
TRABAJO ORIGINAL

Efectos “in vivo” de Metformina sobre las alteraciones de la microarquitectura ósea asociadas al Síndrome Metabólico inducido por fructosa en ratas

In vivo effects of Metformin on the alterations of bone micro-architecture associated with fructose-induced Metabolic Syndrome in rats

Felice J.I., Cortizo A.M., Sedlinsky C., Schurman L., McCarthy A.D.¹

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

RESUMEN

El Síndrome Metabólico (SM) se ha asociado recientemente con una disminución en la densidad mineral ósea, y con un aumento en la incidencia de fracturas osteoporóticas. Recientemente encontramos que la Metformina por vía oral en ratas, promueve la diferenciación osteogénica de células progenitoras de médula ósea e incrementa la reparación de lesiones óseas. En este trabajo evaluamos los efectos del SM inducido por Fructosa sobre la microarquitectura ósea en ratas, y la modulación de estos efectos por Metformina administrada en forma oral. Utilizamos ratas Sprague Dawley macho jóvenes: C (control sin tratamiento), C+M (100mg/kg/día Metformina en el agua de bebida), F (10 % Fructosa en el agua de bebida) y F+M (Fructosa+Metformina en el agua de bebida). Los tratamientos se continuaron por 3 semanas luego de lo cual se tomaron muestras de sangre, previas al sacrificio de los animales. Se disecaron los fémures para evaluación histomorfométrica de la microarquitectura metafisaria por tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E). Se observó un incremento en la glucemia y trigliceridemia en el grupo F versus el C, compatible con el desarrollo de SM. El análisis de las metafisis femorales mostró un aumento en la densidad osteocítica trabecular para el grupo C+M (118 % del control, $p < 0,05$). El tratamiento con Fructosa sola disminuyó la densidad osteocítica (79 % del control, $p < 0,05$), mientras que el co-tratamiento Fructosa+Metformina (grupo F+M) revirtió parcialmente este descenso (88 % del control). Similarmente, el porcentaje de hueso trabecular en la metafisis femoral aumentó luego del tratamiento sólo con Metformina (129 % respecto del control), se redujo en las ratas tratadas con Fructosa (89 % respecto del control), y fue intermedia en el grupo F+M (94 % respecto del control). Estos resultados muestran que el SM inducido por Fructosa en ratas altera la microarquitectura metafisaria femoral; y que estos efectos deletéreos pueden ser parcialmente prevenidos por un tratamiento oral con Metformina. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 193-199, 2011**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: síndrome metabólico, microarquitectura ósea, metformina

ABSTRACT

Several clinical studies have demonstrated that the Metabolic Syndrome (MS) is associated with a decrease in bone mineral density, and with an increased risk for non-vertebral osteoporotic fractures. We have recently found that orally administered Metformin induces osteogenic effects in rats, promoting osteoblastic differentiation of bone marrow progenitor cells and increasing the repair of bone lesions. In the present work we have evaluated the effects of Fructose-induced MS on bone micro-architecture in rats, and the possible

Correspondencia: Antonio Desmond McCarthy, GIOMM, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115, (1900), La Plata, Argentina. Telefax 54-221-4512426.

