



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

OBTENCIÓN DE UN PERFIL DE PROTEÍNAS EN HUESO ALVEOLAR DE RATAS DIABETIZADAS
CON ESTREPTOZOTOCINA BAJO UN ESTRÉS MECÁNICO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

Carla Cecilia Flores Oscós

Director Dr. Alejandro García Muñoz

Dictaminadores Dr. José Francisco Gómez Clavel
Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte
Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez
Dra. Marcela Sofía Jiménez Martínez

Los Reyes Iztacala, Edo. de México 2017

Este proyecto fue realizado gracias al programa PAPIME 2017 y al

CONACYT CB-2014-1235984





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Índice

Contenido	Página
<u>Resumen</u>	<u>5</u>
<u>Abstract</u>	<u>6</u>
Tema I	
<u>1INTRODUCCIÓN</u>	<u>7</u>
Tema II	
2.1HUESO	8
2.1.1Osteoblastos	9
2.1.2Osteoclastos	9
2.1.3Osteocitos	10
2.2REMODELADO ÓSEO	11
2.3HUESO Y DIABETES	12
2.3.1 Diabetes Experimental (STZ)	14
2.4ESTRÉS MECANICO Y HUESO	15
2.5PROTEOMICA	17
2.6PROTEINAS DE MATRIZ OSEA	17
2.6.1 Proteínas no colágenas	17
2.6.2 Proteínas de unión celular	18



2.6.3 Factores de crecimiento de la matriz ósea	19
2.6.4 Factores de transcripción	20
2.6.5 Peso molecular y Punto isoeléctrico	21
2.6.6 Proteínas sintetizadas por el osteocito	23
Tema III	
<u>3Justificación</u>	<u>24</u>
Tema IV	
<u>4Hipótesis</u>	<u>25</u>
Tema V	
<u>5.1ObjetivoGeneral</u>	<u>25</u>
<u>5.2 Objetivos Particulares</u>	<u>25</u>
Tema VI	
<u>6Material y Métodos</u>	<u>26</u>
6.1 Diabetes Experimental	28
6.2 Estrés Mecánico	29
6.3 Preparación de la muestra	30
6.4 Electroforesis	31



Tema VII

7Resultados 33

7.1 Resultados de electroforesis en una dimensión 34

5.2 Resultados de electroforesis en dos dimensiones 36

5.3Análisis de resultados 47

Tema VI

6Discusión 48

Tema VII

7CONCLUSIONES 50

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 51

9 ANEXO 56



RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 1 es una enfermedad autoinmune que implica la destrucción de la células β pancreáticas y conlleva a alteraciones en el metabolismo óseo. Se ha observado en huesos largos de ratas inducidas con diabetes experimental que hay una disminución en la densidad ósea. Sin embargo, en la actualidad existen pocos estudios enfocados en la obtención de un perfil proteico en el hueso. El objetivo de este trabajo fue el estandarizar la obtención de un perfil de proteínas expresadas en los maxilares superiores de ratas con diabetes experimental inducida mediante una inyección única de estreptozotocina y sometidas a estrés mecánico con un resorte en forma de U de níquel titanio. En este trabajo se utilizaron 24 ratas tipo wistar, las cuales se dividieron en 4 grupos: Normoglicémicas sin estrés mecánico (Grupo N), Hiperglicémicas sin estrés mecánico (Grupo G), Normoglicémicas con estrés mecánico (Grupo NS) e Hiperglicémicas con estrés mecánico (Grupo GS). Se extrajeron las proteínas de los maxilares y se purificaron para después obtener los perfiles en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones.

Resultados

En los geles de poliacrilamida en una dimensión se observó la presencia de bandas con un rango de 10 a >250 kDa. Se observaron bandas con expresión diferencial entre el Grupo N y el Grupo G.

En la electroforesis bidimensional dentro de un rango de pH de 3 a 10 se mostró que el perfil proteico del Grupo N, tenía un total de manchas proteicas de 41, mientras que en el Grupo G se detectaron 43, en el Grupo NS un total de 63 y en el Grupo GS 72.

Conclusión

Aunque todos los perfiles comparten varias proteínas, los perfiles del Grupo N y el Grupo GS mostraron más parecidos entre sí, así como el perfil de hueso del Grupo G y del Grupo NS. En ambos casos, se observaron manchas con expresión diferencial y un aumento o disminución en la cantidad de expresión proteica (la hiperglicemia disminuye la expresión de proteínas en el hueso alveolar). Con lo cual podemos sugerir que el aparato influye en la sobre expresión de las proteínas. Ya que la tensión generada en el hueso expresa una cantidad mayor de proteínas.



ABSTRACT

Type 1 Diabetes Mellitus is an autoimmune disease that involves the destruction of pancreatic cells and implies an alteration in bone metabolism. It has been observed in long bones of rats induced with experimental diabetes that the bone densities decrease. However, at present there are few studies focused on obtaining a proteins profile in the bone. The objective of this work was to obtain the proteins profile expressed in the upper jaws of rats with experimentally induced diabetes by a single injection of streptozotocin and subjected to a mechanical stress with a wire in U form of nickel titanium. Twenty-four wistar rats were divided into 4 groups: Normoglycemic without mechanical stress (Group N), Hyperglycemic without mechanical stress (Group G), Normoglycemic with mechanical stress (Group NS) and Hyperglycemic with mechanical stress (Group GS). The proteins were extracted from the jaws and purified to then obtain the profiles on polyacrylamide gels in one and two dimensions.

Results

In polyacrylamide gels in one dimension was detected the presence of bands with a range of 10 to >250 kDa: but also was observed the over expression of some proteins in the Group N and Group G.

In the two-dimensional electrophoresis within a pH range of 3 to 10: The protein profile of the Group N have a total spots of 41, while in Group G were detected 43, in the NS Group a total of 63 and in the Group GS 72.

Conclusion

Although all profiles share several proteins, the profiles of Group N and Group GS are more similar to each other, as well as the bone profile of Group G and Group NS. In both cases where the results are similar, but the spots have a differential expression and an increase or decrease in the amount of protein expression were observed (hyperglycemia decreases the expression of proteins in the alveolar bone). By which we can suggest that the stress influences the expression of the proteins.



Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que afecta a más de 6 millones de mexicanos, siendo la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres. Existen diferentes tipos de DM debido a una compleja interacción entre genética y factores ambientales.¹ Por lo que la diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad metabólica multifactorial en la que los mecanismos de defensa juegan un papel fundamental. Cuando la enfermedad se encuentra desarrollada los pacientes son dependientes de insulina.²

Actualmente está demostrado que los pacientes diabéticos muestran una pérdida significativa de la masa ósea.³

Las complicaciones óseas asociadas a la diabetes producen efectos que deterioran al paciente que lo padece, dentro de los cuales los más comunes son: la disminución de la masa ósea, riesgo a fracturas y la enfermedad periodontal. La resorción ósea en los modelos animales diabéticos se ha mostrado como una disminución en la actividad de los osteoblastos y osteoclastos.⁴

Por otro lado la enfermedad periodontal es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida del hueso alveolar, la cual conduce en etapas avanzadas a la pérdida de los dientes, siendo considerada una enfermedad infecciosa-inflamatoria, que es agravada por el estado hiperglicémico.⁵

La DM1 contribuye a la pérdida de hueso a través de cambios en la expresión génica de TRAP y catepsina K en los osteoclastos, así como de osteocalcina en osteoblastos lo que resulta en aumento de la actividad de resorción ósea y disminución de la formación de hueso.⁶

No obstante los osteocitos son la célula más abundante en el hueso, pero poco se sabe acerca de su contribución al metabolismo óseo. Se han propuesto diferentes funciones para los osteocitos, pero es generalmente aceptado que su tarea más importante radica en la detección de la tensión causada por la carga mecánica sobre el hueso.⁷

Por otro lado, en ratas diabéticas se han observado alteraciones en la matriz ósea en particular en su formación, lo que da lugar a alteraciones en la mineralización.⁸



Hueso

El tejido óseo, es un tejido conjuntivo especializado denso, está constituido por células, una matriz ósea, sustancia intercelular calcificada, integrada por componentes orgánicos amorfos, fibrilares e inorgánicos como son: sales de calcio y fosforo(Figura.1 tejido óseo).⁹

Este tejido está conformado por tres tipos identificables de células especializadas que son los osteoblastos, los osteoclastos, y osteocitos.¹⁰

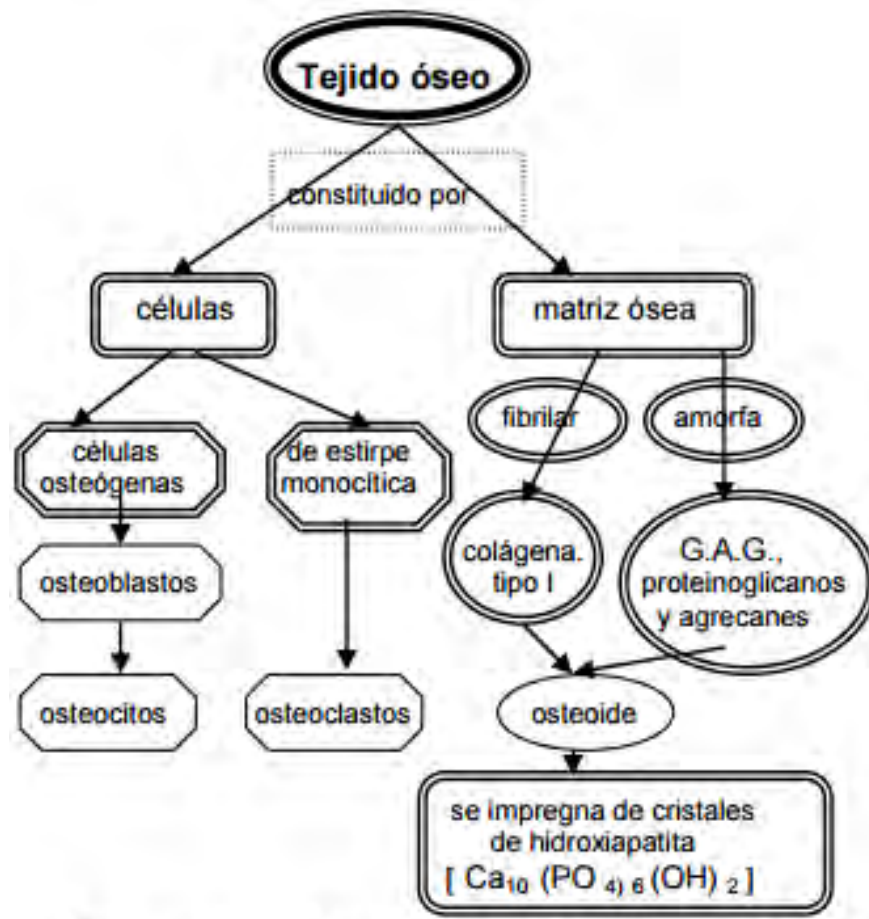


Figura 1. Mapa conceptual que representa los componentes del tejido óseo (MONTALVO 2010)



Osteoblastos

Los osteoblastos son células que derivan de células mesenquimales. Están situadas en la superficie externa de los huesos en formación. Son los responsables de generar la sustancia intercelular orgánica denominada osteoide, constituida por matriz amorfa (osteopontina, osteonectina y osteocalcina), fibras colágenas tipo I, y de depositar en el osteoide cristales de fosfato y carbonatos de calcio (matriz inorgánica).¹⁰ La mayor parte de los OB desaparecen al finalizar la síntesis osteoide, posiblemente por un fenómeno de apoptosis o muerte celular programada.¹¹ Algunos, sin embargo, quedan atrapados dentro de la matriz ósea, transformándose en células de aspecto estrellado, conocidas como osteocitos, o bien, se aplanan y se transforman en las llamadas células de revestimiento (“lining cells”). Estas células tapizan las superficies óseas y a través de la producción de factores locales como las Interleucina-6 e Interleucina-11.¹² Las cuales parecen desempeñar un papel importante no sólo en el control del remodelado óseo sino también en lo que se refiere al intercambio de calcio entre el hueso y el líquido intersticial.

Osteoclasto

Los osteoclastos son células grandes, multinucleadas, se localizan en la superficie interna de los huesos densos o de las trabéculas óseas. Son células que tienen receptores membranales para sus factores estimulantes secretados por los osteoblastos para la calcitonina. Tienen por función desgastar o erosionar el hueso con la finalidad de remodelarlo, cuando el organismo así lo requiere. ¹⁰ Los preosteoclastos son células dotadas de un solo núcleo que se adhieren a las superficies óseas y al fusionarse entre sí dan lugar a los osteoclastos.¹³ Los preosteoclastos expresan en su membrana moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las cadherinas que parecen intervenir en la fusión de estas células. En uno de los polos de los osteoclastos se encuentra el llamado “borde en cepillo”, donde la membrana celular se pliega varias veces.¹³



Osteocitos

Los osteocitos, componen entre el 90 al 95% de todas las células óseas. Los osteocitos son los osteoblastos que quedan atrapados entre la matriz ósea calcificada y dentro de cavidades llamadas lagunas óseas.¹⁴

Se han propuesto diferentes funciones para los osteocitos a lo largo del tiempo, pero ahora se acepta que su tarea más importante radica en la detección de la tensión causada por la carga mecánica pero a un nivel molecular.¹⁵

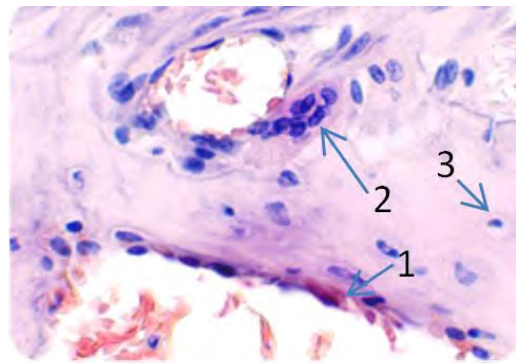


Figura 2. Muestra del hueso alveolar de rata, En donde se observan los 1) Osteoblastos, 2) Osteoclastos y 3) Osteocitos

Remodelado óseo.

