

López-Herradón A<sup>1,2</sup>, Lozano D<sup>1,2,3</sup>, Portal-Núñez S<sup>1,2</sup>, Ardura JA<sup>1,2</sup>, Gutiérrez-Rojas I<sup>1,4</sup>, Maycas M<sup>1,2</sup>, Rodríguez L<sup>3,5,6</sup>, Varela I<sup>3,5,6</sup>, Esbrit P<sup>1,2</sup>

1 Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria (IIS)-Fundación Jiménez Díaz - Universidad Autónoma de Madrid

2 Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid

3 Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) de Madrid

4 Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid

5 Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" - CSIC-Universidad Autónoma de Madrid

6 Unidad 761 - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid

## Comparación de las acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en modelos de ratón diabético y con déficit del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)

Correspondencia: Pedro Esbrit - Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - IIS-Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)  
Correo electrónico: pesbrit@fjd.es

Fecha de recepción: 01/05/2014

Fecha de aceptación: 15/07/2014

*Trabajo becado por la SEIOMM para asistir al 35 Congreso de la ASBMR (Baltimore, 2013).*

### Resumen

La diabetes *mellitus* (DM) es una patología metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica debida al déficit de producción y/o acción de la insulina. La DM, sobre todo la tipo 1, se asocia comúnmente a osteopenia/osteoporosis y al aumento de riesgo de fracturas. El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), un factor abundante en la matriz ósea que ejerce un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la masa ósea, disminuye en la DM. La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), un modulador del crecimiento y la función osteoblástica, actúa sobre los osteoprogenitores promoviendo la diferenciación osteoblástica y la regeneración ósea. Su expresión disminuye en situación diabética. En este trabajo, hemos evaluado y comparado las acciones osteogénicas de la PTHrP en modelos murinos de DM tipo 1 y deficiente en IGF-I. Los ratones diabéticos por inyección de estreptozotocina presentan una disminución de la masa ósea en los huesos largos, asociada al incremento de proteínas oxidadas y a la disminución de expresión de genes relacionados con la vía Wnt y de la proteína  $\beta$ -catenina, además de mostrar alteraciones en el hueso trabecular vertebral. En el modelo de ratón con déficit de IGF-I, nuestros resultados indican una situación de osteopenia tanto en el fémur (asociado a una inhibición de la vía Wnt) como en la columna (L1-L5). Nuestros hallazgos demuestran que la administración de PTHrP, predominantemente a través de su dominio N-terminal, modula la vía de Wnt canónica en relación a sus acciones osteogénicas en situación diabética y, también en parte, en ausencia de IGF-I.

**Palabras clave:** *PTHrP, diabetes mellitus, IGF-I, osteopenia, vía Wnt.*

# Comparison of the osteogenic actions of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in diabetic and insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficient mouse models

## Summary

Diabetes *mellitus* (DM) is a metabolic pathology characterised by chronic hyperglycemia due to a deficit in the production and/or action of insulin. DM, above all type I, is commonly associated with osteopenia/osteoporosis and with an increased risk of fractures. Insulin-like growth factor-I (IGF-I), a factor abundant in the bone matrix which plays a significant role in the development and maintenance of bone mass, diminishes with DM. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP), a modulator of growth and osteoblast function, acts on osteoprogenitors, promoting osteoblast differentiation and bone regeneration. Its expression is reduced in the presence of DM. In this work we have evaluated and compared the osteogenic actions of PTHrP in mouse models with type 1 DM and IGF-I deficiency. Diabetic mice by injection of streptozotocin had a reduction in bone mass in the long bones associated with an increase in oxidised proteins and a reduction in the expression of genes related to the Wnt pathway and of  $\beta$ -catenin protein, as well as alterations in vertebral trabecular bone. In the mouse model with IGF-I deficit our results indicate the presence of osteopenia both in the femur (associated with an inhibition of the Wnt pathway) and the spine (L1-L5). Our findings demonstrate that the administration of PTHrP, predominantly through its N-terminal domain, modulates the canonical Wnt pathway in relation to its osteogenic actions in a diabetic situation and also, in part, in the absence of IGF-I.

**Key words:** *PTHrP, diabetes mellitus, IGF-I, osteopenia, Wnt pathway.*

## Introducción

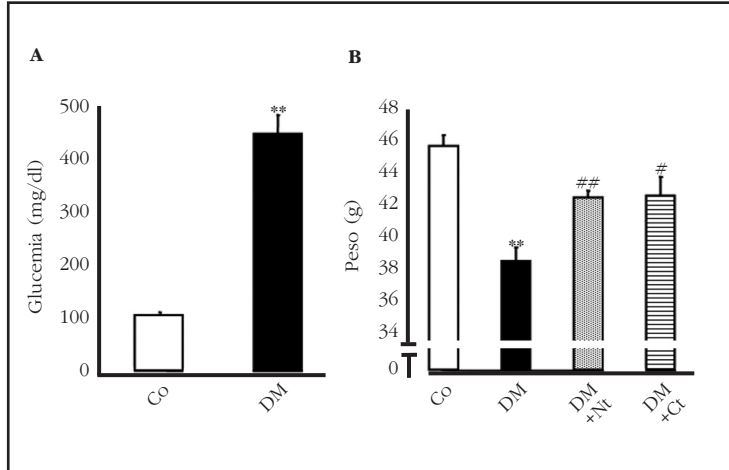
La diabetes *mellitus* (DM) es una patología metabólica caracterizada por una hiperglucemia crónica debida al déficit de producción y/o acción de la insulina, responsable de la disfunción de órganos tales como la retina, el riñón, el sistema nervioso y el sistema cardiovascular<sup>1</sup>. Además, la DM se asocia comúnmente a osteopenia/osteoporosis y al aumento de riesgo de fracturas, por mecanismos solo parcialmente caracterizados<sup>2</sup>. La DM tipo 1 (DM1), o insulino-dependiente, se caracteriza por niveles bajos de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) circulantes y se suele manifestar antes de alcanzar el pico de masa ósea, mientras que la tipo 2 (DM2) -asociada a resistencia insulínica- es común en adultos<sup>3</sup>. Las alteraciones esqueléticas en la DM1 incluyen: 1) una disminución del crecimiento óseo longitudinal durante la pubertad en adolescentes; 2) una disminución de masa ósea en cadera, cabeza del fémur y columna vertebral en adultos; 3) un incremento del riesgo de fractura; y 4) una disminución de la capacidad regenerativa ósea. Las características de la DM son compatibles con un bajo nivel de remodelado óseo<sup>4,7</sup>. La hiperglucemia induce una menor proliferación y función osteoblástica. Además, los productos de glicosilación avanzada (AGEs) contribuyen a la generación de estrés oxidativo, incrementando la fragilidad ósea y el riesgo de fracturas<sup>8,9</sup>.

Entre los factores endocrinos y locales con acción ósea demostrada, la insulina, producida y secretada por las células pancreáticas, y el IGF-I mayoritariamente producido en el hígado pero

también en el hueso donde se acumula en la matriz ósea, merecen una especial consideración en la osteopatía asociada a la DM<sup>10,11</sup>. Estudios en ratas diabéticas tipo 1 indican el papel del déficit de insulina en la disminución de la integridad y resistencia ósea<sup>12,13</sup>. Además, los pacientes con DM1 poseen niveles séricos de IGF-I significativamente disminuidos en relación a los encontrados en individuos normales o en pacientes con DM2<sup>14</sup>. Se sabe que el IGF-I sistémico juega un importante papel en el desarrollo y mantenimiento de la masa ósea. De hecho, ratones con una deficiencia global en IGF-I presentan al nacer un tamaño de aproximadamente el 60% del correspondiente a sus controles, que disminuye al 30% a las 8 semanas, y presentan una menor mineralización ósea y un bajo remodelado óseo<sup>15-17</sup>.