mccarthy@biol.unlp.edu.ar

Recibido: 04-07-2011 Aceptado: 12-07-2011

modulation of these effects by orally administered Metformin. We utilized young male Sprague-Dawley rats, divided into four groups: C (non-treated controls); C+M (100 mg/kg/day of Metformin in drinking water); F (10 % of Fructose in drinking water); and F+M (Fructose+Metformin in drinking water). After three weeks of all treatments blood samples were taken, after which animals were sacrificed by cervical dislocation under anaesthesia. Femurs were then dissected for evaluation of metaphyseal micro-architecture after Haematoxylin-Eosin staining of 5 μ m histological slices of decalcified bone. In particular, osteocytic density and relative trabecular volume were determined. An increase in serum glucose and triglycerides was observed in Fructose-treated rats, in accordance with the development of MS. In rats treated with Metformin alone (group C+M), the analysis of femoral metaphyses showed an increase in trabecular osteocytic density (118 % of control [group C], $p < 0.05$). Treatment with Fructose alone (group F) significantly decreased osteocytic density (79 % of control, $p < 0.05$), while co-treatment with Fructose and Metformin partially reverted this decrease (group F+M, 88 % of control). Similarly, the relative trabecular volume of femoral metaphysis was increased by treatment with Metformin alone (129% of control), was reduced in Fructose-treated rats (89 % of control), and tended to revert back to control values after Fructose-Metformin co-treatment (94 % of control). These results show for the first time that (a) Fructose-induced MS in rats alters their femoral metaphysis micro-architecture; and that (b) these deleterious effects can be partially prevented by orally administered Metformin. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 193-199, 2011**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: metabolic syndrome, bone micro-architecture, metformin

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Metabólico (SM) es una entidad heterogénea y multifactorial que se asocia a riesgo cardiovascular aumentado. Los hallazgos clínicos más comúnmente observados en pacientes con SM incluyen: resistencia insulínica, dislipemia (particularmente hipertrigliceridemia y niveles bajos de HDL), obesidad central, hipertensión, tolerancia a la glucosa alterada o diabetes mellitus y altas tasas de enfermedad aterosclerótica⁽¹⁾.

El SM afecta aproximadamente al 25 % de los adultos en Latinoamérica (rango: 18,8 – 43,3 % dependiendo del país)⁽²⁾. Valores de prevalencia similares se encuentran en Estados Unidos e incluso se reportan mayores índices en varios grupos étnicos en otras partes del mundo⁽³⁾. Actualmente su prevalencia continúa aumentando, probablemente como resultado del incremento de la obesidad^(4,5).

Se han realizado numerosos estudios para estudiar los posibles efectos del SM sobre el tejido óseo y su metabolismo. La mayoría de los estudios recientes ha encontrado que en humanos, el desarrollo del síndrome metabólico se asocia con un mayor grado de osteopenia y osteoporosis así como con un incremento significativo en la incidencia de fracturas osteoporóticas no vertebrales⁽⁶⁻⁸⁾. Sin embargo los resultados pueden no ser concluyentes, ya que el grupo de Kinjo⁽⁹⁾ mostró que la densidad mineral ósea (BMD) del cuello femoral aumenta a medida que aumentan los componentes del SM.

La metformina es uno de los agentes más comúnmente usados en el tratamiento de estados

patológicos asociados a insulinoresistencia como son la Diabetes mellitus tipo 2 y el Síndrome Metabólico. Esta droga es una biguanida insulino-sensibilizante, que disminuye los niveles glucémicos sin afectar en forma directa la secreción de insulina⁽¹⁰⁾.

Recientemente hemos descrito que la metformina ejerce efectos osteogénicos directos sobre osteoblastos en cultivo, promoviendo su proliferación, diferenciación y mineralización⁽¹¹⁾. También encontramos que esta biguanida administrada por vía oral en ratas, promueve la diferenciación osteoblástica de células progenitoras de médula ósea e incrementa la reparación de lesiones óseas⁽¹²⁾.

En el presente estudio nos propusimos investigar los posibles efectos del síndrome metabólico inducido por fructosa sobre la microarquitectura ósea en ratas, bajo la hipótesis de que la mayor fragilidad de huesos largos observada en el SM podría deberse, en parte, a alteraciones en su microarquitectura metafisaria (a saber, disminución en el volumen relativo de hueso trabecular y/o alteraciones en su celularidad). También fue objetivo de este trabajo, evaluar la posible modulación de estos efectos por Metformina administrada en forma oral.

