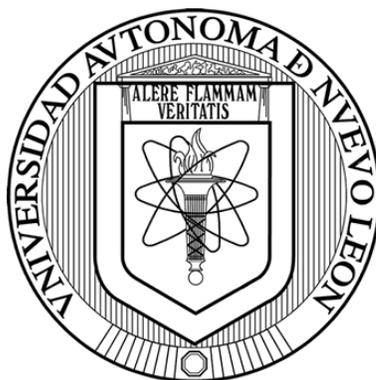


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE NANOCOMPLEJOS HÍBRIDOS DE HIDROXIAPATITA-CALCITONINA COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA OSTEOPOROSIS ASOCIADA A DIABETES MELLITUS TIPO 1**

**POR**

**Q.F.B. CRISTOPHER NOE MOTHE CÁNOVAS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**2024**

**EVALUACIÓN DE NANOCOMPLEJOS HÍBRIDOS DE HIDROXIAPATITA-CALCITONINA COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA OSTEOPOROSIS ASOCIADA A DIABETES MELLITUS TIPO 1**

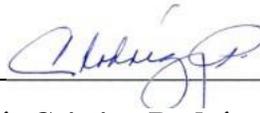
**Comité de Tesis**



---

**Dra. Diana Ginette Zárate Triviño**

**Presidente**



---

**Dra. María Cristina Rodríguez Padilla**

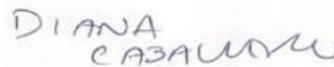
**Secretario**



---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**

**Vocal**



---

**Dr. Moisés Ármides Franco Molina**

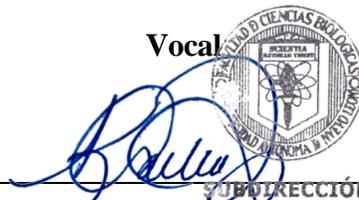
**Vocal**



---

**Dra. Diana Elia Caballero Hernández**

**Vocal**



---

**Dra. Katiushka Arevalo Niño**

**Subdirector de Posgrado**

**EVALUACIÓN DE NANOCOMPLEJOS HÍBRIDOS DE HIDROXIAPATITA-  
CALCITONINA COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA  
OSTEOPOROSIS ASOCIADA A DIABETES MELLITUS TIPO 1**

**Dirección de Tesis**



---

**Dra. Diana Ginette Zárate Triviño**

**Director de Tesis**



---

**Dr. Juan Miguel Jiménez Andrade**

**Asesor Externo**

## **AVISO DERECHOS DE AUTOR**

**DERECHOS RESERVADOS©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a el **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías** por la beca asignada con No. CVU: 1003076 durante el periodo de permanencia en el programa de maestría.

A mis padres, **Noe Mothe** y **Luz María Cánovas** por apoyarme incondicionalmente en cada decisión que he tomado y por su esfuerzo para forjar el ser humano que soy ahora. Gracias a mi familia por siempre confiar en mí, por brindarme su amor y apoyo incondicional. Los amo.

**Dra. Diana Zarate**, quiero agradecer infinitamente por la confianza incondicional, cariño brindado, dedicación, amistad; en especial por destacar habilidades en todos los aspectos que desconocía de mí. Usted consolidó aún más el profesionista que ahora soy. Muchas gracias por todo.

**Dr. Juan Miguel Jiménez**, quiero agradecer de manera especial por abrirme las puertas del laboratorio de farmacología, por el conocimiento invaluable, confianza y amistad que me brindaste durante mi estancia en el laboratorio.

**Dra. Arisáí Martínez**, agradezco de igual manera tu apoyo, confianza y amistad durante todos estos años.

**M.C. Jennifer Leos**, te agradezco por cada momento, palabra, consejo, corrección y amistad que me diste durante todo este tiempo de conocerte. Aprendí y desarrollé habilidades que me costaba manejar gracias a ti.

**M.C. Bruno Valades**, igualmente te agradezco tu amistad y cada enseñanza que me brindaste durante estos años. Valoraré muchísimo cada uno de los momentos que compartiste conmigo.

**M.C. Raúl Rangel**, me queda agradecerte los pocos y valiosos momentos que me compartiste. Me habría gustado que fueran más, pero gracias a ello aprendí que siempre hay que buscar más para conseguir más.

**Q.F.B. Jesús Verastegui**, amaré siempre cada recuerdo, apoyo y cariño que me entregaste durante 7 años. Me enseñaste a crecer y madurar como ser humano; sin mencionar que

sembraste el potencial que me ayudo a sobresalir profesionalmente. Estos logros profesionales y personales los compartiremos siempre con el corazón. Gracias por todo, te amo.

**Q.F.B.´s Angelica Hernández, Norma Chávez y Anahí Castro**, además de ser mis colegas, han sido mis amigas y tesoros de la vida más valiosos. Nunca terminaré de agradecer cada momento que compartimos por más de 7 años. Siempre e incondicionalmente las llevaré en el corazón.

**Q.F.B.´s Lizeth Gómez, Giovanni López y Eduardo Mendoza**, se ganaron mi confianza por el apoyo incondicional para culminar con éxito este proyecto, sin su ayuda parte de estos resultados no habrían sido encontrados.

**L.B.G´s Ada Leal y Carolina Palestino**, agradezco por su amistad y apoyo incondicional durante estos años en el posgrado. Espero enormemente seguir compartiendo momentos inigualables con ustedes en el futuro por venir.

**L.B.G´s Abril Velázquez, Fernanda Ochoa, Natanael Palacios**; de igual manera a los **Q.B.P.´s Denisse Campa, Mizael Rodríguez y Roberto González**, estos últimos años han sido de aprendizajes para fortalecer nuestro vinculo como amigos y colegas de maestría. Gracias por estar presentes en todo momento.

## DEDICATORIAS

*A mis padres. Este logro es un testimonio de su inmenso amor y dedicación. Valoro mucho las lecciones de vida que me han impartido y por el cariño que siempre me han brindado. Mi gratitud hacia ustedes es imposible de expresar completamente. Esta tesis es un tributo a su legado y a la eterna admiración que siento por ustedes.*

*Gracias por ser los mejores padres del mundo.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Diabetes Mellitus.....	3
2.2 Prevalencia de la diabetes mellitus.....	4
2.3 Diagnóstico de la diabetes mellitus .....	4
2.4 Inmunobiología de la diabetes mellitus .....	5
2.5 Complicaciones asociadas con la diabetes mellitus.....	8
2.6 Impacto económico para los pacientes con diabetes mellitus.....	8
2.7 Sistema Óseo .....	9
2.7.1 Tejido óseo y sus componentes.....	9
2.7.2 Remodelado óseo .....	10
2.8 Farmacoterapia actual para la osteoporosis .....	12
2.9 Sistema Nervioso.....	13
2.9.1 Sistema Nervioso Periférico .....	14
2.9.2 Sistema Nervioso Autónomo.....	14
2.9.3 Sistema Nervioso Somático.....	15
2.10 Nanotecnología: Ingeniería de tejidos .....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
6.1 Animales.....	20
6.2 Cultivo celular .....	21
6.3 Fármacos y reactivos .....	21
6.4 Síntesis de hidroxapatita (HAP) .....	22
6.5 Síntesis de nanocomplejos de hidroxapatita-calcitonina (NHCal) .....	22
6.6 Métodos de caracterización fisicoquímica.....	23
6.7 Ensayo de resazurina .....	24
6.8 Ensayo de tinción con rojo de alizarina.....	24
6.9 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	25
6.10 Inducción del modelo experimental de diabetes tipo 1.....	26

6.11 Curva de tolerancia oral a la glucosa.....	26
6.12 Obtención de tejidos.....	27
6.13 Análisis por microtomografía computacional.....	27
6.14 Inmunohistoquímica.....	28
6.15 Cuantificación de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas; infiltración de macrófagos y neovascularización.....	29
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
7.1 Caracterización fisicoquímica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina.....	31
7.2 Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la viabilidad celular relativa y proceso de mineralización ósea en células MG-63.....	33
7.3 Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63.....	35
7.4 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el peso corporal y niveles de glucosa plasmática en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina.....	37
7.5 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la respuesta a la tolerancia oral de glucosa en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina.....	38
7.6 Determinar el efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad y microarquitectura ósea en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.....	40
7.7 Determinar el efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas; infiltración de macrófagos y vascularización en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.....	41
7.7.1 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas sensoriales CGRP <sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.....	42
7.7.2 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas simpáticas TH <sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.....	43
7.7.3 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas PGP 9.5 <sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.....	45
7.7.4 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la infiltración de macrófagos CD68 <sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1....	46
7.7.5 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el proceso de vascularización en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.....	47
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>

**10. PERSPECTIVAS.....57**  
**11. BIBLIOGRAFÍA .....58**

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Criterios de diagnóstico de la diabetes mellitus.....	4
<b>Tabla 2.</b> Farmacoterapia actual para tratamiento de osteoporosis.....	12
<b>Tabla 3.</b> Caracterización física de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina.....	30

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Regulación del sistema inmune en condición normal y diabetes mellitus tipo 1 .....	5
<b>Figura 2.</b> Efecto del estrés en la función de las células $\beta$ pancreáticas e inmunogenicidad.....	8
<b>Figura 3.</b> Imagen representativa de la estructura interna del hueso .....	10
<b>Figura 4.</b> Células involucradas en el remodelado óseo.....	12
<b>Figura 5.</b> Influencia del desequilibrio celular en el sistema óseo .....	13
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental de inducción del modelo de diabetes tipo 1... ..	20
<b>Figura 7.</b> Caracterización química por espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier .....	32
<b>Figura 8.</b> Caracterización física por microscopía electrónica de barrido... ..	32
<b>Figura 9.</b> Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la viabilidad celular relativa y proceso de mineralización ósea en células MG-63 .....	34
<b>Figura 10.</b> Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en el proceso de mineralización ósea en células MG-63.....	35
<b>Figura 11.</b> Efecto de la administración de hidroxiapatita en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63.....	35
<b>Figura 12.</b> Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63 .....	36
<b>Figura 13.</b> Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el peso corporal y niveles de glucosa plasmática en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina.....	37
<b>Figura 14.</b> Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la respuesta a la tolerancia oral de glucosa en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina.....	39
<b>Figura 15.</b> La administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina disminuye la pérdida de hueso trabecular a nivel del cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.....	40
<b>Figura 16.</b> Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad y microarquitectura ósea en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1... ..	41
<b>Figura 17.</b> Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas sensoriales CGRP <sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1 .....	42
<b>Figura 18.</b> Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas simpáticas TH <sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1 .....	44
<b>Figura 19.</b> Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas PGP 9.5 <sup>+</sup> en cuello de femur de ratones hembra con DMT1... ..	45

**Figura 20.** Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la infiltración de macrófagos CD68<sup>+</sup> en cuello de femur de ratones hembra con DMT1... .....47

**Figura 21.** Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el proceso de vascularización en cuello de femur de ratones hembra con DMT1 .....48

## ABSTRACT

Type-1 diabetes is one of the most prevalent chronic diseases worldwide, principally characterized by chronic hyperglycemia, which results in painful peripheral neuropathy, bone deterioration and high risk of bone fractures. Recently, the development of nanoparticles has acquired great relevance to promote bone regeneration, because of their oral administration and easy functionalization with molecules can improve the effects of pharmaceutical drugs accelerating considerably the process of regeneration. Nanoparticles of hydroxyapatite-calcitonin was synthesized and evaluated as an alternative treatment. The capability to promote proliferation and mineralization was determined *in vitro* with MG-63 cells, meanwhile *in vivo*, the repair of bone microarchitecture was evaluated using a streptozotocin-induced diabetes mice model. *In vitro*, the administration of hydroxyapatite-calcitonin affected the cell viability, bone mineralization process and the expression of alkaline phosphatase, osteoprotegerin, osteocalcin and type 2/4 bone metaloproteins related to bone formation. *In vivo*, female BALB/c mice treated with hydroxyapatite-calcitonin nanoparticles (NHCa) showed a significant improvement for bone and innervation recovering. The densitometric analysis revealed significant increase of the bone volumen percentage, trabecular number and a considerable reduction of trabecular separation. Additionally, the histological evaluation showed an ameliorated sympathetic innervation, blood vessels formation and an increase of infiltrating macrophages compared to diabetic mice at the femoral neck. Therefore, these results confirm the utility of NHCa nanoparticles as potential combined treatment developed with low doses of hydroxyapatite and calcitonin for pathologic bone loss and bone denervation. In comparison with conventional treatments with high doses that chronically decrease their therapeutic effect.

## RESUMEN

La diabetes de tipo 1 es una de las enfermedades crónicas más prevalentes en todo el mundo, caracterizada principalmente por la hiperglucemia crónica, que se traduce en neuropatía periférica dolorosa, deterioro óseo y alto riesgo de fracturas óseas. Recientemente, el desarrollo de nanopartículas ha adquirido gran relevancia para promover la regeneración ósea, debido a que su administración oral y su alta capacidad de funcionalización con moléculas pueden mejorar los efectos de los fármacos acelerando considerablemente el proceso de regeneración. Se sintetizaron y evaluaron nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina como tratamiento alternativo. Se determinó su capacidad para promover la proliferación y mineralización *in vitro* con células MG-63, mientras que *in vivo* se evaluó la reparación de la microarquitectura ósea utilizando un modelo de ratón con diabetes inducida por estreptozotocina. *In vitro*, la administración de hidroxiapatita-calcitonina afectó a la viabilidad celular, al proceso de mineralización ósea y a la expresión de fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina y metaloproteínas óseas de tipo 2/4 relacionadas con la formación ósea. *In vivo*, los ratones BALB/c hembra tratados con nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina (NHCal) mostraron una mejora significativa de la recuperación ósea y de la inervación. El análisis densitométrico reveló un aumento significativo del porcentaje de volumen óseo, número de trabéculas y una reducción considerable de la separación trabecular. Además, la evaluación histológica mostró un incremento en la expresión de la inervación simpática, formación de vasos sanguíneos y número de macrófagos infiltrados en médula ósea en comparación con los ratones diabéticos. Por lo tanto, estos resultados confirman la utilidad de las nanopartículas de NHCal como potencial tratamiento combinado desarrollado con bajas dosis de hidroxiapatita y calcitonina para la pérdida ósea patológica y la denervación ósea. En comparación con los tratamientos convencionales con dosis elevadas que disminuyen crónicamente su efecto terapéutico.

# 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica prevalente en la sociedad mexicana, caracterizada por altos niveles plasmáticos de glucosa (hiperglucemia), como resultado de defectos en el funcionamiento del páncreas y la producción de insulina. En 2021, se estimó que 537 millones de personas a nivel mundial padecían algún tipo de diabetes y se espera que esta cifra incremente a 783 millones de personas para el 2045, de acuerdo con cifras reportadas por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

La DM se ha considerado uno de los problemas más alarmantes de salud pública debido a las numerosas complicaciones asociadas, tales como: retinopatía, nefropatía y complicaciones cardiovasculares. Adicionalmente se ha asociado la diabetes tipo 1 (DMT1) y 2 (DMT2) con cambios patológicos en el proceso de remodelado óseo que subsecuentemente incrementan el riesgo de fractura en pacientes con diabetes. Estudios clínicos recientes por Davila, *et al.* del Instituto Nacional de Endocrinología en Romania han demostrado que pacientes con DM presentan pérdida patológica de hueso trabecular en comparación con pacientes sin DM, por lo que estos hallazgos sugieren que existe un mayor riesgo de desarrollar osteoporosis en pacientes con DM generando una nueva rama de investigación. Debido a los múltiples factores patológicos y genéticos involucrados, el impacto económico del país es relativamente alto a causa de la prevalencia clínica, medicamentos y tratamientos de la misma enfermedad que reducen la esperanza y calidad de vida de los pacientes.

Se ha reportado que la DMT1 está altamente asociada con complicaciones neuronales como neuropatía periférica, que es una de las complicaciones más prevalentes a largo plazo en los pacientes. Estudios preclínicos en ratones con DM inducida con estreptozotocina han mostrado cambios en la inervación de tejidos periféricos como: piel, ganglio de la raíz dorsal, nervio ciático y mucosa gástrica donde se ha encontrado pérdida significativa de fibras nerviosas que expresan sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Aunque, también se ha reportado recientemente que la DM afecta del mismo modo la inervación simpática del tejido óseo.

En este contexto diferentes grupos científicos han estudiado la interacción existente entre diabetes y osteoporosis para comprender los mecanismos implicados en la progresión de ambas enfermedades; por lo que se han identificado señales que actúan como “mediadores maestros” que integran diferentes mecanismos moleculares a nivel celular. Sin embargo, el paradigma dominante sobre la pérdida patológica ósea como consecuencia de la diabetes mellitus aún prevalece y los enfoques terapéuticos actuales se visualizan de manera independiente sin considerar que podrían evaluarse en un modelo bimodal que refleje la interacción entre ambas condiciones.

A pesar de que existen múltiples grupos de fármacos para tratamiento de la osteoporosis, presentan limitaciones en la efectividad, duración del tratamiento, dosis y vías de administración de estos fármacos. Es por ello que el objetivo principal de este estudio es desarrollar y caracterizar nanocomplejos conjugados con hidroxapatita y calcitonina, como tratamiento alternativo, evaluar su capacidad óseo regenerativa en la línea celular MG-63 (línea celular de osteosarcoma humano) y finalmente determinar el efecto de la administración de los nanocomplejos en la densidad y microarquitectura ósea; así como la inervación de fibras nerviosas que expresan CGRP (marcador de fibras nerviosas sensoriales), TH (marcador de fibras nerviosas simpáticas posganglionares) y PGP 9.5, así como Endomucina (marcador de vasos sanguíneos) y macrófagos CD68 (marcador de células mieloides) en cuello femoral de ratón en un modelo bimodal diabético-osteoporótico altamente aceptado.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica prevalente caracterizada por altos niveles plasmáticos de glucosa (hiperglucemia), como resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina. Actualmente, la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud, han clasificado a la misma en las siguientes categorías (American Diabetes 2013, 2018):

- **Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1):** causada por destrucción autoinmune de las células  $\beta$ -pancreáticas disminuyendo drásticamente los niveles plasmáticos de insulina. Este tipo de diabetes representa del 5 al 10% de los pacientes con diabetes.
- **Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2):** se debe a una pérdida progresiva en la secreción de insulina, así como deficiencia en la acción de la insulina y obesidad en la mayoría de los pacientes. En comparación con la diabetes tipo 1, este tipo de diabetes representa del 90 al 95% de los pacientes.
- **Diabetes mellitus gestacional (DMG):** se caracteriza particularmente por manifestarse intolerancia a la glucosa con inicio o reconocimiento por primera vez durante el embarazo, independientemente de la resolución de la enfermedad con el parto.
- **Otros tipos de diabetes mellitus:** en este grupo de diabetes se incluyen defectos genéticos en la función de las células  $\beta$ -pancreáticas, insulina, enfermedades exocrinas pancreáticas (por ejemplo: pancreatitis, trauma/pancreatectomía, neoplasias, fibrosis quística, hemocromatosis, entre otras), enfermedades endocrinas pancreáticas (por ejemplo: acromegalia, síndrome de Cushing, glaucanoma, hipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma, entre otras), inducida por fármacos o drogas, infecciones (por ejemplo: citomegalovirus), formas no comunes de diabetes mediadas por respuesta inmune (por ejemplo: anticuerpos para receptor de insulina o síndrome de Stiff-man) dentro de las más prevalentes.

## 2.2 Prevalencia de la diabetes mellitus

Actualmente la incidencia de diabetes ha incrementado considerablemente a nivel mundial. En 2019, se estimó que 537 millones de personas entre 20 a 79 años padecían algún tipo de diabetes, se espera que esta cifra incremente a 783 millones de personas diagnosticadas con diabetes para el año 2045, presentando mayor prevalencia en mujeres que en hombres, de acuerdo con cifras reportadas (Sun H *et al.* 2022).

En México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) aproximadamente 15 millones de personas padecen diabetes en territorio nacional. Cabe mencionar que dentro de las entidades federativas con mayor prevalencia en incidencia clínica se encuentran los estados de Campeche, Tamaulipas, Hidalgo, Ciudad de México y Nuevo León.