Por otra parte, la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) juega un papel fundamental en el desarrollo del hueso endocondral retrasando la diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento, y actúa como un importante regulador local del remodelado óseo en adultos<sup>18</sup>. Ratones homocigotos *Pthrp*<sup>-/-</sup> presentan una condrodisplasia letal perinatal; mientras que los heterocigotos *Pthrp*<sup>+/-</sup> son viables pero exhiben una reducción significativa de la masa ósea<sup>19</sup>. La PTHrP posee similitud estructural con la PTH en su extremo N-terminal, pero difiere completamente de esta hormona en el resto de su estructura. La región media y C-terminal de la PTHrP contiene distintos epítomos singulares, asociados a efectos auto/paracrinos e intracrinos en distintos tipos celulares<sup>20</sup>. Como consecuencia de su pro-

Figura 1. Caracterización del modelo de ratón diabético por STZ. Se muestra la glucemia basal en los ratones control (Co) y diabéticos (DM), así como los cambios en el peso en cada uno de los grupos experimentales. Nt, PTHrP (1-36); Ct, PTHrP (107-139). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de 5 ratones/grupo. \*\* $p < 0,01$  vs. Co; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs. DM



cesamiento post-trasduccional<sup>21</sup>, la PTHrP puede generar distintos fragmentos bioactivos: 1) un fragmento N-terminal 1-36; 2) uno o varios fragmentos en la región media, cuyos aminoácidos 88-91 y 102-106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS); y 3) un fragmento C-terminal que contiene la secuencia 107-111 conocida como osteostatina. Aunque aún no se ha logrado aislar un receptor para esta región C-terminal de la PTHrP, se ha demostrado que señala en parte a través de la transactivación del receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) asociada a sus acciones en los osteoblastos<sup>22-24</sup>. Estudios previos han demostrado que la PTHrP revierte los efectos deletéreos de la DM1 sobre el número de células osteoformadoras y la función osteoblástica en la tibia de ratón en regeneración<sup>25</sup>. Además, la PTHrP es capaz de compensar la disminución de diferenciación osteoblástica y la inhibición de la señalización a través de Wnt/ $\beta$ -catenina –una vía clave estimuladora de la formación ósea– inducidas por la alta glucosa en células osteoblásticas *in vitro*<sup>24,26,27</sup>.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo hemos evaluado y comparado las consecuencias del déficit de insulina (DM1) y de IGF-I en la eficacia de la PTHrP para inducir acciones osteogénicas en el ratón.

## Materiales y métodos

Todos los estudios realizados en animales fueron desarrollados con la aprobación del Comité de Experimentación y Bienestar Animal del IIS-Fundación Jiménez Díaz. El dolor y el sufrimiento de los animales fueron paliados de acuerdo a la normativa europea vigente (Directiva 2010/63/UE). Igualmente, el diseño experimental se adaptó al criterio conocido como las 3R (del inglés, *replace, reduce, refine*) para minimizar el número de animales que permitan obtener resultados significativos<sup>28</sup>.

## Modelo de ratón con DM1

Se utilizaron ratones CD-1 macho de 4 meses de edad (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona), estabilizados durante dos semanas en el bioterio del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a una dieta estándar (8,8 g/kg de calcio y 5,9 g/kg de fósforo; Panlab, Reus), a 22°C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para inducir la DM, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.), una citotoxina pancreática, durante 5 días consecutivos a una dosis de 45 mg/kg de peso corporal en tampón citrato sódico 50 mM, pH 4,5, o con el vehículo salino (controles)<sup>25</sup>. Una semana después de la última inyección se midió la glucosa en sangre, extraída de la cola del ratón, mediante un glucómetro (Glucocard G+meter, Menarini Diagnostics,

Florenza, Italia), considerándose diabéticos aquellos con glucemia  $\geq 250$  mg/dl (Figura 1A). Dos semanas tras la confirmación de la DM, los ratones se trataron con PTHrP (1-36) (Nt) o PTHrP (107-139) (Ct) (Bachem, Bubendorf, Suiza), 100  $\mu$ g/kg en cada caso, o con tampón salino fosfatado, pH 7,4 (TSF) (vehículo de los péptidos) cada dos días por inyección subcutánea, durante un total de 14 días (Figura 1A). Se utilizaron 5 ratones/grupo en cada uno de estos 4 grupos experimentales.

Dos horas después de la última inyección de cada tratamiento, los animales se pesaron y posteriormente fueron sacrificados con una mezcla de ketamina (Pfizer, Madrid, España) 20 mg/kg y xilacina (Bayer, Kiel, Alemania) 5 mg/kg (2:1, v/v). Posteriormente, se extrajeron los fémures, las tibias (descartando el peroné) y las vértebras L1-L5, eliminando los restos de músculo adyacentes. Los huesos largos se destinaron a la obtención de cultivos de células mesenquimales de médula ósea (CMMOs) o fueron almacenados para la posterior extracción de ARN (en N<sub>2</sub> líquido) o el análisis de proteínas carboniladas (a -80°C). Las vértebras se almacenaron a -20°C hasta su inclusión en metacrilato para análisis de histomorfometría ósea.

## Modelo de ratón deficiente en IGF-I

Los ratones con deficiencia homocigótica de IGF-I (*Igf1*-nulos), de 3 meses de edad y un fondo genético mixto MF1/129sv, se generaron tras el cruce de ratones heterocigotos con una deleción en el exón 4 del gen *Igf1*<sup>15</sup>. Los ratones fueron genotipados mediante *Southern Blot* tras la extracción de ADN genómico proveniente de la cola con REExtract-N-Amp<sup>TM</sup>Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) y se caracterizaron por criterios funcionales<sup>29,30</sup>.

Se establecieron 4 grupos experimentales con 6 ratones/grupo, control e *Igf1*-nulos, tratados con PTHrP (1-36), PTHrP (107-111) o con TSF. Se admi-

nistraron los péptidos de la PTHrP (80 µg/kg en cada caso) o el vehículo salino por inyección subcutánea cada 48 horas durante dos semanas. Se eligió esta dosis debido a que dosis similares de estos péptidos inducen efectos anabólicos o anti-resortivos, respectivamente, en roedores<sup>25,29-31</sup>. A las 2 h. de la última inyección, los ratones se sacrificaron como se ha descrito anteriormente. Los huesos largos se destinaron a la obtención de CMMOs. Los fémures sobrantes se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido para posterior extracción de ARN total, y las vértebras L1-L5 para histomorfometría.

