y se calculó el IMC.

A todos los pacientes se tomó una muestra de sangre durante los 4 primeros días tras el episodio de fractura, determinándose en suero los siguientes parámetros bioquímicos: glucosa, urea, creatinina, enzimas de función hepática, fosfatasa alcalina total (FA), calcio y fósforo (Autoanalizador DAX-96), hemoglobina glicosilada (HbA1c) (HPLC); 25OHD, PTH, factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), marcador de resorción ósea ( $\beta$ -Crosslaps) y de formación (P1NP) (ELISA).

Las biopsias de hueso de fémur fueron procesadas en condiciones de esterilidad inmediatamente después de ser extraídas en el acto quirúrgico, procediéndose a la realización de cultivos celulares, como se detallará en el siguiente apartado.

### *Cultivos celulares*

Realizamos cultivos primarios de osteoblastos humanos (hOB) a partir de explantes de hueso



trabecular de 1-2 mm, extraídos de la cabeza de fémur recogida. Éstos fueron enjuagados con PBS y posteriormente distribuidos en placas de Petri de 90 mm a razón de 10-15 explantes por placa, procurando obtener de 3 a 5 placas de cada sujeto.

Fueron incubados en medio DMEM (4,5 mM de glucosa) suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS), 0,5% de fungicida, 1% de L-Glutamina, 1% de Na-Pyr y 1% de antibiótico (Penicilina 100 U/ml y Estreptomina 100 µg/ml) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días.

Se realizaron cambios del medio de cultivo dos veces en semana hasta alcanzar la sub-confluencia. Al llegar este momento (entre 4-6 semanas) realizamos un pase celular. Tripsinizamos (Tripsina-EDTA) y sembramos las células (300.000 cels/pocillo, en placas de 6 pocillos), con el mismo medio anteriormente mencionado.

Al llegar de nuevo al momento de sub-confluencia, las células fueron lavadas con tampón salino PBS y fueron incubadas durante 24 h con el mismo medio sin FBS para tener los cultivos en el mismo estadio de crecimiento al iniciar el experimento. Se realizaron diferentes condiciones de cultivo, durante 24 h, para valorar el efecto de las concentraciones elevadas de glucosa y AGEs sobre el funcionamiento de los osteoblastos: a) medio bajo en glucosa (4,5 mM), b) rico en glucosa (25 mM), c) rico en glucosa (25 mM) suplementado con AGEs (0,1 mg/ml) (Advanced Glycation Endproduct-BSA. Calbiochem. USA) y d) medio bajo en glucosa suplementado con manitol (25 mM) para descartar el posible efecto de la hiperosmolaridad que pudiera ejercer una concentración alta en glucosa sobre los osteoblastos en cultivo.

A todos los cultivos se les analizó:

1. Viabilidad celular, calculada mediante el test de exclusión con TripanBlue al 0,05%.

2. Actividad de la fosfatasa alcalina ósea (FAO), medida incubando durante 1 h a 37°C en 0,1 M de NaHCO<sub>3</sub>- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgSO<sub>4</sub> y 6 mM PNPP. La reacción se detuvo con 1M de NaOH y la absorbancia fue medida a 405 nm. El porcentaje de cambios de la actividad FAO con respecto al valor encontrado en el control se calculó respecto a la fórmula:  $M = \text{valor de la absorbancia a 405 nm} / \text{valor de la absorbancia a 560 nm}$ . Porcentaje de cambio =  $(M \text{ del test} - M \text{ del control}) / M \text{ del control} \times 100$ .

#### *Cuantificación de la expresión del mRNA (OPG, RANKL, Runx2 y AGER)*

A partir de las células recogidas de cada una de las condiciones experimentales de cultivo, se realizó la extracción del RNA total (High Pure RNA Isolation. Roche, USA). La concentración del RNA fue medida a 260 nm (GeneQuant, Amersham Biosciences). Posteriormente, el RNA obtenido se retrotranscribió a cDNA (QuantiTec Reverse Transcription, Qiagen).

El análisis de la expresión génica de los diferentes genes de estudio se realizó por PCR *real time* (QuantiTec SYBR Green PCR, Quiagen; Primers Applied Biosystem).

Los resultados de cada gen de estudio fueron referenciados a los obtenidos para el gen 18S ribosomal y a su vez, a la condición control (4,5 mM de glucosa).