La remodelación ósea es un proceso fisiológico que involucra funciones celulares dirigidas hacia la resorción y formación de hueso nuevo (Figura 3). La osteoporosis o la disminución del contenido mineral óseo, es el resultado de anomalías en el acoplamiento de las funciones del osteoclasto y del osteoblasto. Estas funciones están reguladas por hormonas sistémicas y factores locales.¹⁶ Los osteocitos también podrían ser importantes para la iniciación del proceso de remodelación. Se sugiere que realizan micro fisuras en el hueso, mecanismo por el cual se induce la remodelación. La formación de micro grietas en el tejido óseo conduce a la apoptosis del osteocito¹⁷, se ha encontrado que estas células se expresan en el proceso de RANKL, el cual es un mecanismo para inducir la osteoclastogenesis, necesaria para reabsorber el hueso dañado y posteriormente sustituir el hueso viejo por nuevo.¹⁸

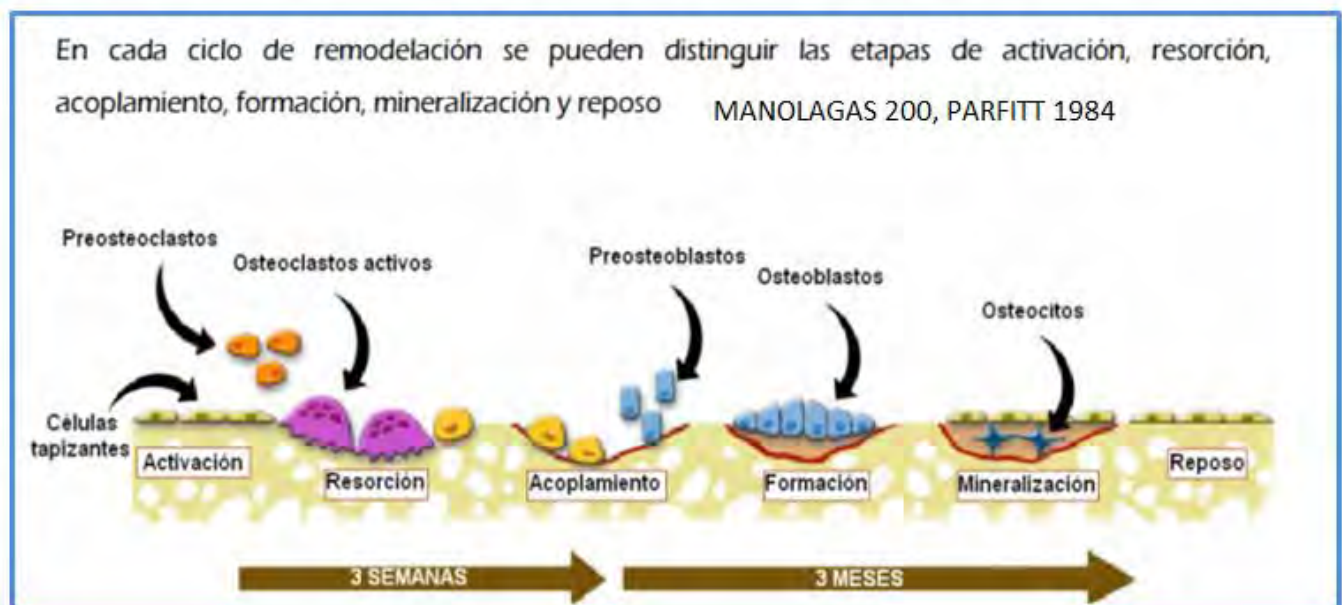


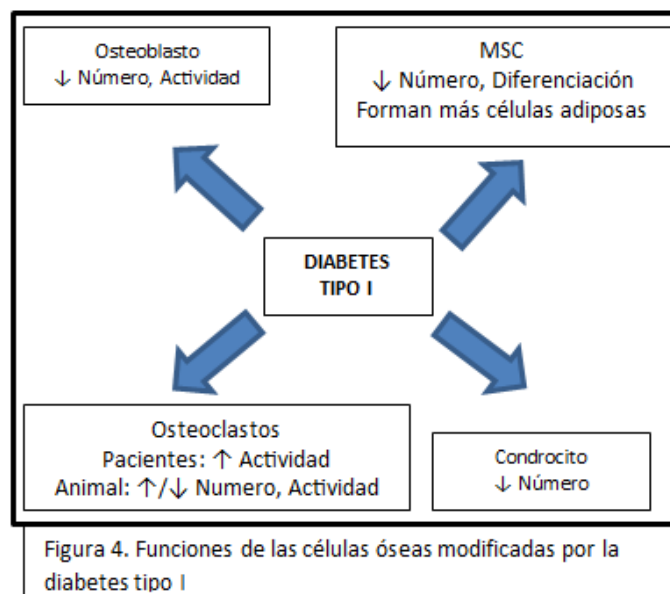
Figura 3.



Hueso y Diabetes

En la diabetes, el estado del hueso se altera, lo que conduce a un mayor riesgo de fractura. La osteopenia, e incluso la osteoporosis, se encuentran tanto en humanos como en modelos animales con diabetes tipo 1, a menudo con una corteza más delgada, a través de una disminución en la formación ósea, contenido mineral óseo y una menor tasa de mineralización.¹⁹

Se han encontrado cantidades disminuidas de proteínas y minerales de la matriz en roedores, incluyendo colágeno, osteocalcina, proteoglicano (PG), calcio, magnesio, cobre y estroncio. La posterior interacción alterada de la matriz modificada con células óseas altera su efecto sobre la función celular. La mala formación de la matriz y las propiedades modificadas conducirán a una unión insuficiente e ineficiente de las células y los iones, interrumpiendo la mineralización (Figura. 3). La disminución del flujo sanguíneo debido a una disminución de la densidad microvascular dentro del hueso, como se observa en los ratones, contribuirá a la mala calidad general del hueso.²⁰ Se han observado cambios relacionados con osteoblastos, condrocitos, células madre mesenquimatosas y osteoclastos (Figura 4).





En roedores, el número de osteoblastos y su actividad se han encontrado disminuidos, por lo tanto, es una superficie osteoide disminuida en donde se forma hueso nuevo.²⁰ De manera similar, la producción de colágeno disminuye.²¹ La formación de condrocitos también se reduce en estos animales, debido a la baja expresión del receptor de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1). La retención de glucosa en los ratones se ve reducida por la disminución del transportador de glucosa 4 (GLUT4)²², limitando el metabolismo de la glucosa y, por lo tanto, la energía para la actividad celular, incluida su proliferación. Las células mesenquimales (MSC) son el punto de partida común para el desarrollo de osteoblastos y condrocitos, estando su proliferación y diferenciación con una baja regulación en ratas diabéticas.²³

En pacientes diabéticos con microangiopatía, se observó que tienen una densidad mineral ósea disminuida en comparación con diabéticos sin microangiopatía. La resorción ósea aumentada se midió a través de la concentración de Ca e hidroxiprolina en la orina.²⁴ A partir de estudios en modelos de roedores, surgieron resultados variados para el número y la actividad de los osteoclastos.

En muchos de estos estudios de diabetes tipo 1, los osteoclastos mostraron una disminución en el número y actividad,²⁵ con una baja concentración de marcadores de degradación de colágena en la orina.²⁶ El número disminuido de osteoclastos contribuiría a la disminución del número de osteoblastos mientras que la función osteoclástica comprometida significaría una extracción menos eficaz del hueso dañado, haciéndolo más débil. Por el contrario, tanto Suzuki en el año 2003²⁷ como Hie en el año 2009²⁸, demostraron en varios modelos de ratas diabéticas de tipo 1, una mayor actividad y un mayor número de osteoclastos. Dentro de la médula ósea de los ratones diabéticos se encontró un mayor contenido de células adiposas. Esto implica un cambio en el equilibrio de la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos o adipocitos en favor de estos últimos, siendo promovidos por el Receptor Gamma Activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas (PPAR γ) elevado en humanos y ratones y por lo tanto hay una menor formación ósea.²⁹



DIABETES EXPERIMENTAL CON ESTREPTOZOTOCINA (STZ).

El mecanismo de acción de la estreptozotocina es someter a las células β del páncreas a la destrucción por necrosis a través de un transportador de glucosa 2 (GLUT2), además la estreptozotocina libera cantidades tóxicas de óxido nítrico que inhibe la actividad de la aconitasa y participa en el daño del ADN.³⁰

También resulta eficaz una dosis similar o mayor después de la primera administración intraperitoneal, ya que una sola dosis por debajo de los 40 mg / kg de peso corporal puede ser ineficaz. La vía de inducción de diabetes experimental se realiza mediante una dosis única intravenosa en ratas adultas para inducirla se administran entre 40 y 60mg/kg de peso. Los agentes más utilizados para la diabetización de animales de laboratorio son el Alozan y estreptozotocina, con una dosis de 541 mg / kg de peso corporal.

La Estreptozotocina (STZ) deteriora la oxidación de la glucosa, otros autores reportan que disminuye la biosíntesis y secreción de insulina.³¹ Se ha encontrado que para evitar la acción diabetogénica de STZ se necesita de una expresión reducida de GLUT2. Estudios resientes observaron que la STZ restringe la expresión GLUT2 in vivo e in vitro cuando se administra en dosis múltiples.³²



Estrés Mecánico y Hueso

Los tejidos óseos son sensibles a su entorno mecánico.³³ Es bien aceptado que la presencia de un nivel razonable de estrés mecánico en los huesos (conocido como carga normal) podría mejorar la formación ósea y mantener una masa ósea saludable.³⁴ La ausencia prolongada de carga normal en los huesos, casi siempre es asociada con una inactividad física prolongada debido a lesiones, podría disminuir la formación ósea y aumentar la resorción ósea, eventualmente conduciendo a la pérdida ósea y la osteoporosis. Cuando el nivel de estimulación mecánica excede la cantidad normal durante un período prolongado de tiempo, podría producirse una condición de estrés conocida como carga por fatiga. En la carga por fatiga, pueden aparecer micro daños, tales como pequeñas grietas en los tejidos óseos, desencadenando una cascada de procesos de remodelación que intentan reparar el tejido óseo dañado mediante la resorción secuencial. Cuando las condiciones de carga por fatiga no se reconocen temprano y se abordan, los riesgos de lesiones óseas y enfermedades de los huesos aumentarán.³⁵

Sigue siendo desconocido como los genes mecánicamente sensibles y proteínas en las células óseas actúan bajo estrés mecánico y cómo sus expresiones génicas diferenciales están reguladas.³⁶ Se ha identificado a los osteoblastos como células reclutadas en las superficies óseas para formar nuevo hueso en respuesta a la carga.³⁷ En las condiciones de carga por fatiga, se sabe que la migración de osteoblastos a la superficie ósea coincide con migraciones de progenitores osteoblásticos y áreas del osteoblasto dañadas por el hueso, activando así el proceso de remodelación ósea y reparaciones de daños.³⁸ Este proceso requiere la coordinación temporal de los osteoblastos y los osteoclastos para reparar los tejidos óseos dañados. El hueso de rata que se somete a remodelado intracortical en respuesta a altos niveles de cargas cíclica, que inducen microdaños en la corteza y la reabsorción intracortical está asociado tanto con el microdaño óseo así como con zonas de osteocitos alterados. De acuerdo a lo anterior las ratas pueden iniciar el remodelado haversiano en los huesos largos en respuesta a la fatiga, y la muerte o daño de los osteocitos puede proporcionar uno de los estímulos para este proceso.



Estudios de microarreglos sugirieron que la apoptosis del osteocitos y las vías de señalización de Wnt son dos procesos biológicos críticos implicados, no se realizaron controles adecuados contra las condiciones normales de carga por lo que no estaba claro cuáles eran los cambios en el nivel de ARNm observados en la carga por fatiga compartidos en común con la carga normal.³⁹

En las últimas décadas se han generado datos sobre la biología molecular y la función de los osteocitos. Lejos de ser un espectador pasivo en el hueso, se ha encontrado que esta célula tiene numerosas funciones, como actuar como un orquestador de la remodelación ósea a través de la regulación de los osteoclastos y la actividad osteoblástica y también funciona como una célula endocrina.⁴⁰

Los osteocitos, las células óseas más numerosas y menos estudiadas, son células de forma estrellada encerradas en la red ósea, hueso-canalicular. Basándose en la ubicación de los osteocitos dentro de la matriz ósea y la morfología celular, se propone que los osteocitos contribuyan potencialmente a la regulación del remodelado óseo en respuesta a estímulos mecánicos y endocrinos. Aunque se ha reconocido la importancia potencial de los osteocitos, ha habido pruebas limitadas de los roles funcionales de los osteocitos en la remodelación ósea. Sin embargo, los estudios de genes de ratón y las mutaciones de genes humanos han contribuido a los últimos avances de la biología de osteocitos. Además, el hueso se ha considerado tradicionalmente como parte del sistema esquelético y locomotor, pero estudios recientes sugieren que los osteocitos regulan las funciones biológicas sistémicas basadas en el vínculo inseparable entre el hueso y otros sistemas. El osteocito es una fuente de factores solubles no sólo para dirigir a las células de la superficie del hueso, sino también para dirigirse a órganos distantes, tales como riñón, músculo y otros tejidos. Esta célula desempeña un papel importante en el metabolismo del fosfato y la disponibilidad de calcio y puede remodelar su matriz perilacunar. Los factores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral y los glucocorticoides utilizados para tratar la enfermedad inflamatoria inducen la muerte de los osteocitos, pero por diferentes mecanismos con resultados potencialmente diferentes. Por lo tanto, los osteocitos sanos, viables son necesarios para la funcionalidad apropiada del hueso y de otros órganos.⁴⁰



Proteómica

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término "PROTEOMA" fue usado por vez primera en 1995 para describir el conjunto de proteínas, en una célula o un tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la "PROTEOMICA". Se habla de dos tipos de proteómica, la de expresión que es un estudio cuantitativo y la proteómica de mapa celular (funcional). La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones metabólicas y/o patológicos permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. En el caso concreto del análisis proteómico asociado a patologías concretas, es posible identificar proteínas que permitirían diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma. Dichas proteínas se conocen con el nombre genérico de biomarcadores.⁴¹

Proteínas de la matriz ósea

El 90% de las proteínas que se pueden extraer de la matriz ósea es colágena tipo I, el 10% restante se les conoce de manera genérica como proteínas no colágenas de hueso.

Proteínas no colágenas

En los últimos años, una serie de proteínas no colágenas se han aislado del hueso, y aunque su función no siempre se entiende por lo menos una proporción de ellas parecen ser biológicamente activas.

Dentro de estas proteínas se encuentran las fosfoproteínas, estas son proteínas que se modifican mediante la unión de un solo grupo fosfato o de una molécula compleja.⁴² Las fosfoproteínas Incluyen a la sialoproteína ósea y los proteoglicanos como constituyentes



menores de la matriz ósea. Los proteoglicanos inhiben la calcificación enmascarando las fibrillas de colágena u ocupando espacios críticos dentro de la fibrilla y con ello disminuyen la difusión, la interacción química y el secuestro de iones de calcio o complejos de fosfato de calcio.⁴³

La osteocalcina también conocida como proteína que contiene ácido δ -carboxiglutámico (BGLAP) es una proteína no colágena que se encuentra en el hueso y en la dentina. La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante en el hueso⁴⁴ que comprende aproximadamente el 20% de las proteínas de la matriz no colágena y es producida por el osteoblasto. Contiene tres residuos de ácido γ -carboxilglutámico (Gla) que se unen al calcio, y es dependiente de la vitamina K. Sin embargo, su papel fisiológico en la mineralización sigue siendo incierto. Se ha postulado que en lugar de facilitar la calcificación podría retardarlo, y también que es quimio atrayente para los osteoclastos. Al igual que la fosfatasa alcalina, la osteocalcina se usa clínicamente como un marcador de la actividad de los osteoblastos. La osteocalcina en suero se mide por radio inmuno ensayo como marcador de recambio óseo.⁴⁵ Finalmente, la osteocalcina favorece la utilización de la glucosa en los tejidos periféricos.⁴⁶

Por otro lado, la proteína Gla de matriz (MGP), al igual que la osteocalcina, es un miembro de las proteínas del ácido γ -carboxilglutámico dependiente de la vitamina K (Gla). MGP es un posible regulador de la calcificación de la matriz extracelular debido a que los ratones deficientes en MGP exhiben la calcificación espontánea de varios cartílagos y también de sus arterias.⁴⁷

La fosfatasa alcalina es una ectoenzima (proteínas integrales de la membrana) producida por los osteoblastos que se asocia al proceso de mineralización. La fosfatasa alcalina del tejido óseo hidroliza el pirofosfato inorgánico (PPi) y genera fosfato inorgánico (Pi), que es esencial para la formación de hidroxapatita mediada por vesículas de la matriz.⁴⁸

Proteínas de unión celular

Diferentes proteínas de unión celular que tienen la secuencia de aminoácidos RGD común (arginina-glicina-ácido aspártico), son responsables de mediar la unión de estas proteínas a las integrinas (proteínas integrales de membrana) en la superficie celular.



Estas proteínas de unión celular incluyen a la fibronectina, la osteopontina, la osteonectina, trombospondina y varias otras sialoproteínas óseas, incluyendo la sialoproteína ósea y una segunda llamada glicoproteína ácida ósea.⁴⁹

La osteopontina es una sialoproteína no colágena relativamente abundante producida por osteoblastos que tiene un papel en la fijación y reabsorción de los osteoclastos⁵⁰ y que también tiene sitios de unión al calcio.⁵¹ La expresión de la osteopontina está regulada por la vitamina D, que aumenta su secreción. Se une a los receptores de integrina en los osteoclastos por su secuencia RGD, activando la vía de la fosfolipasa C en el osteoclasto y aumentando el calcio intracelular.

