



ARTÍCULO ORIGINAL / Original

## EL TRATAMIENTO ORAL CON METFORMINA PREVIENE SIGNOS TEMPRANOS DE ARTERIOESCLEROSIS AÓRTICA INDUCIDA POR AGE/RAGE EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO

Lucas Streckwall\*,<sup>ORCID</sup> Nancy Martini,<sup>ORCID</sup> Claudia Sedlinsky,<sup>ORCID</sup> León Schurman,<sup>ORCID</sup> María Virginia Gangotti,<sup>ORCID</sup> Antonio Desmond McCarthy<sup>ORCID</sup>

Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

### Resumen

**Introducción:** El síndrome metabólico (SM) se asocia al aumento de estrés carbonílico y productos de glicación avanzada (AGE) y favorece la calcificación arterial (CA) por transdiferenciación osteogénica de células de músculo liso vascular (CMLV). La metformina (MET) inhibe esa transdiferenciación in vitro. Evaluamos si MET oral previene CA en un modelo experimental de SM.

**Materiales y métodos:** Ratas Wistar macho jóvenes adultos fueron separadas en dos grupos: uno recibió agua como bebida (C) y el otro una solución 20% de fructosa (F). Tras dos semanas, y por cuatro más, cada grupo original se dividió, agregándose MET (100 mg/kg/día) a la bebida de la mitad de cada grupo (así, M y FM). Se midieron parámetros metabólicos y corporales. La aorta se disecó para análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico. Se aislaron CMLV aórticas para evaluar la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), producción de colágeno, mineralización extracelular y expresión génica de Runx2 y receptor para AGE (RAGE).

**Resultados:** El grupo F desarrolló rasgos compatibles con SM: mayor adiposidad, hiperglucemia, dislipemia y aumento de fructosamina. Las aortas de F evidenciaron reducción de la relación capa elástica/muscular, aumento de colágeno, acumulación de AGE y sobreexpresión de RAGE. Las CMLV de F mostraron mayor actividad FAL, incremento de colágeno y mineralización, junto a aumento de expresión de Runx2 y RAGE. El cotratamiento con MET previno estas alteraciones. In vitro, MET bloqueó la inducción de RAGE por AGE; efecto que se anuló con un inhibidor de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK).

**Conclusión:** Estos resultados indican que MET atenúa la glicación extracelular, la activación AGE/RAGE y el remodelado vascular asociado al SM experimental.

**Palabras clave:** síndrome metabólico, productos finales de glicación avanzada, receptor para productos finales de glicación avanzada, arterioesclerosis, metformina, transdiferenciación osteoblástica, quinasa dependiente de AMP.

## **ORAL TREATMENT WITH METFORMIN PREVENTS EARLY SIGNS OF AGE/RAGE-INDUCED AORTIC ARTERIOSCLEROSIS IN RATS WITH METABOLIC SYNDROME**

### **Abstract**

**Introduction:** Metabolic syndrome (MS) is associated with increased carbonyl stress, accumulation of advanced glycation end products (AGE), and induction of arterial calcifications (AC) through the osteoblastic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC). Metformin (MET) inhibits this transdifferentiation *in vitro*. We evaluated whether oral MET can prevent AC in an experimental model of MS.

**Materials and Methods:** Young adult male Wistar rats were divided into two groups: one received water as the drinking source (C) and the other a 20% fructose solution (F). After two weeks, and for an additional four weeks, each group was subdivided, and MET (100 mg/kg/day) was added to the drinking water of one half (thus, M and FM). Metabolic and body parameters were measured. The aorta was dissected for histomorphometric and immunohistochemical analyses. Aortic VSMC were isolated to assess alkaline phosphatase

(ALP) activity, collagen production, extracellular matrix mineralization, and gene expression of Runx2 and the receptor for AGE (RAGE).

**Results:** Group F developed features consistent with MS, including increased adiposity, non-fasting hyperglycemia, dyslipidemia, and elevated serum fructosamine. Aortas from F animals showed a reduced elastic-to-muscular ratio, increased collagen content, AGE accumulation, and RAGE overexpression. VSMC from F rats displayed higher ALP activity, increased collagen production and mineralization, and elevated expression of Runx2 and RAGE. Cotreatment with MET prevented all these MS-induced alterations. *In vitro*, MET blocked AGE-induced RAGE upregulation by VSMC, an effect abolished by an AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibitor.

**Conclusion:** These findings indicate that oral MET treatment attenuates extracellular glycation, AGE/RAGE activation, and vascular remodeling associated with experimental MS.

**Keywords:** metabolic syndrome, advanced glycation end-products, receptor for advanced glycation end-products; arteriosclerosis, metformina, osteoblastic transdifferentiation, AMP-dependent kinase.

### **Introducción**

El síndrome metabólico (SM) es una entidad patológica caracterizada por un conjunto de alteraciones metabólicas interrelacionadas, como obesidad central, dislipidemia, hiperglucemia, insulinoresistencia e hipertensión, que incrementan significativamente el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2.<sup>1</sup> La creciente prevalencia del SM, impulsada principalmente por el consumo de dietas ricas en fructosa y grasas saturadas (predominantes en los países occidentales y estrechamente asociadas al aumento global

de la obesidad) representa un importante desafío sanitario. En este contexto, la combinación de resistencia a la insulina, dislipidemia aterogénica, hipertensión, estado protrombótico y disfunción endotelial eleva notablemente el riesgo de enfermedad cardiovascular y favorece la acumulación de calcificaciones arteriales (CA).<sup>2</sup> Diversos estudios clínicos han demostrado una clara asociación entre la presencia de CA y el desarrollo del SM o de sus componentes individuales, como la obesidad, hipertensión, dislipidemia, resistencia a la insulina o hiperglucemia, e incluso con niveles



elevados de hemoglobina glicada.<sup>3,4</sup> En concordancia, el suero de individuos con SM y CA presenta concentraciones aumentadas de factores promotores de la biomineralización extracelular, tales como fosfato inorgánico,<sup>5</sup> fosfatasa alcalina (FAL),<sup>6</sup> osteoprotegerina,<sup>7</sup> esclerostina<sup>8</sup> y osteocalcina.<sup>9</sup>

La arterioesclerosis y la calcificación vascular emergen como complicaciones estructurales clave que vinculan las alteraciones metabólicas con la disfunción y la pérdida de elasticidad arterial. Este proceso está mediado, en parte, por la transdiferenciación osteoblástica de las células de músculo liso vascular (CMLV) presentes en la túnica media, las cuales pierden su fenotipo contráctil y adquieren características propias de los osteoblastos, las células formadoras de hueso.<sup>10</sup>

Entre los componentes del SM, la hiperglucemia crónica desempeña un papel central, ya que induce estrés carbonílico por acumulación de compuestos dicarbonílicos altamente reactivos, como metilglioxal (MGO) y 3-desoxiglucosona (3-DG), derivados de la glucólisis o de la vía de los polioles.<sup>11</sup> Estos compuestos promueven la glicación no enzimática de proteínas y la consecuente acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGE) en la pared vascular. Los AGE generan modificaciones estructurales irreversibles en la matriz extracelular, especialmente sobre colágeno y elastina, provocando rigidez y pérdida de distensibilidad arterial debido al entrecruzamiento (*crosslinking*) de las fibras. Además, interactúan con el receptor para productos de glicación avanzada (RAGE), expresado en múltiples tipos celulares, incluidas las CMLV, activando vías de señalización inflamatorias y procalcificantes.<sup>12</sup>

La activación del eje AGE/RAGE desencadena la translocación del factor de transcripción NFκB,<sup>13</sup> promoviendo un estado de inflamación crónica, estrés oxidativo intracelular y la expresión de genes osteogénicos, entre ellos el factor de transcripción relacionado con runt 2 (Runx2), el cual desempeña

un papel crítico en la respuesta procalcificante. Runx2 induce la transdiferenciación osteoblástica de las CMLV, facilitando la remodelación de la matriz arterial y la mineralización ectópica en la túnica media, lo que contribuye a la progresión de la calcificación vascular.<sup>10</sup> Particularmente, si la activación de NFκB mediada por RAGE es sostenida y prolongada, superando los mecanismos endógenos de inhibición, esto conduce a una respuesta inflamatoria persistente y a la disfunción celular, al tiempo que estimula la sobreexpresión del propio RAGE, generando un bucle de retroalimentación positiva.<sup>13</sup>

El entrecruzamiento de las fibras de colágeno con AGE incrementa su resistencia a la degradación por colagenasas, promoviendo el engrosamiento de la pared; mientras que la acumulación de AGE sobre la elastina (proteína clave para la distensibilidad arterial) induce pérdida de elasticidad aórtica. Asimismo, la rigidez inducida por AGE favorece la migración, proliferación y diferenciación osteoblástica de las CMLV mediante la inducción de Runx2.<sup>14,15</sup> De esta manera, el colágeno y la elastina modificados por AGE no solo pierden su función estructural normal, sino que adquieren un papel activo en la progresión de la CA.