## 2.3 Diagnóstico de la diabetes mellitus

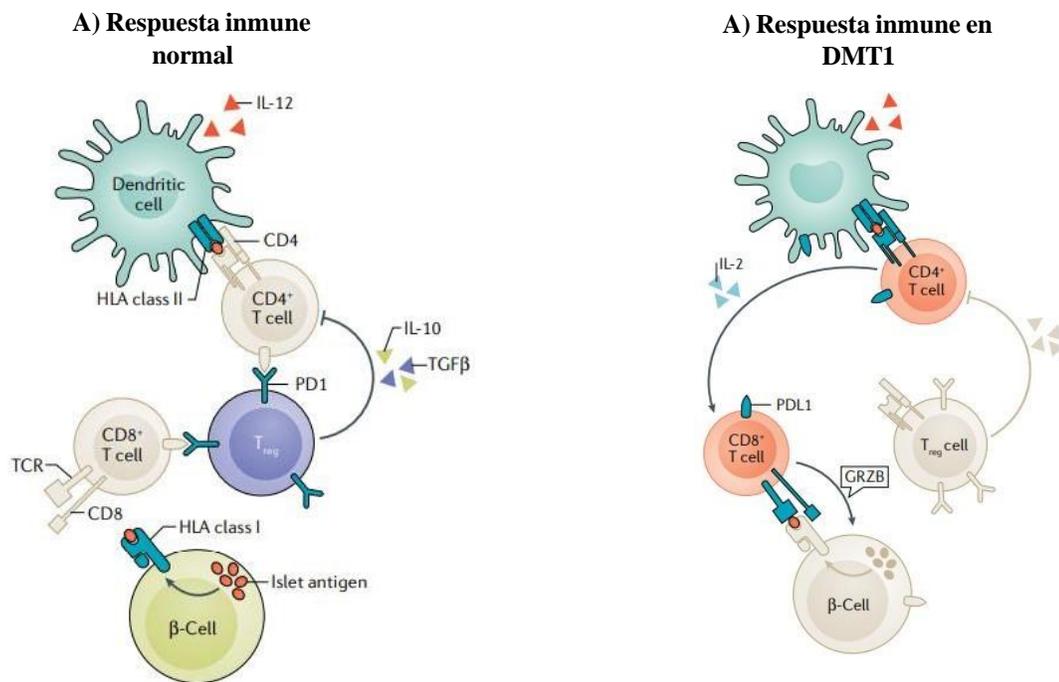
De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes, el diagnóstico se basa según los criterios de glucosa plasmática, glucosa en ayunas, valor de glucosa plasmática de 2 horas, prueba de tolerancia oral a la glucosa y hemoglobina glicosilada. Los valores de referencia para cada criterio de diagnóstico de la diabetes se enumeran a continuación en la siguiente tabla (American Diabetes 2013, 2018):

**Tabla 1. Criterios de diagnóstico de la diabetes mellitus.** Criterios de diagnóstico estandarizados para definir un estado de diabetes, intolerancia a la glucosa o glucosa alterada en ayuno de un paciente con base a una concentración plasmática de referencia.

Criterio diagnóstico	Valor de referencia	Diabetes	Intolerancia a la glucosa	Glucosa alterada en ayunas
Glucosa plasmática en ayunas	<100 mg/dl	≥126 mg/dl (7 mmol/l)	126 mg/dl	110-125 mg/dl
Prueba de tolerancia a la glucosa	<140 mg/dl	≥200 mg/dl (11.1 mmol/l)	140-200 mg/dl	140 mg/dl
Hemoglobina glicosilada HbA1c	<5.7%	≥6.5% (48 mmol/l)	No aplica	No aplica
Glucosa en plasma aleatoria	No aplica	200 mg/dl	No aplica	No aplica

## 2.4 Inmunobiología de la diabetes mellitus

Durante décadas se pensaba que la DMT1 era una enfermedad autoinmunitaria mediada únicamente por linfocitos T, actualmente se ha cuestionado que la DMT1 sea exclusivamente de células inmunitarias disfuncionales, dado que el mismo componente de células pancreáticas puede inducir una respuesta inmunológica que propicia el progreso de la enfermedad (Roep B *et al.* 2020). Sin embargo, se ha propuesto que los factores ambientales y genéticos también influyen en el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 1. Regulación del sistema inmune en condición normal y diabetes mellitus tipo 1.** Adaptada de Roep, 2021.

Durante el desarrollo de la DMT1 se ha reconocido la participación de los autoanticuerpos contra la insulina, glutamato descarboxilasa, antígeno de insulinoma 2 o el transportador de zinc 8 como predictores de la tolerancia inmunológica (es decir, inducción de autoinmunidad) y manifestación clínica (Bloem y Roep, 2017).

A medida que progresa la enfermedad, las células inmunitarias se infiltran en el páncreas creando un microambiente inflamatorio como resultado de la interacción de los antígenos de las células pancreáticas presentados por las moléculas HLA (complejo mayor de histocompatibilidad de clase I) con las células del sistema inmune (Bloem y Roep, 2017). La presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ autorreactivos específicos de los islotes, sangre periférica, ganglios linfáticos y lesiones insulínicas, son las células responsables de la respuesta inmune dirigida contra las autoproteínas de las células productoras de insulina, esto acompañado del aumento en la frecuencia de células T de memoria CD8+ residentes en páncreas de pacientes con DMT1 en comparación con pacientes control (Coppieters *et al.* 2012).

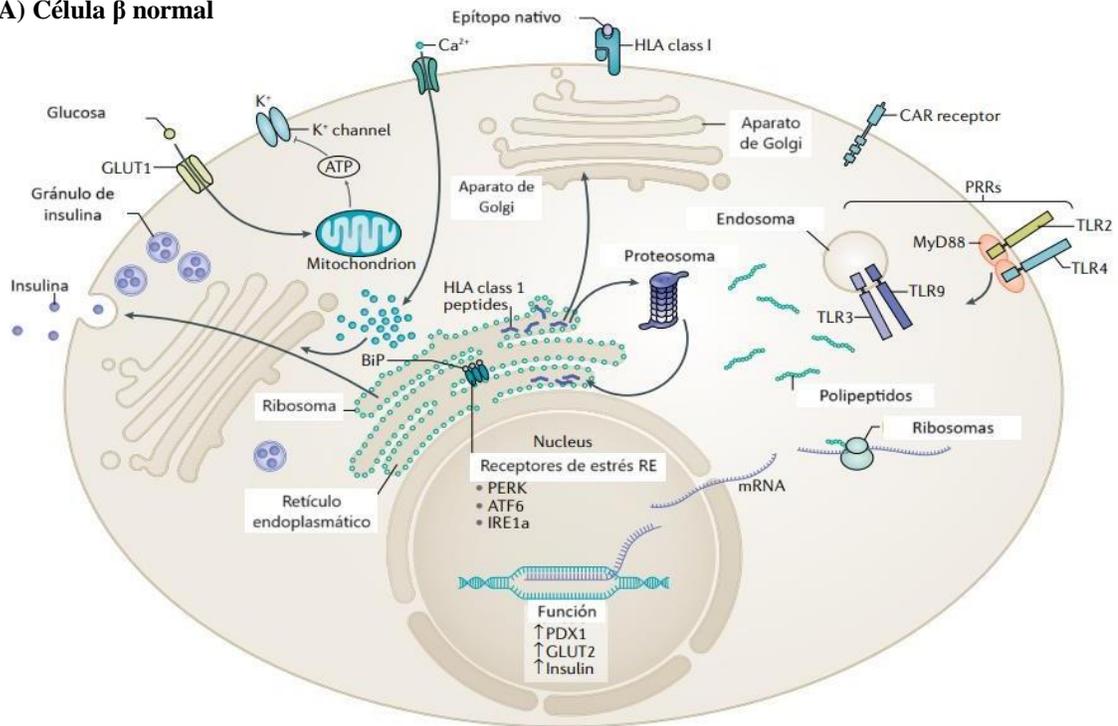
Distintivamente, las poblaciones celulares con mayor presencia para el progreso de la enfermedad autoinmune DMT1 son las células T CD8+, que subsecuentemente abarca macrófagos (CD68+), CD4+, linfocitos B (CD20+) y células plasmáticas (CD138+) (Imagawa *et al.* 1999). La señalización celular característica de esta respuesta inmune inicia con la activación de la célula dendrítica que ha sido estimulada por la interleucina 12 (IL-12) para presentar el antígeno al linfocito T CD4+, que seguidamente secreta IL-2 al linfocito T CD8+ para producir citotoxicidad en las células beta pancreáticas mediando este proceso por granzima B para su destrucción (Roep B *et al.* 2020).

Además de la función citoprotectora mediada por insulina, se ha identificado que la activación de sensores de estrés del retículo endoplásmico conduce a una cascada de señalización que promueven la apoptosis directa mediante la activación de la vía IRF-STAT1, TNRF1-RIP1 que se han asociado en procesos de necroptosis y necrosis mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, así como la inducción de senescencia celular en las células pancreáticas mediada por estrés mitocondrial de la célula (Li *et al.* 2019; Moore *et al.* 2011).

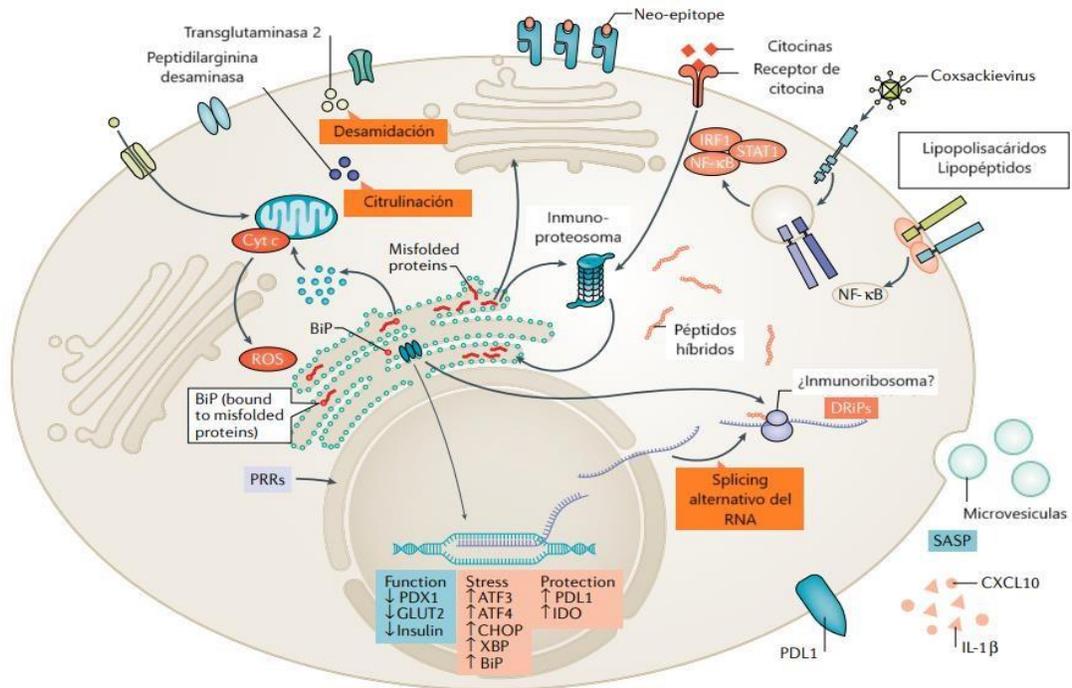
Las citocinas involucradas en el entorno fisiopatológico conducen a cambios genéticos que por consiguiente afectan la síntesis de los productos proteicos de las vías STAT1, IRF1 y NF-KB impulsando la sobreexpresión de HLA clase I y receptores inhibitorios de membrana de la célula como PDL-1 (Roep B *et al.* 2020). Durante el estrés celular comienza la absorción de calcio por acción de las mitocondrias para la liberación de

factores proapoptóticos como especies reactivas de oxígeno (ROS) y citocromo C (cyt c), adicionalmente, la pérdida de calcio en el retículo endoplásmico propicia la activación de enzimas dependientes de calcio involucradas en los procesos de modificación postraduccional al inducir desamidación y citrulinación de proteínas. En respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas dentro del retículo endoplásmico inicia la activación de sensores PERK (vía encargada de atenuar la traducción de ARNm), IRE1a y ATF6 expresados en la membrana del retículo endoplásmico, donde IRE1a y ATF6 activan la vía de degradación de proteínas acumuladas y la transcripción de genes que codifican para enzimas de degradación con el fin de restaurar la homeostasis de la célula (Li *et al.* 2019).

**A) Célula β normal**



**A) Célula β bajo “estrés”**



**Figura 2. Efecto del estrés en la función de las células  $\beta$  pancreáticas e inmunogenicidad.** Adaptada de Roep, 2021.

## 2.5 Complicaciones asociadas con la diabetes mellitus

Las complicaciones crónicas son muy diversas y se clasifican en macrovasculares y microvasculares (Tesfaye y Selvarajh, 2012). Las complicaciones macrovasculares afectan a los vasos de mayor calibre, es decir las arterias, lo que favorece el desarrollo de otras patologías como la enfermedad cardíaca coronaria, la enfermedad vascular periférica y la enfermedad cardiovascular. Por su parte, las complicaciones microvasculares afectan vasos de menor calibre, es decir arteriolas y capilares, y pueden afectar distintos órganos y sistemas como el riñón, la retina, el sistema nervioso y el sistema óseo (Lettgen et al. 1995; Neumann et al. 2016).

## 2.6 Impacto económico para los pacientes con diabetes mellitus

De acuerdo con las estimaciones de costos directos globales por gastos de salud, medicamentos y tratamiento de para diabetes se calcularon 966,000 millones de USD (aproximadamente 19,627,439 pesos mexicanos en M.N.) para 2021 y se estima que

aumente a 1,054,000 millones de USD para 2045 (Sun H *et al.* 2022). Debido a los múltiples factores involucrados el impacto económico que sufren los sistemas de salud es relativamente alto ya que el pronóstico de vida de un paciente disminuye con el progreso de la enfermedad y en un intento por resolver esta problemática se invierte en medicamentos y tratamientos para mejorar la esperanza y calidad de vida (Dempster 2011).

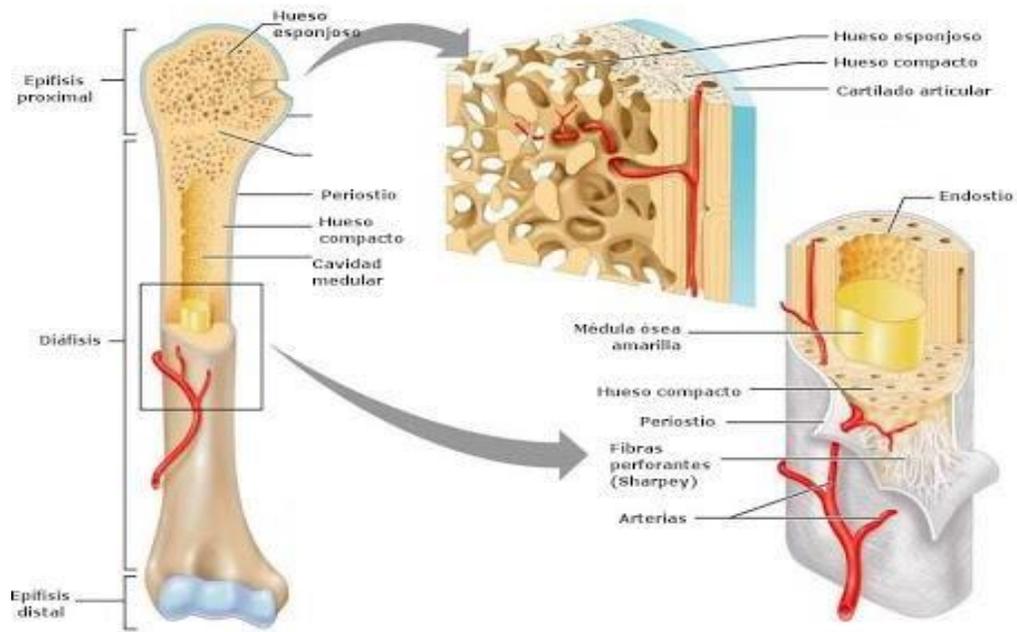
## **2.7 Sistema Óseo**

El sistema óseo brinda soporte estructural para el resto del cuerpo humano, permite el movimiento y la locomoción al proporcionar flexibilidad para los músculos, protegen los órganos y estructuras internos vitales, brindan mantenimiento de la homeostasis mineral y el equilibrio ácido-base, sirven como reservorio de crecimiento de factores y citocinas, y proporcionan el entorno para la hematopoyesis dentro de los espacios medulares (Clarke 2008).

### **2.7.1 Tejido óseo y sus componentes**

Los huesos largos están compuestos por un eje hueco o diáfisis; metáfisis acampanadas en forma de cono debajo de las placas de crecimiento; y epífisis redondeadas por encima de las placas de crecimiento. La diáfisis se compone principalmente de hueso cortical denso, mientras que la metáfisis y la epífisis se componen de hueso de malla trabecular rodeado por una capa relativamente delgada de hueso cortical denso (Clarke 2008). El esqueleto humano adulto está compuesto por un 80% de hueso cortical (rodea el espacio de la médula) y un 20% de hueso trabecular (compuesto por una red en forma de panal de placas y varillas trabeculares intercaladas) en general (Revell 1994).

El hueso cortical posee una superficie perióstica externa (vainas de tejido conectivo fibroso que contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas, osteoblastos y osteoclastos.) y una superficie endóstica interna (estructura membranosa que cubre la superficie interna del hueso cortical, el hueso trabecular y los canales de los vasos sanguíneos). La actividad de la superficie perióstica es importante para el crecimiento óseo y reparación de fracturas (Clarke 2008).



**Figura 3. Imagen representativa de la estructura interna del hueso.** Adaptada de Gómez Sáez, 2014.

### 2.7.2 Remodelado óseo

El hueso experimenta diferentes procesos dinámicos (crecimiento, modelado y remodelado óseo) durante el transcurso de la vida. El modelado es el proceso por el cual el tejido óseo cambia su forma general en respuesta a influencias fisiológicas o fuerza mecánica. Por otra parte, el remodelado óseo es el proceso mediante el cual se renueva el hueso para mantener la fuerza ósea y homeostasis mineral (Clarke 2008). Para lograr una remodelación ósea fisiológicamente normal se requiere de la comunicación directa entre diferentes células óseas (osteoblastos y osteoclastos) (Siddiqui *et al.* 2016). Los osteoblastos se originan a partir de células madre mesenquimales en el estroma de la médula ósea y son responsables de la síntesis de la matriz ósea y su posterior mineralización. Por otro lado, los osteoclastos son células gigantes multinucleadas originadas a partir de la fusión de progenitores mononucleares del monocito/macrófago (Clarke 2008; Siddiqui *et al.* 2016). El ciclo de remodelación se compone de cuatro fases secuenciales (fase de activación, fase de reabsorción, fase de inversión y fase de terminación) (Clarke 2008; Siddiqui *et al.* 2016).

La fase de activación implica la detección de una señal de remodelación iniciadora, por ejemplo, tensión mecánica directa que da como resultado daño estructural o acción

hormonal (p. ej. PTH, IGF-1, IL-1, PGE2, TNF- $\alpha$ , calcitriol o estrógeno) sobre las células óseas (Siddiqui *et al.* 2016; Raggatt *et al.* 2010).

Durante la fase de reabsorción los osteoblastos responden a señales generadas por osteocitos y reclutan precursores de osteoclastos en el sitio de remodelación. Se ha ido aclarando gradualmente que M-CSF es esencial en la diferenciación, supervivencia y apoptosis de preosteoclastos y que RANKL promueve la formación de osteoclastos maduros y fosas de resorción ósea al unirse a RANK; OPG bloquea esta interacción. Además, la interacción de RANKL-RANK contribuye a la activación de diferentes vías de señalización involucradas, como las vías NF- $\kappa$ B, MAPK y AKT (Meng *et al.* 2020).