La osteonectina es una glicoproteína ácida implicada en la unión celular. Apoya la remodelación ósea y el mantenimiento de la masa ósea en los vertebrados, como lo demuestran los frágiles huesos de ratones deficientes en osteonectina.⁵² También se le conoce como proteína de secreción ácida y rica en cisteína (SPARC / osteonectina / BM40) la cual es una de las proteínas no colágenas más abundantes expresadas en tejidos mineralizados. Esta proteína parece influir en las vías involucradas en el ensamblaje de la matriz extracelular, tales como el procesamiento de la procolágena y la formación de fibrillas de colágena, así como la capacidad para influenciar la diferenciación de osteoblastos y la actividad de osteoclastos.⁵³

La sialoproteína ósea humana (BSP) es una glicoproteína que se encuentra en tejidos mineralizados como hueso, dentina, cemento y cartílago calcificado.⁵⁴ Durante la morfogénesis ósea, la BSP es producida por osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y condrocitos hipertróficos. A través de los dominios de unión única, la BSP puede estar involucrada en la unión celular y la señalización, la nucleación de la hidroxiapatita (HA), y la unión a la colágena tipo I.

Factores de crecimiento de la matriz ósea

Una amplia gama de otras proteínas biológicamente activas en el hueso tienen el potencial de regular la actividad celular. La mayoría de estos factores son factores reguladores del crecimiento (Tabla 1), como el factor de crecimiento transformante β I (TGF β I) y TGF β II, las proteínas morfogénicas óseas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, los factores

estimuladores de colonias, el factor de necrosis tumoral y la linfoxina, el factor insulínico de crecimiento I y II.⁵⁵

	Estimulan formación	Estimulan reabsorción
Factores de crecimiento	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (Proteínas morfogenética osea-4) BMP-6 (Proteínas morfogenética osea-6) BMP-7 (Proteínas morfogenética osea-7) IGF-I (Factor análogo a la insulina I) IGF-II (Factor análogo a la insulina II) TGF-β (Factor transformante del crecimiento β) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) FGF (Factor de crecimiento Fibroblástico) M-CSF (Factor estimulante de colonias macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)

Tabla 1. Factores locales reguladores del remodelado óseo (FERNANDEZ et al 2006)

Factores de Transcripción

Dos factores de transcripción que se expresan predominantemente en los osteoblastos necesarios para el desarrollo del osteoblasto funcional. La primera proteína es, Runx2 es un miembro esquelético. Osterix actúa corriente abajo de Runx2 en la cascada transcripcional de la diferenciación osteoblástica. La expresión de Osterix se regula mediante la unión directa de Runx2 a un elemento sensible en el promotor del gen Osterix. Los factores de transcripción múltiples también juegan un papel crítico en la homeostasis ósea y el desarrollo de osteoblastos funcionales (**Figura 5**).⁵⁶

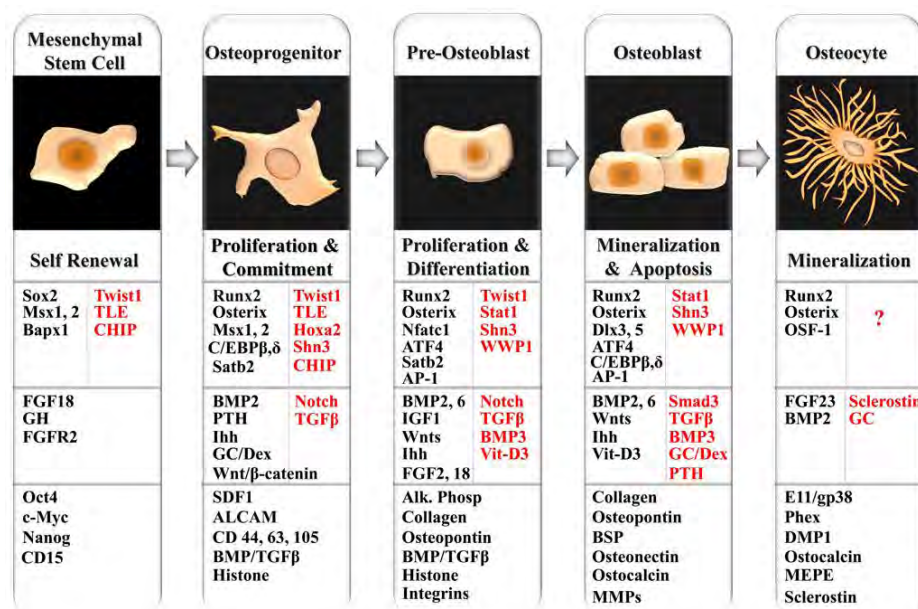


Figura 5. Se ilustra esquemáticamente la secuencia y las etapas del linaje osteoblástico de una célula madre mesenquimal a osteocitos diferenciados de forma terminal. (AMJAD 2010)



Peso molecular y punto isoeléctrico estimado de las proteínas más comunes en hueso.

Proteína	Descripción	pI (Punto Isoeléctrico)	Mw (Peso Molecular)
COLAGENO I	Es sintetizado por osteoblastos. Su función principal es la de resistencia al estiramiento.	5.05	44.722kDa
TROMBOSPONDINA	Glicoproteína de la matriz extracelular de las plaquetas y de una variedad de células normales y transformadas, tanto de origen mesenquimal como epitelial. La trombospondina-1 se cree que desempeñan un rol en la migración y proliferación celular.	4.72	129.647 kDa
FIBRONECTINA	Componente de matriz extracelular; Pueden desempeñar un papel en la fibrosis y las metástasis tumorales.	5.44	272.446kDa
BIGLICANOS	Este gen codifica un miembro de la proteína de proteoglicano rico en leucina (SLRP). La preproteína codificada se procesa para generar la proteína madura, que desempeña un papel en el crecimiento óseo. Se cree que este gen y el gen relacionado con la decorina son el resultado de una duplicación de genes.	7.16	41.654kDa
DECORINA	Este gen codifica un miembro de la pequeña familia de proteoglicanos rico en leucina. Esta proteína desempeña un papel en el montaje de fibrillas de colágeno. Se cree que este gen y el gen asociado biglicanos son el resultado de una duplicación de genes.	8.96	39.805 kDa
SIALOPROTEINAS	Une osteoblastos y osteocitos a la matriz extracelular	4.13	35.018kDa
OSTEOPONTINA	Sialoproteína que une las células de osteosarcoma; Pueden desempeñar un papel en la función celular de los osteoclastos	4.40	33.843kDa
OSTEONECTINA	Glicoproteína no colágena, enlazadora de calcio del hueso en desarrollo. Une el colágeno al mineral en la matriz ósea.	4.70	34.426kDa



OSTEOCALCINA	Este gen codifica una proteína ósea altamente abundante secretada por osteoblastos que regulan la remodelación ósea y el metabolismo energético. La proteína codificada contiene un dominio Gla (gamma carboxiglutámico), que funciona en la unión a calcio e hidroxapatita, el componente mineral del hueso.	6.56	10.962kDa
FGF	FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTOS	9.64	20.725kDa
BMP	PROTEINA MORFOGENICA OSEA	5.04	10.036kDa
IGF	FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINICO	9.56	15.194kDa
IGF – BP	FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINICO-DE UNION DE PROTEINAS	8.84	12.056kDa
TGF – β	FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA	5.69	41.870kDa
PDGF	FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS	5.52	6.028kDa
COLAGENASA	Es una enzima que descompone el colágeno del tejido dañado y facilita el crecimiento de tejido saludable.	5.94	97.316kDa
Catepsina k	La proteína codificada por este gen es una cisteína proteinasa lisosómica implicada en la remodelación ósea y la reabsorción. Se expresa predominantemente en osteoclastos.	8.72	36.966kDa
Esclerostina	Glicoproteína, implicada en el crecimiento óseo.	9.43	24.030kDa
Osterix	Factor de transcripción que es esencial para la diferenciación osteoblástica y la formación ósea.	8.67	44.994 kDa
RUNx2	Es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos	8.77	18.809kDa
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente	8.82	36.598kDa

Cuadro 1. El Punto Isoeléctrico y Peso Molecular estimados se obtuvieron del programa *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*



Proteínas sintetizadas por el osteocito

El osteocito rodeado de osteoide (temprano) realiza principalmente dos funciones en forma simultánea: regulariza la mineralización y forma sus procesos dendríticos para conectarse a las células de la superficie y con otros osteocitos en el interior de la estructura ósea. El osteocito rodeado de osteoide puede controlar y regular la mineralización.⁵⁷ Holmbeck y colaboradores⁵⁸ han demostrado que la osteocitogénesis es un proceso invasivo activo que requiere la hidrólisis de colágena y potencialmente de otras moléculas de la matriz. Los osteocitos en ratones nulos (null) para la metaloproteinasa MT1-MMP tienen significativamente un menor número y longitud de los procesos dendríticos. MT1-MMP es una proteinasa anclada en membrana que puede hidrolizar colágenas de tipo I, II y III, fibrina, fibronectina y otras moléculas de la matriz ósea.

La morfología de los osteocitos puede ser controlada por la molécula E11/gp38/, la cual es un marcador para el osteocito incluido en osteoide, también se le denomina podoplanina, OTS-8, gp38 o PA2.25, ésta se detectó por primera vez en la superficie celular de los osteocitos en el hueso de rata.⁵⁹

A medida que los osteoblastos se transforman a un osteocito, la fosfatasa alcalina se reduce y la caseína cinasa II se eleva, al igual que la osteocalcina.⁶⁰ Se expresan marcadores adicionales, incluyendo el gen regulador de fosfato con homologías a endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX), la fosfoglicoproteína extracelular (MEPE), la proteína de la matriz de dentina 1 (DMP-1), el factor de crecimiento de fibroblastos 23, (FGF-23), la esclerostina y ORP150, un factor pensado para proteger contra la hipoxia. Sorprendentemente, bajo ciertas condiciones los osteocitos también pueden expresar marcadores de osteoclastos, tales como la fosfatasa ácida y la catepsina en la lactancia para remodelar su matriz perilacunar.⁶¹

Los osteocitos sanos y lesionados pueden reclutar osteoclastos a sitios de remodelación. La apoptosis de los osteocitos puede ocurrir en sitios de microdaño. Las moléculas proapoptóticas están elevadas en los osteocitos adyacentes a los lugares con microfracturas, mientras que las moléculas antiapoptóticas se expresan 1 a 2 mm de la microfractura,⁶² lo que muestra que algunos osteocitos tienen mecanismos protectores contra la apoptosis. Mientras que los osteocitos apoptóticos liberan cuerpos apoptóticos que expresan RANKL para reclutar osteoclastos.⁶³



JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico que se presenta aproximadamente en el 3 al 4% de la población en México, siendo la segunda causa de muerte, la diabetes mellitus causó cerca de 83 000 muertes en México según cifras del Instituto Nacional de Salud Pública en 2010. Entre las complicaciones de DM, a largo plazo se encuentran alteraciones en el metabolismo óseo, incluyendo la disminución de la densidad ósea que puede conducir a fracturas, así como alteraciones en la reparación y la regeneración ósea, incluso en los pacientes tratados con insulina.

El estudio de los modelos experimentales en animales de laboratorio, inducidos a una diabetes experimental con estreptozotocina nos permite observar los cambios producidos en el hueso alveolar, que incluye la disminución en la densidad ósea, la fractura por fragilidad e incluso alteración en la aposición y regeneración ósea, en las que se ven alteradas las lagunas osteocitarias por el estrés mecánico. Al ser afectadas las lagunas se ha visto que hay un aumento en la actividad de los osteocitos.⁶⁴

Las células óseas son sensibles a las fuerzas físicas y convierten condiciones de estimulación mecánica en señales bioquímicas que conducen a la expresión de genes y proteínas mecánicamente sensibles. La estimulación mecánica puede causar que las células óseas expresen genes mecano-sensibles y proteínas a través de los receptores de la membrana y los canales iónicos liberando señales intracelulares en cascada.

Entender cómo los cambios en la función de órganos y tejidos surgen en los niveles celular y molecular proporcionará objetivos para una intervención más específica y, por lo tanto, eficiente, por lo que la determinación de la expresión proteica en el hueso alveolar de ratas diabéticas sometidas a estrés mecánico permitirá entender el comportamiento del tejido óseo en esta condición alterada.



Hipótesis

Estandarizar la purificación de proteínas provenientes de hueso sometido a estrés mecánico en condiciones de diabetes tipo 1 en comparación de sus controles nos permitirá observar cambios moleculares en este modelo de estudio.

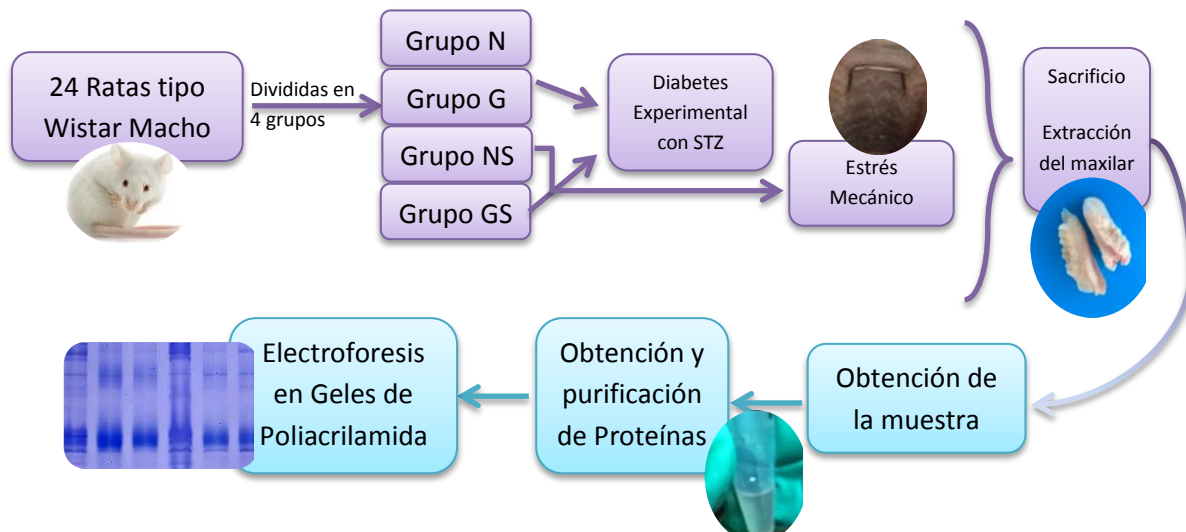
OBJETIVO: Evaluar los perfiles de proteínas provenientes del modelo animal con diabetes, bajo condiciones de estrés mecánico.

Objetivos específicos:

1. Estandarizar y obtener proteínas de hueso alveolar de ratas hiperglicémicas sometidas a estrés mecánico y sus controles. En un perfil en geles desnaturizantes SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico).
2. Obtener el perfil proteico del hueso alveolar en una y dos dimensiones de ratas problema y sus controles.
3. Sugerir la identidad de proteínas diferencialmente expresadas.



