



**Máster Universitario en Medicina Molecular:  
Daño Oxidativo y Bioprotección**

***Estudio experimental de la influencia de la  
administración de IGF-1 y de su análogo peptídico  
Pep-1, en cultivos celulares de condrocitos humanos***

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**María Muñoz de Benavides**

**Curso académico 2012-2013**

## ÍNDICE:

<b>I. PARTE TEÓRICA</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1. Cultivos celulares</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.1. Introducción histórica</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.2. Ventaja del uso de cocultivos en Biotecnología</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.3. Conceptos actuales de cultivo celular</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1.4. Tipos de cultivos de tejidos</b> .....	<b>13</b>
<b>I.1.5. Biología de la célula en cultivo</b> .....	<b>14</b>
<b>I.2. Condrocitos</b> .....	<b>19</b>
<b>I.2.1. Introducción</b> .....	<b>19</b>
<b>I.2.2. Aplicación clínica del cultivo de condrocitos</b> .....	<b>21</b>
<b>I.2.3. Influencia del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) en el cartílago articular</b> .....	<b>22</b>
<b>I.3. Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I)</b> ..	<b>24</b>
<b>I.3.1. Estructura, síntesis y regulación de IGF-1</b> .....	<b>25</b>
<b>I.3.2. Receptores de IGF-I</b> .....	<b>27</b>
<b>I.3.3. Proteínas transportadoras de IGF-I</b> .....	<b>29</b>
<b>I.3.4. Péptido- 1 derivado de IGF-I</b> .....	<b>30</b>
 <b>OBJETIVOS</b> .....	 <b>32</b>
 <b>II. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	 <b>33</b>
<b>II.1. Material y Métodos</b> .....	<b>34</b>
<b>Cultivo de condrocitos</b> .....	<b>34</b>
<b>Estudios de señalización de condrocitos</b> .....	<b>36</b>
<b>II.2. Resultados</b> .....	<b>39</b>
<b>Cultivo de condrocitos</b> .....	<b>39</b>
<b>Estudios de señalización de condrocitos</b> .....	<b>44</b>
<b>II.3. Discusión</b> .....	<b>47</b>
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	 <b>48</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	 <b>49</b>

<b>ANEXO: Protocolos de las técnicas de laboratorio empleadas.....</b>	<b>55</b>
1. ELABORACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA .....	1
2. MÉTODO DE BRADFORD PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	4
3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA WESTERN BLOT.....	6
4. TÉCNICA DE ELECTROFORESIS .....	8
ELABORACIÓN DE LOS BUFFER.....	12
5. WESTERN BLOT.....	13
5.1. TRANSFERENCIA DEL GEL A MEMBRANA DE NITROCELULOSA.....	13
5.2. TINCIÓN CON ROJO PONCEAU.....	16
5.3. BLOQUEO.....	17
5.4. DETECCIÓN.....	17
5.4.1. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO.....	18
5.4.2. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO.....	18
5.5. ANÁLISIS.....	19
6. CULTIVOS CELULARES.....	21
6.1. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN PARA SIEMBRA DE CÉLULAS.....	36
6.2. CAMBIO DE MEDIO. MANTENIMIENTO.....	38
6.3. DILUCIÓN DE LA DENSIDAD (PASE) DE CÉLULAS.....	39
6.4. TRIPSINIZACIÓN.....	40
6.5. RECUENTO DE CÉLULAS.....	41

## I. PARTE TEÓRICA

## Introducción

El uso de sistemas de cultivos celulares *in vitro*, supone en la actualidad una plataforma tecnológica esencial para el desarrollo de múltiples investigaciones científicas. La evolución de esta metodología durante las últimas décadas, la ha convertido en una herramienta imprescindible en el intento de desentrañar los mecanismos moleculares y celulares característicos de todo proceso biológico.

El cultivo celular o cultivo de tejidos, tiene su origen en el siglo XIX, como método experimental para el estudio del comportamiento de las células animales, libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante su normal homeostasis y bajo el estrés de un experimento. El cultivo de fragmentos disgregados de tejidos aumentó notablemente el crecimiento celular *in vitro*, respecto del cultivo de explantos. Este fenómeno supuso un gran avance y provocó el interés creciente en este área a partir de los años 50 (Sanford et al, 1948; Grey et al, 1952; Levi-Montalcini, 1954; Eagle, 1955; Hayflick y Moorhead, 1961; etc.).

Entre los tipos celulares de mayor interés en medicina traslacional se encuentran los condrocitos, único componente celular del cartílago hialino, encargado de mantener la integridad de la matriz cartilaginosa, a través de la producción de sus principales compuestos: colágeno y proteoglicanos. Los condrocitos son esenciales para el mantenimiento de la matriz extracelular, que comprende el 95% del tejido cartilaginoso. La limitada capacidad de reparación del cartílago articular es causa de la osteoartritis (OA), patología de elevada incidencia en la población mayor de 65 años, con síntomas característicos como dolor y disfunción articular y consiguiente discapacidad en dichos pacientes (Mobasher A, 2009).

La investigación de factores hormonales, como el IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), relacionados con los mecanismos de control del crecimiento y regeneración celular de los condrocitos está logrando esclarecer la importancia de determinadas moléculas o vías de señalización intracelulares características de tales procesos y, por tanto, el hallazgo de posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la OA (Yin, 2009).

Numerosos autores han demostrado que la expresión aberrante de IGF-I o una alteración en su señalización producen enfermedades y alteraciones sistémicas en el hombre, como desórdenes del crecimiento, diabetes tipo II y enfermedad cardiovascular, OA, cáncer, senescencia celular. Con la edad, se ha observado una menor respuesta a la estimulación de IGF-I en los tejidos músculo-esqueléticos, incluido el hueso (D'avis et al, 1997; Cao et al, 2007) y el cartílago (Martin et al, 1997; Loeser et

al, 2000; Messay et al, 2000), aunque los mecanismos que subyacen a la disminución de la efectividad de esta hormona son aún desconocidos.