La elastina también resulta alterada por la acción de diversas metaloproteinasas de matriz (MMP), cuya expresión aumenta en condiciones de hiperglucemia y estrés oxidativo.<sup>12,16</sup> La degradación de elastina genera péptidos bioactivos (elastoquinas), que promueven la proliferación y transdiferenciación osteogénica de las CMLV,<sup>16,17</sup> contribuyendo a una matriz extracelular más rígida, propensa a la mineralización y con menor capacidad de amortiguación del flujo pulsátil, características que contribuyen al deterioro progresivo de la función arterial.

La metformina (MET), una biguanida, es uno de los tratamientos farmacológicos más utilizados para prevenir alteraciones metabólicas asociadas a la diabetes mellitus tipo 2, SM y/o intolerancia a la glucosa, debido a su

acción euglucemiante mediada por activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK), una enzima clave en la regulación del metabolismo, sobre todo a nivel hepático<sup>18</sup> En ensayos *in vitro*, la MET ha demostrado inhibir la transdiferenciación osteoblástica de CMLV mediante diversos mecanismos, como la producción de óxido nítrico (NO) mediante la activación de la vía AMPK/eNOS/NO<sup>19</sup>, inhibiendo la translocación del factor NFκB<sup>20</sup> o desestabilizando al factor Runx2 al aumentar su proteólisis.<sup>21</sup>

En el presente trabajo buscamos evaluar la eficacia de un tratamiento oral con MET para prevenir alteraciones arterioescleróticas en la aorta, estudiando mecanismos que involucran el estrés metabólico inducido por carbohidratos, tales como la acumulación de productos de glicación avanzada o AGE extracelulares, y su interacción/modulación con el receptor RAGE expresado por CMLV, utilizando para tal fin un modelo preclínico de SM inducido por fructosa en ratas.

## Materiales y métodos

### Diseño experimental y tratamiento

Ratas macho Wistar adultas jóvenes de 12 semanas de edad al inicio, fueron alojadas y mantenidas en un ambiente controlado a 23 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h:12 h, y alimentadas con alimento estándar para ratas. Inicialmente, 20 animales fueron divididos al azar en dos grupos de 10 animales cada uno: un grupo recibió agua como fuente de bebida y el otro recibió una solución de fructosa al 20% para inducir síndrome metabólico (Biopack®, Argentina), ambos *ad libitum*. Después de 14 días, y durante 4 semanas adicionales, se agregó metformina (MET) a razón de 100 mg/kg de peso corporal por día (Química Montpellier, Argentina) a la fuente de bebida de la mitad de los animales de cada grupo<sup>22</sup>. De esta manera, se establecieron cuatro grupos (n=5): C (solo agua), F (solución de fructosa al 20%), M (agua + MET 100 mg/kg/día) y FM (solución de fructosa al 20% + MET 100 mg/kg/día). Este tamaño muestral

reducido podría limitar la capacidad de detectar diferencias más sutiles, especialmente en parámetros con alta variabilidad biológica. Sin embargo, y de acuerdo con lo establecido en las Guías indicadas más adelante, al observarse diferencias significativas entre los grupos en varios parámetros de relevancia fisiopatológica se tomó la decisión de no ampliar el tamaño muestral. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Manejo y Entrenamiento de Animales de Laboratorio publicada por la Universities Federation for Animal Welfare,<sup>23</sup> y el estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (protocolo CI-CUAL 001-00-15).

### Obtención de parámetros bioquímicos y corporales

Las ratas no fueron privadas de agua ni sometidas a ayuno antes de la anestesia y eutanasia. Previo al sacrificio, las ratas fueron anestesiadas por inhalación de vapores de Sevoflurano 100%® (Cristalia, Argentina), luego se obtuvieron sus pesos y se tomaron muestras de sangre para obtención de suero, en los cuales se midió glucosa, triglicéridos (TG) y colesterol HDL (HDLc), utilizando un analizador automático de química clínica CM250 Metrolab® y kits comerciales (Wiener Lab. Group, Argentina). La relación TG/HDLc se determinó como marcador subrogante de resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular.<sup>24</sup> Además, se cuantificó fructosamina sérica mediante un kit comercial (BioSystems, España) como marcador de glicación extracelular. Luego de la extracción de sangre, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia, tras lo cual la aorta y los tejidos adiposos mesentérico y epididimario fueron disecados.

### Análisis histológico de la pared arterial

Porciones de la aorta abdominal se fijaron durante 24 horas, se incluyeron en parafina y



se obtuvieron cortes transversales de 4  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un micrótopo RMT-20 Type Erma® (TechLabs, India). Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), Sirius Red, fucsina-resorcina de Weigert y rojo de Alizarina. Las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon Coolpix 4500® acoplada a un microscopio Nikon ECLIPSE Ei® (Nikon, Japón). Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ® (<https://imagej.net/ij/>) utilizando la escala del microscopio y complementos de deconvolución de color. El grosor de la túnica media (calculado como el promedio de la distancia entre las membranas elásticas interna y externa) y la relación capa elástica/capa muscular (calculada como la relación entre el espesor promedio de la membrana elástica y el espesor promedio de la capa muscular) se midieron en cortes teñidos con H&E, mientras que el porcentaje del área ocupada por fibras de colágeno y elastina se cuantificó en cortes teñidos con Sirius Red y fucsina-resorcina, respectivamente.<sup>25</sup> Las secciones teñidas con rojo de Alizarina se utilizaron para evidenciar la presencia de depósitos de calcio.

### **Análisis inmunohistoquímico de AGE y RAGE en pared arterial**

La acumulación de carboximetil-lisina (CML, estructura AGE muy prevalente de origen glicoxidativo), así como la expresión del receptor RAGE, se evaluaron en la pared aórtica mediante inmunohistoquímica cromogénica. Brevemente, se desparafinaron y rehidrataron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de aorta abdominal en gradiente alcohólico, bloqueando la actividad de peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,5%. La recuperación antigénica se realizó con el reactivo Trilogy® (Cell Marque, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Las secciones se trataron con una solución bloqueante, se incubaron con anticuerpos primarios anti-CML o anti-RAGE® (1:500; Abcam, Reino Unido) durante 48 horas a 4 °C, se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios

específicos (1:1000; Vector Laboratories, EE. UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras otro lavado, las secciones se incubaron con los reactivos del kit Vectastain Elite ABC® (Vector Laboratories, EE. UU.) durante 1 hora adicional. Finalmente, las muestras se revelaron con solución de 3,3'-diaminobencidina, se lavaron y se montaron. Las fotografías se adquirieron con una cámara digital Nikon Coolpix 4500® acoplada a un microscopio Nikon ECLIPSE Ei® (Nikon, Japón) bajo las mismas condiciones de iluminación y en áreas comparables.