MATERIALES Y MÉTODOS

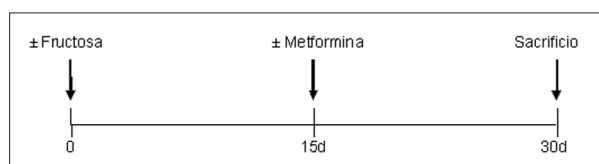
Animales y Tratamientos

Se utilizaron ratas Sprague – Dawley macho jóvenes (200 - 220 g) mantenidas en un bioterio climatizado (23°C) con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, alimentados con alimento balanceado es-

tándar y agua *ad libitum*. Todos los ensayos con animales fueron realizados de acuerdo a la Guía de Manejo y Uso de Animales de Laboratorio⁽¹³⁾, bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales – Disposición ANMAT 5330/97 – e internacionales. Asimismo, se tuvieron en cuenta las indicaciones de la guía del NIH para animales de experimentación (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>).

Los animales fueron divididos en cuatro grupos de 5 animales por grupo: Control (C), que recibieron agua *ad libitum*; Fructosa (F), que recibieron una solución de Fructosa (Biopack, Buenos Aires, Argentina) al 10 % en el agua de bebida⁽¹⁴⁾; Metformina (C+M), recibieron 100 mg/kg/día de Metformina (Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina) en el agua de bebida y Fructosa + Metformina (F+M), que recibieron la combinación de ambos tratamientos.

El esquema de tratamiento seguido fue el siguiente:



Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia.

Se eligieron estos tiempos de tratamiento por dos motivos: (a) previamente hemos descrito que la administración oral de Metformina a ratas Sprague Dawley durante dos semanas, induce cambios significativos en parámetros osteogénicos "in vivo" y "ex vivo"; y (b) luego de este período de tratamiento de ratas Sprague Dawley jóvenes con fructosa 10 % en el agua de bebida, otros autores han encontrado que desarrollan hipertensión, hipertrigliceridemia e intolerancia a la glucosa^(14, 15).

Parámetros sanguíneos

Previo al sacrificio, se extrajo sangre sin someter a los animales a ayuno, por punción cardíaca, y se separó el suero por centrifugación. La glucosa, los triglicéridos y el colesterol séricos se midieron con equipos comerciales (Wiener-Lab, Argentina).

Obtención de las muestras para histomorfometría de hueso

Se disecaron los fémures de cada rata para analizar la microarquitectura metafisaria. Los huesos se fijaron en formalina neutra tamponada (NBF)

durante 72 h y luego se descalcificaron en sucesivos lavados de una solución de EDTA (Biopack, Buenos Aires, Argentina) 10 %, pH = 7,0. Las muestras fueron incluidas en parafina y se hicieron cortes de 5µm de espesor con un micrótopo Leica SM 2000 R. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina – Eosina (H-E) y se tomaron fotos con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 en un microscopio Nikon Eclipse E400. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej/>) utilizando un plugin para incorporar una escala micrométrica⁽¹²⁾.

Histomorfometría ósea

Para las imágenes fotográficas de cortes teñidos con H-E y obtenidos de las diferentes condiciones experimentales, se determinó el volumen relativo de hueso trabecular en la metafisis femoral, definido como:

$$\% \text{Hueso Trabecular} = \frac{\text{Área Trabecular}}{\text{Área Total}} \times 100$$

donde Área total corresponde a la superficie total de la fotografía, es decir la suma de hueso trabecular más cavidades con médula ósea.

Se calculó también la densidad osteocítica contando el número de osteocitos por unidad de área de hueso trabecular.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media ± SEM. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por el test de ANOVA (one-way) usando el test de Tukey como posttest. Se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

La dieta rica en fructosa produce un estado metabólico compatible con el SM y estos hallazgos son prevenidos parcialmente por metformina

La Tabla I muestra los resultados de los parámetros sanguíneos posprandiales (glucemia, trigliceridemia, colesterolemia) de los cuatro grupos de ratas.

Los valores de glucemia muestran una elevación de este parámetro en el grupo de ratas tratados con fructosa (20 % mayor que el grupo control). El valor registrado en el grupo que recibió el tratamiento con fructosa y con metformina

muestra una normalización de la glucemia luego de 2 semanas con la droga (sin diferencia significativa con respecto a los animales controles). El grupo que solo recibió metformina tampoco mostró cambios en los valores de este parámetro, lo cual concuerda con la acción normoglucemiante de este fármaco.