Weihong Yin y colaboradores (Yin, 2009) han observado que la capacidad de IGF-I de estimular a los condrocitos para producir matriz cartilaginosa disminuye con la edad y en la OA. Este fenómeno aparece asociado a una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) en estas células enfermas y envejecidas respecto de las sanas y jóvenes. Las ROS parecen ser responsables de esta degeneración, por provocar interferencias en la señalización normal que tiene lugar en el citoplasma, por la unión de IGF-I a su receptor de membrana. Los citados autores postulan que, niveles elevados de ROS, alteran el equilibrio en la actividad de Akt frente a ERK, segundos mensajeros implicados en las dos principales vías de señalización intracelular que se activan en respuesta a la autofosforilación del receptor de IGF-I (IGF-IR) por la unión a su ligando.

Dependiendo del tipo celular y del contexto en el que tiene lugar la estimulación con IGF-I, se produce la activación preferente de la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa-Akt, que promueve el crecimiento celular, la síntesis de proteínas de la matriz extracelular cartilaginosa (proteoglicano y colágeno de tipo II) y/o la supervivencia de la célula; o bien, la activación de la vía MEK-ERK, que promueve la proliferación celular y/o la transcripción génica.

Resultaría de gran interés, por tanto, el hallazgo de alguna molécula que lograra activar al receptor de IGF-I de forma selectiva, es decir, que lograra principalmente la activación de la vía del fosfatidilinositol-3-kinasa-Akt, responsable de la supervivencia de los condrocitos, la promoción de su crecimiento y la síntesis de proteoglicano, para contrarrestar la falta de efectividad que parece experimentar esta vía de señalización en presencia de las ROS características del envejecimiento y de la OA. Es aún desconocido el mecanismo a través del cual las ROS activan la cascada MEK/ERK, que provoca la inhibición de la vía Akt por la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina, que conlleva la inactivación de esta vía con la disminución consiguiente en la producción de proteínas, además de la disminución en la transcripción de RNAm de agregano, proteína constitutiva del proteoglicano.

Los péptidos sintéticos derivados de IGF-I, como el péptido-1 (Pietrkowski, 1995), se presentan como una estrategia posible a la demanda no satisfecha de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de OA en pacientes de edad avanzada, ya que, según nuestra hipótesis, conseguirían unirse al IGF-IR, inhibiendo la vía ERK, responsable de la proliferación celular y pudiendo estimular, en cambio, la cascada de

señalización de ISR-1 que produce la activación de la vía Akt conducente a la producción de matriz cartilaginosa.

## **I.1. Cultivos celulares**

### **I.1.1. Introducción histórica**

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas empleadas en embriología. Wilhem Roux, en el año 1885, mantuvo células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907.

Harrison fue el primer autor que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantos de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantos obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que siguen utilizándose hoy en día.

En 1913, Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años (Berj y Sharp, 1977). Gran

parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel (Leyva-Cobián, 1985).

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que podemos destacar:

- 1948, Earle y col. (Sanford, Earle y Likely, 1948) aislaron células de la línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que, para que una célula llegue a dividirse, necesita ser alimentada con los nutrientes correctos.

- 1952, Grey y col. (Grey, Coffman y Kubicek, 1952) establecen la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

- 1954, Rita Levi-Montalcini y col. establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo (Levi-Montalcini y Calissano, 1979). Este trabajo supuso el Premio Nobel para Levi-Montalcini en 1986.

- 1955, Eagle (Eagle, 1955) realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas (sueros...) pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares...)

- 1961, Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.

- 1965, Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente (Ham, 1965).

- 1969, Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables (Augusti-Tocco y Sato, 1969). Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

- 1975, Kohler y Milstein establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975). El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel.



- 1976, Sato y col. publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero (Sato y col., 1982).

A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares era un anfibio, poiquilotermo, rápidamente el interés se centró en el cultivo de células de animales homeotermos, especialmente humanas, por su gran interés médico. Sin embargo en los últimos años, y especialmente debido a la problemática del control de plagas e infecciones en agricultura y piscicultura, se ha desarrollado notablemente el establecimiento de líneas celulares de poiquilotermos e invertebrados.

En los últimos años la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de co-cultivos...

### ***1.1.2. Ventajas del uso de cocultivos en Biotecnología***

En biotecnología la mayoría de los productos se obtienen usando una cepa pura, ya que de esta manera se facilita el control del proceso. Se esteriliza el medio de cultivo y se inocula con un cultivo; sin embargo, en la naturaleza la mayoría de los microorganismos se encuentran formando parte de comunidades microbianas, en las que se obtienen productos mediante la combinación de vías metabólicas de diferentes microorganismos. Algunos procesos, como los que ocurren en las compostas, en el intestino humano o en los alimentos fermentados tradicionales, actúan microbiotas mixtas, las cuales son por lo general complejas. Bader *et al.* (2010) distinguen estos cultivos mixtos, de los cuales comúnmente no se conoce qué microorganismos los componen, de los cocultivos, que se forman mezclando microorganismos conocidos y se llevan a cabo en condiciones asépticas.

Dentro de las ventajas del uso de los cocultivos se encuentran: el incremento en el rendimiento del producto con respecto al del cultivo puro, la producción de diferentes compuestos debida a la sucesión en el crecimiento de diferentes microorganismos, la estabilización de alimentos, al tener cepas que produzcan compuestos antimicrobianos. Asimismo, es posible usar en vez de glucosa sustratos más baratos, como algún residuo lignocelulósico, junto con un cocultivo que incluya microorganismos capaces de degradar el sustrato, junto con los que usen los productos de esta degradación para crecer y producir el compuesto de interés. Esto abarataría considerablemente el proceso.

Los efectos de los cocultivos se deben a que existen interacciones entre los microorganismos que forman parte del complejo. En la mayoría de los casos se busca

una interacción positiva entre los miembros de un cultivo, es decir, se incluye un miembro cuya acción sería benéfica para uno o todos los integrantes de un cocultivo. En este caso una cepa estaría sacrificando su propio bien en aras del bien de la comunidad y éste es un tema a investigar en ecología microbiana.

Existe un gran potencial en el uso de cocultivos o de cultivos mixtos para mejorar los procesos biotecnológicos. Es necesario entonces conocer más sobre los cultivos mixtos naturales y sus interacciones, para aprovechar no solamente lo que un cultivo puro puede proporcionar, sino también lo que es capaz de hacer “en equipo”.