### Cultivo de CMMOs *ex vivo*

Para la obtención de las CMMOs de los fémures y tibias obtenidos en ambos modelos animales, se perforaron las epífisis de manera paralela a la diáfisis con una aguja quirúrgica de tipo 20G de grosor. La cavidad medular se perfundió con medio de cultivo α-MEM suplementado con suero fetal bovino al 15%, penicilina-estreptomina al 1% y fungizona 2,5 µg/ml, obteniéndose la médula ósea. Tras varios lavados se obtuvo una suspensión homogénea que se centrifugó a 1.500xg durante 5 minutos en frío. El precipitado celular se resuspendió en el medio mencionado anteriormente (sin fungizona), contando el número de células viables (por exclusión de azul de tripán) en un contador de células automático (Countess™, Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Posteriormente, las células se sembraron a una densidad de 1-2,5x10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C<sup>25,32</sup>. Se añadió medio de diferenciación osteogénica (el medio anterior suplementado con ácido L-ascórbico 50 µg/ml y β-glicerolfosfato 10 nM) al cultivo el tercer día de la siembra. Las células se mantuvieron bajo estas condiciones durante 14-16 días siendo la mitad del volumen del medio condicionado reemplazado cada dos días. Durante este periodo, las CMMOs procedentes de ratones diabéticos o *Igf1*-nulos se trataron *in vitro* con los péptidos de la PTHrP (añadidos en el momento del cambio de medio).

### Densitometría ósea

Mediante absorciometría dual de rayos X (DXA) se midieron la densidad mineral ósea (DMO; g/cm<sup>2</sup>), el contenido mineral óseo (CMO; g) y el % de grasa periósea en el cuerpo total, el fémur, la tibia y la columna lumbar (vértebras L1-L5) (regiones de interés) de los ratones anestesiados. La DXA se llevó a cabo utilizando un equipo PIXIMus I (GE Lunar Corp., Madison, Wisconsin, EE.UU.). El programa de este equipo calcula los parámetros citados en diferentes regiones del esqueleto (excluyendo la cabeza) con un coeficiente de variación de ±2%.

### Histomorfometría ósea

Las muestras de vértebras L1-L5 se fijaron durante 24 horas en etanol al 70% y, posteriormente, se deshidrataron en etanol 96% durante dos días y etanol absoluto otros dos días. A continuación, las muestras se incluyeron en metil-metacrilato polimerizado (Merck, Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE.UU.), siguiendo un protocolo estándar<sup>34</sup>. A continuación,

se realizaron cortes seriados de 7 µm lo más cercanos al eje sagital de la columna con un microtomo Leica RM 2255, que fueron depositados en portas pre-tratados con gelatina de Haupt, se cubrieron con una lámina de polietileno y se prensaron durante 20-24 horas a 60°C. Antes de teñir las muestras, éstas se desplastificaron en metil-acetato (Merck) durante 15-30 minutos, seguido de rehidratación con etanol a concentraciones decrecientes (absoluto, 70% y 50%) y lavado con agua destilada. La tinción de Von Kossa permite visualizar el hueso mineralizado de color negro. La tinción con tricrómico de Goldner tiñe en azul, los núcleos celulares; en rojo, los ribetes de osteoide; y en verde, el hueso mineralizado. Tras las tinciones, las muestras se deshidrataron y se montaron con resina DPX (VWR, Lovaina, Bélgica).

Para determinar los parámetros histomorfométricos, se utilizó un micrómetro acoplado a una redícula rectangular en el ocular del microscopio (*Olympus BX41*, Olympus, Melville, Nueva Jersey, EE.UU.)<sup>32</sup>. Se determinó: el volumen trabecular frente al volumen óseo total (BV/TV); el grosor medio trabecular (Tb.Th); el número de trabéculas (Tb.N); y la separación trabecular (Tb.S), según los criterios de la *American Society for Bone and Mineral Research*<sup>35</sup>. Estos parámetros fueron evaluados por 2 observadores de manera independiente.

### Análisis de expresión proteica por transferencia *western*

Para extraer la proteína total del fémur se procedió a su homogenización mecánica en un mortero. Las proteínas se extrajeron con tampón RIPA [50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Tritón X-100 al 1%, deoxicolato sódico al 1% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1%], suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail* P8340, Sigma-Aldrich) y de fosfatasa (*Phosphatase inhibitor cocktail Set II*, Calbiochem, La Jolla, California, EE.UU.). Tras incubación durante 30 minutos a 4°C, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos, recogiendo los sobrenadantes. La medida de la concentración de proteína se realizó por el método del ácido bicinónico (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, EE.UU.), utilizando una curva patrón de seroalbúmina bovina. En los extractos proteicos se cuantificaron las proteínas carboniladas, mediante derivatización de los grupos carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP-hidrazina) utilizando el ensayo comercial *OxyBlot protein oxidation detection kit* (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.). La proteína DNP-hidrazona estable obtenida se detecta por inmunotransferencia. Para ello, las proteínas derivatizadas (20 µg) se separaron por electroforesis en geles de poliácridamida-SDS al 12,5%, y posteriormente se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinidileno (Schelider & Schuel, Keene, Nueva Hampshire, EE.UU.), seguido de incubación con un anticuerpo primario policlonal anti-DNP y con un secundario conjugado con peroxidasa de rábano. Las bandas resultantes se visualizaron por quimioluminiscencia (*ECL Western Blotting Detection Reagents*; GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos empleados para la amplificación génica por PCR a tiempo real

Cebador	Secuencia Sentido 5'-3'	Secuencia Anti-sentido 5'-3'
<i>Wnt3a</i>	GCACCACCGTCAGCAACAG	GGGTGGCTTTGTCCAGAACA
<i>Fz2</i>	CCGTCTCTGGATCCTCACAT	AGAAGCGCTCATTGCATAACC
<i>Lrp5</i>	CAACGTGGACGTGTTTTATTCTTC	CAGCGACTGGTGCTGTAGTCA
<i>Lrp6</i>	AGATCCATCAAGTGGGTTTCATGTA	GAAGCGACTTGAGCCATCCA
<i>18s</i>	ATGCTCTTAGCTGAGGTGCCCG	ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG

Para el análisis de las proteínas procedentes de los CMMOs, los extractos proteicos (20 µg) fueron separados en gel de poliacrilamida-SDS al 8% con β-mercaptoetanol al 5%. A continuación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot® SD *semi-dry transfer cell*, Bio-Rad, California, EE.UU.). Seguidamente, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 2,5% en un tampón Tris-salino (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1%). Posteriormente, estas membranas fueron incubadas en presencia del anticuerpo primario policlonal correspondiente a β-catenina (dilución 1:10000; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y de IgG de cabra anti-conejo combinado con peroxidasa de rábano [(dilución 1:10000); Santa Cruz, California, EE.UU.]. Como control de carga se analizó la expresión de β-actina [(dilución 1:500); Santa Cruz].

#### Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

El ARN total se extrajo de los homogeneizados de fémur (como se ha indicado anteriormente) con Trizol (Invitrogen, Groningen, Holanda) a 4°C. La retrotranscripción del ARN obtenido a ADNc se llevó a cabo a partir de 0,5 -1,5 µg de ARN con el *cDNA High capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) en un termociclador Techgene (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, Reino Unido), siguiendo el siguiente protocolo secuencial: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. La PCR a tiempo real se realizó con: 1) cebadores específicos de ratón para los siguientes genes de la vía canónica de Wnt<sup>34</sup>: *Wnt3a*, *frizzled 2 (Fz2)* y proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (*Lrp5* y *Lrp6*, respectivamente) (Tabla 1), y la mezcla de reacción *SYBR Premix Ex-Taq green* polimerasa (Takara, Otsu, Japón); 2) sondas *TaqMan MGB* (Assay-by-Design™ System, Applied Biosystems) para ciclina D1 (*Ccnd1*) y conexina 43 (*Cx43*), y una mezcla de reacción con *Premix Ex-Taq* polimerasa (Takara) en un termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). En paralelo, se amplificó el ARN *18s* ribosomal como gen normalizador<sup>25,31</sup>.