METODOLOGIA



Con el fin de tener una cantidad representativa de muestras, los experimentos se realizaron en 24 ratas tipo Wistar macho de 200-250g. Para eliminar la variabilidad hormonal, que se presentan en las ratas hembras debido a los ciclos reproductivos, se decidió que el modelo experimental sea en rata macho.⁶⁵ Se dividieron aleatoriamente en 4 grupos. El primer grupo se conformó por 3 ratas Normoglicémicas sin estrés mecánico (Grupo N), el segundo grupo se conformó por 3 ratas hiperglicémicas (con Estreptozotocina STZ) sin estrés mecánico (Grupo G), el tercero fue el grupo control conformado con 9 ratas se separaron en 3 ratas por caja (Grupo NS), y el cuarto grupo fue de las ratas experimentales con 9 ratas e igual dividido en 3 (Grupo GS). Se alojaron en el Bioterio de las FES Iztacala de 20 a 30 días, de tres ratas por caja con aserrín estéril, cada caja tuvo una tarjeta de identificación, con acceso ad libitum de alimento y agua, donde estas estuvieron iluminadas mediante luz artificial y el cambio de los ciclos de luz se efectuó cada 12 horas. La temperatura fue entre 18° a 25°C. Con una humedad máxima de 54% y la mínima de 13%. Las ratas se marcaron para su identificación mediante marcadores permanentes libres de xilol, no tóxicos, colocando números en la cola dependiendo de cada caso (véase tabla 2).

Los animales utilizados en este proyecto fueron tratados de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, de ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. Con la aprobación y los estándares establecidos por el consejo de Bioética de FES Iztacala bajo el Folio 1080



Tabla 2

	GRUPO	#RATA	Buffer/ STZ	Sacrificio	
6 Días con puro Buffer	GRUPO N	1	Buffer	4 Días	SIN APARATO
		2	Buffer		
		3	Buffer		
	GRUPO G	4	Buffer/ STZ	4 Días	
		5	Buffer/ STZ		
		6	Buffer/ STZ		
		7	Buffer		
	GRUPO NS	8	Buffer		
		9	Buffer		
		10	Buffer	4 Días	
11		Buffer			
12		Buffer			
13		Buffer	2 Días		
14	Buffer				
6 Días STZ+ 2 Después de Diabéticas	GRUPO GS	15	Buffer	6 Días	*CON APARATO
		16	Buffer/ STZ		
		17	Buffer/ STZ		
		18	Buffer/ STZ		
	GRUPO GS	19	Buffer/ STZ	4 Días	
		20	Buffer/ STZ		
		21	Buffer/ STZ		
		22	Buffer/ STZ	2 Días	
		23	Buffer/ STZ		
		24	Buffer/ STZ		

Tabla 2. Se observa el número de la rata, los grupos con solo buffer y los grupos con estreptozotocina (STZ) así como los días que duraron con aparato los Grupos NS y GS antes del sacrificio.

TABLA 3

GRUPO N	Ratas Normoglicémicas
GRUPO G	Ratas hiperglicémicas (Diabetes experimental con STZ)
GRUPO NS	Ratas normoglicémicas con estrés mecánico
GRUPO GS	Ratas hiperglicémicas (STZ) con estrés mecánico

Tabla 3. Significado de cada grupo



En el siguiente cuadro se explica que se realizó con cada grupo. Los 6 días en el que los grupos tenían el buffer o la estreptozotocina, hasta el día cero para la colocación del aparato a partir del cual se cuentan los 2, 4, 6 días para el sacrificio el cual se dividió de esta forma ya que en trabajos previos se observaron cambios en las lagunas osteocitarias.

Grupo N	Grupo G	Grupo NS	Grupo GS
Admisión de 3 ratas, pesaje marcaje. <i>Buffer de Citratos. 6 días</i> Sin estrés mecánico. Sacrificio a los 4 días después.	Admisión de 3 ratas, pesaje y marcaje. Se administra buffer de citratos y estreptozotocina. Medición de glucosa 2 días después. 4 días Sin estrés mecánico. Sacrificio a los 4 días después.	Control 1: admisión de tres ratas, pesaje marcaje, 6 días con Buffer, Con estrés mecánico por 6 días para el Sacrificio.	Experimental 1: admisión de 3 ratas pesaje y marcaje, 6 días con estreptozotocina y buffer, 2 días después medición de glucosa. Para la colocación de estrés mecánico por 6 días más para sacrificio.
		Control 1: admisión de tres ratas, pesaje marcaje, 6 días con Buffer, Con estrés mecánico por 4 días para el Sacrificio.	Experimental 1: admisión de 3 ratas pesaje y marcaje, 6 días con estreptozotocina y buffer, 2 días después medición de glucosa. Para la colocación de estrés mecánico por 4 días más para sacrificio.
		Control 1: admisión de tres ratas, pesaje marcaje, 6 días con Buffer, Con estrés mecánico por 2 días para el Sacrificio.	Experimental 1: admisión de 3 ratas pesaje y marcaje, 6 días con estreptozotocina y buffer, 2 días después medición de glucosa. Para la colocación de estrés mecánico por 2 días más para sacrificio.

Cuadro 2: Se explica que se realizó con cada grupo.

Diabetes Experimental con STZ

Para la administración de la estreptozotocina en los grupos G y GS se inyectaron 60mg de STZ por kg de peso en 1ml de amortiguador de citratos (véase cuadro 2), con una inyección única intraperitoneal. El buffer de citratos se administró también en los grupos N y NS ya que este no sube los niveles de glucosa.



ESTREPTOZOTOCINA Agregar 1ml a la dosis final	Dosis 60 mg STZ - 1000g X - peso de rata
BUFFER DE CITRATOS	1ml buffer de citratos- 1000g X- peso rata

Figura 6. Muestra la Dosis de Stz y Buffer de Citratos por kg de peso de la rata.

Los Grupos N y NS se quedaron 6 días con buffer únicamente, a los Grupos G y GS se les midió la glucosa 2 días después de la administración de estreptozotocina, realizando una punción en la cola se tomó la muestra de sangre, se colocó en tiras y después en el glucometro, posteriormente se verificaron niveles de glucosa, se quedaron 4 días más.

Estrés mecánico

Concluidos los 6 días con buffer o STZ, se colocó el estrés mecánico el cual consistió en un arco de níquel titanio 0.012mm el cual fue colocado en los grupos NS y GS.⁶⁶

La anestesia general para su colocación fue la administrada empleando un relajante en este caso, Xilazina 7mg/kg. Seguido de la administración 5 min después de un anestésico general Ketamina 60mg/kg.

Con el animal anestesiado se prosiguió a colocar el aparato colocándolo entre los primeros y segundos molares superiores (Figura 7).

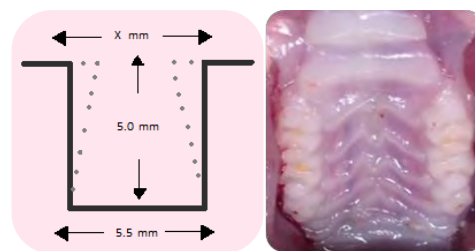


Figura 7. Resorte de níquel titanio 0.012 de grosor entre el primer y segundo molar superior, y activado con una fuerza de 10g (Igarashi et al, 1998)



Sacrificio

El sacrificio, se realizó mediante un trauma cerebral y dislocación cervical a los 2, 4 y 6 días después de la colocación del aparato, se extrajo el maxilar y se retiraron todos los tejidos blandos y dientes con una hoja de bisturí en un ambiente frío. Para posteriormente ser almacenados en refrigeración a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, así como una muestra de sangre la cual fue almacenada a la misma temperatura.

Preparación de la muestra

En condiciones asépticas con nitrógeno líquido se pulverizó el hueso con un mortero y pistilo (Figura 8) y la sangre fue centrifugada a 1700 rpm para obtener el suero.



Figura 8. Hueso en nitrógeno líquido pulverizado con mortero y pistilo

Posteriormente, las muestras se homogeneizaron en amortiguador de muestra para isoelectroenfoque (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 2%, DTT 40 mM y agua MQ), en presencia de inhibidores de proteasas (Complete "cocktail", GE Healthcare). Posteriormente, mediante centrifugación (10,000 xg) se obtuvo el sobrenadante.

Después, se disolvieron en 200 μg de muestra en solución de hidratación para isoelectroenfoque (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 0.5% ó 2%, DTT 40 mM, azul de bromofenol 0.002% y agua MQ), con inhibidores de proteasas (GE Healthcare). Finalmente, las muestras se colocaron en el platillo de hidratación (GE Healthcare).



Para la separación de proteínas en una dimensión, las muestras se colocaron en el gel de poliacrilamida SDS- PAGE al 10%, y se cargaron 25 μ g, el corrimiento fue aplicando un voltaje de 100V hasta su migración final (**Figura 9**). Por último se tiñó el gel utilizando la tinción Coomassie.

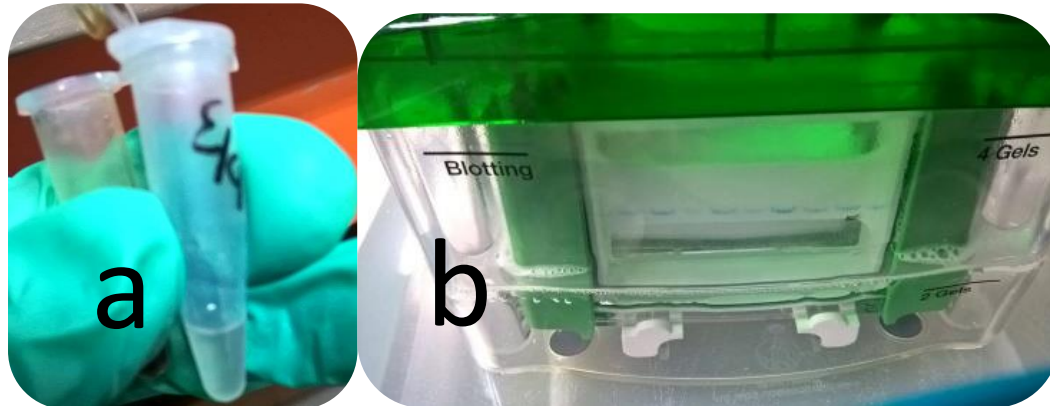


Figura 9. (a) Muestra de hueso y (b) cámara de electroforesis.

Electroforesis en dos dimensiones

Para estandarizar la técnica y obtener un perfil proteico, se llevó a cabo la separación de las proteínas con base en su punto isoeléctrico, esta separación se realizó en las tiras pre-elaboradas para electroforesis (ImmobilineDrystripGels, pH 3-10 of 7 cm, GE Healthcare), para ello, las tiras fueron ya hidratadas con las muestras e incubadas durante 16 h con un gradiente de pH de 3 a 10. Las muestras se sometieron a electroforesis a 16-20 kV/h durante 5 horas en el IPGphor (GE Healthcare).

Posteriormente, las tiras se colocaron durante 10 min en el amortiguador de equilibrio reductor y alquilante (6 M urea, 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, glicerol 29.3%, dodecil sulfato de sodio 2% y azul de bromofenol 0.1%, 65 mM DTT, 135 mM iodoacetamida). Las proteínas se separaron por su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS al 10% utilizando un sistema estándar de electroforesis vertical (15 cm × 13 cm) (BIO-RAD). La electroforesis se llevó a cabo manteniendo constante el voltaje a 100 voltios hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior del gel. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G250 (BIO-RAD) (**Figura 10**).

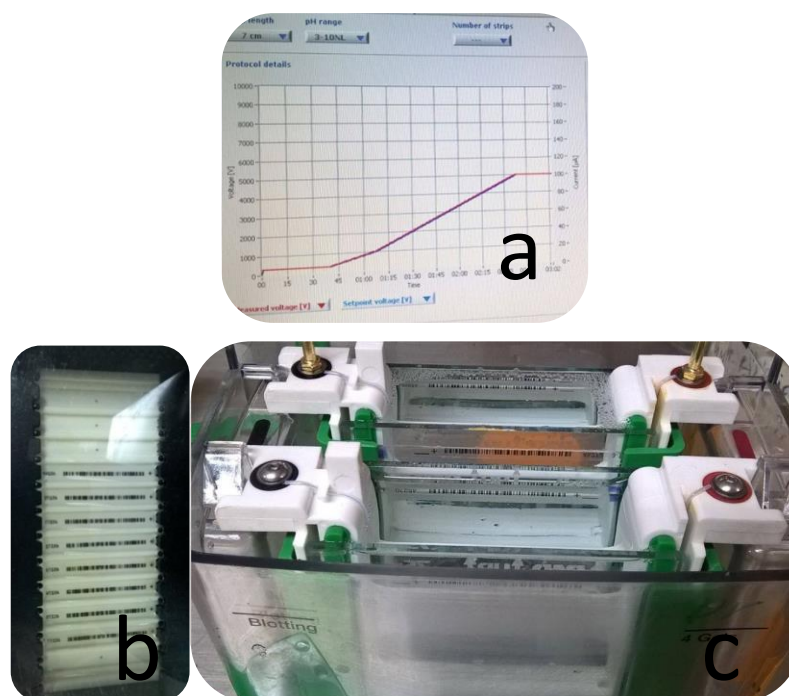


Figura 10. (a y b) Incubación de las tiras pre elaboradas para electroforesis, (c) cámara de electroforesis con las tiras.



Resultados

GRUPO	CARACTERISTICAS	NUMERO DE MUESTRAS	DIAS PARA SACRIFICIO
Grupo N	NORMOGLICEMICAS	3	4
Grupo G	HIPERGLICEMICAS	3	4
Grupo NS	NORMOGLICEMICAS CON ESTRÉS MECÁNICO	3	2
		3	4
		3	6
Grupo GS	HIPERGLICEMICAS CON ESTRÉS MECÁNICO	3	2
		3	4
		3	6

Tabla 4. Grupos y sus características, el número de ratas por grupo y día de sacrificio.

En este trabajo se realizaron los geles en una dimensión de todas las muestras de los diferentes grupos que se pueden observar en la parte de abajo. Al no encontrar diferencias dentro de los mismos grupos por día se analizaron las muestras de los grupos de estudio de 4 días, los mismos que se utilizaron para los dos tipos de electroforesis (en una y dos dimensiones).

Por otro lado, los geles en una dimensión se realizaron para ver la pureza de las muestras y reconocer si había cambios entre cada grupo de rata analizada y sus controles. Lo que se encontró fue que no había diferencias significativas entre las muestras de cada grupo y la pureza de las diferentes muestras fue aceptable.

En la figura 11 se observan diferentes paneles que presentan los patrones electroforéticos de proteínas extraídas de hueso en diferentes condiciones y donde podemos observar que las ratas normales versus las hiperglicémicas mostraron un patrón similar pero con algunas bandas diferencialmente expresadas (Figura 11 A). Mientras la figura 11B presenta las proteínas correspondientes a hueso de ratas normales sometidas a estrés mecánico. La figura 11C por su parte muestra el perfil de proteínas de hueso de rata hiperglicémicas y sometidas a estrés mecánico. Finalmente, la Figura 11 D muestra las proteínas extraídas de

suero proveniente de ratas que representan cada una de las condiciones anteriores y donde se pueden observar diferencias menores particularmente en las muestras C10 y E23.

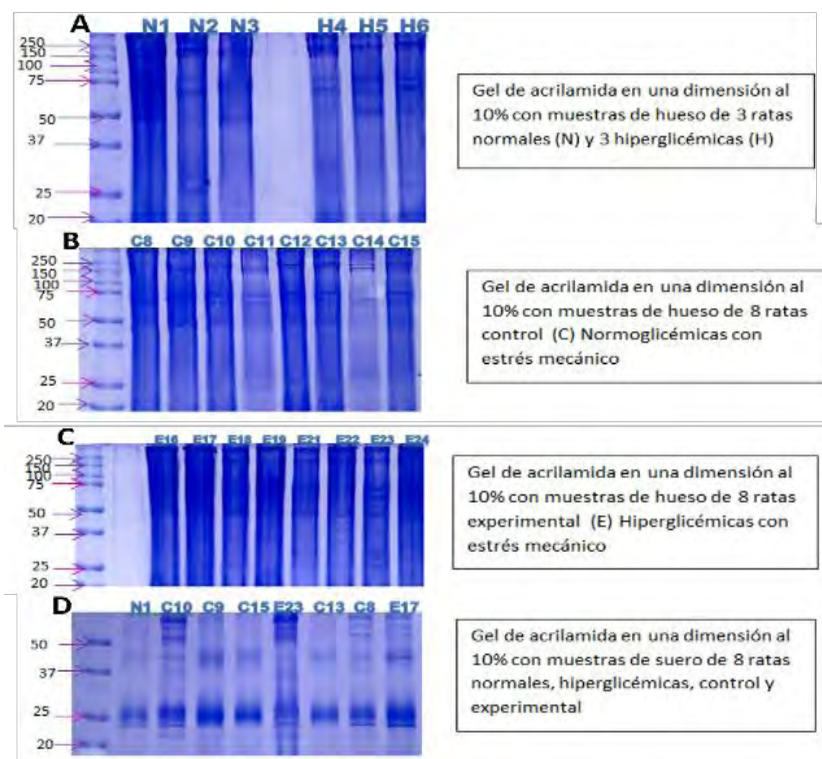


Figura 11. Se observan bandas de los geles correspondientes a los diferentes grupos de ratas que se analizaron, entre ellas están las muestras de hueso y suero.

