

**REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES Y VITAMINA D
DE LA PROLIFERACIÓN Y LA DIFERENCIACIÓN
DE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO EPIFISEAL FETAL HUMANO**

MÓNICA FERNÁNDEZ CANCIO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Programa de doctorado **BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Biennio **1998-2000**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES Y VITAMINA D
DE LA PROLIFERACIÓN Y LA DIFERENCIACIÓN
DE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO EPIFISEAL FETAL HUMANO**

Tesis doctoral presentada por:

MÓNICA FERNÁNDEZ CANCIO

para acceder al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

Dirigida por:

Prof. Antonio Carrascosa Lezcano

Dra. Laura Audí Parera

Dra. Cristina Esteban Redondo

y tutelada por:

Prof. Santiago Imperial Ródenas

BARCELONA, mayo 2006

Prof. Antonio Carrascosa Lezcano, Catedrático de Pediatría de la Universidad Autónoma de Barcelona, Jefe de Servicio de Pediatría y de la Unidad de Endocrinología y Adolescencia del Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona,

Dra. Laura Audí Parera, Jefe del Laboratorio de la Unidad de Investigación en Endocrinología y Nutrición Pediátricas del Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona y

Dra. Cristina Esteban Redondo, investigador del Laboratorio de la Unidad de Investigación en Endocrinología y Nutrición Pediátricas del Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona

CERTIFICAN QUE

Mónica Fernández Cancio, Licenciada en Biología por la Universidad de Barcelona ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral, titulada “**Regulación por glucocorticoides y vitamina D de la proliferación y la diferenciación de condrocitos de cartílago epifiseal fetal humano**” en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Endocrinología y Nutrición Pediátricas en el Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Dicha Tesis está concluida y se considera apta para su lectura y defensa pública.

Fdo. Prof. Antonio Carrascosa

Fdo. Dra. Laura Audí

Fdo. Dra. Cristina Esteban

BARCELONA, mayo 2006

Durante la realización de este trabajo de investigación la doctoranda MÓNICA FERNÁNDEZ CANCIO ha disfrutado de:

- una beca pre-doctoral de la Fundació per a la Investigació i la Docència del Hospital Vall d'Hebron desde enero a octubre de 2002
- una beca de formación en investigación (BEFI) del Instituto de Salud Carlos III desde octubre de 2002

AGRADECIMIENTOS

Al **Prof. Antonio Carrascosa Lezcano** por ofrecerme la oportunidad de realizar esta tesis, por confiar en mi y creer en mi trabajo.

A la **Dra. Audí** por su gran calidad científica y profesional, por su esfuerzo dedicado al grupo de investigación, por hacerme partícipe de parte de sus conocimientos y por su paciencia conmigo. Gracias por todo.

A la **Dra. Cristina Esteban**, por enseñarme todo lo que sé sobre biología molecular, por su paciencia conmigo en el laboratorio y por su amistad.

Al **Prof. Santiago Imperial** por abrirme el camino hacia la investigación, por darme la primera oportunidad de trabajar en un laboratorio y por acordarse de mi cuando nació la idea de esta tesis.

A la **Dra. Nuria Torán**, que tan amablemente ha cedido parte de su tiempo para la obtención de los cartílagos, por su cariño y sus palabras de aliento.

A la **Dra. M^a Luisa Granada** por su ayuda en el diseño del inmunoanálisis para la cuantificación de la proteína IGFBP3.

A **Pilar Andaluz**, por el cuidado que con tanto mimo realiza a las células, por todos sus consejos y por crear ese ambiente tan familiar.

A **Rosa Arjona**, por su amistad ante todo, por ayudarme en muchos momentos y por sus palabras de aliento cuando el trabajo agobia.

Sin vosotras esto no hubiera sido lo mismo.

A la **Dra. Paqui Gallego**, por los ratos que hemos compartido junto al aparato de PCR cuantitativa y por su amistad.

A la **Dra. Gertrudis Martí** y a **Annalisa Pérez** que han contribuido a hacer más agradable mi trabajo en el laboratorio.

A **mis padres**, porque han dedicado todo su esfuerzo en mi educación y formación académica y por transmitirme responsabilidad en el trabajo. Todo lo que soy se lo debo a ellos.

A **Jordi**, por su paciencia conmigo durante todo este tiempo, por ser casi tan experto como yo en mi trabajo, por darme ánimos y cariño en mis días bajos, en definitiva, por ser como es.

“En teoría, no existe diferencia
entre teoría y práctica;
en la práctica sí la hay.”

Jan L.A. van de Snepscheut

“No progresas mejorando
lo que ya está hecho,
sino esforzándote por lograr
lo que aún queda por hacer.”

Khalil Gibran

POEMA OBERT AL CARTÍLAG ARTICULAR

*amb motiu d'una reunió científica
al castell de Peratallada (Baix Empordà)*

No corre mai la sang en el teu si.
El blanc, només un blanc que venç el nacre.
Cap nervi et solca la textura insomne
on xarboteja el teu metabolisme:
secrets, només secrets solquen el blanc,
innúmers i lluents, callats, callats
secrets que sí innerven la paraula
i la vigília d'un diletant.
Jo vull saber-te tot, vull despullar
la teva química, aquest silenci,
la proteïna de la teva lluïssor,
abeure el meu saber assedegat
als circuits dels teus fluids omnipresents,
desxifrar l'elegància del frec.
Les trenes d'agrecans, digue'm, no callis
és cert que et doten de la rigidesa?
¿les fibres de col·làgena musculen
la força de tensió i l'altivesa?
Al castell enfosqueix. Enlluernats
interroguem el teu blanc magistral.
Per què tanta bellesa oculta al cos?
Per què mai et refàs quan et fereixen?
¿Quina molècula du la renúncia,
quin àcid, quin enllaç et du el menyspreu?
Als murs, un gruix de segles xiuxiueja.
Sento el salobre i l'humitat ferint-te
sota la llum incerta de les torxes,
gemecs a les escales circulars,
dolors atribuïts al goig d'un Déu.
Jo vull ser déu d'un món laic de condrocits
per a imposar-te el dogma de refer-te
per a trenar-te els agrecans ferits.

Dr. ENRIC CASTELLET

A mis padres

A Jordi

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO	6
1.2 REGULACIÓN HORMONAL DEL CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO	9
1.2.1 Sistema GH-IGF-I	10
1.2.2 Glucocorticoides	13
1.2.3 Vitamina D	15
1.3 REACCIÓN DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	16
1.3.1 Normalización de los resultados	20
1.3.2 Métodos de cuantificación	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 LÍNEA CELULAR CONDROCÍTICA HUMANA PREESTABLECIDA C-28/I2	27
3.1.1 Cultivo celular de la línea condrocítica humana C-28/I2	27
3.1.2 Condiciones de cultivo	27
3.1.3 Estudio de la proliferación celular mediante el conteo de células en cámara de Neubauer	28
3.1.4 Extracción de RNA total de las células de la línea C-28/I2 en cultivo	29
3.1.5 Tratamiento con DNasa I	30
3.1.6 Extracción de mRNA de las células de la línea C-28/I2 en cultivo	30
3.1.7 Diseño de cebadores para la amplificación por reacción de PCR	31
3.1.8 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica	35
3.1.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
3.1.10 Electroforesis	36
3.1.10.1 Electroforesis en geles de agarosa	36
3.1.10.1.1 <i>Tinción de los geles de agarosa mediante bromuro de etidio</i>	37

3.1.10.2 Electroforesis en geles de agarosa comerciales	37
3.1.10.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida	37
3.1.10.3.1 <i>Condiciones de electroforesis de geles de poliacrilamida</i>	38
3.1.10.3.2 <i>Tinción de los geles de poliacrilamida</i>	38
3.1.11 Identificación de transcritos amplificados	39
3.1.11.1 Extracción de productos de PCR a partir de gel de agarosa	39
3.1.11.2 Extracción de productos de PCR a partir de gel de poliacrilamida	40
3.1.12 Secuenciación automática	40
3.1.12.1 Secuenciación directa del producto de PCR	42
3.1.12.2 Precipitación o eliminación de terminadores fluorescentes	42
3.1.13 Direcciones de internet para búsquedas y alineamientos	43
3.1.14 Amplificación del RNA mediante la técnica de RT-PCR en una sola etapa (<i>One-Step</i>)	43
3.1.15 Método semi-cuantitativo	44
3.1.16 Estudio de la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada al DNA	45
3.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE CONDROCITOS HUMANOS	
PROCEDENTES DE CARTÍLAGO DE EPÍFISIS FETAL	47
3.2.1 Cultivo celular de condrocitos procedentes de epífisis fetal humana	47
3.2.2 Condiciones de cultivo	48
3.2.3 Control de pureza de los cultivos de condrocitos	48
3.2.4 Protocolo de incubación	48
3.2.4.1 Estudio de la proliferación celular	49
3.2.4.2 Estudio de la expresión génica	51
3.2.5 Extracción de RNA total de las células de cultivos primarios	51
3.2.6 Amplificación del RNA mediante la técnica de RT-PCR en dos etapas (<i>Two-Step</i>)	52
3.2.6.1 Síntesis de cDNA	52

3.2.6.2 Placa de controles endógenos	53
3.2.7 Assays-on-Demand	56
3.2.8 Cuantificación de la expresión génica	58
3.3 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IGF-I E IGFBP3 EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	58
3.3.1 Cuantificación de la proteína IGF-I en el medio de cultivo	58
3.3.2 Cuantificación de la proteína IGFBP3 en el medio de cultivo	59
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	59
4. RESULTADOS	60
4.1 LÍNEA CELULAR CONDROCÍTICA HUMANA PREESTABLECIADA C-28/I2	61
4.1.1 Condiciones de cultivo	61
4.1.2 Amplificación específica de los genes de interés	62
4.1.3 Amplificación del RNA mediante la técnica de RT-PCR en una sola etapa para cada uno de los genes de interés	65
4.1.4 Cuantificación de los genes de interés	68
4.1.5 Estudio de la regulación de la proliferación celular	73
4.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE CONDROCITOS HUMANOS PROCEDENTES DE CARTÍLAGO DE EPÍFISIS FETAL	75
4.2.1 Condiciones de cultivo	75
4.2.2 Control de pureza de los cultivos de condrocitos	76
4.2.3 Estudio de la regulación de la proliferación celular por GCs, VitD, IGF-I y GH	77
4.2.4 Estudio de la expresión génica	81
4.2.4.1 Control endógeno	81
4.2.4.2 Estudio de la expresión de los genes de interés	83
4.2.4.2.1 <i>Regulación de la expresión génica por Dx</i>	84
4.2.4.2.2 <i>Regulación de la expresión génica por VitD</i>	93
4.2.4.2.3 <i>Regulación de la expresión génica por el tratamiento combinado con Dx, VitD y GH</i>	103
4.2.5 Cuantificación de la proteína IGF-I en el medio de cultivo	112
4.2.6 Cuantificación de la proteína IGFBP3 en el medio de cultivo	113
5. DISCUSIÓN	115

6. CONCLUSIONES	135
7. BIBLIOGRAFÍA	138

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO

El crecimiento longitudinal óseo precisa el proceso de osificación endocondral que tiene lugar en el cartílago de crecimiento, en el cual primero se forma cartílago y después éste se osifica. El cartílago de crecimiento es una estructura altamente organizada situada entre la epífisis y la metafisis óseas en el extremo distal de los huesos largos. Está formado por un único tipo celular, los condrocitos, que derivan del mismo precursor pluripotencial que miocitos, adipocitos y osteoblastos (*Figura 1*).

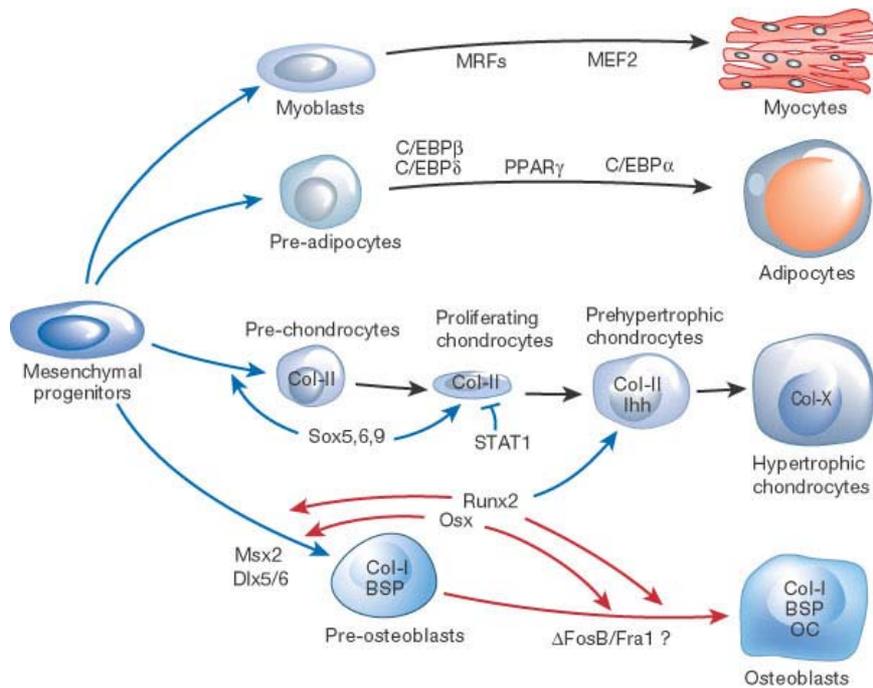


Figura 1. Los condrocitos se diferencian a partir del mismo progenitor mesenquimal que miocitos, adipocitos y osteoblastos [Harada S, Rodan GA. Nature (2003) 423:349-355].

Los condrocitos, en el cartílago de crecimiento, se encuentran en diferentes estados de diferenciación, de manera que los más inmaduros son los más alejados del hueso y los más maduros o hipertrofos son los más próximos al hueso. En el cartílago de crecimiento se diferencian varias zonas¹ (*Figura 2*):

- zona de reserva: esta zona es la más cercana a la epífisis y está formada por condrocitos de pequeño tamaño e inmaduros, con capacidad para responder a factores que estimulan la multiplicación celular. Se ha demostrado recientemente que estas células son cruciales para la orientación de las columnas de los condrocitos subyacentes y, por lo tanto, del crecimiento

óseo unidireccional, seguramente debido a la secreción de un factor orientador del cartílago de crecimiento².

- zona proliferativa: en esta zona rica en matriz, los condrocitos sufren divisiones celulares en dirección longitudinal y se organizan en forma de columna. Sintetizan cantidades sustanciales de proteínas de matriz extracelular, las cuales son esenciales para la estructura de la matriz del cartílago de crecimiento.
- zona de maduración: a partir de un número finito de divisiones o por cambios en la exposición a factores de crecimiento locales, los condrocitos proliferativos van perdiendo la capacidad de división y se diferencian hasta convertirse en prehipertróficos, coincidiendo con un incremento de su tamaño.
- zona hipertrófica y degenerativa: en esta zona los condrocitos son hipertróficos, con forma redondeada, comienzan a lisarse y las hidrolasas liberadas al medio reabsorben la matriz previamente formada. Al mismo tiempo sintetizan enzimas con actividad fosfatasa alcalina, se forman vesículas extracelulares en la matriz y se inicia el proceso de mineralización. La matriz mineralizada es invadida por vasos sanguíneos y células osteoprogenitoras, dando lugar a nuevo hueso que es remodelado por la acción de los osteoblastos y osteoclastos, produciéndose el crecimiento logitudinal del hueso adyacente.

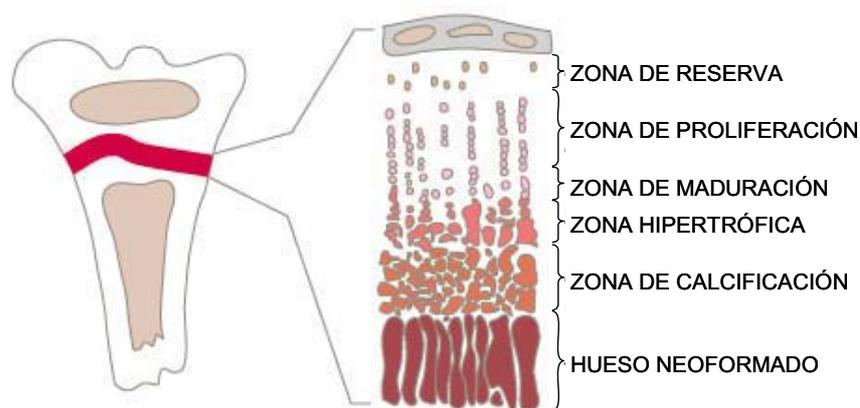


Figura 2. Diferentes zonas del cartílago de crecimiento.

En el proceso de osificación endocondral los condrocitos proliferan y se diferencian en células sintetizadoras de matriz extracelular, como el colágeno tipo 2. Los condrocitos hipertróficos pierden la capacidad de sintetizar colágeno tipo 2 y, en cambio, sintetizan colágeno tipo 10. Finalmente, los condrocitos hipertróficos sufren una muerte celular programada (apoptosis)^{3,4}. El proceso apoptótico está regulado, entre otros factores, por niveles intracelulares elevados de calcio (que permiten la activación de proteasas, lipasas y nucleasas), por el ácido retinoico y por la vitamina D (VitD). En particular, la deficiencia de VitD, que provoca el raquitismo infantil, se asocia con una deficiencia en la calcificación y la vascularización, dando lugar a una disminución de la formación ósea del cartílago de crecimiento, fenómeno que ha sido observado en el ratón raquítico^{5,6}. Los condrocitos, al morir por apoptosis, liberan al medio extracelular gran cantidad de hidrolasas que inician la resorción de la matriz extracelular y, junto con las fosfatasa alcalinas almacenadas en las vesículas de la matriz, se inicia el proceso de mineralización. El frente de mineralización es invadido por vasos sanguíneos y células osteoprogenitoras que sintetizan una matriz rica en colágeno tipo 1 propia del hueso⁷.

La proliferación, la diferenciación y la mineralización son fenómenos que progresan de forma sincrónica y a ritmos que varían de unas épocas a otras de la vida en relación con el crecimiento en longitud del esqueleto óseo, siendo muy intensas durante el desarrollo fetal y los primeros años de vida. Los condrocitos pierden progresivamente su capacidad de multiplicarse, así como de sintetizar matriz extracelular, que se mineraliza más rápidamente hasta la desaparición del cartílago de crecimiento al finalizar el crecimiento y alcanzar la talla adulta. En este momento, la desaparición de los condrocitos de la zona de reserva puede considerarse total desde un punto de vista funcional, aunque no desde un punto de vista anatómico, ya que persiste una pequeña capa de células en reposo que en condiciones patológicas pueden multiplicarse y formar nuevo hueso.

En definitiva, el crecimiento longitudinal óseo tiene lugar a través de las siguientes etapas:

- condicionamiento de los condrocitos de la zona de reserva a proliferar
- proliferación condrocítica
- hipertrofia de los condrocitos y producción de componentes de la matriz
- apoptosis de condrocitos hipertróficos
- invasión de vasos sanguíneos y resorción del cartílago

- neoformación ósea

La diferenciación fenotípica y funcional de los condrocitos de las diferentes zonas del cartílago está regulada por hormonas, por factores de crecimiento sistémicos y locales y por factores de transcripción, entre los cuales SOX9 (*SRY-box9*) y CBFA1 (*core-binding factor, runt domain, alpha subunit 1*) juegan un papel fundamental⁸⁻¹⁰. Se ha demostrado que SOX9 regula la tasa de diferenciación condrocítica a hipertrofia controlando la expresión de una serie de genes específicos de cartílago como colágeno tipo 2 A1 (COL2A1), colágeno tipo 9 A2 (COL9A2), colágeno tipo 11 A1 (COL11A1) y aggrecan^{8,11,12}. Por otro lado, CBFA1 es necesario para la diferenciación de los osteoblastos¹³⁻¹⁵ y puede jugar un papel primordial en la maduración condrocítica durante el proceso de osificación endocondral¹⁶⁻¹⁸. Actúa como factor de transcripción y puede inducir la expresión de metaloproteinasas, como MMP-13¹⁹⁻²⁰, las cuales se ha demostrado que participan en el proceso de osificación²¹.

Los condrocitos de la zona de reserva expresan varios factores de crecimiento que por un mecanismo auto/paracrino regulan su diferenciación a células más maduras. Algunos, como el FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) estimulan su proliferación e inhiben la diferenciación a condrocitos hipertróficos. Otros, como los TGF- β (*transforming growth factor- β*), estimulan el proceso de diferenciación. Es conocido que la PTH (*parathyroid hormone*) y la hormona de crecimiento (GH) estimulan la proliferación de los condrocitos en la zona de reserva de una forma directa; éstos, también por acción de la GH, sintetizarían IGFs (*insulin-like growth factors*) e IGFbps (*insulin-like growth factor binding proteins*) que regularían la diferenciación celular y estimularían la síntesis de colágeno y otras moléculas de la matriz. Otras hormonas, entre ellas las tiroideas y los esteroides gonadales estimularían el proceso de maduración hacia condrocitos hipertróficos y la mineralización²²⁻³¹.

1.2 REGULACIÓN HORMONAL DEL CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO

En el transcurso de los últimos años numerosos estudios en modelos animales de experimentación, estudios *in vitro* en cultivos celulares y datos obtenidos a partir de observaciones clínicas han permitido conocer parte de la compleja regulación del proceso de crecimiento y mineralización del esqueleto.

Las principales hormonas y factores de crecimiento sistémicos que regulan el crecimiento longitudinal óseo durante la infancia son GH e IGF-I y hormonas tiroideas (T_3 y T_4), mientras que durante la pubertad las hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) son las que modulan los efectos de las anteriores hormonas durante el pico de crecimiento puberal y su ulterior finalización. Para muchas hormonas los efectos sobre el crecimiento longitudinal y la talla final han sido descritos, pero muchos de los mecanismos moleculares implicados todavía permanecen sin esclarecer.

1.2.1 Sistema GH-IGF-I

Antes del nacimiento, el IGF-I y el IGF-II así como la insulina son considerados como los principales reguladores del crecimiento esquelético de forma, en gran parte, independiente de la GH. En la deficiencia congénita de GH, la talla al nacer está ligeramente disminuida, mientras que un niño descrito con deficiencia congénita de IGF-I tenía una talla al nacer severamente disminuida³². Después del nacimiento, la GH es un importante modulador del crecimiento longitudinal óseo y, junto con el IGF-I, tiene un papel importante en el eje hipotálamo-hipófisis-cartílago de crecimiento. La secreción de GH por la hipófisis está controlada por la actividad de GHRH (*growth hormone releasing hormone*) y de la somatostatina, los cuales son liberados por el hipotálamo. Con el descubrimiento de la ghrelina, el ligando endógeno con acciones similares al segretagogo sintético de GH (GHS), y de su receptor (GHSR), ha surgido una nueva dimensión fisiológica en cuanto a la regulación de la secreción de GH³³. A pesar de la complejidad, parece claro que GHS actúa sinérgicamente con GHRH en la liberación de GH³⁴. La GH es segregada de un modo pulsátil. Los adenomas hipofisarios durante la infancia o en la edad adulta provocan un incremento en la secreción de GH, dando lugar al gigantismo hipofisario o a la acromegalia, respectivamente^{35,36}. Por el contrario, defectos en la formación de las células secretoras de GH (por ejemplo, por mutaciones en Prop-1 o Pit-1), en la síntesis o liberación de GH (por ejemplo, por mutaciones en GHRH-receptor, deleciones de gen GH1 y otras formas de deficiencia de GH), o la insensibilidad a la GH (incluyendo defectos en el receptor de GH (GHR), deleción de IGF-I y mutaciones en el receptor de IGF-I [IGF-IR]) provocan un enanismo severo³⁷⁻⁴⁰.

La GH actúa en sus tejidos diana directamente o a través de dos intermediarios: IGF-I e IGF-II. Los modelos animales han demostrado que el IGF-II es esencial para el crecimiento embrionario normal⁴¹, mientras que el IGF-I es un ligando que tiene funciones continuas durante el desarrollo y la edad adulta⁴². El papel del IGF-II después del nacimiento permanece sin esclarecer. Existen numerosas evidencias de que ambos IGFs tienen un único y complementario papel en la regulación del crecimiento óseo⁴³. De acuerdo con la hipótesis de la somatomedina de Salmon y Daughaday⁴⁴ del año 1957, la GH estimula la síntesis de somatomedina (IGF-I) en el hígado, el cual, a su vez, activa la proliferación de los condrocitos en el cartílago de crecimiento. Sin embargo, a mediados de los 80s los resultados obtenidos a partir de diferentes estudios cambiaron esta visión. Estos estudios demostraron que la inyección local de GH en el cartílago de crecimiento de tibia de rata estimulaba el crecimiento longitudinal⁴⁵, de manera que se estableció la hipótesis del efector-dual. Esta hipótesis propone que la GH estimula tanto la producción hepática de IGF-I como actúa directamente sobre el cartílago de crecimiento incrementando el condicionamiento de los condrocitos de la zona de reserva y la producción local de IGF-I⁴⁶⁻⁴⁹. Otros trabajos demostraron que en condrocitos de cartílago de crecimiento humano y de conejo se expresaba GHR, hecho que concordaría con la teoría de los efectos directos de la GH en el cartílago de crecimiento^{50,51}. Otro hallazgo interesante fue que la administración de GH incrementaba el diámetro de la zona de reserva en ratones deficientes de IGF-I, confirmando un papel directo de la GH en el cartílago de crecimiento⁵².

Además de la GH, el IGF-I juega un papel importante en el crecimiento longitudinal óseo durante la vida pre y postnatal ya que el ratón knock-out (KO) para IGF-I presenta enanismo^{42,53}, y un paciente con una delección homocigota de IGF-I presenta talla baja extrema³². El tratamiento con GH no tiene ningún efecto sobre el crecimiento longitudinal y el peso del cuerpo en ratones y humanos deficientes en el gen IGF-I^{32,54}. Se han generado ratones con el gen GHR inactivado, un potencial modelo del síndrome de Laron, y un ratón doble KO para GHR e IGF-I^{55,56}. Se ha observado que los ratones doble mutantes GHR/IGF-I eran más pequeños que los mutantes simples GHR o IGF-I, indicando que tanto GH como IGF-I contribuyen significativamente al crecimiento longitudinal. Estudios en estos ratones han demostrado que el IGF-I es el mayor determinante tanto del crecimiento embrionario como postnatal y que la expresión de IGF-I está modulada por la GH en el período postnatal⁵⁴⁻⁵⁶. Mohan et al.⁵⁷, utilizando ratones KO IGF-I y ratones KO IGF-II así como ratones lit/lit deficientes en GH,

mostraron que GH/IGF-I pero no IGF-II eran críticos para el crecimiento óseo inducido durante la pubertad. Además, se ha demostrado que, durante la prepubertad, el efecto del IGF-I sobre la aposición ósea se produce a través de mecanismos dependientes de GH, mientras que, durante la pubertad, el IGF-I tendría efectos tanto dependientes como independientes de GH¹.

Numerosos estudios han intentado esclarecer la contribución relativa del IGF-I sistémico y la del IGF-I producido localmente en relación al crecimiento. Se ha generado un ratón con delección del gen IGF-I hepático, en el que los niveles de RNA mensajero (mRNA) para IGF-I eran menores del 1% respecto a los niveles en los animales normales⁵⁸. Estos ratones tenían una mayor reducción de los niveles séricos de IGF-I a lo esperado (20-25% del normal), pero sorprendentemente presentaban una tasa de crecimiento similar a la de los ratones normales y sus niveles de GH estaban incrementados^{59,60}. Basándose en estos hallazgos, se propuso la “hipótesis somatomedina 2001”, según la cual el hígado fue excluido del eje somatotrópico⁴³. Sin embargo, este modelo puede ser cuestionado por el hecho de que los niveles séricos de IGFBPs también están disminuidos en el ratón KO para el IGF-I hepático, de manera que no tiene lugar una reducción de los niveles circulantes de IGF-I libre⁶¹. Además, un 20% de los niveles normales de IGF-I parece representar el umbral necesario para el crecimiento normal del hueso, ya que en ratones KO para el gen GHR los estrógenos recuperaban los niveles del IGF-I sérico a un 20% respecto a los niveles normales y se recuperaba el crecimiento⁶². Sin embargo, la disminución de los niveles séricos de IGF-I al 10% respecto al normal, que tiene lugar en ratones doble mutantes para el IGF-I hepático y la subunidad ácido lábil (ALS), produce una reducción importante del crecimiento⁶³, demostrando claramente la importancia del IGF-I circulante en este contexto.

Algunos trabajos han demostrado expresión de IGF-II pero no de IGF-I en condrocitos del cartílago de crecimiento^{64,65}. LeRoith et al.⁴³ propusieron un mecanismo según el cual el IGF-II, controlado por la GH, estaría implicado en la regulación de la proliferación de los condrocitos, mientras que el IGF-I sería responsable de la diferenciación condrocítica. Sin embargo, existe controversia acerca de la localización del IGF-I en el cartílago de crecimiento. Los mRNA de IGF-I e IGF-II se han localizado en condrocitos hipertróficos de ratones postnatales⁶⁶, pero en cartílago de crecimiento de vacas fetales se ha detectado mayor expresión de ambos mRNAs en condrocitos

proliferativos respecto a condrocitos hipertróficos⁶⁷. Finalmente, en ratas, el IGF-I fue detectado en todas las zonas del cartílago de crecimiento, siendo los niveles de expresión más elevados en los condrocitos proliferativos y prehipertróficos^{68,69}.

Es necesario realizar más investigaciones para esclarecer la implicación del eje GH-IGFs en la regulación del crecimiento longitudinal del esqueleto.

1.2.2 Glucocorticoides

Varias condiciones clínicas, tales como artritis reumatoide juvenil, asma crónico y trasplante de órganos, requieren la administración prolongada de glucocorticoides (GCs), dando lugar, entre otros fenómenos durante la infancia y la adolescencia, a una disminución de la masa ósea y a un retraso de crecimiento^{70,71}. También existe durante la infancia, aunque no son frecuentes, estados de aumento patológico de secreción de GCs que dan lugar a los mismos efectos. Por el contrario, la deficiencia familiar de GCs está asociada a talla alta⁷². Esta deficiencia se debe a una resistencia al ACTH (*adrenocorticotropic hormone*), en un alto porcentaje por mutaciones del receptor de ACTH (MC2R). Sin embargo otras deficiencias de GCs no dan lugar a talla alta.

Los GCs regulan el metabolismo del hueso y del cartílago a través de múltiples mecanismos y sus efectos varían según las concentraciones y el tiempo a los que las células están expuestas. De forma general, se ha sugerido que concentraciones fisiológicas de cortisol tendrían un efecto anabólico y promotor del crecimiento del esqueleto óseo regulando de una forma positiva la actividad de los condrocitos, de los osteoblastos y de los osteoclastos. Sin embargo, concentraciones suprafisiológicas, tales como las observadas en la terapia corticoidea crónica o en el síndrome de Cushing, tienen de una forma global un efecto deletéreo sobre el crecimiento y mineralización del esqueleto, dando lugar a un retraso de crecimiento y a una osteoporosis importante^{70, 71}.

No existen datos en la literatura sobre el efecto de concentraciones fisiológicas de GCs aunque probablemente una cierta concentración de GCs sea necesaria para el desarrollo normal del cartílago. Así, Grant et al.⁷³ demostraron que en niños con insuficiencia adrenal primaria debido al síndrome de Addison la terapia sustitutiva con GCs daba lugar a un crecimiento normal. Concentraciones suprafisiológicas tienen un efecto opuesto, además de inhibir las acciones estimuladoras del TGF- β y de la GH. En los osteoblastos concentraciones fisiológicas son necesarias en la osteoclastogénesis,

mientras que dosis elevadas la inhiben. En condiciones fisiológicas se produce un balance en la regulación de estas tres estirpes celulares que tiene como resultado final el crecimiento y la mineralización del tejido óseo. En condiciones en las que existe un exceso de GCs, este balance se rompe no sólo por lo anteriormente expuesto, sino también por las múltiples modificaciones que el exceso de GCs produce sobre el metabolismo fosfocálcico y la síntesis de hormonas relacionadas con el anabolismo óseo como PTH, VitD, GH, esteroides gonadales y factores locales de crecimiento⁷⁴⁻⁷⁶.

El tratamiento con dexametasona (Dx) inhibe la proliferación condrocítica y la síntesis de matriz, sugiriendo que los GCs son potentes reguladores negativos de la condrogénesis⁷⁷. Estudios recientes han demostrado expresión de receptor de GCs (GCCR) en células óseas de rata, incluyendo condrocitos⁷⁸ y en cartílago de crecimiento humano, especialmente en condrocitos hipertróficos, sugiriendo efectos directos de los GCs sobre el cartílago de crecimiento⁷⁹. La administración sistémica de GCs a ratón, rata y conejo disminuye el crecimiento longitudinal del hueso al inhibir la proliferación celular condrocítica^{80,81}. Además, se ha comprobado que los GCs estimulan la apoptosis de los condrocitos de cartílago de crecimiento^{80,82}.

Los efectos locales de los GCs sobre la proliferación de los condrocitos del cartílago de crecimiento pueden estar mediados, al menos en parte, por los cambios en el sistema IGF-I local. Así se ha demostrado que la administración sistémica de GCs a corto plazo a roedores disminuye la expresión de IGF-I en el cartílago de crecimiento⁸³ mientras que la administración a largo plazo incrementa su expresión⁶⁶. Las dosis de GCs supresivas del crecimiento que se dan a los conejos incrementan la expresión de GHR⁸⁴, en cambio *in vitro*, los GCs suprimen la expresión de GHR en condrocitos de cartílago de crecimiento de rata, mientras que la expresión de IGF-IR no se ve afectada⁸⁵.

Además de estas acciones directas sobre el cartílago de crecimiento, los GCs pueden suprimir el crecimiento longitudinal por mecanismos indirectos. En algunos trabajos en humanos, un exceso de GCs ha sido asociado a una secreción de GH reducida⁸⁶, pero en otros no⁸⁷.

Los GCs ejercen la mayor parte de sus efectos mediante la interacción con un receptor específico localizado en el citoplasma celular. El GCCR inactivo se encuentra asociado a varias proteínas, entre ellas hsp90. Al unirse con el GC, el receptor cambia su forma y se combina con otro para formar un homodímero y translocarse al núcleo. Una vez en el núcleo, el receptor se une a la secuencia de DNA conocida como

elemento de respuesta a glucocorticoide (GRE) y activa la transcripción de genes (transactivación) o bien la inhibe (transrepresión)⁸⁸.

1.2.3 Vitamina D

El metabolito activo de la VitD [1,25(OH)₂-vitamina D] es el que posee mayor afinidad y capacidad de unión al receptor de la vitamina D (VDR). Este metabolito es fundamental en la regulación del crecimiento y la mineralización ósea. Actúa al menos por tres mecanismos diferentes:

- proporciona los sustratos necesarios para la mineralización tanto del cartílago como del hueso al regular la absorción intestinal de calcio y fósforo y la reabsorción tubular de calcio en el riñón;
- regula la síntesis de otras hormonas implicadas en el metabolismo calcio-fósforo (inhibe la síntesis de PTH, de PTHrP (*PTH related protein*) y de calcitonina) y
- ejerce acciones directas sobre los condrocitos, los osteoblastos y los osteoclastos⁵.

En el cartílago de crecimiento ya formado, los condrocitos expresan VDR, la VitD promueve su diferenciación a estadios más maduros (condrocitos hipertróficos) y regula su función en el frente de mineralización estimulando la síntesis de actividades enzimáticas relacionadas con la mineralización de la matriz (hidrolasas que resorberán la matriz y fosfatasas alcalinas que iniciarán la mineralización en las vesículas de la misma)⁵.

La VitD es la principal hormona reguladora del balance cálcico positivo necesario para la mineralización del esqueleto durante la infancia y adolescencia. En ausencia de concentraciones adecuadas de VitD, la mineralización del cartílago y del hueso es deficiente, dando lugar a un cuadro clínico de raquitismo en el niño en crecimiento y a osteomalacia en el adulto. Sin embargo, tanto en el hueso como en el cartílago no es un agente imprescindible para la mineralización de sus matrices extracelulares, ya que esta mineralización puede tener lugar en ausencia de VitD cuando se aportan cantidades adecuadas de calcio y fósforo, tal como se ha demostrado en ratas raquíticas y en niños con déficit de VDR. La administración intravenosa de calcio en ambas situaciones normaliza la calcemia, inhibe el hiperparatiroidismo y cura las lesiones raquíticas en ausencia de efectos de VitD. Estos datos indican que las acciones más importantes de

este metabolito son las de regular la absorción intestinal de calcio y fósforo y facilitar los sustratos necesarios en el frente de mineralización del cartílago y en el hueso para promover la mineralización de sus matrices. En este sentido, cabe señalar el estrecho paralelismo existente entre sus concentraciones plasmáticas, su biodisponibilidad y el proceso de mineralización del esqueleto óseo. Sus efectos sobre condrocitos, osteoblastos y osteoclastos no son limitantes y pueden ser compensados por otras hormonas con efectos similares^{31,74,75,89-92}.

Como ya se ha comentado, la deficiencia de VitD produce raquitismo, en el que la anchura de la zona hipertrófica del cartílago de crecimiento está incrementada y la mineralización es defectiva⁹³. Un fenotipo similar aparece en el ratón KO para VDR. En estos ratones existe una disminución de la apoptosis de los condrocitos hipertróficos en los extremos metafisiales de la columna y disminuye la invasión de vasos sanguíneos y células óseas⁹⁴. El raquitismo también se desarrolla en ratones y humanos hipofosfatémicos, sugiriendo que la disminución del fosfato extracelular, fenómeno que ocurre cuando hay deficiencia de VitD, puede jugar un papel importante en el raquitismo. De hecho, una dieta enriquecida puede normalizar el crecimiento en animales deficientes o resistentes a VitD^{95,96}.

El 85% de la VitD se transporta en sangre ligada a la proteína de transporte con alta afinidad VDBG (*vitamin D binding globulin*) y sus acciones biológicas se llevan a cabo por medio de VDR. Este receptor después de unirse a VitD se heterodimeriza con otros receptores hormonales, en particular con la familia de los receptores de ácido retinoico (RXR). El complejo se liga a secuencias de DNA, llamadas elementos de respuesta a VitD (VDRE), en las regiones promotoras de los genes regulados por VitD. Los heterodímeros VDR/RXR activados forman complejos con proteínas adicionales llamadas coactivadoras, para formar un puente con el complejo VDR/RXR que une los VDRE a las proteínas responsables de la transcripción, como la RNA polimerasa II en el lugar de inicio de la transcripción⁵.

1.3 REACCIÓN DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

En el contexto de nuestro trabajo orientado al conocimiento de la regulación del cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano por GCs y VitD hemos utilizado la

metodología disponible para la cuantificación de la expresión génica: la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real. Los ensayos de PCR a tiempo real representan un avance en la tecnología para los análisis cuantitativos de secuencias de ácidos nucleicos (DNA y RNA). Actualmente existen numerosos sistemas de detección útiles para PCR cuantitativa a tiempo real.

Los métodos de PCR cuantitativa a tiempo real presentan diferentes ventajas respecto a las técnicas convencionales de PCR, que requieren electroforesis para detectar el amplicon y cuantificarlo. Estas ventajas son:

- No se requiere manipulación después de la reacción de PCR ya que los resultados están disponibles en cuanto acaba esta reacción.
- Es posible realizar la co-amplificación y detección de un gen normalizador (*housekeeping gene* o control positivo interno) en el mismo tubo.
- Disminuye la variabilidad, debido a que los datos son recogidos durante la fase exponencial de la reacción de PCR, de manera que los datos no están influenciados por la limitación de reactivos.
- Como la sonda *TaqMan* es específica del gen diana, el ensayo es específico.
- Es una metodología altamente sensible.

Las desventajas son:

- Los métodos de PCR a tiempo real no permiten determinar el tamaño del producto de la reacción de PCR, de manera que no se puede excluir la posibilidad de contaminación entre muestras ni se puede comparar el tamaño de los amplicones cuando se analizan diferentes muestras.
- Los ensayos requieren que el tamaño de la diana amplificada no sobrepase los 150 pares de bases (pb) para obtener el máximo de eficiencia en la reacción.

El hallazgo de que la *Taq* polimerasa posee actividad exonucleasa 5' → 3' y la construcción de sondas de oligonucleótidos dualmente marcadas, las cuales emiten señales fluorescentes sólo cuando son eliminadas, han sido esenciales para la puesta a punto de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real. En los ensayos *Taqman* se combinan estos dos puntos. En este sistema una sonda, denominada sonda *TaqMan*, está diseñada para alinearse con una secuencia diana situada entre las secuencias dianas de los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada dualmente, con un marcador *reporter* en el extremo 5' y con un *quencher* en el extremo 3'. La sonda tiene una T_m (temperatura de *melting* o de separación de las hebras) aproximadamente 10°C superior a la T_m de los cebadores. Mientras esta sonda esté intacta, en su forma libre, la

fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher*. En la degradación de la sonda, que tiene lugar durante la fase de extensión por la actividad 5' → 3' exonucleasa de la *Taq* polimerasa, el *reporter* y el *quencher* se separan de manera que el *quencher* no puede absorber la fluorescencia del *reporter* y tiene lugar un incremento en la emisión de fluorescencia (Figura 3).

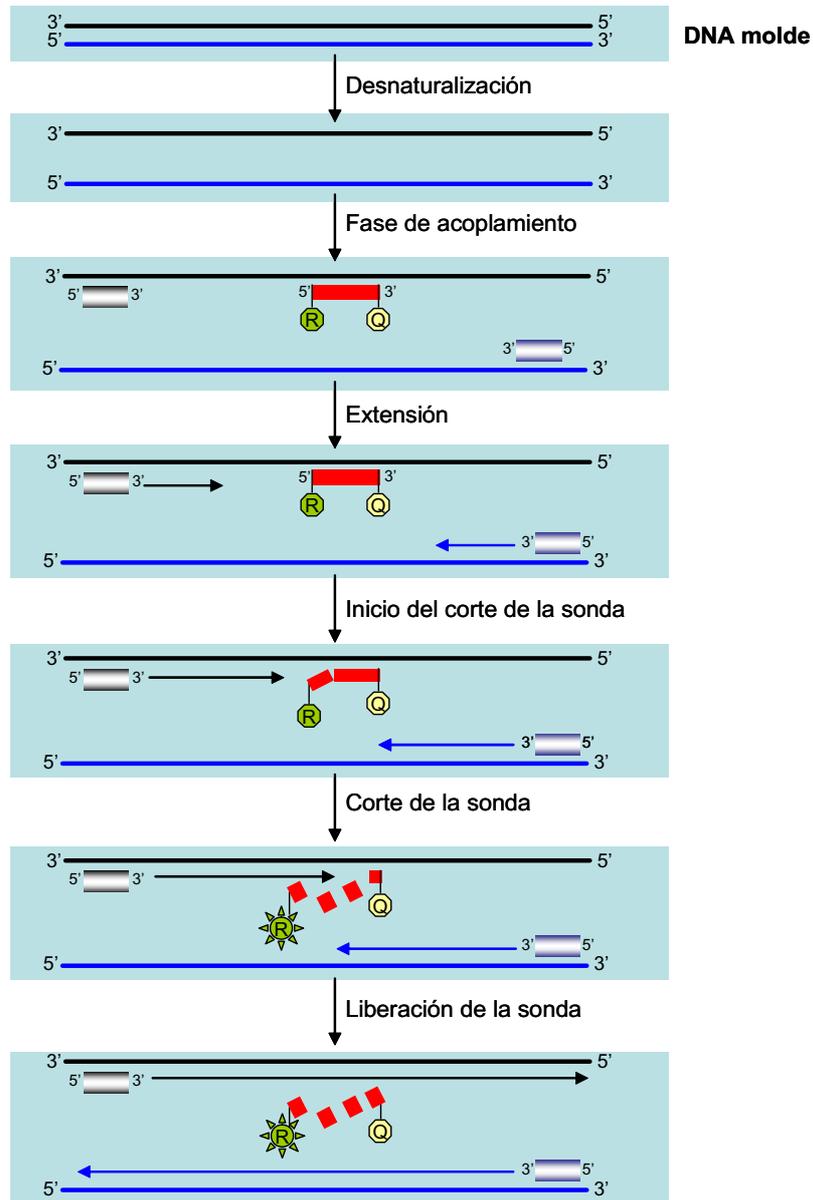


Figura 3. Hidrólisis de las sondas *TaqMan* durante la reacción de PCR a tiempo real.

La cantidad de fluorescencia liberada es directamente proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo de la reacción de PCR y se puede utilizar como medida

cuantitativa de la formación del producto. Este proceso, que tiene lugar en cada ciclo de la reacción de PCR, no interfiere con la acumulación exponencial del producto de PCR. Este incremento de fluorescencia puede ser leído a “tiempo real” (durante el transcurso de la reacción) por un detector y es una consecuencia directa de la amplificación que tiene lugar durante la reacción de PCR. Un programa de ordenador calcula el ΔR_n utilizando la ecuación:

$$\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$$

en la cual R_n^+ es la emisión de fluorescencia del producto en cada punto y R_n^- la emisión de fluorescencia de la línea basal. Este valor expresa la degradación de la sonda durante el proceso de la reacción de PCR.

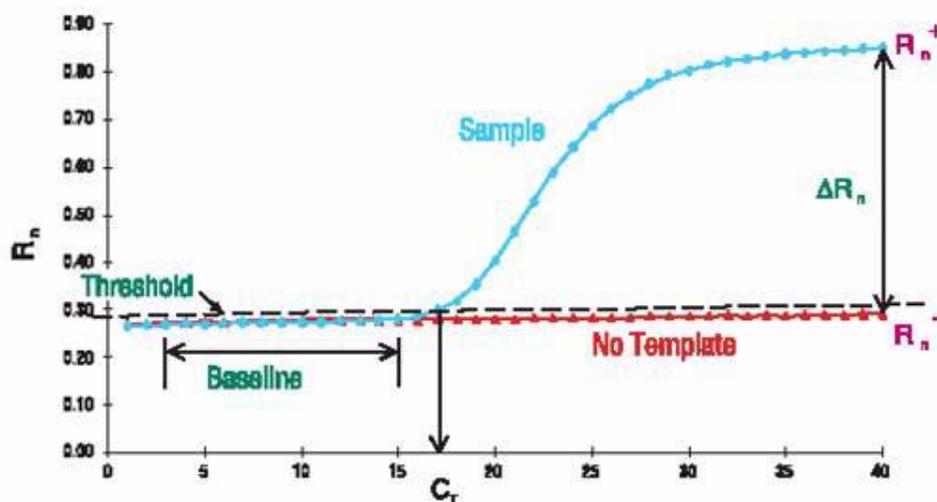


Figura 4. Gráfica de amplificación de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real. (R_n^+ : emisión de fluorescencia del producto en cada punto; R_n^- : emisión de fluorescencia de la línea basal ; C_t : *threshold cycle*)

El software del ordenador construye gráficas de amplificación (Figura 4) utilizando los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la amplificación. Los ΔR_n se representan respecto al número de ciclos. Durante los primeros ciclos de la reacción de PCR, los valores del ΔR_n no sobrepasan la línea basal. Se escoge un umbral arbitrario (*threshold*) normalmente determinado como 10 veces la desviación estándar de la línea basal. El ciclo umbral (*threshold cycle* o C_t) se calcula como el punto (número de ciclo) en el cual la fluorescencia excede este umbral escogido. Los valores de C_t disminuyen linealmente con el incremento de la cantidad del transcrito de interés presente en la muestra.

La elevada especificidad de este método se debe a la complementariedad entre los cebadores, la sonda interna y el transcrito de interés. La señal de fluorescencia se generará solamente si la sonda se alinea con la secuencia diana durante la reacción de PCR.

La reacción de PCR a tiempo real incluye todos los componentes de una reacción de PCR convencional: los cuatro nucleótidos en un tampón apropiado que contiene la concentración de magnesio óptima, los cebadores y la DNA polimerasa, y un componente adicional, la sonda *TaqMan*.