### **Aislamiento y cultivo de células de músculo liso vascular**

Los miocitos vasculares se aislaron a partir de anillos de aorta toracoabdominal según lo descrito previamente.<sup>22,26</sup> En resumen, bajo condiciones estériles, se separó la túnica adventicia y parte de la aorta restante se cortó en anillos de aproximadamente 1 mm. Los anillos individuales se colocaron en frascos de cultivo y se incubaron con DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina/estreptomocina), a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire. Después de 24 horas, el medio se reemplazó por DMEM con 10% de SFB y antibióticos, renovándolo cada 2-3 días. Tras dos semanas, las células fueron caracterizadas como CMLV por su morfología cilíndrica y alargada de extremos ahusados y por la expresión de  $\alpha$ -actina mediante inmunofluorescencia. Brevemente, las células se cultivaron sobre cubreobjetos durante 24 horas, se lavó con PBS, se fijaron con p-formaldehído en PBS al 4%, se permeabilizaron con etanol absoluto y luego se bloqueó con 10% de SFB-PBS. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario de ratón anti- $\alpha$ -actina de músculo liso® (1:200, Santa Cruz Biotechnology, EEUU) y se incubó a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavó con PBS-Tween 20 0,01%, y se agregó el anticuerpo secundario marcado con FITC anti-IgG de ratón® (1:200, Santa

Cruz Biotechnology, EE.UU.) y se incubó con agitación suave a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas. Finalmente se lavó con PBS y en uno de los lavados se incluyó Hoechst 33258 (tiñe los núcleos de azul). Se montaron los cubres sobre portaobjetos con glicerina/PBS 80%. Se obtuvieron las imágenes con Microscopio confocal Espectral Leica TCS SP5® con objetivo de 63Xoil utilizando la línea de excitación láser 495 para el FITC® (color verde). Este microscopio no posee láser para poder observar emisión azul.

Cuando las CMLV alcanzaron la confluencia, se recolectaron mediante la adición de tripsina al 0,05% y se subcultivaron en placas multipocillo para los diferentes experimentos descriptos a continuación.

#### **Análisis del fenotipo osteoblástico de las CMLV**

Las CMLV se sembraron a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos que contenían DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos, e incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Una vez alcanzada la confluencia (a los 5 días), se evaluó el potencial osteogénico midiendo la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), la producción de colágeno tipo 1 y la mineralización de la matriz extracelular, según se describe a continuación.

Para la determinación de FAL, las monocapas celulares se lavaron con PBS y se solubilizaron en 500 µL de Tritón X-100 al 0,1%. Tras una centrifugación, se tomaron alícuotas del extracto celular total para determinar proteínas por el método de Bradford y para evaluar espectrofotométricamente, a 405 nm, la velocidad inicial de hidrólisis del p-nitrofenil fosfato en p-nitrofenol a 37 °C.<sup>22</sup>

Para evaluar la producción de colágeno tipo 1, las células se fijaron con solución de Bouin y se tiñeron con colorante Sirius Red durante 1 hora. El material teñido se disolvió en 1 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y la absorbancia

de la solución se midió a 550 nm.<sup>26</sup> En pocillos replicados, las células se extrajeron con 500 µL de Tritón X-100 al 0,1% para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

El calcio extracelular se evaluó mediante tinción con rojo de Alizarina. El colorante unido a los depósitos minerales se disolvió con 1 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm.<sup>27</sup> En pocillos replicados, las células se extrajeron con 500 µL de Tritón X-100 al 0,1% para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

#### **Análisis de expresión génica de las CMLV**

La expresión génica de las CMLV para el factor Runx2 (marcador clave de la transdiferenciación osteoblástica) y para RAGE (receptor para AGE, implicado en dicha transdiferenciación) se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Las células se sembraron en placas de seis pocillos y se cultivaron en DMEM con 10% SFB hasta alcanzar la confluencia. Luego se extrajo el ARN total utilizando el reactivo QUICK-ZOL® según las instrucciones del fabricante (Kalium Technologies, Argentina). La retrotranscripción se realizó empleando transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney® (Productos Bio-Lógicos, Argentina). Los *primers* específicos (Tabla 1) se diseñaron a partir de la base de datos de secuencias del NCBI utilizando el *software* CLC Genomics Workbench® (QIAGEN) y fueron sintetizados por Macrogen® (República de Corea). Tras la separación de los productos de RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa y su visualización con GelRed, la intensidad de las bandas se cuantificó con el programa ImageJ utilizando β-actina como gen de referencia. Aunque hubiera sido relevante complementar esta evaluación semicuantitativa de la expresión génica por métodos genómicos y proteómicos cuantitativos, esto no fue posible por



**Tabla 1.** Primers utilizados para RT-PCR

Marcador	Genbank Code	Tamaño (bp)		Secuencia
$\beta$ -actina	NM_031144.3	345	Fw	CCTTCAACACCCCGAGCCAT
			Rv	CATAGCTCTTCTCCAGGGA
Runx2 (2 bandas)	NM_001278483.2	598/424	Fw	GCCGGGAATGATGAGAACTA
			Rv	TGAGAGAGGAAGGCCAGA
RAGE	NM_053336.2	1109	Fv	GTCAGAACATCACAGCC
			Rv	CGCTTCCTCTGACTGATT

limitaciones de equipamiento y/o insumos de nuestro laboratorio.

#### **Análisis del efecto *in vitro* de MET y AGE sobre la expresión génica de RAGE en CMLV**

La albúmina sérica bovina (BSA) modificada por productos finales de glicación avanzada (AGE-BSA) se obtuvo incubando BSA libre de ácidos grasos® (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en una concentración de 10 mg/mL bajo condiciones estériles, con 33 mM de D-glicolaldehído en PBS 150 mM, pH 7,4, a 37 °C durante 3 días. El exceso del azúcar se eliminó mediante centrifugación/filtración con cartuchos de 10 kDa de *cutoff*. La formación de AGE se confirmó y cuantificó por emisión de fluorescencia a 420 nm tras excitación a 340 nm. La BSA no glicada (control) se obtuvo excluyendo el D-glicolaldehído de la mezcla de incubación.<sup>28</sup>

Para estos experimentos, las CMLV control (del grupo C) se cultivaron en placas de seis pocillos hasta alcanzar la confluencia. Luego se reemplazó el medio y las células se incubaron durante 72 horas en DMEM con 5% SFB, en presencia de 100  $\mu$ g/mL de AGE-BSA o BSA no glicada, con o sin la adición de 500  $\mu$ M de MET y/o 0,5  $\mu$ M de compuesto C o dorsomorfina, un potente inhibidor de la activación/fosforilación de AMPK.<sup>29</sup> Tras las 72 horas de incubación, la expresión génica de RAGE se evaluó mediante RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa, según lo descrito anteriormente.

#### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los supuestos de distribución normal y homocedasticidad se verificaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba *post hoc* de Tukey utilizando el software GraphPad® (San Diego, EE. UU.); se consideraron como estadísticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### **Resultados**

##### **Parámetros bioquímicos y corporales de los grupos experimentales**

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos al final del estudio, los animales tratados únicamente con fructosa (grupo F) mostraron varios cambios compatibles con el SM (Tabla 2): un aumento significativo en la adiposidad (Figura 1), en la glucemia posprandial, en los niveles de triglicéridos (TG) y en la relación TG/HDLc (vs. grupo C). Todos estos efectos fueron total o parcialmente prevenidos por el cotratamiento Fructosa+MET (grupo FM).

