

Pérez Castrillón JL¹, Riancho Moral JA², De Luis D¹, Caeiro Rey JR³, Guede Rodríguez D⁴, González Sagrado M¹, Ruíz Mambrilla M⁵, Domingo Andrés M¹, Primo Martín D¹

1 Hospital Universitario del Río Hortega - Instituto de Endocrinología - Reticef - Valladolid

2 Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Universidad de Cantabria - Reticef - Santander

3 Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) - Reticef - Santiago de Compostela

4 Trabeculae[®] Empresa de Base Tecnológica, S.L. - Ourense

5 Centro Médico de Rehabilitación y Lenguaje - Valladolid

Estudio estructural mediante micro-CT en fémur de ratas Goto-Kakizaki, modelo experimental de diabetes tipo 2 sin sobrepeso

Correspondencia: José Luis Pérez Castrillón - Hospital Universitario Río Hortega - Dulzaina, 2 - 47016 Valladolid
Correo electrónico: castrv@terra.es

Fecha de recepción: 20/11/2010

Fecha de aceptación: 24/03/2011

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

Resumen

Fundamento: Los efectos de la diabetes tipo 2 en la microestructura y la masa ósea no están claramente definidos. El objetivo de este estudio ha sido valorar las propiedades microestructurales y la densidad mineral ósea volumétrica en ratas Goto-Kakizaki, modelo de ratas con diabetes tipo 2 sin sobrepeso que intenta soslayar la influencia de la obesidad sobre la masa ósea.

Material y métodos: Se diseñó un estudio experimental con ratas Goto-Kakizaki frente a un grupo control de ratas Wistar no diabéticas de peso similar y con glucemias normales, realizándose estudios densitométricos y microestructurales de la región distal del fémur mediante microtomografía computarizada de rayos X (micro-CT).

Resultados: En la densitometría volumétrica no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. El estudio microestructural mostró que el BV/TV y la conectividad trabecular estaban disminuidos en las ratas diabéticas, a la vez que aumentaban las trabéculas en forma de tubo en detrimento de las trabéculas en forma de placa.

Conclusión: El deterioro de la calidad ósea trabecular podría explicar el descenso de la resistencia biomecánica ósea en la diabetes tipo 2.

Palabras clave: diabetes tipo 2, microtomografía de rayos X, densidad mineral ósea, microestructura ósea.

Structural study using micro-CT of the femur of Goto-Kakizaki rats, experimental model for non-overweight type 2 diabetes

Summary

Background: The effects of type 2 diabetes on the microstructure and mass of bone are not clearly defined. The objective of this study has been to assess the microstructural properties and volumetric bone mineral density of Goto-Kakizaki rats, the rat model for non-overweight type 2 diabetes which tries to circumvent the influence of obesity on bone mass.

Material and methods: An experimental study was designed using Goto-Kakizaki rats compared with a control group of non-diabetic Wistar rats of similar weight and with normal glycemia, with densitometric and microstructural studies being carried out on the distal region of the femur using computerised X-ray microtomography (micro-CT).

Results: In the volumetric densitometry no significant differences were found between the two groups. The microstructural study showed that the BV/TV and trabecular connectivity were reduced in the diabetic rats, while the tube-like trabeculae increased to the detriment of plaque-like trabeculae.

Conclusion: The deterioration trabecular bone quality could explain the decrease in biomechanical bone resistance in type 2 diabetes.

Key words: *type 2 diabetes, X-ray microtomography, bone mineral density, bone microstructure.*

Introducción

Los trastornos esqueléticos en la diabetes son diferentes según se trate de diabetes tipo 1 o tipo 2. Los pacientes con diabetes tipo 1 tienen un descenso de la masa ósea, que implica un riesgo de fractura aumentado^{1,2}, mientras que los diabéticos tipo 2 pueden presentar una masa ósea incrementada, disminuida o dentro de límites normales^{3,4}. Sin embargo, el riesgo de fractura en la diabetes tipo 2 está incrementado^{5,6}. Este hecho puede deberse tanto a causas óseas como a causas extraóseas (retinopatía, neuropatía, fármacos, etc.) que determinan una mayor incidencia de caídas. Un hecho frecuente en los diabéticos tipo 2 es el sobrepeso, que constituye un factor de confusión debido a que el peso es un factor determinante de la masa ósea. Los obesos presentan normalmente una densidad mineral ósea elevada. Para evitar la influencia de este factor de confusión se diseñó un estudio experimental con ratas Goto-Kakizaki (GK), subcepa de rata Wistar no obesa que desarrolla diabetes tipo 2. Las ratas GK presentan una diabetes tipo 2 leve-moderada que ocurre tras el nacimiento y desarrollan complicaciones crónicas de la enfermedad, como neuropatía, retinopatía y nefropatía⁷.