Por otro lado, la tabla 5 muestra las condiciones que tenían las ratas escogidas para analizar los perfiles proteicos en una y en dos dimensiones así como las diferentes condiciones a las que fueron sometidos los huesos de los diferentes grupos de ratas.

Muestra	N. de Rata	Alteración	Días con buffer/stz y su sacrificio
Grupo N (normoglicémica)	N 3	Solo con buffer	10
Grupo G (hiperglicémica)	H 6	Diabetes stz	10
Grupo NS (normoglicémica con estrés)	C 11	Con aparato	10
Grupo GS (hiperglicémica con estrés)	E 22	Con aparato y diabetes stz	10

Tabla 5. Se muestra el grupo y el número de rata a 4 días para el sacrificio utilizadas para los dos tipos de electroforesis uni y bidimensional.

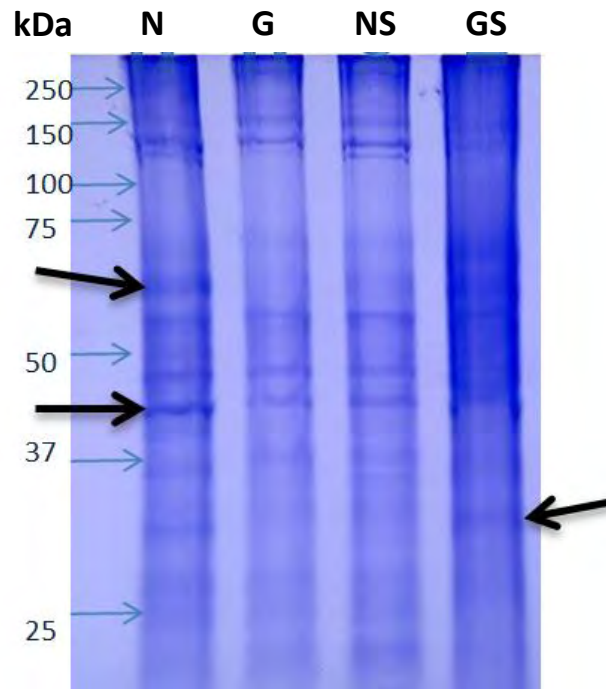


Figura 12. Representa la comparación de los perfiles de proteínas en una dimensión de cada uno de los grupos de hueso de ratas analizadas.

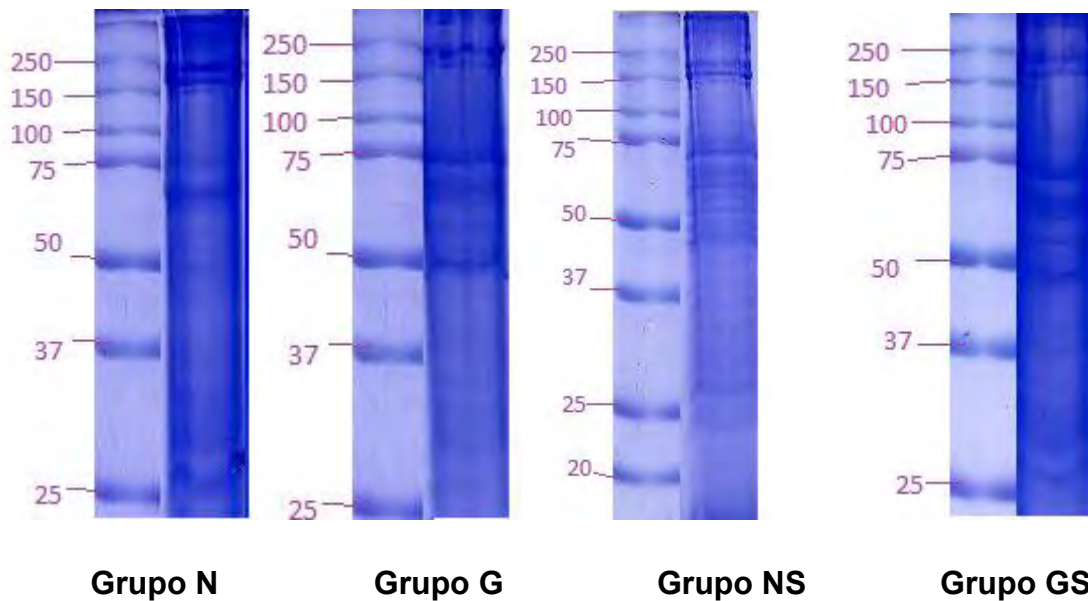


Figura 13. Representa los perfiles de proteínas en una dimensión de cada uno de los grupos de hueso de ratas analizadas.



Electroforesis en dos dimensiones

Perfil proteico del grupo N

Las electroforesis en dos dimensiones fueron analizadas utilizando el software libre Melani el cual nos permitió cuantificar las proteínas totales de las muestras.

En el caso del grupo N (Normoglicémicas) se cuantificaron un total de 26 manchas proteicas mayoritarias (observadas a simple vista después de la tinción de los geles con azul de Coomassie) las cuales se encontraron en un rango de pH de 3 a 10 y en un rango de peso molecular de 10 a 250 kDa. Por otro lado, para poder observar la presencia de otras proteínas de menor expresión y difícilmente visualizadas a simple vista (proteínas minoritarias) se empleó el software libre llamado Melani 7.0 el cual nos permitió detectar un mayor número de las proteínas que conforman el proteoma del grupo N. En este análisis pudimos detectar un total 41 manchas proteicas (proteínas totales). Nuevamente, estas se encontraron en un pH de 3 a 10 y en un rango de peso molecular de 10 a 250 kDa. En este perfil, la mayoría de las proteínas se encontraron en un rango de pH 7-10, con algunas proteínas ácidas y básicas (Fig.14).

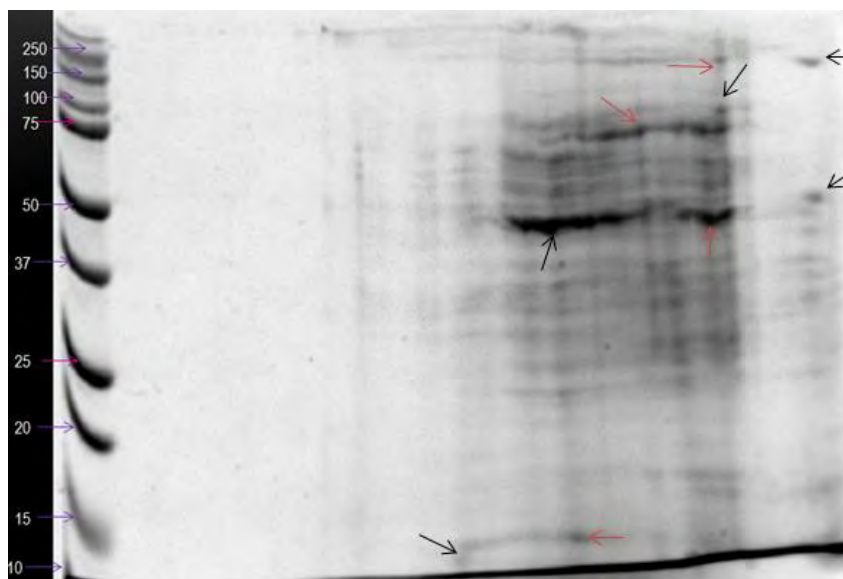


Figura 14. Perfil de proteínas totales del grupo N (Normoglicémicas). Las proteínas de este grupo se analizaron mediante electroforesis bidimensional. La primera dimensión o isoelectroenfoque se realizó en tiras pre-elaboradas (GE Healthcare) de pH de 3 a 10. Posteriormente, la segunda dimensión se llevó a cabo en PAGE-SDS al 10%. Los geles se



tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250) y fueron digitalizados. Este perfil mostro 26 manchas mayoritarias y 41 totales. Finalmente en este gel se pueden observar proteínas que posiblemente solo se expresan en esta muestra (flechas rojas) y los puntos que también se encuentran en otros perfiles se encuentran señalados con flechas negras.

Perfil proteico del grupo G

En este caso, se cuantificaron un total de 30 manchas proteicas mayoritarias las cuales se encontraron en un rango de pH de 3 a 10 y en un rango de peso molecular de 10 a 250 kDa. Al emplear el software Melani para detectar las proteínas minoritarias, se detectaron 43 manchas proteicas (proteínas totales). Nuevamente, estas se encontraron utilizando los mismos parámetros descritos anteriormente (Figura13). En este perfil se puede observar que la mayoría de las proteínas se encuentran en un pH entre 4 y 8 un peso molecular de entre 10 y 150kDa con algunas proteínas ácidas y básicas (Figura.15).

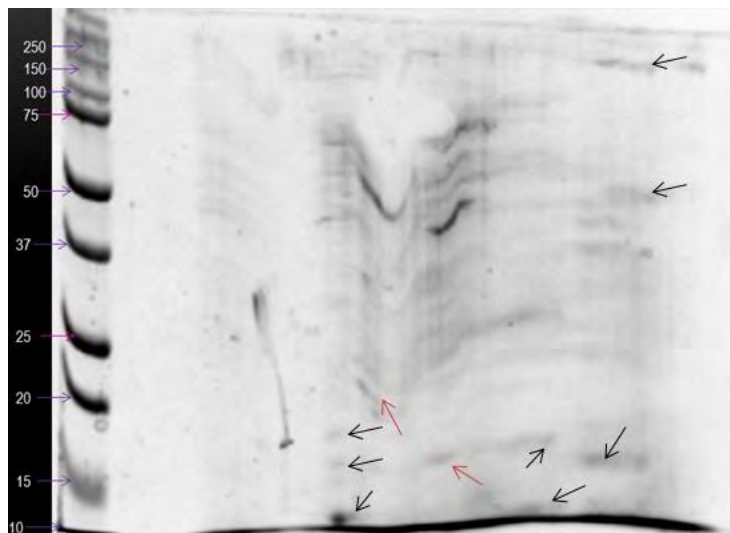


Figura 15. Perfil de proteínas totales del grupo G de ratas (hiperglicémicas). Las proteínas de este grupo se analizaron mediante electroforesis bidimensional. La primera dimensión o isoelectroenfoque se realizó en tiras pre-elaboradas (GE Healthcare) de pH de 3 a 10. Posteriormente, la segunda dimensión se llevó a cabo en PAGE-SDS al 10%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250) y fueron digitalizados. Este perfil mostro 30 manchas mayoritarias y 43 totales. Finalmente en este gel se pueden observar proteínas



que posiblemente solo se expresan en esta muestra (flechas rojas) y los puntos que también se encuentran en otros perfiles se encuentran señalados con flechas negras así como un barrido que impide ver de manera íntegra el perfil de proteínas.

Perfil proteico del grupo NS

En este caso, se cuantificaron un total de 33 manchas proteicas mayoritarias las cuales se encontraron en un rango de pH de 3 a 10 y en un rango de peso molecular de 10 a 250 kDa. Al emplear el software Melani para detectar las proteínas minoritarias, se detectaron 63 manchas proteicas totales. En este perfil se puede observar que la mayoría de las proteínas se encuentran en un pH entre 5 y 7 un peso molecular de entre 10 y 150kDa con algunas proteínas ácidas y básicas (Figura.16).

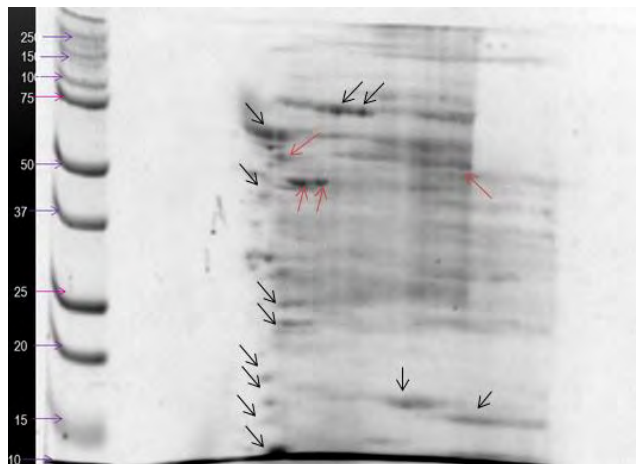


Figura 16. Perfil de proteínas totales del grupo NS de ratas (Normoglicémicas con estrés mecánico). Las proteínas de este grupo se analizaron mediante electroforesis bidimensional. La primera dimensión o isoelectroenfoque se realizó en tiras pre-elaboradas (GE Healthcare) de pH de 3 a 10. Posteriormente, la segunda dimensión se llevó a cabo en PAGE-SDS al 10%. Los gels se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250) y fueron digitalizados. Este perfil mostro 33 manchas mayoritarias y 63 totales. Finalmente en este gel se pueden observar proteínas que posiblemente solo se expresan en esta muestra (flechas rojas) y los puntos que también se encuentran en otros perfiles se encuentran señalados con flechas negras.

Perfil proteico del grupo GS

En este caso, se cuantificaron un total de 38 manchas proteicas mayoritarias las cuales se encontraron en un rango de pH de 3 a 10 y en un rango de peso molecular de 10 a 250 kDa. Al emplear el software Melani para detectar las proteínas minoritarias, se detectaron 72 manchas proteicas totales. En este perfil se puede observar que la mayoría de las proteínas se encuentran en un pH entre 7 y 10 un peso molecular de entre 10 y 150kDa con proteínas mayoritariamente básicas (Figura.17).

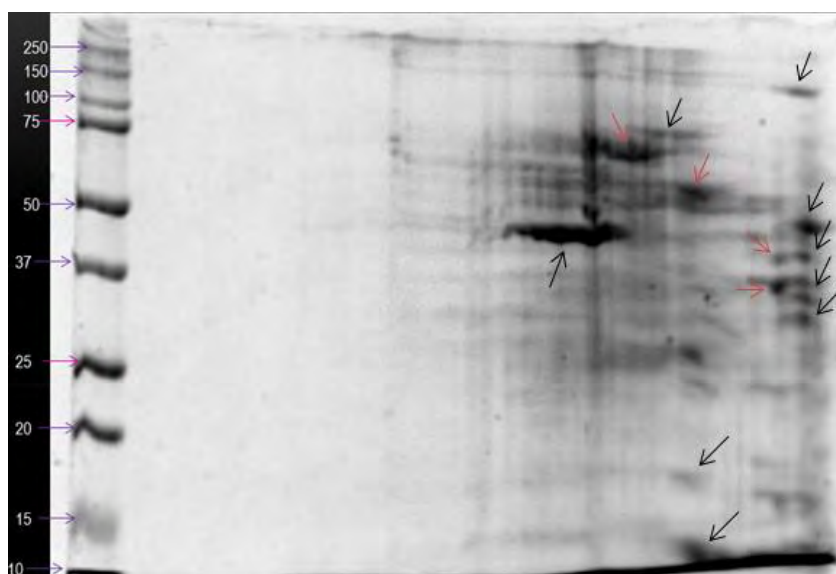


Figura 17. Perfil de proteínas totales del grupo GS de ratas (hiperglicémicas con estrés mecánico). Las proteínas de este grupo se analizaron mediante electroforesis bidimensional. La primera dimensión o isoelectroenfoque se realizó en tiras pre-elaboradas (GE Healthcare) de pH de 3 a 10. Posteriormente, la segunda dimensión se llevó a cabo en PAGE-SDS al 10%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250) y fueron digitalizados. Este perfil mostro 38 manchas mayoritarias y 72 totales. En este gel se pueden observar proteínas que posiblemente solo se expresan en esta muestra (flechas rojas) y los puntos que también se encuentran en otros perfiles se encuentran señalados con flechas negras.