### ***1.1.3. Conceptos actuales de cultivo celular***

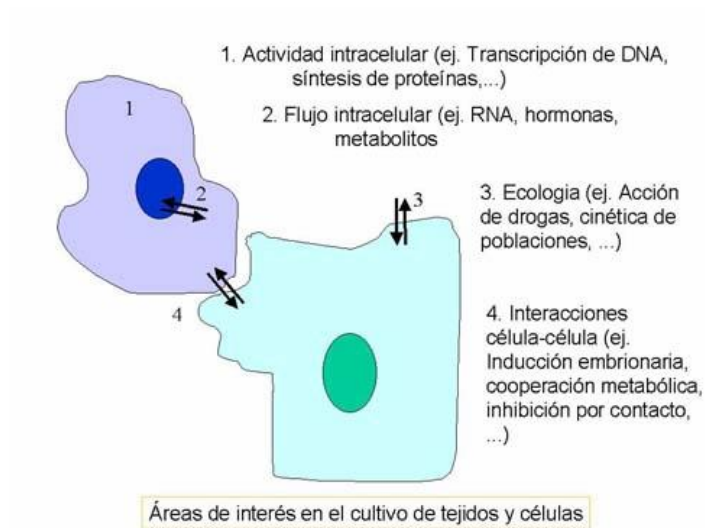
Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantos, primarios o secundarios,...

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular:

- Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ej. transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, etc.
- Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ej. el ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del RNA: núcleo-citoplasma, movimiento de proteínas, etc.
- Ecología celular. Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular y de su diferenciación, como por ej. el estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular, etc.
- Interacciones celulares. Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

Como ejemplo de áreas de investigación fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular, citamos:

- Virología: establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas antivirales, etc.



**Figura 1:** Esquema representativo de los ámbitos de aplicación del cultivo de tejidos y células.

- Investigación del cáncer
- Inmunología. Gracias especialmente a la introducción de las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales, así como en el análisis de la genética de la célula somática.
- Ingeniería de proteínas. Por la producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento, etc.
- Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo. Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.
- Aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad, etc.
- Aplicaciones médicas: mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.
- Aplicaciones industriales y agronómicas: producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial, etc.

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo tienen unas desventajas que hay que tener en consideración.

**Ventajas de la técnica de cultivo celular:**

a) Permite un control preciso y fino del medio ambiente. En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, tensión superficial, etc.), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Esto es cierto completamente sólo para algunas líneas celulares, para las que se han definido los denominados medios definidos. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo, en muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos. En estos casos, se trata de medios que se suplementan con soluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc.) en los que se encuentran factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el mantenimiento del cultivo pero cuya naturaleza se desconoce. Estas soluciones complejas están sujetas a variación de lote a lote.

b) Caracterización y homogeneidad de la muestra. Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado) o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras asociado al uso de animales de experimentación.

c) Economía. Suponen una economía en el uso de reactivos o fármacos a estudiar pues, al realizarse en volúmenes reducidos y con un acceso directo de las células al fármaco, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo. El coste de investigación para la industria farmacéutica de una nueva molécula es mucho menor si se ha de probar en cantidades del orden del gramo (en el caso del estudio en animales) al de miligramos, como es el caso de los cultivos.

d) Motivaciones éticas. La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo *in vivo*, pero es una alternativa válida en muchas situaciones.

**Desventajas del cultivo celular:**

a) Técnica sensible. El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas...). Además, puesto que proceden de organismos pluricelulares, son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones

de asepsia en todo momento, lo cual supone unos requerimientos elevados de tipo material -instrumental requerido- como del personal, que debe estar cualificado para su manipulación.

b) Cantidad y costo. El costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al del animal. Asimismo, existe una limitación de producción de unos 10 g de células en un laboratorio normal que, para ser superior a 100 g, requeriría instalaciones de tipo industrial.

c) Inestabilidad. Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior. Es decir, podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones.

d) Validez del modelo *in vitro*. Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que:

☐ se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.

☐ se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular. Es de destacar que los avances más interesantes en la función celular proceden del reconocimiento de la importancia de las interacciones específicas de las células con otras células o con el sustrato.

☐ carece de los componentes sistémicos de regulación, característicos de la homeostasis *in vivo*, especialmente de los sistemas nervioso y endocrino.

Cuando se establece el cultivo, las células se desdiferencian, se hacen móviles e inician su proliferación. Esta desdiferenciación puede en algunos casos ser revertida por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, confluencia, inductores químicos (ésteres de forbol...) pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación *in vivo*.

Por todo lo anterior, hemos de ser prudentes en cuanto al reconocimiento de la validez de los resultados *in vitro* respecto a las observaciones *in vivo*. Sin embargo, actualmente se están realizando numerosos estudios de validación de modelos *in vitro* en el marco del desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal: ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods), ALTWEB (Colección de

recursos para el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal en web de la Universidad John Hopkins, USA), Invitox (Colección de protocolos *in vitro*), Invitroderm (Alternativas a los ensayos de irritación dérmica en animales), etc.

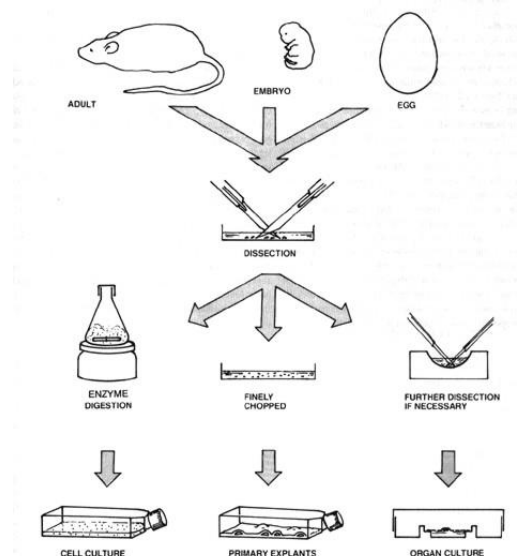
#### 1.1.4. Tipos de cultivos de tejidos

Se podría hablar de tres tipos de cultivos:

- **Cultivo de órganos.** Implica que la arquitectura característica del tejido “in vivo” se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad.

- **Explantos primarios.** Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explanto.

- **Cultivo celular.** Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.



**Figura 2:** Procedimiento experimental para la obtención de cultivos celulares a partir de órganos o tejidos animales.

En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y reproducibilidad de las muestras. A fin de compensar la ausencia de interacciones heterotípicas, se realizan desde hace unos años cultivos mixtos con importantes éxitos.