El objetivo principal del estudio fue la valoración mediante microtomografía computarizada la densitometría y las propiedades microestructurales trabeculares y corticales de ratas GK, y compararlas con un grupo de ratas Wistar empleado como control, con el propósito de evaluar y en su caso definir los cambios que en estas variables induce la obesidad.

Material y métodos

Modelos animales

Se realizó un estudio experimental con 4 ratas GK macho frente a un grupo control de 4 ratas Wistar (WI) macho no diabéticas de peso similar y con glucemias normales (Taconic Farms Inc., Lille Skensved, Dinamarca), debido a que la subcepa Goto-Kakizaki ha sido desarrollada a partir de ratas Wistar. El tratamiento de los animales y todos los experimentos se llevaron a cabo conforme a la Ley 14/2007 y al Real Decreto 1201/2005, y siguiendo las directrices de las normas UNE-EN 30993-3:1994 y ISO 10993-2:2006. Las ratas se alimentaban con una dieta estándar teniendo acceso de forma libre al agua, sin recibir tratamiento farmacológico, y fueron sacrificadas a las 12 semanas en una cámara con CO₂.

Análisis microestructural óseo mediante micro-CT

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los fémures derechos para la realización del análisis microestructural. Tras la extracción, las muestras se conservaron envueltas en una gasa empapada en solución salina y se conservaron a -20°C hasta los momentos previos al análisis. El estudio microestructural de las muestras se llevó a cabo mediante microtomografía computarizada de rayos X (micro-CT) empleando el equipo comercial SkyScan 1172 (SkyScan NV, Aarstelaar, Bélgica) en el laboratorio de investigación de Trabeculae®, Empresa de Base Tecnológica, S.L. (Ourense, España).

La región distal de cada fémur se escaneó con un voltaje de la fuente de rayos X de 50 KV y una intensidad de 200 μ A, empleando un tamaño de vóxel de 8,95 μ m. Se colocó un filtro de aluminio de 0,5 mm de espesor para reducir los artefactos de *beam hardening*. El paso de rotación empleado fue de 0,4° hasta un total de 180° y el tiempo de exposición de 1250 ms.

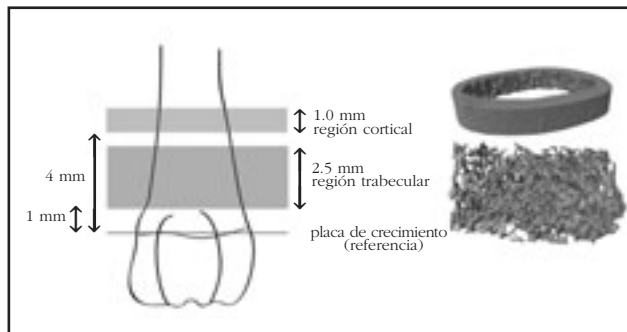
Las imágenes obtenidas se reconstruyeron empleando el algoritmo modificado de Feldkamp⁸ mediante la aplicación NRecon 1.5 (SkyScan NV, Aarstelaar, Bélgica). Las secciones transversales resultantes después de la etapa de reconstrucción se emplearon para el análisis cuantitativo de la microestructura ósea trabecular y cortical mediante la aplicación CTAn 1.10.0.2 (SkyScan NV, Aarstelaar, Bélgica), tras su segmentación en imágenes binarias utilizando un *thresholding* de adaptación local⁹.

Para el análisis del hueso trabecular se seleccionó una región de interés metafisodifisaria (hueso cortical excluido) de 2,5 mm comenzando a una distancia de 1,0 mm de la placa de crecimiento en dirección proximal. Para el análisis de las propiedades microestructurales del hueso cortical se tomó una región de interés de 1,0 mm comenzando a 4,0 mm de la placa de crecimiento (Figura 1).