La proliferación y supervivencia de los precursores de los osteoclastos es modulada por el CSF-1, que además dirige la propagación, motilidad y organización del citoesqueleto en las células maduras. Así mismo RANKL también promueve la proliferación de precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros y promueve la actividad de reabsorción (Raggatt *et al.* 2010). Durante esta fase las MMP son secretadas en respuesta a señales de remodelación mediadas por osteoclastos y osteoblastos, las cuales se encargan de degradar el osteoide no mineralizado que recubre la superficie del hueso, posteriormente se crea un microambiente aislado debajo de los osteoclastos conocido como “zona sellada”. Los iones de hidrógeno se bombean a la zona sellada y la disolución de la matriz mineralizada se produce en este espacio ácido, lo que produce lagunas de reabsorción de Howship (Raggatt *et al.* 2010; Nandiraju *et al.* 2019).

En la fase de inversión, las lagunas de Howship permanecen cubiertas con una matriz de colágeno desmineralizado no digerido. Una célula mononuclear de linaje indeterminado elimina estos restos de colágeno y prepara la superficie mineral para la posterior formación ósea mediada por osteoblastos (Raggatt *et al.* 2010; Nandiraju *et al.* 2019).

Por último, en la fase de terminación, cuando se ha reemplazado una cantidad igual de hueso reabsorbido, concluye el ciclo de remodelación ósea. Sin embargo, las señales de terminación que informan a la maquinaria de remodelación para que deje de funcionar son en gran parte desconocidas, aunque está surgiendo un posible papel para los osteocitos (Raggatt *et al.* 2010; Nandiraju *et al.* 2019).

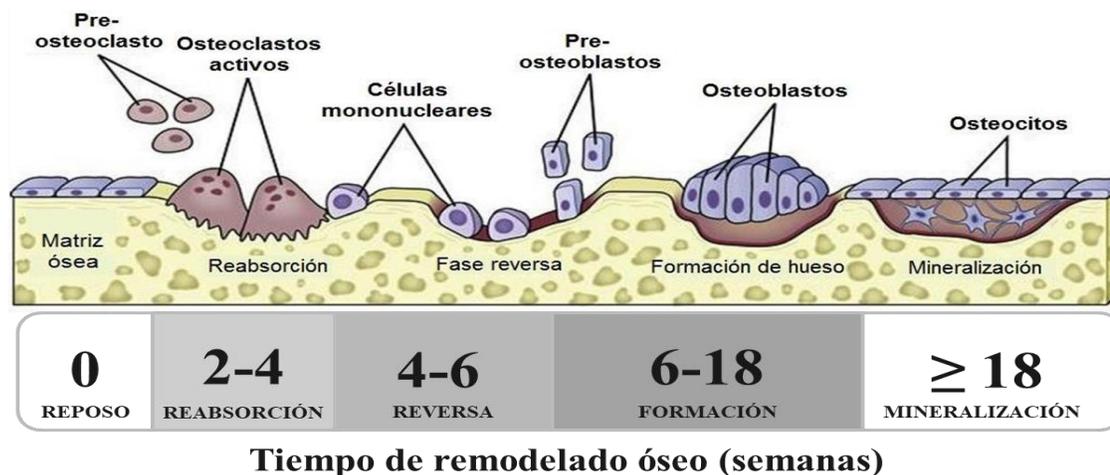


Figura 4. Células involucradas en el remodelado óseo. Adaptada de Nandiraju, 2019.

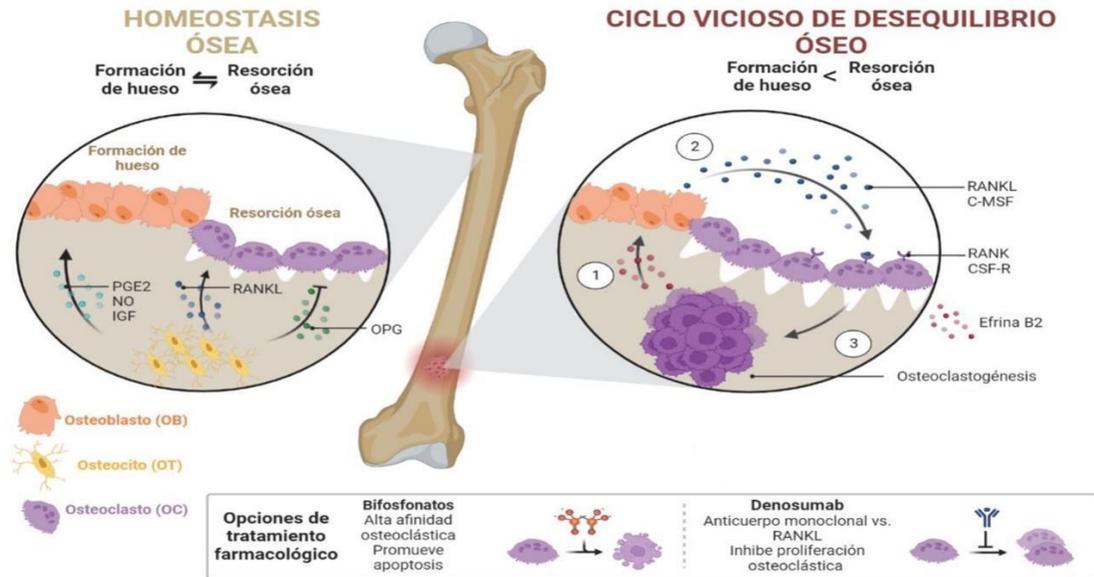
## 2.8 Farmacoterapia actual para la osteoporosis

El tratamiento farmacológico de la osteoporosis tiene como objetivo restaurar la masa ósea y mantener la integridad ósea para prevenir fracturas. Actualmente, los grupos de fármacos para tratamiento de esta patología se clasifican de la siguiente manera, con base a su similitud química y mecanismo de acción implícito.

Tabla 2. Farmacoterapia actual para tratamiento de osteoporosis. Ejemplos de fármacos para tratamiento convencional de la osteoporosis actualmente disponibles y comercializados.

Grupo de fármacos	Fármacos	Vía de administración
Agentes quelantes de fosfato	Carbonato de calcio	<u>Oral</u>
	Acetato de calcio	Dosis: 45-65 mg/kg al día en 4 dosis
Bifosfonatos	Zoledronato	<u>Oral</u>
	Etidronato	Dosis: 5 mg una vez al año
	Clodronato	
	Alendronato	
	Ibandronato	
Hormona análoga paratiroidea	Teriparatida	<u>Subcutánea</u>
	Abaloparatida	Dosis: 1 dosis diaria
Miméticos del receptor sensor de calcio	Calcitonina	<u>Intramuscular</u> : 100 UI 6-8 horas
	Cinacalcet	<u>Oral</u> : 30 mg una vez al día
	Denosumab	<u>Subcutánea</u> : 60 mg cada 6 meses
	Raloxifeno	<u>Oral</u> : 60 mg al día
	Hidroclorotiazida	<u>Oral</u> : 12,5-50 mg al día

<b>Análogos de la vitamina D</b>	Ergocalciferol	<u>Oral</u> : 800-1000 UI
	Colecalciferol	
	Doxercalciferol	
	Calcitriol	
	Calcifediol	



**Figura 5. Influencia del desequilibrio celular en el sistema óseo.** Adaptada de biorender por modificación propia, 2024.

## 2.9 Sistema Nervioso

El sistema nervioso es una colección compleja de nervios y células especializadas conocidas como neuronas que llevan a cabo la transducción de señales, con el fin de controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas. Su actividad se lleva a cabo mediante la emisión y recepción de señales eléctricas o impulsos nerviosos (Dimitri y Rosen 2017). Desde un punto anatómico, el sistema nervioso se divide en dos grandes componentes: el sistema nervioso central (SNC) compuesto por el encéfalo y la médula espinal; y el sistema nervioso periférico (SNP), dentro del cual se incluyen las neuronas sensoriales, ganglios y nervios que se conectan entre sí con el SNC (Barha *et al.* 2016).

### **2.9.1 Sistema Nervioso Periférico**

El SNP se encuentra constituido por todos los nervios periféricos, los que tienen origen en el encéfalo se denominan nervios craneales, y los que se originan en la médula espinal, nervios raquídeos o espinales, estos son los encargados de comunicar al SNC con los receptores sensoriales, los músculos y las glándulas (Elefteriou 2018). A su vez, el SNP se divide en: somático que se encarga de la información de tipo sensorial y motora; y en el autónomo (simpático y parasimpático), responsable del control de las funciones involuntarias corporales (Dimitri y Rosen 2017; Barha *et al.* 2016; Elefteriou 2018).

La homeostasis ósea está estrechamente regulada e integrada con la biología de otros órganos para mantener la homeostasis de todo el cuerpo, como lo es la participación del SNP en el control de la remodelación ósea (Elefteriou 2018). En los últimos años, se ha demostrado que existe un equilibrio entre las vías neuronales y los neurotransmisores mediados por el SNP que ejercen un equilibrio entre las células del tejido óseo (Dimitri y Rosen 2017).

### **2.9.2 Sistema Nervioso Autónomo**

El sistema nervioso autónomo (SNA) controla la función de las vísceras para mantener la homeostasis y efectuar respuestas de adaptación ante cambios del ambiente interno y externo. Su nombre se debe a que regula principalmente funciones de las que no somos conscientes, es decir funciones involuntarias. Como la respiración, la digestión, etc. Posee dos divisiones, la simpática y la parasimpática (Dimitri y Rosen 2017; Barha *et al.* 2016; Elefteriou 2018; Wehrwein *et al.* 2016). Las diferentes vísceras inervadas por el SNA reciben tanto fibras simpáticas como parasimpáticas.

A) Sistema Nervioso Simpático: las neuronas preganglionares tienen sus cuerpos en la línea intermediolateral desde los segmentos de las vértebras torácicas hasta la vértebra lumbar. Estas neuronas hacen sinapsis en los ganglios simpáticos paravertebrales con las neuronas posganglionares, las cuales inervan los diferentes tejidos. La división simpática está encargada de poner en alerta al individuo ante una situación de peligro real o potencial, con la intención de preservar su integridad. Se ha identificado a la noradrenalina como el principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático involucrado.

B) Sistema Nervioso Parasimpático: Las neuronas preganglionares tienen sus somas en los núcleos del tronco encefálico y en la columna lateral de la médula espinal sacra. Estas hacen sinapsis en los diferentes ganglios localizados sobre las paredes de los órganos diana. La actividad del sistema nervioso parasimpático está relacionada con funciones protectoras y de conservación, que favorecen el correcto funcionamiento de los diferentes órganos viscerales. Los componentes funcionales del sistema nervioso parasimpático no actúan simultáneamente en condiciones normales, sino que participan mediante reflejos específicos o en reacciones integradas para promover una función visceral concreta. El principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático es la acetilcolina.

### **2.9.3 Sistema Nervioso Somático**

La función del sistema nervioso somático es integrar estímulos externos y dar una respuesta frente a estos estímulos como consecuencia. Este sistema se subclasifica a su vez en sistema nervioso somático motor y sistema nervioso somático sensorial. Su unidad primordial son las fibras nerviosas sensoriales o también denominadas nociceptores. Los nociceptores son neuronas sensoriales con alto umbral de activación que responden a estímulos nocivos, cuyo soma se encuentra en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) (Khalid y Tubbs 2017; Dinakar y Stillman 2016). Estos se clasifican en tres grandes grupos con base en su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción (Sneddon 2018).

A) Fibras A $\alpha$  y A $\beta$ : Son fibras de diámetro grande, altamente mielinizadas y conducción rápida. Estas fibras participan en el procesamiento de la propiocepción y el tacto, pero no en la percepción de estímulos nocivos como los otros tipos de fibras.

B) Fibras A $\delta$ : Son fibras que poseen un diámetro menor que las fibras A $\alpha$  y A $\beta$ , están ligeramente mielinizadas y conducen los potenciales de acción con más lentitud que las fibras A $\beta$ . Estas fibras participan en la transmisión de estímulos nocivos y se clasifican en tipo fibras A $\delta$  de tipo I y II. Las fibras A $\delta$  tipo I poseen un umbral de activación alto frente a estímulos térmicos (mayor a 50 °C), mientras que las de tipo II tienen un umbral de activación menor.

C) Las fibras C: Son de diámetro pequeño y su velocidad de conducción es lenta. Están involucradas en la percepción de estímulos nocivos. Estas a su vez se subdividen en peptidérgicas o no peptidérgicas. Las fibras C peptidérgicas liberan sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), además expresan el receptor de tropomiosina cinasa A ya que su supervivencia depende del factor de crecimiento neural (NGF).

### **2.10 Nanotecnología: Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejido óseo se ha convertido en una de las áreas esenciales para abordajes de traumatismo, deterioro u osteopatías en la última década mediante el desarrollo de materiales biológicos, para comprender con mayor eficiencia su estructura y composición para tratamiento del deterioro óseo (Ramesh *et al.* 2018). Anteriormente los biomateriales se administraban en forma de prótesis completas, andamios o hidrogeles para distintas aplicaciones médicas. Debido a la necesidad de formular y diseñar nuevos biomateriales el campo de la nanotecnología ha ganado más importancia permitiendo el surgimiento de los biomateriales a escala nanométrica (nanopartículas) como nuevos enfoques en la medicina regenerativa (Abdul *et al.* 2021).

Diversos investigadores han desarrollado nanomateriales para mejorar la capacidad óseo-regenerativa como posibles tratamientos para deterioro del sistema óseo. Kotak D y colaboradores en el año 2019, fueron de los primeros investigadores en desarrollar nanopartículas de hidroxiapatita cargadas con calcitonina de salmón (SCT HAP NP's) con un tamaño promedio de 100 nm aproximadamente, potencial zeta de -25 mV con eficiencia de carga del 85%. Dentro del estudio se reportó diferencias significativas (\*P <0.05) en el grupo tratado con nanopartículas cargadas durante 28 días en comparación con su respectivo grupo control en un modelo de ovariectomía en ratas hembra Sprague Dawley.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Se ha reportado que la diabetes puede asociarse con pérdida significativa y deterioro óseo incrementando potencialmente el riesgo de desarrollar osteoporosis y fracturas. La diabetes se considera como una de las mayores problemáticas de salud pública. En 2021, se estimó que 537 millones de personas a nivel mundial padecían algún tipo de diabetes y se espera que esta cifra incremente a 783 millones de personas para el 2045. Se ha demostrado que en condiciones experimentales de diabetes tipo 1 existe pérdida y deterioro de la microarquitectura ósea, así como denervación sensorial y simpática.

Debido a que diversos estudios epidemiológicos estiman un incremento alarmante de este padecimiento en las próximas décadas; y que además los tratamientos farmacológicos actuales poseen limitaciones terapéuticas surge la necesidad de desarrollar nuevas terapias más eficaces encaminadas a tratar simultáneamente la neuropatía y pérdida ósea asociada a esta enfermedad.

#### **4. HIPÓTESIS**

La administración de nanocomplejos híbridos de hidroxiapatita-calcitonina promueve el proceso de regeneración ósea en un modelo *in vitro* y contribuye a la reparación de la microarquitectura ósea en un modelo murino bimodal diabético-osteoporótico.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la administración de nanocomplejos híbridos de HAP-CT como una alternativa terapéutica para la osteoporosis asociada a diabetes tipo 1 en un modelo murino.

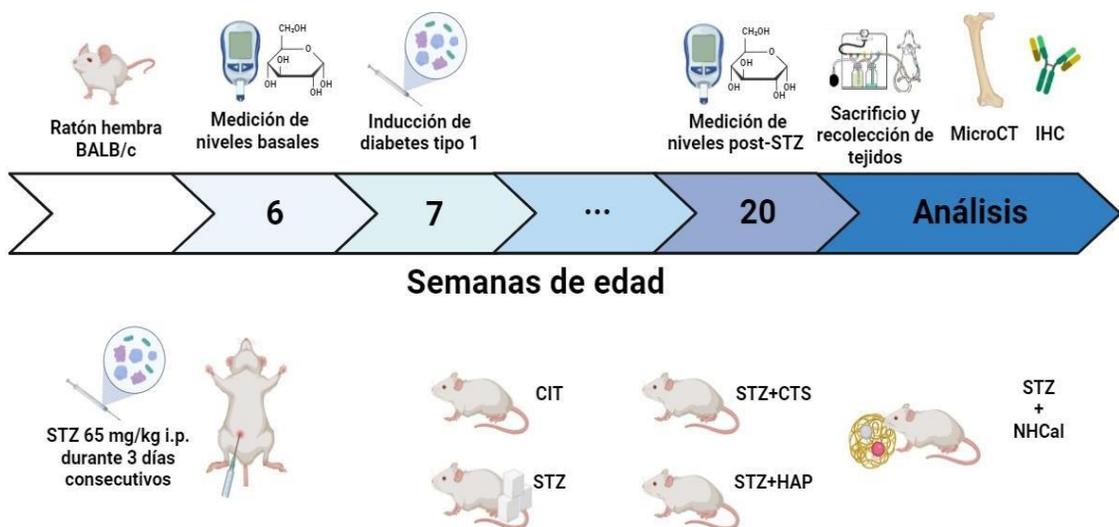
### **Objetivos específicos**

1. Estandarizar los parámetros de síntesis y caracterización de los nanocomplejos de NHCa por medio de precipitación iónica y antisolvente.
2. Evaluar la viabilidad relativa y proceso de mineralización de los nanocomplejos de NHCa en línea celular MG-63.
3. Detectar la presencia de proteínas osteoblásticas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63.
4. Determinar el efecto de la administración de nanocomplejos de NHCa en la densidad y microarquitectura ósea en el fémur de ratones con DMT1, por medio de microtomografía computacional.
5. Determinar el efecto de la administración de nanocomplejos de NHCa en la densidad de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas en el fémur de ratones con DMT1, por medio de la técnica de inmunohistoquímica y microscopía confocal.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Animales

Se utilizaron 25 ratones hembra de 6-7 semanas de la cepa BALB/c divididos en 5 grupos experimentales: citrato (CIT; n=5), estreptozotocina (STZ; n=5), estreptozotocina + hidroxiapatita (STZ + HAP; n=5), estreptozotocina + calcitonina (STZ + CTS; n=5) y estreptozotocina + nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (STZ + NHCa; n=5) administrados por vía oral durante 28 días consecutivos. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL donde también fueron alojados. Se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura ambiental controlada de 22°C y humedad relativa de 45%. Se enriqueció su ambiente con tubos de cartón para la creación de nidos y recreación del murino. Todos los procedimientos de trabajo con animales de experimentación cumplen con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y han sido sometidos para su revisión por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (CEIBA) UANL, con número de registro CEIBA-2022-010.



**Figura 6. Diseño experimental de inducción del modelo de diabetes tipo 1.** Representación gráfica de inducción, evaluación y seguimiento del modelo murino en los diferentes grupos experimentales (n=5 por grupo).

## **6.2 Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular osteoblástica MG-63 derivada de osteosarcoma humano proveniente del banco de líneas celulares del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL. Para su mantenimiento y proliferación se empleó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% en conjunto con antibiótico/antimicótico al 1%. El crecimiento celular en monocapas adherentes con un porcentaje de confluencia mayor al 50% fue considerado óptimo. Posteriormente, los cultivos celulares fueron resguardados a una temperatura de 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

## **6.3 Fármacos y reactivos**

En el presente estudio se utilizaron los siguientes reactivos y sustancias. Para la preparación de buffer de citratos se utilizó citrato de sodio (No. Catalogo 3646-01) y ácido cítrico (No. Catalogo 0110-01) de J.T. Baker. El buffer de citratos se preparó disolviendo ambos reactivos a una concentración de 0.1 M y ajustando la solución hasta obtener un pH de 4.5, posteriormente se almacenó a 4°C. La estreptozotocina (STZ, No. Catalogo S0130) y calcitonina de salmón (CTS, No. Catalogo C0200000). La hidroxiapatita fue sintetizada a partir del método de co-precipitación reportado por Martínez (Martinez *et al.* 2019) con algunas modificaciones en la metodología de síntesis. La zeína (ZN, No. Catalogo Z3625) fue adquirida en Sigma Aldrich. El medio DMEM (No. Catalogo 12400-024) fue adquirido en Gibco. El dimetil sulfóxido (DMSO, No. Catalogo D5879) fue adquirido en Sigma Aldrich. El bromuro (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, No. Catalogo 0535730-3) fue adquirido en Cayman Chemical Company. El reactivo rojo de alizarina (No. Catalogo A3400-02) fue adquirido en Jalmek.