Los triglicéridos plasmáticos también mostraron un aumento marcado en el grupo de ratas que recibieron la dieta rica en fructosa (217 % del control). Este efecto fue prevenido parcialmente por la metformina (185 % del control, 85 % del grupo tratado con fructosa).

No se observaron diferencias significativas en los valores de colesterol en sangre.

El análisis de la microarquitectura ósea muestra una disminución de la cantidad y la calidad ósea

La Tabla II muestra los resultados obtenidos en el análisis del volumen trabecular relativo en las metafisis femorales. Se observa una disminución en el porcentaje de hueso trabecular en las ratas tratadas con fructosa (reducción de un 11 %

respecto del control), efecto que es parcialmente prevenido por el cotratamiento con metformina. Por otro lado, en los animales sin fructosa en el agua de bebida, el tratamiento con metformina indujo un aumento significativo respecto del control (30 %) en el porcentaje de hueso trabecular.

La Figura 1 muestra los valores obtenidos para la densidad osteocítica del hueso trabecular metafisario. Se observa un comportamiento similar al observado para el porcentaje de hueso trabecular, registrándose un menor número de Osteocitos por unidad de área para el grupo de ratas que recibió la dieta rica en fructosa, hecho que es prevenido por la administración por vía oral de Metformina. Además, la administración de Metformina sola (sin fructosa) induce un incremento en la densidad osteocítica respecto del control.

DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado que la alimentación de ratas con una dieta con un alto contenido de hidratos de carbono y particularmente de fructosa (DRF) induce un estado compatible con el Síndrome Metabólico, mostrando hipertensión, dislipemia, hiperinsulinemia y tolerancia a la glucosa alterada⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Coincidentemente, los resultados obtenidos en este ensayo muestran hiperglicemia e hipertrigliceridemia posprandiales en las ratas alimentadas con una DRF, lo que muestra una condición metabólica alterada compatible con el Síndrome Metabólico. Adicionalmente, encontramos que el cotratamiento con metformina previene total o parcialmente estas alteraciones.

Varios trabajos clínicos reportan que alteraciones metabólicas como la Diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, así como el Síndrome metabólico, se asocian con alteraciones óseas que vuelven al paciente más propenso a fracturas⁽⁶⁻⁸⁾. En el presente trabajo encontramos que la generación de Síndrome Metabólico induce una disminución del porcentaje de hueso trabecular, que podría relacionarse con una menor densidad ósea trabecular. Más aun, encontramos una disminución en la densidad osteocítica, lo cual a largo plazo podría favorecer la acumulación de microdaños en el hueso, dado el papel que cumplen los osteocitos en el mantenimiento de la integridad de su microentorno óseo. Si nuestros resultados actuales en un modelo animal de Síndrome Metabólico pudieran extrapolarse a una situación clínica, estarían indicando un nexo entre dicho síndrome y una mayor fragilidad ósea.

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

Grupo	Glucemia (mg/dL)	Trigliceridemia (mg/dL)	Colesterolemia (mg/dL)
Control	172.0 ± 6.2	65.0 ± 3.8	45.0 ± 1.6
Fructosa	207.3 ± 5.9 ^{a, b}	141.0 ± 6.6 ^{a, b}	50.2 ± 2.0
Control + Metformina	168.7 ± 6.6	56.3 ± 3.5	47.3 ± 0.9
Fructosa + Metformina	190.6 ± 7.5	120.0 ± 7.4 ^{a, b}	45.6 ± 2.2