#### *Análisis estadístico de resultados*

Para el análisis estadístico de resultados utilizamos el paquete estadístico SPSS versión 18.0. Los resultados individuales se revisaron para evitar pérdida de datos y valores inusuales. Todos los experimentos fueron reproducidos por duplicado y los datos estadísticos descriptivos de las variables numéricas fueron expresados como media  $\pm$  error estándar. Inicialmente, se analizó la homogeneidad de las varianzas de las variables. En aquellos casos que se comprobó homocedasticidad, se aplicó un test ANOVA con un análisis *post-hoc* de HSD de Tukey. Para aquéllos que se demostró heterocedasticidad, se aplicó un test de F. de Welch con un análisis *post-hoc* de Games-Howell. Se hicieron estudios de correlación mediante el test de correlación de Pearson o Spearman según la distribución normal o no de las variables. En todos los casos se exigió como nivel de significación  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

Los resultados que aquí presentamos son preliminares, teniendo en cuenta que sólo se valoran 4 sujetos por grupo de estudio. Las características de los pacientes de los tres grupos estudiados, así como los valores medios de los parámetros séricos analizados se encuentran en la Tabla 1.

La edad de los pacientes del grupo OA fue significativamente menor que la edad del resto de los grupos, por ello para la comparación estadística del resto de los parámetros se realizó un ajuste por edad. El IMC fue menor, aunque no estadísticamente diferente, en el grupo OP. La función renal fue normal y comparable en los tres grupos. Los niveles de glucosa en ayunas y HbA<sub>1c</sub> estuvieron en rango de normalidad, sin mostrar diferencias significativas entre los tres grupos, si bien los pacientes OP+DM fueron los que presentaron un valor más alto, llegando la HbA<sub>1c</sub> a ser superior en un 25% en este grupo, respecto a los otros dos estudiados. En cuanto a los parámetros relacionados con el metabolismo cálcico, sólo los niveles de fósforo y FA fueron significativamente diferentes al comparar los tres grupos. Así, los niveles de fósforo fueron inferiores y los de FA superiores en el grupo OP, respecto OA y OP+DM. El resto de los parámetros, si bien no mostraron diferencias significativas, revelan algunos aspectos que son reseñables. Los niveles de vitamina D estuvieron en todos los casos por debajo de 20 ng/ml y algo inferiores en los pacientes que habían presentado fractura de cadera, con o sin DM, respecto a los controles (valores medios de 9,6 ng/ml y 9,2 ng/ml *vs.* 12,3 ng/ml, respectivamente). Los niveles de PTH fueron superiores en el grupo OP, así como los marcadores de remodelado óseo, tanto de formación como de resorción, P1NP y  $\beta$ -CrossLaps, también en este grupo.



Tabla 1. Características antropométricas y parámetros bioquímicos séricos de los grupos estudiados

	OA (n=4)	OP (n=4)	OP+DM (n=4)	
Edad (años)	66 ± 11 *	80 ± 8	84 ± 10	*p=0,04
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,8 ± 2,8	23,6 ± 2,3	31,5 ± 4,9	
Creatinina (mg/ml)	0,8 ± 0,05	0,9 ± 0,05	0,8 ± 0,06	
Glucosa (mg/dl)	84,8 ± 4,9	97,5 ± 0,5	100,7 ± 12,9	
HbA1c (%)	5,1 ± 0,3	5,1 ± 0,5	6,5 ± 0,6	
25(OH)D (ng/ml)	12,3 ± 3,1	9,2 ± 3,2	9,6 ± 0,7	
PTH (pg/ml)	48,1 ± 10,6	72 ± 55	35 ± 4,9	
PIPn (ng/ml)	38,01 ± 16,2	42,5 ± 1,2	67 ± 20,3	
β-CrossLaps (ng/ml)	0,45 ± 0,09	0,83 ± 0,07	0,62 ± 0,19	
Fósforo (mg/dl)	3,3 ± 0,1	2 ± 0,3 *	2,5 ± 0,3#	*p=0,004 #p=0,022
FA (U/L)	160,3 ± 16,3	247,5 ± 25,5 *	181 ± 39,4	*p=0,04
Ca corregido (mg/dl)	9,6 ± 0,2	9 ± 0,1	9,5 ± 0,3	
IGF-1 (ng/ml)	41,8 ± 2,9	25 ± 0,01 *	37,7 ± 12,7	*p=0,011

\*OA *vs.* OP; # OP *vs.* OP+DM

Los niveles séricos de IGF-1 fueron más bajos en los 2 grupos con fractura de cadera (valores medios en OP = 25 ng/ml, en OP+DM = 37,7 ng/ml y en OA = 41,8 ng/ml), llegando a ser significativamente diferentes en el grupo OP, respecto al OA ( $p = 0,011$ ).