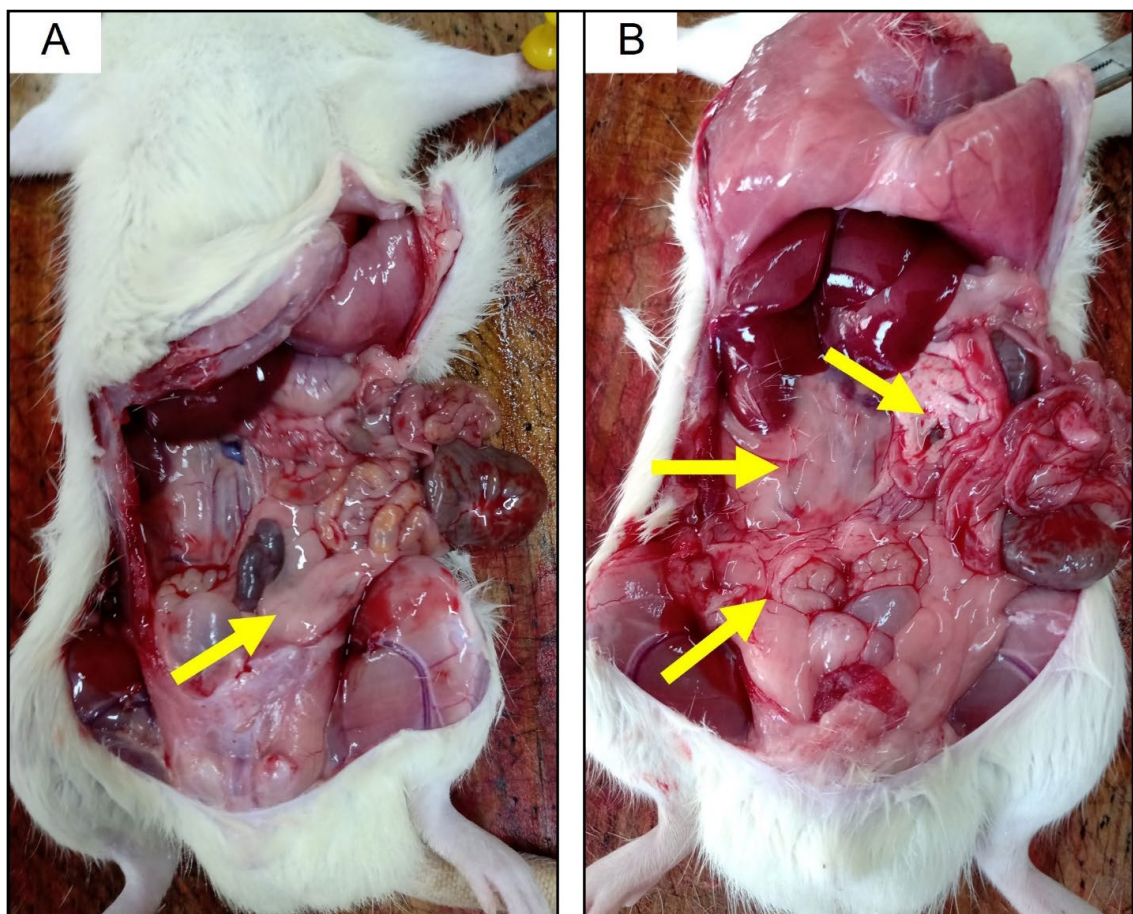
##### **MET previene alteraciones histológicas aórticas inducidas por el SM**

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el grosor total de la túnica media entre los grupos, los animales expuestos

**Tabla 2.** Parámetros anatómicos y perfiles séricos tras tratamientos de 6 semanas de fructosa y/o 4 semanas de metformina

	C	F	M	FM
<b>Peso corporal (g)</b>	284 ± 22	268 ± 39	278 ± 26	261 ± 48
<b>Tejido adiposo (% de peso corporal)</b>	3,30 ± 0,25	4,14 ± 0,15 <sup>#</sup>	3,57 ± 0,21	3,58 ± 0,13
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	178 ± 9,00	322 ± 1900 <sup>***</sup>	212 ± 7,00	218 ± 14,00
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	48,0 ± 5,6	121,8 ± 22,6 <sup>#</sup>	87,8 ± 18,4	97,2 ± 12,8
<b>TG/HDLc</b>	2,5 ± 0,2	5,6 ± 1,1 <sup>#</sup>	2,82 ± 0,8	4,7 ± 0,7

C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: <sup>#</sup>p<0,05 vs. C; <sup>\*\*\*</sup>p<0,001 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=5.



**Figura 1.** Fotografías representativas de la cavidad abdominal de animales experimentales. Las flechas amarillas marcan acumulación de tejido adiposo. (A) Grupo control. (B) Ratas que recibieron solución 20% de fructosa.



únicamente a fructosa mostraron una disminución significativa en la relación entre las capas elástica y muscular de la túnica media. Este efecto deletéreo fue completamente prevenido por el cotratamiento *in vivo* con MET (Tabla 3).

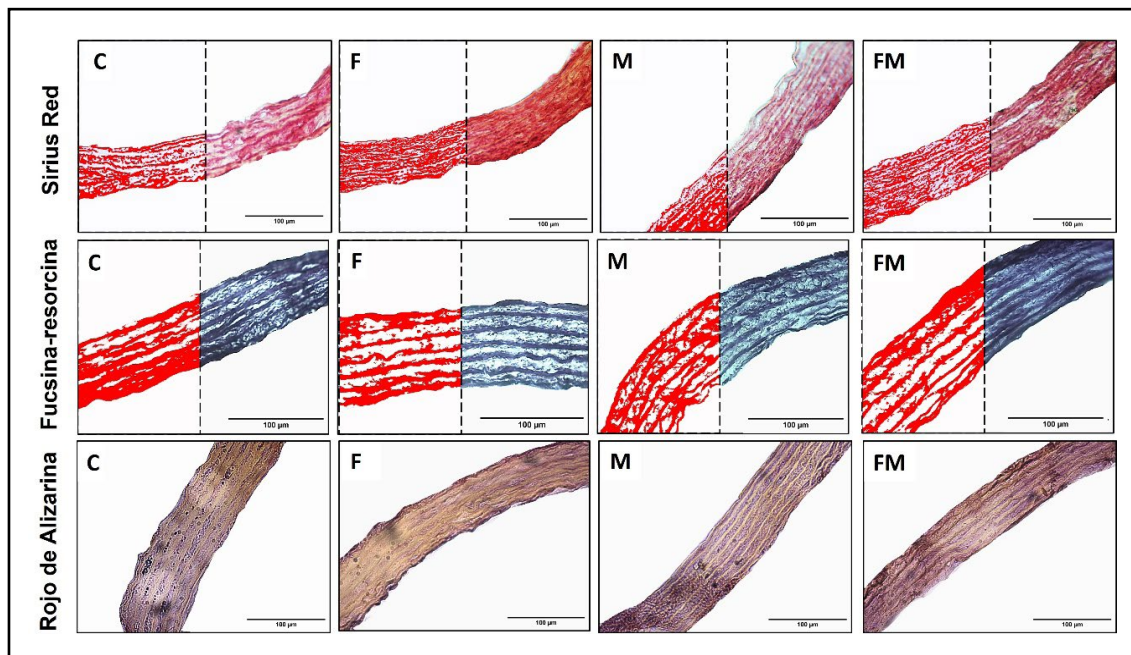
No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el contenido de elastina en las secciones aórticas teñidas con fucsina-resorcina (Figura 2).

Mediante tinción con Sirius Red se encontró, en secciones de aorta de los animales del grupo F, un aumento significativo en el contenido de colágeno de la pared arterial, en comparación con el grupo C. El cotratamiento oral con MET (grupo FM) previno completamente este efecto (Figura 2).

No se evidenció la presencia de macrocalcificaciones en ninguno de los grupos experimentales al analizar los cortes teñidos con rojo de Alizarina (véase Figura 2).

### **Efecto de SM y MET oral sobre el potencial osteogénico de CMLV**

Las CMLV aisladas de los animales del grupo F presentaron un aumento significativo en la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) (Figura 3A) junto a una tendencia a mayor producción de colágeno tipo 1 (Figura 3B) y mineralización de la matriz extracelular (Figura 3C). Además, presentaron un incremento significativo en la expresión del marcador osteogénico Runx2 (Figura 3D). El cotratamiento con fructosa y MET por vía oral (grupo FM) previno completamente estos efectos.