1.3.1 Normalización de los resultados

En cada método de PCR cuantitativa pueden introducirse variaciones debidas a pequeñas diferencias en las cantidades iniciales de RNA o a diferencias en cuanto a la eficiencia de la síntesis de cDNA (*complementary DNA*) y la amplificación en la reacción de PCR. Por ello, la reacción de PCR cuantitativa requiere de la corrección de estas variaciones experimentales. Esta corrección se realiza mediante la normalización respecto a un gen endógeno (*housekeeping gene*). Un gen endógeno ideal es aquel que se expresa de forma constante en diferentes tejidos de un organismo, en los diferentes estados de desarrollo y cuya expresión no se ve afectada por ningún tratamiento experimental. Pero encontrar un gen con estas características no siempre es posible. Los genes endógenos más comúnmente utilizados son la β -actina, el gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el rRNA (RNA ribosomal) y la hipoxantinguanin fosforibosiltransferasa. Otros genes candidatos son la ciclofilina, la ATP sintasa 6 mitocondrial y la porfobilonógeno deaminasa. El gen endógeno ideal depende de las condiciones específicas de cada experimento así como de cada tejido. Pueden existir experimentos, como tratamientos que incrementen o que disminuyan la expresión génica, en los que esta elección del gen endógeno sea difícil. En estos casos se utiliza un factor de corrección para comparar las muestras tratadas con las no tratadas, en el que la media del gen endógeno en la muestra control se divide por la media del gen endógeno en las muestras tratadas.

1.3.2 Métodos de cuantificación

Para cuantificar los resultados obtenidos por PCR cuantitativa a tiempo real existen dos métodos diferentes:

- Cuantificación absoluta: en este método se utiliza una muestra de concentración conocida para construir una curva estándar. Este estándar puede ser un plásmido de doble cadena purificado, un RNA transcrito *in vitro*, un DNA de cadena sencilla sintetizado *in vitro* o cualquier muestra de cDNA que exprese el gen de interés. La concentración de estas muestras de DNA o RNA se puede medir por espectrofotómetro a 260 nm de λ y convertir en número de copias utilizando el peso molecular del DNA o del RNA. Para la cuantificación absoluta de la expresión del mRNA tienen que ser utilizados patrones puros. Este método es utilizado en aquellas aplicaciones en las que la cuantificación absoluta es esencial para obtener buenos resultados, como por ejemplo para cuantificar una carga viral.
- Cuantificación relativa: esta cuantificación se puede realizar por:
 1. **Método de curva estándar**: para la cuantificación relativa se establece una curva estándar para cada gen a analizar sobre la que se extrapolan los resultados obtenidos en las muestras. El resultado se expresa como el cociente entre el valor obtenido en la muestra problema respecto al obtenido en la muestra control o calibradora. En el caso de experimentos con diferentes tratamientos la muestra control o calibradora puede ser la muestra no tratada. Para hacer esta curva se puede utilizar RNA o DNA que contenga el gen a cuantificar. Para la cuantificación normalizada del gen endógeno, es necesario preparar una curva estándar tanto del gen problema como del gen endógeno. En cada muestra experimental, la cantidad del gen problema y del gen endógeno se determina extrapolando cada valor obtenido en su respectiva curva estándar. La cantidad del gen problema se divide por la cantidad del gen endógeno para obtener valores normalizados. Cada uno de estos valores normalizados se divide por el valor obtenido en la muestra control o calibradora, de manera que se obtienen niveles de expresión relativa respecto a la muestra control.
 2. **Método de comparación de C_t o $\Delta\Delta C_t$** : en este método se utilizan fórmulas aritméticas para el cálculo de los niveles de expresión relativa, comparando con un calibrador, el cual puede ser una muestra control (muestra no tratada). La cantidad del gen problema, normalizada con el gen endógeno y relativizada

respecto a la muestra control, viene dada por la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t$ es igual a ΔC_t (muestra) - ΔC_t (control o calibrador) y ΔC_t es el C_t del gen problema restado del C_t del gen endógeno. La ecuación representa la expresión normalizada del gen diana en una muestra desconocida, relativa a la expresión normalizada de la muestra control. Para poder utilizar este método es necesario que la eficiencia de la amplificación del gen diana sea idéntica a la de la amplificación del gen endógeno. Si la eficiencia no es la misma para los dos genes, lo cual es frecuente, se tiene que utilizar el método de curva estándar para cuantificar este gen.

2. OBJETIVOS

Los objetivos generales han sido analizar los efectos de los GCs, de la VitD, del IGF-I y de la GH sobre la proliferación y la expresión de genes del eje GH-IGFs, del factor de transcripción SOX9 y de proteínas de la matriz, en condrocitos del cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano. Este objetivo general contribuye al conocimiento de la regulación del cartílago de crecimiento humano, en condiciones que puedan semejar las fisiológicas y en condiciones patológicas, en las que pueden existir deficiencias o excesos de las hormonas estudiadas. Tanto los déficits como los excesos pueden tener, *in vivo*, un origen endógeno o exógeno. Los déficits de GCs, de VitD, de GH y/o de IGF-I se observan en situaciones clínicas bien definidas. Los excesos, aunque pueden ser de origen endógeno, son los menos frecuentes en pediatría, de modo que se producen principalmente por tratamientos con dosis farmacológicas, sobre todo en el caso de los GCs. Todas estas situaciones alteran el patrón de crecimiento esquelético cuyo tejido diana es el cartílago de crecimiento. Al iniciar este trabajo disponíamos de un modelo experimental de cultivo de condrocitos humanos fetales, modelo en el que se había estudiado la regulación de la proliferación celular por diversas hormonas y la diferenciación mediante técnicas de biología celular y bioquímicas. Se fijó el objetivo de poner a punto las técnicas de biología molecular que permitieran detectar la regulación de la expresión de genes implicados en la fisiología del cartílago de crecimiento. Asimismo, consideramos la necesidad de poner a punto un modelo celular estable que permitiera obtener resultados homogéneos y disponer de un material celular más abundante.

Los objetivos concretos han sido:

- Establecer un modelo celular humano de cultivo que permita analizar la proliferación y la expresión de los genes de interés en células procedentes del cartílago de crecimiento humano.
 - Línea celular condrocítica humana
 - Cultivo primario procedente de cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano
- Analizar la regulación de la proliferación y de la expresión de los genes de interés por GCs.
- Analizar la regulación de la proliferación y de la expresión de los genes de interés por VitD.

- Analizar la regulación de la proliferación y de la expresión de los genes de interés por IGF-I.
- Analizar el efecto del IGF-I sobre la regulación observada por los GCs y/o por la VitD.
- Analizar la regulación de la proliferación y de la expresión de los genes de interés por GH.
- Analizar el efecto de la GH sobre la regulación observada por los GCs y/o por la VitD.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LÍNEA CELULAR CONDROCÍTICA HUMANA PREESTABLECIDA C-28/I2

3.1.1 Cultivo celular de la línea condrocítica humana C-28/I2

La línea celular condrocítica humana C-28/I2 ha sido cedida por la Dra. Mary B. Goldring. Esta línea celular inmortalizada fue establecida por Goldring et al.⁹⁷ a partir de un cultivo primario de células aisladas de cartílago costal de una joven de 15 años. Para inmortalizar las células utilizaron SV40-T antígeno insertado en el vector retroviral pZipNeoSV (X)⁹⁸ con resistencia a neomicina. Estas células inmortalizadas expresan transcritos de mRNA que codifican para proteínas de matriz específicas de cartílago como colágeno tipo 2 y aggrecan, pero no expresan marcadores de condrocito hipertrófico como colágeno tipo 10.

Los cultivos de esta línea se han mantenido en medio DMEM/HAM F-12 (1/1, v/v) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) a 37°C, con 5% CO₂ en aire y humedad.

3.1.2 Condiciones de cultivo

Para establecer las condiciones de cultivo apropiadas para la realización de las diferentes experiencias se analizó la curva de crecimiento. Para ello se sembraron 42 placas de 25 cm² a una densidad de 3.000 células/cm² con 5 ml de medio DMEM/HAM F-12 al 50% suplementado con 10% de SBF y 25 UI de penicilina y estreptomycin. El cultivo se continuó durante 14 días y cada día se recogieron las células de tres cajas mediante una digestión enzimática con tripsina, desde el día 1 hasta el día 14, con el siguiente protocolo:

- Se aspiró el medio de cultivo y se guardó a -20°C.
- Se realizaron dos lavados con PBS (*Phosphate buffer solution*: solución salina tamponada con fosfato) a 37°C.
- Se añadió tripsina 0,2% y se incubaron las placas a 37°C durante 10 minutos.
- Se añadió PBS frío.
- Se centrifugó la suspensión celular a 810 g durante 15 minutos a 15°C.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PBS frío.

3.1.3 Estudio de la proliferación celular mediante el conteo de células en cámara de Neubauer

El índice de proliferación celular de la línea condrocítica humana C-28/I2 se estableció mediante el recuento de células viables utilizando la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado, con la ayuda de un diamante, una cuadrícula como la que se ve en la *Figura 5*. El área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado.

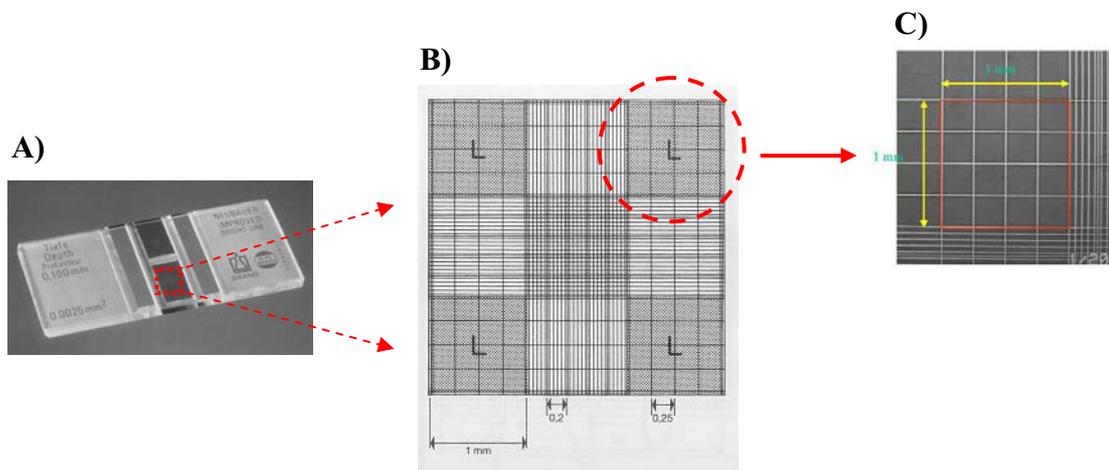


Figura 5. Cámara de Neubauer. A) Portaobjetos. B) Cuadrícula de 3 x 3 mm marcada con diamante. C) Zona L formada por 16 cuadrículas de 0,25 mm cada lado. Imagen tomada empleando microscopio invertido de contraste de fases.

En la *Figura 5 (C)* se puede observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ve como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0,25 milímetros de lado.

Para determinar la viabilidad celular se empleó el método de exclusión de azul tripán (*Tripán Blue* 1%). El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues, las células que aparecen claramente de color azul son consideradas no viables. Se debe realizar el conteo de aquellas células viables que están dentro de las cuadrículas además de aquellas que tocan la línea superior o la derecha pero no la inferior o la izquierda.

Si se cuentan las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de X células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será:

$$\text{Concentración en la suspensión (células / ml)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células}}{4} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

Una vez realizado el recuento se juntaron las células tripsinizadas de las tres cajas de cada uno de los días de cultivo.

3.1.4 Extracción de RNA total de las células de la línea C-28/I2 en cultivo

El método utilizado para la extracción de RNA total de las células se resume en el esquema de la *Figura 6*.

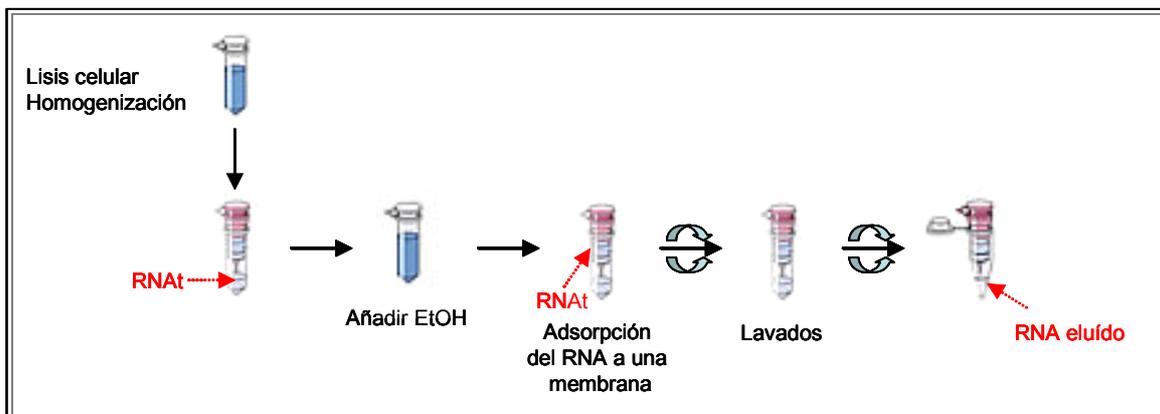


Figura 6. Diferentes etapas del método de extracción de RNA total.

Las células se lisaron y homogeneizaron en presencia de un tampón con un alto contenido en tiocianato de guanidina (GTC), el cual inactiva las RNasas. La homogeneización de la muestra es necesaria para reducir la viscosidad causada por componentes celulares de elevado peso molecular o restos celulares. En este trabajo se ha utilizado el preparado comercial *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) para la extracción de RNA total y para homogeneizar las muestras se han utilizado las columnas *QIAshredder spin column* (QIAGEN), que contienen un polímero sintético de fibras cortantes con efecto triturador. Una vez homogeneizadas las muestras, se añadió etanol para ajustar las condiciones óptimas de unión y la mezcla se aplicó a la *RNeasy Mini Column*, en la que el RNA total se une a la membrana de sílica gel de la columna y, mediante lavados sucesivos, se eliminaron los contaminantes. El RNA total se eluyó en 50 μ l de agua libre de RNasas.

3.1.5 Tratamiento con DNasa I

Una vez extraído el RNA total de las células procedentes de los cultivos de la línea celular condrocítica humana C-28/I2, se realizó un tratamiento con DNasa I a una concentración final de 0,1 U/ μ l (AMBION) para eliminar la posible contaminación con DNA genómico de las muestras de RNA total.

3.1.6 Extracción de mRNA de las células de la línea C-28/I2 en cultivo

Para la extracción de mRNA se utilizó un método basado en la unión de las colas poli-Adeninas [poli(A)] de los mRNA a una celulosa que contiene oligo(dTimidina) [(oligo(dT))].

Las células se lisaron en una solución tamponadora que contenía GTC a alta concentración para asegurar la rápida inactivación de las RNasas endógenas. El extracto se diluyó tres veces con un tampón de elución, reduciendo de esta manera la concentración de GTC para permitir la unión eficiente entre las colas poli-A de las moléculas de mRNA y los oligo(dT) de la celulosa, pero siendo esta concentración lo suficientemente elevada para mantener las RNasas completamente inhibidas. Esta dilución da lugar a una purificación inicial ya que se produce la precipitación de parte de las proteínas. El extracto se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga que contenía la celulosa oligo(dT). Después de 3 minutos en agitación, durante los cuales los poli(A) del RNA se unen a la celulosa oligo(dT), el tubo se centrifugó a 11.000 g durante 10 segundos y el sobrenadante se eliminó quedando un precipitado con la celulosa oligo(dT). El precipitado se lavó secuencialmente: primero con un volumen de tampón Tris-EDTA con alto contenido en sal (HTE) (10 mM Tris-HCl pH 7,5 / 1 mM EDTA / 0,5 M NaCl) para luego continuar con lavados con un volumen de tampón Tris-EDTA con bajo contenido salino (LTE) (10 mM Tris-HCl pH 7,5 / 1 mM EDTA / 0,1 M NaCl). Cada lavado se acompañó de un proceso de resuspensión y una re-centrifugación de 10 segundos a 11.000 g. Para este proceso de extracción se utilizó el preparado comercial *QuickPrep micro mRNA Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) basado en el método explicado anteriormente. Este preparado comercial permite el aislamiento rápido de mRNA a partir de pequeñas cantidades de células eucariotas. Después del último lavado con tampón HTE, el precipitado de celulosa oligo(dT) se resuspendió en un pequeño volumen de tampón

LTE. El conjugado oligo(dT)-mRNA se transfirió a una microcolumna en la que se lavó tres veces con medio volumen de tampón LTE mediante centrifugación breve. Finalmente el mRNA se eluyó con una aplicación de 0,2 ml de tampón de elución previamente calentado a 65°C.

Una vez extraído se concentró el mRNA por precipitación. Esta precipitación se realizó utilizando 250 µg/ml final de glicógeno y 250 mM final de acetato potásico. El mRNA finalmente se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNasas y se guardó congelado a -80°C.

3.1.7 Diseño de cebadores para la amplificación por reacción de PCR

El diseño de las secuencias de los cebadores es una etapa importante en la puesta a punto de una reacción de PCR. Su composición determina el tamaño del producto obtenido y su temperatura de *melting* (T_m : temperatura a la cual la mitad de las moléculas de un ácido nucleico bicatenario se encuentran desnaturalizadas). Un mal diseño de cebadores puede dar lugar a una amplificación pobre o nula debido a una amplificación inespecífica y/o a la formación de dímeros de cebadores. A pesar de que la selección de cebadores eficientes y específicos es empírica, existen determinadas reglas bien establecidas que conviene seguir:

- Tamaño del cebador: tanto la especificidad, la T_m como la temperatura de hibridación o de *annealing* son parcialmente dependientes del tamaño del cebador, de manera que este parámetro es crítico para una correcta reacción de PCR. La longitud mínima de un oligonucleótido debe ser de 18 bases. El tamaño del cebador es proporcional a la eficiencia de la hibridación, de manera que, cuanto más largo sea el cebador menor será la eficiencia aunque mayor su especificidad. La temperatura de hibridación óptima para un cebador es de al menos 50°C y se procura que sea 5°C inferior a la T_m . De manera que con la premisa de que la temperatura de hibridación óptima sea de al menos 50°C eso quiere decir que la T_m sea de unos 55°C.
- Temperatura de *melting* (T_m): es necesario tener en cuenta que en la reacción de PCR se añaden dos cebadores. Estos dos cebadores tienen que ser diseñados de manera que tengan T_m similares. Si los cebadores fallan en cuanto a la T_m la

amplificación será menos eficiente, de manera que un cebador con una T_m baja no trabajará a temperaturas elevadas y viceversa. La fórmula más ampliamente utilizada para el cálculo de la T_m , conocida como la fórmula Wallace, es la siguiente:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

- Especificidad: como ya se ha mencionado anteriormente, la especificidad es parcialmente dependiente del tamaño del cebador. Los cebadores deben ser diseñados de manera que solamente exista una única secuencia idéntica en el DNA que se quiere amplificar. Al menos uno de ellos debe ser específico de la secuencia. Un cebador diseñado con una secuencia común a otros genes da lugar a una amplificación inespecífica.
- Secuencias complementarias: los cebadores deben ser diseñados sin homología dentro de su misma secuencia. Si un cebador contiene alguna intra-homología puede producirse un replegamiento de manera que esto interferirá con la unión de este cebador a su secuencia complementaria en el DNA. También debe evitarse la homología inter-cebadores ya que esto puede interferir en la hibridación. Si esta homología ocurre en el extremo 3' se pueden formar dímeros de cebadores que disminuirán la formación del producto esperado vía competición. La secuencia de los cebadores debe estar conservada en todas las variantes descritas del DNA que se quiere detectar y ser específica del mismo.
- Contenido en G/C (guanina/citosina): el cebador debe contener entre un 45% a un 55% de GC, respecto al contenido en AT (adenina/timina). Esto es debido a que la unión entre G-C es más fuerte que la unión entre A-T de manera que la temperatura necesaria para romper la unión entre G-C es más elevada. Un cebador con elevado contenido en GC tendrá una T_m elevada.

Se puede concluir que idealmente un cebador tiene que contener una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia del DNA que queremos amplificar, un 50% de contenido en GC y de aproximadamente 20 pb.

Como estos cebadores van a ser utilizados para amplificar cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción del RNA extraído de los cultivos celulares, han sido diseñados

de manera que estén lo más cerca posible del extremo 3' del mRNA del gen de interés. Siempre que sea posible se diseñarán cebadores interexónicos (cebador sentido y antisentido diseñados en exones diferentes o en uniones exón-exón). De esta manera se evita la amplificación de DNA genómico en el material extraído de las células. En algunos genes este diseño inter-exónico no ha sido posible debido a que el último exón era de gran tamaño y se hubiera alejado demasiado del extremo 3' de RNA.

Todos los productos obtenidos a partir de la utilización de estos cebadores tienen un tamaño aproximado de entre 200-300 pb.

Teniendo en cuenta todas estas premisas, los cebadores utilizados para la cuantificación génica en condrocitos de la línea celular humana C-28/I2 son los que están representados en la *Tabla 1*. Se analizó la expresión de factores de crecimiento, receptores, factores de transcripción y proteínas de la matriz a lo largo de los diferentes días de cultivo.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Localización	Tamaño RNA(b)	Tamaño DNA(pb)
GAPDH	Sentido	GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC	Exón 8	346	-
	Antisentido	CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTT	Exón 8-9		
IGF-IA	Sentido	CCCGTGTCTAAACACACTGC	Exón 5	328	328
	Antisentido	CCAGTCATTATTTTCTGGTTTC	Exón 5		
IGF-IB	Sentido	GAAGGAAAGGTTGGCCAAAG	Exón 5	255	255
	Antisentido	CAGCAGGCCTACTTTTCTTC	Exón 5		
IGF-II	Sentido	TCCTGGAGACGTACTGTGC	Exón 8	249	541
	Antisentido	GTAGAGCAATCAGGGGACG	Exón 9		
IGFBP3	Sentido	TATGATACAACTGTGGCCATG	Exón 5	248	248
	Antisentido	CTCAAAAATACTTTTCCCCC	Exón 5		
IGF-IR	Sentido	CATCAGCAGCATCAAAGAGG	Exón 21	253	253
	Antisentido	GTAAGGCTGTCTCTCGTCG	Exón 21		
IGF-IIR	Sentido	GAAACTGCATGAAAAATCATGG	Exón 48	224	224
	Antisentido	TCATTCACTAAACATGGCAGG	Exón 48		
GCCR α	Sentido	ATTCATACAGGCAGCGATGG	Exón 9 α	248	248
	Antisentido	TCCTGTCTCCTGTTACATAC	Exón 9 α		
GCCR β	Sentido	GGATTTGCTTCTCTCTAGAAAATG	Exón 9 β	306	306
	Antisentido	ACTACAGATTATTATTCAGCATG	Exón 9 β		
GHR	Sentido	AGCAAGAAGGCAAAAATAGTTTGG	Exón 10	252	252
	Antisentido	AGGAGTCTGGGGAGGTATAAAAGG	Exón 10		
SOX9	Sentido	CATCTTCTCTGGAGTGAGG	Exón 8	267	267
	Antisentido	GCCAGGTTTCTTAAGTTACAG	Exón 8		
CBFA1	Sentido	TTAGGTGCTTCAGAACTGGG	Exón 6-7	253	-
	Antisentido	GTAGAGATATGGAGTGCTGC	Exón 7		
Ets2	Sentido	TGAACTACGAGAAGCTGAGC	Exón 10	248	248
	Antisentido	AGGCAGCTGGTCAGGATGGG	Exón 10		
Aggrecan	Sentido	CCAGGAGGTATGTGAGGAG	Exón 15	182	682
	Antisentido	TCCACTGGTAGTCTTGGGC	Exón 16		
COL10	Sentido	ACTACTCTGAGGCCTGTATG	Exón 3	321	321
	Antisentido	GGTACATGTGCTAATGTTCTG	Exón 3		
CEP-68	Sentido	TAGGACACAGATGTGCCAG	Exón 14	237	237
	Antisentido	GTGCCAGGTTTGTGCCAAG	Exón 14		
COL2A1	Sentido	ACTACTGGATTGACCCCAAC	Exón 51	226	569
	Antisentido	TTGGCAGTGTTGGGAGCCAG	Exón 52		
COMP	Sentido	CGATTCTATGAGGGCCCTG	Exon 18	285	378
	Antisentido	TTCTCACTTCCCCCTCAGG	Exon 19		

Tabla 1. Cebadores sentido y antisentido diseñados para el análisis de la expresión génica en condrocitos de la línea celular humana C-18/I2. En esta tabla se muestra la secuencia de los cebadores así como su localización exónica y el tamaño del producto generado.

3.1.8 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica

Se ha utilizado DNA genómico para establecer las condiciones óptimas de la reacción de PCR para los cebadores diseñados debido a que el RNA extraído de las células es un material poco abundante. El DNA genómico se extrajo a partir de 3-4 ml de sangre periférica según el método de Lahiri y Nurnberger⁹⁹, utilizando el Tris como tampón, MgCl₂ para estabilizar las paredes de los leucocitos, EDTA como inhibidor de las DNasas, SDS 10% y Nonidet P40 como detergentes para disolver los lípidos de la membrana celular y lisar las células, ClNa para precipitar las proteínas, etanol para precipitar el DNA, la solución TK1M (10 mM Tris pH 7,6 / 2,5 mM KCl / 10 mM MgCl₂ / 2 mM EDTA pH 8) para lisar las células y la solución TK2M (10 mM Tris pH 7,6 / 2,5 mM KCl / 10 mM MgCl₂ / 40 mM NaCl / 2 mM EDTA pH 8) para lisar los núcleos.

El DNA genómico así extraído se cuantificó por espectrofotometría.

3.1.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica fue desarrollada a mediados de los ochenta por Kary Mullis y permite obtener una gran cantidad de moléculas de una secuencia específica de DNA. La región que se quiere amplificar se delimita con dos oligonucleótidos sintéticos o cebadores, cuya secuencia es complementaria a cada uno de los extremos del segmento que se desea amplificar.

Para establecer las condiciones óptimas para la reacción de PCR de los genes que se van a estudiar la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía 50 ng de DNA genómico humano, Tampón 10x (*Tabla 2*), 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 µM de cada cebador y 0,02 U de *EcoTaq DNA Polymerase* (Ecogen), utilizando el termociclador *Gene Amp PCR System 2700* (Applied Biosystems) (*Figura 7*).

166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
670 mM Tris.HCl (pH 8,8 a 25°C)
0,1 % Tween-20

Tabla 2. Composición del Tampón 10x de la *EcoTaq DNA Polymerase*.

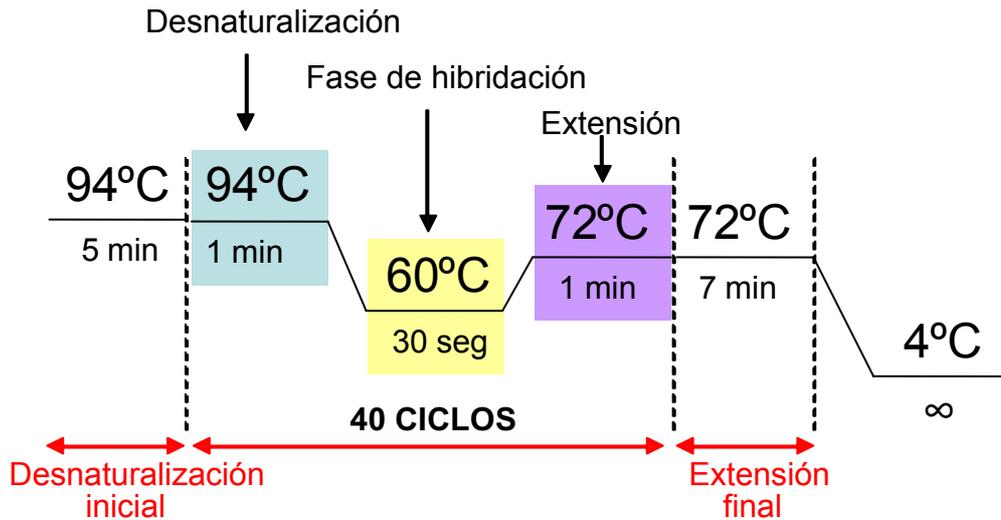


Figura 7. Condiciones del termociclador utilizadas para la amplificación de segmentos.

Con estas condiciones de PCR, no se ha obtenido la banda esperada para el gen COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*), de manera que ha sido necesario realizar un gradiente de Mg^{+2} a las concentraciones de 0,5-1-1,5-2 mM de $MgCl_2$. En función de los resultados obtenidos se decidió amplificar COMP utilizando 0,5 mM de $MgCl_2$.

3.1.10 Electroforesis

3.1.10.1 **Electroforesis en geles de agarosa**

Las moléculas de DNA con un tamaño comprendido entre 200 pb y 50 kb de longitud pueden separarse en geles de agarosa sometidos a una electroforesis horizontal dentro de un campo eléctrico de dirección constante.

Los geles se prepararon a una concentración de 1% de agarosa (Agarose. PROMEGA) en tampón TAE (40 mM Tris-acetato / 1 mM EDTA pH 8).

En la electroforesis se aplicó la corriente eléctrica de un voltaje de 120 V para la separación de los fragmentos de DNA durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3.1.10.1.1 *Tinción de los geles de agarosa mediante bromuro de etidio*

Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio (BE). Una de las propiedades físicas del DNA es su capacidad para intercalar BE entre sus bases. Este compuesto absorbe la luz UV, excitándose y emitiendo fluorescencia naranja en el espectro de la luz visible. Así la adición de BE a una preparación de DNA permitirá su visualización al exponerla a la luz UV utilizando un transiluminador.

El tamaño de cada fragmento se determinó por comparación con marcadores de tamaño conocido como el *1 kb DNA Ladder* (GIBCOBRL. Life Technologies) apropiado para fragmentos con tamaño entre 500 pb y 12 kb o el *100 bp DNA Ladder* (GIBCOBRL. Life Technologies) apropiado para fragmentos de entre 100 pb hasta 1500 pb aunque también contiene un fragmento adicional de 2072 pb. La banda de 600 pb es aproximadamente 2 ó 3 veces más ancha que el resto para obtener una orientación inicial.

3.1.10.2 **Electroforesis en geles de agarosa comerciales**

Se utilizaron geles de agarosa 1,2 % comerciales diseñados para ser utilizados sin necesidad de tampones líquidos [*Ready-To-Run* (Amersham Pharmacia Biotech)]. Estos geles contienen 0,5 µg/ml de BE. Se utilizaron geles de 48 pocillos en cada uno de los cuales se cargó 1 µl de la muestra. La electroforesis se realizó utilizando el sistema *Ready-To-Run Separation Unit* (Amersham Pharmacia Biotech) aplicando un voltaje de 120 V durante 10 minutos.

El resultado se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

3.1.10.3 **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Preparación de geles de poliacrilamida: se prepararon geles de poliacrilamida (acrilamida: 12,5%; bisacrilamida: 2%) en tampón Tris pH 7,6 ajustado con HCl. La mezcla se desgasificó por aplicación de vacío durante 15 minutos.

La composición de los tampones utilizados para el ánodo y el cátodo es la siguiente:

- ÁNODO (+): 450 mM Tris-acetato / 0,4% SDS
- CÁTODO (-): 80 mM Tris / 800 mM Tricina / 0,6% SDS

Se utilizaron tiras *GeneGel Standard Electrode Wicks* (Amersham Pharmacia Biosciences) que se embebieron en los tampones anteriormente preparados.

Geles de poliacrilamida comerciales: estos geles permiten separar fragmentos pequeños de DNA (5-500 pb) que difieren entre sí tan sólo en un par de bases. Se han utilizado geles comerciales *GeneGel Excel 12.5/24 kit* (Amersham Biosciences AB) para su uso en el sistema de electroforesis *GenePhor Electrophoresis System* (Amersham Biosciences AB).

Los geles *GeneGel Excel* son de poliacrilamida al 12% de 122 x 110 x 0,5 mm con 24 pocillos de 6 µl de capacidad cada uno. Para la electroforesis se utilizaron tiras embebidas en tampón de poliacrilamida al 12 % de 123 mm de longitud y 4,5 mm de altura. La tira correspondiente al ánodo está preparada en tampón 0,45 mol/l Tris/Acetato, 4 g/l SDS y 0,05 g/L Orange G. La tira correspondiente al cátodo está preparada en tampón 0,08 mol/l Tris, 0,80 mol/l Tricine y 6g/l SDS.

3.1.10.3.1 *Condiciones de electroforesis de geles de poliacrilamida*

Para el análisis del DNA se aplicó al gel de poliacrilamida comercial una alícuota de 5 µl de producto de PCR más 1 µl de tampón de carga (Blue 6X), consiguiendo un volumen final máximo de 6 µl. En los geles de poliacrilamida preparados en el laboratorio se aplicaron 6 µl de muestra (2 µl de producto de PCR, 3 µl de agua y 1 µl de tampón de carga). Se reservó un pocillo para la aplicación del marcador de peso molecular. El marcador de peso molecular utilizado fue el *100 bp Ladder* (GIBCOBRL. Life Technologies. 250 µg; 1 µg/µl). Se aplicaron 3 µl de 100 bp que equivalen a 3 µg. La electroforesis en el sistema *GenePhor Electrophoresis System* se realizó a 12°C aplicando 600 V (voltaje), 25mA (corriente), 15 W (fuerza) durante 1 hora y 30 minutos.

3.1.10.3.2 *Tinción de los geles de poliacrilamida*

La tinción de los geles de poliacrilamida se realizó mediante el método de tinción de plata. Para esta tinción primero se sumergió el gel en una solución fijadora (ácido benceno sulfónico 3,0% w/v en etanol 24% v/v) en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se realizó la impregnación con nitrato de plata (solución de tinción:

nitrate de plata 1,0% w/v; ácido benceno sulfónico 0,35% w/v) durante otros 30 minutos en agitación, se lavó con agua destilada durante 1 minuto, se reveló el gel (solución de revelado: carbonato sódico 12,5 % w/v; tiosulfato sódico 2% w/v; formaldehído 37% w/v) durante 6 minutos en agitación y finalmente se paró la reacción de tinción (solución de parada y conservación: ácido acético 5% v/v; acetato sódico 25% w/v; glicerol 50% v/v). Para esta tinción se utilizó el preparado comercial *DNA Silver Staining Kit* (Amersham Biosciences Biotech).

3.1.11 Identificación de transcritos amplificados

3.1.11.1 Extracción de productos de PCR a partir de gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% según el siguiente esquema:



Se realizó la electroforesis y, al finalizar ésta, se recortó el gel (línea roja marcada en el esquema anterior). Se tiñó con BE la parte del gel que contenía el marcador y la muestra. Una vez teñido se visualizaron las bandas utilizando un transiluminador. Se recortó la zona del gel no teñido que se encontraba localizada a la altura de la banda que se había visualizado en la parte del gel teñido, se colocó el trozo en un microtubo de 1,5 ml y se pesó la banda recortada. Una vez pesada se troceó la agarosa, se añadieron 50 µl de agua estéril y se colocaron los tubos a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a velocidad máxima y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificó el DNA así obtenido y, si la cantidad era adecuada, se secuenció directamente. En aquellos casos en los que se recuperó poca cantidad de DNA se realizó una reamplificación por PCR según las condiciones especificadas en la *Figura 7*.

3.1.11.2 Extracción de productos de PCR a partir de gel de poliacrilamida

Se recortaron las bandas de interés y, después de trocearlas, se dejaron con 10 μ l de agua estéril en un microtubo de 1,5 ml durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, se centrifugaron los tubos y se realizó una reacción de PCR con los 10 μ l según las condiciones especificadas en la *Figura 7*. Se realizó una electroforesis del producto obtenido en gel de poliacrilamida 12% para comprobar que se había conseguido separar las bandas que se habían recortado y, una vez hecha esta comprobación, se secuenciaron los productos.

3.1.12 Secuenciación automática

Para este trabajo se ha aplicado la secuenciación automática, basado en la secuenciación enzimática o método de los dideoxinucleótidos (ddNTPs) desarrollada por Sanger pero utilizando un marcaje fluorescente en lugar de uno radioactivo.

El secuenciador que se ha utilizado para llevar a cabo la secuenciación automática es el sistema *ABI PRISM 310* (Applied Biosystems) (ver *Figura 8*). En este aparato la electroforesis se realiza de forma continua en un solo capilar que contiene el polímero.

Para la reacción de secuencia se ha utilizado el preparado comercial *ABI PrismTM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), con *AmpliTaq[®] DNA Polymerase, FS*. El polímero utilizado es el POP6 (6% concentración de polímero, Urea 6M).

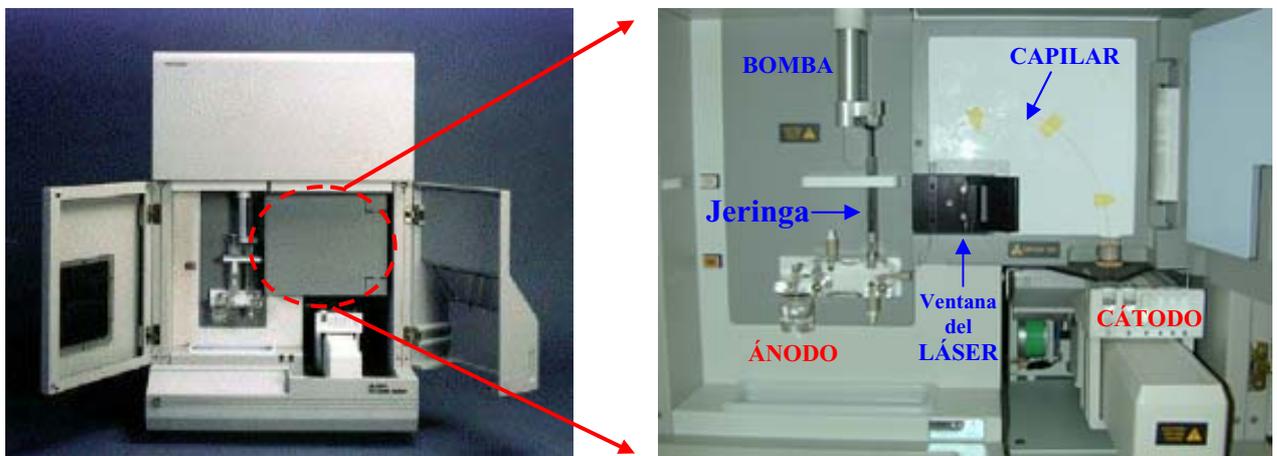


Figura 8. Secuenciador automático ABI PRISM 310.

Durante la recolección de los datos el *ABI PRISM Collection software* recopila las intensidades de luz de las cuatro áreas específicas en la cámara CCD, cada una de ellas correspondiente a la λ de emisión particular de cada marcador fluorescente.

El análisis de multicomponente de los datos de la secuenciación se lleva a cabo automáticamente por el *Sequencing Analysis software*, el cual aplica un cálculo matemático matricial para cada muestra analizada, de manera que asigna las bases para cada intensidad de fluorescencia detectada.

La formulación del preparado comercial *ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* contiene el enzima *AmpliTaQ® DNA Polymerase, FS*. Este enzima es una variante de la *Thermus aquaticus* DNA polimerasa que contiene una mutación puntual en el lugar activo. Ello da lugar a una menor discriminación frente a los ddNTPs, llevando a un patrón con picos más intensos.

Los ddNTPs con marcaje fluorescente (unidos covalentemente a un marcador fluorescente) están modificados de manera que no contienen el grupo hidroxilo 3'. Cada vez que la polimerasa coloque en la cadena elongada uno de estos nucleótidos modificados no se podrá continuar con esta elongación, de manera que se van generando fragmentos de DNA de diferentes tamaños marcados fluorescentemente. Al aplicar la electroforesis, estos fragmentos de DNA entrarán en el capilar en función de su tamaño y así podrá leerse la secuencia completa del producto de interés (*Figura 9*).

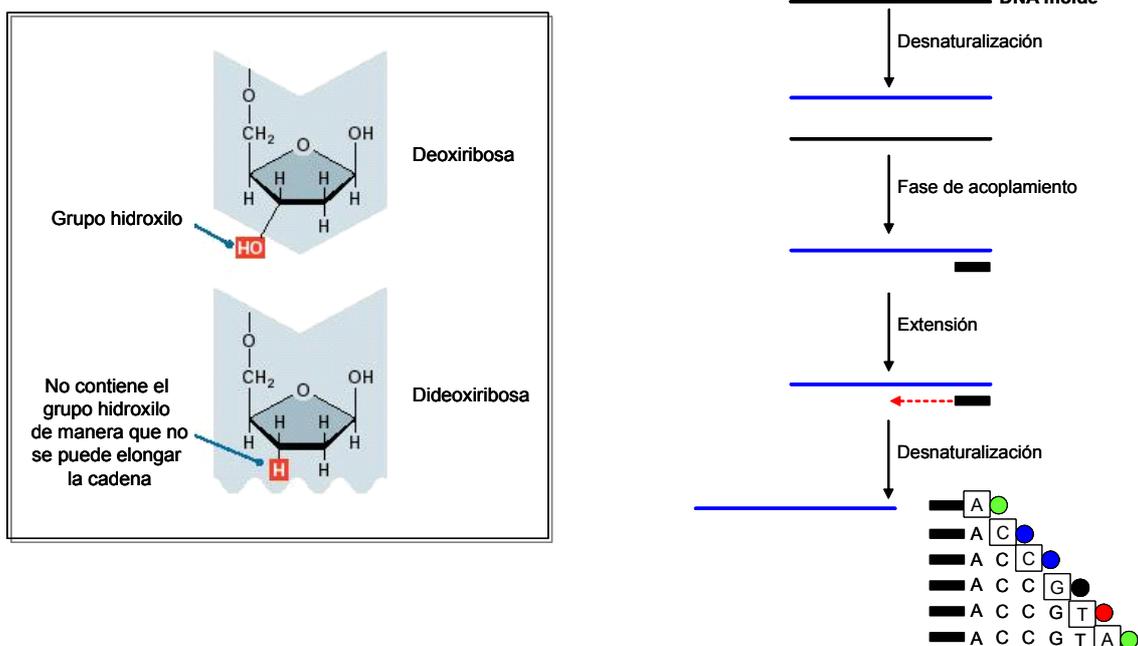
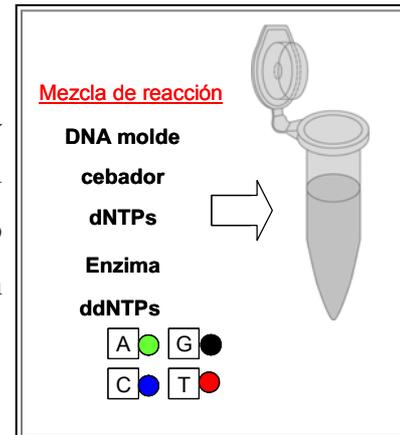


Figura 9. ddNTPs modificados en el extremo 3' y reacción de secuenciación.

3.1.12.1 Secuenciación directa del producto de PCR

Para secuenciar las muestras se preparó una mezcla en un volumen final de 10 μ l que contenía 100 ng del producto de PCR, 3,2 pmol de cebador sentido o antisentido, 0,5% DMSO y *premix* del kit y agua según las especificaciones del proveedor.



Las condiciones del termociclador *Gene Amp PCR System 2700* (Applied Biosystems) para la reacción de secuencia son las representadas en la *Figura 10*.

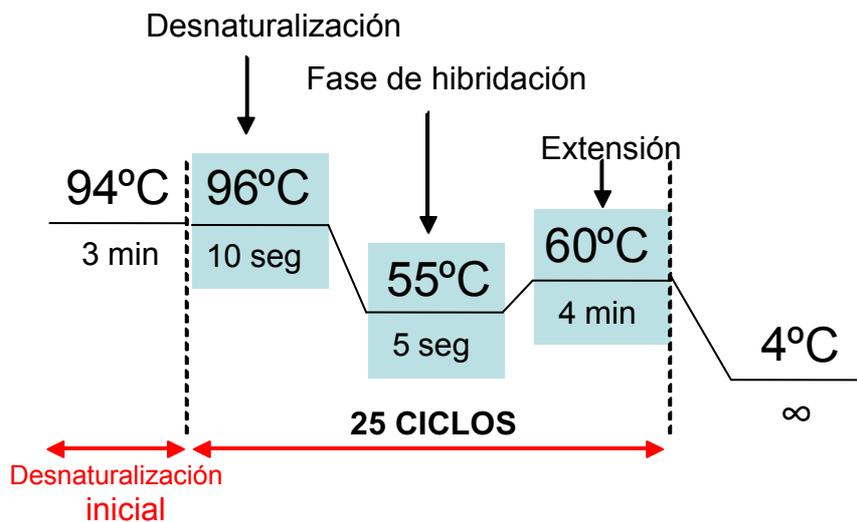


Figura 10. Condiciones del termociclador para la reacción de secuencia.

3.1.12.2 Precipitación o eliminación de terminadores fluorescentes

Una vez finalizada la reacción de secuencia es necesario eliminar los terminadores con marcaje fluorescente (ddNTPs) que no se han unido a los fragmentos de DNA formados para que no puedan interferir al hacer la electroforesis. Se ha utilizado el protocolo de precipitación con etanol y acetato de sodio. Una vez precipitados los productos se resuspendieron en tampón TSR (Applied Biosystems) y se mantuvieron a 4°C y protegidos de la luz hasta su secuenciación.

3.1.13 Direcciones de internet para búsquedas y alineamientos

Una vez obtenida la secuencia de los productos de PCR se procedió a su identificación por comparación con las secuencias contenidas en la base de datos pública *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) cuya dirección es www.ncbi.nlm.nih.gov/. Se utilizó el *BLAST two sequences (bl2seq)* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para alinear cada secuencia obtenida con la secuencia de referencia (RefSeq) del gen de interés a partir de la cual se había realizado el diseño de los cebadores.

3.1.14 Amplificación del RNA mediante la técnica de RT-PCR en una sola etapa (*One-Step*)

Para la obtención de cDNA a partir del RNA extraído de las células se realizó la amplificación mediante la técnica de RT-PCR (retrotranscripción y amplificación por PCR) en una sola etapa. Tanto la síntesis de cDNA como la reacción de PCR se realizan en un único tubo utilizando unos cebadores específicos (ver *Tabla 1*) y RNA que tanto puede ser RNA total como mRNA. Se ha utilizado el preparado comercial *SUPERSCRIPTTM One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq* (GIBCO. Life Technologies). La mezcla *RT/PLATINUM Taq* contiene: a) *Taq* DNA polimerasa recombinante, acoplada a un anticuerpo que inhibe la actividad polimerasa, y b) *SuperScript II H-Reverse Transcriptase*. La *Taq* DNA polimerasa se bloquea a temperatura ambiente pero se recupera después del paso de desnaturalización de la PCR a 94°C. La RT es seguida automáticamente por una reacción de PCR sin ninguna etapa ni manipulación adicional.

La RT-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl que contenía 5, 10 o 20 ng de mRNA dependiendo del gen a amplificar (5 ng: GAPDH, IGF-IA, IGF-IB, IGF-II, IGF-IR, GHR, SOX9, COL10, CEP-68, Ets2; 10 ng: IGFBP3, CBFA1; 20 ng: IGF-IIR, aggrecan, GCCR α , GCCR β), Reaction Mix (200 µM de cada dNTP y 1,2 mM MgSO₄), 0,3 µM de cada cebador y 1x RT/PLATINUM[®] *Taq* Mix. Las condiciones de la RT-PCR son las representadas en la *Figura 11*.

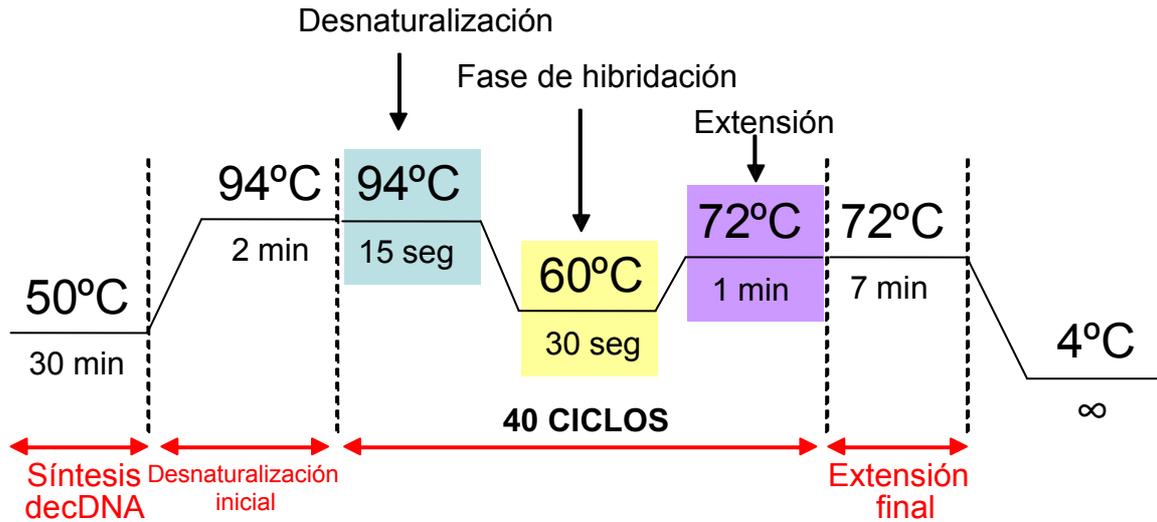


Figura 11. Condiciones del termociclador para la reacción de RT-PCR.