#### Viabilidad celular y FAO

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos, para ninguna de las condiciones de estudio, presentado todos los cultivos una viabilidad mayor al 85% y una tinción FAO mayor al 95%.

#### RT-q-PCR

En el estudio de la expresión de los genes osteogénicos estudiados, encontramos una elevada variación interpersonal.

Los resultados de la expresión de OPG se encuentran representados en la figura 1. Ninguna de las condiciones diferentes de cultivo influyó significativamente en la expresión génica de OPG en los tres grupos estudiados, ni mostró diferencias entre los tres grupos. Sólo la situación de hiperglucemia y más aún la suma de hiperglucemia y AGEs, llevó a una mayor expresión de OPG en el grupo OP, llegando a ser hasta de 1,7 veces en este último caso, respecto al grupo control.

La expresión génica de RANKL (Figura 2) se vio aumentada en el grupo OP+DM, aunque no de manera significativa, siendo la expresión en la

condición alta en glucosa mayor, tanto con respecto a la condición control como al grupo control (1,9 y 2,3 veces mayor, respectivamente). Lo mismo le ocurre en la condición alta en glucosa suplementado con AGEs (4,6 *vs.* condición control y 4,4 veces *vs.* grupo control, respectivamente). Los resultados mostraron un descenso de la expresión génica de RANKL en presencia de una alta concentración de glucosa, tanto en el grupo control como en el grupo OP; sin embargo, en presencia de AGEs la expresión fue similar a condición control en ambos grupos.

Los valores de la ratio RANKL/OPG (Figura 3) se mantuvieron constantes en el grupo control; sin embargo, en el grupo OP+DM se vieron incrementados ante todas las condiciones experimentales. Con respecto al grupo OP se produjo una disminución en presencia de glucosa elevada y un aumento, similar al que observamos en el grupo diabético, en glucosa elevada más AGEs.

En el caso de la expresión génica de Runx2 (Figura 4) encontramos un incremento significativo en el grupo OP+DM con respecto al grupo control en la condición experimental que combina glucosa alta y AGEs (OA = 1,08 ± 0,43; OP+DM = 3,33 ± 0,73;  $p=0,039$ ). En esta misma condición también observamos un aumento de expresión en el grupo OP, aunque no fue significativo.

Por último, los resultados de la expresión génica de AGER (Figura 5) fueron muy similares entre los grupos de estudio, siendo más altos que la



Figuras 1-5. Efecto de una concentración elevada de glucosa y productos finales de glicosilación sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo en cultivos primarios de osteoblastos humanos. Los cultivos primarios de hOB fueron incubados hasta la confluencia, tras la cual se les realizó un pase celular. Una vez alcanzada de nuevo la confluencia se diferenciaron las condiciones de cultivo durante 24 h: control normoglucémico (4,5 mM de glucosa), control osmótico (25 mM de manitol), tratamiento alto en glucosa (25 mM de glucosa) y tratamiento alto en glucosa suplementado con AGEs (25 mM de glucosa y 0,1 mg/ml de AGEs). Se realizó el análisis de la expresión génica en respuesta a los tratamientos mediante PCR *real time* cuantitativa. Se utilizó el método de la  $\Delta\Delta C_t$  y los resultados fueron referenciados tanto al gen endógeno 18S Ribosomal como a la condición control (4,5 mM de glucosa), la cual fue establecida como 1.