#### **6.4 Síntesis de hidroxiapatita (HAP)**

La hidroxiapatita fue sintetizada a partir del método de coprecipitación reportado por Martínez (Martínez et al. 2019) con algunas modificaciones en la metodología de síntesis, utilizando como precursores nitrato de calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de amonio dihidrogenado ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) y urea. En una solución 0.012 M de 40 ml  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  se agregó por titulación un volumen igual de 0.02 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en agitación constante a 15000 rpm. Posteriormente se agregó 20 ml de urea 0.03 M para obtener un volumen estimado de 100 ml. Después de la mezcla se calentó a  $80^\circ\text{C}$  durante 30 minutos manteniendo un pH de 5.5 con hidróxido de amonio ( $\text{NH}_3$ ) para permanecer en agitación durante otra hora y finalmente reposar 24 horas a temperatura ambiente. Después se separó el precipitado mediante decantación con agua destilada en 3 ciclos de repetición con centrifugado de 10 minutos cada ciclo a 4000 rpm. Finalmente, el precipitado se secó a  $70^\circ\text{C}$  durante 24 horas para la obtención final del polvo.

#### **6.5 Síntesis de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (NHCaI)**

La hidroxiapatita fue sintetizada a partir del método de co-precipitación reportado por Martínez (Martínez *et al.* 2019) con algunas modificaciones en la metodología de síntesis, utilizando como precursores nitrato de calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de amonio dihidrogenado ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) y urea.

En una solución 0.012 M de 40 ml  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  se agregó por titulación un volumen igual de 0.02 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en agitación constante a 15000 rpm. Posteriormente se agregó 20 ml de urea 0.03 M para obtener un volumen estimado de 100 ml. Después de la mezcla se calentó a  $80^\circ\text{C}$  durante 30 minutos manteniendo un pH de 5.5 con hidróxido de amonio ( $\text{NH}_3$ ) para permanecer en agitación durante otra hora y finalmente reposar 24 horas a temperatura ambiente. Después se separó el precipitado mediante decantación con agua destilada en 3 ciclos de repetición con centrifugado de 10 minutos cada ciclo a 4000 rpm. Finalmente, el precipitado se secó a  $70^\circ\text{C}$  durante 24 horas para la obtención final del polvo.

Para la síntesis de las nanopartículas se utilizó el método de precipitación iónica y antisolvente de Sun (Sun *et al.* 2016). Se disolvió 1 g de zeína en 100 ml de solución etanólica al 70% con agitación magnética en baño de glicerina a 95°C durante 30 minutos. Posteriormente se estandarizó la relación peso/volumen de la hidroxiapatita (50 µg/ml) y calcitonina (30 µg/ml) en la solución de zeína. En agua desionizada a una velocidad de 5000 rpm se agregó la solución de zeína con hidroxiapatita-calcitonina aproximadamente a una velocidad de 1 ml/min para finalmente permanecer en agitación 2 minutos más.

## **6.6 Métodos de caracterización fisicoquímica**

### **1. Dispersión de luz dinámica (DLS)**

Para determinar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas se determinó el tamaño, polidispersidad y potencial zeta superficial mediante dispersión de luz dinámica utilizando el equipo Nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Las muestras de nanopartículas se cargaron en una celda capilar y electroforesis doppler láser para espectrofotometría a una temperatura estándar de 25°C. Para analizar el tamaño de partícula y polidispersidad se preparó una dilución con relación 1:1000 en agua desionizada, mientras que para el análisis de potencial Z superficial se analizó directamente la muestra de nanopartículas sin dilución previa.

### **2. Espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier (FT-IR)**

Esta técnica permite determinar los modos de vibración de los grupos químicos y su modificación por interacciones químicas o electrostáticas de los componentes del material sintetizado. Las nanopartículas se analizaron mediante espectrofotómetro de infrarrojo marca Pekin Elmer modelo Spectrum One con aditamento de ART, analizadas por la técnica de transmisión en un intervalo de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup> y 24 barridos con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

### **3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para revelar la morfología, tamaño de las partículas y composición elemental de las mismas se utilizará la técnica de espectroscopia de energía dispersa (EDS). Las

nanopartículas se dispersaron en isopropanol usando un baño ultrasónico, posteriormente se colocará una cinta de grafito hasta obtener el secado de esta para finalmente visualizar en microscopio marca JOEL JXA 840A.

### **6.7 Ensayo de resazurina**

Para determinar la viabilidad celular se cultivaron  $1 \times 10^5$  células óseas MG-63 por pozo en medio DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino bajo una atmosfera a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  en placas de 96 pozos. Se tomarán en cuenta controles de crecimiento sin tratamiento para el ensayo. Seguidamente se trataron a diferentes concentraciones de hidroxiapatita-calcitonina para evaluar después de un tiempo de incubación de 24 horas. A continuación, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se incubaron con medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) que contenía 0,15 mg/mL de resazurina (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) durante 3 horas de incubación. La reducción de resazurina se determinó midiendo la excitación a 530 nm y la emisión a 590 nm utilizando el lector de placas Varioskan Flash con espectrofotómetro UV-VIS. Cada muestra se analizó por triplicado. El porcentaje de viabilidad celular (%) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{Absorción muestra} \div \text{Absorción control}) \times 100$$

### **6.8 Ensayo de tinción con rojo de alizarina**

El método de tinción con rojo de alizarina fue utilizado para visualizar el proceso de calcificación de la matriz extracelular y desarrollo de nódulos de calcio por las células osteoblásticas MG-63.

Se colocaron aproximadamente de 5000-10,000 células viables por pozo en una placa de 96 pozos expuestas a diferentes tratamientos: hidroxiapatita (30, 125, 250 y 350  $\mu\text{g/ml}$ ), calcitonina de salmón (6, 25, 50 y 150  $\mu\text{g/ml}$ ), hidroxiapatita-calcitonina (dosis combinadas) y medio DMEM. Subsecuentemente, las células tratadas fueron incubadas durante 7 y 14 días. Seguido de su incubación se lavaron las células con PBS, y seguidamente fueron fijadas usando una solución de paraformaldehído 4% por 15

minutos. Posteriormente fueron teñidas con solución rojo de alizarina 1% (pH= 4.2, Sigma Aldrich) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, las muestras fueron lavadas con agua desionizada a 37°. El análisis cualitativo se realizó mediante evaluación visual de nódulos rojos formados en microscopio invertido (Olympus) en aumento 20X. El colorante de tinción fue disuelto con solución de ácido acético al 10%.

Finalmente, el análisis fue realizado mediante absorbancia en lector de placas (Elisa Reader) con longitud de onda de 485 nm. El ensayo se realizó por triplicado para asegurar mayor precisión.

### **6.9 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)**

El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima permitió identificar las proteínas fosfatasa alcalina (ALP), osteonectina (ON), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), tromboespondina y colágeno tipo 1 (COL-1) relacionadas con el proceso de mineralización ósea.

Se colocaron aproximadamente de 5000-10,000 células viables por pozo en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se utilizó medio osteogénico para mantenimiento de la línea celular MG-63, después de la formación de una monocapa adherente a las 24 horas, se retiró el medio a las células para ser sometidas a diferentes tratamientos hidroxiapatita (30, 125, 250 y 350 ug/ml), calcitonina de salmón (6, 25, 50 y 150 ug/ml), hidroxiapatita-calcitonina (dosis combinadas) durante 7 y 14 días de incubación.

Posterior al periodo de incubación se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos (PBS), para consecutivamente fijar las células con formaldehído al 4% durante 15 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se agregó la solución permeabilizante (0.04g de citrato de sodio, 40 µl/L tritón X-100 y 40 mL de agua bidestilada), en un periodo de incubación por 20 minutos; posteriormente se realizaron dos lavados con TBS al 1X (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH a 7.6) y se colocó nuevamente formaldehído al 4% en refrigeración a 4°C durante 12 horas. Seguidamente, se realizaron dos lavados con TBS 1X y la adición de los anticuerpos primarios anti-ALP, anti-ON, anti-OCN, anti-OPN, anti-COL-1 y anti-β-actina de ratón disueltos en una relación 1:1000 en TBS-Tween

20-BSA (99.6\% TBS al 1X, 0.05\% Tween 20, 0.01\% BSA), durante 12 horas de incubación a 4°C. Después del periodo de incubación, se realizaron dos lavados nuevamente con TBS 1X, para agregar el anticuerpo secundario anti IgG de conejo HRP (peroxidasa de rábano) durante 3 horas; transcurrido este el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con TBS 1X y se colocó el reactivo de TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine) por 30 minutos, para finalmente añadir la solución stock (0.16 M de ácido sulfúrico). El análisis se realizó mediante un lector de placas (Elisa Reader) a una longitud de onda de 450 nm.

### **6.10 Inducción del modelo experimental de diabetes tipo 1**

La inducción de DMT1 se realizó mediante la administración de STZ vía intraperitoneal. Para esto se empleó un esquema de administración de 5 inyecciones intraperitoneales consecutivas de STZ (una cada 24 horas) a una dosis 65 mg/Kg, con un ayuno previo de 6 horas. El seguimiento del modelo murino de DMT1 se realizó mediante monitoreo continuo de los niveles de glucosa en sangre y del peso corporal de los animales de experimentación (una vez por semana). La medición de los niveles de glucosa en sangre se realizó a las 2, 4 y 8 semanas después de inyección de STZ, con un ayuno previo de 8 horas. Para esto se obtuvo una gota de sangre de la vena caudal, posteriormente se procesó en un glucómetro previamente calibrado (Accucheck Performa, Roche Diabetes Care, Indiana, EUA). Solo fueron incluidos en el experimento los ratones con niveles de glucosa mayor a 150 mg/dL de acuerdo con el método publicado por Enriquez, *et al.* en el año 2017.

### **6.11 Curva de tolerancia oral a la glucosa**

Para realizar la curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) los ratones se sometieron a un ayuno previo de 8 horas. Una vez transcurrido ese tiempo se realizó la medición de los niveles de glucosa basal. Enseguida, se les administró a los ratones, mediante una cánula oral, una solución saturada de glucosa a una dosis de 2 g/Kg. y se midieron nuevamente los niveles de glucosa sanguíneos 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de glucosa.

## **6.12 Obtención de tejidos**

Para determinar los cambios en la DMO y en la microarquitectura ósea, así como en la densidad de fibras nerviosas, se analizó el fémur de ratones con DMT1. Adicionalmente, se determinó la densidad de fibras nerviosas en el cuello del fémur. Para obtener los tejidos mencionados, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (100/5 mg/Kg, i.p.) y posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca. Inicialmente el ratón se colocó en posición decúbito dorsal sobre una rejilla para permitir el adecuado flujo de los líquidos de lavado o fijación. Posteriormente se realizó un corte en la piel a la altura del esternón, seguido de un corte en las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón. Acto seguido, se realizó la punción del ventrículo izquierdo con una cánula rígida para favorecer el flujo continuo del líquido de perfusión a nivel de la aorta ascendente; y un pequeño corte en la aurícula derecha para facilitar la evacuación de líquidos. A continuación, a través de la cánula rígida se administraron 20 mL de PBS frío (0.01 M, pH 7.4 a 4°C), seguidos de 20 mL de solución fijadora (formaldehído al 4%, en PBS, pH 7.4). Una vez terminada la perfusión se realizó la extracción de las extremidades izquierda y derecha. Después los tejidos fueron post-fijados en formaldehído al 4% a 4°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se enjuagaron y se almacenaron en PBS (0.01 M, pH 7.4) hasta su posterior análisis.

## **6.13 Análisis por microtomografía computacional**

Para determinar los cambios en la densitometría ósea, en el hueso trabecular y en el hueso cortical, se analizaron los fémures mediante imágenes adquiridas por microtomografía computacional de alta resolución (microCT, SkyScan 1272, Brucker, Bélgica) de acuerdo con los estándares propuestos por Bouxsein (Bouxsein *et al.* 2010). El escaneo de los fémures para la adquisición de imágenes se realizó con las siguientes características: potencia de 60 kVp y 166  $\mu$ A con un tiempo de integración de 627 ms, un tamaño de voxel 10  $\mu$ m y resolución de 2016x1344 pixeles. Para analizar los parámetros trabeculares en el cuello del fémur, la región de interés se ubicó en dirección vertical a 0.75 mm de la cabeza de fémur (punto de referencia). En este sitio se analizó 1 mm de tejido a través de un

cilindro de 0.3 por 0.3 mm, con el software CT analyzer (Bruker, Bélgica). Los parámetros trabeculares analizados fueron los siguientes: volumen de hueso trabecular (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), grosor trabecular (Tb.Th) y separación trabecular (Tb.Sp). El análisis de la DMO se realizó utilizando un calibrador de hidroxapatita para roedores, con valores de 250 y 750 mg/cm<sup>3</sup>.

#### **6.14 Inmunohistoquímica**

Para determinar si existen cambios en la inervación de fibras nerviosas en el cuello del fémur se utilizó la técnica de inmunohistoquímica. En primer lugar, los fémures fueron descalcificados con una solución de EDTA (0.5M, pH=7.4) a 4°C por un periodo de aproximadamente dos semanas. El grado de descalcificación del fémur se verificó mediante rayos “x” utilizando un equipo portátil de rayos “x” (Fona X70). Una vez descalcificados, los huesos se crioprotegieron en una solución de sacarosa al 30% y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

Para llevar a cabo la inmunohistoquímica, los fémures se cortaron en secciones longitudinales en un plano frontal (20 µm de grosor) con un criostato (Criostato CM900 Leica). Se obtuvieron aproximadamente 12 laminillas por fémur donde fueron montados en laminillas (Superfrostplus, Thermo Scientific, No. de catálogo J1800AMNZ) y se dejaron secar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las laminillas se colocaron en cámaras verticales (Shandon, Sequenza Immunostaining, Fisher Scientific, no. de catálogo 73-310-017) y se realizó 3 lavados con PBS (0.1 M, pH=7.4) de 10 minutos cada uno. A continuación, las laminillas se incubaron con una solución bloqueadora (3% de suero normal de burro y 0.3% de Tritón X100 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Acto seguido, las secciones se incubaron durante 12 horas con diferentes anticuerpos primarios para la identificación de: i) fibras nerviosas sensoriales no mielinizadas y ligeramente mielinizadas que expresan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP+; anticuerpo policlonal de conejo anti-humano 1:3000; Sigma Aldrich No. de catálogo C8198); ii) fibras posganglionares simpáticas que expresan tirosina hidroxilasa (TH+; anticuerpo policlonal de conejo anti-rata 1:1000; Millipore No. de catálogo AB152) y iii) un marcador panneuronal que expresa

el producto del gen de la proteína 9.5 (PGP-9.5+; anticuerpo policlonal de conejo anti-humano, 1:3000; Cedarlane No. de catálogo CL7756AP), iv) un marcador de vasos sanguíneos que expresa endomucina (Endomucin+; anticuerpo policlonal de rata anti-ratón, 1:500; Santa Cruz No. de catálogo SC-65495) y v) un marcador de macrófagos infiltrantes que expresa el cúmulo de diferenciación 68 (CD68+; anticuerpo policlonal de rata anti-ratón, 1:2000; BioRad No. de catálogo MCA1957).

Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS 3 veces durante 10 minutos por cada uno y enseguida se incubaron durante 3 horas con los anticuerpos secundarios; (Cy3 anticuerpo monoclonal de burro anti-conejo 1:600; Jackson ImmunoResearch No. de catálogo 711-165-152 y Cy2 anticuerpo monoclonal de burro anti-rata 1:300; Jackson ImmunoResearch No. de catálogo 712-225-150) seguido de esto, las laminillas fueron colocadas en canastillas de vidrio y se incubaron durante 5 minutos con el marcador nuclear DAPI ((2-(4-aminodifenil))-1H -indol-6-carboxamidina); 1:20,000; Sigma Aldrich No. de catálogo D21490) seguido de 2 lavados con PBS (0.1 M, pH 7.4) de 10 minutos cada uno. Una vez lavadas, las secciones fueron deshidratadas en un gradiente de alcohol (70%, 80%, 90% y 100%, 2 minutos por solución) durante 2 minutos por solución y posteriormente se fijaron en xileno por 2 minutos.

Secuencialmente, las laminillas se sellaron con un cubreobjetos el cual se adhirió con el medio de montaje DPX (Slide mounting médium; Sigma Aldrich No. de catálogo 06522). Finalmente, se les permitió un periodo de secado de 24 horas antes de ser analizadas al microscopio.

### **6.15 Cuantificación de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas; infiltración de macrófagos y vascularización**

Para realizar la cuantificación de la densidad de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y macrófagos se analizaron tres secciones de cada fémur de ratón de los distintos grupos. Inicialmente de cada sección de tejido se localizó el cuello del fémur y se identificaron las áreas con mayor densidad de fibras nerviosas con ayuda del objetivo de 10x. Posteriormente se obtuvo una imagen confocal, utilizando la función de z-stack, de un microscopio confocal Carl Zeiss (modelo CLSM 800, Jena, Alemania) con el objetivo de

40x. Para realizar la cuantificación de fibras nerviosas, las imágenes fueron analizadas con el software Image J (National Institutes of Health).

Para determinar la longitud de las fibras nerviosas y vasos sanguíneos se utilizó la herramienta de línea a mano alzada para trazar las fibras nerviosas manualmente, mientras que para la expresión de macrófagos se realizó el conteo de número de células multinucleadas por campo utilizando como contraste la tinción de DAPI para la identificación de los núcleos. Adicionalmente en cada imagen se determinó el área de la médula ósea con la herramienta correspondiente. Para obtener el volumen se multiplicó el área por el grosor de la sección (20  $\mu\text{m}$ ). La densidad de las fibras nerviosas en el cuello del fémur se reportó como la longitud total de estas por el volumen de médula ósea analizada ( $\text{mm}/\text{mm}^3$ ). Finalmente, se obtuvo el promedio de las tres secciones analizadas por ratón (por cada marcador dado) para realizar las pruebas estadísticas correspondientes.