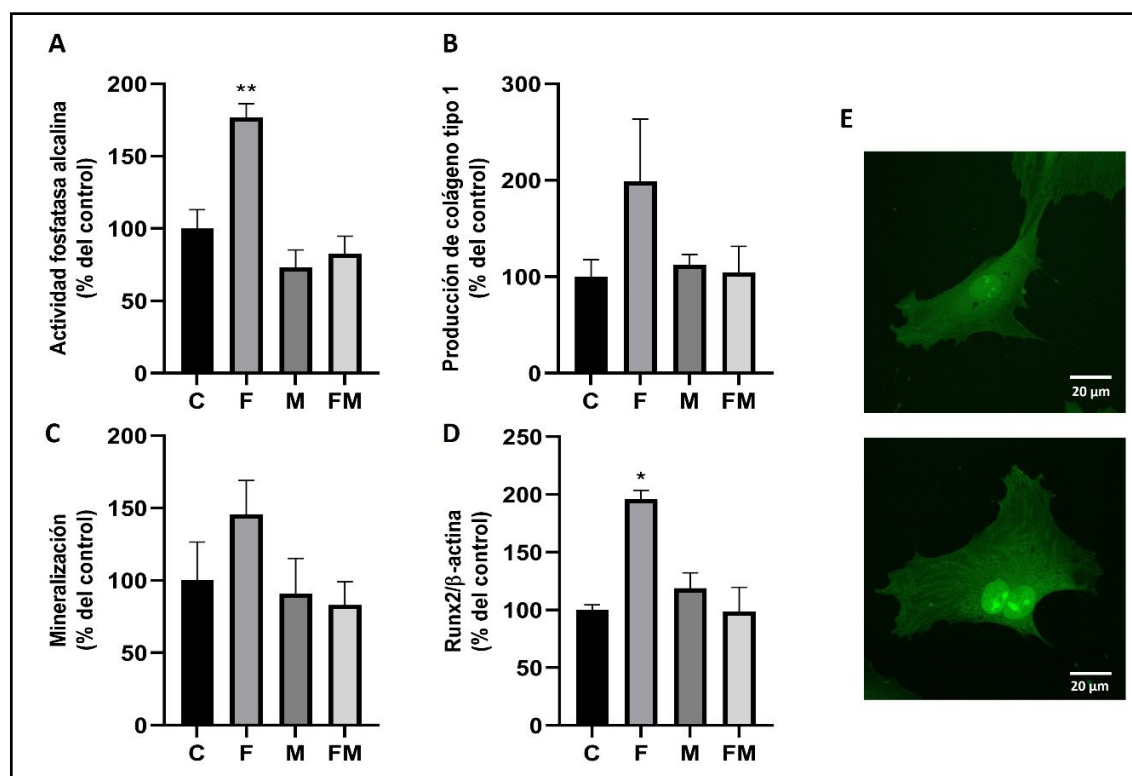


**Figura 2.** Micrografías representativas del análisis histomorfométrico de la pared arterial (Obj. 40x); la porción a la izquierda de la línea punteada marca las regiones ricas en colágeno o elastina. La fila superior corresponde a secciones teñidas con Sirius Red para colágeno. La fila del medio corresponde a secciones teñidas con fucsina-resorcina de Weigert para elastina. La fila inferior corresponde a secciones teñidas con rojo de Alizarina para depósitos de calcio. C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina.

**Tabla 3.** Histomorfometría aórtica tras tratamientos de 6 semanas de fructosa y/o 4 semanas de metformina

	C	F	M	FM
<b>Grosor túnica media (% del control)</b>	100 ± 10	112 ± 5	107 ± 8	118 ± 4
<b>Relación capa elástica/muscular (% del control)</b>	100 ± 3	73 ± 3*	102 ± 7	92 ± 1
<b>Contenido de colágeno (% del control)</b>	100 ± 7	132 ± 5*	89 ± 9	96 ± 4
<b>Contenido de elastina (% del control)</b>	100 ± 6	92 ± 6	106 ± 7	94 ± 5

C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: \*p<0,05 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=3.



**Figura 3.** Efectos del tratamiento con fructosa y/o metformina sobre marcadores del potencial osteoblástico de CMLV aisladas. (A) Actividad de fosfatasa alcalina. (B) Producción de colágeno tipo 1. (C) Mineralización de la matriz extracelular y (D) expresión génica relativa de Runx2 por RT-PCR. Las imágenes (E) corresponden a microfotografías de inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti- $\alpha$ -actina en CMLV aisladas del grupo control. C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: \*p<0,05 vs. C, M y FM; \*\*p<0,01 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=3-5.



**Efecto de SM y MET oral sobre la glicación extracelular y expresión de RAGE**

Los animales del grupo F presentaron niveles significativamente más altos de fructosamina sérica, un marcador temprano de la glicación extracelular sistémica de proteínas (Tabla 4).

Asimismo, se realizó la detección inmunohistoquímica de CML (una estructura AGE prevalente) y del receptor RAGE en las secciones aórticas de todos los grupos experimentales. Se observó un aumento notorio de CML y RAGE (vs. grupo C) en la túnica media

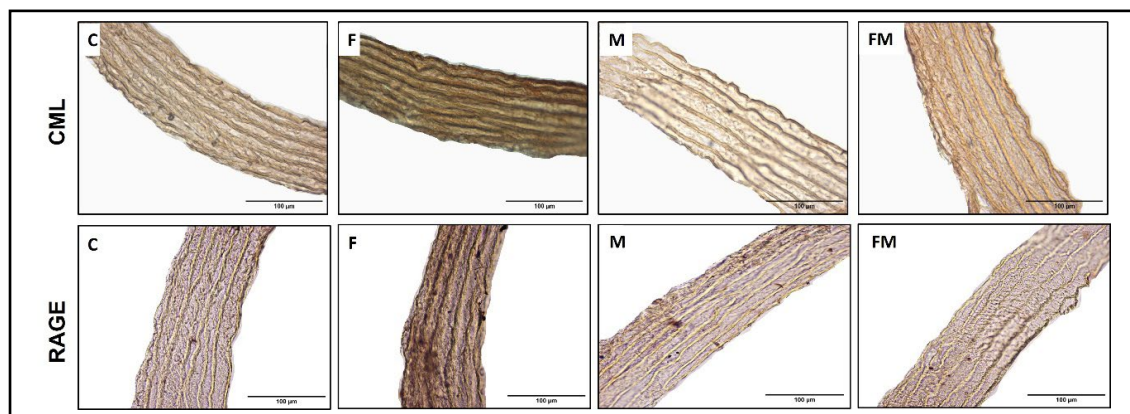
de los animales expuestos a fructosa (grupo F). El cotratamiento oral con MET (grupo FM) previno completamente ambos aumentos (Figura 4).

En experimentos con cultivos primarios de CMLV en los cuales se evaluó la expresión génica de RAGE en todos los grupos experimentales, se observó para las CMLV del grupo F un aumento significativo en la expresión de RAGE (respecto del grupo C). El cotratamiento oral con MET (grupo FM) previno completamente este efecto (Tabla 4).

**Tabla 4.** Niveles de fructosamina sérica y expresión génica basal de RAGE en CMLV cultivadas *in vitro*.

	C	F	M	FM
<b>Fructosamina (mmol/L)</b>	1,33 ± 0,13	2,28 ± 0,07***	1,32 ± 0,15	1,05 ± 0,08
<b>RAGE/<math>\beta</math>-actina (% del control)</b>	100 ± 8	612 ± 95**	179 ± 61	205 ± 63

C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina. Diferencias: \*\*p<0,01 vs. C, M y FM; \*\*\*p<0,001 vs. C, M y FM. Resultados expresados como media ± SEM, n=3-5.



**Figura 4.** Micrografías representativas del análisis inmunohistoquímico postinción con DAB, en secciones de la pared aórtica (Obj. 40x). La fila superior corresponde a acumulación extracelular de carboximetil-lisina (CML) en la pared aórtica. La fila inferior corresponde a expresión de RAGE en la pared aórtica. C: grupo control; F: ratas que recibieron solución de 20% fructosa; M: ratas que recibieron metformina 100 mg/kg/día; FM: ratas que recibieron fructosa y metformina.