### ***1.1.5. Biología de la célula en cultivo***

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así solo formarán el cultivo aquellas células que sean por una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

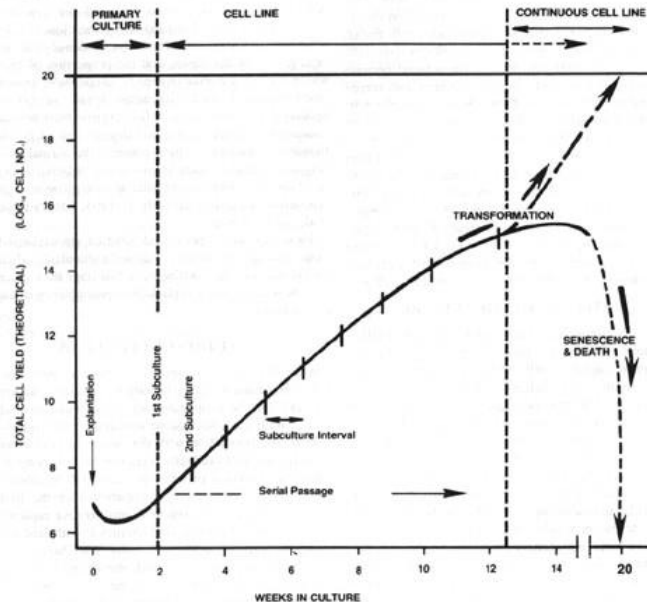
- El *crecimiento en monocapa* significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje dependientes, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras.
- El *crecimiento en suspensión* es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión. A pesar de que su origen no está claro se cree que se trata de células cepa (*stem cells*) indiferenciadas.

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia las células, en general, detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares, neoplásicos, que sigan duplicándose y que desplacen a los otros del cultivo.

Así, pues, se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos.

Una vez se alcanza la confluencia en el cultivo muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, subcultivar (sembrar en otra placa, hacer un *pase*) o propagar las células.

Es una observación generalizada que, después del tercer pase, el cultivo se estabiliza y homogeneiza: el tipo celular de mayor tasa de crecimiento ha ocupado completamente el cultivo desplazando a los otros tipos celulares.



**Figura 3:** Evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a lo largo de las semanas.

En general, si no se establecen condiciones selectivas las células del tejido conjuntivo, especialmente fibroblastos, serán las seleccionadas finalmente. Para evitar que las células más especializadas del cultivo se vean desplazadas de éste por los fibroblastos y otras células de rápido crecimiento se han establecido protocolos detallados de medios selectivos.

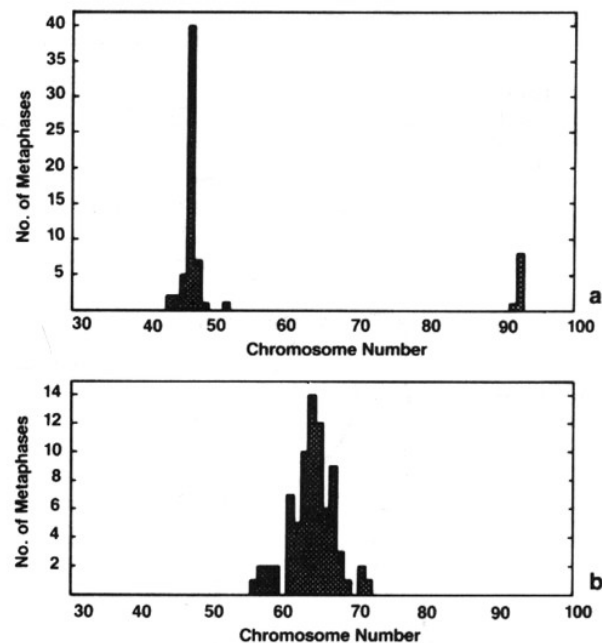
En el momento en que las células comienzan a dividirse en la placa su número se incrementa, hasta ocupar todo el espacio. En ese momento es necesario tomar algunas y resembrar en una nueva placa. En el caso de células en cultivo primario el factor de dilución de un pase al siguiente suele ser de 1/2 a 1/5 pero no superior. En el caso de líneas celulares establecidas la dilución puede ser tan elevada como 1/100 o 1/1000, siendo la habitual 1/10. El caso más extremo serían los procesos de clonaje en los que se siembran en pocillos (*multiwell* de 96 pocillos) una única célula.

El crecimiento de las células en cultivo primario prosigue a lo largo de una serie de generaciones o pases característicos de cada tipo celular y condiciones de cultivo. Así, los hepatocitos de adultos no se establecen más que como cultivo primario mientras que las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) permanecen en cultivo de 3 a 9 pases, y los fibroblastos dérmicos humanos pueden superar los 20 pases. Sin embargo, al final todas ellas entran en una fase de senescencia, con acumulación de



numerosas anomalías, pérdida de funciones especializadas, etc. que conducen a la muerte del cultivo.

Sólo ocasionalmente un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas. Es debido a la aparición en el cultivo de células inmortales. Estas células forman **líneas estables** o cultivos celulares permanentes. La razón de la inmortalización de estas células es en la mayor parte de los casos desconocida pero se incrementa la frecuencia de inmortalización mediante infecciones virales, tratamientos con mutágenos, etc. por lo que deben estar relacionadas con la pérdida, espontánea o inducida por el tratamiento, de las vías de control celular. Se hipotetiza que la capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionado directamente con su variabilidad genética. Así líneas celulares que nunca se establecen como estables se mantienen euploides como es el caso de fibroblastos humanos (Hayflick y Moorhead, 1961), fibroblastos de pollo (Hay y Strehler, 1967), y la glia humana (Pontén y Westermarck, 1978) mientras que otras líneas frecuentemente se convierten en aneuploides y se transforman en líneas celulares continuas con mayor frecuencia, como es el caso de las células epidérmicas (Green y col., 1979).