Las curvas de disociación verificaron la obtención de un único producto de amplificación en el caso del uso de cebadores específicos. Los niveles de expresión en cada condición experimental

relativos al control basal se calcularon como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamiento}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$ ) como se ha descrito anteriormente<sup>27</sup>. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

#### Estadística

Los resultados se expresaron como media ± error estándar de la media (EEM). La comparación entre varios grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La comparación paramétrica entre dos grupos se realizó mediante la prueba t de Student; mientras que en aquellas comparaciones no paramétricas se realizó la prueba de Mann Whitney. Las diferencias con una  $p < 0,05$  fueron consideradas significativas. Los análisis se llevaron a cabo con el programa informático Graphpad InStat (San Diego, California, EE.UU.).

#### Resultados

##### Acciones osteogénicas de la PTHrP en un modelo de osteopenia asociada a DM1 en ratón

Los ratones diabéticos por inyección de STZ mostraron una disminución significativa del peso corporal respecto a los controles, que en parte se recuperó por el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP (Figura 1). En estos animales, la DM indujo una disminución de la DMO y CMO, así como del porcentaje de grasa periósea, predominantemente en los huesos largos; alteraciones que fueron en parte por ambos fragmentos de la PTHrP (Tabla 2).

Mediante histomorfometría realizada en las vértebras (L1-L5), observamos que los ratones diabéticos mostraban una disminución del volumen trabecular total (BV/TV), del grosor medio (Tb.Th) y del número de trabéculas (Tb.N.) y un incremento de separación trabecular (Tb.S); parámetros que se normalizaron tras el tratamiento con los péptidos de la PTHrP (Tabla 3). La tinción de Von Kossa permitió visualizar claramente estas alteraciones en el hueso trabecular de las vértebras en cada uno de los grupos experimentales estudiados (Figura 2).

En el fémur de los ratones diabéticos, analizamos la expresión de genes implicados en la activación de la vía Wnt/β-catenina; observamos que los niveles de ARNm del ligando *Wnt3a*, del receptor *Fz2* y de los co-receptores *Lrp5* y *Lrp6*, así como los de *Ccnd1* (un gen diana final de esta vía) estaban disminuidos en estos ratones (Figura

Tabla 2. Valores de masa ósea y grasa periósea en los huesos largos, columna vertebral y cuerpo total de ratones controles y diabéticos, con y sin tratamiento PTHrP (1-36) o PTHrP (107-139)

		Control	Diabético (DM)	DM+PTHrP (1-36)	DM+PTHrP (107-139)
<b>Fémur</b>	DMO	0,123±0,001	0,103±0,0009**	0,106±0,001	0,119±0,001##
	CMO	0,046±0,001	0,041±0,0005**	0,042±0,0007	0,047±0,001#
	%Grasa	19,45±2,376	11,56±0,409**	17,76±0,248##	13,34±0,441#
<b>Tibia</b>	DMO	0,084±0,002	0,076±0,0004**	0,086±0,002#	0,086±0,002##
	CMO	0,046±0,001	0,042±0,0007*	0,045±0,001#	0,046±0,0004##
	%Grasa	18,94±0,909	14,98±0,485**	16,78±0,171##	18,64±0,930##
<b>Columna</b>	DMO	0,077±0,003	0,074±0,001	0,074±0,0009	0,076±0,0007
	CMO	0,092±0,006	0,057±0,011*	0,089±0,001#	0,094±0,003#
	%Grasa	18,78±1,084	11,06±0,175	10,4±0,175#	11,21±0,606
<b>Cuerpo total</b>	DMO	0,064±0,001	0,056±0,001**	0,067±0,001##	0,067±0,002##
	CMO	0,901±0,029	0,864±0,017	0,892±0,019	0,892±0,001
	%Grasa	18,78±1,084	12,82±0,582**	13,56±0,597	12,92±2,143

DMO (g/cm<sup>2</sup>); CMO (g). Los valores son la media ± EEM de 5 ratones/grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05; ##p<0,01 vs. DM.

3A). Además, en los osteoprogenitores de la médula ósea (CMMOs) de los huesos largos encontramos una menor expresión proteica de β-catenina (Figura 3B). Estos efectos deletéreos de la situación diabética sobre efectores de la vía Wnt/β-catenina fueron compensados por la administración de PTHrP *in vivo* (sobre todo por el fragmento N-terminal) e *in vitro* (Figuras 3A y 3B).

Dado que la DM se asocia a un incremento de estrés oxidativo, analizamos la producción de proteínas oxidadas en el fémur de los ratones diabéticos<sup>35</sup>. Estos animales presentaban un aumento de proteínas oxidadas respecto a los controles, que mostró una tendencia a la normalización tras el tratamiento con PTHrP (1-36), pero no con PTHrP (107-139) (Figura 3C).

#### Alteraciones de la masa y la estructura óseas asociadas al déficit de IGF-I en ratón y su modulación por la PTHrP

Los ratones *Igf1*-nulos mostraron una disminución significativa de la DMO y CMO respecto a los ratones control en el cuerpo total, fémur y columna (L1-L5) (Figura 4A). Al final del período de estudio (día 14), los ratones *Igf1*-nulos mostraron menos ganancia de masa ósea en el cuerpo total, pero mayor en fémur y en columna, respecto a la de los controles (Figura 4B). El tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP produjo un aumento significativo de masa ósea en el cuerpo total y en

el fémur de los ratones *Igf1*-nulos (Figura 4B). Mediante análisis histomorfométrico, se observó una alteración general en los parámetros estructurales evaluados en las vértebras L1-L5 de los ratones *Igf1*-nulos respecto a los controles. El tratamiento con los péptidos de la PTHrP normalizó el BV/TV y el Tb.Th. en estos animales (Tabla 4).

En los ratones *Igf1*-nulos, encontramos en el fémur una disminución de un gen inicial y otro final, claves en la actividad de la vía canónica de Wnt, *Wnt3a*, y *Cx43*, que resultó parcialmente compensada por el tratamiento con los péptidos de la PTHrP (Figura 5A).

Además, quisimos comprobar si la PTHrP podría ejercer acciones osteogénicas autónomas a nivel celular en ausencia de IGF-I. Para ello, utilizamos cultivos de CMMOs provenientes de ratones controles e *Igf1*-nulos, tratados *in vitro* con ambos péptidos de la PTHrP. Estos cultivos a partir de ratones *Igf1*-nulos mostraron una menor capacidad de mineralización en comparación con la de los ratones control, que no se afectó por el tratamiento con ambos péptidos de la PTHrP (Figura 5B).