Figura 1. Expresión génica de OPG

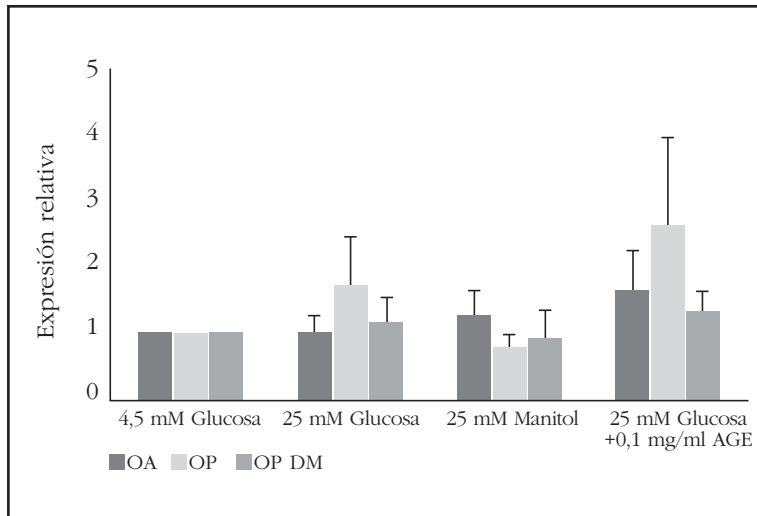
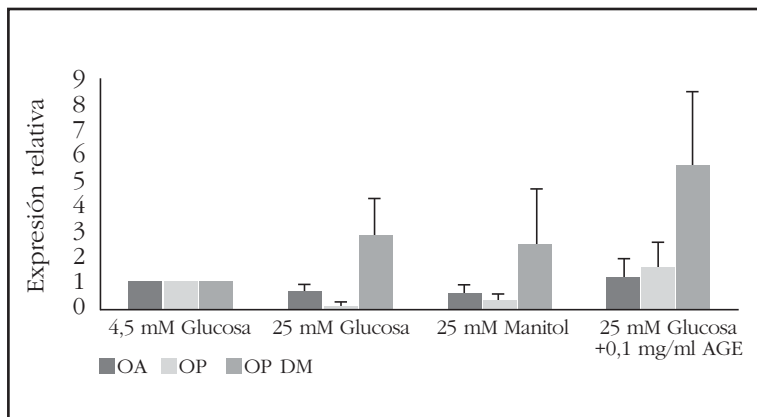


Figura 2. Expresión génica de RANKL



condición control. Sin embargo, estos resultados no fueron significativos en ninguno de los grupos para ninguna de las condiciones experimentales.

No encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa entre los parámetros bioquímicos y antropométricos (Tabla 1) y los genes implicados en el metabolismo óseo estudiados (Figuras 1-5).

## Discusión

Los resultados más importantes del presente estudio nos demuestran que la adición de glucosa, a concentraciones elevadas, y sobre todo la suma de glucosa y AGEs, a cultivos de hOB de pacientes con DM2 y fractura de cadera incrementa la expresión de genes RANKL, la ratio RANKL/OPG y Runx2, respecto a persona sin fractura de cadera ni DM.

Acorde con nuestros resultados, Li y cols. demostraron en estudios en ratas que niveles altos de glucosa en el medio de cultivo, inducen una mayor diferenciación osteoblástica en células de ligamento estimuladas a osteoblastos, a través de un aumento significativo de los niveles de expresión génica de Runx2<sup>19</sup>. Sin embargo, otros autores describen otros resultados diferentes según el tipo de células empleadas, los niveles de glucosa en el medio de cultivo y el tiempo de exposición a ella, no siendo éstos consistentes<sup>20-23</sup>.

Se ha podido comprobar que ratones transgénicos que sobreexpresan Runx2 presentan igualmente un aumento en la expresión de RANKL, dando como resultado ratones con una importante pérdida de masa ósea. En este caso los autores asociaron estos hallazgos al bloqueo de la diferenciación de osteoblastos, es decir, la sobreexpresión de Runx2 estaba relacionada con un mayor número de osteoblastos menos diferenciados que expresan una mayor cantidad de RANKL, activando la osteoclastogénesis y generando así un mayor número de osteoclastos maduros<sup>24</sup>. La presencia de altas concentraciones sanguíneas de glucosa y AGEs suelen ser alteraciones metabólicas bastante frecuentes en pacientes diabéticos, según se desprende de nuestros resultados, condiciona una sobreexpresión de Runx2 en células osteoblásticas, así como de la expresión de la

ratio RANKL/OPG, lo cual puede llevar a una tasa de remodelación incrementada y tener una influencia negativa sobre la resistencia ósea.

Nosotros hemos constatado en nuestro estudio el aumento de RANKL y ratio RANKL/OPG, más elevado sobre todo en el grupo OP+DM. De Amorim y cols. han encontrado que en ratas diabéticas con fractura tibial se produce un aumento



de la ratio RANKL/OPG con respecto a las ratas sanas, lo que respalda nuestros resultados<sup>25</sup>.