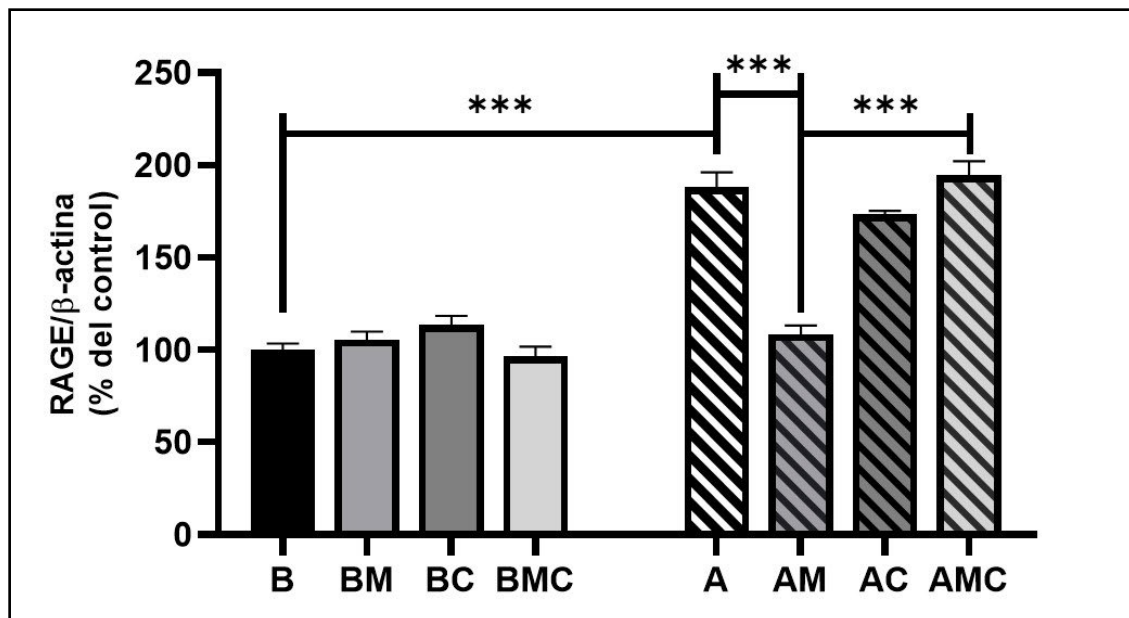
**La MET reduce vía AMPK la sobreexpresión génica de RAGE inducida por AGE en CMLV aórticas**

Realizamos experimentos *in vitro* en los que se cultivaron CMLV obtenidas de animales control con AGE-BSA o BSA y/o MET y/o compuesto C (dorsomorfina, un potente inhibidor de la activación/fosforilación de AMPK). La exposición a AGE-BSA incrementó significativamente la expresión génica relativa de RAGE en las CMLV (en comparación con la BSA no glicada). Este aumento fue completamente prevenido cuando las células se coincubaron con AGE-BSA y MET. Sin embargo, la prevención mediada por MET

de la sobreexpresión de RAGE inducida por AGE, fue abolida por el inhibidor de AMPK dorsomorfina (Figura 5).

**Discusión**

El SM agrupa factores de riesgo cardiometabólicos que aumentan la probabilidad de enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se ha demostrado que duplica el riesgo de enfermedad cardiovascular y eleva 1,5 veces la mortalidad por todas las causas,<sup>2,31</sup> y constituye un predictor independiente de eventos cardiovasculares futuros.<sup>32</sup> El sistema arterial es un sitio relevante de mineralización ectópica.<sup>10</sup> Algunas patologías



**Figura 5.** Efectos de metformina y/o compuesto C (inhibidor de la fosforilación/activación de AMPK) sobre la expresión génica relativa de RAGE inducida por AGE *in vitro* sobre CMLV controles (del grupo C). Las CMLV fueron incubadas 72 horas en: B: 100 µg/mL de albúmina sérica bovina no glicada (BSA); BM: 100 µg/mL de BSA más metformina 500 µM; BC: 100 µg/mL de BSA más compuesto C 0,5 µM; BMC: 100 µg/mL de BSA más metformina 500 µM más compuesto C 0,5 µM; A: 100 µg/mL de BSA glicada (AGE-BSA); AM: 100 µg/mL de AGE-BSA más metformina 500 µM; AC: 100 µg/mL de AGE-BSA más compuesto C 0,5 µM; y AMC: 100 µg/mL de AGE-BSA más metformina 500 µM más compuesto C 0,5 µM. Diferencias: \*\*\*p<0,001. Resultados expresados como media ± SEM, n=4.



como DM2, SM e insuficiencia renal, así como el envejecimiento, se asocian con depósitos de calcio en la pared arterial.<sup>33</sup> Estas alteraciones reducen la distensibilidad vascular y aumentan el riesgo de eventos graves, principales causas de muerte en el mundo.<sup>34,35</sup>

La calcificación arterial es un proceso regulado y complejo,<sup>36</sup> en el que la transdiferenciación osteogénica de las CMLV desempeña un papel central.<sup>37,38</sup> Varias condiciones propias del SM, como hiperglucemia y acumulación de AGE, favorecen este cambio fenotípico y promueven rigidez y depósito de calcio en la matriz vascular.<sup>10</sup>

En este trabajo hemos empleado un modelo experimental de SM inducido por fructosa al 20% en el agua de bebida, previamente caracterizado en nuestro laboratorio.<sup>27</sup> En el grupo tratado únicamente con fructosa observamos alteraciones metabólicas comparables a las del SM humano, incluyendo hiperglucemia, hipertrigliceridemia, aumento de la relación TG/HDLc, mayor adiposidad y niveles elevados de fructosamina como marcador de glicación temprana. A nivel vascular, la exposición a fructosa durante seis semanas generó alteraciones histológicas compatibles con disfunción de la túnica media: reducción en la relación entre el grosor de la capa elástica y la muscular, aumento de colágeno y acumulación de AGE.

Aunque no se detectaron diferencias significativas en el grosor total de la túnica media ni en el contenido de elastina o calcio *in vivo*, estos hallazgos concuerdan con modelos preclínicos de calcificación incipiente, como la inducida por vitamina D3/nicotina,<sup>39</sup> y con cambios observados en arterias envejecidas o con aterosclerosis temprana, donde la disminución relativa de elastina suele deberse a un incremento de otros componentes de la matriz más que a una reducción absoluta de su contenido.<sup>40</sup> Por otro lado, la técnica de tinción por rojo de Alizarina, si bien es apta para la detección de macrocalcificaciones, no resulta lo suficientemente sensible para la identificación de microcalcificaciones que

podrían estar presentes en estadios tempranos, para lo que sería más pertinente el uso de técnicas más sensibles como la tinción de Von Kossa o la cuantificación de calcio total en tejido aórtico mediante reacción colorimétrica.<sup>41</sup>

La metformina (MET), una biguanida euglicemizante de primera línea para el tratamiento del SM y DM2, ejerce sus efectos principalmente mediante activación de AMPK por inhibición del complejo I mitocondrial, reduciendo lipogénesis y gluconeogénesis, y mejorando la sensibilidad a la insulina. Además, actúa por vías independientes de AMPK modulando el metabolismo redox y el microbioma intestinal.<sup>42, 43</sup> Desde que se demostró que la MET reduce complicaciones cardiovasculares en pacientes con DM2 con sobrepeso en el *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS, 1998),<sup>44</sup> múltiples estudios han evidenciado su papel en disminuir la carga de CA en pacientes con SM y/o diabetes.

En nuestro modelo, el tratamiento oral con MET revirtió las alteraciones metabólicas inducidas por fructosa (grupo FM vs. F), normalizando glucemia posprandial, trigliceridemia, relación TG/HDLc, fructosamina y adiposidad, alcanzando valores comparables a los controles. A nivel vascular, MET previno los cambios deletéreos sobre la túnica media inducidos por la fructosa oral, restaurando la relación elastina/colágeno, reduciendo la fibrosis y la acumulación de AGE. Sin embargo, el tratamiento con MET de animales no expuestos a fructosa (grupo M) no indujo diferencias significativas en ningún parámetro evaluado, respecto de los animales control (grupo C).

En concordancia con las modificaciones histológicas *in vivo*, las CMLV aisladas de animales con SM (grupo F) mostraron *in vitro* un fenotipo osteogénico, evidenciando aumento de la expresión génica de Runx2, mayor actividad FAL, y tendencia al incremento de colágeno y mineralización de la matriz extracelular. Este fenómeno coincide con hallazgos previos en CMLV de ratas diabéticas, donde niveles elevados de AGE inducen transdiferenciación

osteogénica, efecto completamente prevenido por MET *in vivo* o *in vitro*.<sup>22</sup> En estudios con células estromales de médula ósea de ratas diabéticas, también se ha demostrado que la glicación extracelular incrementa la expresión de RAGE, y que MET la previene.<sup>45</sup>

De manera relevante, las CMLV de animales tratados con fructosa presentaron aumento de marcadores osteogénicos incluso en condiciones basales de cultivo, sin inductores osteogénicos externos, y dicho efecto fue completamente prevenido por la coadministración de MET *in vivo*. Estos resultados podrían reflejar la presencia de subpoblaciones celulares con fenotipos específicos, fenómeno descrito en lesiones ateroscleróticas.<sup>46</sup> El aumento de AGE está estrechamente asociado con obesidad, hiperglucemia, dislipidemia y resistencia a la insulina, contribuyendo a las complicaciones a largo plazo tanto del SM como de la diabetes. Los AGE, dietarios o endógenos, inducen estrés oxidativo e inflamación sostenida tanto de manera directa como mediante activación de RAGE y su consecuente señalización inflamatoria mediada por NFκB.<sup>47</sup> En nuestro trabajo, las ratas tratadas con fructosa mostraron aumento de fructosamina sérica (precursora de AGE) y, mediante inmunohistoquímica, incremento de CML y RAGE en la túnica media. Estas observaciones se correlacionaron con un aumento en la expresión génica de RAGE en CMLV aisladas y cultivadas *in vitro*. Tanto los niveles séricos de fructosamina como la expresión tisular de CML y RAGE, y la expresión génica aumentada de RAGE, retornaron a valores control con el tratamiento con MET.