#### Discusión

##### Efectos osteogénicos de la PTHrP en un modelo murino de DM1 inducido por STZ

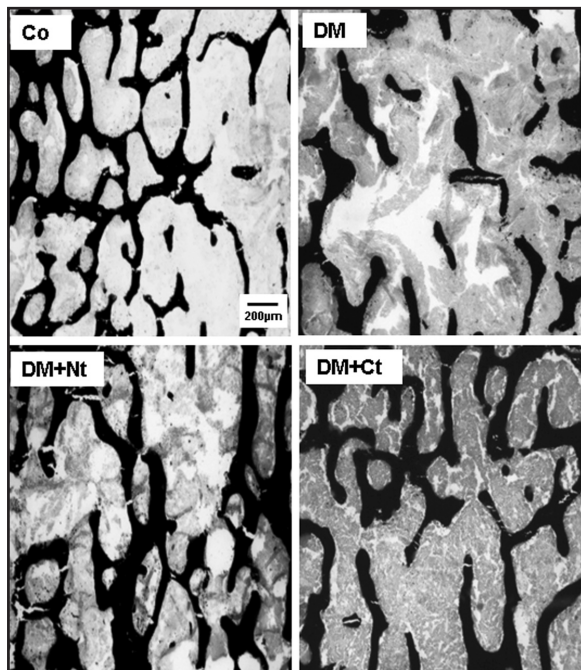
En el presente estudio observamos una pérdida de peso en los ratones diabéticos, debida posiblemente a la acción lipolítica y a la pérdida muscu-

Tabla 3. Alteraciones de parámetros histomorfométricos en el hueso trabecular (vértebras L1-L5) de ratones diabéticos, tratados o no con PTHrP

Parámetro	Control	Diabético (DM)	DM + PTHrP (1-36)	DM + PTHrP (107-139)
BV/TV (%)	36,93±1,64	22,21±1,6**	37,19±2,76##	37,43±3,7##
Tb.Th. (µm)	85,49±4,53	59,91±2,24**	83,93±4,81##	88,24±2,91##
Tb. N. (mm <sup>-1</sup> )	2,26±0,09	1,77±0,09*	2,32±0,07##	2,30±0,15#
Tb. S. (µm)	146,93±9,71	225,97±12,07**	130,12±1,45##	130,52±12,49#

BV/TV: volumen trabecular total; Tb.Th.: grosor medio de las trabéculas; Tb.N.: número de trabéculas; Tb.S.: separación trabecular. Los valores corresponden a la media ± EEM de 5 ratones/grupo \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05, ##p<0,01 vs. DM.

Figura 2. Alteraciones del hueso trabecular en las vértebras (L1-L5) en ratones diabéticos, con o sin tratamiento con los péptidos de la PTHrP. Se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía óptica (4x) de cortes histológicos de vértebras de ratones control (Co) o diabéticos (DM), tratados o no con PTHrP Nt (Nt) o C-terminal (Ct), tras su inclusión en metacrilato y tinción de Von Kossa, mostrando la estructura trabecular



lar inducida por la droga STZ<sup>36,37</sup>. Utilizando DXA, corroboramos este hallazgo con el descenso observado en el porcentaje de grasa periósea en el cuerpo total y los huesos largos de los ratones diabéticos. En dichas localizaciones observamos, además, una disminución de masa ósea a las 4 semanas de la instauración de la DM. El tratamiento con los péptidos de la PTHrP compensó esta osteopenia, de acuerdo a observaciones previas en este modelo de DM1 tras la administración de análogos de PTH y PTHrP<sup>25,26,38,39</sup>.

El análisis histomorfométrico de las vértebras L1-L5 mostró una disminución del BV/TV y de otros parámetros trabeculares (Tb.Th., Tb.N y Tb.S) en los ratones diabéticos, en consonancia con observaciones en otro modelo de DM1 inducida por STZ en ratón<sup>40</sup>. Por otra parte, datos recientes de un análisis histomorfométrico en biopsias procedentes de cresta iliaca de pacientes con DM1 no registraron alteraciones significativas en la estructura trabecular respecto al grupo control sano, aunque sí una tendencia coherente con los resultados obtenidos en las vértebras de los ratones diabéticos en nuestro estudio<sup>41</sup>. Sin embargo, es interesante señalar que en estos pacientes diabéticos, las muestras fueron obtenidas antes de la aparición de complicaciones asociadas a la DM. Nuestros resultados demuestran la capacidad de los péptidos de la PTHrP para atenuar las alteraciones de la estructura trabecular vertebral producidas por la DM en el ratón, confirmando hallazgos previos<sup>25,26,44</sup>.

Datos recientes de nuestro grupo han mostrado alteraciones de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el hueso de ratones con DM1 inducida por STZ, asociadas a una disminución de esclerostina correspondiente a una mayor tasa de apoptosis osteocítica en la tibia de estos ratones<sup>42</sup>. Por otra parte, se ha encontrado una sobreexpresión de Sost y Dkk1 (inhibidores de la vía Wnt canónica) en la tibia de ratas diabéticas<sup>43</sup>. En humanos, se han encontrado altos niveles de esclerostina y una disminución de  $\beta$ -catenina en el suero de pacientes con DM2<sup>44</sup>. Los resultados del presente trabajo demuestran una alteración en la expresión de genes canónicos de las etapas iniciales de la vía Wnt en el hueso murino diabético, en contraste con lo observado en la rata diabética<sup>43</sup>. Así pues, las alteraciones en los componentes de la vía Wnt en situación diabética parece compleja y dependiente de la especie.

El estado hiperglucémico asociado a la DM1 condiciona un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), que producen aumento de la carbonilación proteica<sup>35,45</sup>. El aumento observado de proteínas carboniladas en el fémur de los ratones diabéticos se redujo en los tratados con el fragmento N-terminal de la PTHrP. En este sentido, se ha descrito la capacidad

Tabla 4. Alteraciones de parámetros histomorfométricos en las vértebras L1-L5 de ratones *Igf1*-nulos, tratados o no con PTHrP

Parámetro	Control	<i>Igf1</i> -nulo	<i>Igf1</i> -nulo+Nt	<i>Igf1</i> -nulo+Ost
BV/TV (%)	26,1±1,5	16,5±0,9**	22,6±3,3#	22,85±0,2#
Tb. Th (µm)	54,5±2	45,9±1,8**	65,4±3**,##	52,5±2,5#
Tb. Sp (µm)	156±6,8	214,7±19,3**	230,6±27,9**	213,2±9,24**
Tb. N (1/mm)	4,7±0,1	3,7±0,2**	3,4±0,3**	3,6±0,23**

BV/TV: volumen trabecular óseo/volumen total; Tb. Th: espesor trabecular; Tb.N: número de trabéculas; Tb. Sp: separación trabecular. Nt, PTHrP (1-36); Ost, osteostatina. Los valores son la media ± EEM de 6 ratones/grupo. \*\*p<0,01 vs. control; #p<0,05; ##p<0,01 vs. *Igf1*-nulo.

de la PTH para disminuir la producción de ROS en CMMOs del fémur de ratones viejos<sup>46</sup>. El exceso de ROS en el hueso diabético afecta a la osteoblastogénesis -derivando la diferenciación de las CMMOs a adipogénesis<sup>47,48</sup> y a la función osteoblástica -disminuyendo la expresión de Runx2, FA y Col1α<sup>49</sup> y también activando la transcripción de FoxO, el cual antagoniza la señalización de Wnt canónica<sup>50</sup>. Así, encontramos una disminución de β-catenina en los cultivos de CMMOs provenientes de los huesos largos de los ratones diabéticos. A este respecto, en un modelo de ratón diabético no obeso (similar al modelo de DM1 por STZ) se ha observado una supresión de la vía PI3K/AKT en células osteoprogenitoras que podría contribuir a la desestabilización de la β-catenina en estas células<sup>51</sup>. En humanos, se ha caracterizado una mutación en el gen *Sirt1* directamente relacionada con el desarrollo de DM1<sup>52</sup>, que resulta de interés, ya que la proteína SIRT1 promueve la translocación al núcleo de la β-catenina en células osteoprogenitoras<sup>53</sup>.