Nos llama la atención que los osteoblastos de pacientes con fractura de cadera, con y sin DM2, son los que presentan una mayor variabilidad en la expresión de los genes de estudio ante los estímulos realizados en las diferentes situaciones de los cultivos *in vitro*. En este sentido, en anteriores investigaciones de nuestro grupo llevados a cabo en cultivos de hOB de pacientes con fractura de cadera frente a personas con artrosis, comprobamos también que los pacientes con osteoporosis eran los que presentaban mayores modificaciones en la expresión génica ante los diferentes estímulos<sup>26-28</sup>. Esto puede indicar que, *in vivo*, estas células de pacientes osteoporóticos ya están condicionadas, por el ambiente en que se encuentran, a unos niveles de respuesta mayores que los de un individuo con metabolismo óseo sano. Igualmente, los pacientes con DM2 con una alteración en el metabolismo óseo inducida por la hiperglucemia y el estrés oxidativo habitual, son también los que más responden ante las condiciones *in vitro* que hemos experimentado.

La expresión génica de AGER se vio aumentada tanto en la condición alta en glucosa como en la alta en glucosa suplementada con AGEs en los grupos control (OA) y osteoporótico (OP), pero no así en el grupo diabético (OP+DM), que resultaron similares a la condición basal. Estos resultados coinciden con los obtenidos en células MC3T3E1 por Mercer y cols.<sup>17</sup> y en osteoblastos humanos por Franke y cols.<sup>18</sup>, donde analizan la expresión de AGER en cultivos expuestos a AGEs. En ellos se sugiere que a consecuencia de la presencia de una concentración mayor de AGEs, se produce una mayor activación AGE-AGER, lo que causaría disfunción osteoblástica. Los resultados, con respecto a la expresión de AGER, en el grupo OP+DM indican que los osteoblastos de estos pacientes podrían sufrir algún tipo de habituación a niveles extracelulares altos en glucosa y AGEs, lo cual les hace no reaccionar ante estos