En cada reacción se incluyó un blanco en el que se sustituyó el RNA por agua para comprobar si durante la preparación de la mezcla se produjo contaminación. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *Gene Amp PCR System 2700* (Applied Biosystems).

3.1.15 Método semi-cuantitativo

Para la cuantificación de los productos las muestras se cargaron en geles de agarosa al 1,2 % *Ready-To-Run* (Amersham Pharmacia Biotech) que llevan incorporado BE como método de tinción del DNA. El uso de estos geles prefabricados con BE incorporado evita diferencias de cuantificación debidas a diferencias en el espesor de los geles o a la homogeneidad de la tinción. El sistema de cuantificación de los transcritos obtenidos por análisis de imagen es muy útil por su reproductibilidad y alta sensibilidad. Se utilizó el programa *Multi-Analyst 1.0.2* (Bio-Rad), que traduce la intensidad de fluorescencia de BE incorporado por el producto de PCR en un valor según una escala arbitraria.

Al cuantificar GAPDH, uno de los genes normalizadores más utilizados en la literatura, a lo largo de los diferentes días de cultivo de la línea condrocítica humana C-28/I2 se comprobó que éste variaba dependiendo de la fase de cultivo de manera que no se podía utilizar para normalizar los resultados. Los resultados se expresaron normalizados con respecto a un patrón de concentraciones de DNA calibrado (*Precision Molecular Mass Standard*, Bio-Rad) (ver *Figura 12*) que permite realizar

una curva patrón de densidad óptica y traducir a cantidad de DNA este valor arbitrario. La cantidad de DNA del producto final se consideró proporcional al número de copias inicialmente presentes en la muestra porque se midió en fase exponencial de amplificación, previamente comprobado durante la puesta a punto de las reacciones. Las posibles diferencias de iluminación en el campo se evitaron comprobando la densidad de campos iguales en superficie a la ocupada por las bandas, medida previamente en numerosos puntos de todo el gel.

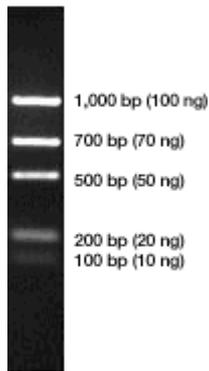


Figura 12. Patrón de bandas calibrado (*Precision Molecular Mass Standard*). Se diluyeron 2,5 μ l del estándar en 10 μ l de tampón de carga y TE y se cargó en un gel de 1,8% agarosa. Las condiciones de electroforesis fueron: 70V durante 75 minutos en tampon TAE 1x. Se tiñó con 300 ml de BE 0,5 μ g/ml durante 15 minutos y se destiñó en agua destilada durante 30 minutos.

3.1.16 Estudio de la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada al DNA

El estudio de la proliferación celular se realizó mediante el análisis de la incorporación de timidina tritiada (timidina- 3 H) al DNA. La valoración de la incorporación de timidina- 3 H al DNA se ha realizado siguiendo una metodología basada en el método descrito por Madsen et al.¹⁰⁰, con algunas modificaciones:

- Cuando los condrocitos en cultivo alcanzaron la fase de confluencia se tripsinizaron y se sembraron a razón de 3.000 células/cm² en una placa de 96 pocillos con 250 μ l de medio DMEM/HAM F-12 al 50% con 10% de SBF y 25 UI de penicilina y de estreptomicina.
- Se incubaron las células durante 48h con medio HAM F-12 sin SBF (condición de privación).
- Se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron durante otras 48 horas con 250 μ l de los diferentes tratamientos especificados en la *Tabla 3*.
- La timidina- 3 H (5 μ Ci/ml) (Amersham Biosciences) se añadió después de las primeras 24 horas de tratamiento sin cambio de medio (ver *Figura 13*).
- Al finalizar el período de tratamiento, el medio de cultivo se aspiró utilizando un colector celular múltiple tipo Mash II, las células se lavaron varias veces con ácido

acético 2,5 % en agua destilada y, a continuación, se trataron con 0,5 % Tritón X-100 (250 μ l/pocillo) durante 10 minutos y se rascaron con la punta de la pipeta. Las células se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se cuantificó la radioactividad en un contador Beta (BECKMAN LS650 *Multi-purpose Scintillation Counter*) obteniéndose un valor que se expresa en cpm de radioactividad por pocillo.

- Las células control fueron incubadas sólo con medio DMEM/HAM F-12 que contenía la misma cantidad de etanol (0,4%) y BSA [*bovine serum albumin*] (0,1%) que las condiciones de tratamiento con Dx, IGF-I y VitD.
- El resultado corresponde al valor medio obtenido para cuatro pocillos para cada una de las condiciones de cultivo expresado como porcentaje respecto a la condición control (100%).

	TRATAMIENTO
1	Control
2	Dexametasona 10^{-9} M
3	Dexametasona 10^{-6} M
4	IGF-I 100 ng/ml
5	IGF-I + Dexametasona 10^{-6} M
6	Vitamina D 10^{-11} M
7	Vitamina D 10^{-6} M
8	IGF-I + Vitamina D 10^{-6} M

Tabla 3. Condiciones de cultivo correspondientes al estudio de proliferación celular de la línea celular C-28/I2.

Dexametasona: SIGMA Chemical CO.

IGF-I: Pharmacia.

Vit D (Calcitriol [$1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃]): Solvay Duphar.

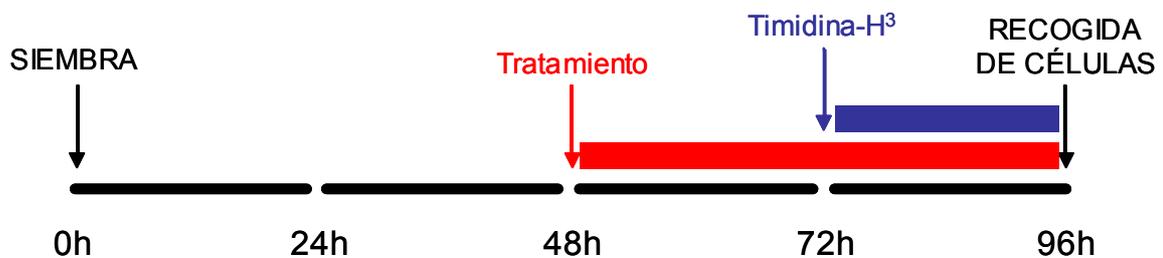


Figura 13. Protocolo de incubación de las células de la línea C-28/I2 para el estudio de proliferación celular por incorporación de timidina-³H al DNA.

3.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE CONDROCITOS HUMANOS PROCEDENTES DE CARTÍLAGO DE EPÍFISIS FETAL

3.2.1 Cultivo celular de condrocitos procedentes de epífisis fetal humana

Los cultivos de condrocitos fueron preparados a partir del cartílago epifiseal de 28 fetos humanos (13 ♀ y 15 ♂), de diferentes edades gestacionales (14-24 semanas), recogidos, previa autorización de necropsia, en las primeras 12 horas “post mortem”. Las muestras proceden del Banco de Tejidos del Hospital Vall d’Hebron. En todos los casos el diagnóstico excluía las patologías relacionadas con el crecimiento.

El cultivo de condrocitos se realizó según la técnica puesta a punto en nuestro laboratorio¹⁰¹, consistente en:

- Recogida de las epífisis tibiales, en las primeras 12 horas “post mortem”, en condiciones de esterilidad, depositándolas en una caja con medio HAM F-12 estéril.
- En una cámara de flujo laminar se limpiaron las epífisis, separando el cartílago de los tejidos adyacentes y aponeurosis, cortándose en finas láminas que fueron depositadas en una cápsula de Petri con medio de cultivo HAM F-12, donde fueron finamente troceadas.

El tejido así obtenido fue sometido a dos digestiones enzimáticas sucesivas en agitación constante en una cámara de digestión con dos compartimentos separados por una malla (tamaño del poro: 63 micras):

- tripsina 0,2% durante 30 minutos a 37°C.
- colagenasa 0,2 %, durante 30 minutos a 37°C.

En aquellos casos en los que el tejido no quedó bien digerido se realizó otra digestión enzimática adicional con colagenasa 0,2% durante 30 minutos a 37°C.

La suspensión celular obtenida se centrifugó a 810 g durante 10 minutos y el depósito celular se resuspendió en 1-2 ml medio de cultivo HAM F-12, en función del tamaño del precipitado. El número de células se contó mediante la cámara de Neubauer.

Los condrocitos fueron sembrados en frascos de cultivo celular de 75 cm² de superficie a una densidad de 4000-7000 células/cm² con 14 ml de medio de cultivo HAM F-12 suplementado con 10 % de SBF, 25 UI de penicilina y de estreptomicina. El aporte de nutrientes se realizó mediante el cambio de medio de cultivo, efectuado cada 72 horas. Los frascos se mantuvieron a 37°C, con 5% CO₂ en aire y humedad.

3.2.2 Condiciones de cultivo

Para poder determinar las condiciones óptimas del cultivo para realizar los estudios de regulación de la proliferación y de la expresión génica se realizó una curva de crecimiento para lo cual se sembraron 15.000 células/cm² en una placa de 96 pocillos con 250 µl de medio HAM F-12 suplementado con un 10% de SBF y 25 UI de penicilina y de estreptomicina. El cultivo se continuó durante 12 días, cambiándose el medio cada 48 horas. Cada día se tripsinizaron 3 pocillos, desde el día 1 hasta el día 12, con el siguiente protocolo:

- Se aspiró el medio de cultivo y se guardó a -20°C.
- Se realizaron tres lavados con PBS a 37°C.
- Se añadieron 50 µl de tripsina 0,2% y se incubaron las placas a 37°C durante 3-5 minutos.
- Se añadieron 100 µl de PBS frío, se recogieron las células en un tubo, se lavó el pocillo con otros 100 µl de PBS frío.
- Se centrifugó la suspensión celular a 810 g durante 15 minutos a 15°C.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PBS frío.

3.2.3 Control de pureza de los cultivos de condrocitos

Para comprobar que las células en cultivo mantenían el fenotipo condrocítico se realizó una reacción de PCR de genes específicos de cartílago, como COMP, COL2A1 y aggrecan, utilizando RNA total procedente de células obtenidas a partir de cartílago fetal y RNA total procedente de fibroblastos de piel fetal. Con los productos obtenidos se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y se secuenciaron.

3.2.4 Protocolo de incubación

En el protocolo de cultivo, las células fueron sincronizadas desde un inicio ya que se sembraron en condiciones de deprivación durante 48h.

Se analizó la expresión de genes del eje GH-IGFs, del factor de transcripción SOX9 y de proteínas de la matriz extracelular. Los genes estudiados se presentan en la *Tabla 4*.

Factores de crecimiento	Receptores	Proteínas transportadoras	Factores de transcripción	Proteínas de matriz
IGF-I	IGF-IR	IGFBP3	SOX9	COL2A1
IGF-II	GHR			Aggrecan
				COMP

Tabla 4. Genes analizados en este trabajo

3.2.4.1 Estudio de la proliferación celular

El estudio de la proliferación celular se realizó mediante el análisis de la incorporación de la timidina-³H al DNA. La valoración de la incorporación de timidina-³H al DNA se ha realizado siguiendo una metodología basada en el método descrito por Madsen et al.¹⁰⁰ con alguna modificación¹⁰¹. Cuando los condrocitos en cultivo primario alcanzaron la fase de confluencia celular se tripsinizaron y 60.000 células/cm² fueron depositadas en una placa de 96 pocillos con 300 µl de medio HAM F-12 sin SBF durante 48 horas (condiciones de privación). El protocolo de incubaciones y recogida de las células que se ha seguido es el mismo que el indicado para el estudio de proliferación celular de la línea C-28/I2 (ver apartado 3.1.16).

Las células control fueron incubadas sólo con medio HAM F-12 sin SBF que contenía la misma cantidad de etanol (0,4%) y BSA (0,1%) que las condiciones de tratamiento con Dx, Mifepristone (MF), IGF-I y VitD. Se han realizado 28 experimentos a partir de cartílagos procedentes de 28 fetos diferentes (edad gestacional: 20.7 ± 2.1 semanas). El resultado corresponde al valor medio obtenido para cuatro pocillos para cada una de las condiciones de cultivo expresado como porcentaje respecto a la condición control (100%).

Los diferentes tratamientos analizados son los especificados en la *Tabla 5*.

	TRATAMIENTO
1	Control
2	Dexametasona 10^{-9} M
3	Dexametasona 10^{-8} M
4	Dexametasona 10^{-7} M
5	Dexametasona 10^{-6} M
6	Dexametasona 10^{-5} M
7	IGF-I 100 ng/ml
8	IGF-I 100 ng/ml + Dx 10^{-6} M
9	Mifepristone 10^{-6} M
10	MF 10^{-6} M + Dx 10^{-9} M
11	MF 10^{-6} M + Dx 10^{-7} M
12	MF 10^{-6} M + Dx 10^{-6} M
13	GH 500 ng/ml
14	GH + Dx 10^{-9} M
15	GH + Dx 10^{-6} M
16	Vitamina D 10^{-11} M
17	Vitamina D 10^{-10} M
18	Vitamina D 10^{-9} M
19	Vitamina D 10^{-8} M
20	Vitamina D 10^{-7} M
21	Vitamina D 10^{-6} M
22	IGF-I 100 ng/ml + Vit D 10^{-6} M
23	Dx 10^{-6} M + Vit D 10^{-6} M
24	GH + Vit D 10^{-11} M
25	GH + Vit D 10^{-10} M
26	GH + Vit D 10^{-9} M
27	GH + Vit D 10^{-8} M
28	GH + Vit D 10^{-7} M
29	GH + Vit D 10^{-6} M
30	GH + Vit D 10^{-11} M + Dx 10^{-9} M
31	GH + Vit D 10^{-10} M + Dx 10^{-9} M
32	GH + Vit D 10^{-9} M + Dx 10^{-9} M
33	GH + Vit D 10^{-8} M + Dx 10^{-9} M
34	GH + Vit D 10^{-7} M + Dx 10^{-9} M
35	GH + Vit D 10^{-6} M + Dx 10^{-9} M
36	GH + Vit D 10^{-11} M + Dx 10^{-6} M
37	GH + Vit D 10^{-10} M + Dx 10^{-6} M
38	GH + Vit D 10^{-9} M + Dx 10^{-6} M
39	GH + Vit D 10^{-8} M + Dx 10^{-6} M
40	GH + Vit D 10^{-7} M + Dx 10^{-6} M
41	GH + Vit D 10^{-6} M + Dx 10^{-6} M

Tabla 5. Condiciones de cultivo correspondientes al protocolo de incubación. El Control corresponde a las células que han sido incubadas con medio de cultivo que contenía la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y VitD.

3.2.4.2 Estudio de la expresión génica

A partir del mismo cultivo y en paralelo, para el estudio del patrón de expresión de los genes especificados en la *Tabla 4* se sembraron 42.000 células/cm² en placas de 6 pocillos y se incubaron 48 horas con 2 ml de medio HAM F-12 sin SBF. Posteriormente se incubaron las células con los tratamientos diferentes especificados en la *Tabla 5* durante otras 48 horas. Pasado este tiempo se recogieron los medios de cultivo y se congelaron a -20°C para el posterior análisis de proteínas en el medio. Se añadió a cada pocillo 1 ml de PBS frío y se recogieron las células mediante rascado. Se lavaron las células con otro ml de PBS frío. Se centrifugaron los 2 ml a 11.000 g durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió una solución de lisis que contenía GTC para proteger el material de las RNAsas endógenas y se realizó una agitación fuerte para romper las células. Este material se guardó en el congelador a -80°C para procesamiento posterior.

3.2.5 Extracción de RNA total de las células de cultivos primarios

El protocolo utilizado para la extracción de RNA total de las células es el mismo que el utilizado para la extracción de RNA total de las células de la línea condrocítica C-28/I2 (ver apartado 3.1.4). En este caso, se realizó un tratamiento adicional con 27 Kunitz U de DNasa I (*RNeasy-Free DNase Set*, QIAGEN) durante 15 minutos a temperatura ambiente mientras el RNA estaba unido a la membrana de silica-gel. Después esta DNasa fue eliminada con un lavado.

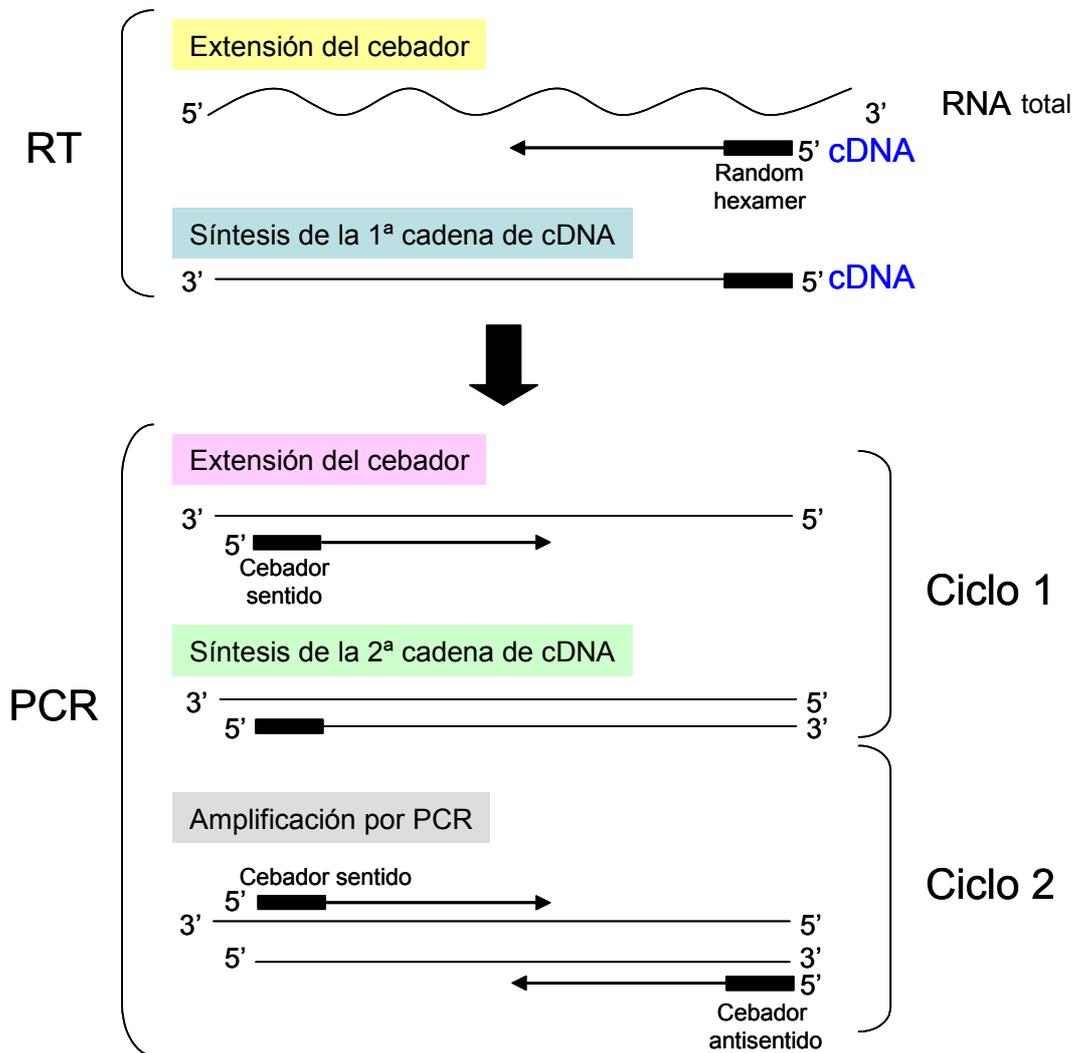
3.2.6 Amplificación del RNA mediante la técnica de RT-PCR en dos etapas (*Two-Step*)

Figura 14. Amplificación de RNA mediante RT-PCR en dos etapas.

En el paso de transcripción reversa o retrotranscripción (RT) el cDNA es retrotranscrito a partir de RNA total utilizando hexámeros aleatorios (*random hexamers*). En el paso de PCR, los productos se sintetizaron a partir del cDNA retrotranscrito utilizando *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) (Figura 14).

3.2.6.1 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se realizó RT utilizando el preparado comercial *Taqman Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems). El RNA total fue retrotranscrito en un volumen final de 100 μ l que contenía de 0,5 a 1,5 μ g de RNA total, 5,5 mM de

MgCl₂, 500 μM de cada uno de los dNTPs, 2,5 μM de Radom Hexamers, 0,4 U/ μl de inhibidor de RNasa y 1,25 U/ μl de *MultiScribe Reverse Transcriptase*. La RT se realizó, según las condiciones especificadas en la *Figura 15*, en el termociclador *Gene Amp PCR System 2700* (Applied Biosystems):

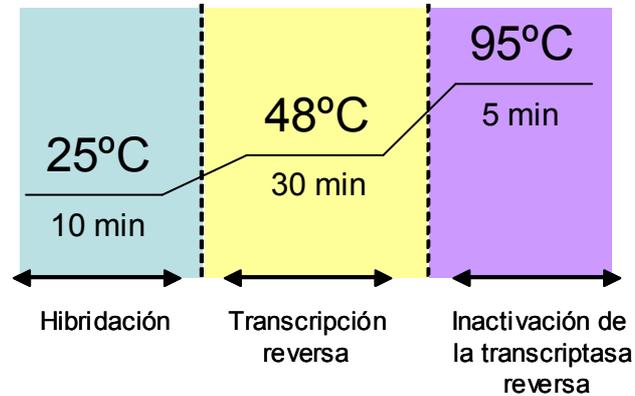


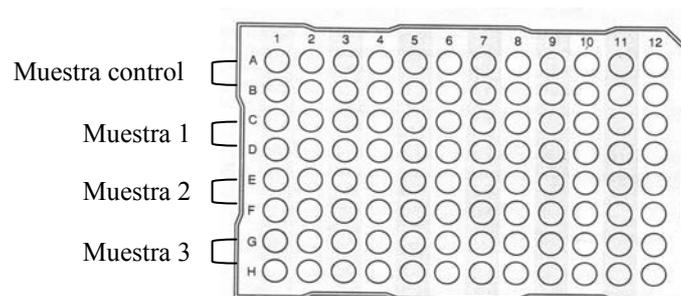
Figura 15. Esquema de las etapas de la transcripción inversa.

Al utilizar como cebadores los *random hexamers* es necesaria la incubación de 10 minutos a 25°C para maximizar la unión del cebador al RNA molde.

Una vez finalizada la RT, el cDNA se alicuotó para sólo descongelar cada alícuota a utilizar.

3.2.6.2 Placa de controles endógenos

Esta placa evalúa la expresión de once controles endógenos utilizando la RT-PCR en dos etapas. Además la placa contiene un Control Interno Positivo (IPC) diseñado para detectar la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en las muestras analizadas.



Columna	CONTROL	Abreviación
1	Control positivo interno	IPC
2	18S rRNA	18S
3	Proteína ácida ribosomal	huPO
4	β -actina	hu β A
5	Ciclofilina	huCYC
6	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	huGAPDH
7	Fosfoglicerokinasa	huPGK
8	β_2 -microglobulina	hu β 2m
9	β -glucoronidasa	huGUS
10	Hipoxantina ribosil transferasa	huHPRT
11	Factor de transcripción IID, TATA binding protein	huTBP
12	Receptor de transferrina	huTfR

Figura 16. Esquema de la *TaqMan Human Endogenous Control Plate* (Applied Biosystems) y tabla de los genes endógenos analizados.

Para poder elegir el control endógeno adecuado se utilizó *TaqMan Human Endogenous Control Plate* (Applied Biosystems) que consiste en una *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems) dividida en 12 columnas, una para control endógeno. Cada columna contiene 8 pocillos que contienen los cebadores y sondas *TaqMan* necesarios para la detección de cada gen (Figura 16). El RNA fue retrotranscrito a cDNA utilizando el kit *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems) pero partiendo de 600 ng de RNA total. Se utilizó el mismo protocolo para todos los genes excepto para el cDNA que se utilizó para cuantificar el 18S. Para este gen el RNA total fue retrotranscrito en un volumen final de 100 μ l que contenía 200 ng de RNA total, 5,5 mM de $MgCl_2$, 500 μ M de cada uno de los dNTPs, 2,5 μ M de Radom Hexamers, 0,4 U/ μ l de inhibidor de RNasa y 3,125 U/ μ l de *MultiScribe Reverse Transcriptase*. También variaron las condiciones de la reacción (Figura 17).

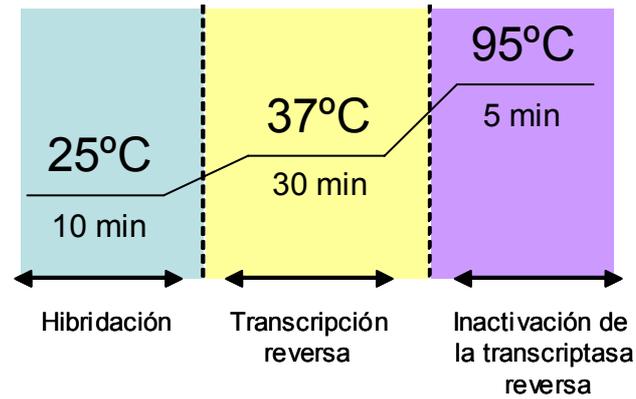


Figura 17. Esquema de las etapas de la transcripción reversa del 18S ribosomal.

En la reacción de PCR, los productos se sintetizaron a partir del cDNA utilizando *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Las sondas utilizadas en esta placa están marcadas con VIC (*reporter*) y TAMRA (*quencher*). Cada pocillo contenía 25 μ l de mezcla de la cual la mitad correspondía a *TaqMan Universal PCR Master Mix* (concentración final 1x) y 2 μ l del cDNA retrotranscrito en el paso anterior. Se ha evaluado la expresión de estos genes en cuatro muestras distintas por duplicado:

- muestra no tratada (muestra control)
- muestra tratada con Dx 10^{-5} M (muestra 1)
- muestra tratada con VitD 10^{-6} M (muestra 2)
- muestra tratada con IGF-I 100 ng/ml (muestra 3)

Estos tratamientos se aplicaron siguiendo el mismo protocolo de incubación que para el estudio de la proliferación celular (ver apartado 3.2.4.1). Las condiciones de la reacción de PCR son las representadas en la *Figura 18*.

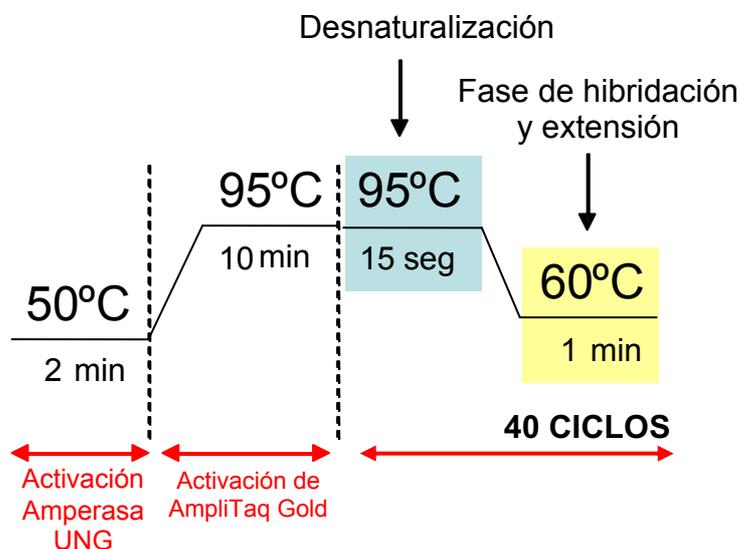


Figura 18. Etapas de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real.

El preparado comercial *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) contiene *AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase*, que es una DNA polimerasa termoestable. Este enzima tiene actividad 5'→ 3' nucleasa pero ha perdido la actividad 3'→ 5' exonucleasa. *TaqMan Universal PCR Master Mix* es una mezcla concentrada 2x que contiene los reactivos suficientes para llevar a cabo la reacción de PCR. La mezcla está optimizada para las reacciones *TaqMan* y contiene la *AmpliTaq Gold DNA polimerasa*, *AmpErase UNG*, dNTPs con dUTP y tampón para optimizar las condiciones.

Una vez finalizada la reacción de PCR es necesario establecer el umbral de detección dentro de la fase exponencial de la escala logarítmica de todas las curvas de amplificación. En la fase exponencial los datos que se obtienen incrementan linealmente. Si esto no es posible, se puede trabajar con múltiples umbrales, diferentes según el gen analizado. Se calcula el ΔC_t entre la muestra control y las diferentes muestras problema.

$$\Delta C_t (\text{muestra}) = \text{media de } C_t(\text{control}) - \text{media de } C_t (\text{muestra})$$

El valor de ΔC_t de la muestra control será de 0, mientras que para el resto de muestras se pueden obtener valores negativos (gen menos expresado en la muestra problema que en la muestra control) o positivos (gen más expresado en la muestra problema que en la muestra control). Los resultados de la *TaqMan Human Endogenous Control Plate* (Applied Biosystems) se expresan en ΔC_t , mayores o menores que el ΔC_t de la muestra control. De esta manera, el control representa la línea basal para los ensayos y se muestra con el valor 0 en el gráfico. Un ΔC_t igual a 1 equivale a una diferencia de 2 veces la concentración inicial de transcrito. El mejor control endógeno es aquel que menos variaciones provoque en cuanto al ΔC_t en las diferentes muestras analizadas, es decir, el que menos varía respecto al valor 0 (valor de la muestra control). Idealmente, el mejor control sería aquel que se mantuviera constante en todas las muestras.

3.2.7 Assays-on-Demand

Para el estudio de la expresión génica se han utilizado *Assays-on-Demand* (Applied Biosystems) y el sistema *ABI PRISM 7000* (Applied Biosystems). Estos ensayos permiten la obtención de resultados de secuencias de referencia de transcritos humanos (RefSeq).

La expresión génica se detecta en una RT-PCR en dos etapas, en la que la etapa de la reacción de PCR está acoplada a un ensayo nucleasa 5' fluorogénico. Todos los *Assays* utilizados están diseñados y optimizados para trabajar con *TaqMan PCR Master Mix* y amplifican dianas de cDNA sin amplificar DNA genómico. Estos ensayos contienen sondas *TaqMan*[®] *MGB* y cebadores a concentraciones no limitantes.

Las sondas *MGB* (*minor groove binder*) contienen un *reporter* marcado con 6-FAM en el extremo 5' de la sonda y un *quencher* no fluorescente (NFQ) en el extremo 3' de la sonda (*Figura 19*). La modificación *MGB* de estas sondas incrementa la T_m sin necesidad de incrementar el tamaño de la sonda. Esto permite la utilización de sondas más pequeñas.

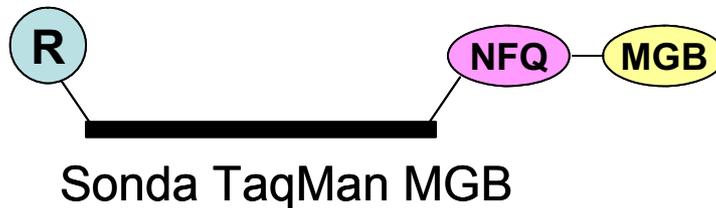


Figura 19. Esquema de la sonda *TaqMan*[®] *MGB*. (R: *reporter*; NFQ: *quencher* no fluorescente; MGB: *minor groove binder*).

Se realizó la reacción de PCR en un volumen final de 20 μ l que contenía 500 ng de cDNA, 1x *Assay-on-Demand* y 1x *TaqMan Universal PCR Master Mix*. Las condiciones de la PCR son las mismas que las que se utilizaron para el análisis de los controles endógenos (*Figura 18*). Los *Assays-on-Demand* utilizados son los especificados en la *Tabla 7*.

GEN	ASSAY	RefSeq	LOCALIZACIÓN	
			Exón	Nucleótido
IGF-I	Hs00153126_m1	NM_000618.2	1-2	224
IGF-II	Hs00171254_m1	NM_000612.2	1-2	549
IGFBP3	Hs00426287_m1	NM_000598.4	-	532
IGF-IR	Hs00609566_m1	NM_000875.2	10-11	2246
GHR	Hs00174872_m1	NM_000163.2	-	314
SOX9	Hs00165814_m1	NM_000346.2	2-3	1060
COL2A1	Hs00264051_m1	NM_033150.1	6-7	475
Aggrecan	Hs00153936_m1	NM_013227.1	11-12	2324
COMP	Hs00164359_m1	NM_000095.2	4-5	425

Tabla 5. *Assays-on-Demand* utilizados en este trabajo.

3.2.8 Cuantificación de la expresión génica

Se han realizado 12 experimentos con condrocitos obtenidos a partir de cartílagos procedentes de 12 fetos diferentes (5 ♀ y 7 ♂). Para cada muestra analizada por PCR cuantitativa a tiempo real se han realizado triplicados tanto del control endógeno huCYC como de cada uno de los genes de interés. Una vez comprobado, mediante cuantificación relativa por el método de curva estándar, que la eficiencia de la amplificación de cada uno de los genes a cuantificar era idéntica a la del gen endógeno, el método de cálculo utilizado en este trabajo ha sido el de cuantificación relativa por comparación de C_t o $\Delta\Delta C_t$. La cantidad del gen problema, normalizada con el gen endógeno y relativizada respecto a la muestra control o calibradora (muestra no tratada), se calculó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t$ es igual a ΔC_t (muestra tratada) - ΔC_t (muestra calibradora) y ΔC_t es el C_t del gen problema restado del C_t del gen endógeno.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IGF-I E IGFBP3 EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

3.3.1 Cuantificación de la proteína IGF-I en el medio de cultivo

La concentración de la proteína IGF-I se ha cuantificado en el medio de cultivo de tres experimentos al final del protocolo de incubación de 48h mediante ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc.), previa separación de IGFbps para evitar interferencias en la cuantificación. Se trata de un inmunoensayo tipo “sandwich” en dos pasos (*Figura 20*). Los estándares, los controles y las muestras problema previamente diluidas (dilución 1/100) se incubaron en pocillos que han sido previamente recubiertos con un anticuerpo frente a IGF-I. Tras la incubación y el lavado, los pocillos se trataron con otro anticuerpo anti-IGF-I marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante. Tras otra incubación y lavado, los pocillos se incubaron con el sustrato tetrametilbenzidina (TMB). A continuación, se añadió una solución ácida para parar la reacción y el grado de producción mediada por enzimas se determinó mediante una doble medición de absorbancia a dos longitudes de onda: 450 y 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la cantidad de IGF-I presente en el medio. La lectura de los estándares permitió establecer una curva patrón en la que se estrapolaron los resultados de las muestras problema.

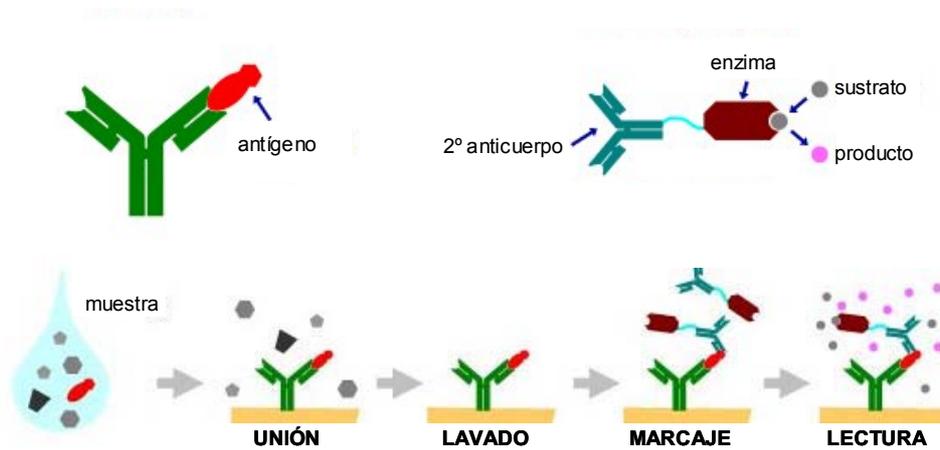


Figura 20. ELISA para la cuantificación de la proteína IGF-I.

3.3.2 Cuantificación de la proteína IGFBP3 en el medio de cultivo

La concentración de la proteína IGFBP3 se ha cuantificado en el medio de cultivo de dos experimentos al final del protocolo de incubación de 48h mediante inmunoanálisis de quimioluminiscencia automatizado IMMULITE[®] (Diagnostics Products Corp).

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se han expresado como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los tratamientos se han calculado mediante el test de la *t-Student* para datos apareados utilizando el programa estadístico StatView 4.5.

4. RESULTADOS

4.1 LÍNEA CELULAR CONDROCÍTICA HUMANA PREESTABLECIDA C-28/I2

4.1.1 Condiciones de cultivo

Se analizó la curva de crecimiento de los condrocitos de la línea celular humana C-28/I2 para establecer las condiciones óptimas de cultivo. El recuento de células se realizó mediante cámara de Neubauer. La curva de crecimiento obtenida se representa en la *Figura 21*.

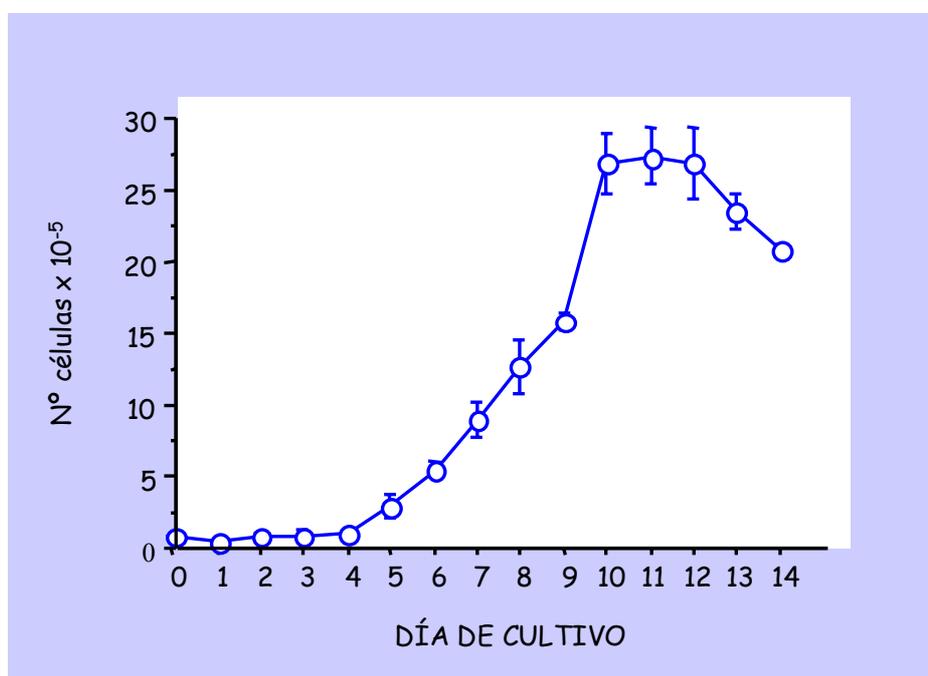


Figura 21. Curva de crecimiento de la línea celular C-28/I2 expresada en número de células ($\times 10^5$) por día de cultivo. Cada punto representa la media \pm DE de tres cajas por día.

Como se observa en la *Figura 21*, las células de la línea C-28/I2 se mantienen en fase de latencia los 4 primeros días, durante los cuales tiene lugar la recuperación del cultivo, produciéndose una pérdida del número de células el día 1 respecto a las células que se sembraron. A partir del día 5 el cultivo entra en fase de crecimiento exponencial produciéndose un incremento del número de células hasta llegar al día 10, en el cual se alcanza el número máximo. A partir del día 10 el número de células se mantiene estable hasta el día 13 en que aumenta la muerte celular con la consiguiente disminución de

células. Utilizando microscopio de campo invertido se observó que el cultivo alcanzó la fase de confluencia el día 10.

Para el estudio de la proliferación celular se sembraron 3000 células/cm² y se dejaron crecer durante 10 días para que las células estuvieran en fase exponencial tardía. A partir de ese momento se realizaron los protocolos de incubación.

4.1.2 Amplificación específica de los genes de interés

Debido a que se obtiene RNA en cantidad insuficiente para el número de determinaciones necesarias en este estudio, para establecer las condiciones óptimas de la reacción de PCR de cada uno de los genes de interés, en cuanto a concentración de Mg⁺² y T_m, se utilizó DNA genómico. Para visualizar los productos obtenidos se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de plata (*Figura 22*).

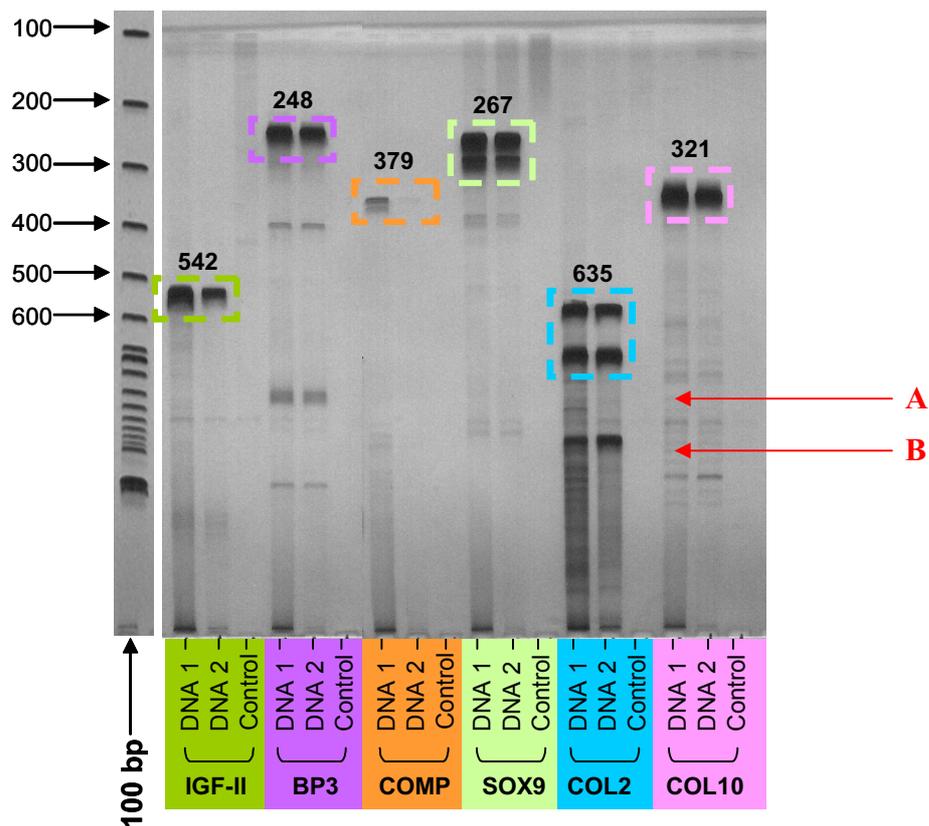


Figura 22. Puesta a punto de las reacciones de amplificación. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos de la amplificación de dos DNA genómicos humanos (DNA1 y DNA2) utilizando los cebadores diseñados para los genes IGF-II, IGFBP3, COMP, SOX9, COL2A1 y COL10. En el control se ha sustituido el DNA genómico por agua para descartar contaminación de la mezcla de PCR. Se ha utilizado 100 bp *Ladder* como marcador de peso molecular.

Una vez realizada la reacción de PCR, se comprobó por electroforesis que el tamaño del amplicon se correspondía con el tamaño esperado (ver *Tabla 1*) y se procedió a secuenciar los productos obtenidos para confirmar que se trataba del gen para el cual estaban diseñados.

La secuenciación de los productos demostró que correspondían a los genes para los cuales estaban diseñados estos cebadores. En otros casos, como en COMP, se obtuvo una banda del tamaño esperado pero muy poco representada, de manera que se procedió a realizar otra reacción de PCR utilizando diferentes concentraciones de Mg^{2+} (ver *Figura 23*).

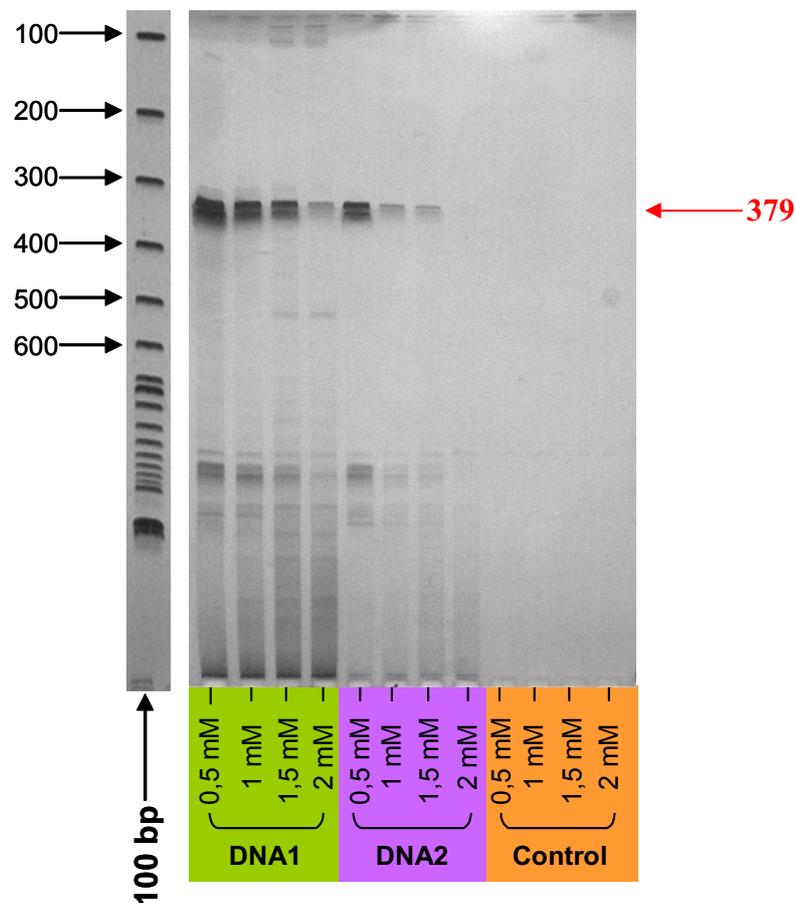


Figura 23. Puesta a punto de la reacción de amplificación de COMP. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos a partir de la amplificación de dos DNA genómicos humanos (DNA1 y DNA2) realizando un gradiente de Mg^{2+} (concentraciones 0,5, 1, 1,5 y 2 mM). En el control se ha sustituido el DNA genómico por agua para descartar contaminación de la mezcla de PCR. Se ha utilizado 100 bp *Ladder* como marcador de peso molecular.

En la *Figura 23* se observa que la concentración adecuada para amplificar COMP a partir de DNA genómico es 0,5 mM de Mg^{2+} . Se secuenció el producto de la reacción

de PCR y se comprobó que la secuencia obtenida se correspondía con la secuencia esperada, de manera que se consideró que los cebadores eran adecuados para amplificar el mRNA de este gen.