Nuestros hallazgos demuestran que la PTHrP (predominantemente su fragmento N-terminal) es capaz de contrarrestar, al menos en parte, el estrés oxidativo y las alteraciones de distintos componentes activadores de la vía Wnt como parte de sus acciones osteogénicas en el hueso diabético.

**Efectos osteogénicos de la PTHrP (1-36) y la osteostatina en un modelo murino deficiente en IGF-I**

El sistema IGF juega un papel determinante en la regulación del crecimiento somático. Se ha sugerido que una disminución en la producción y/o en la actividad de IGF-I podría contribuir a la pérdida de masa ósea

Figura 3. Efecto de la PTHrP sobre la vía Wnt/β-catenina en los huesos largos de ratones diabéticos. (A) Cambios en la expresión de genes relacionados con la vía Wnt canónica (analizada por PCR a tiempo real) en el fémur de los ratones control (Co) y diabéticos (DM), tratados o no con el fragmento N-terminal (Nt) o C-terminal (Ct) de la PTHrP. (B) Autorradiografía representativa de los cambios en la expresión de β-catenina en CMMOs extraídas del fémur y la tibia de estos ratones, cultivadas durante 14 días en medio osteogénico, en presencia o no de cada uno de los péptidos de la PTHrP (100 nM). Se muestran las intensidades medias relativas de la señal de β-catenina normalizadas a la de β-actina para cada condición experimental referidas al control en un experimento representativo. (C) Efecto de la PTHrP sobre la oxidación de proteínas en ratones diabéticos. Medida de las proteínas carboniladas en el fémur de ratones control y diabéticos, tratados o no con los péptidos de la PTHrP. Los resultados en A y C corresponden a la media ± EEM de los valores obtenidos en 5 ratones de cada condición experimental. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Co; #p<0,05, ##p<0,01 vs. DM

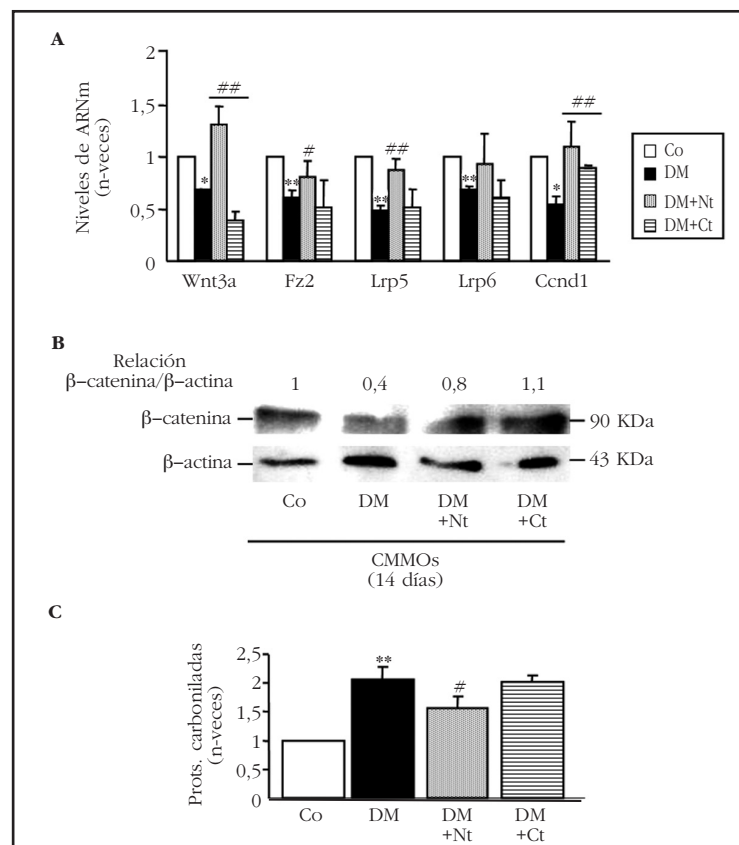
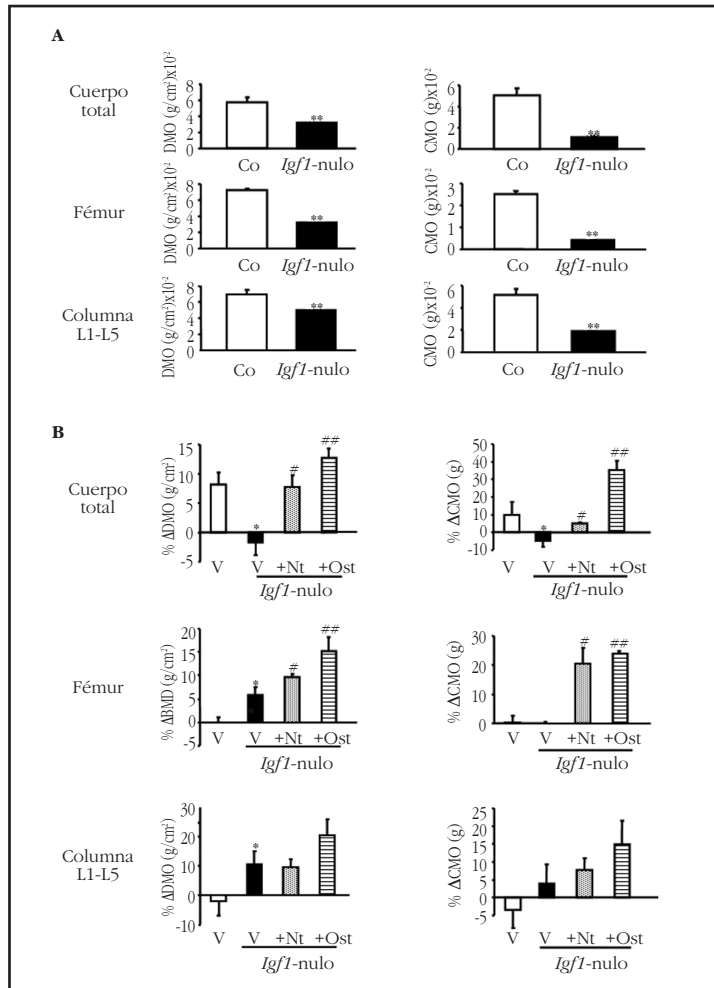




Figura 4. Caracterización de los cambios en la masa ósea de ratones *Igf1*-nulos, tratados o no con PTHrP. (A) Valores de DMO y CMO de ratones control (Co) e *Igf1*-nulos al comienzo del estudio (día 0) en cuerpo total, fémur y columna. (B) Incrementos ( $\Delta$ ) en % de los valores de DMO y CMO desde el comienzo (día 0) hasta la finalización del estudio (día 14) para cada uno de los genotipos, y efecto del tratamiento con la PTHrP N-terminal (Nt) o con osteostatina (Ost) (o vehículo, V). Los valores corresponden a las medias  $\pm$  EEM de 6 ratones para cada condición experimental. \*\* $p < 0,01$  vs. Co (A); \* $p < 0,05$  vs. V-control; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs. V-*Igf1*-nulo (B)



asociada a la edad<sup>54</sup>. Sin embargo, también se ha especulado que esta disminución determinaría un menor remodelado óseo y así preservar la solidez de los huesos largos en esta situación<sup>55</sup>. El IGF-I aumenta la formación ósea periosteal, pero sus efectos en el hueso trabecular son variables<sup>16,56,57</sup>. Las diferencias observadas en el esqueleto de los ratones deficientes en IGF-I podrían ser consecuencia del efecto dual de este factor en la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis y su impacto relativo según la localización ósea<sup>16</sup>.