Figura 3. Ratio RANKL/OPG

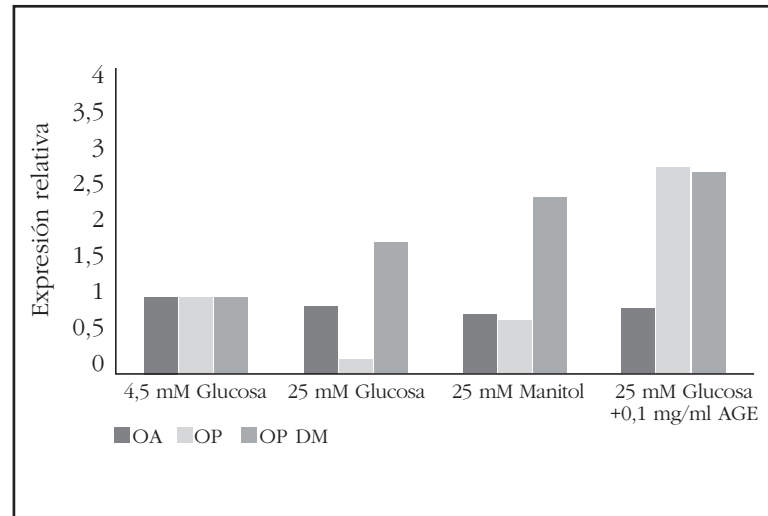


Figura 4. Expresión génica de Runx2

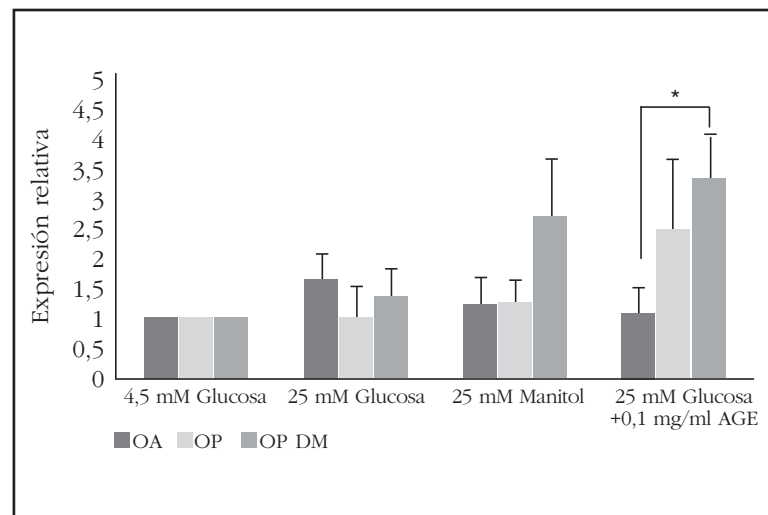
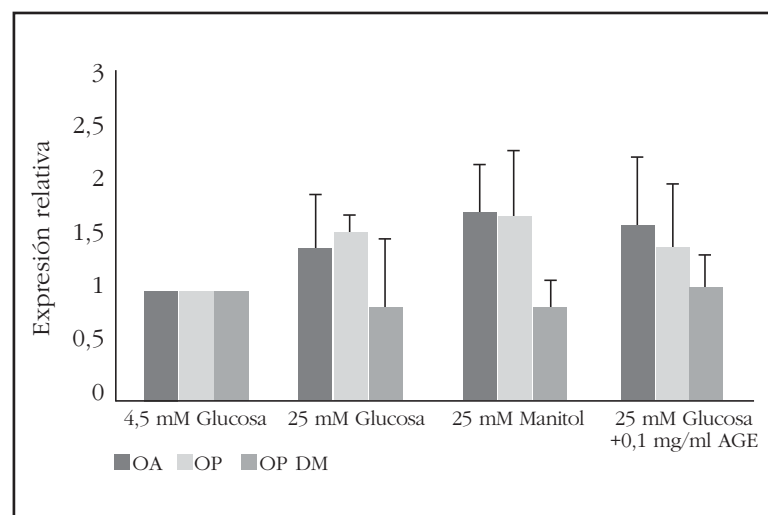


Figura 5. Expresión génica de AGER





estímulos, al menos durante las primeras 24 h de tratamiento, La interacción de AGEs con sus receptores altera la señalización celular, promueve la expresión de genes, aumenta la liberación de moléculas pro-inflamatorias y aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), con el consecuente estrés oxidativo. A su vez, el ambiente hiperglicémico a largo plazo, como ocurre en la diabetes, incrementa la producción de AGEs y de ROS, pudiendo causar un descenso en la proliferación y un aumento de la apoptosis en los osteoblastos<sup>29</sup>.

Hemos podido comprobar que los pacientes con fractura de cadera sin DM presentaron niveles elevados de PTH y bajos de IGF-1, condiciones ambas que se asocian a la osteoporosis senil y la fractura de cadera. Es conocido que con la edad existen menores niveles de vitamina D, como consecuencia del menor aporte, la menor absorción y la menor exposición solar, que lleva a un hiperparatiroidismo secundario, con el consiguiente incremento en el remodelado óseo y el mayor riesgo de padecer fracturas<sup>30</sup>. En personas de edad avanzada también se describen niveles bajos de IGF-1 en suero que se correlaciona con una baja densidad mineral ósea y con un riesgo de fractura incrementado<sup>31</sup>.

Si bien es verdad que la mayoría de los resultados que hemos encontrado puede que no hayan sido estadísticamente diferentes por pequeño tamaño muestral, hemos de tener en cuenta también que el grupo de pacientes con DM2 llevaba escaso tiempo de evolución de enfermedad (media de 5 años) y con un control metabólico muy adecuado (HbA1c media de 6,5%). Como se sabe, las complicaciones de la diabetes son tanto más acusadas como mayor sea su tiempo de evolución y cuanto más alterado se halle el metabolismo hidrocarbonado<sup>3</sup>. Entre las limitaciones del presente estudio la más importante es el hecho de no poder contar con un grupo de personas verdaderamente sanas de las que poder obtener biopsias óseas, teniendo que utilizar como referencia personas con artrosis, que por lo general y dada la naturaleza de esta patología, siempre van a ser de menor edad que los pacientes que se fracturen la cadera, siendo conscientes de que la edad es uno de los factores independientes que más influyen sobre las alteraciones en el remodelado óseo. Por último, sería conveniente analizar si las alteraciones génicas encontradas repercuten a nivel proteico o no.