Las variables cuantitativas que se determinaron para la región trabecular fueron: fracción volumétrica ósea (BV/TV), superficie específica ósea (BS/BV), densidad de superficie ósea (BS/TV), grosor trabecular (Tb.Th), separación trabecular (Tb.Sp), número trabecular (Tb.N), factor de patrón trabecular (Tb.Pf), índice de modelo estructural (SMI) y grado de anisotropía (DA). Las distintas variables se midieron directamente utilizando métodos descritos en la literatura^{10,11}. Las variables no métricas, SMI y Tb.Pf, se calcularon directamente del modelo tridimensional. El SMI indica la prevalencia relativa de trabéculas en forma de placa (*plate-like*) o trabéculas en forma de tubo (*rod-like*), indicando mayor presencia de placas cuanto más se acerca el valor a cero¹². Por su parte, el Tb.Pf es un índice inverso de conectividad, medido a partir del cálculo de la convexidad y concavidad relativa de la superficie ósea¹³. A mayor valor de Tb.Pf la red trabecular muestra una peor conectividad, que lleva implícita una disminución de la resistencia mecánica. El DA es una medida de la alineación de las trabéculas en una determinada dirección, calculado de manera que 0 es la isotropía total y 1 la anisotropía total.

En el caso de la región cortical, los parámetros calculados incluyeron: grosor de la sección transversal (Cs.Th), grosor cortical (Ct.Th), el área transversal media de hueso (B.Ar), el momento de inercia polar medio (I) y la excentricidad (Ecc). El I es un índice básico de resistencia mecánica que indica la resistencia a la rotación de una sección transversal en un eje determinado (asumiendo propiedades biomecánicas materiales uniformes). La Ecc es un parámetro que indica la diferencia de alargamiento de la sección transversal con respec-

Figura 1. Esquema de un fémur distal de rata en el que se señalan las regiones analizadas mediante micro-CT, indicando sus dimensiones y las distancias a la referencia (placa de crecimiento). La región trabecular comienza a 1 mm de la placa de crecimiento para evitar la esponjosa primaria, mientras que la región cortical a 4 mm para seleccionar una zona con escasez o ausencia de trabéculas



to a una forma circular (un círculo se considera una elipse con excentricidad cero).

Determinación de la densidad mineral ósea volumétrica

Utilizando las imágenes obtenidas mediante micro-CT, se ha determinado la densidad mineral ósea volumétrica (DMOv) tanto de la región cortical como de la región trabecular. Se ha empleado calibración directa frente a coeficientes de atenuación de patrones de hidroxapatita de calcio de densidad conocida (250 y 750 mg/cm³). El método de cálculo de la DMOv difiere ligeramente en una u otra región ósea, ya que en el caso de la región trabecular se refiere a un volumen de hueso y tejido medular, mientras que en el caso de la región cortical se limita a un volumen ocupado únicamente por hueso lamelar calcificado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se introdujeron en una base de datos de texto que se exportó al paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19 (IBM Corporation, Somers, NY, EE.UU.) para su posterior análisis estadístico. Los resultados individuales se revisaron para evitar pérdida de datos y valores inusuales. Seguidamente se procedió con el análisis descriptivo de las variables de estudio. Los datos estadísticos descriptivos de las variables numéricas se expresaron como media \pm desviación estándar, valor máximo y valor mínimo.

El estudio estadístico comparativo de los datos numéricos se llevó a cabo mediante análisis de la varianza de un solo factor (ANOVA) y test de HSD de Tukey para las comparativas múltiples. En aquellos casos en los que no se cumplieron los criterios de homogeneidad de las varianzas, se aplicó el test de Brown-Forsythe para el análisis de las varianzas y el test de Games-Howell para las comparativas múltiples.

El nivel de significación estadística se estableció en valores de $p < 0,05$ para todas las variables analizadas.

Tabla 1. Densidad mineral ósea volumétrica en la región trabecular y cortical de fémur distal de ratas controles y diabéticas

	Ratas WI control (media ± DE)	Ratas GK diabéticas (media ± DE)	Valor de <i>p</i>
DMOV trabecular (mg/cm ³)	306,63 ± 48,78	261,23 ± 45,54	NS
DMOV cortical (mg/cm ³)	1.490,97 ± 227,57	1.727,13 ± 133,95	NS

DE: desviación estándar. DMOV: densidad mineral ósea volumétrica. NS: no significativo

Tabla 2. Resultados de las variables microestructurales de la región trabecular en fémur distal de ratas control y diabéticas