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

^ap < 0.05 vs. Control

^bp < 0.05 vs. Control + Metformina

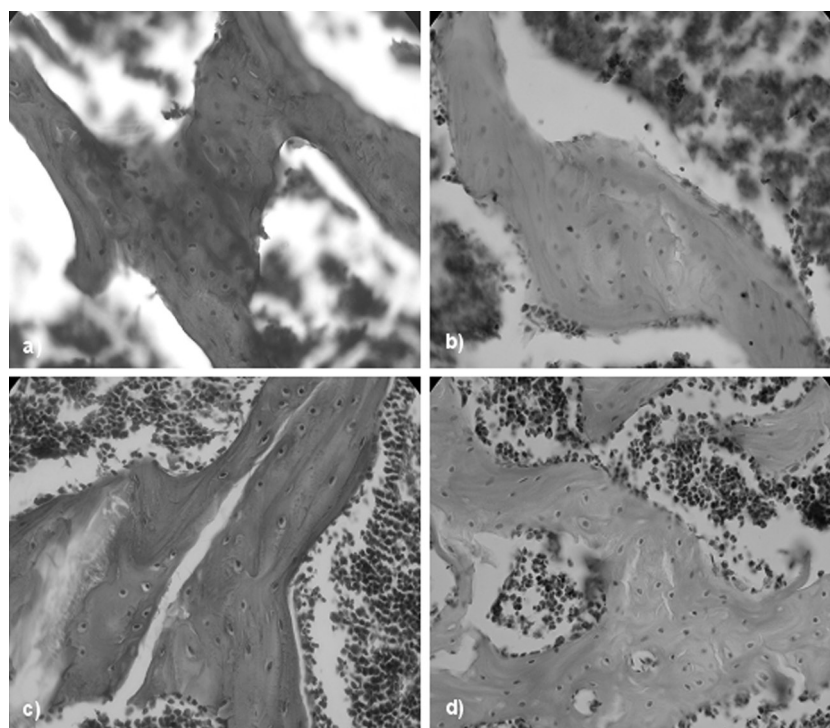
TABLA II. Análisis histomorfométrico - Porcentaje de Hueso Trabecular

Grupo	%Hueso Trabecular (respecto al control)
Control	100 ± 4
Fructosa	89 ± 3 ^{a, b}
Control + Metformina	129 ± 5 ^a
Fructosa + Metformina	94 ± 2

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

^ap < 0.05 vs. Control

^bp < 0.05 vs. Control + Metformina



e)	Control	$100 \pm 3,1^c$
	Fructosa	$79 \pm 2,2^{a,b,c}$
	Control + Metformina	$118 \pm 5,0^a$
	Fructosa + Metformina	$88 \pm 3,6^a$

Figura 1. Densidad Osteocítica. a) - d) Fotos representativas de preparados histológicos de hueso trabecular de la metáfisis femoral de ratas de los diferentes grupos experimentales: Control (a), Fructosa (b), Control + Metformina (c), Fructosa + Metformina (d). Tinción con hematoxilina – eosina, 400X. e) Tabla con la cuantificación de la densidad osteocítica. Los valores se expresan como la media \pm SEM de las determinaciones. a $p < 0.05$ vs. Control, b $p < 0.05$ vs. Control + Metformina, c $p < 0.05$ vs. Fructosa + Metformina.

Actualmente se acepta que el estrés oxidativo podría jugar un papel importante en la patofisiología del Síndrome Metabólico. La hiperglucemia promueve el estrés oxidativo y la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)⁽¹⁷⁾. La acumulación excesiva de triglicéridos induce la generación de radicales libres y favorece daños oxidativos en el tejido adiposo⁽¹⁸⁾. Este estado de mayor producción de especies oxidantes, se halla acompañado por una disminución de los niveles de sustancias antioxidantes (retinil ésteres, vitamina C, vitamina E y varios carotenoides)⁽¹⁹⁻²¹⁾.