## 7. RESULTADOS

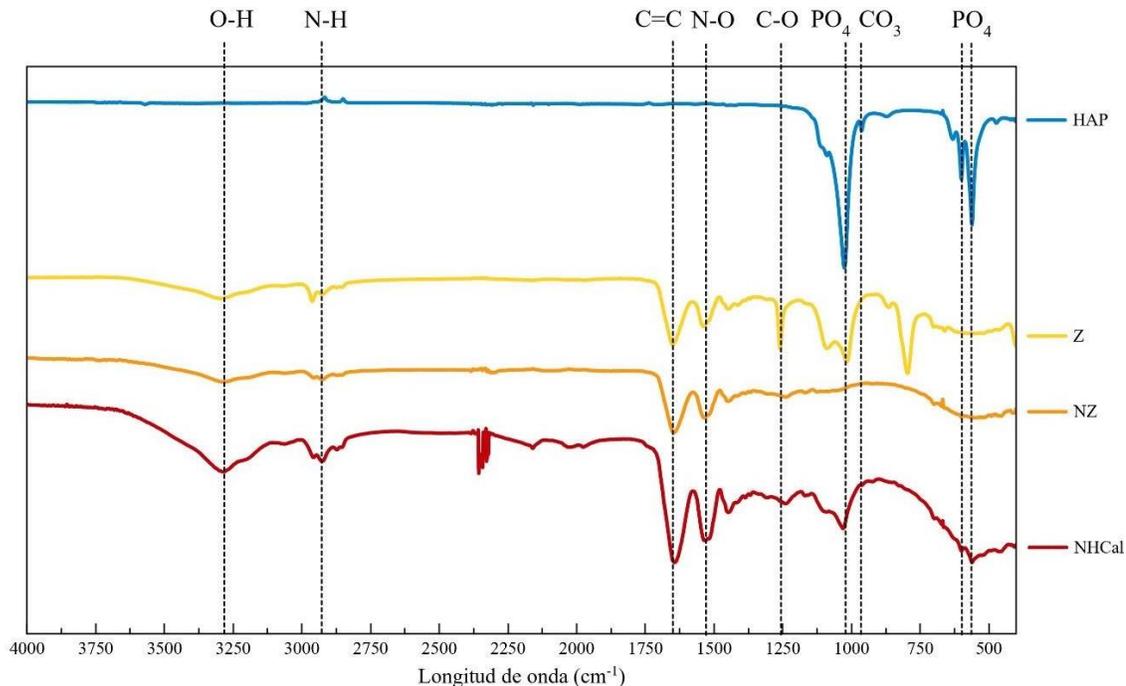
### 7.1 Caracterización fisicoquímica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina

Se realizó el análisis mediante dispersión de luz dinámica para determinar el tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta superficial el día de síntesis de los nanocomplejos (día 0), posteriormente al día 1, 3, 7, 14 y 28. Los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (n=3) mostraron un tamaño promedio inicial de  $470.3 \pm 6.6$  nm (PDI= 0.16 y potencial Z= $-5.2 \pm 0.6$ ) y un tamaño promedio de  $423.7 \pm 11.3$  nm (PDI= 0.35 y potencial Z= $-13.0 \pm 3$ ) al día 28, posterior a la síntesis de los nanocomplejos.

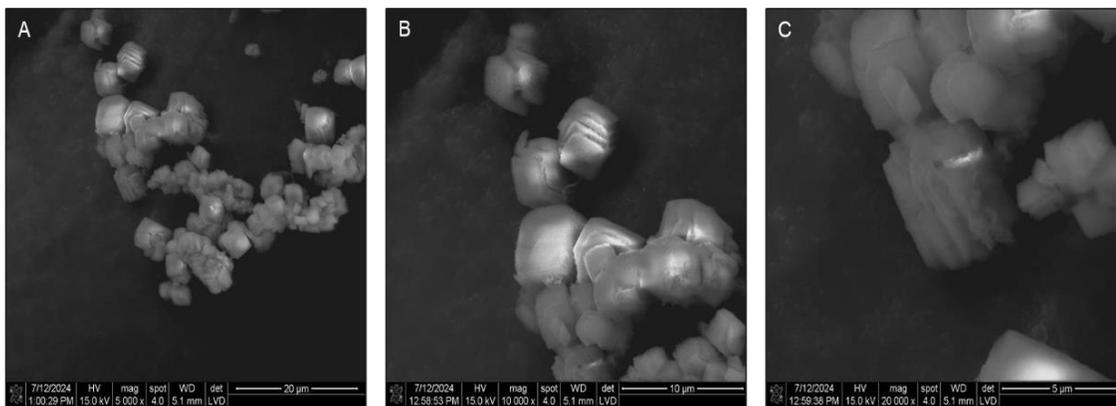
**Tabla 3. Caracterización física de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina.** Tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta superficial de nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina (NHCal). Las mediciones se realizaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y doppler láser electroforético. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=3).

Muestra	Día	Tamaño (nm) <i>Z-average</i>	PDI	Potencial $\zeta$ (mV)
NHCal	0	$470.3 \pm 6.6$	0.16	$-5.2 \pm 0.6$
	1	$592.7 \pm 7.9$	0.25	$-19.2 \pm 1.2$
	3	$586.4 \pm 4.0$	0.26	$-21.1 \pm 0.7$
	7	$549.4 \pm 15.6$	0.25	$-29.1 \pm 0.8$
	14	$499.1 \pm 12.5$	0.27	$-27.5 \pm 3.5$
	28	$423.7 \pm 11.3$	0.35	$-13.0 \pm 3$

Se realizó un análisis de espectroscopía de infrarrojo transformada de Fourier para determinar la naturaleza de los enlaces químicos entre átomos de la hidroxiapatita sintetizada (HAP), zeína (Z), nanopartículas de zeína (NZ) y nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina (NHCal). El análisis mostró bandas características de HAP a 1026, 562 y 600  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas con modos de vibración de grupos  $\text{PO}_4$  y bandas a 963  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos  $\text{CO}_3$ . Por otra parte, el análisis de la Z mostró bandas correspondientes a 3292 (O-H), 2962 (N-H), 1649 (C=C), 1535 (N-O) y 1260 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ . En contraste con las NZ, el espectro mostró bandas similares a 3283 (O-H), 2928 (N-H), 1646 (C=C) y 1537 (N-O). Particularmente, el análisis de las NHCal mostró bandas a 3284 (O-H), 2920 (N-H), 1643 (C=C), 1533 (N-O), 1237 (C-O) y 1031, 562-200 correspondientes a grupos  $\text{PO}_4$ .



**Figura 7. Caracterización química por espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier.** Espectroscopías de infrarrojo de transformada de Fourier de zeína (Z), hidroxiapatita sintetizada (HAP), nanopartículas de zeína (NZ) y nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina (NHCal).

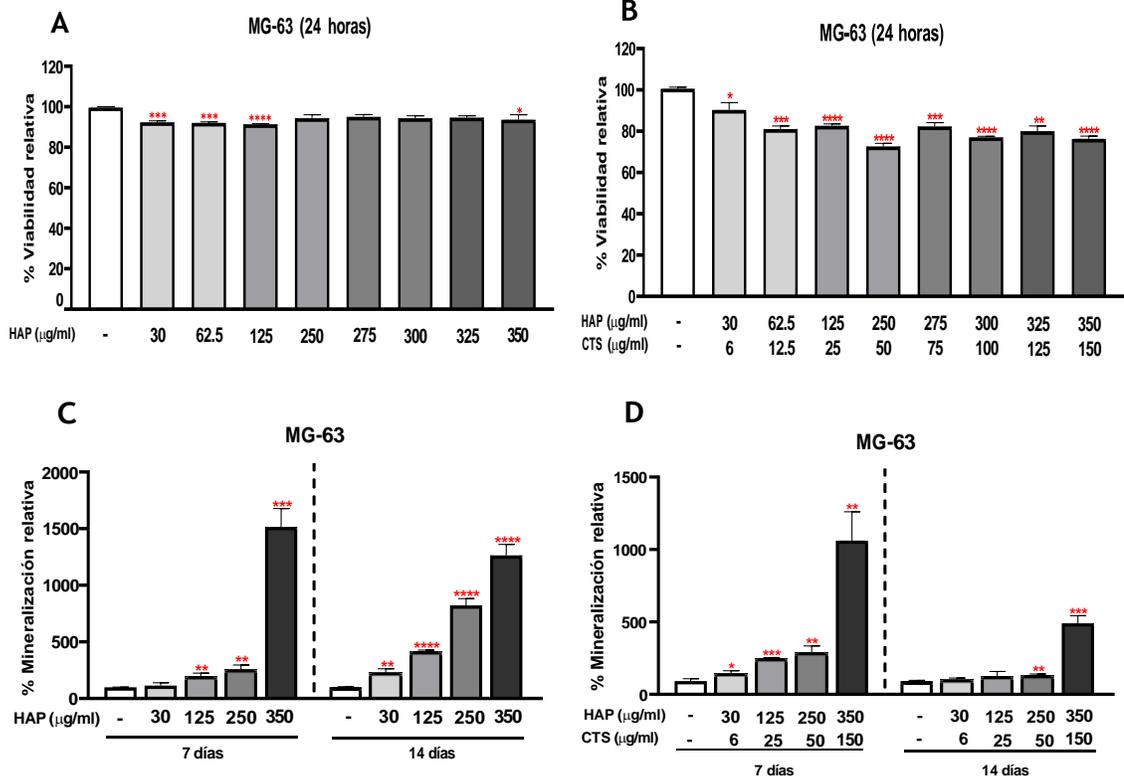


**Figura 8. Caracterización física por microscopía electrónica de barrido.** Fotografías representativas de nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina (NHCal) en aumento a 20  $\mu\text{m}$  (A), 10  $\mu\text{m}$  (B) y 5  $\mu\text{m}$  (C).

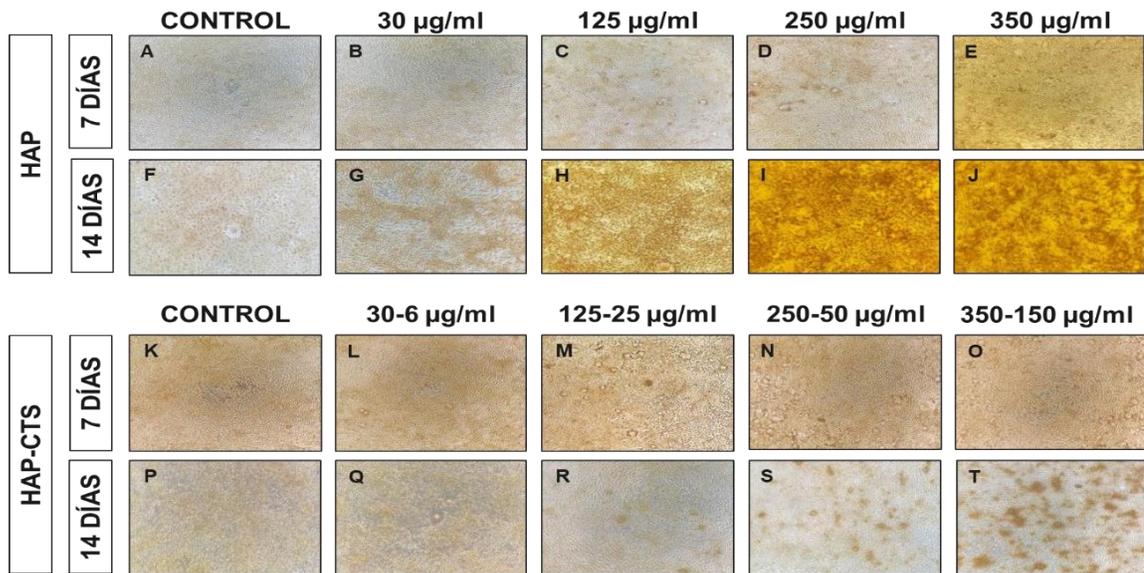
## **7.2 Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la viabilidad celular relativa y proceso de mineralización ósea en células MG-63**

La viabilidad celular relativa fue evaluada mediante un ensayo de resazurina en células óseas (MG-63) expuestas a diferentes concentraciones de hidroxiapatita e hidroxiapatita-calcitonina conjugada durante un periodo de 24 horas. El análisis con ANOVA de una vía mostró que la administración de hidroxiapatita no disminuyó significativamente la viabilidad relativa ( $F(9, 20)=4.914$ ,  $p=0.0015$ ) en células MG-63 a dosis crecientes de 15, 30, 62.5, 125, 250, 275, 300, 325 y 350  $\mu\text{g/ml}$ . En comparación con la administración conjugada, se afectó significativamente la viabilidad relativa ( $F(9, 20)=22$ ,  $p<0.0001$ ) de manera independiente a dosis crecientes de 15-3, 30-6, 62.5-12.5, 125-25, 250-50, 275-75, 300-100, 325-125 y 350-150  $\mu\text{g/ml}$ .

El proceso de mineralización relativa fue evaluado mediante un ensayo de tinción con rojo de alizarina en células óseas (MG-63) expuestas a diferentes concentraciones de hidroxiapatita e hidroxiapatita-calcitonina conjugada durante un periodo de 24 horas. El análisis con ANOVA de una vía mostró que la administración de hidroxiapatita aumentó significativamente, el porcentaje de mineralización relativa a los 7 días ( $F(4, 10)=195.0$ ,  $p<0.0001$ ) y 14 días ( $F(4, 10)=241.9$ ,  $p<0.0001$ ) en células MG-63 a dosis crecientes de 30, 125, 250 y 350  $\mu\text{g/ml}$ . En comparación con la administración conjugada, el análisis con ANOVA de una vía reveló que la administración de hidroxiapatita-calcitonina aumentó significativamente el porcentaje de mineralización relativa a los 7 días ( $F(4, 10)=56.18$ ,  $p<0.0001$ ) y disminuyó significativamente a los 14 días ( $F(4, 10)=108.4$ ,  $p<0.0001$ ) en células MG-63 a dosis crecientes de 30, 125, 250 y 350  $\mu\text{g/ml}$ .

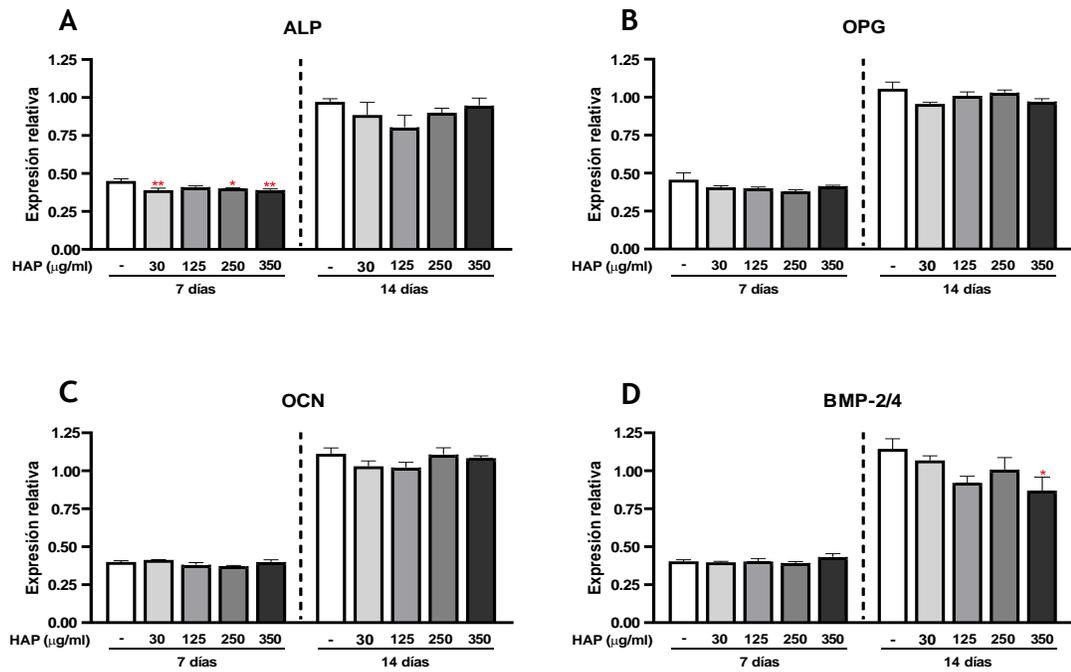


**Figura 9. Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la viabilidad celular relativa y proceso de mineralización ósea en células MG-63.** (A) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita no mostraron disminución significativa en el porcentaje de viabilidad relativa comparado con el grupo control. (B) Células MG-63 tratadas administradas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita-calcitonina mostraron disminución significativa en el porcentaje de viabilidad relativa comparado con el grupo control. (C) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita mostraron un aumento significativo en el porcentaje de mineralización a los 14 días comparado con el grupo control. (D) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita-calcitonina mostraron disminución significativa en el porcentaje de mineralización a los 14 días comparado con el grupo control. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=3 por grupo). \*p < 0,05. Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

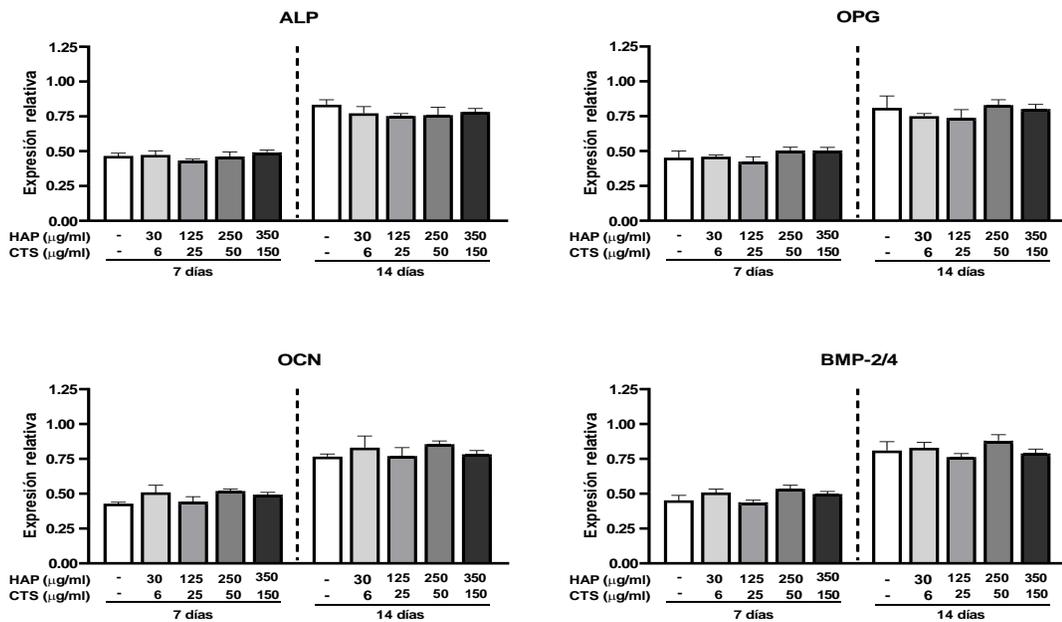


**Figura 10. Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en el proceso de mineralización ósea en células MG-63.** Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita a los 7 días (A-E), 14 días (F-J) y en combinación de hidroxiapatita-calcitonina con diferentes concentraciones a los 7 días (K-O) y 14 días (P-T).

### 7.3 Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63



**Figura 11. Efecto de la administración de hidroxiapatita en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63.** (A) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita mostraron cambios significativos en la expresión relativa de fosfatasa alcalina (ALP) a los 7 días comparado con el grupo control. (B) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita no mostraron cambios significativos en la expresión relativa de osteoprotegerina (OPG) a los 7 y 14 días comparado con el grupo control. (C) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita no mostraron cambios significativos en la expresión relativa de osteocalcina (OCN) a los 7 y 14 días comparado con el grupo control. (D) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita mostraron cambios significativos en la expresión relativa de metaloproteínas óseas 2/4 (BMP-2/4) a los 14 días comparado con el grupo control. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=3 por grupo). \*p < 0,05. Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.