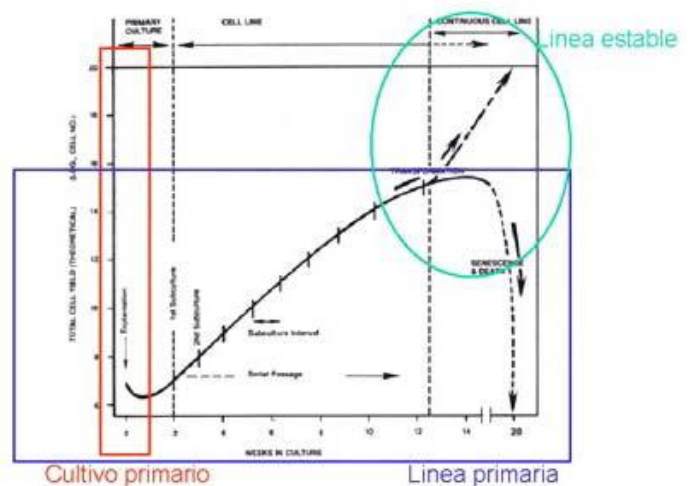


**Figura 4:** Comparación del número de cromosomas por célula en una línea primaria glial y una línea estable de melanoma.

Existen diferencias muy importantes entre una línea celular continua y una línea primaria o un cultivo primario. En la tabla siguiente se recogen las propiedades diferenciales de las líneas finitas y continuas (Tabla 1).

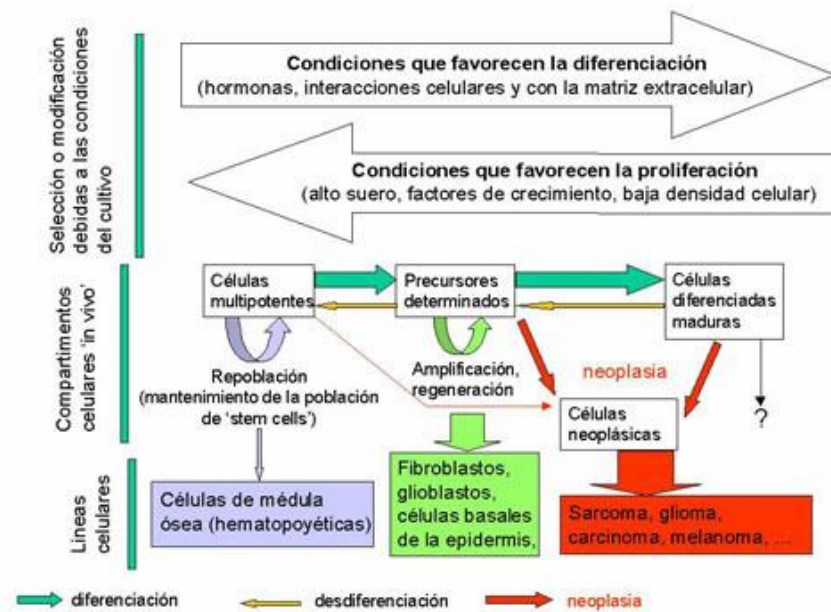
	Finita	Continua
Ploidía	Diploide / Euploide	Heteroploide / Aneuploide
Transformación	Normal	Transformada
Tumorigenicidad	No-tumorigénica	Tumorigénica
Dependencia de anclaje	Si	No
Inhibición por contacto	Si	No
Limitación de crecimiento por densidad	Si	No
Mantenimiento	Cíclico	Posible mantenerlas quiescentes
Requerimientos de suero	Elevados	Bajos
Eficiencia de clonaje	Baja	Elevada
Marcadores	Pueden expresar marcadores específicos	Cromosomales, enzimáticos... se pierden
Funciones especializadas	Se mantienen	Se suelen perder
Tasa de crecimiento	Baja (24 a 96 h tiempo de replicación)	Rápida (12 a 24 h)
Rendimiento en cultivo	Bajo ( $<10^6$ células/ml; $<10^5$ células/cm <sup>2</sup> )	Alto ( $>10^6$ células/ml; $>10^5$ células/cm <sup>2</sup> )

**Tabla 1:** Propiedades diferenciales de las líneas celulares finitas y continuas.



**Figura 5:** Características diferenciales del crecimiento de un cultivo primario, línea primaria y línea estable.

El cultivo de las células no presenta las mismas dificultades independientemente del tipo de célula de que se trate. Hay grandes diferencias que se relacionan fundamentalmente con el grado de diferenciación del tipo celular. Así pues, en general, se puede establecer como norma que una línea celular será tanto más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada sea, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas.



**Figura 6:** Condiciones que facilitan la diferenciación o la proliferación de células en cultivo.

Los cultivos primarios de muchos tipos celulares son posibles porque las células pierden algunas de sus propiedades diferenciadas, entre ellas la característica incapacidad de dividirse, y se convierten en células que mantienen tan sólo algunas de las propiedades que las caracterizaban. Esta pérdida de propiedades puede ser debida a desdiferenciación o desadaptación. La primera implica una pérdida irreversible de una propiedad diferencial del tipo celular (por ejemplo, un hepatocito en cultivo pierde sus enzimas característicos: arginasa, aminotransferasas..., no puede almacenar glucógeno ni sintetizar las proteínas del suero...), mientras que, la segunda, manifiesta que la característica especializada perdida no es irreversible sino consecuencia de la pérdida de la señal (por ejemplo, hormonal, nerviosa...) y que basta con recuperarla para que se reexprese. Sattler y col. (1978) demostraron que los hepatocitos de rata pueden reexpresar tirosina aminotransferasa en presencia de ciertas hormonas (insulina e hidrocortisona) cuando crecen sobre una matriz de colágeno.

## 1.2. Condrocitos

### 1.2.1. Introducción

El cartílago articular es el componente principal que recubre la mayoría de las articulaciones diartrosicas de los seres humanos (De Croos et al, 2006). También llamado cartílago hialino, es una estructura muy especializada que facilita los movimientos articulares y resiste importantes cargas provocadas por las actividades normales del movimiento corporal. En las articulaciones, el cartílago debe cumplir dos funciones esenciales: distribuir las cargas articulares sobre un área amplia (Ateshian y Wang, 1995) y permitir el movimiento relativo de las superficies articulares opuestas con mínima fricción y desgaste (Mow y Ateshian, 1997).

El grosor de este cartílago en una persona adulta se relaciona con su ubicación. Así, en la articulación de la rodilla puede ser de 3-4 mm, en tanto que en la articulación interfalángica de la mano, mide 1-2 mm.

La carga cíclica es el modo más común de carga en las articulaciones del miembro inferior del ser humano. Recientemente, se ha despertado el interés en el estudio del efecto de las cargas dinámicas repetitivas sobre el cartílago articular, debido a que la fuerza de contacto articular tiene un patrón repetitivo durante las actividades diarias, tales como caminar y correr (Afoke, 1987; Krishnan, 2005). *Seedhom y Wallbridge*, han observado que las articulaciones del miembro inferior del ser humano están sujetas a un promedio de entre 1-4 millones de ciclos de carga por año.