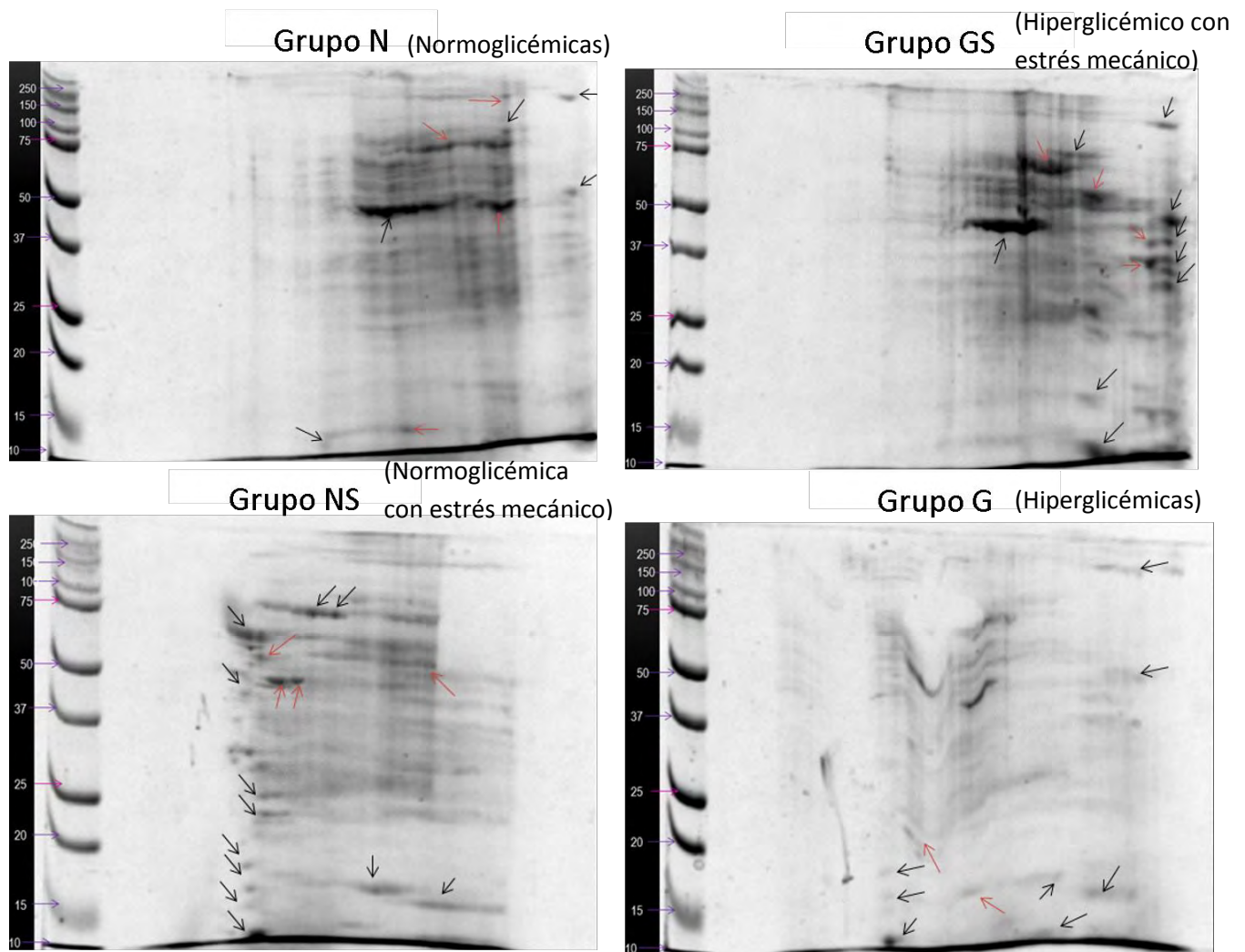


Figura 18. Fotografías editadas con ayuda del programa MELANI, donde observan las proteínas totales así como las proteínas que posiblemente están siendo compartidas por más de una muestra en diferentes condiciones, aquí podemos ver que se encuentran señaladas las proteínas que son compartidas entre algunos perfiles y en color rojo las que se expresan solo por esa muestra en específico.

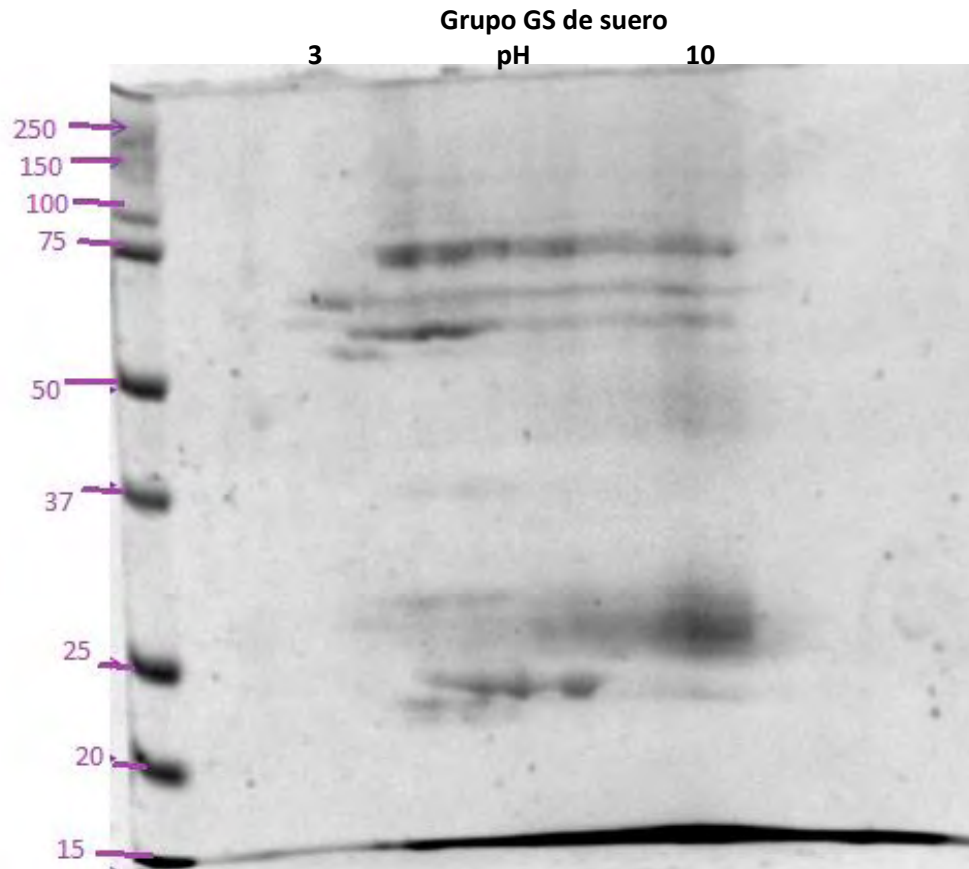


Figura 20. Gel en dos dimensiones, Suero de hueso de rata hiperglicémica con estrés (GS). En el que se observa que las manchas proteicas están concentradas en un pH neutro entre 25 y 75 kDa.

Posible identidad de proteínas en base a su peso molecular y punto isoelectrico

Dado que los perfiles proteicos aquí mostrados nos permiten analizar de manera independiente a cada proteína y sugerir su identidad en base a su punto isoelectrico y peso molecular es que nos dimos a la tarea de investigar algunas proteínas que previamente han sido estudiadas en tejido óseo y que posiblemente las tenemos en los diferentes gels mostrados a continuación.



GRUPO N

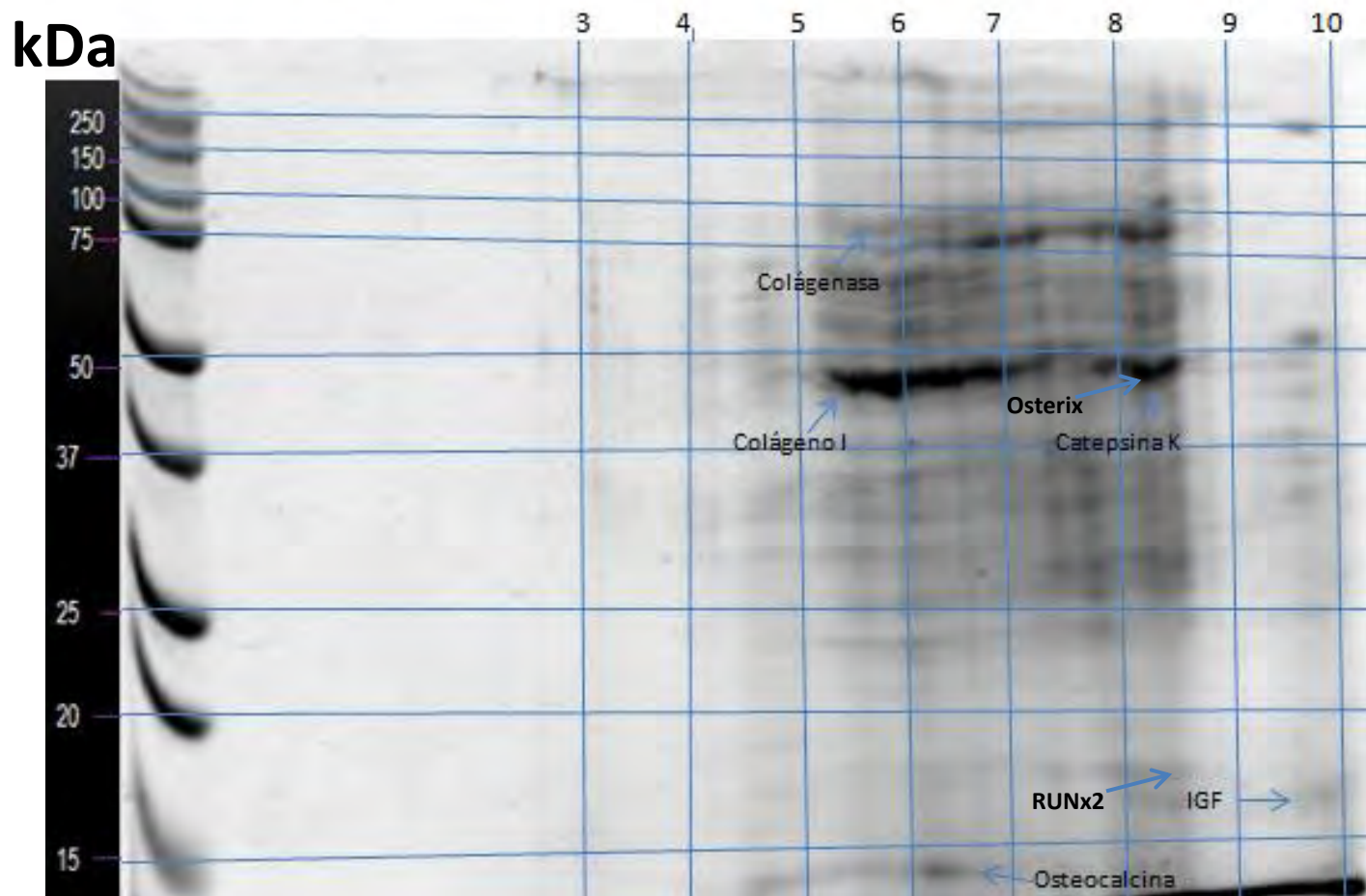


Figura 21. En el gel de dos dimensiones del Grupo N (Normoglicémica) se encuentran las siguientes proteínas: Colágenasa, Colágeno tipo I, Catepsina K, Osteocalcina, IGF, RUN x2 y Osterix.

GRUPO G

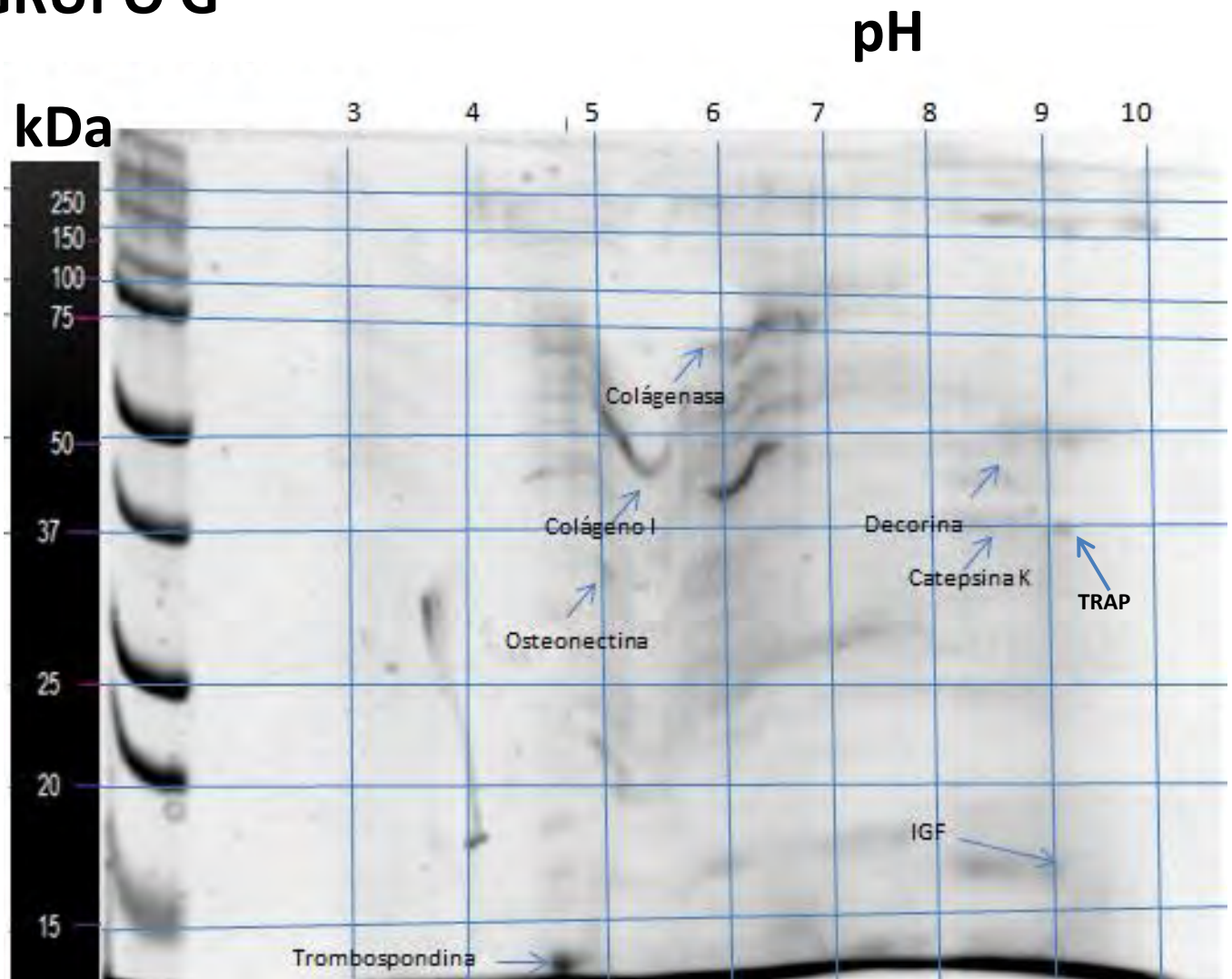


Figura 22. En el gel de dos dimensiones del Grupo G (hiperglicémica) se encuentran: Colágenasa, Colágeno tipo I, Osteonectina, Trombospondina, Decorina, Catepsina K, IGF y TRAP