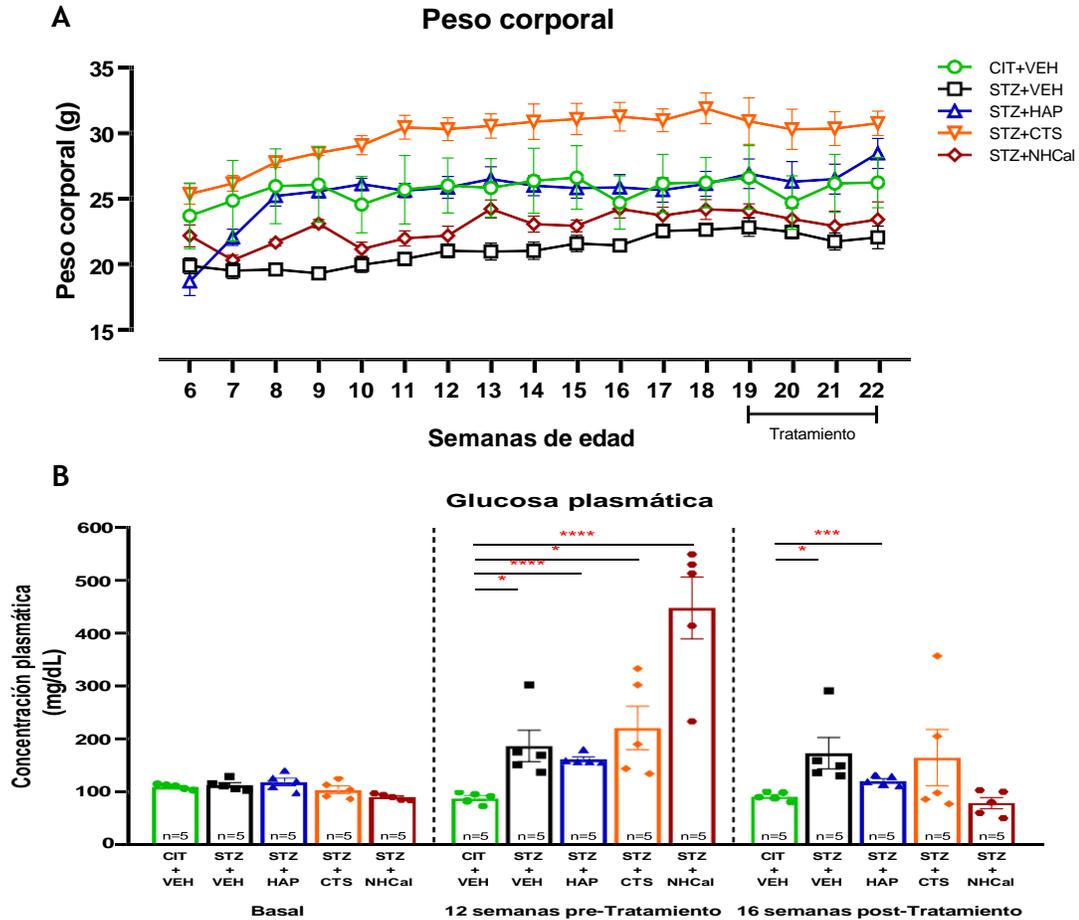
**Figura 12. Efecto de la administración de hidroxiapatita-calcitonina en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63** (A) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita-calcitonina no mostraron cambios significativos en la expresión relativa de fosfatasa alcalina (ALP) a los 7 y 14 días comparado con el grupo control. (B) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita-calcitonina no mostraron cambios significativos en la expresión relativa de osteoprotegerina (OPG) a los 7 y 14 días comparado con el grupo control. (C) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita-calcitonina no mostraron cambios significativos en la expresión relativa de osteocalcina (OCN) a los 7 y 14 días comparado con el grupo control. (D) Células MG-63 tratadas con diferentes concentraciones de hidroxiapatita-calcitonina no mostraron cambios significativos en la expresión relativa de metaloproteínas óseas 2/4 (BMP-2/4) a los 7 y 14 días comparado con el grupo control. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=3 por grupo). \*p < 0,05. Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

#### **7.4 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el peso corporal y niveles de glucosa plasmática en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina**

Los cambios de peso corporal y niveles de concentración de glucosa plasmática fueron determinados durante el periodo de ejecución del experimento. Al inicio del experimento, todos los ratones exhibieron peso corporal y concentración de glucosa plasmática similar (90-109.6 mg/dL) ( $F(4, 20)=4.384, p=0.0105$ ).

Después de 12 semanas de inducción con DMT1 no mostraron diferencias significativas en el peso corporal comparado con el grupo control. Un ANOVA de dos vías de medidas repetidas indicó un efecto significativo de peso corporal entre grupos ( $F(4, 20)=7.953, p=0.0005$ ), tiempo ( $F(3.179, 62.97)=22.54, p<0.0001$ ) e interacción entre grupos y tiempo ( $F(64, 317)=2.974, p<0.0001$ ). Sin embargo, el análisis post hoc de múltiples comparaciones mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina no afectó significativamente el peso corporal comparado con el grupo control 16 semanas post-tratamiento.

El análisis posterior con ANOVA de una vía demostró una interacción significativa entre grupos sobre niveles de glucosa plasmática ( $F(4, 20)=15.36, p<0.0001$ ). Por otra parte, el análisis post hoc de múltiples comparaciones con Bonferroni mostró diferencias significativas entre grupos comparado con el grupo control 12 semanas pre-tratamiento. En contraste, el análisis con ANOVA de una vía no mostró una interacción significativa entre grupos sobre niveles de glucosa plasmática ( $F(4, 20)=2.322, p=0.092$ ) 16 semanas post-tratamiento. Del mismo modo, el análisis post hoc de múltiples comparaciones mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina no aumentó significativamente los niveles de glucosa plasmática comparado con el grupo control.



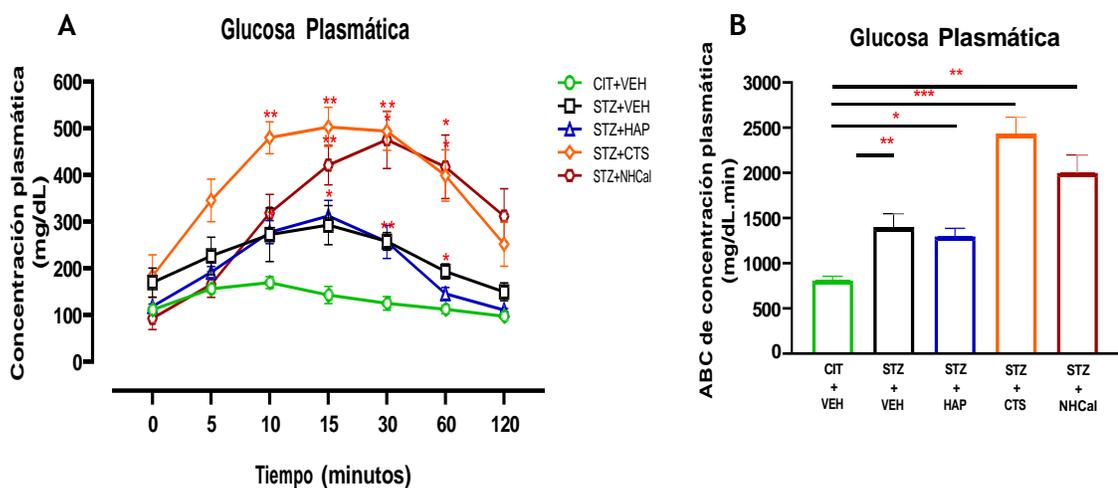
**Figura 13. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el peso corporal y niveles de glucosa plasmática en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina.** (A) Ratones hembra con diabetes mellitus tipo 1 inducido por estreptozotocina no mostraron diferencias significativas en el peso corporal comparado con ratones control. (B) Niveles de glucosa plasmática en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina fueron significativamente mayor comparado con el grupo de ratones control. El tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina no aumento significativamente los niveles de glucosa plasmática o modificó significativamente el peso corporal comparado con el grupo de ratones control (A, B). Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=5 por grupo). \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico de ANOVA de dos vías con medidas repetidas (A) y ANOVA de una vía (B) con prueba post hoc Bonferroni.

### 7.5 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la respuesta a la tolerancia oral de glucosa en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina

Se evaluó mediante una curva de tolerancia oral de glucosa la respuesta metabólica de la glucosa 14 semanas posterior a la administración crónica con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina.

El análisis con ANOVA de dos vías con medidas repetidas indicó un efecto significativo en los niveles de glucosa plasmática entre grupos ( $F(4, 20)=10.95, p<0.0001$ ), tiempo ( $F(2.752, 55.05)=64.91, p<0.0001$ ) e interacción entre grupos y tiempo ( $F(24, 120)=10.24, p<0.0001$ ). El análisis posterior con múltiples comparaciones por Bonferroni mostró diferencias significativas a partir de los 10 minutos hasta los 60 minutos en los grupos de ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina en comparación con el grupo de ratones control sanos.

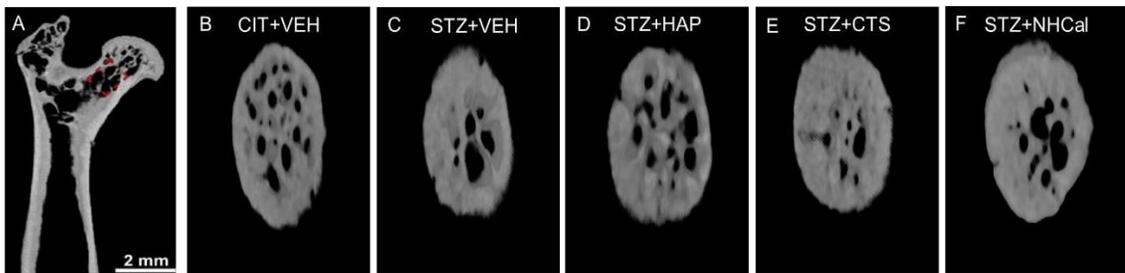
Adicionalmente, el análisis del área bajo la curva (ABC) del grupo de ratones diabéticos ( $STZ+VEH=1400\pm141.4, STZ+HAP=1296\pm90.99, STZ+CTS=2437\pm172.4$  y  $STZ+NHCaI=1998\pm191.9$ ) fue mayor en comparación con el grupo de ratones control ( $808.2\pm46.88$ ). El análisis posterior con ANOVA de una vía demostró una interacción significativa entre grupos sobre niveles de glucosa plasmática ( $F(4, 30)=7.293, p=0.0003$ ). Por otra parte, el análisis post hoc de múltiples comparaciones con Bonferroni mostró diferencias significativas entre grupos comparado con el grupo control.



**Figura 14. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxapatita-calcitonina en la respuesta a la tolerancia oral de glucosa en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina.** (A) Curva de tolerancia oral de niveles de glucosa plasmática de ratones hembra con diabetes mellitus tipo 1 inducido por estreptozotocina mostraron diferencias significativas en el curso temporal de glucosa comparado con el grupo control. (B) Área bajo la curva de niveles de glucosa plasmática en ratones con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina fueron significativamente mayor comparado con el grupo control. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM ( $n=5$  por grupo) (A) y área total  $\pm$  EEM (B). \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico de ANOVA de dos vías con medidas repetidas (A) con prueba post hoc Bonferroni y área bajo la curva (B).

## 7.6 Determinar el efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad y microarquitectura ósea en cuello de femur de ratones hembra con DMT1

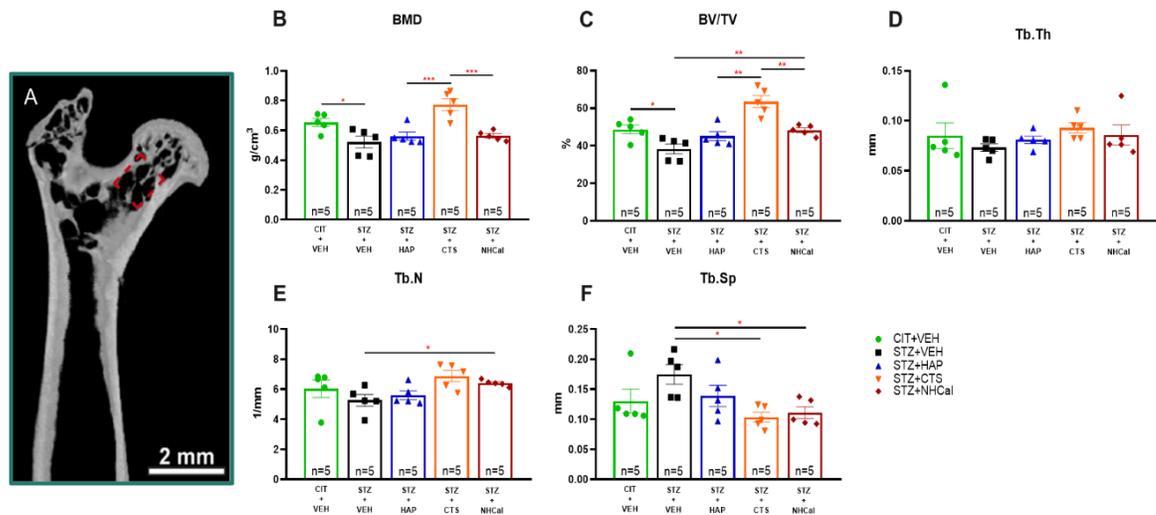
Para determinar el efecto de la administración crónica de los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el femur de ratones con diabetes tipo 1 se realizó el análisis por microtomografía computacional a nivel del cuello de femur a las 16 semanas post-tratamiento. Las imágenes tridimensionales obtenidas en el cuello de fémur (Figura 15) demuestran que los ratones administrados con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (15F) disminuye la pérdida de hueso trabecular en comparación con el grupo control (15B), a las 16 semanas post-tratamiento a nivel del cuello de fémur.



**Figura 15. La administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina disminuye la pérdida de hueso trabecular a nivel del cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.** (A) Reconstrucción tridimensional representativa de la region de interés obtenida por microtomografía computacional. (B-F) Se muestran reconstrucciones transversales representativas de hueso trabecular en el cuello de fémur a los 28 días post-tratamiento con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina.

Después de 16 semanas de inducción con DMT1, el análisis cuantitativo mediante ANOVA de una vía indicó un efecto significativo en los parámetros óseos de la microarquitectura del hueso trabecular; densidad mineral ósea (BMD;  $F(4, 20)=10.4$ ,  $p=0.0001$ ), porcentaje de volumen óseo trabecular (BV/TV;  $F(4, 20)=14.05$ ,  $p<0.0001$ ), número de trabéculas (Tb.N;  $F(4, 20)=2.868$ ,  $p=0.0499$ ) y separación trabecular (Tb. Sp;  $F(4, 20)=3.426$ ,  $p=0.0272$ ). Adicionalmente, el análisis post hoc de múltiples comparaciones con Bonferroni mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina afecta significativamente la densidad mineral ósea (Figura 16B,  $p=0.0013$ ) y porcentaje de volumen óseo trabecular (Figura 16C,  $p=0.003$ ) en

comparación con el grupo de ratones administrados con calcitonina de salmón. En contraste, el análisis reveló que la administración de los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina aumenta significativamente el porcentaje de volumen óseo trabecular (Figura XC,  $p=0.0094$ ) y número de trabéculas (Figura 16E,  $p=0.0202$ ), pero disminuye significativamente la separación trabecular (Figura 16F,  $p=0.0101$ ) en comparación con el grupo de ratones diabéticos.



**Figura 16. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad y microarquitectura ósea en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.** (A) Reconstrucción tridimensional representativa de la región de interés obtenida por microtomografía computacional. El análisis cuantitativo reveló cambios significativos en la densidad mineral ósea (B, BMD), porcentaje de volumen óseo trabecular (C, BV/TV), número de trabéculas (E, Tb.N) y separación trabecular (F, Tb.Sp) en el grupo de ratones administrados con los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en comparación con el grupo de ratones control. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=5 por grupo). \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

### 7.7 Determinar el efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas sensoriales y simpáticas; infiltración de macrófagos y vascularización en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.

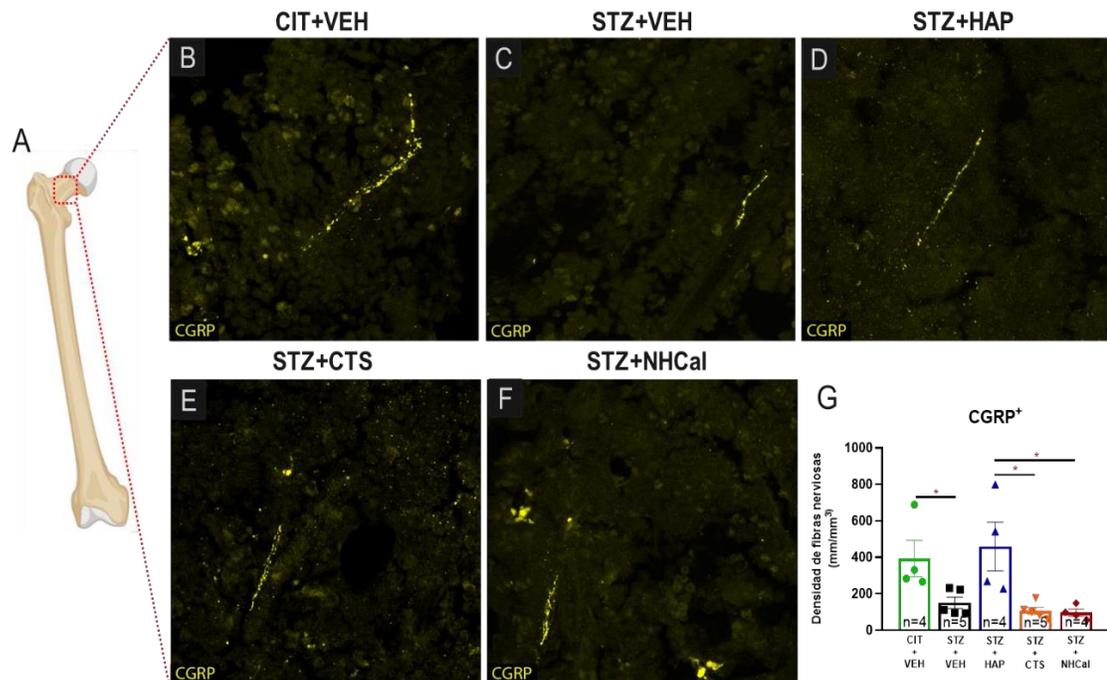
Para determinar el efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas sensoriales, simpáticas, infiltración de macrófagos y vascularización, se realizó el análisis mediante técnica de

inmunohistoquímica y microscopía confocal a nivel del cuello de fémur de ratones hembra con DMT1, a las 16 semanas post-tratamiento.

### 7.7.1 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas sensoriales CGRP<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.

En la figura 17 (A-G) se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal representativas de las fibras nerviosas sensoriales que expresan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP<sup>+</sup>) 16 semanas post-tratamiento en los diferentes grupos experimentales.

El análisis cuantitativo (Figura 17G) mediante ANOVA de una vía indicó un efecto significativo en la densidad de fibras nerviosas sensoriales CGRP<sup>+</sup> ( $F(4, 17)=5.775$ ,  $p=0.004$ ). El análisis posterior con múltiples comparaciones con Bonferroni mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina afecta significativamente la densidad de fibras nerviosas CGRP<sup>+</sup> ( $p=0.0271$ ) en comparación con el grupo administrado con hidroxiapatita.



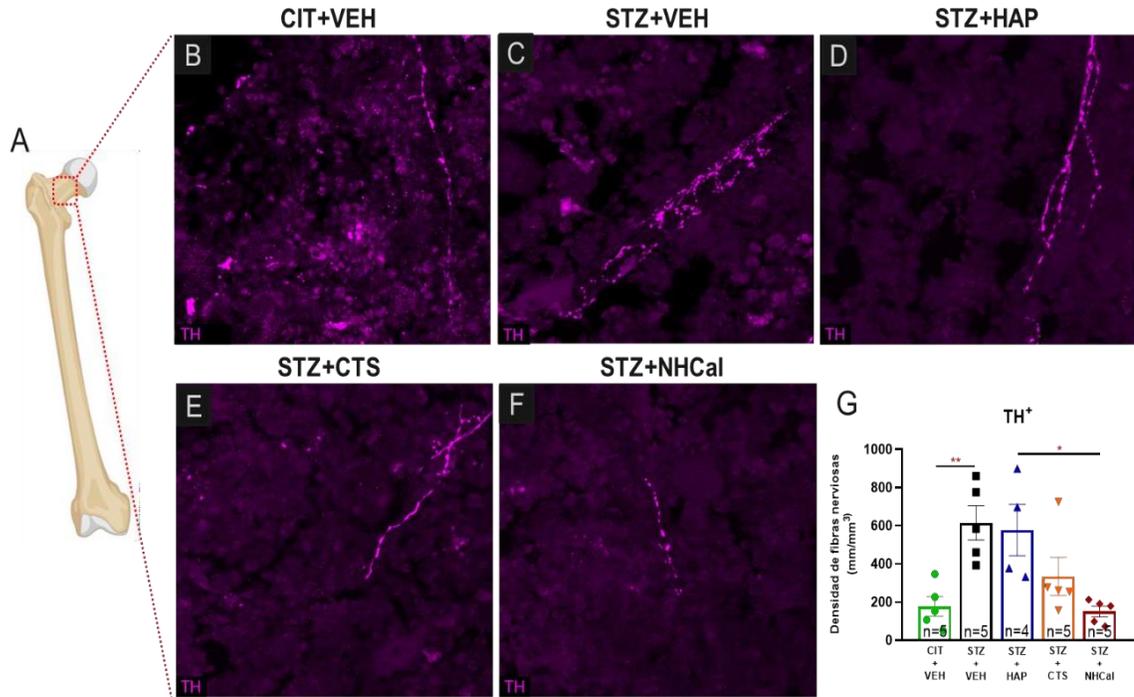
**Figura 17. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas sensoriales CGRP<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.**

(A) Figura representativa de la región de interés analizada para la cuantificación de fibras nerviosas. (B-F) Se muestran fotografías representativas de la inervación sensorial de los diferentes grupos experimentales administrados con cada tratamiento. (G) El análisis cuantitativo reveló una pérdida significativa en el grupo administrado con estreptozotocina (C) en comparación con el grupo control (B). Por otra parte, el grupo administrado con hidroxiapatita (D) no mostró cambios significativos, que en contraste con los grupos administrados con calcitonina de salmón (E) y nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (F) mostraron una pérdida significativa en la densidad de fibras nerviosas CGRP<sup>+</sup> en comparación con el grupo control. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=4-5 por grupo). \*p < 0,05. Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

**7.7.2 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas simpáticas TH<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.**

En la figura 18 (A-G) se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal representativas de las fibras nerviosas sensoriales que expresan tirosina hidroxilasa (TH<sup>+</sup>) 16 semanas post-tratamiento en los diferentes grupos experimentales.