La metformina previene la formación de especies reactivas del oxígeno, evitando así las alteraciones ocasionadas por el estrés oxidativo

en varios tejidos y tipos celulares incluyendo los osteoblastos⁽²²⁻²⁴⁾, por mecanismos aún no totalmente dilucidados. Por otro lado, nosotros hemos descubierto que la metformina ejerce efectos osteogénicos directos, tanto "in vitro" como "in vivo"^(11,12). Junto con otros autores, hemos encontrado además que la metformina ejerce su acción sobre osteoblastos por medio de diversas vías de transducción de señales, tales como un incremento en la expresión y redistribución subcelular de iNOS, un aumento en la activación de ERK 1-2 y de AMPK, y una consecuente mayor expresión del factor de transcripción osteogénico Cbfa1/Runx-2^(12,25-27). En particular, Jang y colaboradores han demostrado mediante una serie de experimentos

elegantes, que la metformina puede estimular la diferenciación de osteoblastos MC3T3E1 en cultivo por medio de la transactivación de Runx-2, vía la cascada regulatoria AMPK/USF-1/SHP⁽²⁷⁾.

Así, la metformina puede ejercer un efecto directo sobre las células óseas, o podría actuar indirectamente sobre ellas al normalizar los niveles de glucemia y/o trigliceridemia, lo cual generaría una menor producción de especies reactivas del oxígeno y evitaría así las alteraciones producidas por este hecho. En el presente trabajo, hemos encontrado que la administración oral de metformina es capaz de incrementar el volumen trabecular relativo y la densidad osteocítica en metáfisis femorales de ratas sin Síndrome Metabólico, así como de revertir los efectos deletéreos de una dieta rica en fructosa sobre dichos parámetros óseos.

Los productos de glicación avanzada (AGEs) se forman por reacciones de glicosilación no enzimática entre grupos amino de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, con azúcares reductores o intermediarios carbonílicos. Estas reacciones ocurren aceleradamente en situaciones como la diabetes descompensada, el síndrome metabólico y durante el envejecimiento fisiológico. Las proteínas de vida media larga como el colágeno tipo I, principal componente de la matriz extracelular del tejido óseo, son blancos para la formación de AGEs. Ésto puede producir entrecruzamientos patológicos en el colágeno glicosilado, produciendo una pérdida en la flexibilidad y elasticidad del hueso, causando un aumento en la fragilidad del tejido^(28,29). Nuestro grupo ha demostrado previamente que los AGEs ejercen efectos nocivos directos sobre la proliferación y diferenciación de osteoblastos en cultivo y que estos efectos pueden ser prevenidos por co-incubación con metformina⁽²²⁾.

Así, en nuestro presente modelo in vivo, la metformina podría estar previniendo los efectos deletéreos sobre el hueso de la dieta rica en fructosa por múltiples mecanismos. Actualmente estamos diseñando enfoques experimentales adicionales que nos permitan esclarecer cuáles de dichos mecanismos son relevantes en nuestro modelo, con el objetivo de poder contribuir a la optimización de estrategias de tratamiento de posible aplicabilidad clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Miranda, P. J.; DeFronzo, R. A.; Califf, R. M. y Guyton, J. R.** Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J* 149: 33-45,2005.
2. **Márquez-Sandoval, F.; Macedo-Ojeda, G.; Viramontes-Hörner, D.; Ballart, J. F.; Salvadó, J. S. y Vizmanos, B.** The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr* 1-12,2011.
3. **Ford, E. S.; Giles, W. H. y Dietz, W. H.** Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey *JAMA* 287:356-359,2002.
4. **James, W. P. T.** The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med*, 263:336-352,2008.
5. **Naser, K. A.; Gruber, A. y Thomson, G. A.** The emerging pandemic of obesity and diabetes: are we doing enough to prevent a disaster? *Int J Clin Pract* 60:1093-1097,2006.
6. **von Muhlen, D.; Safii, S.; Jassal, S. K.; Svartberg, J. y Barrett-Connor, E.** Associations between the metabolic syndrome and bone health in older men and women: the Rancho Bernardo Study. *Osteoporos Int* 18:1337-1344,2007.
7. **Hwang, D.-K. y Choi, H.-J.** The relationship between low bone mass and metabolic syndrome in Korean women. *Osteoporos Int* 21:425-431,2010.
8. **Jeon, Y. K.; Lee, J. G.; Kim, S. S.; Kim, B. H.; Kim, S.-J.; Kim, Y. K. y Kim, I. J.** Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. *Endocr J*, 58:87-93,2011.
9. **Kinjo, M.; Setoguchi, S. y Solomon, D. H.** Bone mineral density in adults with the metabolic syndrome: analysis in a population-based U.S. sample. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4161-4164,2007.
10. **Strack, T.** Metformin: a review. *Drugs Today (Barc)*, 44:303-314,2008.
11. **Cortizo, A. M.; Sedlinsky, C.; McCarthy, A. D.; Blanco, A. y Schurman, L.** Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol* 536:38-46,2006.
12. **Molinuevo, M. S.; Schurman, L.; McCarthy, A. D.; Cortizo, A. M.; Tolosa, M. J.; Gangoiti, M. V.; Arnol, V. y Sedlinsky, C.** Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res* 25:211-221,2010.
13. Guidelines on the handling and training of laboratory animals. In: *The Biological Council of Animal Research and Welfare Panel*. Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992.
14. **Peredo, H. A.; Mayer, M. A.; Rodríguez Fermepeín, M.; Grinspon, D. y Puyó, A. M.** Oral treatment and in vitro incubation with fructose modify vascular prostanoid production in the rat. *Auton Autacoid Pharmacol* 26:15-20,2006.
15. **Bezerra, R. M.; Ueno, M.; Silva, M. S.; Tavares, D. Q.; Carvalho, C. R. y Saad, M. J. A.** A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr* 130: 1531-1535,2000.
16. **Maiztegui, B.; Borelli, M. I.; Raschia, M. A.; Zotto, H. D. y Gagliardino, J. J.** Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-

- cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol*, 200, 139-149, 2009.
17. **Alhaidar, A. A.; Korashy, H. M.; Sayed-Ahmed, M. M.; Mobark, M.; Kfoury, H. y Mansour, M. A.** Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chem Biol Interact*, Epub ahead of print, 2011.
 18. **Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M. y Shimomura, I.** Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-1761,2004.
 19. **Ford, E. S.; Mokdad, A. H.; Giles, W. H. y Brown, D. W.** The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 52:2346-2352,2003.
 20. **Palmieri, V. O.; Grattagliano, I.; Portincasa, P. y Palasciano, G.** Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 136: 3022-3026,2006.
 21. **Lee, Y.; Kim, M.; Choi, K.; Kim, J.; Bae, W.; Kim, S. y Sohn, C.** Relationship between inflammation biomarkers, antioxidant vitamins, and bone mineral density in patients with metabolic syndrome. *Nutr Res Pract* 5:150-156,2011.
 22. **Schurman, L.; McCarthy, A. D.; Sedlinsky, C.; Gangoiiti, M. V.; Arnol, V.; Bruzzone, L. y Cortizo, A. M.** Metformin reverts deleterious effects of advanced glycation end-products (AGEs) on osteoblastic cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116:333-340,2008.
 23. **Erejuwa, O. O.; Sulaiman, S. A.; Wahab, M. S. A.; Salam, S. K. N.; Salleh, M. S. M. y Gurtu, S.** Comparison of antioxidant effects of honey, glibenclamide, metformin, and their combinations in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci* 12:829-843,2011.
 24. **Sena CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernández R, Seica RM.** Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol* 163:424-37,2011.
 25. **Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T.** Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Comm*, 375:414-419,2008.
 26. **Shah M, Kola B, Bataveljic A, Arnett TR, Viollet B, Saxon L, Korbonsits M, Chenu C.** AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass. *Bone* 47:309-319,2010.
 27. **Jang WG, Kim EJ, Bae IH, Lee KN, Kim YD, Kim DK, Kim SH, Lee CH, Franceschi RT, Choi HS, Koh JT.** Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone* 48:885-893,2011.
 28. **McCarthy AD.** Glicosación, glicoxidación y estrés carbonílico: relevancia en las complicaciones vasculares de la Diabetes mellitus. *Rev Argent Endocrinol Metab* 37:141-163,2000.
 29. **Mikulíková, K.; Eckhardt, A.; Kunes, J.; Zicha, J. y Miksík, I.** Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Physiol Res* 57:89-94,2008.