Para profundizar en las implicaciones del eje AGE/RAGE en la transdiferenciación osteogénica y en el papel protector de MET, realizamos ensayos *in vitro* con CMLV incubadas con AGE-BSA. AGE-BSA, en comparación con BSA no glicada, incrementó la expresión de RAGE, pero este efecto fue completamente prevenido por MET. Asimismo, la inhibición de AMPK mediante compuesto C abolió dicha prevención, indicando un mecanismo dependiente de AMPK.

Estos hallazgos coinciden con lo estudiado por otros autores; por ejemplo, Ma y cols. demostraron en un modelo de cultivo de CMLV en medio osteogénico (sin adición de AGE ni glucosa elevada) que la MET previene la transdiferenciación osteogénica de manera dosis dependiente, suprimiendo la expresión de Runx2, FAL, BMP2, osteocalcina y el depósito de calcio, al tiempo que favorece la expresión de SM22- $\alpha$ , marcador de fenotipo contráctil. Estos efectos se asociaron a la inhibición del piruvato deshidrogenasa quinasa-4 inducida por  $\beta$ -glicerofosfato a través de la activación de AMPK, acompañada de una reducción en el estrés oxidativo. Además, la MET indujo directamente la biogénesis mitocondrial mediada por AMPK y favoreció la activación de la mitofagia, proceso necesario para sostener dicha biogénesis y atenuar la transformación fenotípica de las células.<sup>48</sup> Recientemente se ha descrito que la proteasa específica de ubiquitina 10 inhibe la transdiferenciación osteogénica de miocitos vasculares inducida por CML al promover la activación de la AMPK,<sup>49</sup> asimismo, se ha demostrado que la delección de la subunidad  $\alpha 2$  de AMPK potencia la transdiferenciación fenotípica de las CMLV, lo que pone de manifiesto el papel central de esta quinasa, que constituye un efector clave de la acción de la MET en la regulación de la fisiopatología de la calcificación vascular.<sup>50</sup> En conjunto, nuestros resultados sugieren que el SM inducido por fructosa genera un ambiente vascular procalcificante caracterizado por acumulación de AGE, sobreexpresión de RAGE e inducción de un fenotipo osteoblástico en las CMLV aórticas, propenso al remodelado patológico. La MET puede prevenir completamente estos fenómenos a nivel sistémico, tisular y celular mediante un mecanismo dependiente de AMPK. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la MET posee propiedades vasculoprotectoras independientes de su efecto euglucemiante, actuando sobre el eje AGE/RAGE, modulando el metabolismo energético celular y limitando la amplificación de señales inflamatorias.



En conclusión, nuestros experimentos actuales parecerían indicar que un tratamiento con metformina podría contribuir a la prevención de la arterioesclerosis asociada a un síndrome metabólico. Sin embargo, dadas las limitaciones inherentes a todo modelo experimental, se resalta que no es posible una extrapolación directa de nuestros resultados a situaciones clínicas concretas en seres humanos.

**Agradecimientos:** agradecemos a Laboratorios Montpellier Argentina por su generosa provisión de metformina. LS es becario doctoral de la UNLP; NM es becaria posdoctoral del CONICET; MVG es miembro de la Carrera del Investigador del CICPBA. ADM es director del LIOMM y profesor titular de Química Clínica en la UNLP.

**Contribuciones de autores:** Conceptualización (CS, LSc, MVG, ADM). Curación de datos, Análisis formal, Investigación (LS, NM).

Obtención de financiación, Administración del proyecto (ADM). Metodología, Supervisión (MVG, ADM). Recursos (LSc, ADM). Validación (MCG, ADM). Visualización, Redacción –borrador original (LS). Redacción – revisión y edición (MVG, CS, ADM).

**Conflictos de intereses:** los autores manifiestan que no presentan conflictos de intereses en relación con el presente artículo.

**Financiamiento :** Proyecto I+D Bial 2023 (Director Categoría I, II o III) UNLP 11/X945 Proyecto I+D Bial 2025 (Director Categoría I, II o III) UNLP 11/X1033 Proyecto I+D (Director Categoría SICADI) SX003.

Recibido: 26/12/2025

Aceptado: 13/03/2026

Publicado: 1/04/2026

## Referencias

1. Liang X, Or B, Tsoi MF, Cheung CL, Cheung BM. Prevalence of metabolic syndrome in the United States National Health and Nutrition Examination Survey 2011–18. *Postgrad Med J* 2023;99(1175):985–92. <https://doi.org/10.1093/postmj/qgad008>.
2. Dhondge RH, Agrawal S, Patil R, Kadu A, Kothari M. A Comprehensive Review of Metabolic Syndrome and Its Role in Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: Mechanisms, Risk Factors, and Management. *Cureus* 2024;16(8):e67428. <https://doi.org/10.7759/cureus.67428>.
3. Chang Y, Yun KE, Jung HS, Kim CW, Kwon MJ, Sung E, et al. A1C and coronary artery calcification in nondiabetic men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(8):2026–31. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301587>.
4. Yang SW, Yang HF, Chen YY, Chen WL. Unraveling the link between metabolic syndrome and abdominal aortic calcification. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2021;31(2):464–71. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.10.003>.
5. Turner ME, Beck L, Hill Gallant KM, Chen Y, Moe OW, Kuro-O M, et al. Phosphate in Cardiovascular Disease: From New Insights Into Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2024;44(3):584–602. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319198>.
6. Cheung CL, Tan KC, Lam KS, Cheung BM. The relationship between glucose metabolism, metabolic syndrome, and bone-specific alkaline phosphatase: a structural equation modeling approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(9):3856–63. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2024>.
7. Pérez de Ciriza C, Moreno M, Restituto