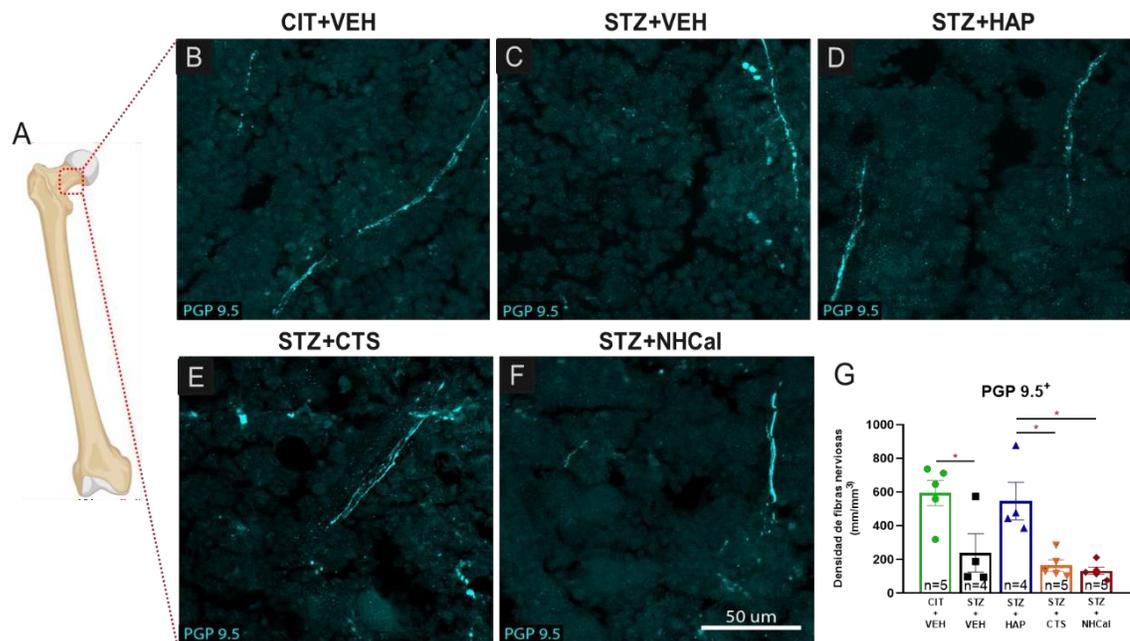
El análisis cuantitativo (Figura 18G) mediante ANOVA de una vía indicó un efecto significativo en la densidad de fibras nerviosas simpáticas TH<sup>+</sup> (F (4, 19)=6.643, p=0.0016). El análisis posterior con múltiples comparaciones con Bonferroni mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina afecta significativamente la densidad de fibras nerviosas TH<sup>+</sup> (p=0.0270) en comparación con el grupo administrado con hidroxiapatita y ratones diabéticos sin tratamiento (p=0.008).



**Figura 18. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas simpáticas TH<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.** (A) Figura representativa de la región de interés analizada para la cuantificación de fibras nerviosas. (B-F) Se muestran fotografías representativas de la inervación simpática de los diferentes grupos experimentales administrados con cada tratamiento. (G) El análisis cuantitativo reveló un aumento significativo en el grupo administrado con estreptozotocina (C) en comparación con el grupo control (B). Por otra parte, el grupo administrado con hidroxiapatita (D) mostró mismos cambios significativos comparado con el grupo diabético, que en contraste con los grupos administrados con calcitonina de salmón (E) y nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (F) mostraron una pérdida significativa en la densidad de fibras nerviosas TH<sup>+</sup> en comparación con el grupo de ratones diabéticos. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=4-5 por grupo). \*p < 0,05. Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

### 7.7.3 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas PGP 9.5<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.

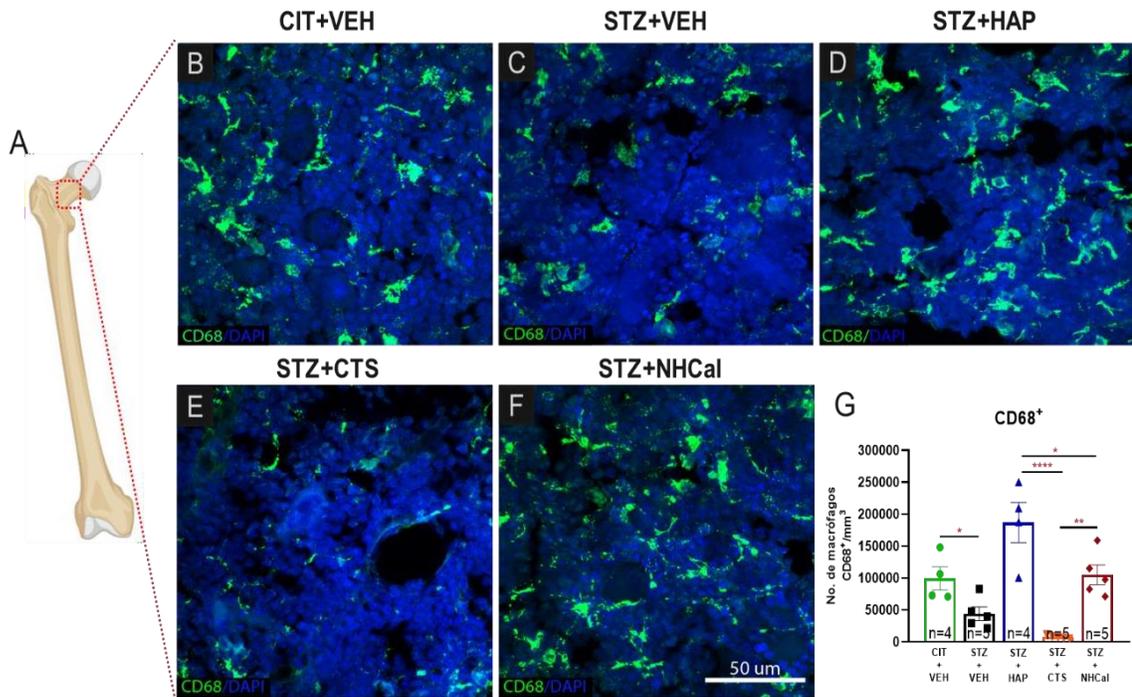
En la figura 19 (A-G) se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal representativas de las fibras nerviosas sensoriales que expresan el producto génico de la proteína 9.5 (PGP 9.5<sup>+</sup>) 16 semanas post-tratamiento en los diferentes grupos experimentales. El análisis cuantitativo (Figura 19G) mediante ANOVA de una vía indicó un efecto significativo en la densidad de fibras nerviosas PGP 9.5<sup>+</sup> ( $F(4, 18)=8.996$ ,  $p=0.0004$ ). El análisis posterior con múltiples comparaciones con Bonferroni mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina afecta significativamente la densidad de fibras nerviosas PGP 9.5<sup>+</sup> ( $p=0.0107$ ) en comparación con el grupo administrado con hidroxiapatita y ratones control ( $p=0.0022$ ).



**Figura 19. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas PGP 9.5<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.** (A) Figura representativa de la región de interés analizada para la cuantificación de fibras nerviosas. (B-F) Se muestran fotografías representativas de la inervación de los diferentes grupos experimentales administrados con cada tratamiento. (G) El análisis cuantitativo reveló una pérdida significativa en el grupo administrado con estreptozotocina (C) en comparación con el grupo control (B). Por otra parte, el grupo administrado con hidroxiapatita (D) mostró un aumento significativo comparado con el grupo diabético, que en contraste con los grupos administrados con calcitonina de salmón (E) y nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (F) mostraron una pérdida significativa en la densidad de fibras nerviosas PGP 9.5<sup>+</sup> en comparación con el grupo control. Los datos se representan como media ± EEM (n=4-5 por grupo). \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

#### **7.7.4 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la infiltración de macrófagos CD68<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.**

En la figura 20 (A-G) se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal representativas de la infiltración de macrófagos que expresan el *cluster* de diferenciación CD68 (CD68<sup>+</sup>) 16 semanas post-tratamiento en los diferentes grupos experimentales. El análisis cuantitativo (Figura 20G) mediante ANOVA de una vía indicó un efecto significativo en la infiltración de células de macrófago CD68<sup>+</sup> ( $F(4, 18)=16.19$ ,  $p<0.0001$ ). El análisis posterior con múltiples comparaciones con Bonferroni mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina aumenta significativamente el número de macrófagos CD68<sup>+</sup> infiltrados ( $p=0.0042$ ) en comparación con el grupo administrado con calcitonina de salmón.

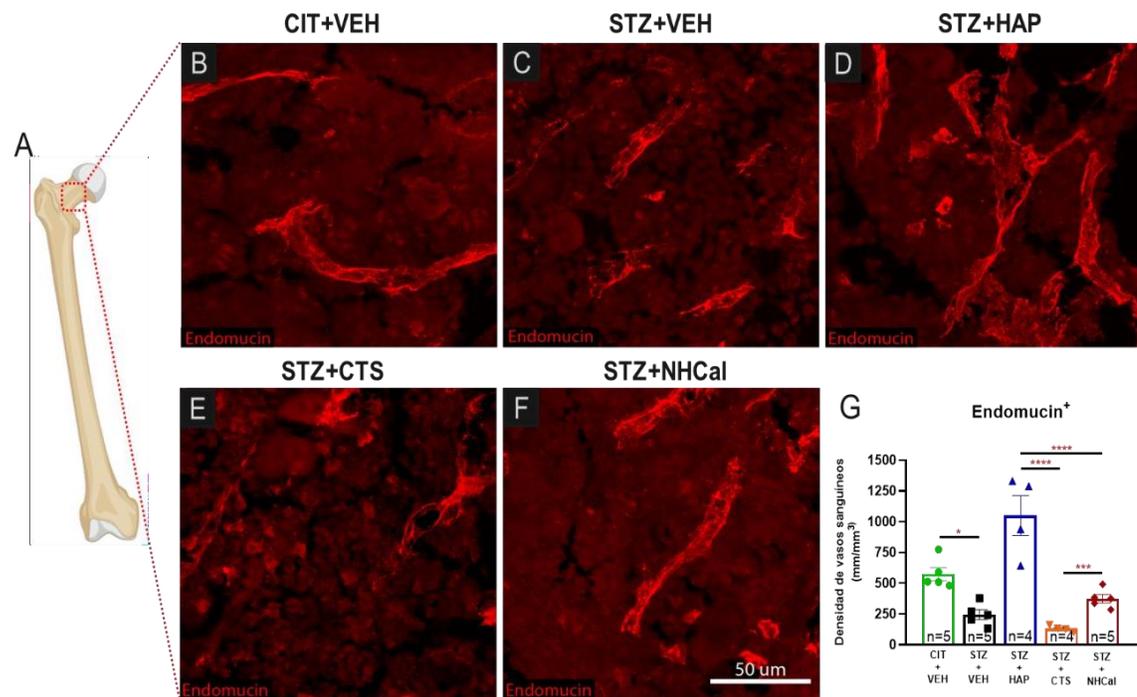


**Figura 20. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxapatita-calcitonina en la infiltración de macrófagos CD68<sup>+</sup> en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.** (A) Figura representativa de la región de interés analizada para la cuantificación de número de macrófagos CD68<sup>+</sup>. (B-F) Se muestran fotografías representativas de la infiltración de macrófagos CD68<sup>+</sup> en médula ósea de los diferentes grupos experimentales administrados con cada tratamiento. (G) El análisis cuantitativo reveló una pérdida significativa en el grupo administrado con estreptozotocina (C) en comparación con el grupo control (B). Por otra parte, el grupo administrado con hidroxapatita (D) mostró un aumento significativo comparado con el grupo diabético, que en contraste con los grupos administrados con calcitonina de salmón (E) y nanocomplejos de hidroxapatita-calcitonina (F) mostraron una pérdida significativa en el número de macrófagos CD68<sup>+</sup> infiltrados en médula ósea en comparación con el grupo administrado con hidroxapatita. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=4-5 por grupo). \*p < 0,05. Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

### 7.7.5 Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxapatita-calcitonina en el proceso de vascularización en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.

En la figura 21 (A-G) se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal representativas del proceso de neovascularización que expresan la proteína endomucina (Endomucina<sup>+</sup>) 16 semanas post-tratamiento en los diferentes grupos experimentales.

El análisis cuantitativo (Figura 21G) mediante ANOVA de una vía indicó un efecto significativo en la neovascularización de vasos sanguíneos Endomucina<sup>+</sup> ( $F(4, 18)=22.69$ ,  $p<0.0001$ ). El análisis posterior con múltiples comparaciones con Bonferroni mostró que el tratamiento crónico con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina aumenta significativamente la densidad de vasos sanguíneos Endomucina<sup>+</sup> en médula ósea ( $p=0.0005$ ) en comparación con el grupo administrado con calcitonina de salmón. En contraste, el mismo grupo de ratones administrados con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina mostró una pérdida significativa ( $p<0.0001$ ) en la densidad de vasos sanguíneos comparado con el grupo administrado con hidroxiapatita.



**Figura 21. Efecto de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en el proceso de vascularización en cuello de fémur de ratones hembra con DMT1.** (A) Figura representativa de la región de interés analizada para la cuantificación de vasos sanguíneos. (B-F) Se muestran fotografías representativas del proceso de neovascularización de vasos sanguíneos que expresan Endomucina<sup>+</sup> en médula ósea de los diferentes grupos experimentales administrados con cada tratamiento. (G) El análisis cuantitativo reveló una pérdida significativa en el grupo administrado con estreptozotocina (C) en comparación con el grupo control (B). Por otra parte, el grupo administrado con hidroxiapatita (D) mostró un aumento significativo comparado con el grupo diabético, que en contraste con los grupos administrados con calcitonina de salmón (E) y nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina (F) mostraron una pérdida significativa en la densidad de vasos sanguíneos Endomucina<sup>+</sup> en médula ósea en comparación con el grupo administrado con hidroxiapatita. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM (n=4-5 por grupo). \* $p < 0,05$ . Análisis estadístico de ANOVA de una vía con prueba post hoc Bonferroni.

## 8. DISCUSIÓN

A principios de la década se desconocían los mecanismos precisos que consolidaban el desarrollo de osteopatías como una enfermedad subyacente de enfermedades metabólicas, por ejemplo, diabetes tipo 1. En la actualidad se han reconocido múltiples mecanismos basados en señalización celular que correlacionan la comunicación multidireccional de las células óseas, sistema nervioso y mediadores del metabolismo como la insulina-glucosa (Cipriani, *et al.* 2020).

La simultaneidad de ambas enfermedades, diabetes y osteoporosis provoca a largo plazo una caída drástica en la calidad de vida de los pacientes aumentando de manera considerable la necesidad terapéutica de contrarrestar ambas enfermedades (American Diabetes Association 2013). Sin embargo, a pesar de que existen múltiples grupos de fármacos disponibles y comercializados en el mundo, sus efectos son limitados debido a la dosis y vía de administración empleada. Por lo que, surge la necesidad médica de desarrollar métodos alternos que permitan mejorar las limitaciones de dosis, margen terapéutico, vía de administración y tiempo de duración con el tratamiento.

Recientemente, la aplicación de la nanotecnología ha adquirido gran importancia en el ámbito médico debido al desarrollo de terapias a base de nanomateriales que mejoran considerablemente limitantes de los tratamientos convencionales actuales, tal es el caso de las nanopartículas como acarreadores de fármacos para aplicaciones biológicas (Akma *et al.* 2021; Ramesh *et al.* 2017). Debido a la problemática actual, en el presente estudio fue sintetizado un sistema de nanocomplejos híbridos que combina dos tratamientos de naturaleza química diferente, uno como regulador de la señalización celular ósea y el otro como componente esencial de la formación del sistema óseo, que a partir de una síntesis por precipitación iónica se estandarizó el encapsulado de hidroxapatita-calcitonina (NHCal) a base de zeína como tratamiento alternativo para osteoporosis en condiciones experimentales de diabetes tipo 1.

Se evaluó en un modelo *in vitro* e *in vivo* la eficacia de la nanoterapia en la viabilidad celular, proceso de mineralización y expresión de proteínas en un modelo validado de células MG-63 de osteosarcoma humano. Con base a los análisis fisicoquímicos se obtuvo

un tamaño de partícula entre 420-470 nanómetros con polidispersidad de 0.1-0.3 y un potencial zeta superficial entre -5 a -13 mV, que fueron confirmados con láser Doppler electroforético y microscopía electrónica de barrido (Sanmiguel *et al.* 2019). El análisis por espectroscopía de infrarrojo de las nanopartículas reveló longitudes de onda de 1031 (PO<sub>4</sub>), 1533 (N-O) y 2920 (N-H) cm<sup>-1</sup> correspondientes a los precursores de hidroxiapatita, calcitonina de salmón y zeína (Dai *et al.* 2016; Sanmiguel *et al.* 2019), por lo que estos datos sugieren una exitosa funcionalización y distribución parcialmente homogénea del sistema.

El análisis en el modelo *in vitro* mediante el método de resazurina mostró diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad entre el 80 a 100 % con diferentes combinaciones de hidroxiapatita y calcitonina en sus formas de precursor, sugiriendo que la viabilidad es afectada de manera dependiente de la combinación. Adicionalmente con el ensayo de mineralización con rojo de alizarina se reveló que el porcentaje de mineralización alcanzó un aumento considerable durante 7 días, que después de 7 a 14 días el porcentaje disminuyó un 50% para todas las combinaciones de dosis de hidroxiapatita y calcitonina en el ensayo. Por lo que se permite inferir que el tiempo de mayor actividad de mineralización ocurre durante los 7 días iniciales en la línea celular. Por otra parte, en la expresión de proteínas óseas involucradas en la osteogénesis no se encontraron cambios significativos con base a la combinación de hidroxiapatita-calcitonina, pero cabe mencionar que se encontró una tendencia de incremento del 50% de 7 a 14 días de ejecución en el experimento, que puede estar implicando una activación celular en fases tempranas de mineralización.

Adicionalmente a estos hallazgos, en el modelo *in vivo* inducido por estreptozotocina se reveló que el tratamiento crónico con nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina mejora significativamente hasta un 20% el porcentaje de volumen óseo trabecular (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N) y separación trabecular (Tb. Sp) en comparación con el grupo de ratones diabéticos sin tratamiento, donde estos parámetros muestran una pérdida significativamente drástica en la integridad del cuello de fémur. Del mismo modo, el análisis histológico mostró que el tratamiento con nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina no influyó en la regeneración de fibras nerviosas sensoriales CGRP<sup>+</sup> y PGP

9.5<sup>+</sup>. Por el contrario, con la expresión de fibras nerviosas simpáticas TH<sup>+</sup>, vasos sanguíneos Endomucina<sup>+</sup> y macrófagos infiltrantes CD68<sup>+</sup> el tratamiento influyó positivamente con el aumento de expresión para estos marcadores mencionados anteriormente en comparación con el grupo de ratones diabéticos sin tratamiento.