Para algunos genes, como COL2A1, se obtuvo más de un producto (ver *Figura 22*, bandas **A** y **B**) de manera que se separaron las bandas obtenidas después de hacer la electroforesis en gel de poliacrilamida. Se utilizaron dos procedimientos diferentes para recuperar las dos bandas de mayor intensidad que se habían observado en la *Figura 22*: recuperación a partir de gel de poliacrilamida y recuperación a partir de gel de agarosa. Tanto en un caso como en otro, una vez recortadas las bandas se procedió a eliminar la poliacrilamida o la agarosa respectivamente y se reamplificó y secuenció el producto resultante. La *Figura 24* representa el gel de poliacrilamida después de la electroforesis de los productos de las dos bandas recortadas y reamplificadas a partir del gel de poliacrilamida de la *Figura 22*.

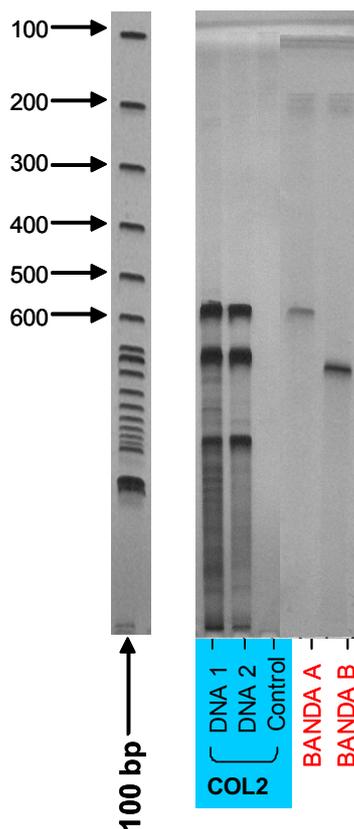


Figura 24. Puesta a punto de la reacción de amplificación de COL2A1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos a partir de la reamplificación de las bandas **A** y **B** recortadas del gel de la *Figura 22*.

Una vez secuenciados los productos se comprobó que correspondían a secuencias de diferentes colágenos pero no eran específicas de COL2A1, como COL1A1,

COL1A2 y COL2A2. Esto es debido a que los diferentes tipos de colágenos presentan elevada homología en cuanto a su secuencia.

4.1.3 Amplificación del RNA mediante la técnica de RT-PCR en una sola etapa para cada uno de los genes de interés

Una vez comprobado que los cebadores diseñados permitían amplificar los genes de interés, se procedió a la extracción del RNA total de las células de la línea condrocítica C-28/I2 para comprobar que estos cebadores también podían amplificar RNA de forma específica. Se realizaron reacciones de RT-PCR en paralelo con RNA total no tratado y tratado con DNasa I, para eliminar la posible contaminación de DNA genómico durante el proceso de obtención de RNA total, para cada uno de los genes. Una vez finalizada la reacción se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de plata (*Figura 25*).

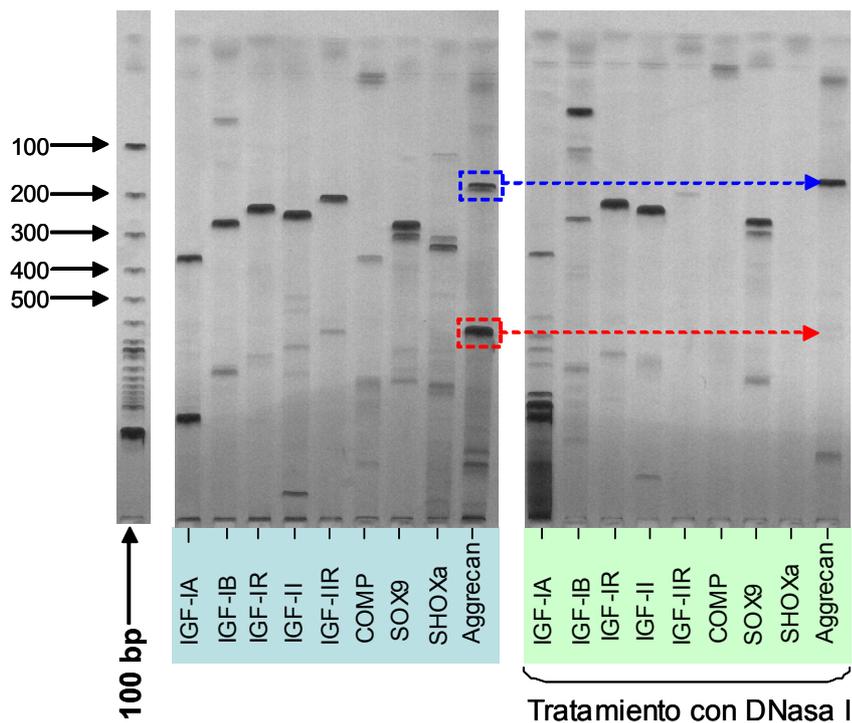


Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de RT-PCR a partir de RNA total de células de la línea celular C-28/I2 sin/con tratamiento con DNasa I.

En la *Figura 25* se puede observar como el RNA total extraído estaba contaminado con DNA genómico: en el caso de *aggrecan* los cebadores estaban diseñados en exones diferentes y se obtuvieron dos productos de tamaño diferente correspondientes a la amplificación de DNA genómico (682 pb) y a la amplificación de RNA (182 pb). Al tratar el RNA total extraído con DNasa I la banda correspondiente al producto obtenido al amplificar DNA genómico desaparece. Lo mismo debería suceder con el IGF-II, en el que los cebadores también se localizan en exones diferentes, pero las bandas correspondientes a la amplificación de DNA genómico no aparecen. Esta diferencia es debida a que el *aggrecan* es un gen poco representado en la muestra, como se comprobó posteriormente con el método de cuantificación, de manera que los cebadores compiten por unirse tanto al RNA total como a la traza de DNA genómico que pueda existir en la muestra. Por el contrario, el IGF-II no se ve tan afectado por la presencia de trazas de DNA genómico ya que es un gen que está más representado en la muestra.

Debido a que la extracción de RNA total no es específica y requiere realizar un tratamiento con DNasa para eliminar la contaminación de DNA genómico, se realizó la extracción de mRNA. El preparado comercial utilizado asegura una extracción específica de mRNA sin contaminación de DNA genómico ya que se basa en un sistema de purificación por afinidad a celulosa oligo(dT), hecho que se comprobó al realizar la RT-PCR con los cebadores anteriormente mencionados. Al hacer la electroforesis de los productos resultantes se comprobó que no aparecían las bandas correspondientes a la amplificación de DNA genómico.

Para determinar el número de ciclos que se corresponden con amplificación exponencial, se realizó un experimento de RT-PCR a diferente número de ciclos de manera que las muestras se fueron extrayendo en los ciclos de amplificación 25, 30, 35 y 40 de la reacción. Estas muestras se cargaron en un gel de agarosa comercial para hacer la electroforesis. Se comprobó mediante el sistema de análisis de imagen MultiAnalyst que a 40 ciclos la reacción no llega a saturación, condición necesaria para realizar la cuantificación de los productos amplificados, ya que no existirá limitación de reactivos. De manera que las cuantificaciones se realizaron a partir de RT-PCR de 40 ciclos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas se realizaron las reacciones de RT-PCR en una sola etapa utilizando los cebadores específicos para cada uno de los genes analizados. Los productos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa comerciales y tinción de BE y se cuantificaron las bandas con el sistema

MultiAnalyst 1.0.2 utilizando como patrón el *Precision Molecular Mass* de Bio-Rad. El sistema *MultiAnalyst* 1.0.2, mediante método densitométrico y análisis computerizado, da un valor a la muestra de interés, en escala arbitraria. La cantidad de producto se determina por comparación con el patrón calibrado.

En la *Figura 26* se representa la imagen de uno de estos geles de agarosa, a partir de la cual se ha realizado la cuantificación.

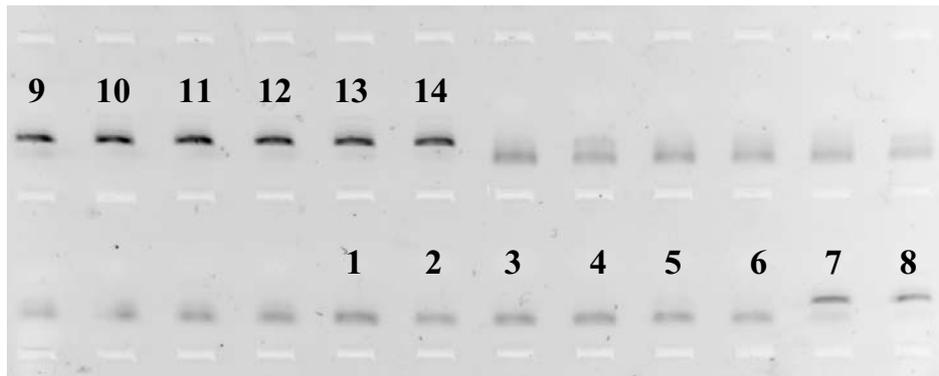


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa comercial de los productos de RT-PCR del gen COL10 obtenidos a partir del mRNA extraído de las células de la línea celular C-28/I2. Cada número representa el día de cultivo.

En la *Figura 26* las muestras se cargaron de forma correlativa, aunque para la cuantificación de los geles las muestras se cargaron de forma aleatoria y siempre se realizaron mediciones del fondo del gel para cada una de las bandas cuantificadas. De esta manera se eliminaron las posibles variaciones en cuanto a tinción de BE que se pueden producir en estos geles. En esta figura se puede observar como el gen amplificado empieza a expresarse a partir del día 6 de cultivo aunque es a partir del día 7 cuando el producto es más abundante. Los resultados obtenidos de las cuantificaciones realizadas para cada uno de los 14 días de cultivo de la línea celular condrocítica C-28/I2 son los que están representados en las *Figuras 27-31*.

4.1.4 Cuantificación de los genes de interés

- Sistema de los IGFs

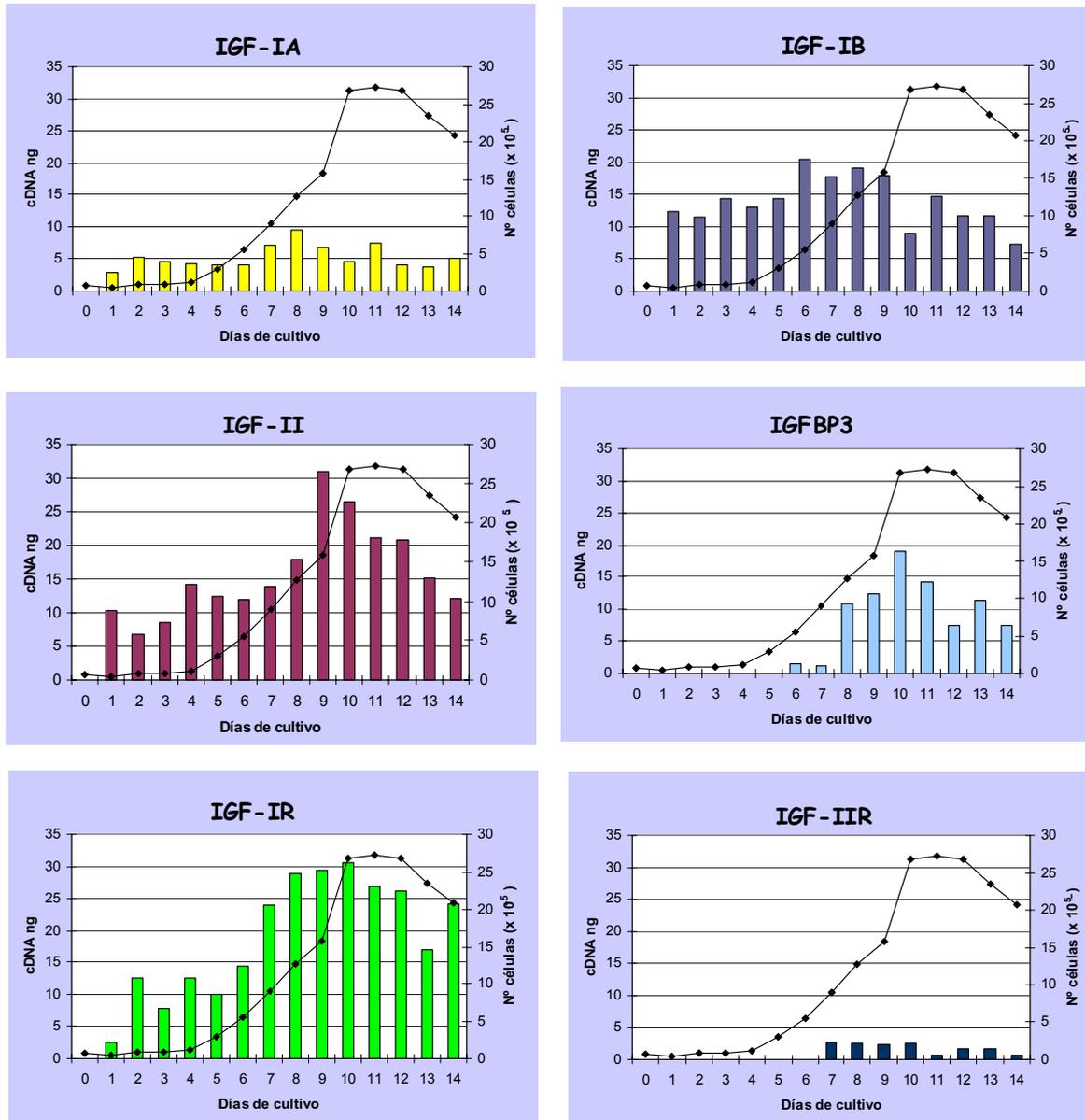


Figura 27. Análisis semicuantitativo de la expresión de los genes del eje IGFs a lo largo de los diferentes días de cultivo. La RT-PCR para cada uno de ellos se realizó partiendo de 5 ng de mRNA para la expresión de IGF-IA, IGF-IB e IGF-IR, 10 ng para la de IGFBP3 y 20 ng para la de IGF-IIR.

La expresión de la isoforma IGF-IB es tres veces superior a la expresión de la isoforma IGF-IA. La expresión de IGF-IA se mantiene constante a lo largo de todo el cultivo ($4,89 \pm 1,82$). Se observa un máximo de expresión el día 8, coincidiendo con la

mitad de la fase exponencial. Con el IGF-IB ($12,98 \pm 3,84$) sucede algo similar pero, en este caso, el máximo de expresión se detecta el día 6 y se mantiene constante hasta el día 9, siendo esta expresión tres veces superior a la de IGF-IA.

En este sistema de cultivo es más abundante la expresión de IGF-II que la de IGF-I. El pico de expresión del IGF-II se detecta el día 9 para luego disminuir coincidiendo con el final de la fase exponencial. El pico de expresión detectado es 1,5 veces superior al detectado para la isoforma IGF-IB.

En cuanto a la proteína de transporte de los IGFs (IGFBP3) no se detecta mRNA hasta el día 6 de cultivo, pese a partir del doble de mRNA que para los genes anteriores. A partir del día 7 incrementa la expresión de este gen alcanzando el máximo el día 10, produciéndose después una disminución de la expresión. El pico de expresión de IGFBP3 es posterior al de IGF-I y al de IGF-II.

La expresión del gen IGF-IR aumenta con los días de cultivo y se mantiene estable hasta el final de la fase exponencial, su pico de expresión es anterior al pico observado para el IGF-II y a partir del día 10 su expresión disminuye.

El IGF-IIR se expresa muy poco en los diferentes días de cultivo a pesar de haber partido de 20 ng de mRNA. No se detecta expresión hasta el día 7 (fase exponencial), para mantenerse constante durante el resto de los días del cultivo.

- Receptores de glucocorticoides y GHR

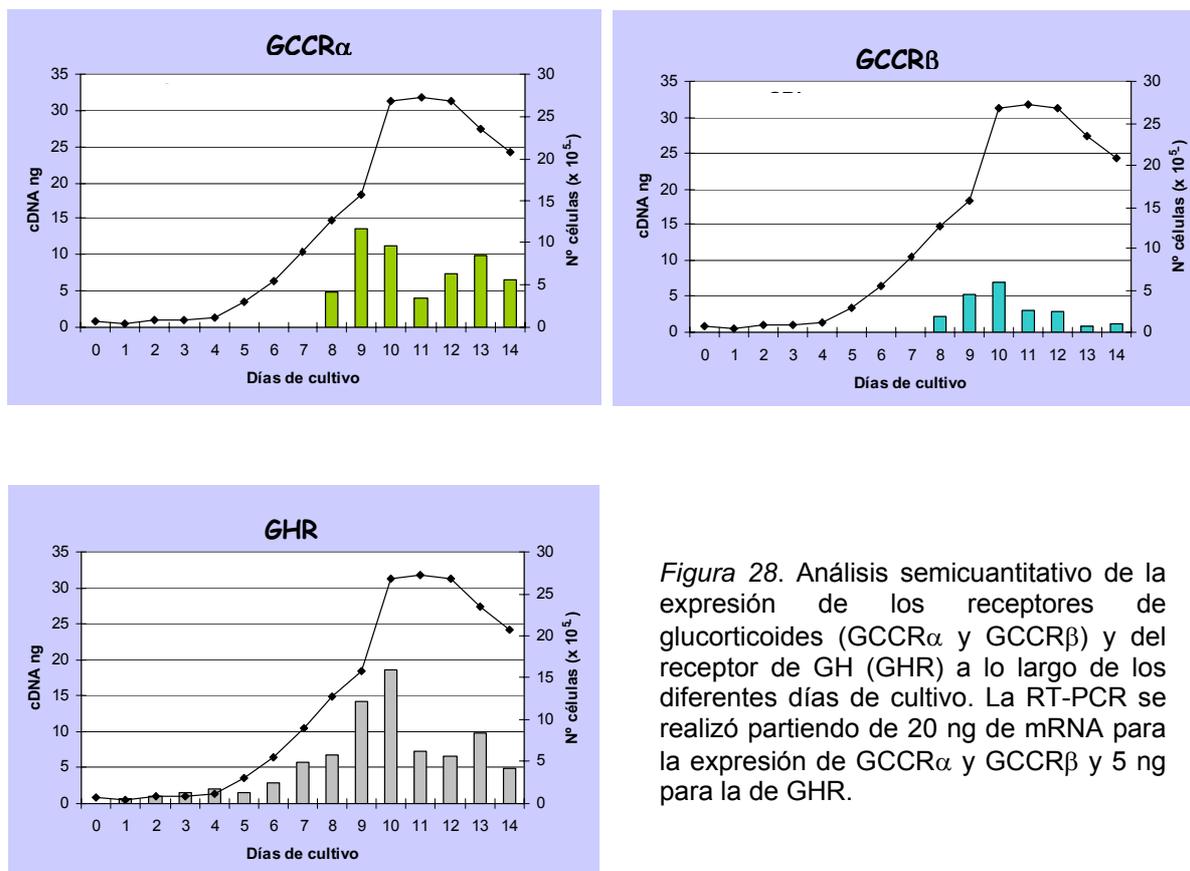


Figura 28. Análisis semicuantitativo de la expresión de los receptores de glucocorticoides (GCCR α y GCCR β) y del receptor de GH (GHR) a lo largo de los diferentes días de cultivo. La RT-PCR se realizó partiendo de 20 ng de mRNA para la expresión de GCCR α y GCCR β y 5 ng para la de GHR.

Tanto la forma α como la forma β del GCCR se detectan a partir del día 8 de cultivo, aunque su expresión es baja. En ambos casos el máximo de expresión se obtiene los días 9 y 10 de cultivo para luego disminuir. Hay mayor expresión de la forma α que de la forma β .

Durante los primeros 5 días de cultivo, la expresión de GHR es muy baja. A partir del día 6, coincidiendo con el inicio de la fase exponencial, se produce un incremento de la expresión alcanzando el máximo el día 10 de cultivo. Posteriormente esta expresión disminuye.

- Factores de transcripción

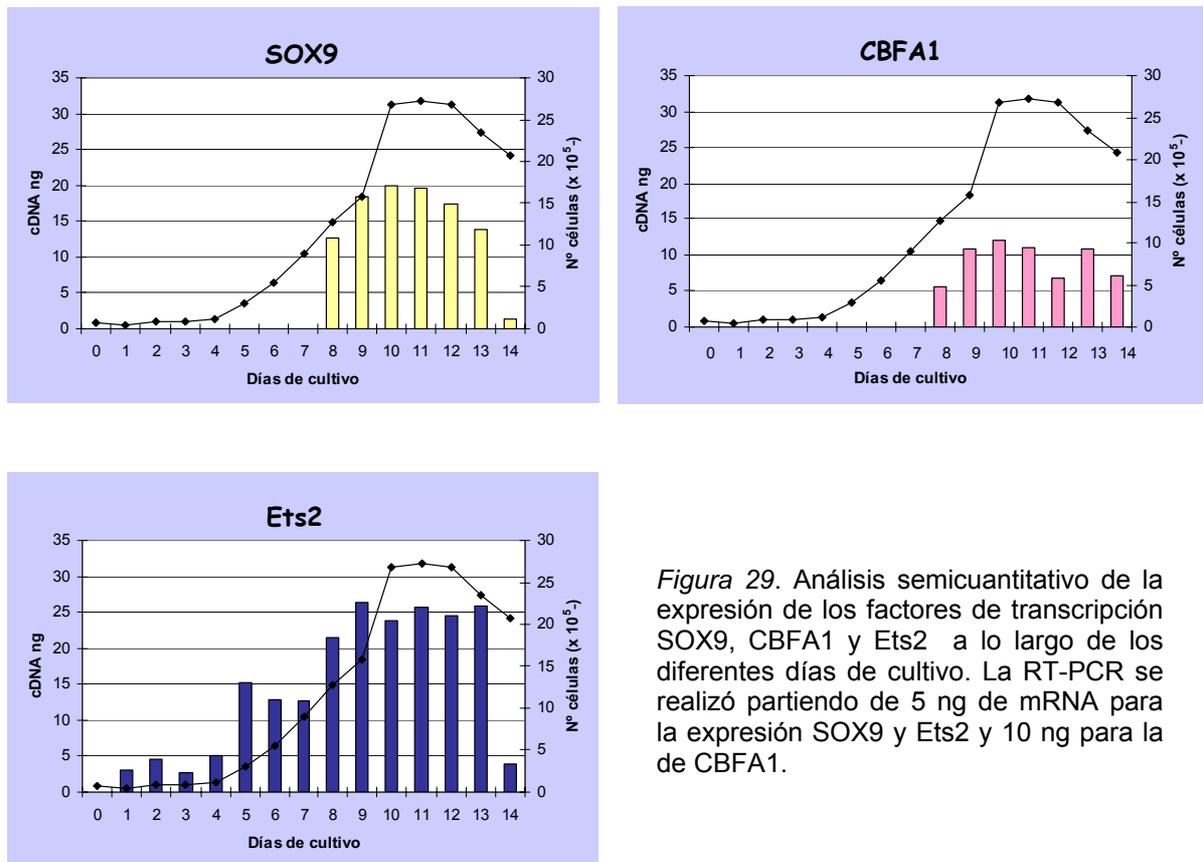


Figura 29. Análisis semicuantitativo de la expresión de los factores de transcripción SOX9, CBFA1 y Ets2 a lo largo de los diferentes días de cultivo. La RT-PCR se realizó partiendo de 5 ng de mRNA para la expresión SOX9 y Ets2 y 10 ng para la de CBFA1.

SOX9 se detecta a partir del día 8 de cultivo. Su expresión alcanza el máximo entre los días 10 y 11 y luego disminuye hasta casi desaparecer el día 14 de cultivo.

La expresión de CBFA1 comienza a detectarse el día 8 de cultivo y se alcanza el máximo el día 9 manteniéndose después su expresión.

La expresión de Ets2 se detecta desde el inicio y el incremento de la expresión es paralelo a la progresión del cultivo.

De entre los factores de transcripción estudiados, Ets2 es constitutivo ya que se detecta durante todo el cultivo mientras que SOX9 y CBFA1 están más expresados a partir de la fase exponencial.

- **Proteínas de la matriz**

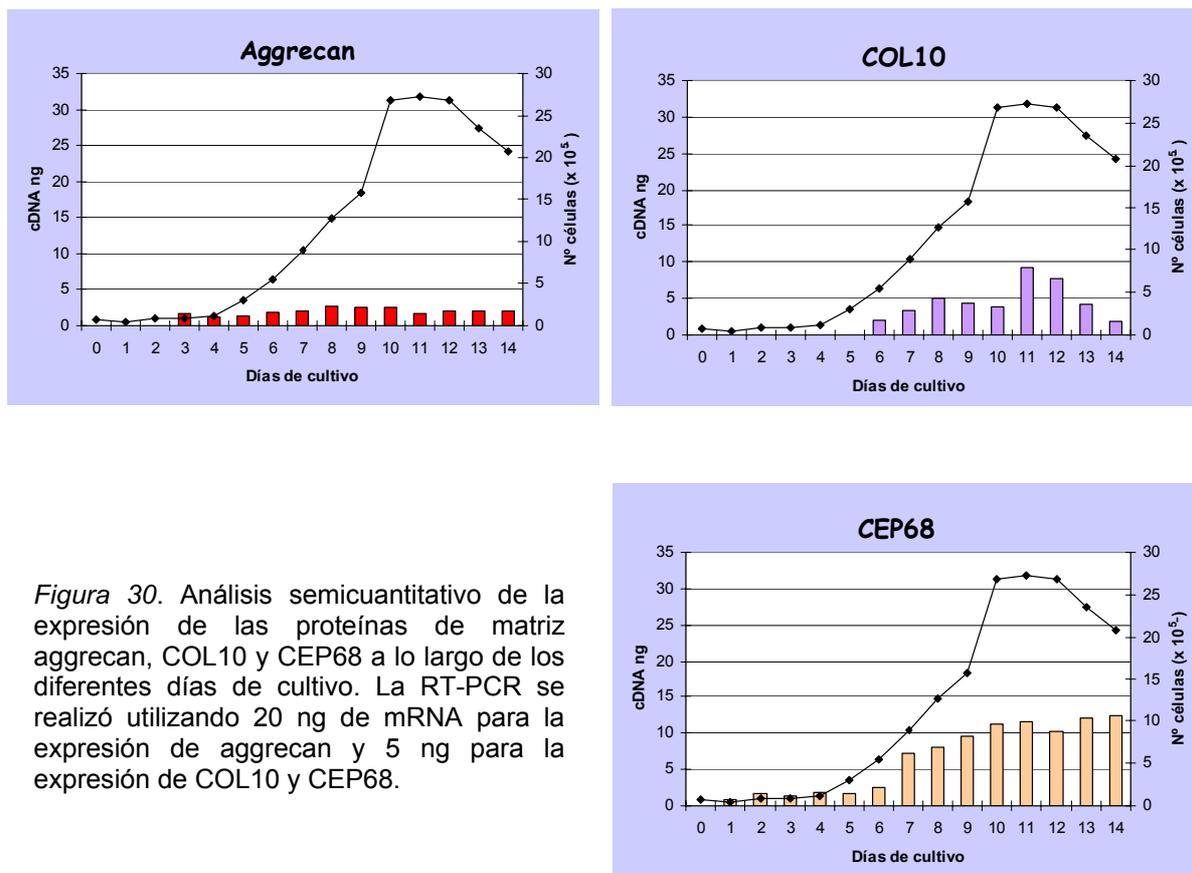


Figura 30. Análisis semicuantitativo de la expresión de las proteínas de matriz aggrecan, COL10 y CEP68 a lo largo de los diferentes días de cultivo. La RT-PCR se realizó utilizando 20 ng de mRNA para la expresión de aggrecan y 5 ng para la expresión de COL10 y CEP68.

La expresión de aggrecan es apenas detectable a pesar de haber partido de 4 veces más mRNA que en las otras cuantificaciones. Esta expresión se mantiene baja y constante durante todos los días del cultivo, de manera que se trata de un gen constitutivo pero su expresión se detecta a niveles bajos.

La expresión de COL10 es baja y se detecta a partir del día 6. El máximo de expresión se alcanza el día 11 de cultivo, día en el que las células ya están en confluencia.

CEP68 se expresa durante todo el cultivo aunque la expresión es baja durante los primeros 6 días, incrementando su expresión a partir del día 7 hasta el final del cultivo.

- GAPDH

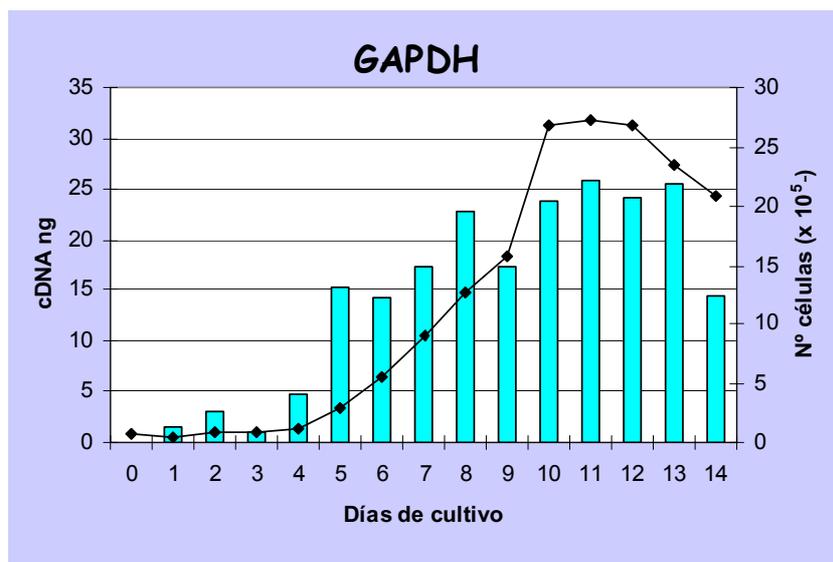


Figura 31. Análisis semicuantitativo de la expresión de GAPDH a lo largo de los diferentes días de cultivo. La RT-PCR se realizó partiendo de 5 ng de mRNA.

Durante los primeros cuatro días la expresión de GAPDH es baja. A partir del día 5, coincidiendo con el inicio de la fase exponencial del cultivo, incrementa su expresión hasta alcanzar el máximo coincidiendo con el final de la fase exponencial y se mantiene constante hasta el día 13 para luego disminuir el día 14 coincidiendo con la etapa de agotamiento del cultivo.

El GAPDH no se puede utilizar en este modelo como normalizador de los resultados puesto que su expresión varía en función de los días de cultivo. Por ello, para realizar la cuantificación de la expresión de los diferentes genes se utilizó un patrón de bandas calibrado.

4.1.5 Estudio de la regulación de la proliferación celular

El estudio de la regulación de la proliferación celular se llevó a cabo mediante el análisis de la incorporación de timidina- ^3H al DNA de las células de la línea celular C-28/I2. Después de 10 días de cultivo las células se privaron durante 48h y se trataron durante otras 48h con diferentes concentraciones de Dx y VitD, con IGF-I 100 ng/ml y con las combinaciones de Dx y VitD con IGF-I. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

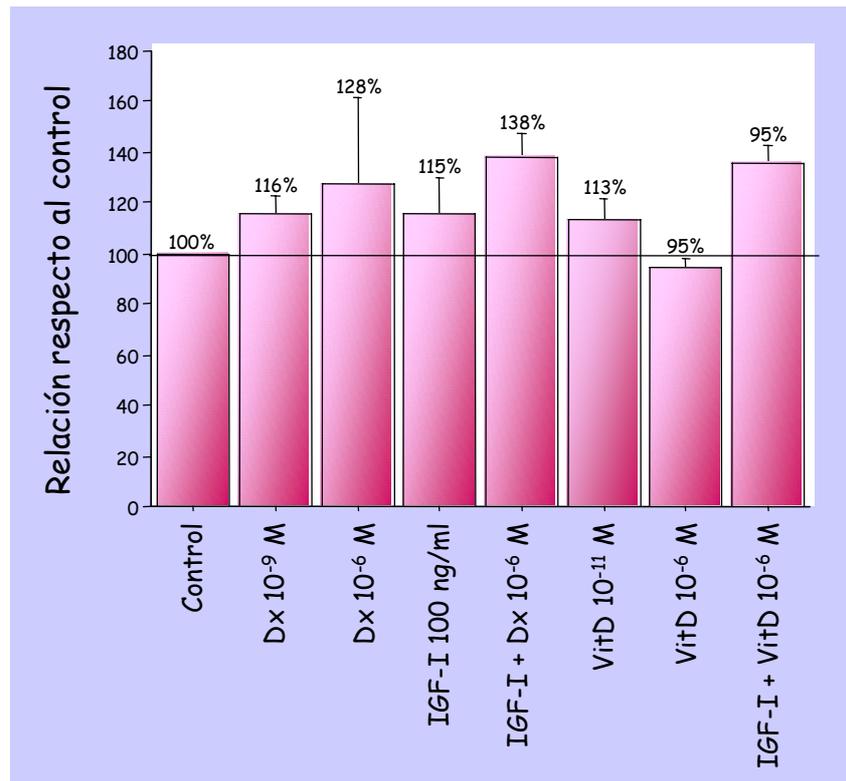


Figura 32. Incorporación de timidina- ^3H al DNA de células de la línea celular C-28/I2 (media \pm desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD e IGF-I. Los resultados se expresan como porcentaje de radioactividad respecto a la condición control (100%). Se han realizado dos experimentos independientes.

Se observa en la *Figura 32* que en la línea celular C-28/I2 la incorporación de timidina- ^3H al DNA como índice de proliferación celular no se modificaba de forma valorable ni con el tratamiento con Dx (a las concentraciones de 10^{-9} M y 10^{-6} M), ni con IGF-I (100 ng/ml) ni con VitD (a las concentraciones de 10^{-11} y 10^{-6} M).

4.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE CONDROCITOS HUMANOS PROCEDENTES DE CARTÍLAGO DE EPÍFISIS FETAL

4.2.1 Condiciones de cultivo

Para establecer las condiciones óptimas de cultivo se analizó la curva de crecimiento de los condrocitos procedentes del cartílago de crecimiento epifiseal de fetos humanos en primer pase de cultivo. El recuento de las células se realizó mediante cámara de Neubauer. La curva de crecimiento obtenida se representa en la *Figura 33*.

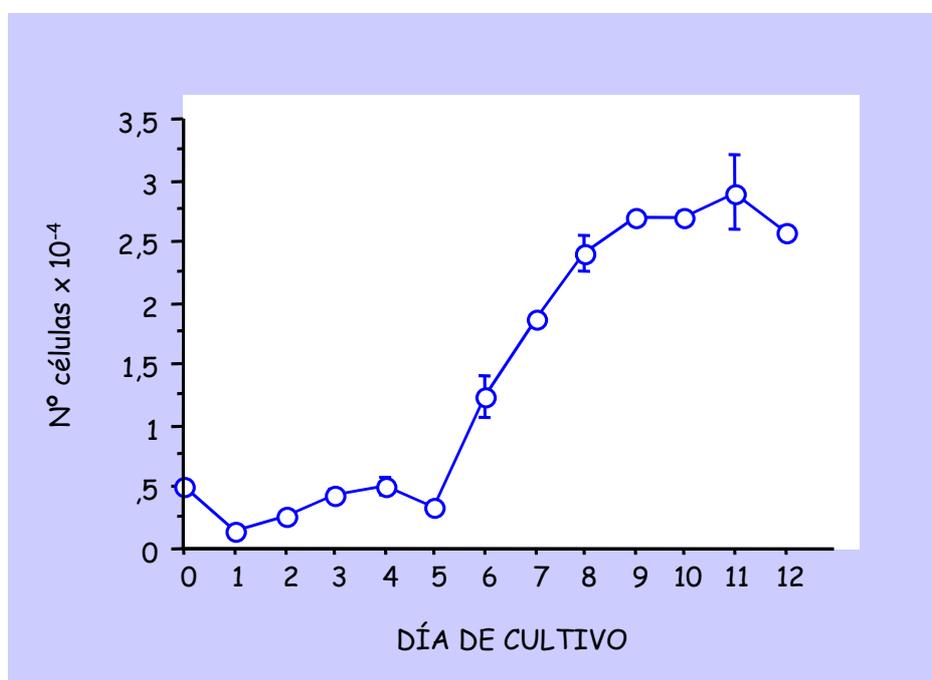


Figura 33. Curva de crecimiento de condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano expresada en número de células ($\times 10^{-4}$) por día de cultivo. Cada punto representa la media \pm DE de tres pocillos por día.

Se observa una recuperación lenta y progresiva del cultivo hasta el día 5, período durante el cual las células se adaptan al sistema de cultivo. A partir del día 6 de cultivo entran en fase de crecimiento exponencial hasta llegar a los días 9-11 de cultivo, cuando se alcanza el número máximo de células. Utilizando microscopio de campo invertido se observó que las células alcanzan la confluencia el día 10 de cultivo.

Para el estudio de la proliferación celular y la expresión génica se establecieron las siguientes condiciones de cultivo:

- para el estudio de incorporación de timidina-³H al DNA, se sembraron 60.000 células/cm² que se corresponde con la densidad celular alcanzada el día 7 de cultivo (fase exponencial);
- para el estudio de la expresión génica, se sembraron 42.000 células/cm² que se corresponde con la densidad celular alcanzada entre los días 6-7 de cultivo (fase exponencial).

4.2.2 Control de pureza de los cultivos de condrocitos

Se realizó una reacción de PCR con RNA total procedente de condrocitos de cartílago fetal y RNA total procedente de fibroblastos procedentes de piel fetal obtenidos en un primer pase de cultivo. El resultado se representa en la *Figura 34*.

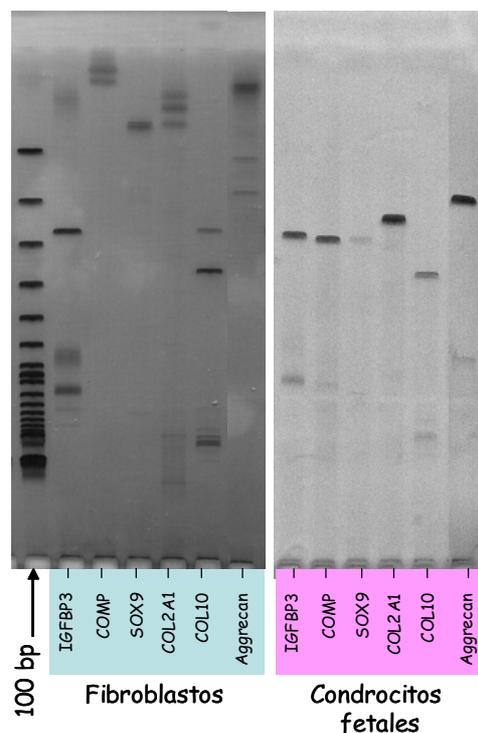


Figura 34. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos de amplificar los genes IGFBP3, COMP, SOX9, COL2A1, COL10 y aggrecan a partir de RNA total de condrocitos de cartílago fetal y de fibroblastos procedentes de piel fetal obtenidos en un primer pase de cultivo.

Se determinó que aquellos genes específicos de cartílago como COMP, SOX9, COL2A1 y aggrecan, no se expresaban en fibroblastos pero sí en condrocitos obtenidos

a partir de cartílago epifiseal fetal, de manera que podíamos afirmar que estas células mantenían el fenotipo condrocítico en las condiciones de cultivo utilizadas.

4.2.3 Estudio de la regulación de la proliferación celular por GCs, VitD, IGF-I y GH

El estudio de la proliferación celular se llevó a cabo mediante el análisis de la incorporación de timidina-³H al DNA de condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano. Se realizaron 28 experimentos diferentes con células procedentes de cultivos de 28 fetos diferentes (Edad gestacional: $20,7 \pm 2,1$ semana; 13 ♀, 15 ♂) aunque no se analizaron todas las condiciones en todos los experimentos. El resultado representado en la *Figura 35* corresponde a la media y desviación estándar de las determinaciones expresada en forma de % respecto a la condición control.

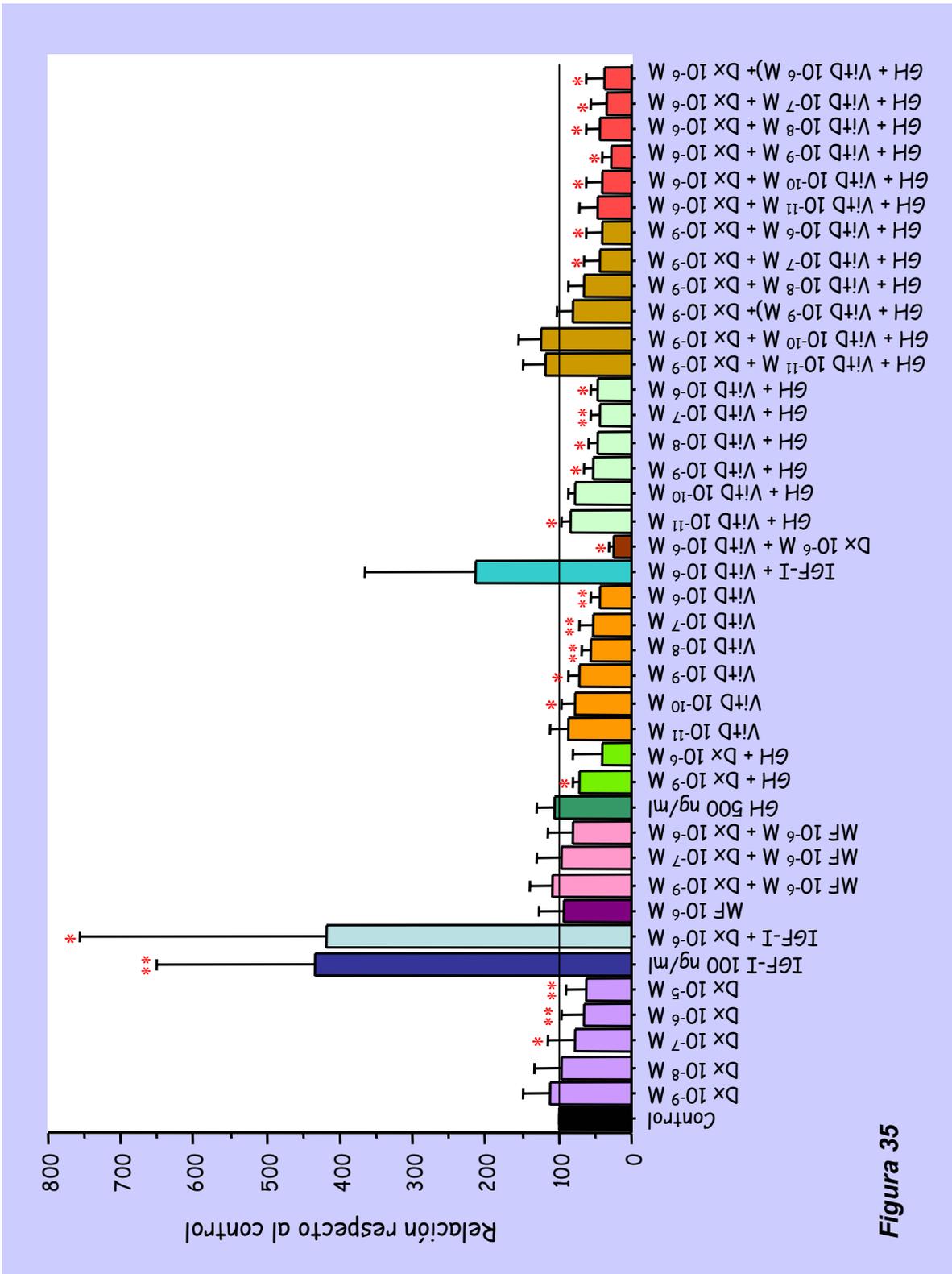


Figura 35

	MEDIA ± DE	n
CONTROL	100,0	28
Dx 10 ⁻⁹ M	112,0 ± 37,2	28
Dx 10 ⁻⁸ M	95,7 ± 38,4	21
Dx 10 ⁻⁷ M	77,3 ± 36,0 *	20
Dx 10 ⁻⁶ M	64,2 ± 30,6 **	28
Dx 10 ⁻⁵ M	61,9 ± 27,1 **	17
IGF-I	434,0 ± 217,6 **	22
IGF-I + Dx 10 ⁻⁶ M	418,7 ± 337,5 *	7
MF 10 ⁻⁶ M	93,1 ± 35,1	7
MF 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	109,7 ± 30,2	3
MF 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁷ M	97,0 ± 32,9	3
MF 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	80,9 ± 34,7	7
GH	104,8 ± 26,2	7
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	71,9 ± 9,6 *	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	41,7 ± 39,1	4
VitD 10 ⁻¹¹ M	86,9 ± 23,8	14
VitD 10 ⁻¹⁰ M	78,0 ± 18,4 *	10
VitD 10 ⁻⁹ M	70,5 ± 16,1 *	10
VitD 10 ⁻⁸ M	54,4 ± 14,6 **	10
VitD 10 ⁻⁷ M	52,6 ± 17,8 **	10
VitD 10 ⁻⁶ M	41,9 ± 13,1 **	15
IGF-I + VitD 10 ⁻⁶ M	215,4 ± 149,9	8
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	23,9 ± 7,2 *	4
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	83,2 ± 12,4 *	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	78,3 ± 10,0	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	51,9 ± 11,8 *	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	45,7 ± 12,7 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	44,6 ± 10,7 **	6
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	46,5 ± 9,8 *	4
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	117,8 ± 29,6	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	122,6 ± 30,9	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	81,6 ± 19,7	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	64,3 ± 24,0	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	43,8 ± 22,5 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	38,8 ± 22,3 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	45,4 ± 24,6	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	40,3 ± 22,1 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	28,3 ± 11,3 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	43,4 ± 19,4 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	33,3 ± 21,8 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	36,7 ± 26,4 *	4

Figura 35. Incorporación de timidina-³H al DNA de condrocitos procedentes de cartilago epifiseal fetal humano deprivadas durante 48h e incubadas otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). El pocillo control se ha incubado con medio que contenía la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I, VitD y GH. El resultado se expresa como porcentaje de radioactividad respecto a la condición control (100%). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05; **p<0,0001, respecto al control).

La Dx, a la concentración de 10^{-9} M, tiene un efecto variable sobre la proliferación celular siendo el efecto medio estimulador. En cambio, a partir de la concentración de 10^{-8} M este efecto disminuye produciendo inhibición significativa a partir de la concentración de 10^{-7} M.

Por otro lado, el IGF-I a la concentración de 100 ng/ml es un potente estimulador de la proliferación celular aunque esta estimulación es variable según el feto. El tratamiento con IGF-I revierte totalmente la inhibición de la proliferación celular producida por la Dx 10^{-6} M cuando las células se incuban en presencia de ambos.

El MF, esteroide sintético bloqueador del GCCR, no tiene ningún efecto por sí solo y revierte, en parte, la inhibición por la Dx cuando se combinan ambos tratamientos.

La GH a 500 ng/ml no tiene un efecto significativo sobre la proliferación y el tratamiento combinado de GH y Dx tiene el mismo efecto que cuando se incuban las células con Dx sola.

La VitD inhibe la proliferación celular de forma concentración dependiente, siendo esta inhibición significativa a partir de la concentración de 10^{-10} M. La presencia de IGF-I revierte la inhibición que la VitD a 10^{-6} M produce sobre la proliferación celular. La incubación simultánea con Dx 10^{-6} M y VitD 10^{-6} M provoca una fuerte inhibición de la proliferación celular, equivalente a la que se observa con la VitD sola. El tratamiento combinado de GH y VitD tiene el mismo efecto que cuando se incuban las células con VitD sola.

La incubación simultánea con GH, Dx 10^{-9} o 10^{-6} M y VitD a diferentes concentraciones tiene un efecto inhibitorio similar al producido por la incubación con Dx y VitD solas.

No existen diferencias en cuanto a la proliferación celular con respecto al sexo o a la edad gestacional de los fetos.

4.2.4 Estudio de la expresión génica

4.2.4.1 Control endógeno

Para evitar que se produzcan errores en la valoración de la estimación de la expresión génica debidas a pequeñas diferencias en las cantidades iniciales de RNA o a diferencias en cuanto a la eficiencia de la síntesis de cDNA y la amplificación en la reacción de PCR, es necesaria la elección de un control endógeno para normalizar los resultados. Se analizaron las variaciones de los 11 genes de la placa en cuatro muestras distintas: una muestra control sin tratamiento y tres muestras con diferentes tratamientos (Dx 10^{-5} M, VitD 10^{-6} M e IGF-I 100 ng/ml). Una vez finalizadas las incubaciones se extrajo el RNA total y se realizó la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real. Una vez finalizada la reacción de PCR, se calcularon los ΔC_t entre la muestra calibradora (muestra control sin tratamiento) y las diferentes muestras tratadas para cada uno de los genes de la placa de controles endógenos. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 36*.