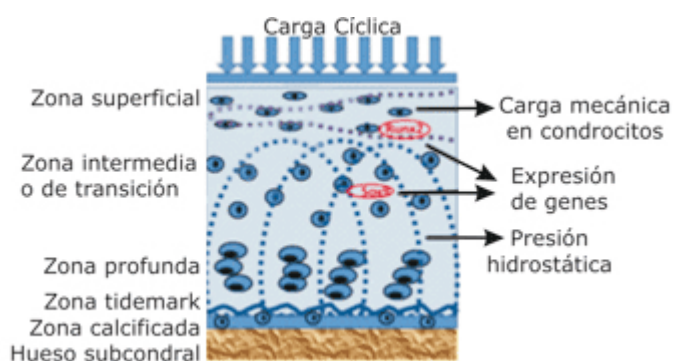
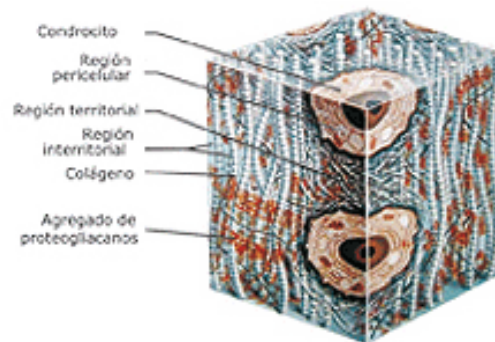
Recientes evidencias experimentales indican que estas cargas dinámicas pueden aumentar la actividad de biosíntesis de los condrocitos. De hecho, algunos investigadores han confirmado que la fuerza mecánica aplicada a una articulación puede regular las actividades metabólicas del cartílago articular *en vivo* (Kiviranta, 1988).

Por otra parte, el cartílago articular se puede modificar por diversos aspectos, por ejemplo, el desarrollo y crecimiento endocondral de los huesos. Éste es un proceso de múltiples etapas, en el que la adhesión de las células mesenquimales es seguida por la formación de la condensación de células que participan en la condrogénesis (Papadopoulou, 2007). Estas células proliferan más tarde y se convierten en condrocitos, que pasan luego a condrocitos maduros y luego a hipertróficos los cuales sintetizan los principales componentes de la matriz extracelular (MEC) del cartílago y, en última instancia, después de su diferenciación terminal, sufren la apoptosis.

Estos acontecimientos se producen continuamente durante toda la vida y son controlados por factores sistémicos (hormonas) y mediadores locales (citoquinas, factores de crecimiento y factores de transcripción) (Takeda, 2005). Además, la regulación de la morfogénesis por parte de las moléculas biológicas, el desarrollo, mantenimiento y adaptación del tejido cartilaginoso depende en gran medida de las cargas mecánicas.

De manera general, y bajo condiciones de equilibrio fisiológico, el cartílago articular adulto está sujeto a un equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de matriz extracelular) y catabólicos (degradación y pérdida de matriz), regulados fundamentalmente por el condrocito en respuesta a una serie de factores en su microambiente, incluidas las fuerzas físicas o mecánicas, los factores de crecimiento, las citoquinas, el envejecimiento y las lesiones (Nesic, 2006; Bay-Jensen AC, 2007; Lotz, 1995) (Figura 7). Las cargas cíclicas son entonces necesarias para el mantenimiento normal de la función del cartílago articular en las articulaciones diartrosis (Chahine, 2007) (Figura 8).

**Figura 7:** Esquema de la estrecha relación existente entre los condrocitos y su microambiente. El condrocito genera y mantiene la matriz extracelular (MEC) de acuerdo con los estímulos recibidos.



**Figura 8:** Las cargas cíclicas generan compresión en la capa superficial del tejido y presión cíclica hidrostática en las capas intermedias y profundas del cartílago articular. Los condrocitos perciben las presiones y generan diversas expresiones de los genes.

### 1.2.2. Aplicación clínica del cultivo de condrocitos

Una aplicación clínica del cultivo de condrocitos es el implante de condrocitos autólogos en el tratamiento de patología del cartílago hialino. Está indicado en lesiones de cartílago sintomáticas focales, del espesor completo. Es recomendable sólo si no hay artritis o es muy leve, para pacientes jóvenes, de entre 15 y 50 años (Couceiro, 2002).

Cuando los condrocitos diferenciados se separan de su matriz extracelular pueden cambiar su fenotipo por un proceso que se conoce como modulación y que ocurre particularmente en los sistemas de cultivo en monocapa. Este sistema de modulación consiste en una interconversión reversible entre células fenotípicamente relacionadas. Estas modulaciones pueden depender de unas interacciones con las células vecinas que podrían ocasionar ciertas señales que, al mismo tiempo, controlarían la secreción de una u otra sustancia. Así pues, tanto los autores citados como Muller en 1977 pudieron demostrar que en el sistema de cultivo en monocapa los condrocitos pueden dejar de segregar colágeno tipo II y sintetizar el colágeno tipo I.

El implante de condrocitos autólogos consta de tres etapas:

1. EXTRACCIÓN DE BIOPSIA DE CARTÍLAGO SANO: Se realiza mediante una artroscopia frecuentemente de rodilla. Se extraen unos 200-300 mg del espesor completo de cartílago sano, mejor del surco intercodíleo aunque tradicionalmente se utiliza una zona marginal superior del cóndilo femoral.
2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LOS CONDROCITOS: Consiste en liberar los condrocitos de su matriz cartilaginosa mediante una digestión enzimática. A continuación son cultivados en monocapa a través de varios subcultivos para su multiplicación. A las tres semanas aproximadamente, se alcanza una población celular 4000 veces superior a la de partida que será implantada en el defecto.
3. IMPLANTE DE LAS CÉLULAS POR ARTROTOMÍA PARAROTULIANA MEDIAL Ó LATERAL

Otras aplicaciones del cultivo de condrocitos es la técnica de ingeniería de tejidos utilizando células en cultivo, factores de crecimiento inductores del fenotipo celular y armazones como estructuras para el desarrollo del tejido. Entre los armazones empleados están los polímeros que pueden ser de origen natural o biológico, como el colágeno o el ácido hialurónico, alginato, xenoinjerto de submucosa, aloinjertos dérmicos; sintéticos, como el poliláctico (PLLA), poliglicólico (PGA), poliláctico-coglicólico (PLGA); de base mineral (THP, HA, sulfato cálcico).