La caracterización del sistema de nanocomplejos depende en gran medida de la concentración del principio activo en cuestión y la electronegatividad de las moléculas de este para funcionalizarse exitosamente con otros compuestos o moléculas (Halim, *et al.* 2021). En concreto con el estudio de Dai y colaboradores encontraron tamaños de partícula de 130 a 263 nanómetros, polidispersidad de 0.2 a 0.3 con potencial zeta superficial de -10 a -30 mV para nanopartículas de zeína y nanopartículas de zeína-lecitina respectivamente (Dai *et al.* 2016), que en comparación con nuestro estudio se obtuvo un tamaño promedio de partícula mayor de 420-470 nanómetros con polidispersidad de 0.1-0.3 y un potencial zeta superficial entre -5 a -13 mV debido a la combinación de hidroxiapatita, calcitonina y zeína, así mismo, la polidispersidad y potencial de carga presentó fluctuaciones en las mediciones obtenidas ya que la síntesis de nanocomplejos se encontraba en suspensión líquida, permitiendo que la suspensión se ionizara por la liberación de los principios activos encapsulados con el paso del tiempo de duración del tratamiento. Se ha identificado que la promoción en la viabilidad celular depende de la señalización intracelular de Ca<sup>+</sup> ejerciendo activación de los complejos Calcio-calmodulina-calcineurina-NFAT/NFκB (Izquierdo *et al.* 2014), por lo que en nuestro estudio la viabilidad celular pudo verse afectada debido a la presencia de calcio proveniente de la hidroxiapatita del nanocomplejo, que permite conocer los efectos citotóxicos adyacentes de la formulación sintetizada. Además, se observó que la hidroxiapatita en conjunto con la calcitonina de salmón presentó mayor efecto citotóxico, que puede deberse a la expresión de receptores CTR para calcitonina en células de osteoclasto en conjunto con la alta especificidad del receptor para moléculas de calcitonina (Kiriakopoulos *et al.* 2022). En comparación con el estudio de Taskiran y colaboradores donde evaluaron la viabilidad celular a 24 horas en células C6 provenientes de glioma de rata con exposición a calcitonina de salmón, sin reportar diferencias significativas (Taskiran *et al.* 2021). Este efecto se relacionó principalmente a la naturaleza de la línea

celular y la ausencia de receptores para calcitonina que son específicos y expresados únicamente por células óseas, que fueron evaluadas en nuestro estudio.

Se ha reportado que altas concentraciones de glucosa plasmática inhiben la diferenciación osteoblástica por regulación directa de la vía de señalización STAT3/SOC3 (Chen *et al.* 2022). Por otro lado, la fosfatasa alcalina (ALP) es considerada como uno de los marcadores tempranos de diferenciación de osteoblastos (Feng *et al.* 2008). En conjunto con la evidencia teórica, RUNX2 puede regular de manera importante otros mediadores óseos como osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN) (Komori *et al.* 2010). Así mismo, los osteoblastos secretan osteoprotegerina (OPG) incrementando la diferenciación del linaje de células osteoblásticas e inhibiendo el linaje de osteoclastos (Wang *et al.* 2013). En el estudio de Darsheen y colaboradores evaluaron el efecto de nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina administradas vía intravenosa en ratas hembra sprague Dawley en la expresión de marcadores séricos de calcio, fosforo y fosfatasa alcalina, revelando que el tratamiento crónico aumento significativamente la concentración de fosfatasa alcalina (Darsheen *et al.* 2020). Con base a los datos obtenidos en la expresión de proteínas dentro del estudio no se encontraron cambios significativos en la expresión relativa en células MG-63 administradas con hidroxiapatita-calcitonina, por lo que estos datos sugieren que la administración crónica de hidroxiapatita-calcitonina combinada no modifican la expresión de proteínas óseas, principalmente por la especificidad de la calcitonina por acción directa de osteoclastos.

En otro estudio por Enríquez y colaboradores reportó que la administración de estreptozotocina en ratones hembra ICR de 10 semanas de edad con 5 dosis consecutivas de 50 mg/kg vía intraperitoneal afecta negativamente la densidad mineral ósea, porcentaje de volumen óseo trabecular, grosor trabecular, número de trabéculas y separación trabecular en un tiempo de 12 semanas de inducción del modelo (Enriquez *et al.* 2017). En comparación con el presente estudio, se estandarizó la inducción del modelo experimental de diabetes tipo 1 en ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad con 5 dosis consecutivas de 65 mg/kg vía intraperitoneal con 12 semanas de duración del modelo, revelando una pérdida significativa en la densidad mineral ósea y porcentaje de volumen óseo trabecular. Del mismo modo, se encontró similitud en los datos reportados

del estudio de Darsheen y colaboradores con base a la densidad mineral ósea; donde se encontró que la administración de nanopartículas de hidroxiapatita-calcitonina aumenta significativamente un 10% la densidad mineral ósea en comparación con el grupo de ratas con cirugía de ovariectomía (Darsheen *et al.* 2020). En comparación con nuestro estudio, la administración con los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina aumentó del mismo modo la densidad mineral ósea y mejoró simultáneamente el porcentaje de volumen óseo trabecular, número de trabéculas y separación trabecular en comparación con el grupo de ratones diabéticos sin tratamiento. Estos hallazgos sugieren que la síntesis desarrollada con dosis bajas mejora considerablemente hasta un 10% la microarquitectura ósea en comparación con tratamientos convencionales como la calcitonina humana sintética, la cual es administrada con dosis altas de 100 a 200 UI, que con base a datos estadísticos aumenta la densidad mineral ósea pero su administración prolongada disminuye su efectividad terapéutica, que adicionalmente en los experimentos se encontró que la administración en los ratones con dosis altas manifestaron efectos adversos debido al tratamiento crónico con los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina.

Dentro de los hallazgos presentados del estudio, se añade la evaluación histológica de la densidad de marcadores de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y macrófagos; donde en estudios previos como el de Enríquez y colaboradores no se habían reportado otros marcadores involucrados durante la progresión y deterioro del sistema óseo en condiciones de diabetes tipo 1. Se encontró que el tratamiento influyó positivamente con el aumento en la expresión de fibras nerviosas simpáticas TH<sup>+</sup>, vasos sanguíneos Endomucina<sup>+</sup> y macrófagos infiltrantes CD68<sup>+</sup> en comparación con el grupo de ratones diabéticos sin tratamiento. Se encontró dentro del estudio un incremento significativo en la expresión de la densidad de fibras nerviosas simpáticas TH<sup>+</sup> en el grupo de ratones diabéticos sin tratamiento, hallazgo que coincide con el estudio de Giannulis y colaboradores donde caracterizaron la densidad de este marcador en islotes de Langerhans de ratones diabéticos (Giannulis *et al.* 2014).

En el estudio de Peng y colaboradores encontraron que en condiciones de diabetes la densidad de vasos sanguíneos disminuye significativamente un 50% en comparación con ratones control, mismo hallazgo encontrado en el estudio (Peng *et al.* 2016).

Adicionalmente, la presencia de hidroxiapatita permitió la promoción de la densidad de vasos sanguíneos en el grupo de ratones administrados con los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina e hidroxiapatita en su forma de precursor. De acuerdo con información reportada es altamente aceptado que el mecanismo involucrado de angiogénesis interactúa por la acción en macrófagos de tipo M2 promotores de angiogénesis (Ling *et al.* 2023), por lo que el mecanismo implícito de acción de los nanocomplejos sintetizados puede modular la polarización de macrófagos de tipo M1 y M2.

Kiriakopoulos y colaboradores han asociado que el osteoclasto es el principal blanco de acción farmacológico para la calcitonina y modulador clave de la resorción ósea (Kiriakopoulos *et al.* 2022). Dentro del estudio se encontró que la administración de calcitonina en ratones diabéticos disminuye significativamente la expresión del número de macrófagos, mientras que el grupo de ratones administrados con los nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina no revelaron el mismo efecto. Por lo que se sugiere que la calcitonina encapsulada del nanocomplejo modula de forma regulada su acción inhibitoria en células de macrófago en comparación con el grupo de ratones control.

A pesar de los hallazgos y resultados presentados, el estudio posee algunas limitantes que pueden enriquecer con más estudios a largo plazo el conocimiento de la progresión de la osteoporosis en condiciones de diabetes. Es imprescindible la comparación de más combinaciones de hidroxiapatita y calcitonina en la síntesis de nanocomplejos para su evaluación en modelos *in vivo* con condiciones experimentales de enfermedad, así como la evaluación en lapsos más prolongados de tiempo la administración de los nanocomplejos para comparar a tiempos iniciales de tratamiento con administración crónica. Por último, desarrollar un método alternativo de obtención de calcitonina de salmón o sintética para estudios preclínicos posteriores, debido a la poca accesibilidad y rentabilidad de la comercialización de hormonas biológicas.

Esta investigación subraya la urgente necesidad de abordar la osteoporosis en pacientes con diabetes, una problemática de salud pública que a menudo se pasa por alto. Nuestros hallazgos no solo aportan algunos de los complejos mecanismos que subyacen a esta condición, sino que también destacan la importancia de un enfoque multidisciplinario que

integre la progresión metabólica y la salud ósea, que además brinda un modelo de estudio *in vivo* que puede ser empleado para estudiar las vías de señalización que se interceptan en estas enfermedades. Es fundamental que investigadores y profesionales de la salud trabajen conjuntamente para desarrollar estrategias de intervención efectivas que mejoren la calidad de vida de estos pacientes. Solo así podremos mitigar las complicaciones asociadas y garantizar un futuro más saludable para quienes enfrentan el desafío de la diabetes.

## 9. CONCLUSIONES

- Se demostró la caracterización exitosa en la funcionalización de hidroxiapatita y calcitonina con tamaños de partícula homogéneos y cargas superficiales electronegativas semejantes con estudios previos.
- La administración de hidroxiapatita-calcitonina combinada afecta la viabilidad celular de manera independiente a dosis crecientes e incrementa el porcentaje de mineralización a partir de los 7 días en células MG-63.
- La administración de hidroxiapatita-calcitonina combinada no afecta la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de regeneración ósea en células MG-63.
- La administración de nanocomplejos híbridos de hidroxiapatita-calcitonina mejora significativamente la microarquitectura ósea trabecular del cuello de fémur en ratones hembra con diabetes tipo 1.
- La administración de nanocomplejos híbridos de hidroxiapatita-calcitonina mejora significativamente la densidad de fibras nerviosas simpáticas TH<sup>+</sup>, vasos sanguíneos y macrófagos CD68<sup>+</sup> en el cuello de fémur en ratones hembra con diabetes tipo 1.

## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar diferentes combinaciones de dosis de hidroxiapatita y calcitonina para la síntesis de los nanocomplejos, así como agregar más análisis para complementar la caracterización fisicoquímica de los nanocomplejos.
- Evaluar a tiempos más prolongados el efecto de la administración de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad y microarquitectura ósea.
- Evaluar a tiempos más prolongados el efecto de la administración de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en la densidad de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y macrófagos infiltrantes en médula ósea de cuello de fémur.
- Desarrollar un método alternativo de producción o síntesis de calcitonina para realización del estudio.
- Evaluar el efecto inmunomodulador de la administración crónica de nanocomplejos de hidroxiapatita-calcitonina en otros modelos experimentales con osteosarcoma o artritis reumatoide.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Abdul Halim, N. A., et al. (2021). "Nanomaterials-Upconverted Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering and a Platform for Drug Delivery." Int J Nanomedicine **16**: 6477-6496.

American Diabetes, A. (2013). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **36 Suppl 1**(Suppl 1): S67-74.

An, Y., et al. (2019). "Activation of ROS/MAPKs/NF-kappaB/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis." FASEB J **33**(11): 12515-12527.

Bandeira, L., et al. (2016). "Pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral salmon calcitonin in the treatment of osteoporosis." Expert Opin Drug Metab Toxicol **12**(6): 681-689.

Bernards, M. T., et al. (2008). "Adhesion of MC3T3-E1 cells to bone sialoprotein and bone osteopontin specifically bound to collagen I." J Biomed Mater Res A **86**(3): 779-787.

Chen, X., et al. (2022). "Xianling Gubao attenuates high glucose-induced bone metabolism disorder in MG63 osteoblast-like cells." PLoS One **17**(12): e0276328.

Cho, W., et al. (2015). "Design of salmon calcitonin particles for nasal delivery using spray-drying and novel supercritical fluid-assisted spray-drying processes." Int J Pharm **478**(1): 288-296.

Cipriani, C., et al. (2020). "The Interplay Between Bone and Glucose Metabolism." Front Endocrinol (Lausanne) **11**: 122.

Conte, C., et al. (2018). "Insulin resistance and bone: a biological partnership." Acta Diabetol **55**(4): 305-314.

Dai, L., et al. (2016). "The Interaction between Zein and Lecithin in Ethanol-Water Solution and Characterization of Zein-Lecithin Composite Colloidal Nanoparticles." PLoS One **11**(11): e0167172.

Enriquez-Perez, I. A., et al. (2017). "Streptozocin-induced type-1 diabetes mellitus results in decreased density of CGRP sensory and TH sympathetic nerve fibers that are positively correlated with bone loss at the mouse femoral neck." Neurosci Lett **655**: 28-34.

Feng J, Shi Z, Ye Z. Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells. Biol Pharm Bull. 2008; 31(6):1067-70. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1067> PMID: 18520031

Forte, L., et al. (2016). "Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized hydroxyapatite: An in vitro osteoblast-osteoclast-endothelial cell co-culture study." Acta Biomater **32**: 298-308.

Furman, B. L. (2021). "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats." Curr Protoc **1**(4): e78.

- Giannulis, I., et al. (2014). "Increased density of inhibitory noradrenergic parenchymal nerve fibers in hypertrophic islets of Langerhans of obese mice." Nutr Metab Cardiovasc Dis **24**(4): 384-392.
- Harizi, H., et al. (2007). "Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosenitivity." J Neuroimmunol **189**(1-2): 59-68.
- He, Y., et al. (2022). "The Relationship between Osteoinduction and Vascularization: Comparing the Ectopic Bone Formation of Five Different Calcium Phosphate Biomaterials." Materials (Basel) **15**(10).
- Hidalgo-Bastida, L. A. and S. H. Cartmell (2010). "Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering." Tissue Eng Part B Rev **16**(4): 405-412.
- Izquierdo, J. H., et al. (2014). "Calcium, channels, intracellular signaling and autoimmunity." Reumatol Clin **10**(1): 43-47.
- Jelinek, D., et al. (2013). "The C57BL/6J Niemann-Pick C1 mouse model with decreased gene dosage has impaired glucose tolerance independent of body weight." Gene **527**(1): 65-70.
- Karsdal, M. A., et al. (2009). "A pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of synthetic and recombinant oral salmon calcitonin." J Clin Pharmacol **49**(2): 229-234.
- Kiriakopoulos, A., et al. (2022). "Calcitonin: current concepts and differential diagnosis." Ther Adv Endocrinol Metab **13**: 20420188221099344.
- Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 658:43–9. [https:// doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9_5) PMID: 19950014
- Kotak, D. J. and P. V. Devarajan (2020). "Bone targeted delivery of salmon calcitonin hydroxyapatite nanoparticles for sublingual osteoporosis therapy (SLOT)." Nanomedicine **24**: 102153.
- Langen, U. H., et al. (2017). "Cell-matrix signals specify bone endothelial cells during developmental osteogenesis." Nat Cell Biol **19**(3): 189-201.
- Lee, T. H., et al. (2010). "Thermal stability and conformational structure of salmon calcitonin in the solid and liquid states." Biopolymers **93**(2): 200-207.
- Lenzen, S. (2008). "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes." Diabetologia **51**(2): 216-226.
- Limlawan, P., et al. (2023). "Delivery of microRNA-302a-3p by APTES modified hydroxyapatite nanoparticles to promote osteogenic differentiation in vitro." BDJ Open **9**(1): 8.

- Liu, C., et al. (2020). "Anti-angiogenic effect of Shikonin in rheumatoid arthritis by downregulating PI3K/AKT and MAPKs signaling pathways." J Ethnopharmacol **260**: 113039.
- Liu, L., et al. (2019). "Enhancement of oral bioavailability of salmon calcitonin through chitosan-modified, dual drug-loaded nanoparticles." Int J Pharm **557**: 170-177.
- Malchiodi-Albedi, F., et al. (2010). "Lipid raft disruption protects mature neurons against amyloid oligomer toxicity." Biochim Biophys Acta **1802**(4): 406-415.
- Martinez-Sanmiguel, J. J., et al. (2019). "Anti-inflammatory and antimicrobial activity of bioactive hydroxyapatite/silver nanocomposites." J Biomater Appl **33**(10): 1314-1326.
- Mejia Suaza, M. L., et al. (2023). "Poly(vinyl alcohol)/Silk Fibroin/Ag-NPs Composite Nanofibers as a Substrate for MG-63 Cells' Growth." Polymers (Basel) **15**(8).
- Motyl, K. J., et al. (2012). "Amelioration of type I diabetes-induced osteoporosis by parathyroid hormone is associated with improved osteoblast survival." J Cell Physiol **227**(4): 1326-1334.
- Munoz-Islas, E., et al. (2021). "Effect of Experimental Gestational Diabetes Mellitus on Mechanical Sensitivity, Capsaicin-Induced Pain Behaviors and Hind Paw Glabrous Skin Innervation of Male and Female Mouse Offspring." J Pain Res **14**: 1573-1585.
- Nagy, C. and E. Einwallner (2018). "Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT)." J Vis Exp(131).
- Peng, J., et al. (2016). "Low bone turnover and reduced angiogenesis in streptozotocin-induced osteoporotic mice." Connect Tissue Res **57**(4): 277-289.
- Poiana, C. and C. Capatina (2017). "Fracture Risk Assessment in Patients With Diabetes Mellitus." J Clin Densitom **20**(3): 432-443.
- Ramesh, N., et al. (2018). "Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **106**(5): 2046-2057.
- Ran, L., et al. (2023). "Strontium-doped hydroxyapatite and its role in osteogenesis and angiogenesis." Int J Dev Biol **67**(4): 137-146.
- Roep, B. O., et al. (2021). "Type 1 diabetes mellitus as a disease of the beta-cell (do not blame the immune system?)." Nat Rev Endocrinol **17**(3): 150-161.
- Sellmeyer, D. E., et al. (2016). "Skeletal Metabolism, Fracture Risk, and Fracture Outcomes in Type 1 and Type 2 Diabetes." Diabetes **65**(7): 1757-1766.
- Shao, X., et al. (2014). "Metformin rescues the MG63 osteoblasts against the effect of high glucose on proliferation." J Diabetes Res **2014**: 453940.

Taskiran, A. S. and M. Ergul (2021). "The effect of salmon calcitonin against glutamate-induced cytotoxicity in the C6 cell line and the roles the inflammatory and nitric oxide pathways play." Metab Brain Dis **36**(7): 1985-1993.

Tesfaye, S. and D. Selvarajah (2012). "Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy." Diabetes Metab Res Rev **28 Suppl 1**: 8-14.

Veerla, S. C., et al. (2019). "Controlled nanoparticle synthesis of Ag/Fe co-doped hydroxyapatite system for cancer cell treatment." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **98**: 311-323.

Wang CY, Yang SF, Wang Z, Tan JM, Xing SM, Chen DC, et al. PCAF acetylates Runx2 and promotes osteoblast differentiation. *J Bone Miner Metab.* 2013; 31(4):381–9. <https://doi.org/10.1007/s00774-013-0428-y> PMID: 23468178

Wszola, M., et al. (2021). "Streptozotocin-Induced Diabetes in a Mouse Model (BALB/c) Is Not an Effective Model for Research on Transplantation Procedures in the Treatment of Type 1 Diabetes." Biomedicines **9**(12).