	Ratas WI control (media ± DE)	Ratas GK diabéticas (media ± DE)	Valor de <i>p</i>
BV/TV (%)	20,68 ± 2,87	15,51 ± 2,90	0,034
BS/BV (mm ⁻¹)	44,50 ± 9,21	47,76 ± 5,21	NS
BS/TV (mm ⁻¹)	9,10 ± 1,71	7,31 ± 0,88	NS
Tb.Th (µm)	84,15 ± 11,72	77,38 ± 5,83	NS
Tb.Sp (µm)	385,28 ± 103,73	332,18 ± 54,31	NS
Tb.N (mm ⁻¹)	2,47 ± 0,34	2,00 ± 0,30	NS
Tb.Pf (mm ⁻¹)	2,98 ± 2,58	10,01 ± 2,45	0,004
SMI	1,24 ± 0,04	1,66 ± 0,18	0,001
DA	0,58 ± 0,06	0,55 ± 0,02	NS

DE: desviación estándar. BV/TV: fracción volumétrica ósea. BS/BV: superficie específica ósea. BS/TV: densidad de superficie ósea. Tb.Th: grosor trabecular. Tb.Sp: separación trabecular. Tb.N: número trabecular. Tb.Pf: factor de patrón trabecular. SMI: índice de modelo estructural. DA: grado de anisotropía

Tabla 3. Resultados de las variables microestructurales de la región cortical en fémur distal de ratas control y diabéticas

	Ratas WI control (media ± DE)	Ratas GK diabéticas (media ± DE)	Valor de <i>p</i>
B.Ar (mm ²)	5,78 ± 0,50	5,79 ± 0,32	NS
I (mm ⁴)	21,87 ± 5,09	21,11 ± 2,38	NS
Cs.Th (µm)	396,92 ± 23,23	373,61 ± 22,74	NS
Ct.Th (µm)	458,23 ± 15,40	433,07 ± 22,99	NS
Ecc	0,74 ± 0,03	0,79 ± 0,02	NS

DE: desviación estándar. B.Ar: área transversal media de hueso. I: momento de inercia polar medio. Cs.Th: grosor de la sección transversal. Ct.Th: grosor cortical. Ecc: excentricidad

Figura 2. Representación tridimensional de la región trabecular analizada en fémur distal de una muestra representativa del grupo control y del grupo diabético

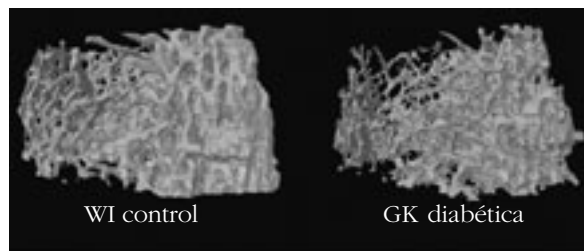
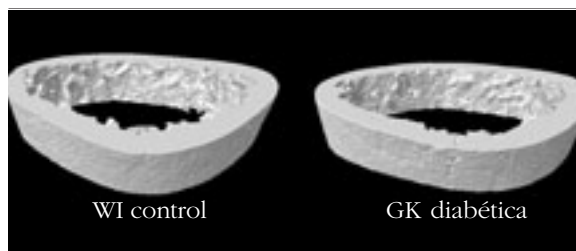


Figura 3. Representación tridimensional de la región cortical analizada en fémur distal de una muestra representativa del grupo control y del grupo diabético



Resultados

Las ratas GK presentaban un peso de 385 ± 23 g y una glucemia de 195 ± 84 mg/dL que confirma la presencia de diabetes en este grupo, mientras que las ratas Wistar tenían un peso de 395 ± 35 g y una glucemia de 124 ± 15 mg/dL ($p < 0,01$). Los resultados de la densidad mineral ósea volumétrica aparecen reflejados en la Tabla 1. La DMOv no mostró diferencias entre los grupos, ni en el compartimento cortical, ni en el trabecular. A pesar de que parece haber una pérdida de masa ósea trabecular en las ratas diabéticas, esta no llega a ser significativa, probablemente debido al tamaño muestral empleado o al tiempo de evolución de la diabetes.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las variables microestructurales de la región trabecular. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la fracción volumétrica ósea (BV/TV) indicando una pérdida de hueso trabecular en las ratas diabéticas frente al grupo control. El considerable aumento del Tb.Pf en las ratas GK confirma, además, una importante pérdida de conectividad trabecular en la diabetes. Por otro lado, el incremento del SMI muestra una prevalencia de trabéculas en forma de tubo en las ratas diabéticas en comparación con el grupo control, en el que hay predominio de trabéculas en forma de placa. Aunque el BS/TV, el Tb.Th y el Tb.N están disminuidos en las ratas diabéticas, al mismo tiempo que la Tb.Sp está aumentada, indicando todo ello un deterioro de la microarquitectura trabecular (Figura 2), sus valores no han alcanzado significatividad estadística.