- P, Bastarrika G, Simón I, Colina I, et al. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clin Biochem* 2014;47(18):272-8. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.004>.
8. Morales-Santana S, García-Fontana B, García-Martín A, Rozas-Moreno P, García-Salcedo JA, Reyes-García R, et al. Atherosclerotic disease in type 2 diabetes is associated with an increase in sclerostin levels. *Diabetes Care* 2013;36(6):1667-74. <https://doi.org/10.2337/dc12-1691>
  9. Okura T, Kurata M, Enomoto D, Jotoku M, Nagao T, Desilva VR, et al. Undercarboxylated osteocalcin is a biomarker of carotid calcification in patients with essential hypertension. *Kidney Blood Press Res* 2010;33(1):66-71. <https://doi.org/10.1159/000289575>.
  10. Martini N, Streckwall L, McCarthy AD. Osteoporosis and vascular calcifications. *Endocr Connect* 2023;12(11):e230305. <https://doi.org/10.1530/EC-23-0305>.
  11. Bora S, Shankarrao Adole P. Carbonyl stress in diabetics with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2021;520:78-86. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.06.002>.
  12. Ngai D, Lino M, Bendeck MP. Cell-Matrix Interactions and Matricrine Signaling in the Pathogenesis of Vascular Calcification. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:174. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00174>.
  13. Dong H, Zhang Y, Huang Y, Deng H. Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. *Front Immunol* 2022;13:931473. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931473>.
  14. Ge C, Yang Q, Zhao G, Yu H, Kirkwood KL, Franceschi RT. Interactions between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAP kinase pathways in the control of RUNX2 phosphorylation and transcriptional activity. *J Bone Miner Res* 2012;27(3):538-51. <https://doi.org/10.1002/jbmr.561>.
  15. Lino M, Wan MH, Rocca AS, Ngai D, Shobeiri N, Hou G, et al. Diabetic Vascular Calcification Mediated by the Collagen Receptor Discoidin Domain Receptor 1 via the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt/Runt-Related Transcription Factor 2 Signaling Axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38(8):1878-89. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311238>.
  16. Sinha A, Vyavahare NR. High-glucose levels and elastin degradation products accelerate osteogenesis in vascular smooth muscle cells. *Diabetes Vasc Dis Res* 2013;10(5):410-9. <https://doi.org/10.1177/1479164113485101>
  17. Tembely D, Henry A, Vanalderwiert L, Toussaint K, Bennisroune A, Blaise S, et al. The Elastin Receptor Complex: An Emerging Therapeutic Target Against Age-Related Vascular Diseases. *Front Endocrinol* 2022;13:815356. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.815356>.
  18. LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr Rev* 2021;42(1):77-96. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023>.
  19. Cao X, Li H, Tao H, Wu N, Yu L, Zhang D, et al. Metformin inhibits vascular calcification in female rat aortic smooth muscle cells via the AMPK-eNOS-NO pathway. *Endocrinology* 2013;154(10):3680-9. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1002>.
  20. Goel S, Singh R, Singh V, Singh H, Kumari P, Chopra H, et al. Metformin: Activation of 5' AMP-activated protein kinase and its emerging potential beyond anti-hyperglycemic action. *Front Genet* 2022;13:1022739. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1022739>.
  21. Lee J, Hong SW, Kim MJ, Kwon H, Park SE, Rhee EJ, et al. Metformin, resveratrol, and exendin-4 inhibit high phosphate-induced vascular calcification via AMPK-RANKL signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;530(2):374-80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.136>.
  22. Molinuevo MS, Cortizo AM, Sedlinsky C. Effects of advanced glycation end-products, diabetes and metformin on the



- osteoblastic transdifferentiation capacity of vascular smooth muscle cells: In vivo and in vitro studies. *J Diabetes Complications* 2023;37(11):108626. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2023.108626>.
23. Universities Federation for Animal Welfare. Guidelines on handling and training of laboratory animals. In: UFAW, ed. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington D. C.: The National Academies Press; 2011.
  24. Salazar MR, Carbajal HA, Espeche WG, Leiva Sisniegues CE, March CE, Balbin E, et al. Comparison of the abilities of the plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio and the metabolic syndrome to identify insulin resistance. *Diabetes Vasc Dis Res* 2013;10(4):346-52. <https://doi.org/10.1177/1479164113479809>.
  25. Chen Y, Yu Q, Xu CB. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. *Int J Clin Exp Med* 2017;10:14904-10.
  26. Molinuevo MS, Fernández JM, Cortizo AM, McCarthy AD, Schurman L, Sedlinsky C. Advanced glycation end products and strontium ranelate promote osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in vitro: Preventive role of vitamin D. *Mol Cell Endocrinol* 2017;450:94-104. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.022>.
  27. Wanionok NE, Molinuevo MS, Fernández JM, Lucas B, Cortizo AM, Castillo EJ, et al. Skeletal effects of a prolonged oral metformin treatment in adult Wistar rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2024;132(10):547-56. <https://doi.org/10.1055/a-2324-8661>.
  28. Gangoiti MV, Arnol V, Cortizo AM, McCarthy AD. Advanced glycation endproducts and alendronate differentially inhibit early and late osteoclastogenesis in vitro. *J Diabetes Metab* 2013;4:274. <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000274>.
  29. Handa N, Takagi T, Saijo S, Kishishita S, Takaya D, Toyama M, et al. Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  subunit kinase domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67(Pt 5):480-7. <https://doi.org/10.1107/S0907444911010201>.
  30. Lee H, Rhee TM, Park HE, Han K, Choi SY. Association between cumulative metabolic risk exposure and cardiovascular disease: A nationwide cohort of over 3.6 million young adults. *Eur J Prev Cardiol* 2024;31(10):1288-300. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwae088>.
  31. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(14):1113-32. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.05.034>.
  32. Guembe MJ, Fernández-Lazaro CI, Sayon-Orea C, Toledo E, Moreno-Iribas C, RIVANA Study Investigators. Risk for cardiovascular disease associated with metabolic syndrome and its components: A 13-year prospective study in the RIVANA cohort. *Cardiovasc Diabetol* 2020;19(1):195. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01166-6>.
  33. Vidavsky N, Kunitake JAMR, Estroff LA. Multiple pathways for pathological calcification in the human body. *Adv Healthc Mater* 2021;10(4):e2001271. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001271>.
  34. Juutilainen A, Lehto S, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Thoracoabdominal calcifications predict cardiovascular disease mortality in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: 18-year follow-up study. *Diabetes Care* 2010;33(3):583-5. <https://doi.org/10.2337/dc09-1813>.
  35. Chen J, Radjabzadeh D, Medina-Gómez C, Voortman T, van Meurs JBJ, Ikram MA, et al. Advanced glycation end products (AGEs) in diet and skin in relation to stool microbiota: The Rotterdam Study. *Nutrients* 2023;15(11):2567. <https://doi.org/10.3390/nu15112567>.
  36. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular

- calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(4):715-23. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302070>.
37. Tyson J, Bundy K, Roach C, Douglas H, Ventura V, Segars MF, et al. Mechanisms of the osteogenic switch of smooth muscle cells in vascular calcification: WNT signaling, BMPs, mechanotransduction, and EndMT. *Bioengineering* 2020;7(3):88. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030088>.
38. Yamazoe M, Hisamatsu T, Miura K, Kadowaki S, Zaid M, Kadota A, et al. Relationship of insulin resistance to prevalence and progression of coronary artery calcification beyond metabolic syndrome components: Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(8):1703-8. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307612>.
39. Ameer OZ, Salman IM, Avolio AP, Phillips JK, Butlin M. Opposing changes in thoracic and abdominal aortic biomechanical properties in rodent models of vascular calcification and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;307(2):H143-H151. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00139.2014>.
40. Tsamis A, Krawiec JT, Vorp DA. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: A review. *J R Soc Interface* 2013;10(83):20121004. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1004>
41. Smith ER, Hewitson TD, Holt SG. Diagnostic tests for vascular calcification. *Adv Chronic Kidney Dis* 2019;26(6):445-63. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.07.001>.
42. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia* 2017;60(9):1566-76. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>
43. Smiles WJ, Ovens AJ, Oakhill JS, Kofler B. The metabolic sensor AMPK: Twelve enzymes in one. *Mol Metab* 2024;90:102042. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2024.102042>
44. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352(9131):837-53. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07019-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07019-6).
45. Sedlinsky C, Molinuevo MS, Cortizo AM, Tolosa MJ, Felice JI, Sbaraglini ML, et al. Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;668(3):477-85. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.033>.
46. Chen R, McVey DG, Shen D, Huang X, Ye S. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2023;12(20):e031121. <https://doi.org/10.1161/JAHA.123.031121>.
47. Kavitha SA, Zainab S, Muthyalaiyah YS, John CM, Arockiasamy S. Mechanism and implications of advanced glycation end products (AGE) and its receptor RAGE axis as crucial mediators linking inflammation and obesity. *Mol Biol Rep* 2025;52(1):556. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10632-x>.
48. Ma WQ, Sun XJ, Wang Y, Zhu Y, Han XQ, Liu NF. Restoring mitochondrial biogenesis with metformin attenuates  $\beta$ -GP-induced phenotypic transformation of VSMCs into an osteogenic phenotype via inhibition of PDK4/oxidative stress-mediated apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 2019;479:39-53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.08.012>.
49. Mushajiang M, Li Y, Sun Z, Liu J, Zhang L, Wang Z. USP10 alleviates N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine-induced vascular calcification and atherogenesis in diabetes mellitus by promoting AMPK activation. *Cell Signal* 2024;120:111211. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2024.111211>.
50. Ding Y, Zhang M, Zhang W, Lu Q, Cai Z, Song P, et al. AMP-activated protein kinase alpha 2 deletion induces VSMC phenotypic switching and reduces features of atherosclerotic plaque stability. *Circ Res* 2016;119(6):718-30. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308689>.