En el presente trabajo, hemos utilizado un modelo de ratón con deficiencia en la expresión de *Igf1* que muestra alteraciones significativas en la masa y la estructura ósea trabecular de las vértebras, compensadas en parte por ambos péptidos de la PTHrP. Resulta de interés mencionar los efectos anabólicos de la PTH observados en el hueso trabecular de rato-

nes con deficiencia del IGF-I proveniente de la síntesis hepática<sup>58</sup>. La baja actividad resortiva asociada a la deficiencia del IGF-I podría facilitar la manifestación de una acción anabólica de la PTHrP a nivel trabecular<sup>16,59</sup>. De hecho, se han descrito efectos anabólicos de ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP en el hueso trabecular del fémur en el modelo de ratón diabético por STZ, con bajo remodelado óseo<sup>25,26</sup>.

Observamos cambios significativos en varios componentes de la vía Wnt canónica compatibles con las alteraciones en el remodelado óseo en los ratones deficientes en IGF-I. Datos previos en ratones con déficit de IGF-I en osteocitos muestran una marcada deficiencia en el desarrollo óseo y en la respuesta a la estimulación mecánica, asociadas a una activación deficitaria de la vía Wnt<sup>60,61</sup>. En nuestro estudio, encontramos que la administración de PTHrP (1-36) u osteostatina corrige en parte las alteraciones observadas en la vía Wnt canónica en los ratones deficientes en IGF-I. En este sentido, como demuestran nuestros datos, tanto la PTHrP (1-36) como el fragmento C-terminal nativo PTHrP (107-139) actúan sobre esta vía metabólica en ratones diabéticos por STZ<sup>25,26,42</sup>.

Por otra parte, encontramos que las CMMOs de los ratones con déficit de IGF-I mostraron una menor capacidad osteogénica que los ratones control. Un resultado similar se obtuvo en ratones con déficit de *Igf1r* en osteoblastos maduros<sup>62,63</sup>. Además, estas CMMOs mostraron una falta de respuesta a la PTHrP *in vitro*, indicando que el IGF-I es esencial para la acción de la PTHrP sobre estas células osteoprogenitoras.

Estos hallazgos, en conjunto, demuestran que la PTHrP, predominantemente a través de su dominio N-terminal, es capaz de modular la vía de Wnt canónica en relación a sus acciones osteogénicas en situación diabética. Además, un sistema funcional de IGF es necesario para al menos parte de las acciones osteogénicas de la PTHrP (1-36) y de la osteostatina en el esqueleto murino.

**Agradecimientos:** La PTHrP (1-36) humana fue donada generosamente por los Dres. A. F. Stewart y A. García Ocaña (Facultad de Medicina de la Universidad de Pittsburg, Pensilvania, EE.UU.).

**Otras financiaciones:** Este trabajo ha sido también financiado con Ayudas del Ministerio de Educación y Cultura (SAF2005-05254), del Instituto de Salud Carlos III (PI050117, PI080922, PI11/00449, RD06/0013/1002 y RD12/0043/0008) y del Ministerio

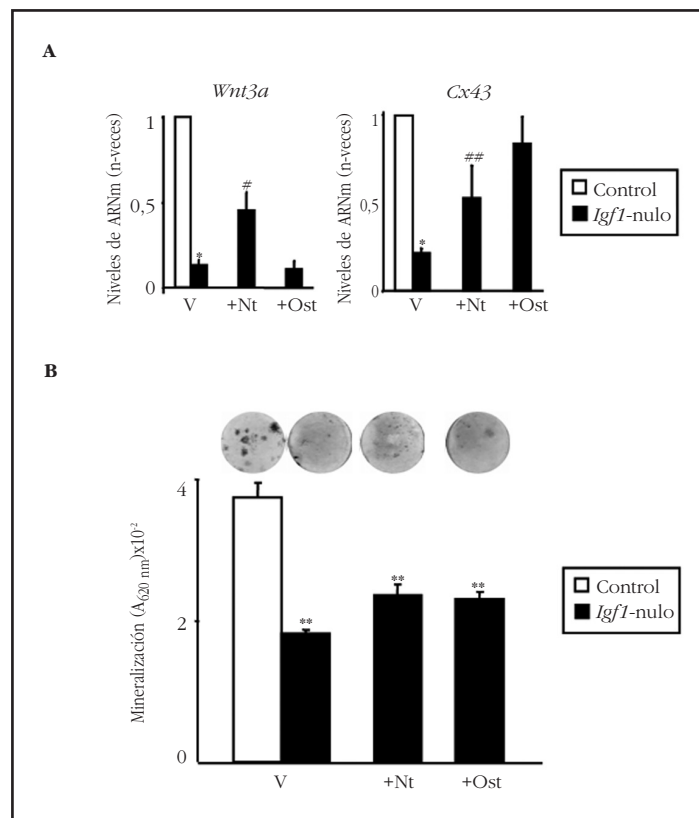
de Ciencia e Innovación (SAF2011-24391). AL-H y MM fueron agraciadas con becas de la Fundación Conchita Rábago, así como del Ministerio de Educación-programa FPU (AP2009-1871) (AL-H) y del Ministerio de Economía y Competitividad (FI12/00458) (MM). LR-de la R posee un contrato CIBERER. SP-N y DL poseen contratos post-doctorales de RETICEF (RD06/0013/1002 y RD12/0043/0008) y la Comunidad Autónoma de Madrid (S-2009/Mat-1472), respectivamente.

**Declaración de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Bibliografía

- Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;37 (Suppl1):S81-90.
- Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes* 2011;2:41-8.
- Adami S. Bone health in diabetes: considerations for clinical management. *Curr Med Res Opin* 2009;25:1057-72.
- McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type 1 diabetic bone loss. *J Cell Biochem* 2007;102:1343-57.
- Rakel A, Sheehy O, Rahme E, Le Lorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2008;34:193-205.
- Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type 1 diabetic mice. *Endocrinology* 2005;146:3622-31.
- Starup-Linde J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:21.
- Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets* 2011;12:2096-102.
- Saito M, Marumo K. Bone quality in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:72.
- Carney EF. Bone: modulation of IGF-1 might prevent osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:440.
- Thraillkill KM, Lumpkin CK, Jr., Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E735-45.
- Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res* 1988;6:317-23.
- Hou JC, Zernicke RF, Barnard RJ. Effects of severe diabetes and insulin on the femoral neck of the immature rat. *J Orthop Res* 1993;11:263-71.
- Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Bohm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol* 1998;159:297-306.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993;75:59-72.
- Bikle DD, Majumdar S, Laib A, Powell-Braxton L, Rosen C, Beamer W, et al. The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. *J Bone Miner Res* 2001;16:2320-9.
- Wang Y, Nishida S, Sakata T, Elalieh HZ, Chang W, Halloran BP, et al. Insulin-like growth factor-I is essential for embryonic bone development. *Endocrinology* 2006;147:4753-61.