En la región cortical, aunque en el grupo diabético parece haber una disminución del grosor de la pared cortical, ya sea determinado con las secciones transversales (Cs.Th) o bien asumiendo el modelo tridimensional (Ct.Th), no se llega a la significatividad estadística (Tabla 3). Las variables B.Ar, I y Ecc muestran valores muy similares entre ambos grupos. Las regiones corticales de dos muestras representativas se pueden observar en la Figura 3.

Discusión

El estudio realizado muestra que las ratas diabéticas tienen una densidad ósea volumétrica similar a las ratas no diabéticas. Sin embargo, se observan diferencias en el hueso trabecular en los paráme-

tros estructurales. Existe una disminución del BV/TV, una menor conectividad de las trabéculas y un predominio de trabéculas cilíndricas en las ratas GK. Las variables estructurales trabeculares en las que existen diferencias significativas entre las ratas diabéticas y las ratas control son las más relacionadas con la resistencia del hueso. La menor cantidad de hueso indicada por el descenso del BV/TV y la gran pérdida de conectividad trabecular revelada por el aumento del Tb.Pf en el grupo diabético, conllevan una disminución evidente de la resistencia biomecánica. Además, se ha demostrado que las trabéculas en forma de tubo, predominantes en el grupo diabético, son menos resistentes a las cargas mecánicas que las trabéculas en forma de placa¹², más abundantes en el grupo control, según se deduce del valor del SMI. Todos estos datos indican que, aunque su densidad ósea sea normal, las ratas GK presentarían una menor resistencia biomecánica, lo que podría sugerir que la mayor prevalencia de fracturas existente en la diabetes tipo 2 estaría en relación con una alteración de la calidad ósea.

Hay pocos estudios realizados con este modelo experimental. Zhang *et al.* midieron en un grupo de ratas GK la densidad mineral ósea por DXA y la microestructura con técnicas histomorfométricas clásicas en 2D⁷. Estos autores encontraron una disminución de la masa ósea y una alteración de la histomorfometría con un descenso del BV/TV, similar al encontrado en nuestro estudio. Ahmad *et al.*, empleando tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT), observaron un descenso de la densidad mineral ósea volumétrica predominando en el compartimento trabecular¹⁴. Las mediciones se realizaron en húmero, tibia y metatarsianos de ratas hembra, lo que podría explicar las diferencias observadas con nuestros resultados. En ninguna de las regiones analizadas en ese trabajo se encontraron diferencias a nivel cortical. Sin embargo, en otro trabajo, empleando técnicas radiogramétricas en un grupo de 10 ratas GK, se observó un descenso del grosor cortical en metatarsiano y húmero¹⁵. Los datos observados son heterogéneos debido probablemente a las diferentes técnicas empleadas y los distintos lugares de medición. Sin embargo, en todos ellos predomina la afectación trabecular y, cuando se ha

determinado, una disminución de la resistencia biomecánica ósea. Otro modelo de rata diabética no obesa es el de las ratas Zucker, desarrollándose la enfermedad de forma progresiva hasta presentar complicaciones graves de la misma. Estas ratas presentan descenso de la masa ósea, tanto a nivel cortical como trabecular, tamaño inferior de los huesos largos y deterioro de las propiedades biomecánicas y microestructurales del hueso cortical y trabecular^{16,17}.

Varios mecanismos pueden explicar esta alteración. La glucosa constituye la principal fuente energética de los osteoclastos siendo la hiperglucemia responsable de un incremento de la actividad osteoclástica, con aumento del remodelado óseo y descenso de la cantidad y calidad ósea². Por otra parte, la hiperglucemia provoca la glucosilación no enzimática de proteínas del hueso dañando la calidad ósea¹⁸. A su vez, la glucosuria incrementa la hiper calciuria con cambios en el sistema PTH/vitamina D. Estos efectos deletéreos sobre la calidad ósea pueden ser parcialmente compensados por el incremento de la masa ósea asociada a la obesidad¹⁹. Una alteración del metabolismo del calcio también puede contribuir al deterioro de la calidad ósea. En diabéticos se ha descrito un aumento de la calciuria que se ha relacionado con la hiperglucemia y glucosuria. Ello provoca un hiperparatiroidismo secundario que ejerce un efecto perjudicial sobre el hueso, especialmente sobre el compartimento trabecular²⁰. La alteración del metabolismo de la vitamina D y de la parathormona es particularmente prominente en pacientes con función renal reducida. La microangiopatía puede alterar la función endotelial²¹ y la macroangiopatía con aterosclerosis puede conducir a reducción del aporte sanguíneo a los huesos^{22,23}. Por otra parte, en pacientes con neuropatía la alteración en la carga sobre los huesos también puede contribuir a la pérdida de masa ósea. Podemos decir por tanto, que existen múltiples mecanismos que ejercen un efecto deletéreo sobre el hueso en animales de experimentación con diabetes tipo 2 que pueden explicar la alteración de la calidad ósea en estos modelos.