El método de utilización podría ser la inyección de polímeros como el alginato o el óxido de polietileno (PEO) que se entrecruzan químicamente *in situ*.

El almacén ideal debería reunir una serie de requisitos para el adecuado desarrollo tisular entre los cuales estarían una distribución uniforme de células en la estructura tridimensional, que facilite la difusión eficiente de moléculas bioquímicas y el flujo de nutrientes y que sean biocompatibles y reabsorbibles, es decir, que la degradación del mismo se produzca a igual ritmo que el reemplazamiento por el tejido nuevo.

Han surgido algunas inquietudes con el empleo de algunos armazones, respecto a su eficacia para la retención de las células implantadas, la ausencia de efectos inflamatorios locales así como la reducción del contenido de glucosaminoglicanos y la baja eficiencia en el sembrado celular que hace necesario el implante de un número muy elevado de células. También se ha observado una distribución celular irregular así como una mínima retención de las moléculas de la matriz extracelular (Maracci et al, 2005).

### ***1.2.3. Influencia del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) en el cartílago articular***

Es bien conocida la influencia de IGF-I sobre los condrocitos, constitutivos del cartílago tisular, así como los mecanismos de acción por los que lleva a cabo sus efectos en el mantenimiento de la integridad celular, producción de matriz cartilaginosa y proliferación celular.

Numerosos autores han demostrado que la expresión aberrante de IGF-I o una alteración en su señalización producen enfermedades y alteraciones sistémicas en el hombre, como desórdenes del crecimiento, diabetes tipo II y enfermedad cardiovascular, OA, cáncer, senescencia celular. Con la edad, se ha observado una menor respuesta a la estimulación de IGF-I en los tejidos músculo-esqueléticos, incluido el hueso (D'avis et al, 1997; Cao et al, 2007) y el cartílago (Martin et al, 1997; Loeser et al, 2000; Messay et al, 2000), aunque los mecanismos que subyacen a esta disminución de la efectividad de esta hormona son aún desconocidos.

En la introducción de este Trabajo se ha descrito que los avances en el conocimiento de las rutas de señalización intracelular que se desencadenan como consecuencia de la activación del IGFR-I en los condrocitos, puede llevar a la identificación de dianas terapéuticas útiles en la patología de OA que, como es bien sabido, cursa con la degeneración de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso hialino.

Recientes investigaciones han observado que la capacidad de IGF-I de estimular a los condrocitos para producir matriz cartilaginosa disminuye con la edad y en la OA y han pretendido dilucidar los mecanismos por los que la incidencia de esta patología es mayor en la población envejecida (Yin, 2009).

Weihong Yin y colaboradores han planteado la hipótesis de que la edad y la OA producen una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que serían responsables de la interferencia en la señalización normal que tiene lugar en el interior de la célula a partir de la unión de IGF-I a su receptor de membrana. Los citados autores postulan que, niveles elevados de ROS, alteran el equilibrio en la actividad de Akt frente a ERK, segundos mensajeros implicados en las dos principales vías de señalización intracelular en respuesta a la autofosforilación del receptor de IGF-I (IGF-IR) (Yin, 2009).

Dependiendo del tipo celular y del contexto en el que tiene lugar la estimulación con IGF-I, se produce la activación de la vía de señalización de la fosfatidil-inositol-3-kinasa-Akt, que promueve el crecimiento celular, la síntesis de proteínas y/o la supervivencia celular, o bien, la activación de la vía ERK MAPK, que promueve la proliferación celular y/o la transcripción génica.

Resultaría de gran interés clínico el hallazgo de alguna molécula que lograra activar al IGF-IR de forma selectiva; es decir, que activara principalmente la vía del fosfatidil-inositol-3-kinasa-Akt, responsable de la supervivencia de los condrocitos, la promoción de su crecimiento y la síntesis proteica, para contrarrestar la falta de efectividad que experimenta esta vía de señalización en presencia de las ROS como consecuencia del envejecimiento oxidativo.

Los péptidos sintéticos derivados de IGF-I se presentan como posibles respuestas a esta demanda terapéutica para el tratamiento de OA en pacientes de edad avanzada, ya que, según nuestra hipótesis, conseguirían unirse al IGF-IR, estimulando preferentemente una de las dos cascadas de activación e inhibiendo a la otra.



### 1.3. Factor de crecimiento semejante a la insulina Tipo I (IGF-I)

El factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) es una hormona polipeptídica segregada en múltiples tejidos, que ejerce efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos, promoviendo la regulación del crecimiento, desarrollo y diferenciación tisular en el cuerpo humano. Además tiene efecto hipoglucemiante y anabolizante. El 90 % del IGF-I circulante es de origen hepático.

Su existencia fue propuesta inicialmente por Salmon y Daughaday (Salmon et al, 1957). Estos autores comprobaron que el efecto estimulante de la hormona del crecimiento (GH) *in vivo* desaparecía en cultivos *in vitro*. Sin embargo, demostraron la existencia en plasma de una sustancia capaz de estimular el crecimiento del cartílago en cultivo; dicha sustancia desaparecía del torrente sanguíneo al realizar hipofisectomía al animal, volviendo a aparecer al administrar GH de forma exógena, postulando de esta manera que la acción de la GH se realizaba de forma indirecta a través de un factor plasmático, que denominaron *factor de sulfatación*.

Posteriormente, Froesch y colaboradores, en 1963, propusieron el término NSILA-S (*Non Suppressible Insulin Like Activity*) por su analogía funcional con la insulina y su actividad anabólica. Finalmente, se secuenciaron y se identificaron las dos formas de NSILA-S (Rinderknech et al, 1976 y 1978). Posteriormente, se logró identificar y secuenciar las dos formas de NSILA-S, decidiéndose entonces cambiar la terminología por las actuales IGF-I e IGF-II (factores de crecimiento semejantes a la insulina tipo I y II, *Insulin-like growth factors*) para así resaltar tanto las similitudes estructurales con la insulina como su papel en el crecimiento (Rinderknech et al, 1976; Rinderknech et al, 1978). En 1990, Salmon y Daughaday (Salmon et al, 1990) propusieron un modelo por el cual determinadas acciones de la hormona del crecimiento (GH) podrían llevarse a cabo por medio de los IGFs.