Figura 5. (A) Cambios de factores relacionados con la vía Wnt canónica en ratones *Igf1*-nulos, tratados o no con PTHrP. Expresión génica (evaluada por PCR a tiempo real) de *Wnt3a* y *Cx43* en el fémur de estos ratones, y efecto del tratamiento con PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost) (o vehículo, V). Los valores representan las medias  $\pm$  EEM de 6 ratones/grupo. \* $p < 0,05$  vs. V; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs. V-*Igf1*-nulo. (B) Alteración en la capacidad mineralizante de CMMOs de ratones *Igf1*-nulos. Las CMMOs de 2 ratones Co ó 5 ratones *gf1*-nulos fueron cultivadas durante 16 días, con o sin (vehículo salino, V) PTHrP (1-36) (Nt) u osteostatina (Ost) (100 nM). La mineralización se evaluó mediante tinción con rojo alizarina S (se muestran imágenes representativas). Los valores representan las medias  $\pm$  EEM de 7 pocillos de cultivo por condición experimental. \*\* $p < 0,01$  vs. V-control



- Kartsogiannis V, Moseley J, McKelvie B, Chou ST, Hards DK, Ng KW, et al. Temporal expression of PTHrP during endochondral bone formation in mouse and intramembranous bone formation in an in vivo rabbit model. *Bone* 1997;21:385-92.
- Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, et al. Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol* 1996;175:166-76.
- McCauley LK, Martin TJ. Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res* 2013;27:1231-9.
- Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE, Yang KH, Soifer NE, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a pro-hormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev* 1994;15:40-60.
- de Gortazar AR, Alonso V, Álvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006;79:360-9.
- Alonso V, de Gortazar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Álvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol* 2008;217:717-27.

24. García-Martín A, Acitores A, Maycas M, Villanueva-Peñacarrillo ML, Esbrit P. Src kinases mediate VEGFR2 transactivation by the osteostatin domain of PTHrP to modulate osteoblastic function. *J Cell Biochem* 2013;114:1404-13.
25. Lozano D, de Castro LF, Dapia S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Álvarez-Arroyo MV, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology* 2009;150:2027-35.
26. Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapia S, Gómez-Barrena E, et al. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopenia. *Br J Pharmacol* 2011;162:1424-38.
27. López-Herradón A, Portal-Núñez S, García-Martín A, Lozano D, Pérez-Martínez FC, Ceña V, et al. Inhibition of the canonical Wnt pathway by high glucose can be reversed by parathyroid hormone-related protein in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 2013;114:1908-16.
28. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. 1959, London: Methuen and Co. Ltd.
29. Rihani-Basharat S, Lewinson D. PTHrP(107-111) inhibits in vivo resorption that was stimulated by PTHrP(1-34) when applied intermittently to neonatal mice. *Calcif Tissue Int* 1997;61:426-8.
30. de Castro LF, Lozano D, Dapia S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E, et al. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid-hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1157-68.
31. de Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, De la Fuente M, Caeiro JR, et al. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol* 2012;227:1752-60.
32. Serrano S, Aubia J, Mariñoso M. Patología ósea metabólica. 1990, Barcelona: Sandoz S.A.E.
33. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013;28:2-17.
34. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
35. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23-38.
36. Szkudelski T, Szkudelska K. Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes in vitro. *Physiol Res* 2002;51:255-9.
37. Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF-kappaB canonical cascade activation. *Acta Diabetol* 2010;47:315-23.
38. Suzuki K, Miyakoshi N, Tsuchida T, Kasakawa Y, Sato K, Itoi E. Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone* 2003;33:108-14.
39. Motyl KJ, McCauley LK, McCabe LR. Amelioration of type I diabetes-induced osteoporosis by parathyroid hormone is associated with improved osteoblast survival. *J Cell Physiol* 2012;227:1326-34.
40. Illien-Junger S, Grosjean F, Laudier DM, Vlassara H, Striker GE, Iatridis JC. Combined anti-inflammatory and anti-AGE drug treatments have a protective effect on intervertebral discs in mice with diabetes. *PLoS One* 2013;8:e64302.
41. Armas LA, Akhter MP, Drincic A, Recker RR. Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bone* 2012;50:91-6.
42. Portal-Núñez S, Lozano D, de Castro LF, de Gortazar AR, Nogués X, Esbrit P. Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Lett* 2010;584:3095-100.
43. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, Tsukamoto I. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med* 2011;28:455-62.
44. Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, Torrisi V, Sidoti MH, Pulvirenti I, et al. Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:3744-50.
45. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:393-404.
46. Jilka RL, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Roberson PK, Weinstein RS, et al. Decreased oxidative stress and greater bone anabolism in the aged, when compared to the young, murine skeleton with parathyroid hormone administration. *Aging Cell* 2010;9:851-67.
47. Yamaguchi M. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation: Involvement in Osteoporosis with Obesity and Diabetes. *J Bone Marrow Res* 2013;1:e107.
48. Li W, Hu W, Ho F. High glucose induced bone loss via attenuating the proliferation and osteoblastogenesis and enhancing adipogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Eng Appl Basis Commun* 2013;25:1-15.
49. Graves D, Alblow J, Paglia D, O'Connor J, Lin S. Impact of diabetes on fracture healing. *J Exp Clin Med* 2011;3:3-8.
50. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007;282:27298-305.
51. Li L, Xia Y, Wang Z, Cao X, Da Z, Guo G, et al. Suppression of the PI3K-Akt pathway is involved in the decreased adhesion and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from non-obese diabetic mice. *Cell Biol Int* 2011;35:961-6.
52. Hughes JW, Herold KC. Novel SIRT1 mutation linked to autoimmune diabetes in humans. *Cell Metab* 2013;17:311-2.
53. Simic P, Zainabadi K, Bell E, Sykes DB, Saez B, Lotinun S, et al. SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating beta-catenin. *EMBO Mol Med* 2013;5:430-40.
54. Cao JJ, Kurimoto P, Boudignon B, Rosen C, Lima F, Halloran BP. Aging impairs IGF-I receptor activation and induces skeletal resistance to IGF-I. *J Bone Miner Res* 2007;22:1271-9.
55. Courtland HW, Kennedy OD, Wu Y, Gao Y, Sun H, Schaffler MB, et al. Low levels of plasma IGF-1 inhibit intracortical bone remodeling during aging. *Age (Dordr)* 2012;35:1691-703.
56. Yakar S, Courtland HW, Clemmons D. IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *J Bone Miner Res* 2010;25:2543-52.
57. Sakata T, Wang Y, Halloran BP, Elalieh HZ, Cao J, Bikle DD. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-I) by inhibiting activation of the IGF-I signaling pathways. *J Bone Miner Res* 2004;19:436-46.
58. Yakar S, Bouxsein ML, Canalis E, Sun H, Glatz V, Gundberg C, et al. The ternary IGF complex influences postnatal bone acquisition and the skeletal response to intermittent parathyroid hormone. *J Endocrinol* 2006;189:289-99.
59. Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, et al. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res* 2002;17:1570-8.
60. Sheng MH, Zhou XD, Bonewald LF, Baylink DJ, Lau KH. Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone* 2013;52:133-44.
61. Lau KH, Baylink DJ, Zhou XD, Rodriguez D, Bonewald LF, Li Z, et al. Osteocyte-derived insulin-like growth factor I is essential for determining bone mechanosensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E271-81.
62. Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res* 2007;22:1329-37.
63. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, et al. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 2002;277:44005-12.