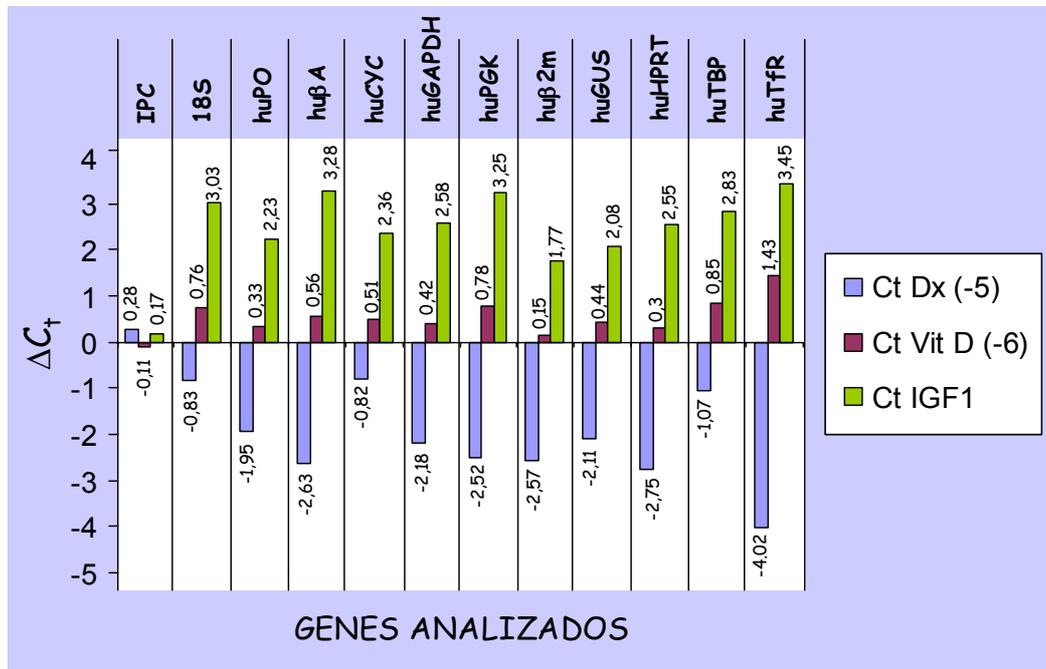


Figura 36. Valoración de la expresión génica para 11 controles endógenos en tres tratamientos distintos (Dx 10^{-5} M, VitD 10^{-6} M e IGF-I 100 ng/ml) respecto a la muestra no tratada, que corresponde a la línea basal 0. [C_t = ciclo umbral; ΔC_t = media de C_t (control) – media de C_t (muestra)]

El IPC no varía entre las muestras; esto indica que no existen inhibidores de la reacción de PCR en las diferentes muestras analizadas, de manera que las diferencias observadas se deberán al tratamiento aplicado. El mejor control endógeno es aquel que menos variaciones provoque en cuanto al ΔC_t , es decir, el que menos varía respecto al valor 0 (valor de la muestra control). Se observa que tanto 18S como huCYC podrían utilizarse como controles endógenos para normalizar los resultados ya que son los genes que menos varían en función de los tratamientos. En cuanto a las diferencias inducidas por los diferentes tratamientos, el IGF-I es el que provoca mayores variaciones en todos los genes de la placa, puesto que es un factor de crecimiento de las células, como ya se ha visto anteriormente en el estudio de la regulación de la proliferación celular.

Se realizó otro experimento cuantificando el 18S, la huCYC y el aggrecan en diferentes muestras:

1. muestra control no tratado (muestra calibradora)
2. muestra tratado con IGF-I 100 ng/ml
3. muestra tratado con IGF-I 100 ng/ml + Dx 10^{-5} M
4. muestra tratado con IGF-I 100 ng/ml + VitD 10^{-6} M
5. muestra tratado con MF 10^{-6} M + Dx 10^{-7} M
6. muestra tratado con IGF-I 100 ng/ml + MF 10^{-6} M

Se decidió analizar el aggrecan como posible control endógeno ya que en los experimentos realizados con la línea celular C-28/I2 (ver *Figura 30*) se había observado que este gen variaba muy poco independientemente del día de cultivo. El protocolo empleado para la cuantificación de estos tres genes y el análisis de los resultados es el mismo que el empleado para la placa de controles endógenos. Los resultados obtenidos están representados en la *Figura 37*.

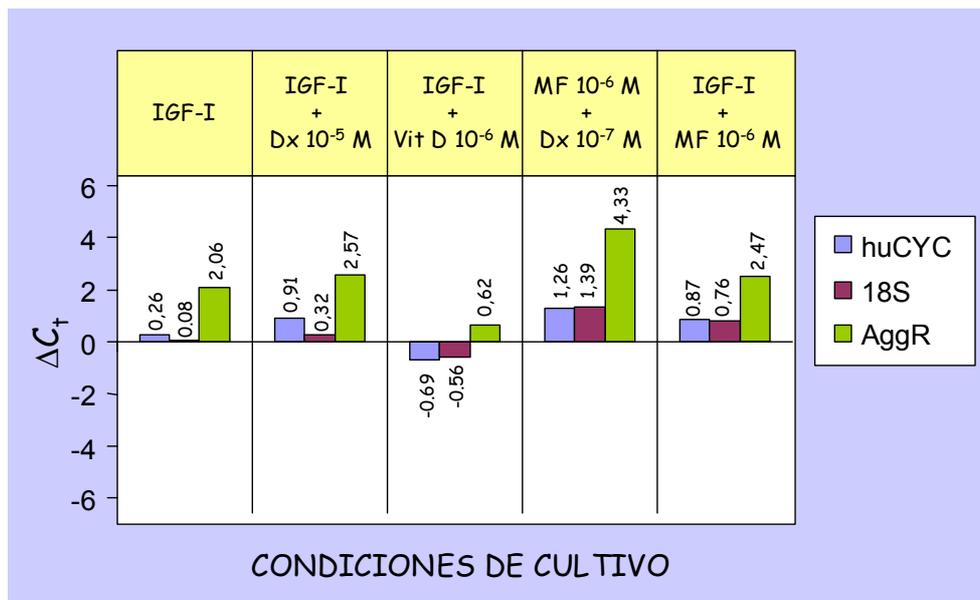


Figura 37. Valoración de la expresión de tres posibles controles endógenos (huCYC, 18S y aggrecan) en 5 tratamientos diferentes respecto a la muestra no tratada que corresponde a la línea basal 0. [ΔC_t (muestra) = media de C_t (control) – media de C_t (muestra)]

Se observó que el aggrecan es más variable dependiendo del tratamiento recibido por las células. Tanto 18S con huCYC pueden ser buenos controles endógenos pero, teniendo en cuenta que el 18S implica una mayor manipulación de las muestras (es un gen que se expresa en gran cantidad y sería necesario diluir las muestras), el gen endógeno escogido para la normalización de los resultados ha sido huCYC.

En todos los experimentos realizados se ha detectado huCYC de forma constante en los ciclos 23-25, independientemente del tratamiento realizado al cultivo, hecho que confirma la idoneidad de este gen como normalizador de los resultados.

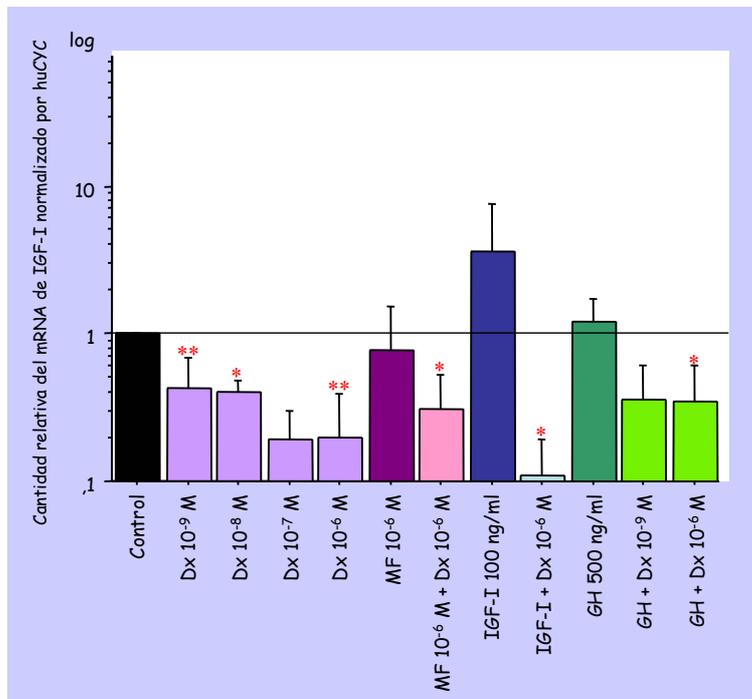
4.2.4.2 Estudio de la expresión de los genes de interés

Para el estudio del patrón de expresión de los genes de interés se incubaron las células con los diferentes tratamientos especificados en la *Tabla 5*. Para la cuantificación de la expresión se utilizó el sistema de sondas *TaqMan*, sistema optimizado por el fabricante para ser utilizado con RNA total. Para la PCR cuantitativa a tiempo real se utilizó el sistema ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Los cálculos se realizaron utilizando el método $\Delta\Delta C_T$ (fórmula: $2^{\Delta\Delta C_t}$). Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de los diferentes genes son los que observan en las *Figuras 38-64*.

4.2.4.2.1 Regulación de la expresión génica por Dx

Expresión de los genes del sistema IGFs

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-I



	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	11
Dx 10 ⁻⁹ M	0,42 ± 0,26 **	10
Dx 10 ⁻⁸ M	0,40 ± 0,09 *	3
Dx 10 ⁻⁷ M	0,19 ± 0,11	2
Dx 10 ⁻⁶ M	0,20 ± 0,19 **	11
MF 10 ⁻⁶ M	0,78 ± 0,76	4
MF 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,31 ± 0,21 *	4
IGF-I	3,61 ± 4,13	4
IGF-I + Dx 10 ⁻⁶ M	0,11 ± 0,08 *	3
GH	1,23 ± 0,48	7
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,36 ± 0,26	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,35 ± 0,26 *	3

Figura 38. Cuantificación de la expresión del gen IGF-I en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05; ** p<0,0001, respecto al control). Resultados expresados en escala logarítmica.

La Dx inhibe de forma significativa la expresión del gen IGF-I a la concentración de 10⁻⁹ M, siendo esta inhibición mayor a medida que aumenta la concentración de Dx. El MF no tiene efecto significativo sobre la expresión del gen y no revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

El tratamiento con IGF-I estimula la expresión de su propio gen pero no revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

El tratamiento con GH no tiene efecto significativo sobre la expresión de IGF-I y en combinación con la Dx no rescata la inhibición producida por la Dx sola.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGFBP3

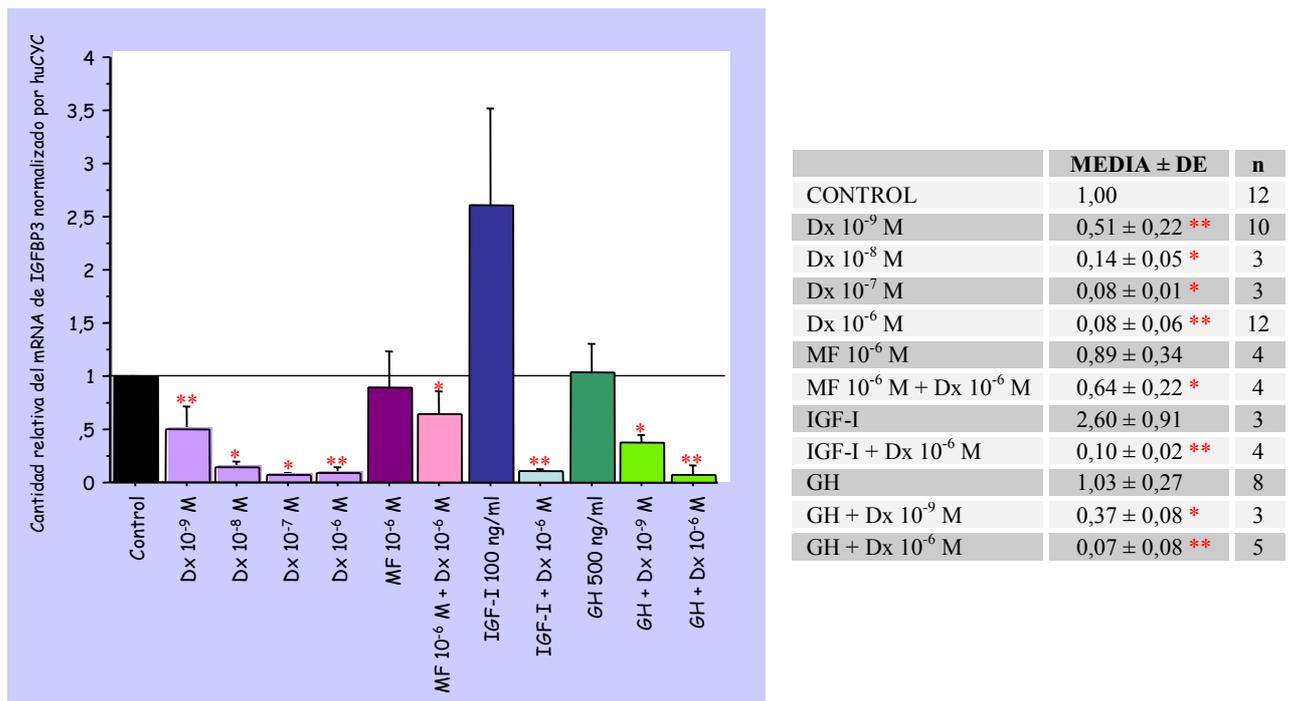


Figura 39. Cuantificación de la expresión del gen IGFBP3 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05; ** p<0,0001, respecto al control).

La Dx inhibe de forma significativa y concentración dependiente la expresión del gen de IGFBP3. El MF no tiene efecto significativo sobre su expresión y revierte parcialmente la inhibición que la Dx 10⁻⁶ M produce sobre la expresión de este gen (p=0,01 con respecto a Dx 10⁻⁶ M).

El IGF-I estimula la expresión de su principal proteína de transporte IGFBP3, pero no revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

El tratamiento con GH no tiene efecto significativo y, al tratar las células con GH y Dx, el efecto observado sobre la expresión de IGFBP3 es el mismo que se observa al incubar las células con Dx sola.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-IR

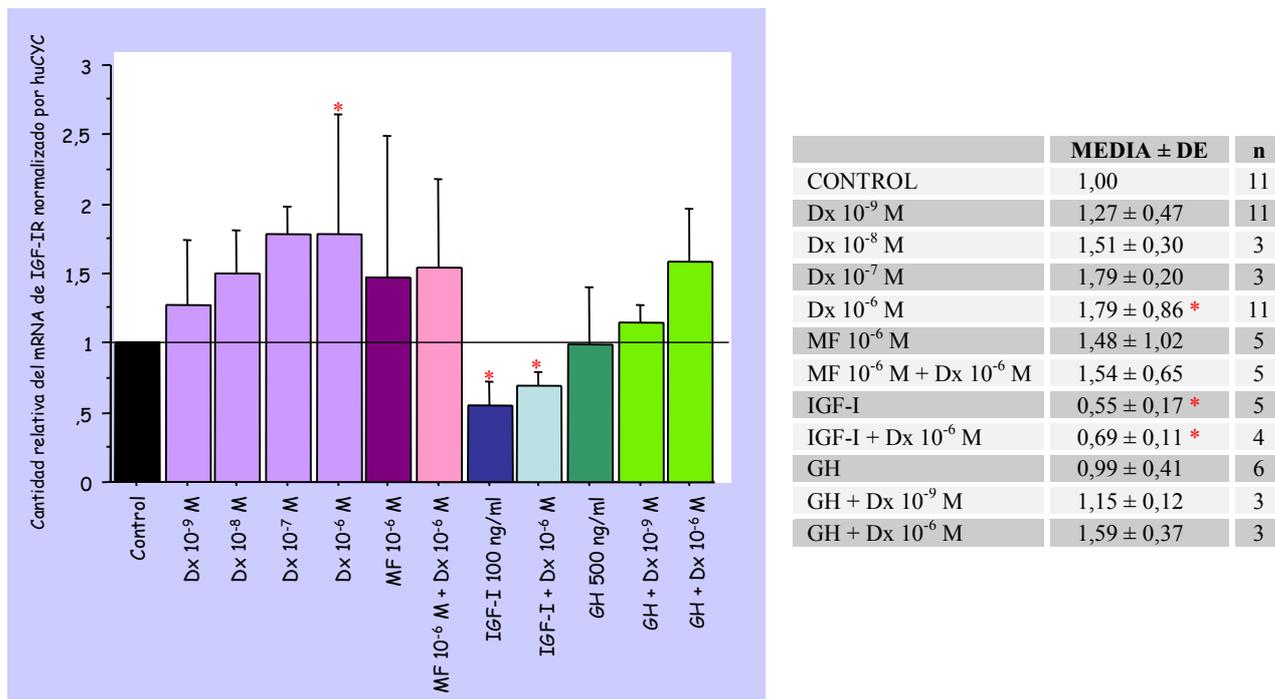


Figura 40. Cuantificación de la expresión del gen IGF-IR en condrocitos procedentes de cartilago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

La Dx estimula la expresión del gen IGF-IR, siendo esta estimulación significativa a la concentración de 10⁻⁶ M. El MF, solo o combinado con Dx 10⁻⁶ M, no tiene efecto significativo sobre la expresión de IGF-IR.

El tratamiento con IGF-I inhibe la expresión de su propio receptor de forma significativa. Aunque la Dx estimula la expresión de IGF-IR, la presencia adicional de IGF-I en el medio provoca la inhibición significativa de la expresión de IGF-IR.

La GH no tiene efecto significativo y combinada con Dx 10⁻⁶ M se observa un aumento en la expresión de IGF-IR aunque no es significativo.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-II

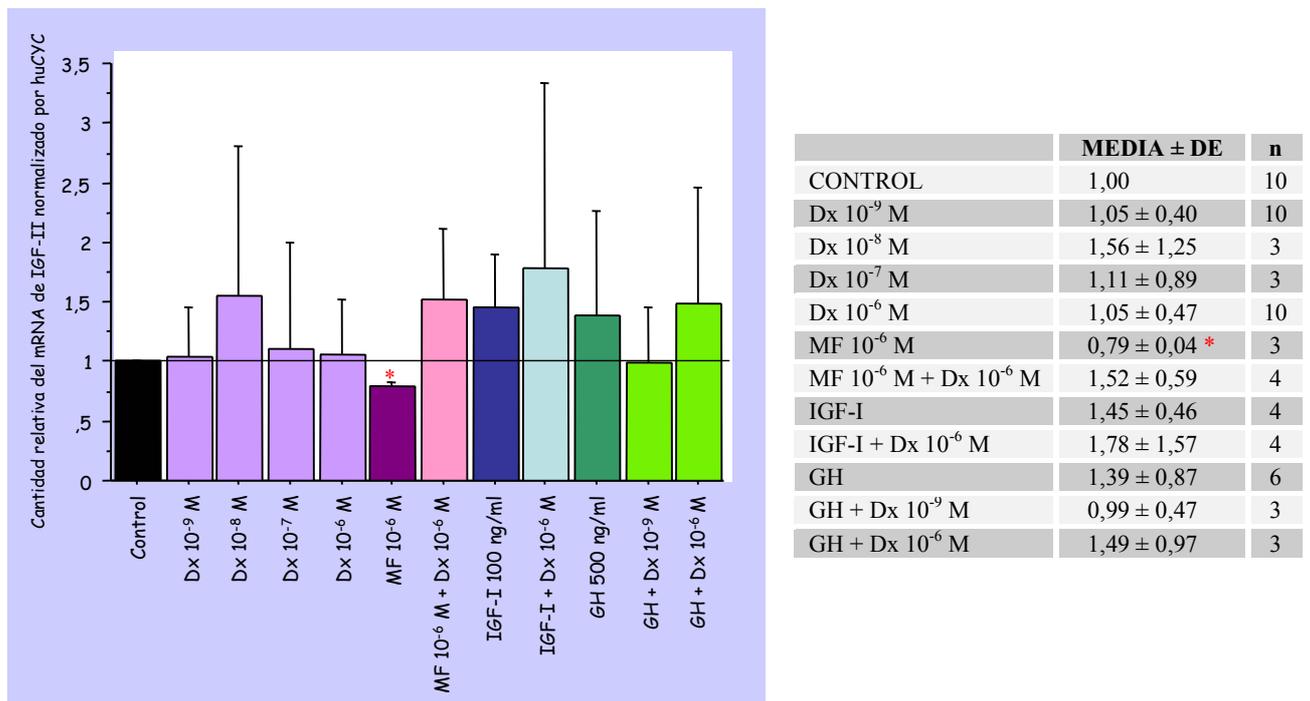


Figura 41. Cuantificación de la expresión del gen IGF-II en condrocitos procedentes de cartilago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

Se observa una gran variabilidad en la expresión de IGF-II en respuesta a los tratamientos. Sólo se observa una inhibición significativa cuando se incuban las células con MF 10⁻⁶ M. La expresión del gen IGF-II no es dependiente de la concentración de Dx.

Cuantificación relativa de la expresión del gen GHR

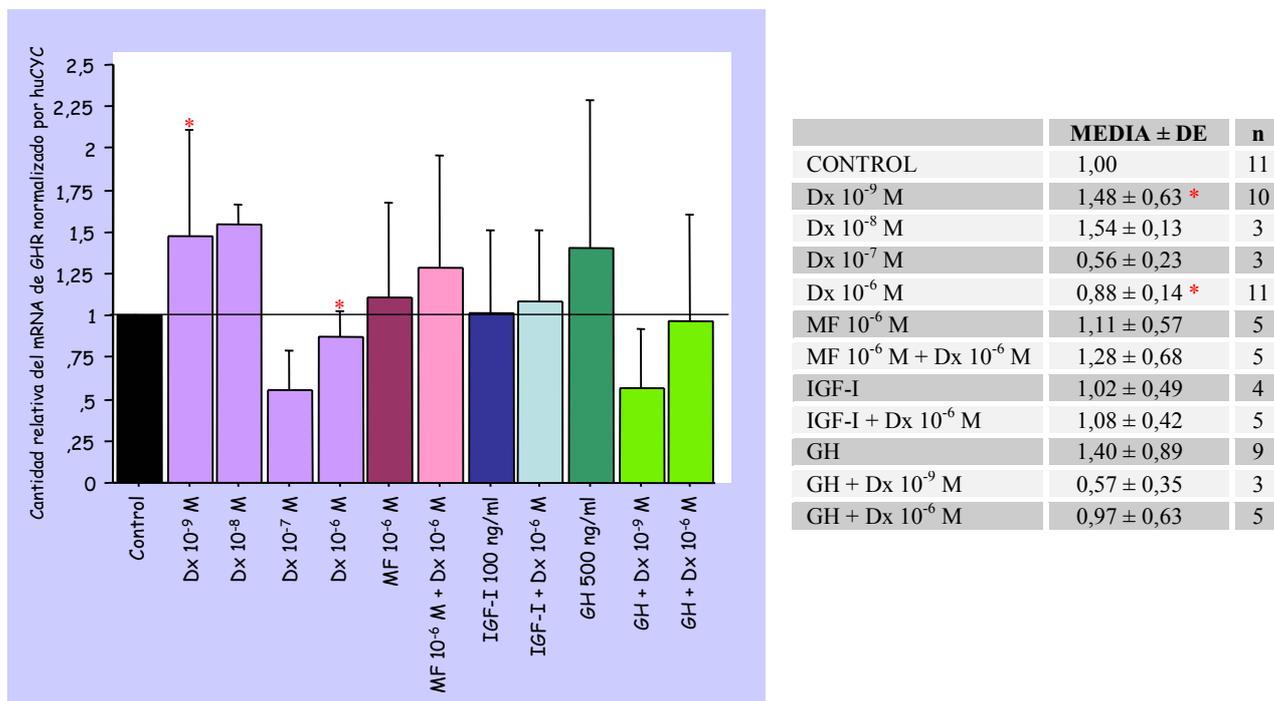


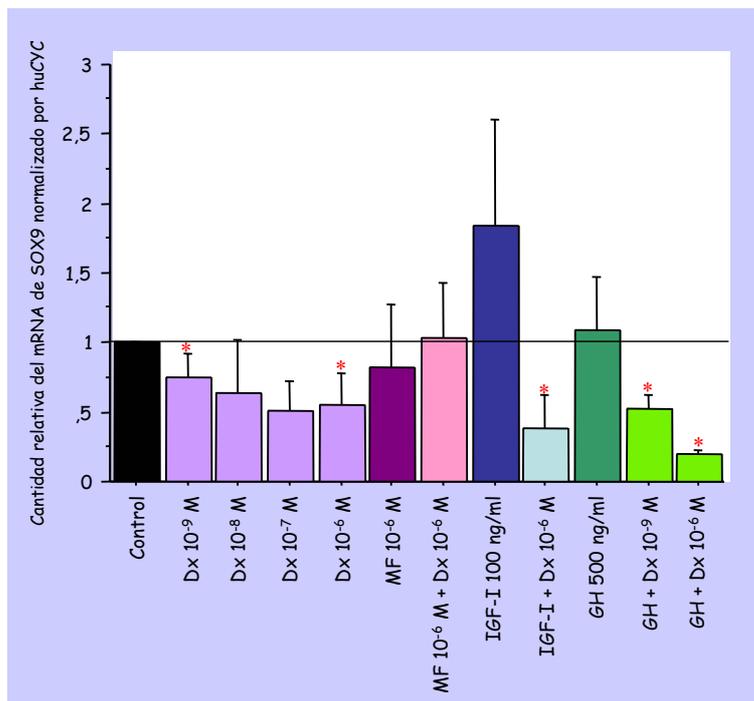
Figura 42. Cuantificación de la expresión del gen GHR en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05, respecto al control).

Se observa un efecto dual de la Dx sobre la expresión de GHR, en función de la concentración del GC. A concentraciones bajas (10⁻⁹ y 10⁻⁸ M) estimula la expresión del gen de GHR pero a concentraciones más elevadas (10⁻⁷ y 10⁻⁶ M) inhibe su expresión siendo esta inhibición significativa a la concentración de 10⁻⁶ M. El MF no tiene efecto significativo y combinado con la Dx 10⁻⁶ M recupera la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M sola.

El tratamiento con IGF-I no tiene efecto significativo sobre la expresión de este gen pero, al igual que el MF, revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

La GH no tiene efecto sobre la expresión de su receptor pero, al igual que el MF y el IGF-I, revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

Expresión del gen SOX9



	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	10
Dx 10 ⁻⁹ M	0,75 ± 0,17 *	9
Dx 10 ⁻⁸ M	0,64 ± 0,38	3
Dx 10 ⁻⁷ M	0,52 ± 0,21	3
Dx 10 ⁻⁶ M	0,55 ± 0,23 *	10
MF 10 ⁻⁶ M	0,83 ± 0,45	3
MF 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,04 ± 0,40	4
IGF-I	1,83 ± 0,77	3
IGF-I + Dx 10 ⁻⁶ M	0,38 ± 0,23 *	4
GH	1,08 ± 0,39	6
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,53 ± 0,10 *	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,20 ± 0,02 *	3

Figura 43. Cuantificación de la expresión del gen SOX9 en condrocitos procedentes de cartilago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05, respecto al control).

La Dx inhibe de forma concentración dependiente la expresión del gen SOX9, siendo esta inhibición significativa a la concentración de 10⁻⁹ M y a la de 10⁻⁶ M. El MF solo no tiene efecto pero rescata la inhibición que la Dx 10⁻⁶ M produce sobre la expresión de este gen.

El IGF-I estimula la expresión de SOX9 aunque no es estadísticamente significativo y no revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

La GH no tiene efecto significativo sobre la expresión de SOX9. La combinación de la GH con la Dx tiene un efecto similar al observado al incubar las células con Dx sola, es decir, se inhibe la expresión de SOX9 de forma significativa.

Expresión de proteínas de la matriz extracelular

Cuantificación relativa de la expresión del gen COL2A1

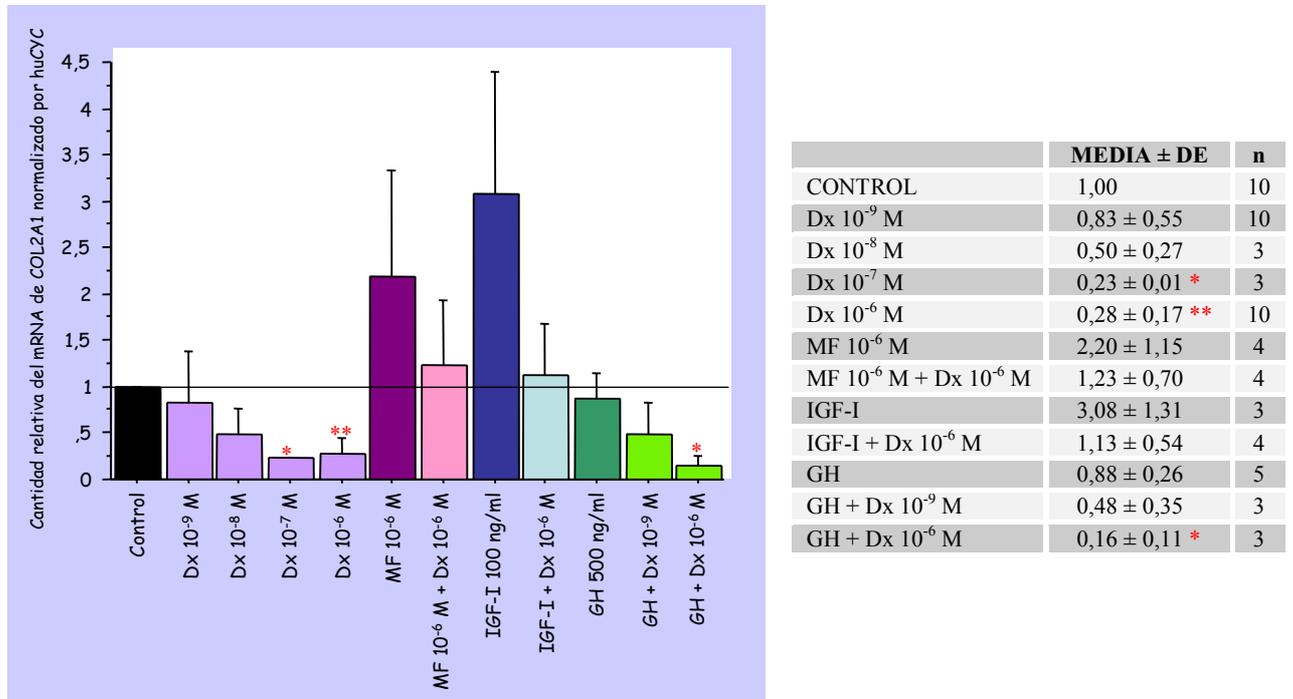


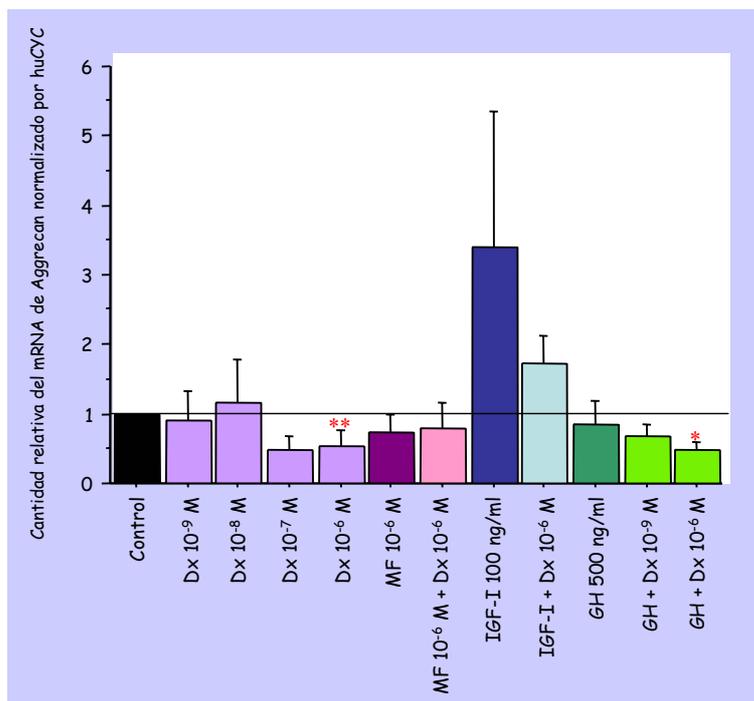
Figura 44. Cuantificación de la expresión del gen COL2A1 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05; ** p<0,0001, respecto al control).

La Dx inhibe de forma concentración dependiente la expresión de COL2A1, siendo esta inhibición significativa a las concentraciones de 10⁻⁷ M y 10⁻⁶ M. El MF tiene un efecto variable sobre la expresión de COL2A1 y bloquea la inhibición que produce la Dx 10⁻⁶ M.

El IGF-I estimula la expresión de este gen de forma variable y revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M sola (p=0,04, respecto a la Dx 10⁻⁶ M sola).

La GH no tiene efecto significativo sobre la expresión de COL2A1 y no revierte la inhibición de la expresión producida por la Dx.

Cuantificación relativa de la expresión del gen aggrecan



	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	10
Dx 10 ⁻⁹ M	0,90 ± 0,44	10
Dx 10 ⁻⁸ M	1,16 ± 0,62	3
Dx 10 ⁻⁷ M	0,48 ± 0,20	3
Dx 10 ⁻⁶ M	0,55 ± 0,21 **	10
MF 10 ⁻⁶ M	0,74 ± 0,26	4
MF 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,81 ± 0,34	4
IGF-I	3,40 ± 1,94	3
IGF-I + Dx 10 ⁻⁶ M	1,72 ± 0,39	3
GH	0,85 ± 0,34	7
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,68 ± 0,17	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,47 ± 0,11 *	3

Figura 45. Cuantificación de la expresión del gen aggrecan en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05; ** p<0,0001, respecto al control).

La Dx a concentraciones elevadas inhibe la expresión de aggrecan, siendo ésta significativa a la concentración de 10⁻⁶ M. El MF no tiene efecto solo y revierte parte de la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

El IGF-I estimula la expresión de este gen aunque existe gran variación interexperimental y revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M (p=0,03, respecto a la Dx 10⁻⁶ M sola).

La GH no tiene efecto sobre la expresión de aggrecan y no revierte la inhibición producida por la Dx.

Cuantificación relativa de la expresión del gen COMP

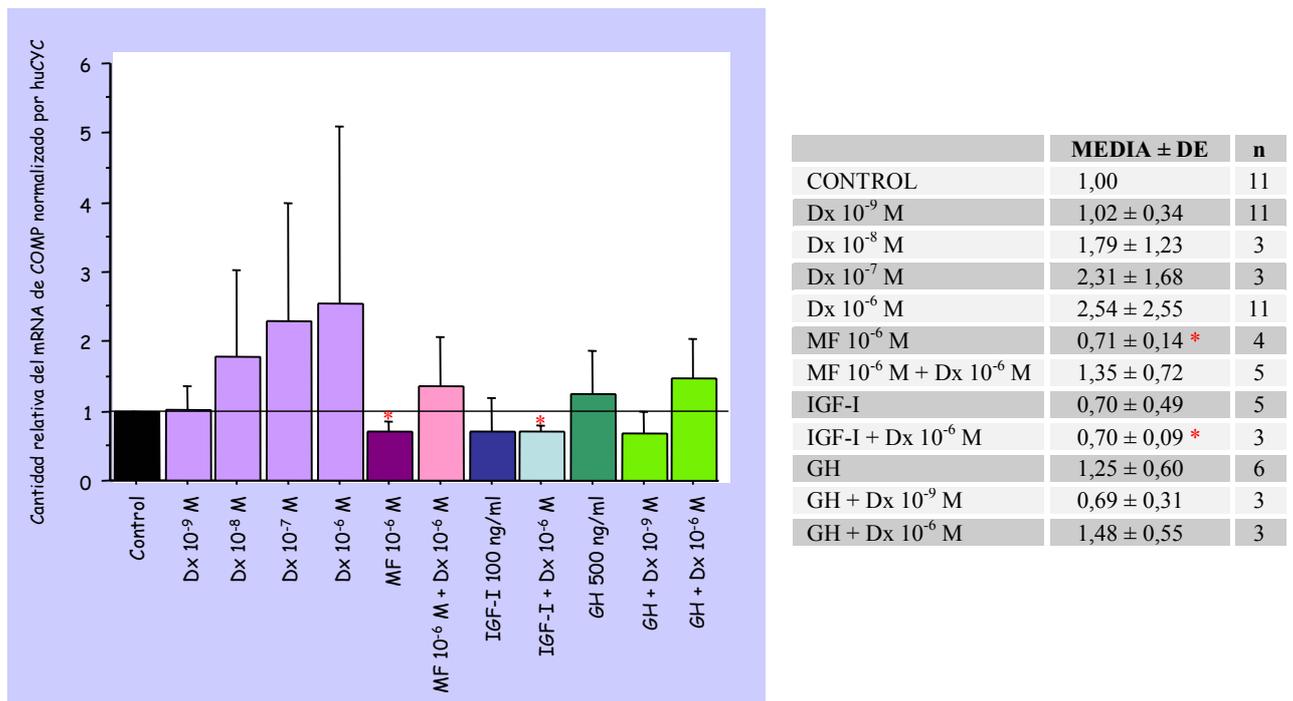


Figura 46. Cuantificación de la expresión del gen COMP en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, MF, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* $p < 0,05$, respecto al control).

La Dx estimula la expresión de COMP, aunque esta estimulación no es significativa debido a la variación interexperimental. El MF, por el contrario, inhibe de forma significativa la expresión de este gen.

El IGF-I inhibe la expresión de COMP y en combinación con la Dx 10⁻⁶ M también inhibe la expresión de forma significativa, pese a que la Dx 10⁻⁶ M sola estimulaba la expresión de este gen.

La GH no tiene efecto sobre la expresión de COMP. En combinación con la Dx tampoco se observa un efecto significativo.

4.2.4.2.2 Regulación de la expresión génica por VitD

Expresión de los genes del sistema IGFs

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-I

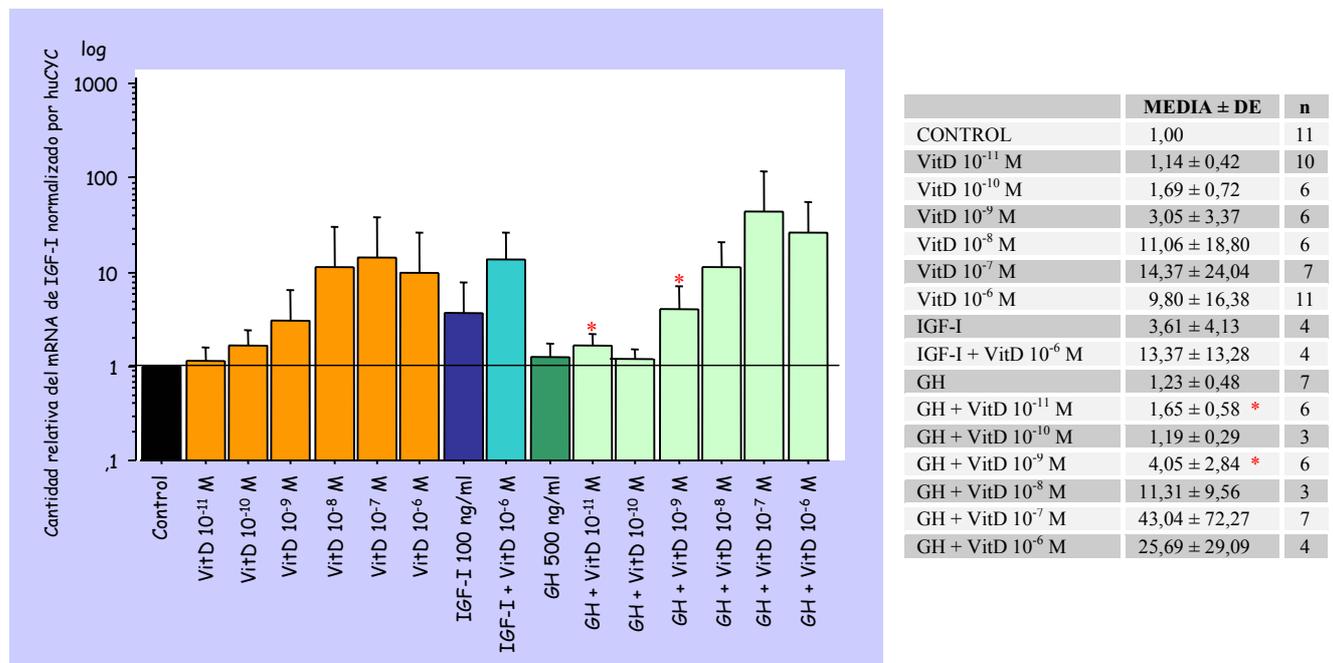


Figura 47. Cuantificación de la expresión del gen IGF-I en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control). Resultados expresados en escala logarítmica.

La VitD estimula la expresión del gen IGF-I de forma concentración dependiente, en todos los experimentos, aunque la estimulación no es significativa debido a la variación interexperimental. El tratamiento con IGF-I estimula la expresión de su propio gen y en combinación con VitD 10⁻⁶ M se observa una estimulación similar a la producida por el tratamiento con IGF-I o VitD solas. El tratamiento con GH no tiene efecto sobre la expresión de IGF-I pero la presencia de VitD en las células tratadas con GH incrementa la expresión de IGF-I. En todos los experimentos analizados se produce este incremento en la expresión pero existe una gran variabilidad interexperimental. Se

han calculado los incrementos de expresión de IGF-I entre los cultivos tratados con VitD sola a las diferentes molaridades y los cultivos tratados con VitD + GH 500 ng/ml para cada experimento: el resultado demuestra que la presencia de GH en el medio incrementa la expresión de IGF-I.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGFBP3

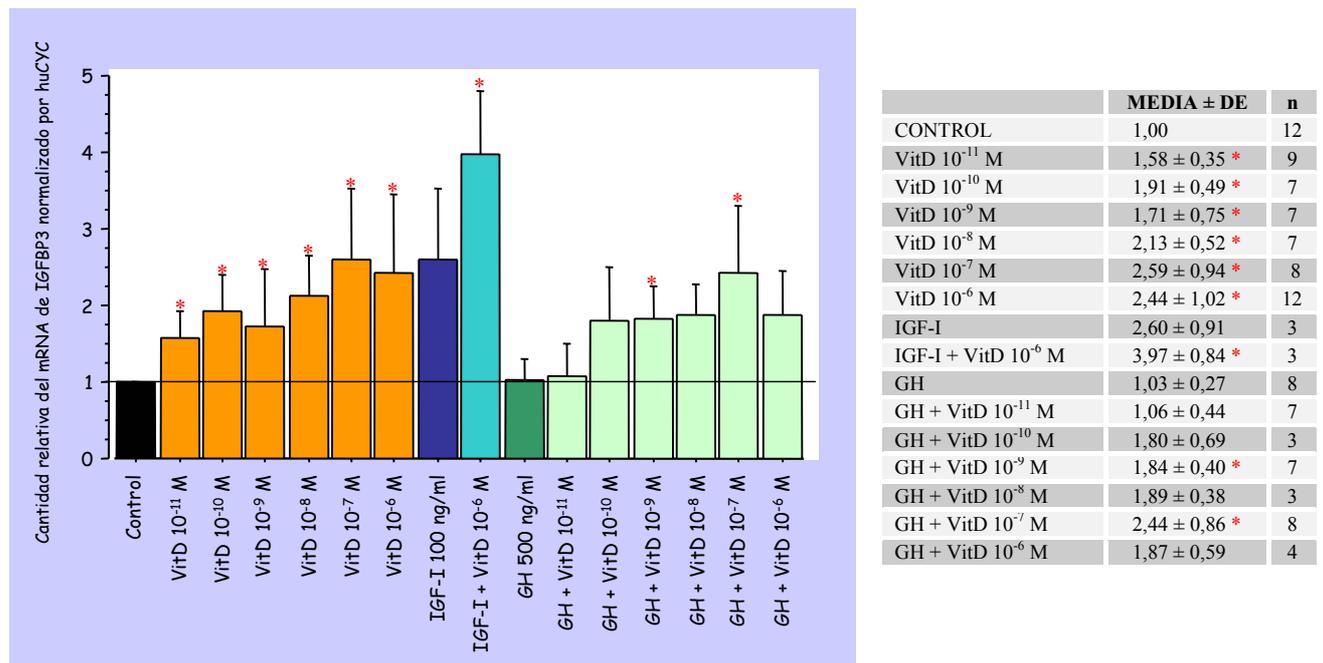


Figura 48. Cuantificación de la expresión del gen IGFBP3 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05, respecto al control).

La VitD estimula de forma concentración dependiente la expresión de IGFBP3. El IGF-I también estimula la expresión de su principal proteína de transporte y el tratamiento combinado con IGF-I y VitD 10⁻⁶ M parece potenciar la estimulación que sobre la expresión de este gen producían tanto IGF-I como VitD 10⁻⁶ M solas, siendo este incremento estadísticamente significativo.

El tratamiento con GH no tiene efecto sobre la expresión de IGFBP3 y, al tratar las células con GH y VitD, el efecto observado sobre la expresión de IGFBP3 es el mismo que se observaba al incubar las células con VitD (estimulación).

Cuantificación de la expresión del gen IGF-IR

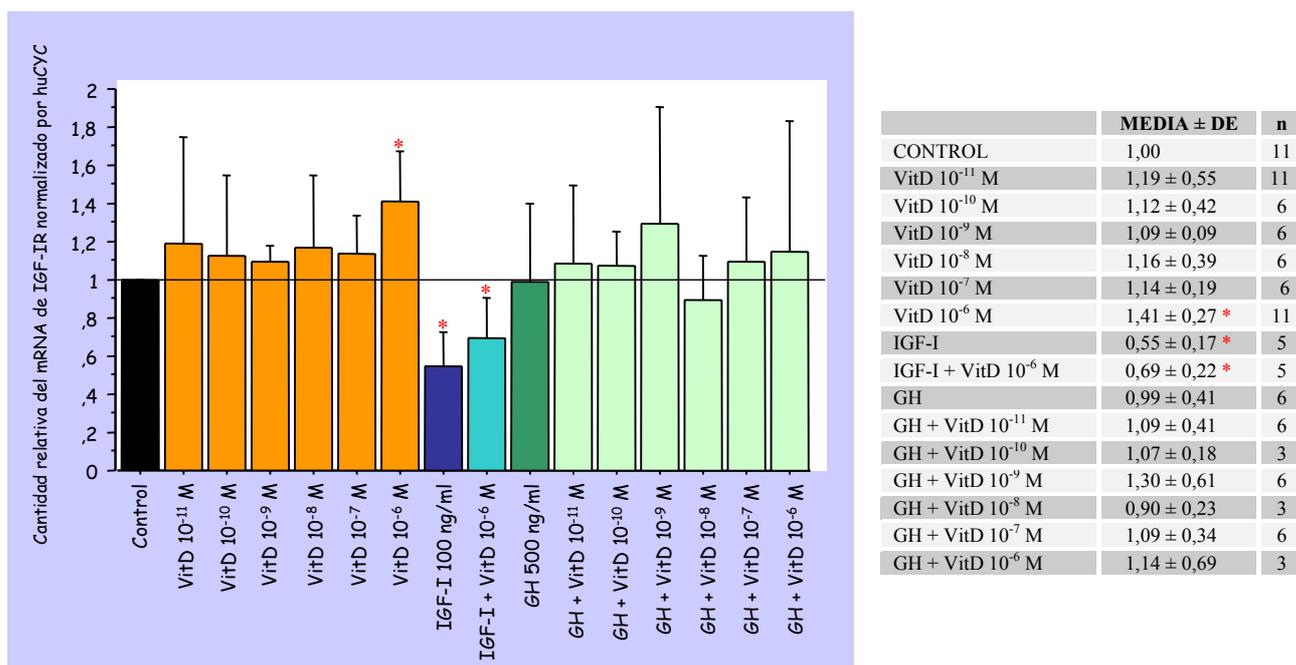


Figura 49. Cuantificación de la expresión del gen IGF-IR en condrocitos procedentes de cartilago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

La VitD de 10⁻¹¹ a 10⁻⁷ M no tiene efecto significativo sobre la expresión de IGF-IR aunque se observa estimulación, siendo ésta significativa a la concentración de 10⁻⁶ M. El tratamiento con IGF-I inhibe la expresión de su propio receptor de forma significativa. La incubación con IGF-I y VitD 10⁻⁶ M tiene un efecto inhibitor de la expresión (p=0,006 con respecto a la VitD 10⁻⁶ M), efecto similar al obtenido al incubarse con IGF-I solo.