Como conclusión, podemos decir que las ratas Goto-Kakizaki constituyen un modelo válido para el estudio de la diabetes tipo 2, ya que elimina un importante factor de confusión, el sobrepeso. Aunque el tamaño muestral es pequeño, hemos encontrado un deterioro de la microestructura a nivel trabecular en fémur, conservándose sin embargo la densidad mineral ósea volumétrica.

Bibliografía

1. Olmos JM, Pérez Castrillón JL, García MT, Garrido JC, Amado JA, González Macías J. Bone densitometry and biochemical bone remodeling markers in type 1 diabetes mellitus. *Bone Miner* 1994;26:1-8.
2. Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmo E. Skeletal involvement in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:196-204.
3. Cortés Sancho R, Pérez Castrillón JL, Martín Escudero JC, Iglesias S, Álvarez Manzanares P, Ramos R. Type 2 diabetes mellitus as a risk factor for hip fracture. *J Am Geriatr Soc* 2004;52:1778-9.
4. De Liefde II, Van der KM, De Laet CE, Van Daele PL, Hofman A, Pols HA. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: The Rotterdam Study. *Osteoporos Int* 2005;16:1713-20.
5. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia* 2005;48:1292-9.
6. Janghorbeni M, Van Dam RM, Willet L, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 2007;166:495-505.
7. Zhang L, Liu Y, Wang D, Zhao X, Qiu Z, Ji H, Rong H. Bone biomechanical and histomorphometrical investigation in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Acta Diabetol* 2009;46:119-26.
8. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am* 1984;A6:612-19.
9. Xuan L, Sasov A. Cluster reconstruction strategies for micro CT and nano Ct scanners. In: Proceedings of the Fully Three-Dimensional Image Reconstruction Meeting in Radiology and Nuclear Medicine, July 6-9, 2005, Salt Lake City, UT, USA.
10. Hildebrand T, Rüegsegger P. A new method for the model independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* 1997;185:67-75.
11. Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Rüegsegger P. The ability of three dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 1999;25:55-60.
12. Hildebrand T, Rüegsegger P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput Methods Biomech Biomed Eng* 1997;1:15-23.
13. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor: A new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 1992;13:327-30.
14. Ahmad T, Ohlsson C, Säaf M, Östenson CG, Kreicbergs A. Skeletal changes in type-2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Endocrinol* 2003;178:111-6.
15. Östenson CG, Fièrè V, Ahmed M, Lindström P, Brismar K, Brismar T, et al. Decreased cortical bone thickness in spontaneously non-insulin-dependent diabetic GK rats. *J Diabetes Complications* 1997;6:319-22.
16. Prisyby RD, Swift JM, Bloomfield SA, Hogan HA, Delp MD. Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. *J Endocrinol* 2008;199:379-88.
17. Reinwald S, Peterson RG, Allen MR, Burr DB. Skeletal changes associated with the onset of type diabetes in the ZDF and ZDSD rodent models. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E765-74.
18. Yamagishi S, Nakamura K, Inoue H. Possible participation of advanced glycation end products in the pathogenesis of osteoporosis in diabetic patients. *Med Hypotheses* 2005;65:1013-5.
19. Pérez Castrillón JL, De Luis D, Martín Escudero JC, Asensio T, Del Amo R, Izaola O. Non-insulin-dependent diabetes, bone mineral density, and cardiovascular risk factors. *J Diabetes Complications* 2004;18:317-21.
20. Hofbauer LC, Brueck C, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res* 2007;22:1317-28.
21. Sanada M, Taguchi A, Higashi Y, Tsuda M, Kodama I, Yoshizumi M, et al. Forearm endothelial function and bone mineral loss in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2004;176:387-92.
22. McNair P, Christensen MS, Christiansen C, Madsbad S, Transbøl I. Is diabetic osteoporosis due to microangiopathy? *Lancet* 1981;1(8232):1271.
23. Vogt MT, Cauley JA, Kuller LH, Nevitt MC. Bone mineral density and blood flow to the lower extremities: The study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 1997;12:283-9.