GRUPO NS

pH

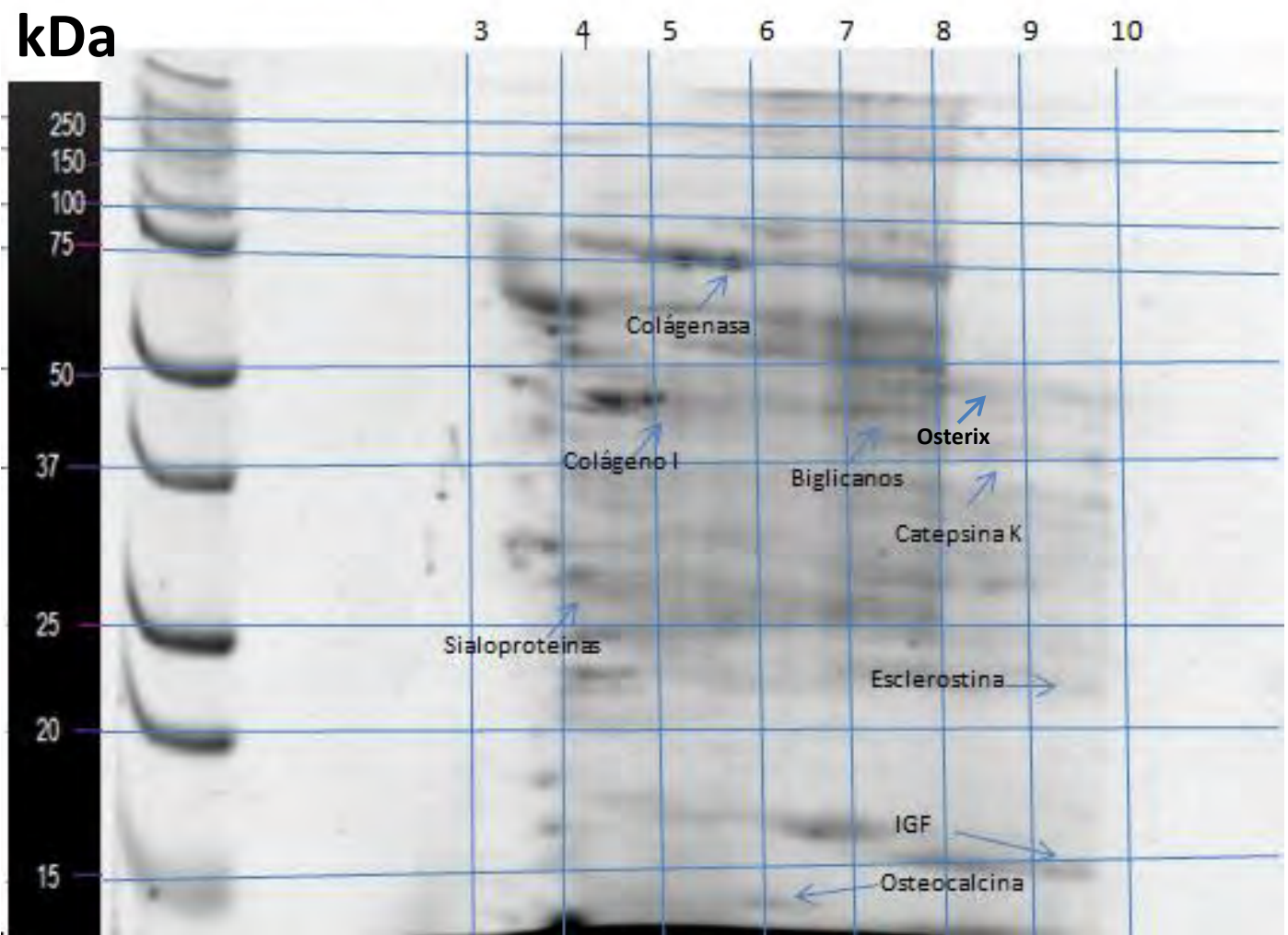


Figura 23. En el gel de dos dimensiones del Grupo NS (normoglicémica con estrés) se encuentran: Colágenasa, Colágeno tipo I, Sialoproteína, Biglicanos, Catepsina K, Esclerostina, Osteocalcina, IGF y Osterix.

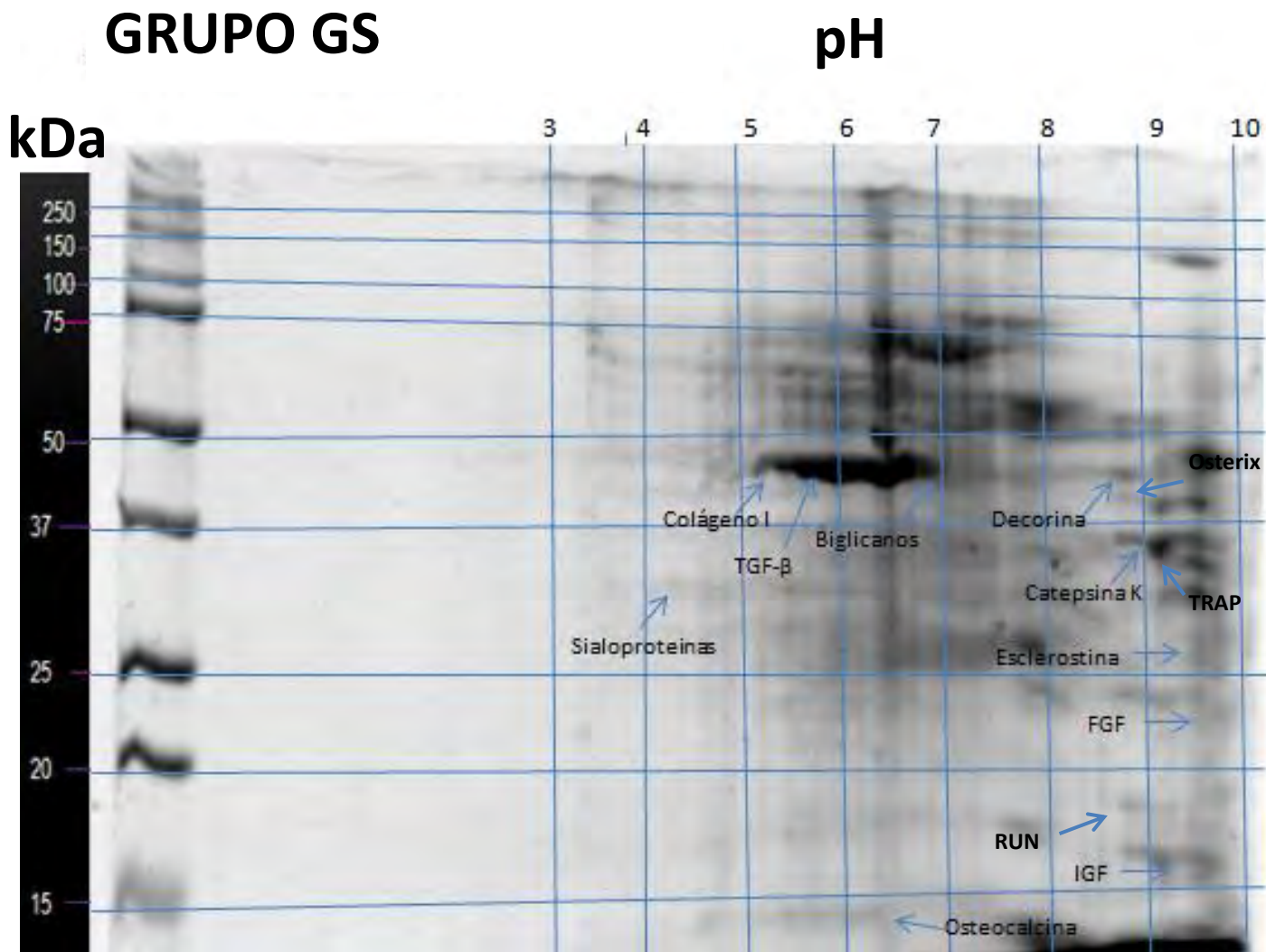


Figura 24. En el gel de dos dimensiones del Grupo GS (hiperglicémica con estrés) se encuentran: Colágeno tipo I, Sialoproteína, TGF- β , Biglicanos, Decorina, Catepsina K, Esclerostina, FGF, Osteocalcina, IGF, Osterix, TRAP y RUNx2



GRUPO N (Normoglicémicas)	GRUPO G (Hiperglicémicas)	GRUPO NS (Normoglicémicas con estrés)	GRUPO GS (Hiperglicémicas con estrés)
COLAGENASA	COLAGENASA	COLAGENASA	
COLAGENO 1	COLAGENO 1	COLAGENO 1	COLAGENO 1
CATEPSINA K	CATEPSINA K	CATEPSINA K	CATEPSINA K
OSTEOCALCINA		OSTEOCALCINA	OSTEOCALCINA
IGF	IGF	IGF	IGF
RUNX2			RUNX2
OSTERIX		OSTERIX	OSTERIX
	OSTEONECTINA		
	TROMBOSPONDINA		
	DECORINA		DECORINA
	TRAP		TRAP
		SIALOPROTEINA	SIALOPROTEINA
		BIGLICANOS	BIGLICANOS
		ESCLEROSTINA	ESCLEROSTINA
			TGFβ
			FGF

Tabla 6. Comparación de las proteínas óseas expresadas en cada gel.

Análisis de resultados

Aunque todos los perfiles comparten varias proteínas el Grupo N y GS tienen un parecido mayor así como el Grupo G y NS. Los perfiles son semejantes, sin embargo, muestran diferencias en las proteínas de acuerdo a su peso molecular y punto isoeléctrico, también hay diferencias en la cantidad de proteínas.

En las proteínas estimadas se puede analizar de acuerdo a la literatura que los geles del Grupo GS así como del Grupo NS expresan una mayor cantidad de proteínas formadoras de hueso en comparación al Grupo G, el gel del Grupo N expresa proteínas de formación y resorción.



Discusión

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad crónica que afecta a más de 6 millones de mexicanos, siendo la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres¹. Esta enfermedad se clasifica dentro de las enfermedades metabólicas multifactoriales. Cuando la enfermedad se encuentra desarrollada en los pacientes, estos son dependientes de insulina.²

A nivel oral, los pacientes que la padecen suelen disminuir su masa ósea y elevar el riesgo a fracturas y a desarrollar enfermedad periodontal.⁵ El modelo de inducción de diabetes a partir de la administración de estreptozotocina por vía intraperitoneal en los animales de experimentación no permitió reproducir las características de la diabetes tipo I.⁶⁷ En el presente trabajo nosotros tratamos de estandarizar la extracción de proteínas de hueso de rata, ya que al hacer una búsqueda, en buscadores científicos como lo es NCBA no se encontró perfil alguno. La extracción se realizó procurando afectar lo menos posible la integridad de las proteínas basándonos en una extracción selectiva.⁶⁸ Una vez logrado este reto se procedió a realizar electroforesis en una dimensión donde se obtuvieron los diferentes patrones para cada uno de los grupos ratas analizadas. En donde se destacan los siguientes datos, de manera general todos los perfiles presentaron bandas entre 10 y 250 kDa, y la mayoría de las bandas se concentraron entre los pesos de 50 y 75 kDa, todas las muestras presentaron dos bandas entre 150 y 250 kDa, en los grupos con hiperglicemia se observó una banda sobre expresada de aproximadamente 50 kDa. Posteriormente se estandarizó la purificación de proteínas para realizar electroforesis en dos dimensiones donde se trataron de obtener los perfiles de proteínas y lo que se observó fue la baja resolución de algunas proteínas pero también algunos barridos dentro de los geles posiblemente por la alta concentración de sales. Tras realizar el conteo de cada mancha mostrada en cada perfil y con ayuda del programa Melani se detectó que las ratas normales (N) presentaron 41 manchas, las ratas hiperglicémicas (G) un total de 43, las ratas normales con estrés (NS) 63 y las hiperglicémicas con estrés (GS) 72.



Lo que pudimos encontrar al observar estos perfiles en dos dimensiones, fue lo siguiente; hay gran cantidad de proteínas que se comparten entre perfiles, pero también hay manchas que solo se expresan bajo una condición específica, también pudimos observar que en el perfil del grupo de ratas normales (N) la mayoría de las proteínas se encuentran en un pH cargado hacia lo básico al igual que el grupo de ratas hiperglicémicas con estrés (GS) pero en este último se destaca que hay gran número de proteínas en un rango de pH 10. Por otro lado, el perfil de las ratas normales con estrés (NS) mostro proteínas ácidas mientras que el grupo de ratas hiperglicémicas (G) mostro un perfil barrido pero se alcanza a observar que la mayoría de las proteínas tienen un pH neutro.

Con el fin de dilucidar los mecanismos involucrados en los procesos de hiperglicemia y estrés se decidió analizar por espectrometría de masas las proteínas sobre expresadas o bien que solo se ven bajo una condición exclusivamente (identidades pendientes por obtener).

Por otro lado, con el fin de detectar si existen proteínas circulantes en la sangre producidas por el hueso en condición de hiperglicemia y estrés fue que se obtuvo el perfil de proteínas de suero proveniente de este grupo de ratas (GS) así como de su control (N). En este experimento no se logró detectar ninguna proteína presente en la muestra de hueso y que estuviera también en el suero. Y cuando se hizo la comparación entre sueros estos fueron muy similares.

Por otro lado, como se pudo observar previamente en la revisión de moléculas que posiblemente están siendo expresadas en estos perfiles, se destaca la presencia de tres proteínas relevantes como son las proteínas TRAP, RUNX2 y OSTERIX. Lo que pudimos observar fue que la proteína TRAP en nuestros perfiles testigo (N, NS) no se expresó, sin embargo si fue observada en condiciones de glicemia con y sin estrés y una vez analizada la literatura al respecto se ha observado que TRAP está involucrada en la pérdida de hueso en una fase temprana de la diabetes⁶⁹ y podría considerarse como un biomarcador en pacientes con diabetes,⁷⁰ trabajos *in situ* muestran su presencia en osteoclastos durante la resorción ósea ⁷¹ en sitios alrededor de los bordes de resorción.⁷² Finalmente, la expresión de TRAP se incrementa en ciertas condiciones patológicas.⁷³



Por otra parte, también observamos la posible presencia del factor de transcripción RUNX2 y OSTERIX los cuales mostraron estar presentes en tejido óseo normal y en el hueso de ratas hiperglicémicas con estrés. En este sentido, la literatura muestra que estos factores determinan el linaje osteoblástico de células madre mesenquimales lo que correspondería su presencia en tejido óseo normal y tejido óseo alterado en busca de atenuar el daño.⁷⁴ Datos actuales muestran que RUNX2 y OSTERIX responden al estímulo de factor de crecimiento fibroblástico (FGF2) e insulina a través de la vía de señalización de BMP-2 (proteínas morfológica de hueso).⁷⁵

Conclusión

Una vez hecho el análisis por medio de geles en una y dos dimensiones pudimos observar la presencia de algunas proteínas sumamente relevantes en el desarrollo de la diabetes, resorción ósea, desarrollo y diferenciación de células osteoblasticas. Así como el hecho de que el modelo de DM1 aquí empleado fue de gran ayuda para lograr un análisis profundo de esta enfermedad y su repercusión en el hueso de ratas diabetizadas.