La GH no tiene efecto y, combinado con la VitD, no se observa ningún efecto significativo sobre la expresión de IGF-IR.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-II

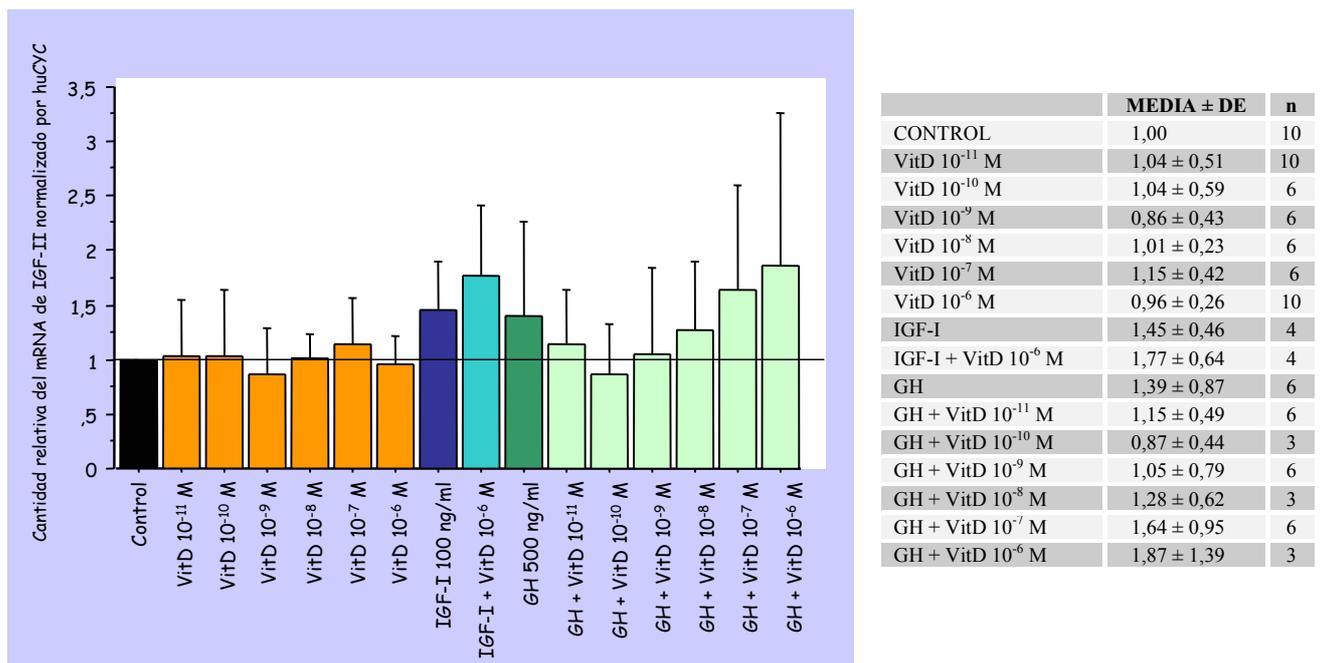


Figura 50. Cuantificación de la expresión del gen IGF-II en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes).

Se observa una gran variabilidad en la expresión de IGF-II en respuesta a los tratamientos. La expresión del gen IGF-II no es dependiente de la concentración de VitD.

Cuantificación relativa de la expresión del gen GHR

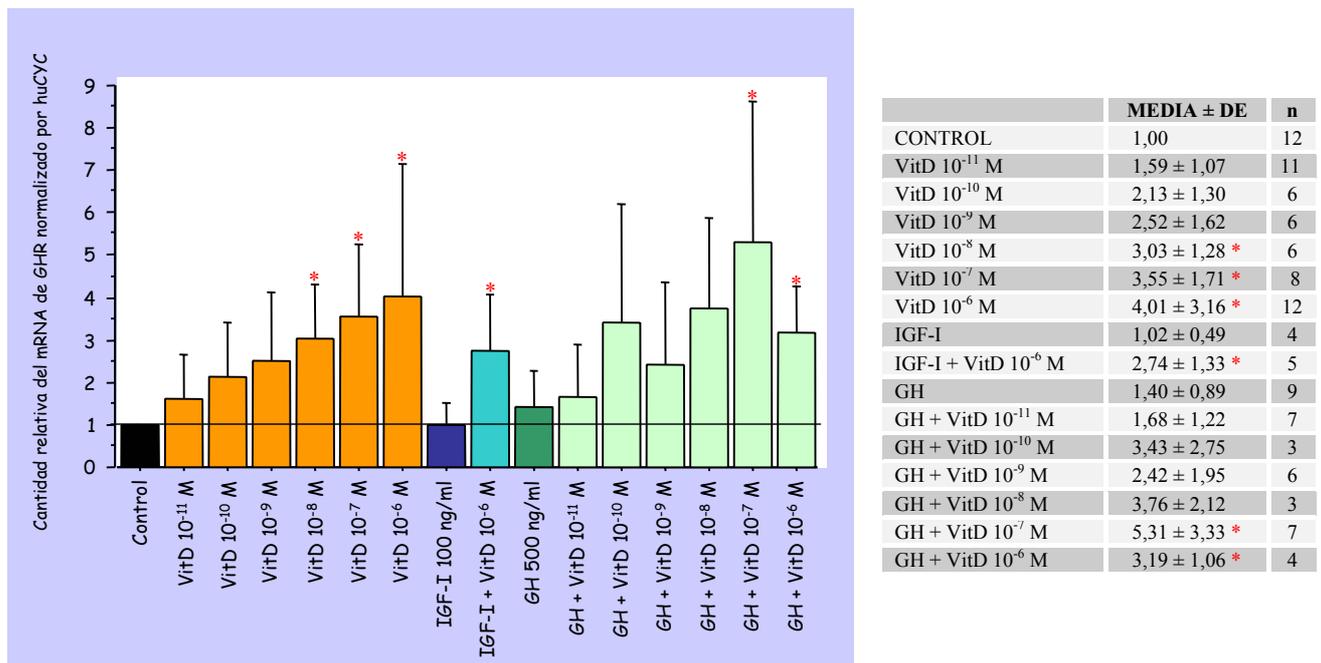


Figura 51. Cuantificación de la expresión del gen GHR en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

La VitD estimula de forma concentración dependiente la expresión del gen GHR siendo esta estimulación significativa a partir de la concentración de 10⁻⁸ M.

El tratamiento con IGF-I no tiene efecto sobre la expresión de este gen pero el tratamiento combinado con VitD 10⁻⁶ M e IGF-I permite seguir observando la misma estimulación de la expresión de este gen que producía la VitD sola.

La GH no tiene efecto sobre la expresión de su receptor pero en combinación con la VitD 10⁻⁸ y 10⁻⁷ M se produce una potenciación de la expresión respecto al efecto producido por la Vit D 10⁻⁸ y 10⁻⁷ M sola.

Expresión del gen SOX9

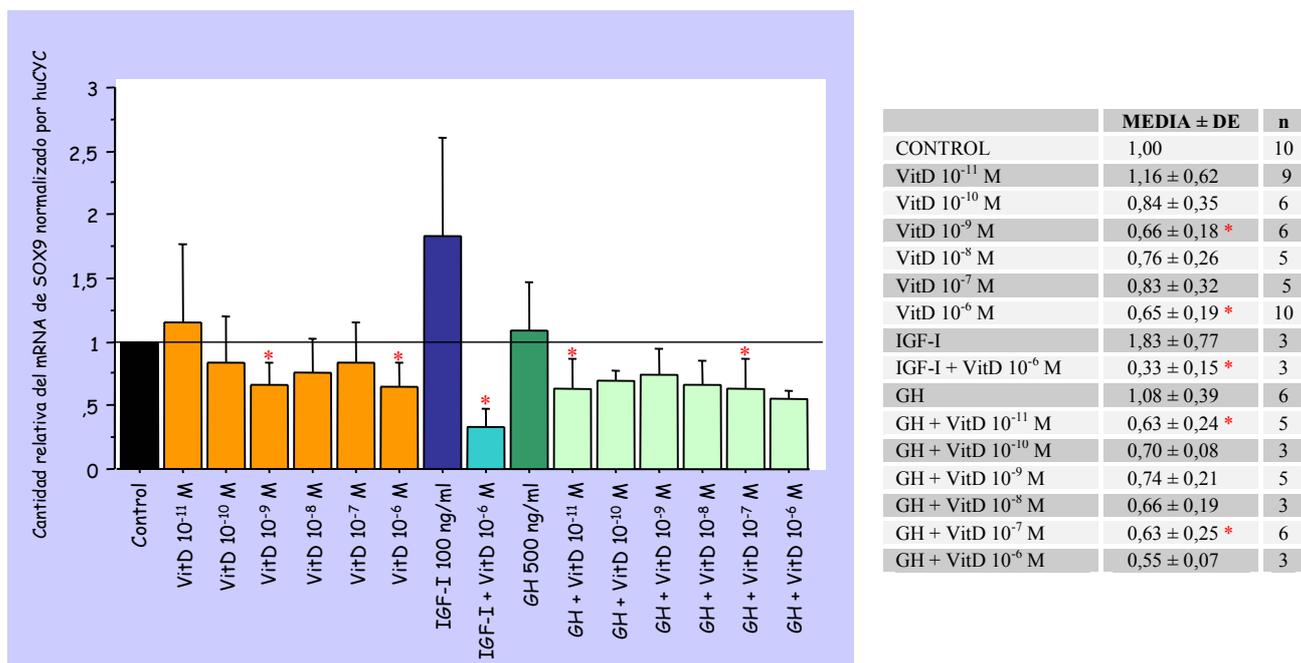


Figura 52. Cuantificación de la expresión del gen SOX9 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

La VitD a la concentración baja de 10⁻¹¹ M tiene un efecto muy variable sobre la expresión de SOX9, pero a partir de 10⁻¹⁰ M inhibe dicha expresión, siendo estadísticamente significativo a 10⁻⁹ M y 10⁻⁶ M, no observándose un efecto progresivo.

El IGF-I estimula la expresión de SOX9 pero no revierte la inhibición producida por la VitD 10⁻⁶ M.

La GH no tiene efecto sobre la expresión de este gen y la combinación de la GH con VitD tiene un efecto similar al observado al incubar las células con VitD sola, es decir, se inhibe la expresión de SOX9.

Expresión de proteínas de la matriz extracelular

Cuantificación relativa de la expresión del gen COL2A1

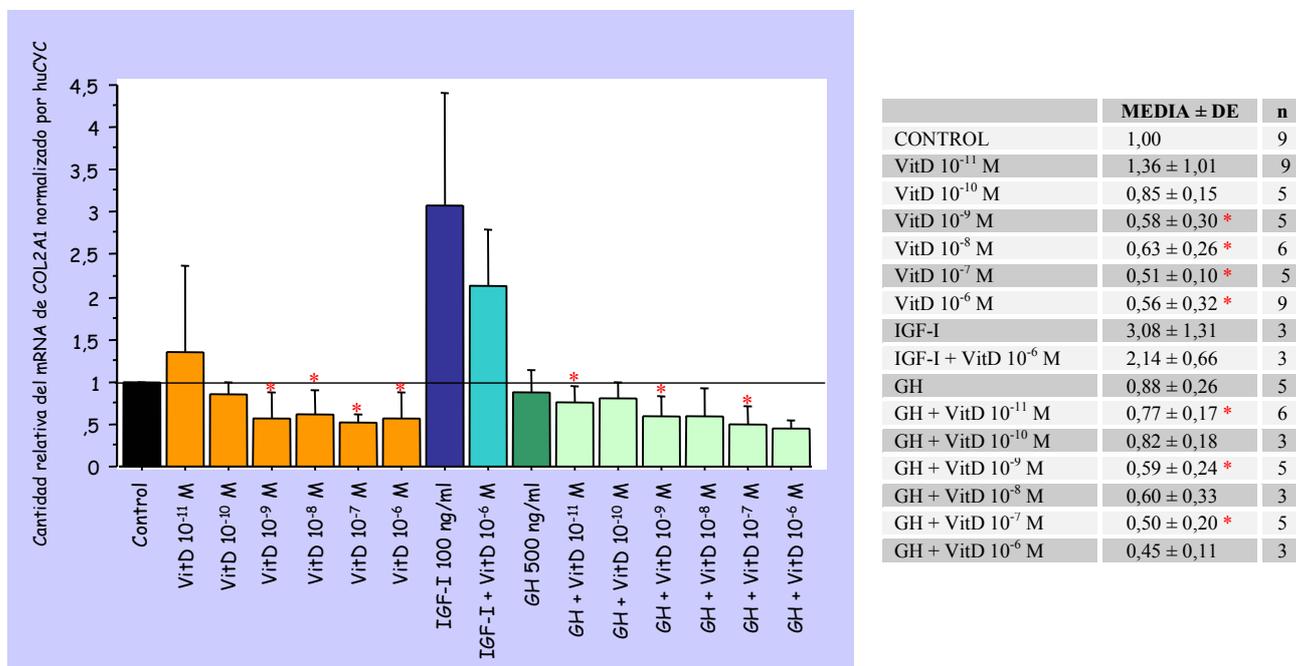


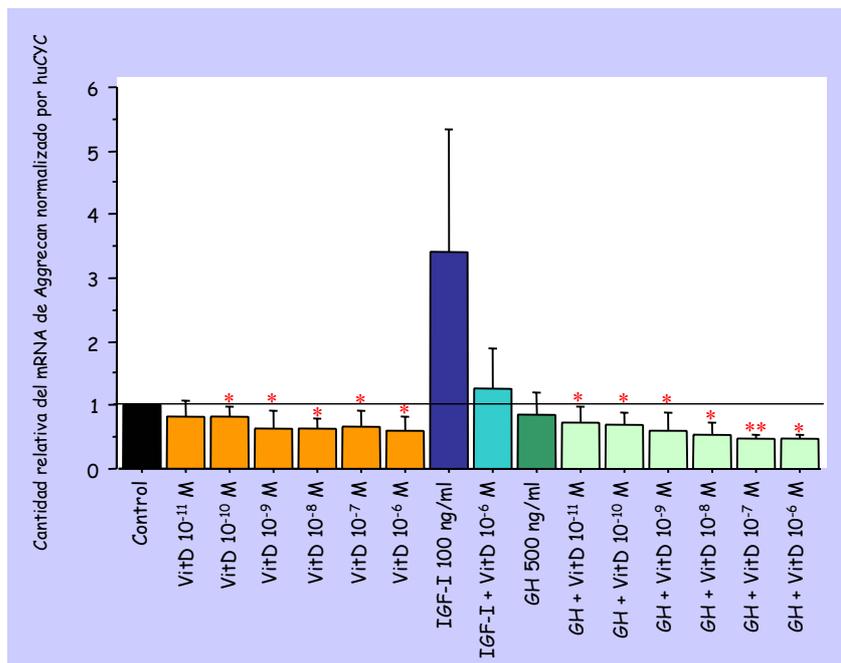
Figura 53. Cuantificación de la expresión del gen COL2A1 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05, respecto al control).

La VitD a la concentración de 10⁻¹¹ M tiene un efecto variable pero a partir de la concentración 10⁻⁹ M tiene un efecto inhibitorio significativo de la expresión de COL2A1, no observándose un efecto progresivo.

El IGF-I estimula la expresión de este gen de forma variable y revierte la inhibición producida por la VitD 10⁻⁶ M (p=0,03 respecto a la Vit D 10⁻⁶ M sola).

La GH no tiene efecto sobre la expresión de COL2A1 y la combinación de esta hormona con la VitD no revierte la inhibición de la expresión producida por VitD sola.

Cuantificación relativa de la expresión del gen aggrecan



	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	10
VitD 10 ⁻¹¹ M	0,81 ± 0,28	10
VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,82 ± 0,17 *	6
VitD 10 ⁻⁹ M	0,64 ± 0,26 *	6
VitD 10 ⁻⁸ M	0,63 ± 0,17 *	6
VitD 10 ⁻⁷ M	0,66 ± 0,27 *	6
VitD 10 ⁻⁶ M	0,59 ± 0,23 *	10
IGF-I	3,40 ± 1,94	3
IGF-I + VitD 10 ⁻⁶ M	1,28 ± 0,63	4
GH	0,85 ± 0,34	7
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	0,72 ± 0,25 *	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,69 ± 0,20 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	0,61 ± 0,26 *	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	0,54 ± 0,19 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	0,46 ± 0,07 **	6
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	0,48 ± 0,07 *	3

Figura 54. Cuantificación de la expresión del gen aggrecan en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05; ** p<0,0001, respecto al control).

La VitD inhibe de forma concentración dependiente la expresión de aggrecan siendo esta inhibición significativa a partir de la concentración de 10⁻¹⁰ M.

El IGF-I estimula la expresión de este gen aunque existe gran variación interexperimental y el tratamiento combinado con IGF-I y VitD 10⁻⁶ M revierte la inhibición producida por la VitD 10⁻⁶ M sola.

La GH no tiene efecto sola y combinada con VitD no revierte el efecto inhibitorio producido por VitD.

Cuantificación relativa de la expresión del gen COMP

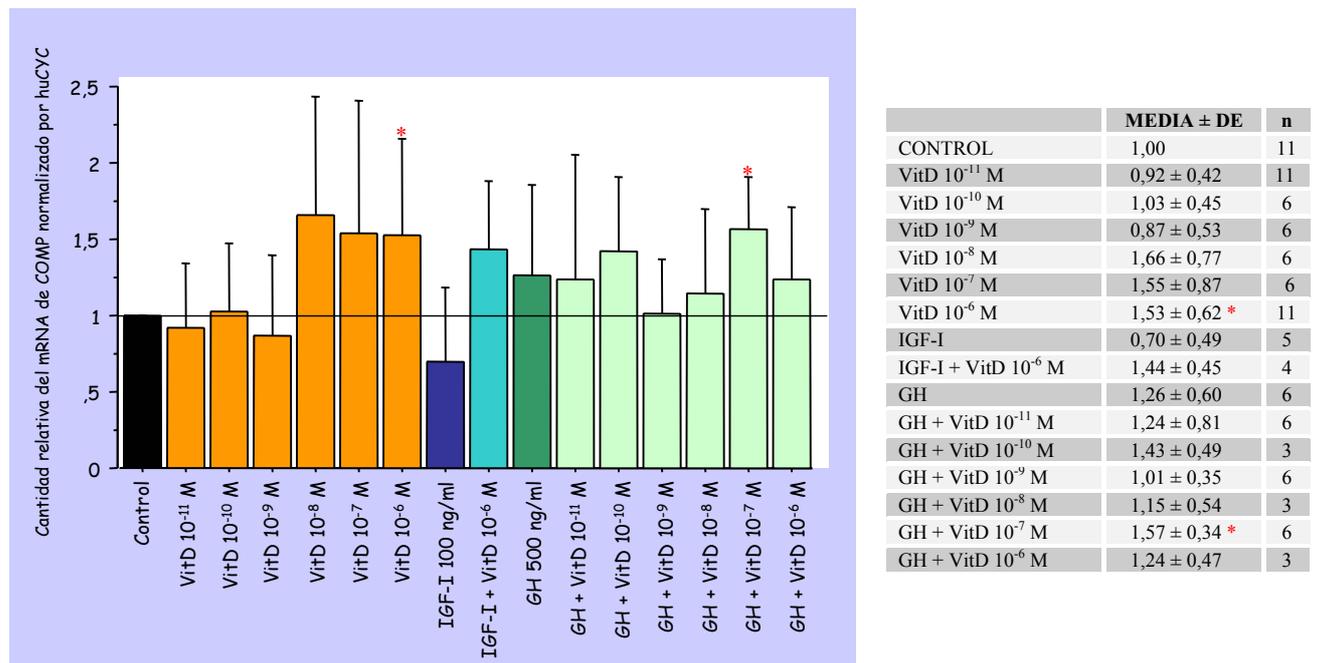


Figura 55. Cuantificación de la expresión del gen COMP en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de VitD, IGF-I y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05, respecto al control).

La VitD tiene un efecto estimulador de la expresión de COMP a partir de la concentración 10⁻⁸ M, aunque por su variabilidad sólo es significativa a la concentración de 10⁻⁶ M.

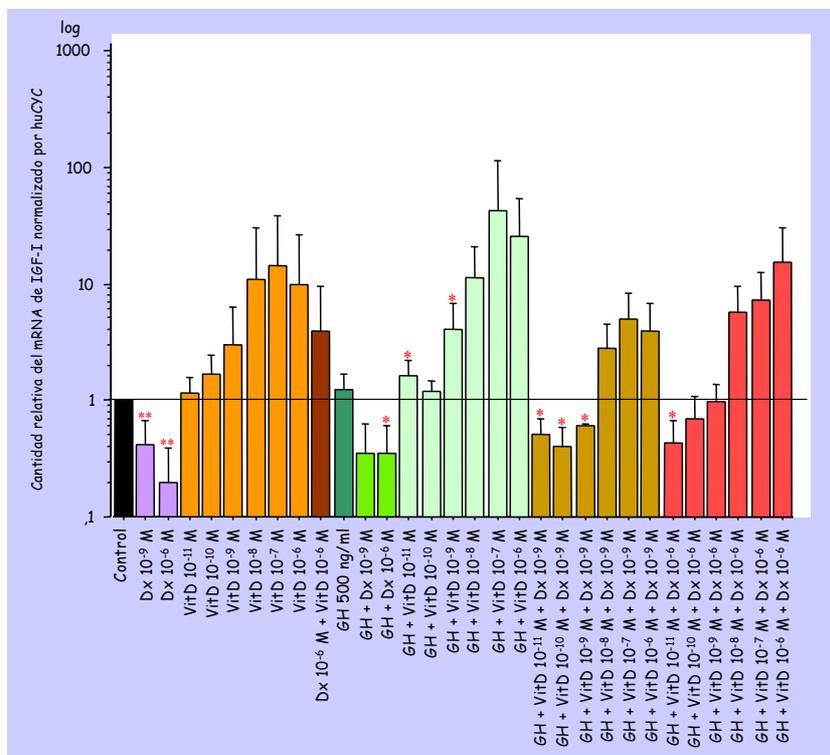
El IGF-I inhibe la expresión de COMP aunque hay variación interexperimental y en combinación con VitD el efecto observado es similar al producido al incubar las células con VitD sola.

La GH no tiene efecto sobre la expresión de COMP y en combinación con VitD se produce el mismo efecto que con VitD sola, es decir, se estimula la expresión de COMP, siendo ésta significativa con VitD 10⁻⁷ M.

4.2.4.2.3 Regulación de la expresión génica por el tratamiento combinado con Dx, VitD y GH

Expresión de los genes del sistema IGFs

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-I



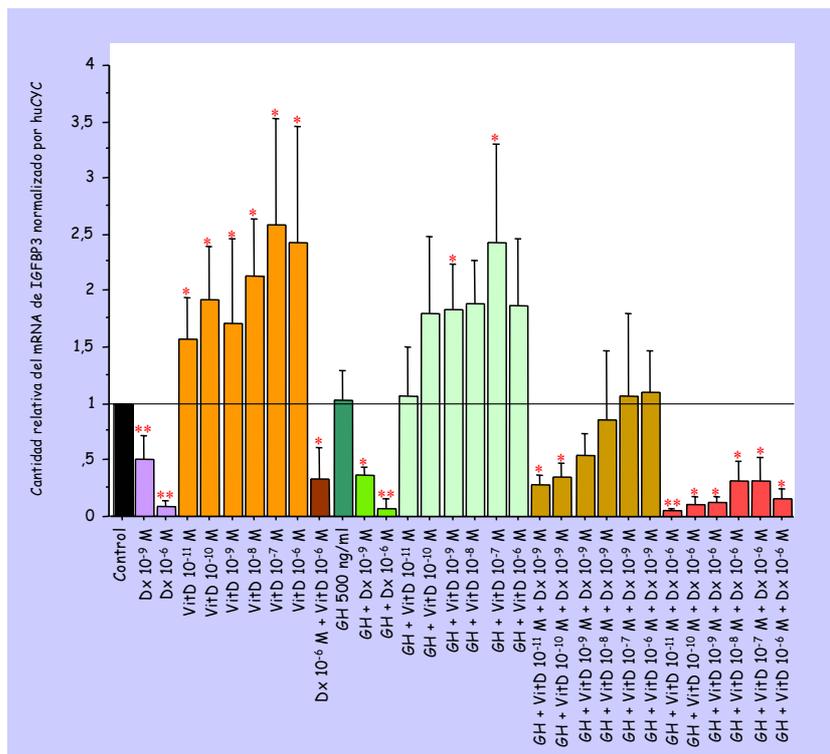
	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	11
Dx 10 ⁻⁹ M	0,42 ± 0,26 **	10
Dx 10 ⁻⁶ M	0,20 ± 0,19 **	11
VitD 10 ⁻¹¹ M	1,14 ± 0,42	10
VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,69 ± 0,72	6
VitD 10 ⁻⁹ M	3,05 ± 3,37	6
VitD 10 ⁻⁸ M	11,06 ± 18,80	6
VitD 10 ⁻⁷ M	14,37 ± 24,04	7
VitD 10 ⁻⁶ M	9,80 ± 16,38	11
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	3,94 ± 5,50	4
GH	1,23 ± 0,48	7
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,36 ± 0,26	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,35 ± 0,26 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	1,65 ± 0,58 *	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,19 ± 0,29	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	4,05 ± 2,84 *	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	11,31 ± 9,56	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	43,04 ± 72,27	7
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	25,69 ± 29,09	4
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,52 ± 0,17 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,41 ± 0,18 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,60 ± 0,03 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	2,82 ± 1,76	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	5,01 ± 3,39	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	3,92 ± 2,90	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,44 ± 0,24 *	4
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,68 ± 0,40	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,96 ± 0,41	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	5,79 ± 3,71	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	7,23 ± 5,43	4
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	15,47 ± 15,09	4

Figura 56. Cuantificación de la expresión del gen IGF-I en condrocitos procedentes de cartilago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05; **p<0,0001, respecto al control). Resultados expresados en escala logarítmica.

Mientras que la Dx es un potente inhibidor de la expresión de IGF-I, la VitD produce el efecto contrario: estimulación. En combinación, la VitD 10⁻⁶ M revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M.

Así como la GH no tiene efecto significativo sobre la expresión de IGF-I y no revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁹ o 10⁻⁶ M, si en el medio además hay VitD a partir de la concentración de 10⁻⁸ M no sólo se revierte la inhibición producida por la Dx sino que se produce una estimulación de la expresión de IGF-I, aunque esta estimulación no es significativa debido a la variación interexperimental y es inferior a la observada cuando se incuban las células con GH y VitD.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGFBP3

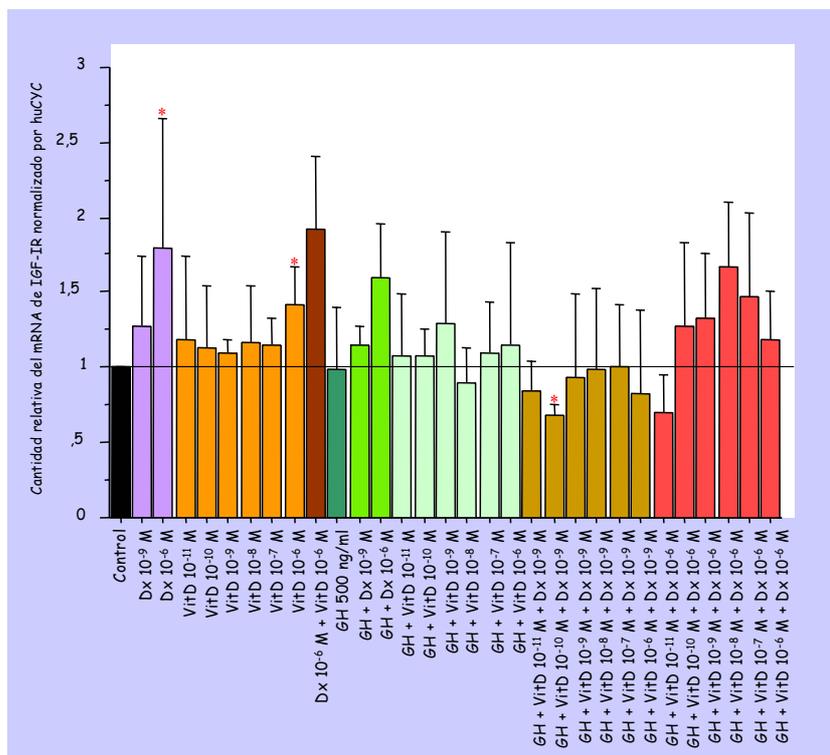


	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	12
Dx 10 ⁻⁹ M	0,51 ± 0,22 **	10
Dx 10 ⁻⁶ M	0,08 ± 0,06 **	12
VitD 10 ⁻¹¹ M	1,58 ± 0,35 *	9
VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,91 ± 0,49 *	7
VitD 10 ⁻⁹ M	1,71 ± 0,75 *	7
VitD 10 ⁻⁸ M	2,13 ± 0,52 *	7
VitD 10 ⁻⁷ M	2,59 ± 0,94 *	8
VitD 10 ⁻⁶ M	2,44 ± 1,02 *	12
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	0,33 ± 0,29 *	4
GH	1,03 ± 0,27	8
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,37 ± 0,08 *	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,07 ± 0,08 **	5
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	1,06 ± 0,44	7
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,80 ± 0,69	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	1,84 ± 0,40 *	7
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	1,89 ± 0,38	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	2,44 ± 0,86 *	8
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	1,87 ± 0,59	4
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,28 ± 0,08 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,34 ± 0,12 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,54 ± 0,20	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,85 ± 0,62	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,07 ± 0,73	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,10 ± 0,37	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,05 ± 0,02 **	4
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,10 ± 0,08 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,12 ± 0,05 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,31 ± 0,18 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,32 ± 0,20 *	4
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,16 ± 0,09 *	4

Figura 57. Cuantificación de la expresión del gen IGFBP3 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05; **p<0,0001, respecto al control).

La VitD, pese a que estimula significativamente la expresión de IGFBP3, no revierte la inhibición de la expresión de este gen producida por la Dx. Lo mismo ocurre con la GH, pero si se incuban las células con Dx a una concentración baja (10⁻⁹ M), GH y VitD a concentraciones crecientes (10⁻¹¹ a 10⁻⁶ M) ésta última revierte la inhibición de la expresión de IGFBP3 a partir de la concentración de 10⁻⁷ M de VitD. En cambio si en el medio hay Dx a una concentración elevada (10⁻⁶ M) no se consigue revertir la inhibición de la expresión de IGFBP3.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-IR

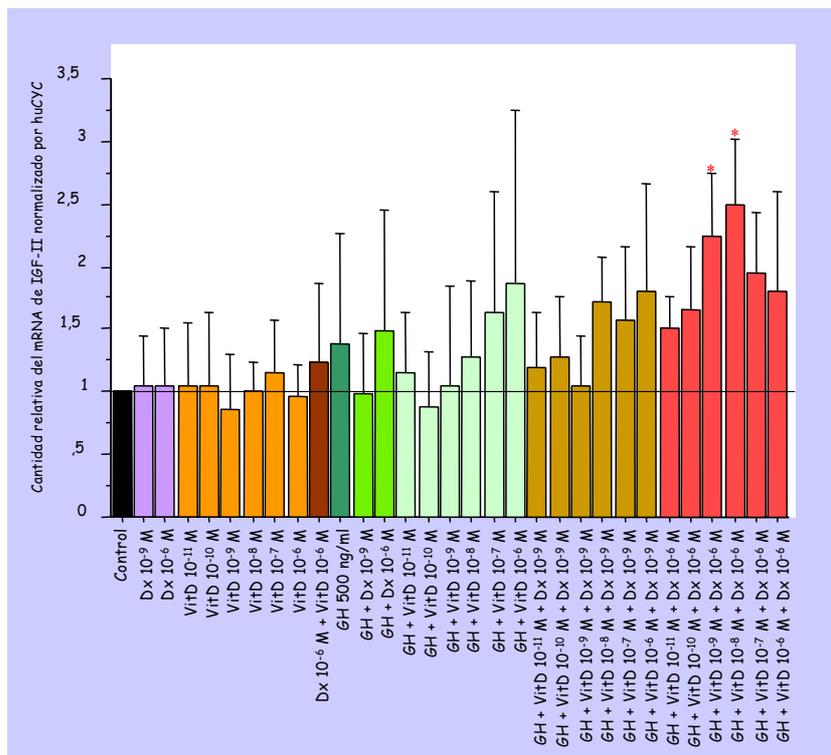


	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	11
Dx 10 ⁻⁹ M	1,27 ± 0,47	11
Dx 10 ⁻⁶ M	1,79 ± 0,86 *	11
VitD 10 ⁻¹¹ M	1,19 ± 0,55	11
VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,12 ± 0,42	6
VitD 10 ⁻⁹ M	1,09 ± 0,09	6
VitD 10 ⁻⁸ M	1,16 ± 0,39	6
VitD 10 ⁻⁷ M	1,14 ± 0,19	6
VitD 10 ⁻⁶ M	1,41 ± 0,27 *	11
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	1,93 ± 0,47	3
GH	0,99 ± 0,41	6
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	1,15 ± 0,12	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	1,59 ± 0,37	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	1,09 ± 0,41	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,07 ± 0,18	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	1,30 ± 0,61	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	0,90 ± 0,23	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	1,09 ± 0,34	6
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	1,14 ± 0,69	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,85 ± 0,20	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,68 ± 0,06	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,93 ± 0,56	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,00 ± 0,52	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,01 ± 0,40	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,83 ± 0,55	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,71 ± 0,24	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,27 ± 0,56	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,32 ± 0,43	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,67 ± 0,44	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,47 ± 0,55	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,19 ± 0,32	3

Figura 58. Cuantificación de la expresión del gen IGF-IR en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

Tanto Dx como VitD estimulan la expresión de IGF-IR de forma significativa a la concentración de 10⁻⁶ M, aunque existen variaciones interexperimentales. El efecto producido sobre la expresión de IGF-IR al incubar las células con GH, Dx y VitD no es significativo y no difiere del observado al incubar con Dx y VitD solas. La combinación GH, VitD 10⁻¹⁰ M y Dx 10⁻⁹ M inhibe de forma significativa la expresión de IGF-IR.

Cuantificación relativa de la expresión del gen IGF-II

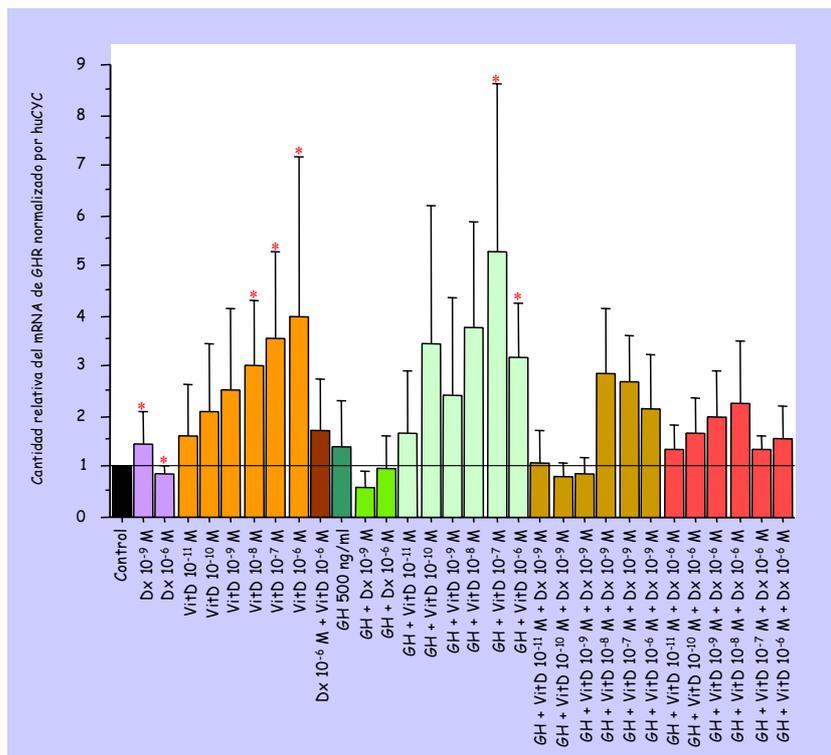


	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	10
Dx 10 ⁻⁹ M	1,05 ± 0,40	10
Dx 10 ⁻⁶ M	1,05 ± 0,47	10
VitD 10 ⁻¹¹ M	1,04 ± 0,51	10
VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,04 ± 0,59	6
VitD 10 ⁻⁹ M	0,86 ± 0,43	6
VitD 10 ⁻⁸ M	1,01 ± 0,23	6
VitD 10 ⁻⁷ M	1,15 ± 0,42	6
VitD 10 ⁻⁶ M	0,96 ± 0,26	10
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	1,23 ± 0,64	3
GH	1,39 ± 0,87	6
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,99 ± 0,47	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	1,49 ± 0,97	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	1,15 ± 0,49	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,87 ± 0,44	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	1,05 ± 0,79	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	1,28 ± 0,62	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	1,64 ± 0,95	6
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	1,87 ± 1,39	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,20 ± 0,43	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,29 ± 0,49	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,04 ± 0,41	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,72 ± 0,34	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,57 ± 0,59	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,80 ± 0,87	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,51 ± 0,25	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,66 ± 0,50	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	2,25 ± 0,49 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	2,50 ± 0,51 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,95 ± 0,48	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,81 ± 0,79	3

Figura 59. Cuantificación de la expresión del gen IGF-II en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

Aunque la expresión de IGF-II no varía ni con Dx, ni con VitD ni con GH existe una tendencia a la estimulación cuando se incuban conjuntamente, siendo esta estimulación significativa con GH, VitD 10⁻⁹ ó 10⁻⁸ M y Dx 10⁻⁶ M.

Cuantificación relativa de la expresión del gen GHR

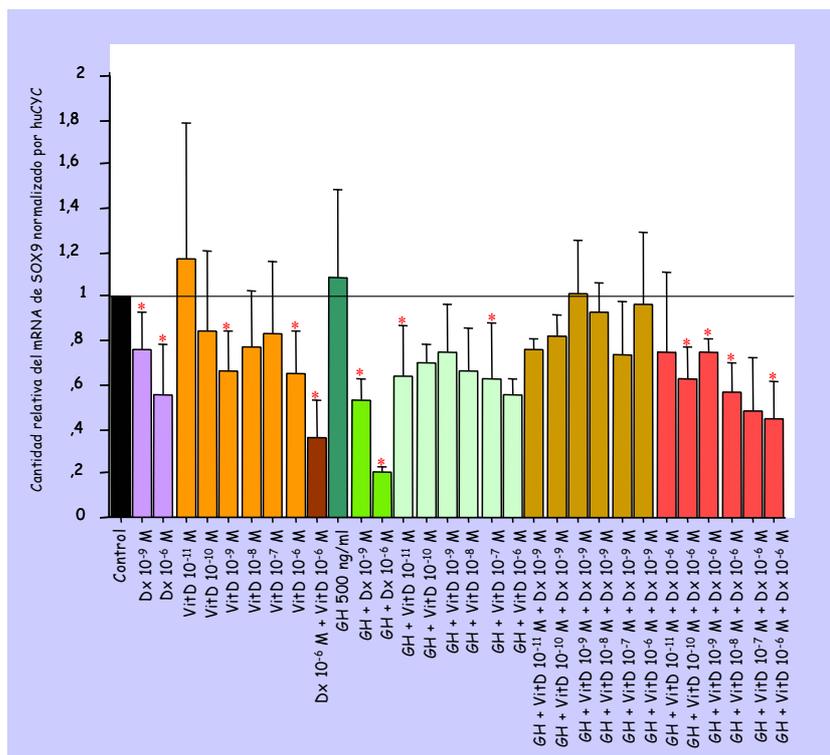


	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	12
Dx 10 ⁻⁹ M	1,48 ± 0,63 *	10
Dx 10 ⁻⁶ M	0,88 ± 0,14 *	11
VitD 10 ⁻¹¹ M	1,59 ± 1,07	11
VitD 10 ⁻¹⁰ M	2,13 ± 1,30	6
VitD 10 ⁻⁹ M	2,52 ± 1,62	6
VitD 10 ⁻⁸ M	3,03 ± 1,28 *	6
VitD 10 ⁻⁷ M	3,55 ± 1,71 *	8
VitD 10 ⁻⁶ M	4,01 ± 3,16 *	12
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	1,74 ± 1,01	4
GH	1,40 ± 0,89	9
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,57 ± 0,35	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,97 ± 0,63	5
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	1,68 ± 1,22	7
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	3,43 ± 2,75	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	2,42 ± 1,95	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	3,76 ± 2,12	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	5,31 ± 3,33 *	7
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	3,19 ± 1,06 *	4
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,06 ± 0,65	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,82 ± 0,27	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,85 ± 0,32	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	2,87 ± 1,28	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	2,70 ± 0,90	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	2,17 ± 1,08	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,33 ± 0,53	4
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,69 ± 0,68	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,98 ± 0,91	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	2,28 ± 1,20	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,36 ± 0,28	4
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,57 ± 0,62	4

Figura 60. Cuantificación de la expresión del gen GHR en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VtD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (p<0,05, respecto al control).

El tratamiento con Dx produce un efecto dual en función de la concentración de manera que concentraciones bajas estimulan la expresión de GHR mientras que concentraciones altas la inhiben. En cambio, la VitD estimula la expresión de este gen desde la concentración 10⁻¹¹ M hasta la de 10⁻⁶ M y revierte la inhibición que la Dx 10⁻⁶ M produce. Así como la GH revierte la inhibición producida por la Dx 10⁻⁶ M si en el medio además hay VitD no sólo se revierte la inhibición sino que se observa una estimulación aunque no es significativa por la variabilidad interexperimental y es inferior a la observada al incubar las células con GH y VitD.

Expresión del gen SOX9



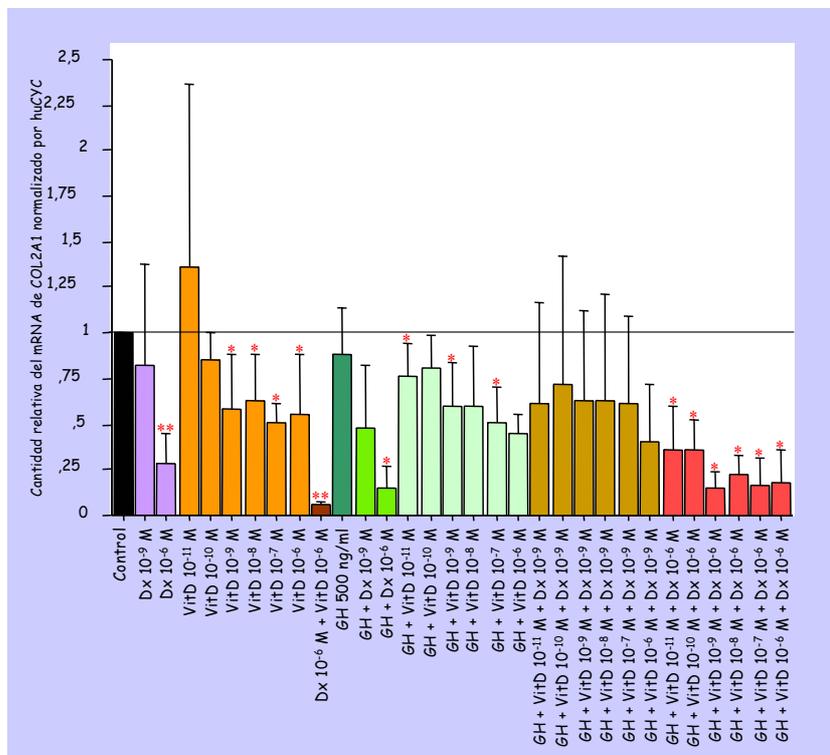
	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	10
Dx 10 ⁻⁹ M	0,75 ± 0,17 *	9
Dx 10 ⁻⁶ M	0,55 ± 0,23 *	10
VitD 10 ⁻¹¹ M	1,16 ± 0,62	9
VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,84 ± 0,35	6
VitD 10 ⁻⁹ M	0,66 ± 0,18 *	6
VitD 10 ⁻⁸ M	0,76 ± 0,26	5
VitD 10 ⁻⁷ M	0,83 ± 0,32	5
VitD 10 ⁻⁶ M	0,65 ± 0,19 *	10
Dx 10 ⁻⁹ M + VitD 10 ⁻⁶ M	0,35 ± 0,18	3
GH	1,08 ± 0,39	6
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,53 ± 0,10 *	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,20 ± 0,02 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	0,63 ± 0,24 *	5
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,70 ± 0,08	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	0,74 ± 0,21	5
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	0,66 ± 0,19	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	0,63 ± 0,25 *	6
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	0,55 ± 0,07	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,75 ± 0,06	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,81 ± 0,10	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,00 ± 0,324	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,92 ± 0,13	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,73 ± 0,24	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,95 ± 0,33	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,74 ± 0,37	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,63 ± 0,14 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,75 ± 0,06 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,56 ± 0,13 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,48 ± 0,25	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,44 ± 0,17 *	3

Figura 61. Cuantificación de la expresión del gen SOX9 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05, respecto al control).

Tanto la Dx como la VitD inhiben la expresión del factor de transcripción SOX9 y la GH no revierte ni la inhibición producida por la Dx ni la producida por la VitD. En el tratamiento combinado de Dx y VitD y/o GH el efecto observado es el mismo: inhibición de la expresión de SOX9.

Expresión de proteínas de la matriz extracelular

Cuantificación relativa de la expresión del gen COL2A1

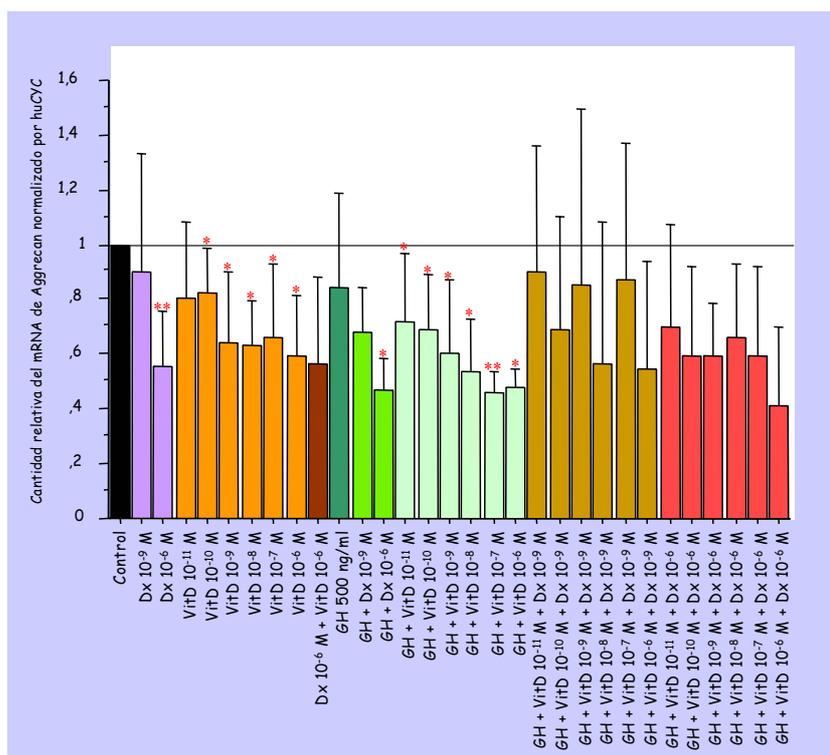


	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	10
Dx 10 ⁻⁹ M	0,83 ± 0,55	10
Dx 10 ⁻⁶ M	0,28 ± 0,17 **	10
VitD 10 ⁻¹¹ M	1,36 ± 1,01	9
VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,85 ± 0,15	5
VitD 10 ⁻⁹ M	0,58 ± 0,30 *	5
VitD 10 ⁻⁸ M	0,63 ± 0,26 *	6
VitD 10 ⁻⁷ M	0,51 ± 0,10 *	5
VitD 10 ⁻⁶ M	0,56 ± 0,32 *	9
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	0,07 ± 0,01 **	3
GH	0,88 ± 0,26	5
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,48 ± 0,35	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,16 ± 0,11 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	0,77 ± 0,17 *	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,82 ± 0,18	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	0,59 ± 0,24 *	5
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	0,60 ± 0,33	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	0,50 ± 0,20 *	5
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	0,45 ± 0,11	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,62 ± 0,54	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,72 ± 0,70	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,63 ± 0,49	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,62 ± 0,59	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,61 ± 0,48	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,40 ± 0,31	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,35 ± 0,24 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,36 ± 0,17 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,15 ± 0,09 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,22 ± 0,11 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,17 ± 0,15 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,19 ± 0,18 *	3

Figura 62. Cuantificación de la expresión del gen COL2A1 en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05; **p<0,0001, respecto al control).