En conclusión y a la vista de nuestros resultados, podemos señalar que la presencia de hiperglicemia y AGEs altera la expresión génica de RANKL, ratio RANKL/OPG y Runx2 en cultivos de osteoblastos de pacientes con fractura osteoporótica y en diabéticos con este tipo de fracturas, especialmente en estos últimos. Ello podría generar alteraciones en el remodelado óseo (niveles más altos de  $\beta$ -Crosslaps y PINP) que podría explicar, al menos en parte, la menor resistencia ósea y el aumento de incidencia de fracturas no traumáticas en estos pacientes.

## Bibliografía

1. Schwartz AV, Sellmeyer DE. Diabetes, fracture, and bone fragility. *Curr Osteoporos Rep* 2007;5:105-11.
2. Roszer T. Inflammation as death or life signal in diabetic fracture healing. *Inflamm Res* 2011;60:3-10.
3. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcif Tissue Int* 2009;84:45-55.
4. Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 2010;21:195-214.
5. Patel S, Hyer S, Tweed K, Kerry S, Allan K, Rodin A, et al. Risk Factors for Fractures and Falls in Older Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Calcif Tissue Int* 2008;82:87-91.
6. Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: the diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds* 2011;10:16-32.
7. Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes* 2011;2:41-8.
8. Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodelling. *Bone* 2009;44:1026-33.
9. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
10. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 2010;339:189-95.
11. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755-64.
12. Wilton R, Yousef MA, Saxena P, Szpunar M, Stevens FJ. Expression and purification of recombinant human receptor for advanced glycation endproducts in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2006;47:25-35.
13. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.
14. Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: the diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds* 2011;10:16-32.
15. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998;37:586-600.
16. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, Pischon N, Trackman PC, Gerstenfeld L, Graves DT. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 2007;40:345-53.
17. Mercer N, Ahmed H, McCarthy AD, Etcheverry SB, Vasta GR, Cortizo AM. AGE-R3/galectin-3 expression in osteoblast-like cells: regulation by AGEs. *Mol Cell Biochem* 2004;266:17-24.
18. Franke S, Siggelkow H, Wolf G, Hein G. Advanced glycation endproducts influence the mRNA expression of RAGE, RANKL and various osteoblastic genes in human osteoblasts. *Arch Physiol Biochem* 2007;113:154-61.
19. Li H, Jiang LS, Dai LY. High glucose potentiates collagen synthesis and bone morphogenetic protein-2-induced early osteoblast gene expression in rat spinal ligament cells. *Endocrinology* 2010;151:63-74.
20. Guan CC, Yan M, Jiang XQ, Zhang P, Zhang XL, Li J, et al. Sonic hedgehog alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Bone* 2009;45:1146-52.
21. Barbagallo I, Vanella A, Peterson SJ, Kim DH, Tibullo D, Giallongo C, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differen-



- tiation. *J Bone Miner Metab* 2010;28:276-88.
22. Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications* 2010;24:334-44.
  23. Wang W, Zhang X, Zheng J, Yang J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biochem* 2010;338:115-22.
  24. Schiltz C, Prouillet C, Marty C, Merciris D, Collet C, de Vernejoul MC, et al. Bone loss induced by Runx2 overexpression in mice is blunted by osteoblastic overexpression of TIMP-1. *J Cell Physiol* 2010;222:219-29.
  25. De Amorim FP, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, Da Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol* 2008;39:401-8.
  26. Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Rios MJ, Moruno R, Miranda MJ, et al. Modifying RANKL/OPG mRNA expression in differentiating and growing human primary osteoblasts. *Horm Metab Res* 2008;40:869-74.
  27. Giner M, Rios MA, Montoya MA, Vázquez MA, Naji L, Pérez-Cano R. RANKL/OPG in primary cultures of osteoblasts from post-menopausal women. Differences between osteoporotic hip fractures and osteoarthritis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:46-51.
  28. Giner M, Rios MJ, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Pérez-Cano R. Alendronate and raloxifene affect the osteoprotegerin/RANKL system in human osteoblast primary cultures from patients with osteoporosis and osteoarthritis. *Eur J Pharmacol* 2011;650:682-7.
  29. Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2011;121:43-55.
  30. Bienaimé F, Prié D, Friedlander G, Souberbielle JC. Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Mol Cell Endocrinol* 2011;347:30-41.
  31. Gamero P, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Low serum IGF-I and occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Lancet* 2000;355:898-9.