En los casos de hiperglicemia con y sin estrés así como en sus controles, se observaron manchas con expresión diferencial y un aumento o disminución en la cantidad de expresión proteica (la hiperglicemia disminuye la expresión de proteínas en el hueso alveolar). Con lo cual podemos sugerir que el aparato influye en la sobre expresión de las proteínas. Ya que la tensión generada en el hueso expresa una cantidad mayor de proteínas.



Bibliografía

1. Olaiz-Fernández, G., Rojas, R., Aguilar-Salinas, C. A., Rauda, J., & Villalpando, S. (2007). Diabetes mellitus en adultos mexicanos: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud pública de México*, 49, s331-s337.
2. Olvera-Granados, C. P., Leo-Amador, G. E., & Hernández-Montiel, H. L. (2008). Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65(4), 306-324.
3. Silvestre, F. J., Miralles, L., Llambes, F., Bautista, D., Solá-Izquierdo, E., & Hernández-Mijares, A. (2009). Type 1 diabetes mellitus and periodontal disease: relationship to different clinical variables. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 14(4), E175-9.
4. Chang, P. C., Chien, L. Y., Yeo, J. F., Wang, Y. P., Chung, M. C., Chong, L. Y., ... & Lee, Q. Q. (2013). Progression of periodontal destruction and the roles of advanced glycation end products in experimental diabetes. *Journal of periodontology*, 84(3), 379-388.
5. Kim, J., & Amar, S. (2006). Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*, 94(1), 10-21.
6. Hamilton, A. I., & Blackwood, H. J. (1977). Insulin deficiency and cell proliferation in oral mucosal epithelium of the rat. *Journal of anatomy*, 124(Pt 3), 757.
7. Bonewald LF. (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. Feb;26(2):229-38.
8. Starup-Linde J, Vestergaard P. (2016) Biochemical bone turnover markers in diabetes mellitus - A systematic review. *Bone*. Jan;82:69-78.
9. Blakytyn, R., Spraul, M., & Jude, E. B. (2011). Review: the diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *The international journal of lower extremity wounds*, 10(1), 16-32.
10. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Canto Pingarrón, M. D., & Blanco Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(1), 47-51.
11. Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M., & Manolagas, S. C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(5), 793-802.
12. Manolagas, S. C. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 49(10), 473.
13. Kameda, T., Miyazawa, K., Mori, Y., Yuasa, T., Shiokawa, M., Nakamaru, Y., & Kumegawa, M. (1996). Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 220(3), 515-519.
14. Bonewald, L. F. (2006). Mechanosensation and transduction in osteocytes. *BoneKEy-Osteovision*, 3(10), 7-15.
15. General, S. (2004). Bone health and osteoporosis: a report of the surgeon general. *US Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General, Rockville, MD*.



16. Anaya, J. M. (1993). Remodelado óseo: osteoporosis y artritis reumatoidea. *Acta méd. colomb*, 18(6), 304-13.
17. O'Brien, C. A., Jia, D., Plotkin, L. I., Bellido, T., Powers, C. C., Stewart, S. A., & Weinstein, R. S. (2004). Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology*, 145(4), 1835-1841.
18. Baldock, P. A., Allison, S., McDonald, M. M., Sainsbury, A., Enriquez, R. F., Little, D. G., & Herzog, H. (2006). Hypothalamic regulation of cortical bone mass: opposing activity of Y2 receptor and leptin pathways. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(10), 1600-1607.
19. Oikawa, A., Siragusa, M., Quaini, F., Mangialardi, G., Katare, R. G., Caporali, A. & Kraenkel, N. (2010). Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(3), 498-508.
20. Hamada, Y., Fujii, H., Kitazawa, R., Yodoi, J., Kitazawa, S., & Fukagawa, M. (2009). Thioredoxin-1 overexpression in transgenic mice attenuates streptozotocin-induced diabetic osteopenia: a novel role of oxidative stress and therapeutic implications. *Bone*, 44(5), 936-941.
21. Sasaki, T., Kaneko, H., Ramamurthy, N. S., & Golub, L. M. (1991). Tetracycline administration restores osteoblast structure and function during experimental diabetes. *The Anatomical Record*, 231(1), 25-34.
22. Maor, G., & Karnieli, E. (1999). The Insulin-Sensitive Glucose Transporter (GLUT4) Is Involved in Early Bone Growth in Control and Diabetic Mice, But Is Regulated through the Insulin-Like Growth Factor I Receptor 1. *Endocrinology*, 140(4), 1841-1851.
23. Stolzing, A., Sellers, D., Llewelyn, O., & Scutt, A. (2010). Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*, 191(6), 453-465.
24. Mathiassen, B., Nielsen, S., Johansen, J. S., Hartwell, D., Ditzel, J., Rødbro, P., & Christiansen, C. (1990). Long-term bone loss in insulin-dependent diabetic patients with microvascular complications. *Journal of Diabetic Complications*, 4(4), 145-149.
25. Verhaeghe, J., SUIKER, A. M., NYOMBA, B. L., VISSER, W. J., EINHORN, T. A., Dequeker, J., & Bouillon, R. (1989). Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. II. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology*, 124(2), 573-582.
26. Verhaeghe, J., Thomsen, J. S., van Bree, R., van Herck, E., Bouillon, R., & Mosekilde, L. I. (2000). Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. *Bone*, 27(2), 249-256.
27. Suzuki, K., Miyakoshi, N., Tsuchida, T., Kasukawa, Y., Sato, K., & Itoi, E. (2003). Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone (1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone*, 33(1), 108-114.
28. Hie, M., Yamazaki, M., & Tsukamoto, I. (2009). Curcumin suppresses increased bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *European journal of pharmacology*, 621(1), 1-9.
29. Nuttall, M. E., Patton, A. J., Olivera, D. L., Nadeau, D. P., & Gowen, M. (1998). Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(3), 371-382.



30. Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537-546.
31. Bedoya, F. J., Solano, F., & Lucas, M. (1996). N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 52(4), 344-347.
32. Nukatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M., & Kawada, J. (1990). Allopurinol protects pancreatic β cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *Journal of pharmacobio-dynamics*, 13(4), 259-262.
33. Robling, A. G., Castillo, A. B., & Turner, C. H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8, 455-498.
34. Ziegler, R., Scheidt-Nave, C., & Scharla, S. (1995). Pathophysiology of osteoporosis: unresolved problems and new insights. *The Journal of nutrition*, 125(7), 2033S.
35. Strømsøe, K. (2004). Fracture fixation problems in osteoporosis. *Injury*, 35(2), 107-113.
36. Villemure, I., Chung, M. A., Seck, C. S., Kimm, M. H., Matyas, J. R., & Duncan, N. A. (2005). Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth. *Connective tissue research*, 46(4-5), 211-219.
37. Turner, C. H., Owan, I., Alvey, T., Hulman, J., & Hock, J. M. (1998). Recruitment and proliferative responses of osteoblasts after mechanical loading in vivo determined using sustained-release bromodeoxyuridine. *Bone*, 22(5), 463-469.
38. Bentolila, V., Boyce, T. M., Fyhrie, D. P., Drumb, R., Skerry, T. M., & Schaffler, M. B. (1998). Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading. *Bone*, 23(3), 275-281.
39. Verborgt, O., Gibson, G. J., & Schaffler, M. B. (2000). Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *Journal of bone and mineral research*, 15(1), 60-67.
40. Nakashima, T. (2015). Frontiers in Live Bone Imaging Researches. Amazing function of osteocyte. *Clinical calcium*, 25(6), 899-905.
41. Anderson NL, Anderson NG (1998). «Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words». *Electrophoresis*
42. Mundy, G. R. (1999). *Bone remodelling and its disorders*. CRC Press.
43. Nudelman, F., Lausch, A. J., Sommerdijk, N. A., & Sone, E. D. (2013). In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of structural biology*, 183(2), 258-269.
44. George, A., & Veis, A. (2008). Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chemical reviews*, 108(11), 4670-4693.
45. Price, P. A., Williamson, M. K., Haba, T., Dell, R. B., & Jee, W. S. (1982). Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24), 7734-7738.
46. Wei, J., & Karsenty, G. (2015). An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Current osteoporosis reports*, 13(3), 180-185.
47. Massaro, E. J., & Rogers, J. M. (Eds.). (2004). *The Skeleton: Biochemical, Genetic, and Molecular Interactions in Development and Homeostasis*. Springer Science & Business Media.



48. Millán, J. L. (2013). The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcifiedtissueinternational*, 93(4), 299-306.
49. Vincent, K., &Durrant, M. C. (2013). A structural and functional model for human bone sialoprotein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 39, 108-117.
50. Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A., &Heinegård, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4473-4475.
51. Tanaka, H., Hruska, K. A., Seino, Y., Malone, J. D., Nishii, Y., &Teitelbaum, S. L. (1991). Disassociation of the macrophage-maturational effects of vitamin D from respiratory burst priming. *Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 10888-10892.
52. Delany, A. M., Amling, M., Priemel, M., Howe, C., Baron, R., &Canalis, E. (2000). Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, 105(7), 915-923.
53. Rosset, E. M., & Bradshaw, A. D. (2016). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*, 52, 78-87.
54. Fisher, L. W., McBride, O. W., Termine, J. D., & Young, M. F. (1990). Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 265(4), 2347-2351.
55. Schliephake, H. (2002). Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 31(5), 469-484.
56. Javed, A., Chen, H., & Ghori, F. Y. (2010). Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, 22(3), 283-293.
57. Barragan-Adjemian, C., Nicoletta, D., Dusevich, V., Dallas, M. R., Eick, J. D., &Bonewald, L. F. (2006). Mechanism by which MLO-A5 late osteoblasts/early osteocytes mineralize in culture: similarities with mineralization of lamellar bone. *Calcified tissue international*, 79(5), 340-353.
58. Holmbeck, K., Bianco, P., Pidoux, I., Inoue, S., Billingham, R. C., Wu, W., & Poole, A. R. (2005). The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci*, 118(1), 147-156.
59. Wetterwald, A., Hofstetter, W., Cecchini, M. G., Lanske, B., Wagner, C., Fleisch, H., & Atkinson, M. (1996). Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*, 18(2), 125-132.
60. Schulze, E., Witt, M., Kasper, M., Löwik, C. W., & Funk, R. H. (1999). Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/2.8. *Histochemistry and cell biology*, 111(1), 61-69.
61. Mikuni-Takagaki, Y., Kakai, Y., Satoyoshi, M., Kawano, E., Suzuki, Y., Kawase, T., & Saito, S. (1995). Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(2), 231-242.
62. Qing, H., Pajevic, P., Barry, K., Dusevich, V., Wysolmerski, J. J., &Bonewald, L. (2010). PTHR1 in Osteocytes Plays a Major role in Perilacunar Remodeling through the Activation of " Osteoclastic" Genes in Osteocytes. *J Bone Miner Res*, 25(Suppl 1), S25.



63. Verborgt, O., Tatton, N. A., Majeska, R. J., & Schaffler, M. B. (2002). Spatial Distribution of Bax and Bcl-2 in Osteocytes After Bone Fatigue: Complementary Roles in Bone Remodeling Regulation?. *Journal of bone and mineral research*, 17(5), 907-914.
64. Kogianni, G., Mann, V., & Noble, B. S. (2008). Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of bone and mineral research*, 23(6), 915-927.
65. Storey, E. (1954). Bone changes associated with tooth movement: the influence of the menstrual cycle on the rate of tooth movement. *Aust J Dent*, 58, 80-85.
66. Igarashi, K., Miyoshi, K., Shinoda, H., Saeki, S., & Mitani, H. (1998). Diurnal variation in tooth movement in response to orthodontic force in rats. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, 114(1), 8-14.
67. Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., & Kamper, E. (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, 23(2), 245-258.
68. Pérez, E., Gallegos, J. L., Cortés, L., Calderón, K. G., Luna, J. C., Cázares, F. E., & Hernández, F. C. (2010). Identification of latexin by a proteomic analysis in rat normal articular cartilage. *Proteome science*, 8(1), 27.
69. Hygum, K., Starup-Linde, J., Harsløf, T., Vestergaard, P., & Langdahl, B. L. (2017). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Diabetes mellitus, a state of low bone turnover—a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Endocrinology*, 176(3), R137-R157.
70. Ek-Rylander, B., Flores, M., Wendel, M., Heinegård, D., & Andersson, G. (1994). Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 14853-14856.
71. Reinholt, F. P., Widholm, S. M., Ek-Rylander, B., & Andersson, G. (1990). Ultrastructural localization of a tartrate-resistant acid ATPase in bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(10), 1055-1061.
72. Minkin, C. (1982). Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified tissue international*, 34(1), 285-290.
73. Ljusberg, J., Wang, Y., Lång, P., Norgård, M., Dodds, R., Hultenby, K., ... & Andersson, G. (2005). Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28370-28381.
74. Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5), 1233-1239.
75. Wongwitwichot, P., & Kaewsrichan, J. (2017). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is impaired by bone morphogenetic protein 7. *Advances in Medical Sciences*, 62(2), 266-272.



Anexo

	GRUPO	FECHA	#RATA	Glucosa Inicial	Peso Inicial	Glucosa Final	Peso Final	Sacrificio			
6 Días con puro Buffer	Grupo N Normoglicémicas	8/03/2016	1	89mg/dl	269gr	87mg/dl	270gr	4 Días	SIN APARATO		
		8/03/2016	2	76mg/dl	287gr	90mg/dl	298gr				
		8/03/2016	3	80mg/dl	278gr	95mg/dl	294gr				
	Grupo G Hiperglicémicas STZ	8/03/2016	4	121mg/dl	300gr	Hi mg/dl	326gr	4 Días			
		8/03/2016	5	559mg/dl	287gr	Hi mg/dl	284gr				
		8/03/2016	6	93mg/dl	303gr	Hi mg/dl	306gr				
	6 Días con puro Buffer	Grupo NS	8/03/2016	7	79mg/dl	304gr	95mg/dl	244gr		6 Días	*CON APARATO
			8/03/2016	8	83mg/dl	309gr	85mg/dl	221gr			
			8/03/2016	9	71mg/dl	301gr	88mg/dl	270gr			
		Grupo NS	8/03/2016	10	85mg/dl	251gr	93mg/dl	270gr		4 Días	
			8/03/2016	11	81mg/dl	281gr	92mg/dl	214gr			
			8/03/2016	12	73mg/dl	268gr	79mg/dl	298gr			
6 Días STZ+ 2 Después de nicotina	Grupo NS	13/05/2016	13	84mg/dl	228gr	84mg/dl	255gr	2 Días			
		13/05/2016	14	78mg/dl	225gr	78mg/dl	244gr				
		13/05/2016	15	77mg/dl	224gr	84mg/dl	309gr				
6 Días STZ+ 2 Después de nicotina	Grupo GS	13/05/2016	16	Hi mg/dl	302gr	Hi mg/dl	258gr	6 Días			
		13/05/2016	17	Hi mg/dl	307gr	Hi mg/dl	304gr				
		13/05/2016	18	Hi mg/dl	299gr	Hi mg/dl	265gr				
	Grupo GS	13/05/2016	19	411mg/dl	310gr	551mg/dl	277gr	4 Días			
		13/05/2016	20	Hi mg/dl	306gr	Hi mg/dl	297gr				
		13/05/2016	21	Hi mg/dl	305gr	Hi mg/dl	231gr				
	6 Días STZ+ 2 Después de nicotina	Grupo GS	13/05/2016	22	416mg/dl	308gr	Hi mg/dl	264gr	2 Días		
			13/05/2016	23	439mg/dl	311gr	597mg/dl	309gr			
			13/05/2016	24	286mg/dl	312gr	Hi mg/dl	311gr			

Tabla 2 (b). En esta tabla se observa el peso y glucosa inicial (después del buffer o estreptozotocina) y final (sacrificio) de las 24 ratas, así como el número según su grupo, y el día de su sacrificio.