El tratamiento de las células con Dx o con VitD inhibe significativamente la expresión de COL2A1 de forma concentración dependiente, de manera que la combinación Dx con VitD también inhibe dicha expresión. La GH no revierte ni la inhibición producida por la Dx ni la producida por la VitD ni la de la combinación de ambas.

Cuantificación relativa de la expresión del gen aggrecan

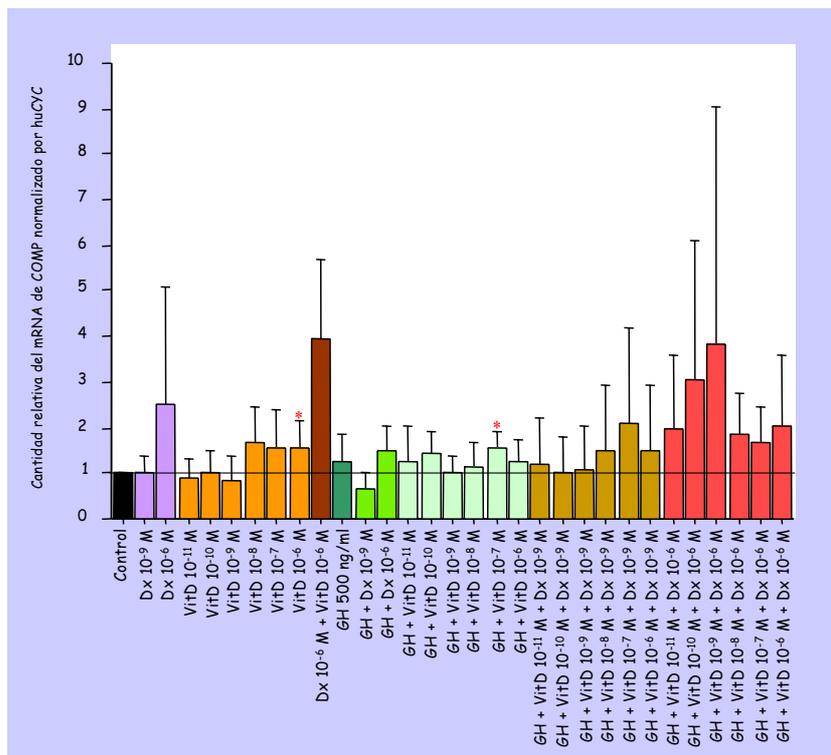


	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	10
Dx 10 ⁻⁹ M	0,90 ± 0,44	10
Dx 10 ⁻⁶ M	0,55 ± 0,21 **	10
VitD 10 ⁻¹¹ M	0,81 ± 0,28	10
VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,82 ± 0,17 *	6
VitD 10 ⁻⁹ M	0,64 ± 0,26 *	6
VitD 10 ⁻⁸ M	0,63 ± 0,17 *	6
VitD 10 ⁻⁷ M	0,66 ± 0,27 *	6
VitD 10 ⁻⁶ M	0,59 ± 0,23 *	10
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	0,57 ± 0,31	3
GH	0,85 ± 0,34	7
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,68 ± 0,17	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	0,47 ± 0,11 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	0,72 ± 0,25 *	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	0,69 ± 0,20 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	0,61 ± 0,26 *	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	0,54 ± 0,19 *	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	0,46 ± 0,07 **	6
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	0,48 ± 0,07 *	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,90 ± 0,46	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,69 ± 0,41	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,85 ± 0,64	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,57 ± 0,51	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,87 ± 0,50	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	0,55 ± 0,40	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,70 ± 0,37	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,60 ± 0,33	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,59 ± 0,19	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,66 ± 0,27	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,60 ± 0,32	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	0,41 ± 0,29	3

Figura 63. Cuantificación de la expresión del gen aggrecan en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (* p<0,05; ** p<0,0001, respecto al control).

Tanto Dx como VitD inhiben la expresión de aggrecan y la GH no revierte esta inhibición. La combinación de GH con Dx y/o con VitD produce el mismo efecto inhibitorio sobre la expresión de este gen.

Cuantificación relativa de la expresión del gen COMP



	MEDIA ± DE	n
CONTROL	1,00	11
Dx 10 ⁻⁹ M	1,02 ± 0,34	11
Dx 10 ⁻⁶ M	2,54 ± 2,55	11
VitD 10 ⁻¹¹ M	0,92 ± 0,42	11
VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,03 ± 0,45	6
VitD 10 ⁻⁹ M	0,87 ± 0,53	6
VitD 10 ⁻⁸ M	1,66 ± 0,77	6
VitD 10 ⁻⁷ M	1,55 ± 0,87	6
VitD 10 ⁻⁶ M	1,53 ± 0,62 *	11
Dx 10 ⁻⁶ M + VitD 10 ⁻⁶ M	3,95 ± 1,77	3
GH	1,25 ± 0,60	6
GH + Dx 10 ⁻⁹ M	0,69 ± 0,31	3
GH + Dx 10 ⁻⁶ M	1,48 ± 0,55	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M	1,24 ± 0,81	6
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M	1,43 ± 0,49	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M	1,01 ± 0,35	6
GH + VitD 10 ⁻⁸ M	1,15 ± 0,54	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M	1,57 ± 0,34 *	6
GH + VitD 10 ⁻⁶ M	1,24 ± 0,47	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,18 ± 1,03	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,04 ± 0,78	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,10 ± 0,94	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,50 ± 1,46	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁹ M	2,08 ± 2,09	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁹ M	1,49 ± 1,44	3
GH + VitD 10 ⁻¹¹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,97 ± 1,61	3
GH + VitD 10 ⁻¹⁰ M + Dx 10 ⁻⁶ M	3,08 ± 3,02	3
GH + VitD 10 ⁻⁹ M + Dx 10 ⁻⁶ M	3,80 ± 5,24	3
GH + VitD 10 ⁻⁸ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,85 ± 0,92	3
GH + VitD 10 ⁻⁷ M + Dx 10 ⁻⁶ M	1,67 ± 0,76	3
GH + VitD 10 ⁻⁶ M + Dx 10 ⁻⁶ M	2,05 ± 1,56	3

Figura 64. Cuantificación de la expresión del gen COMP en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos (media ± desviación estándar). Las células control se han incubado con medio que contiene la misma cantidad de etanol y BSA que las condiciones de Dx, VitD y GH. Cada valor representa el nivel de expresión relativa respecto al control (= 1). (n: número de experimentos realizados para cada condición de tratamiento a partir de condrocitos procedentes de fetos diferentes) (*p<0,05, respecto al control).

El tratamiento con Dx o con VitD estimula la expresión de COMP y el tratamiento combinado con Dx y VitD parece potenciar la estimulación producida tanto por Dx como por VitD aunque no es una estimulación significativa debido a la variación interexperimental. De la misma manera, en el tratamiento de las células con GH, Dx y VitD se observa una tendencia a la estimulación de la expresión de COMP, aunque no es un incremento estadísticamente significativo.

4.2.5 Cuantificación de la proteína IGF-I en el medio de cultivo

La concentración de la proteína IGF-I se cuantificó en los medios de cultivo de tres experimentos al final del protocolo de incubación de 48h con diferentes tratamientos.

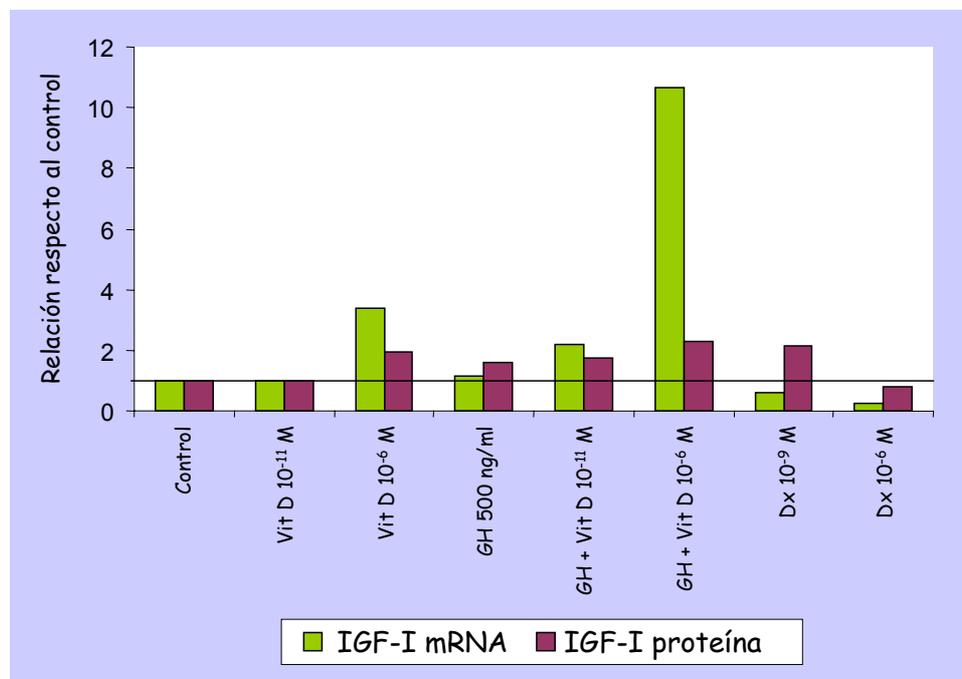


Figura 65. Cuantificación de la expresión del gen y de la síntesis de la proteína IGF-I en el medio de cultivo de un experimento en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos. Resultados expresados en relación a la condición control (=1).

Los resultados presentes en la *Figura 65* corresponden a un experimento y son representativos de los resultados obtenidos. En ausencia de tratamiento (condición control) se detecta una concentración de proteína IGF-I de 4,1 ng/ml.

La VitD 10⁻¹¹ M no tiene efecto sobre la expresión y la síntesis de IGF-I mientras que a 10⁻⁶ M incrementa la síntesis de proteína IGF-I (x 1,94 respecto al control) de forma paralela al incremento que produce sobre la expresión de este gen (x 3,38 respecto al control). La GH sola no tiene efecto sobre la expresión al final de las 48h de incubación pero se observa un incremento de la proteína en el medio (x 1,6 respecto al control). La GH combinada con VitD produce un incremento mayor de la expresión del gen IGF-I (x 10,64 respecto al control a 10⁻⁶ M) y de la síntesis de proteína (x 2,31 respecto al control a 10⁻⁶ M).

Pese a que la $Dx 10^{-9}$ M inhibe la expresión del gen IGF-I (x 0,61 respecto al control) los niveles de proteína están incrementados respecto a la condición control (x 2,13). Sin embargo, la $Dx 10^{-6}$ M inhibe tanto la expresión (x 0,24 respecto al control) como la síntesis de IGF-I (x 0,81 respecto al control).

4.2.6 Cuantificación de la proteína IGFBP3 en el medio de cultivo

La concentración de IGFBP3 en el medio de cultivo se ha cuantificado en dos experimentos independientes.

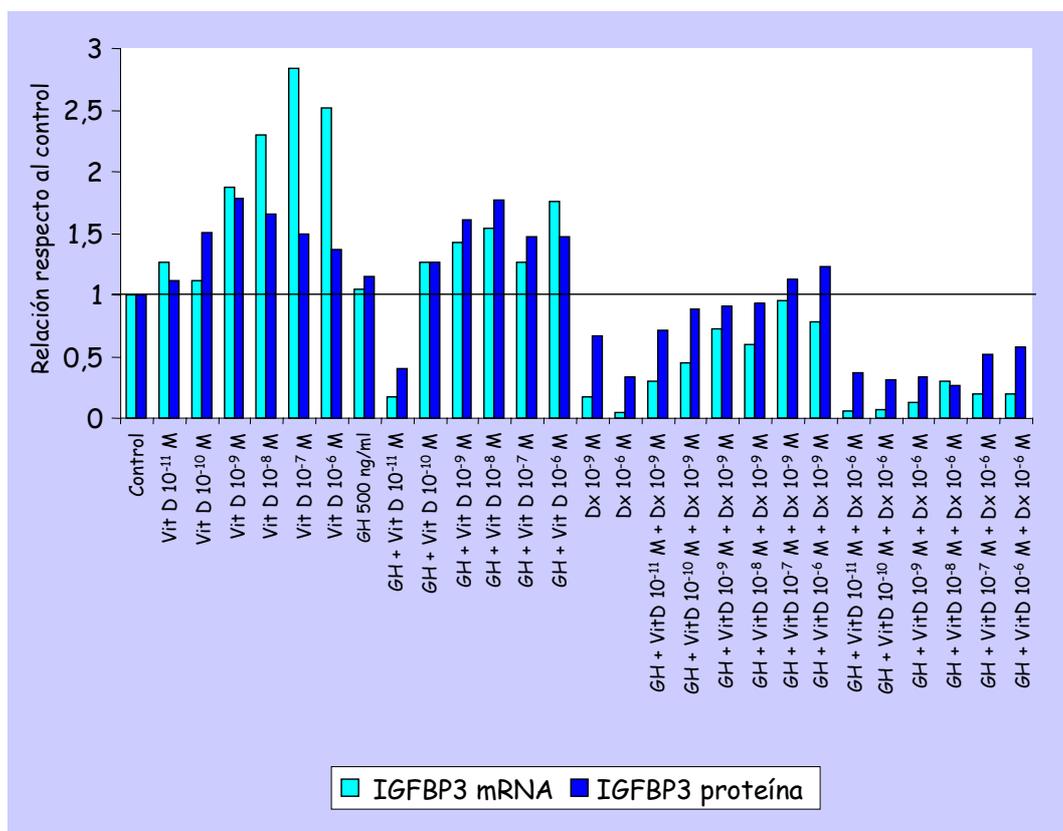


Figura 66. Cuantificación de la expresión del gen y de la síntesis de la proteína IGFBP3 en el medio de cultivo de un experimento en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano deprivados durante 48h e incubados otras 48h con diferentes tratamientos. Resultados expresados en relación a la condición control (=1).

Los resultados presentes en la *Figura 66* corresponden a un experimento y son representativos de los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados. En ausencia de tratamiento (condición control) se detecta una concentración de proteína IGFBP3 de 89 ng/ml.

Las variaciones en la síntesis de la proteína IGFBP3 son paralelas a los cambios observados en los niveles de expresión génica, de manera que aquellas condiciones que estimulan la expresión del gen, como la incubación con concentraciones crecientes de VitD (x 2,52 respecto al control a 10^{-6} M), se acompañan de un incremento en la síntesis de proteína (x 1,37 respecto al control a 10^{-6} M), mientras que aquellas condiciones inhibitorias de la expresión, como el tratamiento con Dx (x 0,05 respecto al control a 10^{-6} M), se corresponden con menor presencia de proteína en el medio (x 0,33 respecto al control a 10^{-6} M).

5. DISCUSIÓN

Metodología

El análisis de la expresión de los genes del eje GH-IGFs, de factores de transcripción y de proteínas de la matriz extracelular en células de la línea condrocítica C-28/I2 se ha realizado utilizando un método de análisis semicuantitativo. Se ha puesto a punto la técnica en cuanto al diseño de cebadores específicos para los genes analizados y a la optimización tanto de la reacción de RT-PCR como de la cuantificación. Este método ha representado un avance para el estudio de la expresión génica respecto al Northern blot ya que precisa menor cantidad de RNA. Mediante este método se ha podido cuantificar la expresión de genes a partir de 5 ng de mRNA extraído de las células de la línea C-28/I2.

Sin embargo, esta metodología no se ha podido utilizar para estudiar la expresión génica en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano debido a que es un material todavía menos abundante que el de la línea condrocítica. Para este estudio ha sido necesario utilizar la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real. Este método es altamente sensible y permite cuantificar RNAs poco representados en la muestra. Esta cuantificación se realiza en la fase exponencial de la reacción de PCR, de manera que los resultados obtenidos no se ven influenciados por la limitación de los reactivos. Es una técnica que no requiere manipulación de las muestras una vez finalizada la reacción de PCR ya que los resultados se obtienen durante la realización de la misma. De esta manera, se han podido cuantificar genes a partir de material escaso o genes que estaban muy poco expresados en las muestras de interés. Se han optimizado las condiciones de la reacción de PCR en cuanto al gen endógeno más adecuado para el estudio y a las cantidades de mRNA necesarias para la cuantificación.

La expresión y producción de IGF-I por el cartílago de crecimiento es crucial para el crecimiento longitudinal del esqueleto aunque se ha sugerido que el efecto de la GH en la zona germinal puede estar mediado por la producción local de IGF-II⁴³. Así mismo, la producción de IGF-I por los condrocitos del cartílago de crecimiento ha sido cuestionada en numerosas ocasiones, probablemente debido a sus niveles extremadamente bajos, lo cual dificulta su detección por Northern blot y/o inmunoensayos. En nuestro trabajo se demuestra, por primera vez, mediante reacción de PCR cuantitativa a tiempo real, que los condrocitos procedentes de cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano expresan el gen de IGF-I. Para su detección se ha

utilizado 5 veces más RNA total que para la detección de los otros genes analizados, lo que indica que se expresa en cantidades muy bajas y, por lo tanto, muy difíciles de evidenciar por los métodos hasta ahora utilizados. En la literatura, otros autores han detectado expresión de IGF-I mediante Northern blot, hibridación in-situ, RT-PCR semicuantitativa y/o inmunohistoquímica en cartílago de crecimiento bovino⁶⁷, ovino¹⁰², murino^{66,69,103,104} y porcino¹⁰⁵ y en cartílago de crecimiento costochondral de rata¹⁰⁶. Por el contrario, Wang et al.⁶⁵ sólo detectaron IGF-II en cartílago de crecimiento murino y Shinar et al.⁶⁴ obtuvieron resultados similares en cartílago de crecimiento de rata.

En resumen, pese a haber demostrado expresión de IGF-I en cartílago de crecimiento fetal humano, el IGF-II es el IGF más abundantemente expresado. Este hecho también ha sido demostrado por otros autores en cartílago de crecimiento de otras especies animales^{64,105}.

Línea celular condrocítica humana preestablecida C-28/I2

Cultivos primarios de condrocitos aislados de animales jóvenes, que mantienen el fenotipo específico de cartílago se obtienen fácilmente, sin embargo, el uso de condrocitos de origen humano ha sido más problemático ya que no siempre se obtiene el número de células apropiado para la realización de los experimentos. Así, la falta de un modelo reproducible de condrocitos humanos ha dificultado el estudio de las funciones relevantes del cartílago en diferentes patologías humanas. Goldring et al.⁹⁷ obtuvieron la línea celular C-28/I2 inmortalizada con SV40-T antígeno, a partir de un cultivo primario aislado de cartílago costal de una joven de 15 años. Esta línea puede ser utilizada para la realización de experimentos sin limitaciones de la muestra y de una manera estandarizada, siendo un modelo útil para estudiar *in vitro* los mecanismos de transcripción génica relevantes para las funciones condrocíticas. Esta línea ha sido utilizada en la literatura como modelo reproducible de cultivo de condrocitos *in vitro* para el estudio de los mecanismos implicados en patologías articulares y procesos inflamatorios como osteoartritis.

Finger et al.¹⁰⁷ investigaron el patrón de expresión de la línea celular C-28/I2, junto con otras dos líneas de la misma procedencia (C28a2 y C28a4) y demostraron que en estos tipos celulares los genes implicados en el ciclo celular estaban más expresados que en condrocitos normales. La expresión de SOX9 en estas células demostró que tenían un fenotipo condrocítico y observaron que estas líneas celulares eran principalmente

proliferativas y expresaban en menor cantidad genes implicados en la síntesis y renovación de la matriz. Concluyeron que de las 3 líneas celulares analizadas, la línea C-28/I2 era la más útil para el estudio de la actividad anabólica y catabólica de condrocitos y su regulación.

A partir de RNAs extraídos de estas células hemos analizado la expresión génica de los genes del eje GH-IGFs, de factores de transcripción así como de proteínas de la matriz extracelular a lo largo de diferentes días de cultivo. Se ha observado que estas células expresan mayor cantidad de IGF-II que de IGF-I. En cuanto a IGF-I, se ha observado que se expresa tres veces más la isoforma IGF-IB que la isoforma IGF-IA. En la literatura está referenciado que la forma de mayor expresión es la IGF-IA: Nagaoka et al.¹⁰⁸ demostraron en hígado, células de hepatoma, macrófagos y fibroblastos humanos que la isoforma IGF-IA se expresaba 10 veces más que la IGF-IB. Este hecho también ha sido demostrado en otros animales como en rata por Lowe et al.¹⁰⁹, que observaron que la expresión de IGF-IB representaba un 2,5% del total de mRNA de IGF-I en corazón, pulmón, músculo, testículo, estómago, riñón y cerebro de rata, aunque representaba un 13% del mRNA de IGF-I hepático.

Algunos de los genes que hemos estudiado se expresan sólo a partir de la fase exponencial de cultivo como IGFBP3, IGF-IIR, tanto la forma α como la forma β del GCCR, SOX9 y CBFA1. Otros factores constitutivos como Ets2 se expresan durante todo el cultivo, mientras que, tanto SOX9 como CBFA1, son más específicos ya que se expresan coincidiendo con la mitad de la fase exponencial del cultivo.

El objetivo principal del trabajo consistía en el estudio de la regulación del cartílago de crecimiento humano por GCs y por VitD tanto en situaciones que puedan semejar las fisiológicas como en situaciones patológicas, en las que pueden existir tanto deficiencias como excesos de las hormonas estudiadas. Para ello, analizamos los efectos de los GCs y la VitD sobre la proliferación celular de la línea celular condrocítica C-28/I2. El estudio de la incorporación de timidina-³H al DNA muestra que esta línea celular no responde al tratamiento ni con GC, ni con IGF-I ni con VitD ya que no se observan modificaciones significativas de la proliferación celular.

Sin embargo, Matsumoto et al.¹¹⁰ demostraron en esta línea que el IGF-I estimulaba la proliferación celular [100 ng/ml: 125%, respecto al control (100%), $p < 0.001$]. En nuestro trabajo, el IGF-I 100 ng/ml estimula la proliferación hasta el 115%, aunque sólo se realizaron dos experimentos, pero no se inhibe la proliferación ni con Dx ni con

VitD y, por ello, se decidió continuar el estudio utilizando condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano, que está bien establecido como modelo¹⁰¹.

Cultivos primarios de condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano

Hemos realizado el estudio de la regulación de la proliferación celular y la expresión génica por GCs y por VitD en condrocitos de cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano obtenidos en un primer pase de cultivo con un 10% de SBF. Estos condrocitos mantienen un fenotipo similar a los condrocitos de la zona proliferativa del cartílago de crecimiento y expresan niveles elevados de COL2A1, mientras que los niveles de expresión del COL10A1 son casi indetectables. Los condrocitos se deprivan durante 48h antes de las incubaciones con los diferentes tratamientos.

Regulación por GCs

En este trabajo hemos utilizado concentraciones de Dx desde 10^{-9} M a 10^{-6} M. La concentración de Dx 10^{-9} M corresponde a una concentración de cortisol de $30-50 \times 10^{-9}$ M, concentración similar a la fracción libre de cortisol circulante en sangre. Por ello, consideramos que Dx 10^{-9} M equivale a una concentración fisiológica, aunque desconocemos cuál es la concentración local de cortisol presente en la matriz intercelular del cartílago de crecimiento a la que están expuestos los condrocitos. Existe poca información experimental sobre los efectos de concentraciones bajas de GCs en relación a la regulación del cartílago de crecimiento, aunque se ha demostrado que niños con insuficiencia suprarrenal primaria sin terapia substitutiva con GCs presentan una velocidad de crecimiento baja, como por ejemplo niños afectados de síndrome de Addison. Todavía no ha podido determinarse si la disminución del crecimiento lineal observado en los niños con síndrome de Addison es una consecuencia directa, por disminución de la regulación de determinados genes en el cartílago de crecimiento, o secundaria, debido a alteraciones en reguladores sistémicos que actúan sobre el cartílago de crecimiento.

Los condrocitos del cartílago de crecimiento controlan el crecimiento longitudinal del hueso a través de dos mecanismos distintos pero interconectados: la proliferación celular y la diferenciación a condrocitos hipertróficos, que va acompañada de un

incremento en el diámetro y volumen de las células. Sin estos dos mecanismos, el crecimiento longitudinal del hueso no ocurriría. Numerosas hormonas y factores de crecimiento están implicados en el control de la proliferación y de la diferenciación de los condrocitos.

En el presente trabajo se ha demostrado, mediante el estudio de la incorporación de timidina-³H al DNA, que la Dx inhibe la síntesis de DNA de forma dosis dependiente. Sin embargo, la incubación con dosis bajas de Dx (10^{-9} M) produce un incremento de la síntesis de DNA, sugiriendo que bajas concentraciones de GCs (equivalentes a los niveles circulantes de cortisol en suero) no interfieren en la proliferación celular basal, mientras que concentraciones farmacológicas por encima de 10^{-8} M la inhiben. Este hecho evidencia que la Dx a elevadas concentraciones, al menos en el presente sistema de cultivo, podría actuar como un potente regulador negativo de la condrogénesis.

La inhibición de la proliferación celular *in vitro* ejercida por los GCs ha sido descrita también por otros autores utilizando diferentes tipos celulares tales como condrocitos de rata^{77,85,111,112}, de cerdo¹⁰⁵ y condrocitos humanos postnatales¹¹³.

Así por ejemplo, Jux et al.⁸⁵ demostraron en condrocitos de rata que la Dx inhibía la proliferación celular ya a la concentración de 10^{-12} M (94% respecto al control), siendo esta inhibición dosis dependiente (Dx 10^{-7} M: 80%).

La disminución de la proliferación ejercida por los GCs, puede ser debida a la inhibición de reguladores del ciclo celular¹¹⁴⁻¹¹⁶ o a la estimulación de inhibidores del crecimiento o de las vías de muerte celular¹¹⁷. En el año 2001, Kassel et al.¹¹⁸ demostraron que la Dx estimulaba la expresión de la fosfatasa MKP-1 (*MAP kinase phosphatase-1*) en células mastocíticas de rata, con la consiguiente inactivación de ERK (*erk-related tyrosine kinase*) y disminución de la proliferación, ya que ERK fosforilada pasa al núcleo y activa la maquinaria del ciclo celular. Esta estimulación era dependiente tanto del GCCR como de la síntesis de proteínas y requería de GRE funcionales presentes en la región promotora del gen MKP-1^{118,119}. La estimulación de la fosfatasa MKP-1 por parte de los GCs también ha sido descrita por Engelbrecht et al.¹²⁰ tanto en osteoblastos de ratón como en una línea celular osteoblástica humana.

Otros autores demostraron que la Dx puede ejercer su efecto a través de la regulación de la expresión de genes implicados en el ciclo celular como ciclina D3^{121,122}, c-Myc¹²³ y Cdk4¹²⁴.

Gafni et al.⁸⁰, mediante la administración de Dx (0.5 mg/Kg por día) a conejos en fase de crecimiento, demostraron que la inhibición del crecimiento por parte de los GCs era transitoria e iba seguida de un crecimiento más rápido que el esperado para la edad, dando lugar al efecto de recuperación del crecimiento (“catch-up”). El exceso de GCs disminuía el crecimiento lineal y esta disminución se debía en parte a la disminución de la proliferación de los condrocitos del cartílago de crecimiento.

El MF, esteroide sintético antagonista de GC por unirse al GCCR, no produce un efecto significativo a la concentración de 10^{-6} M sobre la síntesis de DNA en nuestro sistema de cultivo pero revierte la inhibición de la proliferación producida por la Dx 10^{-6} M. Este hecho sugiere que el mecanismo inhibitor del crecimiento por la Dx es GCCR dependiente. Comprobamos, además, que los condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano expresan mRNA de GCCR.

El bloqueo por el MF de la inhibición por la Dx ha sido descrito también por Engelbrecht et al.¹²⁰ en células osteoblásticas tanto humanas como de ratón *in vitro*.

En nuestros experimentos comprobamos que MF 10^{-5} M producía una inhibición total tanto de la proliferación celular como de la expresión génica y como nos interesaba ver el efecto de la concentración 10^{-6} M de Dx los hemos utilizado a concentraciones equimolares.

Hemos observado que, en condrocitos de cartílago epifiseal fetal humano, el IGF-I a la concentración de 100 ng/ml es un potente estimulador de la proliferación celular aunque esta estimulación es variable en células procedentes de distintos fetos. Por otro lado, el tratamiento con IGF-I revierte totalmente la inhibición de la proliferación celular producida por la Dx 10^{-6} M cuando las células se incuban en presencia de ambos.

El IGF-I es un potente factor de crecimiento para el cartílago de crecimiento, ejerciendo sus acciones tanto por mecanismos endocrinos como auto/paracrinos. Es bien conocido tanto en condrocitos de rata^{69,85,125,126} y humanos^{25,113} y en una línea celular condrocítica humana¹¹⁰ como en ratones Knock-out^{52,63,127} que el IGF-I estimula tanto la proliferación como la diferenciación de los condrocitos del cartílago de crecimiento *in vivo* e *in vitro*. El efecto estimulador de la proliferación celular ejercido por el IGF-I también ha sido observado en otros tipos celulares como en células osteoblásticas SaOS-2¹²⁸, células UMR106.06 (línea celular osteoblástica de rata)¹²⁹, células epiteliales

mamarias (MEC)¹³⁰ y células HSC (hepatic stellate cells) de rata¹³¹. Esta estimulación era dosis dependiente en todos los casos.

De acuerdo con nuestros resultados, Jux et al.⁸⁵ y Olney et al.¹¹³ observaron, en condrocitos de rata y cartílago de crecimiento humano respectivamente, que el IGF-I revertía la inhibición de la proliferación producida por la Dx.

Furlanetto et al.¹³² observaron en células MG63 (línea celular humana de osteosarcoma) que el IGF-I estimulaba la división celular modulando los efectos producidos en la fase G₁ del ciclo celular. Demostraron que el IGF-I estimulaba tanto el mRNA como la proteína de ciclina D1. Este incremento se producía en la fase temprana de G₁ que corresponde a la fase del ciclo celular en la que el IGF-I actúa sobre estas células.

En nuestro modelo experimental, la GH de 100 a 1000 ng/ml no tiene un efecto significativo sobre la proliferación y el tratamiento combinado de GH y Dx tiene el mismo efecto que cuando se incuban las células con Dx sola. No hemos estudiado condrocitos de cartílago epifiseal humano de edades postnatales por lo que desconocemos si *in vitro* las células postnatales responden significativamente a la GH en cuanto a la proliferación celular.

Sin embargo, Jux et al.⁸⁵ demostraron en condrocitos de rata que la GH (40 ng/ml) estimulaba la proliferación celular (173%). Además, revertía la inhibición que la Dx producía en estas células. Cuando se añadía un anticuerpo policlonal anti-IGF-I al medio se bloqueaba completamente la estimulación de la síntesis de DNA por parte de la GH, de manera que la síntesis de DNA estimulada por esta hormona se debía al incremento que producía sobre la expresión de IGF-I.

Se ha demostrado en numerosos trabajos que los GCs suprimen el crecimiento modificando la vía GH-IGFs a diferentes niveles. Nuestros resultados demuestran que la Dx ejerce diferentes efectos sobre IGF-I, IGF-II y su proteína de transporte IGFBP3 en cartílago de crecimiento fetal humano. La Dx inhibe significativamente y de forma dosis dependiente la expresión de los genes IGF-I e IGFBP3 mientras que no tiene efecto significativo sobre la expresión de IGF-II. Por otro lado, el tratamiento con IGF-I (100 ng/ml) estimula la expresión tanto de IGF-I como de IGFBP3 pero no revierte la inhibición que sobre la expresión de estos dos genes produce la Dx. El MF solo no produce efecto significativo, sin embargo, a una concentración equimolar a la Dx

reverte parcialmente la inhibición de la expresión de IGFBP3 producida por ella aunque no la de IGF-I.

Los resultados obtenidos sugieren que el IGF-I sería más importante que el IGF-II en cuanto a la regulación del cartílago de crecimiento fetal humano por GCs. Otros autores tampoco detectaron regulación de la expresión de IGF-II por Dx en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal de cerdos neonatos¹⁰⁵, aunque tampoco detectaron regulación de IGF-I debido, posiblemente, a que sus niveles de expresión eran prácticamente indetectables por Northern blot.

Los niveles de proteína de IGF-I e IGFBP3 en el medio de cultivo al final del período de 48h de incubación confirmaron que la concentración de Dx más elevada (10^{-6} M) inhibe su síntesis. Por el contrario, la Dx a baja concentración (10^{-9} M) no inhibe la secreción de proteína IGF-I aunque la expresión génica está disminuida al final de las 48h de incubación, mientras que inhibe tanto la expresión como la síntesis de IGFBP3.

Otros autores han demostrado que tanto los IGFs (IGF-I e IGF-II) como las diferentes IGFBPs están reguladas por GCs. Así se demostró que los GCs inhibían la síntesis del mRNA y de la proteína de IGF-I en células preosteoblásticas HBMSC (*human bone marrow stromal cells*)¹⁴⁴ y la producción local de IGF-I medida por RIA (radioinmunoensayo) en los sobrenadantes de cultivos de condrocitos de cartílago de crecimiento de rata⁸⁵. De la misma manera, Delany et al.¹⁴⁵ observaron en osteoblastos de rata que el cortisol inhibía el mRNA de IGF-I. En otro trabajo, estos autores localizaron, utilizando el mismo tipo celular, la secuencia en el promotor del gen IGF-I regulada por cortisol¹⁴⁶.

Se han realizado numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* para analizar la regulación de las IGFBPs por GCs, aunque los resultados varían en función de la IGFBP estudiada, de los tipos celulares analizados y de las condiciones experimentales. De acuerdo con nuestros resultados, otros autores han demostrado que la Dx inhibe la expresión de IGFBP3 en células de hueso¹⁴⁷, células hepáticas¹⁴⁸, condrocitos articulares¹⁴⁹ y osteoblastos humanos¹⁴⁴, así como también inhibe los niveles de la proteína de IGFBP3 en el medio de cultivo en osteoblastos humanos^{144,147}, de rata¹⁵⁰ y en fibroblastos humanos^{151,152}. Por el contrario, en condrocitos costales de conejo, Koedam et al.¹⁵³ demostraron que la Dx suprimía la expresión de IGFBP5, un mediador de la acción mitogénica de IGF-I, pero estimulaba IGFBP3 al mismo tiempo. El tratamiento de las

células con IGF-I estimulaba IGFBP3 y este incremento era superior si, además, en el medio había Dx, a diferencia de lo observado en nuestros resultados.

La regulación de IGFBP3 por los GCs también ha sido estudiada *in vivo*. La administración de Dx da lugar a un incremento en los niveles séricos de IGFBP3 tanto en rata^{154,155} como en humanos^{156,157}. Las diferencias entre los hallazgos *in vivo* respecto a los *in vitro* podrían ser un reflejo de los efectos amplios que los GCs tienen sobre la secreción de hormonas y la expresión génica en tejidos de animales intactos.

El tratamiento con IGF-I incrementa tanto la expresión como los niveles de proteína de IGFBP3 en condrocitos¹⁵⁸ y hepatocitos¹⁵⁹ de rata y en fibroblastos bovinos^{151,160,161} y humanos^{152,162,163}. Saffery et al.¹⁶⁴ identificaron en el promotor del gen IGFBP3 de rata elementos de respuesta a insulina e IGF-I, pero no se han identificado en humanos. Por otro lado, Conover et al.¹⁵¹ detectaron en fibroblastos bovinos que el tratamiento con Dx no producía efecto sobre el incremento del mRNA de IGFBP3 inducido por el tratamiento con IGF-I, a diferencia de lo observado en nuestro sistema de cultivo en el que el tratamiento combinado con IGF-I y Dx 10^{-6} M inhibe la expresión de IGFBP3 de forma significativa y similar a la inhibición observada cuando se incuban las células con Dx sola.

Los efectos de los GCs en los condrocitos de cartílago de crecimiento son globalmente opuestos a los efectos de IGF-I, sugiriendo que algunas de las acciones de los GCs pueden estar mediadas por la inhibición de la expresión del gen IGF-I por parte de los GCs. Este hecho podría explicar el rescate de la proliferación celular cuando se añade IGF-I al medio de células tratadas con Dx. Sin embargo, la inhibición de la expresión de los genes IGF-I e IGFBP3 por la Dx sería más potente que la estimulación de la expresión de estos dos genes por IGF-I; esto explicaría que el IGF-I no rescate la inhibición de la expresión de IGF-I y de IGFBP3 producida por Dx. La Dx directamente podría inhibir la transcripción génica vía GCCR, al unirse a un elemento GRE específico de las regiones promotoras de los genes regulados por GCs, mientras que el IGF-I estimularía la expresión génica a través de mecanismos indirectos.

El IGF-IR es un receptor tirosin-quinasa que juega un papel importante en la señalización celular y la proliferación. Su principal ligando es el IGF-I aunque también se une, con menor afinidad, a IGF-II. Para comprobar los efectos de los GCs sobre la vía de señalización del IGF-I estudiamos la regulación de la expresión de su receptor.

Nuestros resultados demuestran que la Dx estimula de forma dosis dependiente la expresión de IGF-IR, mientras que el tratamiento con IGF-I (100 ng/ml) produce el efecto opuesto. El incremento de la expresión de IGF-IR por la Dx también había sido observado por Smink et al.¹⁰⁵ en cartílago de crecimiento epifiseal de cerdos neonatos. Este incremento había sido descrito previamente *in vivo*¹⁵⁴ y podría contrarrestar el retraso de crecimiento inducido por los GCs, aunque esta respuesta sería insuficiente para compensar la inhibición del crecimiento observada.

Yamamoto et al.¹⁶⁵, utilizando células GC de pituitaria de rata, demostraron que el tratamiento con IGF-I provocaba la translocación de IGF-IR de la superficie celular al *pool* intracelular y que este efecto era reversible. Sin embargo, no detectaron disminución de los niveles de IGF-IR mRNA, mientras que nuestros resultados demuestran que la incubación de condrocitos fetales con IGF-I durante 48h inhibe la expresión de IGF-IR hasta el 50%. El conjunto de estos resultados sugiere que existe una regulación inversa entre la expresión de IGF-I y la de su receptor IGF-IR.

Uno de los objetivos de este trabajo consistía en el estudio de los efectos de la GH sobre la regulación observada por los GCs. La GH ejerce su efecto a través de su receptor, GHR, el cual estimula muchas de las vías de señalización de la GH produciendo diferentes respuestas celulares. Como ya se ha comentado en la Introducción, defectos en el gen GHR producen un retraso de crecimiento. Por todo ello, estudiamos la regulación de la expresión del gen GHR por Dx y observamos, en condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano, una respuesta bifásica de la expresión de GHR en función de la dosis: bajas concentraciones de Dx (10^{-9} y 10^{-8} M) estimulan la expresión de GHR mientras que dosis altas producen el efecto contrario. Esta respuesta bifásica en función de la concentración de Dx también ha sido observada por Heinrichs et al.⁸⁴, que demostraron que dosis bajas de Dx incrementaban los niveles del mRNA de GHR en hígado y cartílago de crecimiento de conejo pero no dosis elevadas, o en otros tejidos como riñón, y por Jux et al.⁸⁵, en cultivos primarios de condrocitos de cartílago de crecimiento de rata, sugiriendo que concentraciones fisiológicas de GCs eran necesarias para el mantenimiento de la expresión basal de GHR. La inhibición de la expresión de GHR por GCs también ha sido descrita en cultivos de fibroblastos^{166,167}.

Nuestros resultados sugieren que la disminución del número de GHR podría ser un mecanismo potencial para los efectos inhibidores del crecimiento producidos por los GCs como antagonismo a la acción de la GH.

La diferenciación fenotípica y funcional de los condrocitos de las diferentes zonas del cartílago está regulada, entre otros factores, por el factor de transcripción SOX9, el cual a su vez regula la expresión de COL2A1 y aggrecan. En nuestro sistema de cultivo, la Dx inhibe la expresión de SOX9, COL2A1 y aggrecan de forma concentración dependiente. El MF no tiene un efecto significativo sobre la expresión de ninguno de estos tres genes pero revierte completamente la inhibición que sobre ellos produce la Dx, hecho que sugiere que esta inhibición es GCCR dependiente. Por otro lado, el tratamiento con IGF-I (100 ng/ml) estimula la expresión de SOX9, COL2A1 y aggrecan pero no revierte la inhibición que la Dx produce sobre la expresión de SOX9.

SOX9 es un factor de transcripción requerido para la expresión de genes específicos de cartílago, como COL2A1 y aggrecan¹² y se ha demostrado que se une a un *enhancer* específico, activándolo, tanto del gen COL2A1¹⁶⁸ como del aggrecan¹⁶⁹, de manera que el efecto inhibitorio de la Dx sobre la expresión de estos dos genes podría ser un mecanismo indirecto a través de la inhibición de la expresión de SOX9. A diferencia de nuestros resultados, Sekiya et al.¹⁷⁰ demostraron que la Dx estimulaba la expresión de SOX9 en condrocitos de rata.

COMP es una de las principales proteínas del cartílago no colágeno y se ha demostrado que mutaciones en este gen dan lugar a displasias esqueléticas^{171,172}. Los efectos que la Dx y el IGF-I (100 ng/ml) producen sobre la expresión de COMP son opuestos a los efectos observados sobre la expresión de COL2A1 y de aggrecan: la Dx estimula su expresión, mientras que el tratamiento con IGF-I la inhibe. Nuestros resultados demuestran que, en condiciones de inhibición de la proliferación por GCs, los condrocitos expresan niveles bajos de COL2A1 y aggrecan, mientras que la expresión de COMP está incrementada. Por el contrario, la expresión de COMP es baja cuando la proliferación está estimulada. De acuerdo con nuestros resultados, otros autores demostraron que la expresión de COMP era baja en la zona proliferativa del cartílago de crecimiento mientras que el cese de la proliferación coincidía con su máxima expresión¹⁷³.

En las condiciones experimentales utilizadas, el tratamiento de las células con GH a 500 ng/ml no tiene efecto significativo sobre la expresión de los genes analizados. La presencia en el medio de GH no modifica el efecto que la Dx a 10^{-9} M o a 10^{-6} M provoca sobre la expresión génica. Desconocemos si esta falta de respuesta es debida a que los condrocitos fetales carecen de algún elemento necesario para dicha respuesta o a las condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, otros autores han observado efecto de la GH sobre el crecimiento y la expresión de los genes del eje GH-IGFs. Así *in vivo*, el retraso de crecimiento inducido por los GCs en ratas sanas y urémicas quedaba completamente compensado al tratarlas con GH¹⁷⁴. Además, en niños con trasplante renal tratados con GCs y con función renal casi normal, el retraso de crecimiento que presentaban mejoraba al realizar tratamiento combinado con rhGH¹⁷⁵.

Luo y Murphy¹⁰⁴ demostraron en ratas hipofisectomizadas y en ratas intactas que el tratamiento con Dx antes de la inyección de GH reducía la estimulación del mRNA de IGF-I que la GH producía en hígado y tibia proximal. Se necesitaban dosis más elevadas de Dx para reducir el mRNA de IGF-I en otros tejidos y para disminuir la concentración de IGF-I sérico inducido por la GH.

In vitro, Jux et al.⁸⁵ observaron en condrocitos de rata que la GH incrementaba el mRNA de GHR y la concentración de IGF-I en el medio. Al incubar conjuntamente GH y Dx se antagonizaba de forma dosis dependiente la inhibición de la síntesis de DNA producida por los GCs, a diferencia de lo observado en nuestros resultados, y se reducía el incremento que la GH producía sobre la expresión de GHR. En cuanto a la concentración de IGF-I en el medio, la GH incrementaba los niveles en presencia de bajas concentraciones de Dx respecto a la incubación con Dx sola.

King et al.¹⁶⁷ observaron en fibroblastos 3T3-F442A que la GH estimulaba la fosforilación de ERK1 y 2 y que, si las células habían sido pretratadas con Dx 10^{-7} M durante 24h, se producía una reducción de la estimulación de esta fosforilación. Este hecho concordaría con el efecto de la Dx sobre la expresión de GHR anteriormente descrito e indicaría que los efectos inhibitorios del crecimiento por los GCs pueden ser debidos, en parte, al antagonismo ejercido sobre las acciones de GH.

En resumen podemos afirmar que, en condrocitos epifisiales fetales humanos, la Dx regula la expresión de genes del eje GH-IGFs (IGF-I, IGFBP3, IGF-IR, GHR) así como la expresión de SOX9 y genes de matriz extracelular (COL2A1, aggrecan, COMP). Nuestro trabajo muestra los diferentes efectos que la Dx produce sobre la proliferación

celular y la expresión de los genes analizados. Concentraciones elevadas de Dx, similares a las dosis utilizadas en tratamientos crónicos con GCs, producen inhibición de la proliferación celular y cambios en el patrón de expresión de los genes estudiados, sugiriendo que estos genes podrían participar en los efectos inhibidores del crecimiento producidos por los GCs. También se ha demostrado que el IGF-I es el IGF regulado por GCs mientras que la expresión de IGF-II no se ve afectada por el tratamiento con Dx, aún siendo el IGF más expresado por estas células.

Regulación por VitD

Hemos utilizado concentraciones de VitD desde 10^{-11} M a 10^{-6} M. La concentración de VitD medida en el SBF utilizado al 10% en los medios de cultivo es de $2,3 \times 10^{-11}$ M mientras que la concentración de VitD en el suero humano es de $1,4 \times 10^{-10}$ M. De esta VitD, el 85% circula en sangre ligada a VDBG, el 0,4% circula libre mientras que el resto lo hace unido a la albúmina. De manera que la concentración libre de VitD en suero humano equivale a $0,6 \times 10^{-12}$ M. La concentración más baja de VitD utilizada en este trabajo es 2 veces superior a la concentración fisiológica libre, aunque desconocemos cual es la concentración local de VitD presente en la matriz intercelular del cartílago de crecimiento a la que están expuestos los condrocitos.

La VitD inhibe la proliferación celular de condrocitos fetales humanos de forma concentración dependiente siendo esta inhibición significativa a partir de la concentración de 10^{-10} M. La presencia de IGF-I revierte la inhibición que la VitD a 10^{-6} M produce sobre la proliferación celular. La incubación simultánea con Dx 10^{-6} M y VitD 10^{-6} M provoca una fuerte inhibición de la proliferación celular, equivalente a la que se observa con la VitD sola. El tratamiento combinado con GH y VitD produce el mismo efecto que cuando se incuban las células con VitD sola.

La inhibición de la proliferación celular por la VitD o por análogos de VitD ha sido observada en diferentes tipos celulares, tales como condrocitos de cartílago de crecimiento de rata¹³³, células epiteliales de próstata¹³⁴, células de carcinoma humano de cuello y cabeza¹³⁵, células HT-29 (células de adenocarcinoma de colon humano que contienen VDR y segregan IGF-II pero no IGF-I)¹³⁶ y células MCF-7¹³⁷. Sprenger et al.¹³⁴ utilizaron células PECs (*benign human prostate epithelial cells*) y P153 (*SV40-T immortalized prostate epithelial cell line*) y demostraron que el IGF-I estimulaba la

proliferación celular de forma dosis dependiente (1, 10, 100 ng/ml) mientras que la VitD 10^{-8} M la inhibía y que, de acuerdo con nuestros resultados, en combinación el IGF-I revertía la inhibición producida por la VitD. Hager et al.¹³⁵ observaron que, en células de carcinoma humano, la inhibición que la VitD producía sobre la proliferación celular se debía a que las células se detenían en la fase G_0/G_1 del ciclo celular. Utilizando una concentración de VitD de 10^{-7} M observaron una estimulación de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27 y ningún efecto sobre la expresión de ciclina D1, ciclina estimulada por el IGF-I¹³². De la misma manera, Moffatt et al.¹³⁸ demostraron en células prostáticas de carcinoma LNCaP y ALVA-31 que la VitD estimulaba tanto el mRNA como la proteína p21 y que después de tratar las células LNCaP durante 24h y 72h con VitD 10^{-8} M se observaba un incremento en la acumulación de las células en G_0/G_1 hasta el 78-80%. De acuerdo con este hecho, Jensen et al.¹³⁷ también observaron que la incubación con VitD producía un incremento significativo de la población celular en G_1 que se correlacionaba con una disminución de la proporción de células en fase S. El incremento que la VitD produce sobre la proteína p21 es el responsable del entrecimamiento gradual del ciclo celular y/o la acumulación de las células en G_0/G_1 . Sin embargo, existe controversia sobre si la acción de la VitD sobre p21 es a través de un mecanismo directo o indirecto^{139,140}. Aunque Liu et al.¹⁴¹ demostraron que la VitD actuaba directamente sobre la expresión de p21 a través de un elemento de respuesta VDRE funcional en el promotor del gen p21 en células leucémicas U937, Peng et al.¹⁴² no observaron un efecto directo en células LNCaP sino que demostraron que la estimulación de la expresión de p21 por VitD se inhibía al inmunoprecipitar IGFBP3, sugiriendo que la inducción de p21 estaría mediada por IGFBP3 e indirectamente por VitD¹³⁹. Este efecto indirecto fue demostrado también por Eelen et al.¹⁴⁰ en células óseas y en queratinocitos de rata.

Si bien en la mayoría de trabajos publicados la VitD inhibe la proliferación celular, Krohn et al.¹⁴³ demostraron en cultivos de condrocitos de rata que la VitD estimulaba la síntesis de DNA y la proliferación celular aunque utilizaron dosis muy bajas de VitD (10^{-12} M) y observaron que, al incubar con un anticuerpo policlonal anti-IGF-I, se bloqueaba el incremento de la síntesis de DNA por parte de la VitD, de manera que este incremento era dependiente del IGF-I.

Así como el cartílago de crecimiento ha sido descrito como uno de los tejidos diana para la VitD, sus efectos reguladores de la expresión de los genes del eje GH-IGFs, del

factor de transcripción SOX9 y de las proteínas de la matriz COL2A1, aggrecan y COMP han sido escasamente descritos en el cartílago de crecimiento humano.

Nuestros resultados demuestran que la VitD estimula de forma concentración dependiente la expresión de los genes IGF-I e IGFBP3 en cartílago de crecimiento fetal humano, mientras que no tiene un efecto significativo sobre la expresión de IGF-II. La estimulación de la expresión de IGF-I no es estadísticamente significativa debido a que existe un rango amplio de variación entre los diferentes experimentos, aunque la estimulación está presente en todos ellos. Los resultados obtenidos sugieren que el IGF-I podría ser más importante que el IGF-II para la regulación del cartílago de crecimiento fetal por la VitD.

El efecto estimulador de la VitD sobre la secreción de IGF-I ya había sido observado *in vitro* en condrocitos de rata¹⁴³ y osteoblastos humanos¹⁷⁶, mientras que otros autores demostraron el efecto contrario (la VitD inhibía la secreción de IGF-I en osteoblastos de ratón^{177,178}). Otros autores observaron que ni la producción de IGF-I^{179,180} ni la de IGF-II¹⁸⁰ estaba afectada por el tratamiento con VitD en osteoblastos murinos y en células HBMSC, respectivamente. Los resultados de estos estudios sugieren que el efecto de la VitD sobre la síntesis y secreción de IGF-I pueden ser divergentes, probablemente dependiendo de los diferentes tipos celulares, de las condiciones de cultivo y del estado de diferenciación de las células, y que puede existir, además, un regulación diferencial de la VitD sobre IGF-I e IGF-II.

La VitD estimula la expresión de IGF-I de forma concentración dependiente pero también estimula la expresión de inhibidores del ciclo celular; se puede emitir la hipótesis de que a muy bajas concentraciones puede no inhibirse la proliferación sino incluso estimularse pero que a concentraciones crecientes, pese a estimular la expresión y la síntesis de IGF-I, predomina el efecto de inhibición de la proliferación como consecuencia de la estimulación de inhibidores del ciclo celular.

Existen numerosos estudios sobre la regulación de los IGFbps por VitD. Se ha demostrado que las acciones antiproliferativas de la VitD en células LNCaP de cáncer de próstata humano podrían estar mediadas, al menos en parte, por la inducción de IGFBP3^{134,142}, y que tanto la inmunoneutralización de IGFBP3 como el tratamiento con anticuerpos y antisentidos específicos, que inhiben su síntesis, anulaban las acciones inhibitorias del crecimiento producidas por la VitD¹³⁹. La inducción de IGFBP3 por

VitD podría ser directa a través de la interacción de VDR con un VDRE putativo localizado en posición -3296/-3282 del gen IGFBP3 humano¹⁴². Otros autores han demostrado además en células HBSMC que la VitD incrementaba los niveles de mRNA de IGFBP2, IGFBP3 e IGFBP4¹⁸⁰ así como también estimulaba la secreción de IGFBPs (mediante análisis de Western blot). El incremento tanto de la expresión como de la secreción de IGFBP3 también ha sido descrito en osteoblastos humanos^{181,182}. Dados los efectos inhibitorios de las IGFBPs sobre la acción de los IGFs en células óseas, los efectos de la VitD podrían estar mediados, al menos en parte, por el incremento que ésta produce sobre la producción de IGFBPs.

Si la inhibición de la proliferación celular por la VitD en nuestro sistema de cultivo está mediada directa o indirectamente por el incremento en la secreción de IGFBP3 no está demostrado. La observación de que tanto la expresión de IGFBP3 como la de IGF-I incrementan en paralelo bajo tratamiento con VitD parecería descartar esta hipótesis (la estimulación de la expresión de IGF-I es 4 veces superior a la de la expresión de IGFBP3). La secreción de IGFBP3 por condrocitos epifisiales fetales humanos es superior a la de otros tipos celulares como fibroblastos fetales humanos o la línea osteoblástica SAOS-2, y los niveles de proteína IGFBP3 en el medio de cultivo en condiciones de estimulación por VitD son del orden de $0,4 \times 10^{-8}$ M y a esta concentración de IGFBP3 se ha demostrado que la IGFBP3 recombinante inhibe la incorporación de timidina-³H al DNA. Sin embargo, concentraciones altas de IGF-I (100 ng/ml) son capaces de recuperar la inhibición producida por la VitD, hecho demostrado en nuestros resultados, mientras que concentraciones bajas (1 ng/ml) no lo consiguen¹³⁴.

Nuestros resultados demuestran que la VitD tiene un efecto variable sobre la expresión de IGF-IR aunque se observa una tendencia a la estimulación, siendo ésta significativa sólo a la concentración de VitD 10^{-6} M. El incremento en la expresión de IGF-IR podría explicar el efecto observado sobre la expresión de IGFBP3 al incubar las células con IGF-I y VitD 10^{-6} M simultáneamente: la estimulación de IGFBP3 es superior a la observada al incubar las células sólo con IGF-I o con VitD.

De acuerdo con nuestros resultados, Krohn et al.¹⁴³ y Kurose et al.¹⁷⁹ demostraron, en condrocitos epifisiales de ratas macho jóvenes y condrocitos murinos respectivamente, que la VitD estimulaba significativamente la expresión de IGF-IR.

Los mecanismos implicados en los efectos de la GH y del IGF-I en el hueso son, hasta el momento, poco claros, aunque se ha sugerido que el STAT5 podría mediar parte de los efectos sobre el crecimiento óseo^{183,184}. Morales et al.¹⁸⁵ investigaron si la VitD tenía influencia sobre la vía JAK2/STAT5 de la GH en células UMR106. Demostraron que la VitD prolongaba esta vía y que el pretratamiento de las células con VitD podía ser necesario para detectar la respuesta transcripcional de STAT5 inducida por GH. Además, el pretratamiento de las células con VitD recuperaba la capacidad de estas células para responder a estimulaciones repetitivas de GH y esto concordaría con nuestros resultados, que demuestran que la VitD estimula la expresión de GHR a concentraciones superiores a 10^{-8} M en condrocitos de cartílago de crecimiento fetal humano.

La VitD, a concentraciones superiores a 10^{-11} M, inhibe la expresión de SOX9, COL2A1 y aggrecan, mientras que estimula la expresión de COMP a partir de 10^{-8} M. El efecto del IGF-I (100 ng/ml) es el contrario, ya que estimula la expresión de SOX9, COL2A1 y aggrecan e inhibe la de COMP. El IGF-I no puede revertir la inhibición que la VitD 10^{-6} M produce sobre la expresión de SOX9 mientras que sí revierte la inhibición producida sobre la expresión de COL2A1 y aggrecan. Como ya se ha mencionado anteriormente, SOX9 es un factor de transcripción necesario para la expresión de genes específicos de cartílago como son COL2A1 y aggrecan¹², de manera que los efectos inhibitorios de la VitD sobre la expresión de COL2A1 y aggrecan podrían ser indirectos a través de la inhibición de la expresión de SOX9. De acuerdo con nuestros resultados, Horton et al.¹⁸⁶ demostraron, mediante Northern blot en una línea celular de condrocitos inmortalizados, que la VitD inhibía la expresión de aggrecan (a 10^{-8} M producía una disminución del 90% del mRNA de aggrecan).

Podemos resumir que la VitD es un potente inhibidor de la proliferación celular de condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano y que inhibe la expresión de genes relacionados con el fenotipo condrocítico (COL2A1, aggrecan). Además estimula la expresión de genes del eje GH-IGFs tales como IGF-I, IGFBP3, IGF-IR y GHR y también la expresión de COMP, gen relacionado con un fenotipo más diferenciado. Mientras que la estimulación de la expresión de IGFBP3 que produce la VitD ha sido propuesta como uno de los mediadores de la inhibición de la proliferación celular, nuestros resultados demuestran que se produce un incremento mayor en la expresión de

IGF-I, el cual, sin embargo, no contrarresta el efecto inhibitorio de la proliferación. Nuestros resultados sugieren que la regulación de la VitD sobre el cartílago de crecimiento podría consistir en un incremento en la diferenciación celular y un condicionamiento de las células hacia un fenotipo más sensible a la acción de otras hormonas, como la GH.

Regulación por GCs, VitD y GH

Ya que habíamos observado que tanto los GCs como la VitD producían efectos sobre la proliferación y la expresión génica en condrocitos de cartílago de crecimiento fetal humano, algunos concordantes y otros divergentes, nos pareció interesante estudiar el efecto que ambos tratamientos producían conjuntamente y analizar si la GH tenía algún efecto al ser añadida a Dx y VitD.

Hemos demostrado que tanto Dx como VitD inhiben significativamente la proliferación celular de condrocitos procedentes de cartílago epifiseal fetal humano. La combinación de ambos tratamientos tiene el mismo efecto y la GH no revierte la inhibición producida por Dx y/o VitD.

En nuestro sistema de cultivo, la Dx y la VitD producen el efecto contrario sobre la expresión de IGF-I e IGFBP3: mientras que la Dx inhibe la expresión de estos genes, la VitD los estimula. Al combinar ambos tratamientos (Dx 10^{-6} M y VitD 10^{-6} M), la VitD revierte totalmente la inhibición que la Dx produce sobre la expresión de IGF-I pero no la producida sobre IGFBP3. De manera que, bajo este tratamiento combinado con Dx y VitD, la expresión de IGF-I está estimulada, aunque este estímulo no es significativo debido a la variación interexperimental existente, y la expresión de IGFBP3 está inhibida de forma significativa. En cuanto a la expresión de IGF-I podemos afirmar que predomina el efecto de la VitD por encima del efecto de la Dx, mientras que en cuanto a la expresión de IGFBP3 predomina el efecto de la Dx.

Se puede pensar que, *in vivo*, la presencia de concentraciones adecuadas de VitD son favorables para el crecimiento normal para contrarrestar el efecto negativo de tratamientos como GCs, no sólo por la recuperación de la expresión de IGF-I sino además por la no recuperación de la expresión de IGFBP3.

La GH no limita la inhibición que la Dx produce sobre la expresión de IGF-I pero si en el medio de cultivo hay VitD a una concentración de 10^{-8} o superior, no sólo se revierte la inhibición sino que se produce estimulación de la expresión de IGF-I (aunque

no es significativa debido a la variación interexperimental). Por el contrario, la GH no limita la inhibición que la combinación de Dx y VitD producen sobre la expresión de IGFBP3.

Aunque la expresión de IGF-II no varía ni con Dx, ni con VitD ni con GH existe una tendencia a la estimulación cuando se incuban conjuntamente.

Tanto Dx como VitD estimulan la expresión de IGF-IR, y en combinación producen el mismo efecto. En cuanto a la expresión de GHR, el efecto observado es similar al observado sobre IGF-I: la Dx inhibe su expresión mientras que la VitD la estimula. Al combinar ambos tratamientos, la VitD revierte la inhibición producida por la Dx. Así como la GH revierte la inhibición producida por la Dx 10^{-6} M si en el medio además hay VitD no sólo se revierte la inhibición sino que se observa una estimulación aunque no es significativa por la variabilidad interexperimental existente.

En cuanto a SOX9, COL2A1 y aggrecan, el tratamiento con Dx o con VitD inhiben su expresión y la combinación de ambos tratamientos produce el mismo efecto. La GH incubada con Dx y/o con VitD no revierte la inhibición que Dx y VitD producen sobre la expresión de estos genes. Tanto Dx como VitD estimulan la expresión de COMP y, en combinación, existe una potenciación de esta estimulación, aunque no es significativa debido a la variación interexperimental. El tratamiento de la células con GH, Dx y VitD también potencia el estímulo de la expresión de este gen producido por Dx y por VitD. En resumen, los GCs y la VitD estimulan la expresión de genes que condicionan un fenotipo más diferenciado como COMP, mientras que inhiben la expresión de genes característicos de un fenotipo proliferativo como SOX9, COL2A1 y aggrecan.

Nuestros resultados sugieren que, en tratamientos crónicos con GCs que provocan un retraso de crecimiento, el mantenimiento de niveles óptimos de VitD puede contribuir a mejorar la respuesta al tratamiento con GH.

6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que los genes del eje GH-IGFs (IGF-I, IGFBP3, IGF-II, IGF-IR y GHR), del factor de transcripción SOX9 así como de las proteínas de la matriz COL2A1, aggrecan y COMP se expresan en condrocitos de cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano. Los GCs y la VitD regulan la proliferación celular y la expresión de los genes estudiados. El IGF-I y la GH modulan parte de los efectos de los GCs y de la VitD sobre la proliferación celular y la expresión génica.

- Concentraciones bajas de Dx (10^{-9} M) no interfieren en la proliferación de los condrocitos mientras que a partir de 10^{-7} M inhiben la proliferación celular de forma significativa y concentración dependiente. El MF revierte la inhibición de la proliferación celular producida por la Dx 10^{-6} M. La Dx inhibe la expresión de los genes del eje GH-IGFs (IGF-I, IGFBP3, GHR), del factor de transcripción SOX9 y de las proteínas de matriz COL2A1 y aggrecan mientras que estimula la expresión de IGF-IR y COMP. El MF revierte la inhibición que la Dx produce sobre la expresión de GHR, SOX9, COL2A1 y aggrecan pero no la inhibición de la expresión de IGF-I y de IGFBP3. La síntesis de las proteínas IGF-I e IGFBP3 está inhibida por Dx 10^{-6} de forma paralela a la inhibición de la expresión génica.
- La VitD inhibe la proliferación celular de forma significativa y concentración dependiente a partir de 10^{-10} M. La VitD estimula la expresión de los genes del eje GH-IGFs (IGF-I, IGFBP3, IGF-IR y GHR) y de la proteína de matriz COMP mientras que inhibe la expresión del factor de transcripción SOX9 y de las proteínas de matriz COL2A1 y aggrecan. La síntesis de las proteínas IGF-I e IGFBP3 está estimulada por VitD de forma paralela a la estimulación de la expresión génica.
- La expresión de IGF-II no se regula significativamente ni por GCs ni por VitD. El IGF-I, y no el IGF-II, es el gen regulado por GCs y VitD en condrocitos de cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano.
- El IGF-I es un potente estimulador de la proliferación celular de condrocitos de cartílago epifiseal fetal humano. El IGF-I estimula la expresión de su propio gen, de su transportador IGFBP3, del factor de transcripción SOX9 y de las

proteínas de matriz COL2A1 y aggrecan mientras que inhibe la expresión de IGF-IR y de COMP.

- El IGF-I revierte la inhibición de la proliferación celular producida por la Dx y por la VitD. El IGF-I revierte la inhibición que la Dx produce sobre la expresión de las proteínas de la matriz COL2A1 y aggrecan pero no la producida sobre la expresión de IGF-I, IGFBP3 y del factor de transcripción SOX9. La expresión de IGFBP3 está incrementada cuando se incuban los condrocitos con IGF-I y VitD respecto a la incubación con IGF-I o con VitD solos. El IGF-I no revierte la inhibición que la VitD produce sobre la expresión de SOX9 pero sí la producida sobre la expresión de COL2A1 y aggrecan.
- La GH no tiene efecto significativo sobre la proliferación celular ni sobre la expresión génica en condrocitos de cartílago de crecimiento epifiseal fetal humano en las condiciones experimentales utilizadas.
- La presencia de GH en el medio de cultivo que contiene además VitD incrementa la expresión de IGF-I y GHR respecto a las células tratadas con VitD sola. El tratamiento conjunto con Dx, GH y VitD revierte la inhibición que la Dx produce sobre la expresión de IGF-I y GHR.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine Rev* (2003) 24:782-801.
- ² Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, Baron J. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* (2002) 143:1851-1857.
- ³ Farnum CE, Wilsman NJ. Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *Anat Rec* (1987) 219:221-232.
- ⁴ Gibson G. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech* (1998) 43:191-204.
- ⁵ Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr Rev* (1999) 20:156-188.
- ⁶ Lin R, Amizuka N, Sasaki T, Aarts MM, Ozawa H, Goltzman D, Henderson JE, White JH. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9. *J Bone Miner Res* (2002) 17:1604-1612.
- ⁷ Iannotti JP. Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin North Am* (1990) 21:1-17.
- ⁸ Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98:6698-6703.
- ⁹ Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage* (2001) 9:S69-S75.
- ¹⁰ Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* (2004) 18:952-963.
- ¹¹ Zhao Q, Eberspacher H, Lefebvre V, De Crombrughe B. Parallel expression of SOX9 and COL2A1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* (1997) 209:377-386.

- ¹² de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* (2000) 19:389-394.
- ¹³ Rodan G, Harada S. The missing bone. *Cell* (1997) 89:677-680.
- ¹⁴ Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* (1997) 89:755-764.
- ¹⁵ Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* (1997) 89:747-754.
- ¹⁶ Komori T. A fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 276:813-816.
- ¹⁷ Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of *Cbfa1* in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues *Cbfa1*-deficient mice. *Genes Dev* (2001) 15:467-481.
- ¹⁸ Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T. Skeletal malformations caused by overexpression of *Cbfa1* or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* (2001) 153:87-100.
- ¹⁹ Porte D, Tuckermann J, Becker M, Baumann B, Teurich S, Higgings T, Owen MJ, Schorpp-Kistner M, Angel P. Both AP-1 and *Cbfa1*-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. *Oncogene* (1999) 18:667-678.
- ²⁰ Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. Collagenase 3 is a target of *Cbfa1*, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* (1999) 19:4431-4442.
- ²¹ Alvarez J, Costales L, Serra R, Balbin M, Lopez JM. Expression patterns of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor during epiphyseal ossification. *J Bone Miner Res* (2005) 20:1011-1021.
- ²² Carrascosa A, Audí L, Ferrández MA, Ballabriga A. Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* (1990) 70:134-140.

- ²³ Carrascosa A, Ferrández MA, Audí L, Ballabriga A. Effects of triiodothyronine (T3) and identification of specific nuclear T3-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* (1992) 75:140-144.
- ²⁴ Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine rev* (1994) 15:275-300.
- ²⁵ Carrascosa A, Audí L. Human studies on the biological effects of IGF-I. Evidence suggesting that fetal and postnatal epiphyseal cartilage is a target tissue for IGF-I action. *J Pediatr Endocrinol* (1993) 6:257-261.
- ²⁶ Frenz DA, Liu W, Williams JD, Hatcher V, Galinovic-Schwartz V, Flanders KC, Van de Water TR. Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Development* (1994) 120:415-424.
- ²⁷ Jingushi S, Scully SP, Joyce ME, Sugioka Y, Bolander NE. Transforming growth factor- β 1 and fibroblast growth factors in rat growth plate. *J Orthop Res* (1995) 13:761-768.
- ²⁸ Kaplan FS, Shore EM. Bone morphogenetic proteins and c-fos: early signals in endochondral bone formation. *Bone* (1996) 19:S13-S21.
- ²⁹ Rudnicki JA, Brown AM. Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro. *Dev Biol* (1997) 185:104-118.
- ³⁰ Buckland RA, Collison JM, Graham E, Davidson DR, Hill RE. Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud. *Mech Dev* (1998) 71:143-150.
- ³¹ Feldman D, Malloy PJ, Gross C. Vitamin D: metabolism and action. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic press (1996) 205-236.
- ³² Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* (1996) 335:1363-1367.
- ³³ Root AW, Root MJ. Clinical pharmacology of human growth hormone and its secretagogues. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord* (2002) 2:27-52.
- ³⁴ Baldelli R, Otero XL, Camina JP, Gualillo O, Popovic V, Dieguez C, Casanueva FF. Growth hormone secretagogues as diagnostic tools in disease states. *Endocrine* (2001) 14:95-99.

- ³⁵ Veldhuis JD. Neuroendocrine control of pulsatile growth hormone release in the human: relationship with gender. *Growth Horm IGF Res* (1998) 8:49-59.
- ³⁶ Daughaday WH. Pituitary gigantism. *Endocrinol Metab Clin North Am* (1992) 21:633-647.
- ³⁷ Wit JM, Drayer NM, Jansen M, Walenkamp MJ, Hackeng WH, Thijssen JH, Van den Brande JL. Total deficiency of growth hormone and prolactin, and partial deficiency of thyroid stimulating hormone in two Dutch families: a new variant of hereditary pituitary deficiency. *Horm Res* (1989) 32:170-177.
- ³⁸ Pfaffle RW, Parks JS, Brown MR, Heimann G. Pit-1 and pituitary function. *J Pediatr Endocrinol* (1993) 6:229-233.
- ³⁹ Rosenfeld R, Allen DB, MacGillivray MH, Alter C, Saenger P, Anhalt H, Hintz R, Katz HP. Growth hormone use in pediatric growth hormone deficiency and other pediatric growth disorders. *Am J Manag Care* (2000) 6:S805-S816.
- ⁴⁰ Savage MO, Burren CO, Blair JC, Woods KA, Metherell L, Clark AJ, Camacho-Hubner C. Growth hormone insensitivity: pathophysiology, diagnosis, clinical variation and future perspectives. *Horm Res* (2001) 55:32-35.
- ⁴¹ DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* (1991) 64:849-859.
- ⁴² Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EF, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r) *Cell* (1993) 75:59-72.
- ⁴³ LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr rev* (2001) 22:53-74.
- ⁴⁴ Salmon WD Jr, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. 1956. *J Lab Clin Med* (1990) 116:408-419.
- ⁴⁵ Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* (1982) 216:1237-1239.
- ⁴⁶ Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation* (1985) 29:195-198.
- ⁴⁷ Zezulak KM, Green H. The generation of insulin-like growth factor-1 sensitive cells by growth hormone action. *Science* (1986) 233:551-553.

- ⁴⁸ Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89:9826-9830.
- ⁴⁹ Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev* (1987) 8:426-438.
- ⁵⁰ Barnard R, Haynes KM, Werther GA, Waters MJ. The ontogeny of growth hormone receptors in the rabbit tibia. *Endocrinology* (1988) 122:2562-2569.
- ⁵¹ Werther GA, Haynes K, Edmonson S, Oakes S, Buchanan CJ, Herington AC, Waters MJ. Identification of growth hormone receptors on human growth plate chondrocytes. *Acta Paediatr* (1993) 391:50-53.
- ⁵² Wang J, Zhou J, Bondy CA. IGF1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J* (1999) 13:1985-1990.
- ⁵³ Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes dev* (1993) 7:2609-2617.
- ⁵⁴ Liu JL, LeRoith D. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology* (1999) 140:5178-5184.
- ⁵⁵ Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coshigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94:13215-13220.
- ⁵⁶ Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol* (2001) 229:141-162.
- ⁵⁷ Mohan S, Richman C, Guo R, Amaar Y, Donahue LR, Wergedal J, Bayling DJ. Insulin-like growth factor regulates peak bone mineral density in mice by both growth hormone-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology* (2003) 144:929-936.
- ⁵⁸ Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96:7324-7329.

- ⁵⁹ Yakar S, Liu JL, Le Roith D. The growth hormone/insulin-like growth factor-I system: implications for organ growth and development. *Pediatr Nephrol* (2000) 14:544-549.
- ⁶⁰ Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Tornell J, Isaksson OG, Jansson JO, Ohlsson C. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96:7088-7092.
- ⁶¹ Butler AA, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *ifg1* and *igflr* genes and their role in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* (2001) 142:1685-1688.
- ⁶² Venken K, Schuit F, Van Lommel L, Tsukamoto K, Kopchick JJ, Coschigano K, Ohlsson C, Moverare S, Boonen S, Bouillon R, Vanderschueren D. Growth without growth hormone receptor: estradiol is a major growth hormone-independent regulator of hepatic IGF-I synthesis. *J Bone Miner Res* (2005) 20:2138-2149.
- ⁶³ Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* (2002) 110:771-781.
- ⁶⁴ Shinar DM, Endo M, Halperin D, Rodan GA, Weinreb M. Differential expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II messenger ribonucleic acid in growing rat bone. *Endocrinology* (1993) 132:1158-1167.
- ⁶⁵ Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA. Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology* (1995) 136:2741-2751
- ⁶⁶ Smink JJ, Koster JG, Gresnigt MG, Rooman R, Koedam JA, Van Buul-Offers SC. IGF and IGF-binding protein expression in the growth plate of normal, dexamethasone-treated and human IGF-II transgenic mice. *J Endocrinol* (2002) 175:143-153.
- ⁶⁷ Olney RC, Mougey EB. Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth-plate. *Mol Cell Endocrinol* (1999) 156:63-71.
- ⁶⁸ Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Dahlstrom A, Skottner A, Isaksson OG. Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* (1986) 233:571-574.
- ⁶⁹ Reinecke M, Schmid AC, Heyberger-Meyer B, Hunziker EB, Zapf J. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on the expression of IGF-I

messenger ribonucleic acid and peptide in rat tibial growth plate and articular chondrocytes in vivo. *Endocrinology* (2000) 141:2847-2853.

⁷⁰ Allen DB. Growth suppression by glucocorticoid therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;25:699-717.

⁷¹ Bello CE, Garrett SD. Therapeutic issues in oral glucocorticoid use. *Lippincott's Prim Care Pract* (1999) 3:333-341.

⁷² Elias LL, Huebner A, Metherell LA, Canas A, Warne GL, Bitti ML, Cianfarani S, Clayton PE, Savage MO, Clark AJ. Tall stature in familial glucocorticoid deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2000) 53:423-430.

⁷³ Grant DB, Barnes ND, Moncrieff MW, Savage MO. Clinical presentation, growth, and pubertal development in Addison's disease. *Arch Dis Child* (1985) 60:925-928.

⁷⁴ Lian JB, Stein GS. Osteoblast biology. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editores. *Osteoporosis*. San Diego: Academic press (1996) 23-60.

⁷⁵ Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclast biology. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editores. *Osteoporosis*. San Diego: Academic press (1996) 61-94.

⁷⁶ Lukert B. Glucocorticoid-induced osteoporosis. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editores. *Osteoporosis*. San Diego: Academic press (1996) 801-820.

⁷⁷ Anfeld M. Changes in rat epiphyseal cartilage after treatment with dexamethasone and glycosaminoglycan-peptide complex. *Pathol Res Pract* (1992) 188:649-652

⁷⁸ Silvestrini G, Mocetti P, Ballanti P, Di Grezia R, Bonucci E. Cytochemical demonstration of the glucocorticoid receptor in skeletal cells of the rat. *Endocr Res* (1999) 25:117-128.

⁷⁹ Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of the functional glucocorticoid receptor α in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* (2000) 85:883-889.

⁸⁰ Gafni RI, Weise M, Robrecht DT, Meyers JL, Barnes KM, De Levi S, Baron J. Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatr Res* (2001) 50:618-623.

⁸¹ Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM, Angelucci L, Bonucci E. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in

the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* (2000) 26:33-42.

⁸² Chrysis D, Ritzen EM, Savendahl L. Growth retardation induced by dexamethasone is associated with increased apoptosis of the growth plate chondrocytes. *J Endocrinol* (2003) 176:331-337.

⁸³ Smink JJ, Gresnigt MG, Hamers N, Koedam JA, Berger R, Van Buul-Offers SC. Short-term glucocorticoid treatment of prepubertal mice decreases growth and IGF-I expression in the growth plate. *J Endocrinol* (2003) 177:381-388.

⁸⁴ Heinrichs C, Yanovski JA, Roth AH, Yu YM, Domené HM, Yano K, Cutler GB, Baron J. Dexamethasone increases growth hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in liver and growth plate. *Endocrinology* (1994) 135:1113-1118.

⁸⁵ Jux C, Leiber K, Hügel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O. Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology* (1998) 139(7):3296-3305.

⁸⁶ Magiakou MA, Mastorakos G, Gomez MT, Rose SR, Chrousos GP. Suppressed spontaneous and stimulated growth hormone secretion in patients with Cushing's disease before and after surgical cure. *J Clin Endocrinol Metab* (1994) 78:131-137.

⁸⁷ Crowley S, Hindmarsh PC, Matthews DR, Brook CG. Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma. *J Pediatr* (1995) 126:297-303.

⁸⁸ Rosen J, Miner JN. The search for safer glucocorticoid receptor ligands. *Endocr Rev* (2005) 26:452-64.

⁸⁹ Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* (1996) 17:308-332.

⁹⁰ Robey PG, Boskey AL. The biochemistry of bone. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editores. *Osteoporosis*. San Diego: Academic press (1996) 95-184.

⁹¹ Rodan GA. Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editores. *Osteoporosis*. San Diego: Academic press (1996) 290-301.

⁹² Margolis RN, Canalis E, Partridge NC. Invited review of a workshop: anabolic hormones in bone: basic research and therapeutic potential. *J Clin Endocrinol Metab* (1996) 81:872-877.

⁹³ Dean DD, Boyan BD, Schwart Z, Muniz OE, Carreno MR, Maeda S, Howell DS. Effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-dihydroxyvitamin D3 on

metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo. *Endocrine* (2001) 14:311-323.

⁹⁴ Donohue MM, Demay MB. Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology* (2002) 143:3691-3694.

⁹⁵ Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* (1999) 140:4982-4987.

⁹⁶ Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol* (1984) 246:E493-E498.

⁹⁷ Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbisser JL, Apperley JF. Interleukin-1 β -modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* (1994) 94:2307-2316.

⁹⁸ Williams DA, Rosenblatt MF, Beier DR, Cone RD. Generation of murine stromal cell lines supporting hematopoietic stem cell proliferation by use of recombinant retrovirus vectors encoding simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* (1988) 8:3864-3871.

⁹⁹ Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* (1991) 19:5444.

¹⁰⁰ Madsen K, Friberg U, Roos P, Eden S, Isaksson O. Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature* (1983) 304:545-547.

¹⁰¹ Carrascosa A, Audí L, Ballabriga A. Morphologic and metabolic development of human fetal epiphyseal chondrocytes in primary culture. *Pediatr Res* (1985) 19:720-727.

¹⁰² De los Rios P, Hill DJ. 1999. Cellular localization and expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins within the epiphyseal growth plate of the ovine fetus: possible functional implications. *Can J Physiol Pharmacol* 77:235-249.

¹⁰³ Nilsson A, Carlsson B, Isgaard J, Isaksson OG, Rymo L. Regulation by GH of insulin-like growth factor-I mRNA expression in rat epiphyseal growth plate as studied with in-situ hybridization. *J Endocrinol* (1990) 125:67-74.

¹⁰⁴ Luo JM, Murphy LJ. Dexamethasone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid (mRNA) in

hypophysectomized rats and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat. *Endocrinology* (1989) 125:165-171.

¹⁰⁵ Smink JJ, Koedam JA, Koster JG, van Buul-Offers SC. Dexamethasone-induced growth inhibition of porcine growth plate chondrocytes is accompanied by changes in levels of IGF axis components. *J Endocrinol* (2002) 174:343-352.

¹⁰⁶ Lin WW, Oberbauer AM. Spatiotemporal expression of alternatively spliced IGF-I mRNA in the rat costochondral growth plate. *J Endocrinol* (1999) 160:461-467.

¹⁰⁷ Finger F, Schorle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, Aigner T. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum* (2003) 48:3395-3403.

¹⁰⁸ Nagaoka I, Someya A, Iwabuchi K, Yamashita T. Expression of insulin-like growth factor-IA and factor-IB mRNA in human liver, hepatoma cells, macrophage-like cells and fibroblasts. *FEBS Lett* (1991) 280:79-83.

¹⁰⁹ Lowe WL Jr, Lasky SR, LeRoith D, Roberts CT Jr. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol Endocrinol* (1988) 2:528-535.

¹¹⁰ Matsumoto T, Tsurumoto T, Goldring MB, Shindo H. Differential effects of IGF-binding proteins, IGFBP-3 and IGFBP-5, on IGF-I action and binding to cell membranes of immortalized human chondrocytes. *J Endocrinol* (2000) 166:29-37.

¹¹¹ Miyazaki Y, Tsukazaki T, Hirota Y, Yonekura A, Osaki M, Shindo H, Yamashita S. Dexamethasone inhibition of TGF β -induced cell growth and type II collagen mRNA expression through ERK-integrated AP-1 activity in cultured rat articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* (2000) 8:378-385.

¹¹² Mushtaq T, Farquharson C, Seawright E, Ahmed SF. Glucocorticoid effects on chondrogenesis, differentiation and apoptosis in the murine ATDC5 chondrocyte cell line. *J Endocrinol* (2002) 175:705-713.

¹¹³ Olney RC, Wang J, Sylvester JE, Mougey EB. Growth factor regulation of human growth plate chondrocyte proliferation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 317:1171-1182.

¹¹⁴ Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* (1995) 9:726-735.

¹¹⁵ Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* (1995) 80:179-185.

- ¹¹⁶ Kerkhoff E, Rapp UR. Cell cycle targets of Ras/Raf signaling. *Oncogene* (1998) 17:1457-1462.
- ¹¹⁷ Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* (2000) 21:115-137.
- ¹¹⁸ Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MPK-1. *EMBO J* (2001). 20:7108-7116.
- ¹¹⁹ Noguchi T, Metz R, Chen L, Mattei MG, Carrasco D, Bravo R. Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth. *Mol Cell Bio* (1993) 13:5195-5205.
- ¹²⁰ Engelbrecht Y, de Wet H, Horsch K, Langeveldt CR, Hough FS, Hulley PA. Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology* (2003) 144:412-422.
- ¹²¹ Reisman D, Thompson EA. Glucocorticoid regulation of cyclin D3 gene transcription and mRNA stability in lymphoid cells. *Mol Endocrinol* (1995) 9:1500-1509.
- ¹²² Rhee K, Bresnahan W, Hirai A, Hirai M, Thompson EA. c-Myc and cyclin D3 (CcnD3) genes are independent targets for glucocorticoid inhibition of lymphoid cell proliferation. *Cancer Res* (1995) 55:4188-4195.
- ¹²³ Ma T, Mahajan PB, Thompson EA. Glucocorticoid regulation of c-myc promoter utilization in P1798T-lymphoma cells. *Mol Endocrinol* (1992) 6:960-968.
- ¹²⁴ Rhee K, Reisman D, Bresnahan W, Thompson EA. Glucocorticoid regulation of G₁ cyclin-dependent kinase gene in lymphoid cells. *Cell Growth Differ* (1995) 6:691-698.
- ¹²⁵ Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson OG, Lindahl A. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on DNA synthesis and matrix production in rat epiphyseal chondrocytes in monolayer culture. *J Endocrinol* (1992) 133:291-300.
- ¹²⁶ Kiepe D, Ulinski T, Powell DR, Durham SK, Mehls O, Tönshoff B. Differential effects of insulin-like growth factor binding proteins-1, -2, -3, and -6 on cultured growth plate chondrocytes. *Kidney Int* (2002) 62:1591-1600.

- ¹²⁷ Wang J, Zhou J, Cheng CM, Kopchick JJ, Bondy CA. Evidence supporting dual, IGF-I-independent and IGF-I-dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth. *J Endocrinol* (2004) 180:247-255.
- ¹²⁸ Grey A, Chen Q, Callon K, Cornish J. Parallel phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways subserve the mitogenic and antiapoptotic actions of insulin-like growth factor I in osteoblastic cells. *Endocrinology* (2003) 144:4886-4893.
- ¹²⁹ Leung K, Rajkovic IA, Peters E, Markus I, Van Wyk JJ, Ho KK. Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action. *Endocrinology* (1996) 137: 2694-2702.
- ¹³⁰ Sivaprasad U, Fleming J, Verma PS, Hogal KA, Desury G, Cohick WS. Stimulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 synthesis by IGF-I and transforming growth factor- α is mediated by both phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in mammary epithelial cells. *Endocrinology* (2004) 145:4213-4221.
- ¹³¹ Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* (1999) 29:1743-1751.
- ¹³² Furlanetto RW, Harwell SE, Frick KK. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol Endocrinol* (1994) 8:510-517.
- ¹³³ Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Del Toro F, Schwartz Z. Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ and 24R,25-(OH) $_2$ D $_3$ involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Crit Rev Oral Biol Med* (2002) 13:143-154.
- ¹³⁴ Sprenger CC, Peterson A, Lance R, Ware JL, Drivdahl RH. Regulation of proliferation of prostate epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ is accompanied by and increase in insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* (2001) 170:609-618.
- ¹³⁵ Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J. 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes

P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol* (2001) 121:103-109.

¹³⁶ Oh YS, Kim EJ, Schaffer BS, Kang YH, Binderup L, MacDonald RG, Park JH. Synthetic low-calcaemic vitamin D₃ analogues inhibit secretion of insulin-like growth factor II and stimulate production of insulin-like growth factor-binding protein-6 in conjunction with growth suppression of HT-29 colon cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* (2001) 183:141-149.

¹³⁷ Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Mol Endocrinol* (2001) 15:1370-1380.

¹³⁸ Moffatt KA, Johannes WU, Hedlund TE, Miller GJ. Growth inhibitory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ are mediated by increased levels of p21 in the prostatic carcinoma cell line ALVA-31. *Cancer Res* (2001) 61:7122-7129.

¹³⁹ Boyle BJ, Zhao XY, Cohen P, Feldman D 2001 Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1. *J Urol* 165:1319-1324.

¹⁴⁰ Eelen G, Verlinden L, Van Camp M, Van Hummelen P, Marchal K, de Moor B, Mathieu C, Carmeliet G, Bouillon R, Versuttyf A The effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the expression of DNA replication genes. *J Bone Miner Res* (2004) 19:133-146.

¹⁴¹ Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* (1996) 10:142-153.

¹⁴² Peng L, Malloy PJ, Feldman D. Identification of a functional vitamin D response element in the human insulin-like growth factor binding protein-3 promoter. *Mol Endocrinol* (2004) 18:1109-1119

¹⁴³ Krohn K, Haffner D, Hügel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, Schaefer F. 1,25(OH)₂D₃ and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* (2003)73:400-410.

¹⁴⁴ Cheng SL, Zhang SF, Mohan S, Lecanda F, Fausto A, Hunt AH, Canalis E, Avioli LV. Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding

proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone. *J Cell Biochem* (1998) 71:449-458.

¹⁴⁵ Delany AM, Canalis E. Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology* (1995) 136:4776-4781.

¹⁴⁶ Delany AM, Durant D, Canalis E. Glucocorticoid suppression of IGF-I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol* (2001) 15:1781-1789.

¹⁴⁷ Okazaki R, Riggs BL, Conover CA. Glucocorticoid regulation of insulin-like growth factor-binding protein expression in normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* (1994) 134:126-132.

¹⁴⁸ Villafuerte BC, Koop BL, Pao CI, Phillips LS. Glucocorticoid regulation of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Endocrinology* (1995) 136:1928-1933.

¹⁴⁹ DiBattista JA, Dore S, Morin N, Aribat T. Prostaglandin E2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem* (1996) 63:320-333.

¹⁵⁰ Chen TL, Chang LY, Bates RL, Perlman AJ. Dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of insulin-like growth factor-binding proteins in rat osteoblast-like cell cultures. *Endocrinology* (1991) 128:73-80.

¹⁵¹ Conover CA, Clarkson JT, Bale LK. Effect of glucocorticoid on insulin-like growth factor (IGF) regulation of IGF-binding protein expression in fibroblasts. *Endocrinology* (1995) 136:1403-1410.

¹⁵² Camacho-Hubner C, Busby WH Jr, McCusker RH, Wright G, Clemmons DR. Identification of the forms of insulin-like growth factor-binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion. *J Biol Chem* (1992) 267:11949-11956.

¹⁵³ Koedam JA, Hoogerbrugge CM, Van Buul-Offers SC. Differential regulation of IGF-binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-I and dexamethasone. *J Endocrinol* (2000) 165:557-567.

¹⁵⁴ Price WA, Stiles AD, Moats-Staats BM, D'Ercole AJ. Gene expression of insulin-like growth factors (IGFs), the type 1 IGF receptor, and IGF-binding proteins in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Endocrinology* (1992) 130:1424-1432.

¹⁵⁵ Luo JM, Murphy LJ. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 expression by dexamethasone. *Mol Cell Endocrinol* (1990) 74:213-219.

- ¹⁵⁶ Miell JP, Taylor AM, Jones J, Holly JM, Gaillard RC, Pralong FP, Ross RJ, Blum WF. The effects of dexamethasone treatment on immunoreactive and bioactive insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in normal male volunteers. *J Endocrinol* (1993) 136:525-533.
- ¹⁵⁷ Bang P, Degerblad M, Thoren M, Schwander J, Blum W, Hall K. Insulin-like growth factor (IGF) I and II and IGF binding protein 1, 2 and 3 in serum from patients with Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh)* (1993) 128:397-404.
- ¹⁵⁸ Kiepe D, Ciarmatori S, Hoeflich A, Wolf E, Tönshoff B. Insulin-like growth factor (IGF)-I stimulates cell proliferation and induces IGF binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 gene expression in cultured growth plate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Endocrinology* (2005) 146:3096-3104.
- ¹⁵⁹ Villafuerte BC, Koop BL, Pao CI, Gu L, Birdsong GG, Phillips LS. Coculture of primary rat hepatocytes and nonparenchymal cells permits expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in vitro. *Endocrinology* (1994) 134:2044-2050.
- ¹⁶⁰ Conover CA. Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein synthesis by insulin and IGF-I in cultured bovine fibroblasts. *Endocrinology* (1990) 126:3139-3145.
- ¹⁶¹ Bale LK, Conover CA. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 messenger ribonucleic acid expression by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* (1992) 131:608-614.
- ¹⁶² Neely EK, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors (IGFs) reduce IGF-binding protein-4 (IGFBP-4) concentration and stimulate IGFBP-3 independently of IGF receptors in human fibroblasts and epidermal cells. *Endocrinology* (1992) 130:985-993.
- ¹⁶³ Martin JL, Baxter RC. Release of fibroblast IGFBPs by TGF- β and IGF-I occurs through distinct mechanisms. *Growth Regul* (1993) 3:62-65.
- ¹⁶⁴ Saffery R, Albiston AL, Herington AC. Rat IGFBP-3: Characterization and regulation of the gene promoter. *Growth Regul* (1994) 4:132.
- ¹⁶⁵ Yamamoto H, Prager D, Yamasaki H, Melmed S. Rat pituitary GC cell insulin-like growth factor I receptor regulation. *Endocrinology* (1993) 133:1420-1425.
- ¹⁶⁶ King AP, Tseng MJ, Logsdon CD, Billestrup N, Carter-Su C. Distinct cytoplasmic domains of the growth hormone receptor are required for glucocorticoid- and phorbol ester-induced decreases in growth hormone (GH) binding. *J Biol Chem* (1996) 271:18088-18094.

- ¹⁶⁷ King AP, Carter-Su C. Dexamethasone-induced antagonism of growth hormone (GH) action by down-regulation of GH binding in 3T3-F442A fibroblasts. *Endocrinology* (1995) 136:4796-4803.
- ¹⁶⁸ Zhou G, Garofalo S, Mukhopadhyay K, Lefebvre V, Smith CN, Eberspaecher H, de Crombrughe B. A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J Cell Sci* (1995) 108:3677-84.
- ¹⁶⁹ Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* (2000) 275:10738-10744.
- ¹⁷⁰ Sekiya I, Koopman P, Tsuji K, Mertin S, Harley V, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M. Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. *J Endocrinol* (2001) 169:573-579.
- ¹⁷¹ Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimo DL, Lachman RS, Gaines ES, Cekleniak JA, Knowlton RG, Cohn DH. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat Genet* (1995) 10:330-336.
- ¹⁷² Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FF, Harrison WR, Francomano CA, Prange CK, Lennon GG, Deere M, Lawler J. Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nat Genet* (1995) 10:325-329.
- ¹⁷³ Chen Q, Johnson DM, Haudenschild DR, Goetinck PF. Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev Biol* (1995) 172:293-306.
- ¹⁷⁴ Kovacs G, Fine RN, Worgall S, Schaefer F, Hunzicker EB, Skottner-Lindun A, Mehls O. Growth hormone prevents steroid-induced growth depression in health and uremia. *Kidney Int* (1991) 40:1032-1040.
- ¹⁷⁵ Tönshoff B, Haffner D, Mehls O, Dietz M, Ruder H, Blum WF, Heinrich U, Stöver B. Efficacy and safety of growth hormone treatment in short children with renal allografts: three year experience. *Kidney Int* (1993) 44:199-207.
- ¹⁷⁶ Chenu C, Valentin-Opran A, Chavassieux P, Saez S, Meunier PJ, Delmas PD. 1990 Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by

1,25(OH)₂D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone* 11:81-86.

¹⁷⁷ Linkhart TA, Keffer MJ. Differential regulation on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II release from cultured neonatal mouse calvaria by parathyroid hormone, transforming growth factor- β , and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* (1991) 128:1511-1518.

¹⁷⁸ Scharla SH, Strong DD, Mohan S, Baylink DJ, Linkhart TA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ differentially regulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-4 in mouse osteoblasts. *Endocrinology* (1991) 129:3139-3146.

¹⁷⁹ Kurose H, Seino Y, Yamaoka K, Tanaka H, Shima M, Yabuuchi H. Cooperation of synthetic insulin-like growth factor I/somatomedin C and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on regulation of function in clonal osteoblastic cells. *Bone Miner* (1989) 5:335-345.

¹⁸⁰ Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen EF, Kassem M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the production of insulin-like growth factor-binding proteins-2,-3 and -4 in human bone marrow stromal cells. *Eur J Endocrinol* (2001) 144:549-557.

¹⁸¹ Moriwake T, Tanaka H, Hanzaki S, Higuchi J, Seino Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the secretion of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) by cultured human osteosarcoma cells. *Endocrinology* (1992) 130:1071-1073.

¹⁸² Nakao Y, Hilliker S, Baylink DJ, Mohan S. Studies on the regulation of insulin-like growth factor binding protein 3 secretion in human osteosarcoma cells in vitro. *J Bone Miner Res* (1994) 9:865-872.

¹⁸³ Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ, Davey HW. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94:7239-7244.

¹⁸⁴ Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* (1998) 93:841-850.

¹⁸⁵ Morales O, Faulds MH, Lindgren UJ, Haldosen L-A 2002 1 ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits GH-induced expression of SOCS-3 and CIS and prolongs growth hormone signaling via the Janus Kinase (JAK2)/signal transducers and activators of transcription (STAT5) system in osteoblast-like cells. *J Biol Chem* 277:34879-34884.

¹⁸⁶ Horton WE Jr, Balakir R, Precht P, Liang CT. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ down-regulates aggrecan proteoglycan expression in immortalized rat chondrocytes through a post-transcriptional mechanism. J Biol Chem (1991) 266:24804-24808.