IGF-I circula por el torrente sanguíneo unida a sus proteínas transportadoras (IGFBP). Dichas proteínas juegan un papel muy importante en la biodisponibilidad del IGF-I circulante.

Además, algunas IGBP tienen efectos biológicos específicos de forma directa, sin necesitar de la IGF-I, como la inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación celular en algunos tumores, como es el caso de la IGBP-3. La IGBP-3 es la que liga más del 95 % del IGF-I, su producción depende de la GH y del IGF-I, el complejo formado por

IGBP-IGF-I eleva la semivida del IGF-I hasta 15-20 horas, manteniendo un *pool* de IGF-I en el compartimento vascular.

IGF-I actúa en los tejidos uniéndose a un receptor específico localizado en la membrana de las células; este receptor es muy parecido al receptor de la insulina.

En esencia, el IGF-I es un factor anabolizante con efectos tróficos en diferentes órganos y tejidos favoreciendo su crecimiento y desarrollo desde el periodo posnatal.

### 1.3.1. Estructura, síntesis y regulación de IGF-1

El factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 es un polipéptido de cadena simple, formado por 70 aminoácidos, con un peso molecular de, aproximadamente, 7,6 kDa.

La secuencia primaria consta de cuatro dominios: A, B, el dominio C que conecta los anteriores, y el dominio aminoterminal D.

Los dominios A y B son semejantes a los de la insulina y el C al de la proinsulina. Tiene en común con la insulina la conservación de residuos de cisteína y glicina en determinadas posiciones, la existencia de 3 puentes disulfuro, así como, la estructura central hidrofóbica, correspondiente a los dominios A y B. Difiere de la insulina en la ausencia del dominio D en ésta y la existencia de un dominio C hidrofílico (Sara et al, 1990; Rutanen et al, 1990; Langford et al, 1993; Le Roith, 1999). Aunque la estructura secundaria y terciaria de IGF-I no ha sido determinada con precisión, se ha propuesto un modelo tridimensional con analogías a la proinsulina que explican las interacciones con los receptores, sus proteínas transportadoras y su inmunoreactividad (Van den Brande, 1992, 1999; Langford et al, 1993).

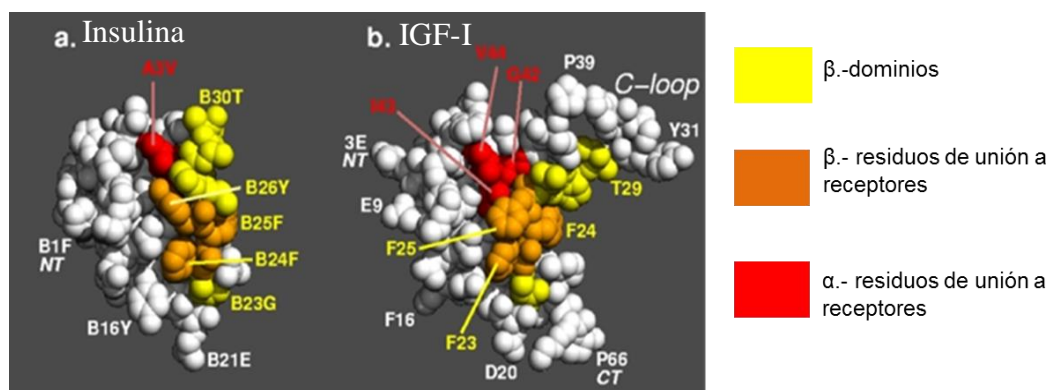


Figura 9: Homología estructural entre insulina e IGF-I

Un dato a destacar es la similitud que presenta la secuencia de aminoácidos del IGF-I en los mamíferos. En los roedores, el dominio A es idéntico y en los dominios restantes solo existen tres aminoácidos diferentes (Sara y Hall, 1990; Van den Brande et al, 1992, 1999).

Se ha identificado una variante natural de IGF-I, la *des(1-3)IGF-I*, que es el mismo péptido sin los tres aminoácidos terminales. Esto le confiere algunas características especiales, como mayor potencia y menor capacidad de unión a IGFBPs (Ballard et al, 1987; Sara et al, 1990; Binoux, 1995, Yamamoto et al, 1995). Se ha identificado una proteasa en suero de rata capaz de generar *des(1-3)IGF-I* a partir e IGF-I intacta.

IGF-I es sintetizado de forma predominante (más del 90 % del IGF-I circulante) en el hígado, como producto de un sólo gen, localizado en el brazo largo del cromosoma 12, que tiene más de 90 Kpb, con al menos 5 exones. La expresión génica es muy compleja, fundamentalmente por la falta de definición del extremo 5' del gen (Ward A et al., 1992). Dicho gen codifica dos formas precursoras distintas de IGF-I, mediante dos ARN de transcripción con regiones 3' diferentes (procedentes de exones distintos); de tal forma que los precursores resultantes, IGF-Ia e IGF-Ib, tienen idénticos péptidos aminoterminales y difieren en la región carboxiterminal, esto es, en el dominio E. El procesamiento posterior puede dar lugar a IGF-I y *des(1-3)IGF-I*, por acción de una proteasa; o sólo IGF-I, sobre el que puede actuar dicha proteasa para formar los compuestos anteriormente descritos (Sara y Hall, 1990).

La regulación de la síntesis de IGF-I sucede en diferentes pasos: en el proceso de transcripción, procesamiento, transporte y estabilidad del ARN; así como en los mecanismos post-transcripcionales (Sara VR y Hall K, 1990). La complejidad del gen hace que el control de su expresión se pueda realizar a múltiples niveles, así como la ruptura de exones alternativos que determina la estructura primaria de la prohormona puede influir en su procesamiento. Además, el lugar de comienzo de la transcripción influye en la longitud y composición de la secuencia peptídica, lo cual puede determinar la cantidad de proteína y potencialmente, el procesamiento intracelular y secreción final de la hormona (Le Roith et al, 2001).

IGF-I se expresa en la mayoría de los tejidos del organismo, siendo variable en las diferentes fases de desarrollo humano. En el feto, las concentraciones titulares de IGF-I están disminuidas, aumentando a lo largo del desarrollo y descendiendo, de nuevo, en edades avanzadas (Xu et al, 1995). En el hígado, la expresión de IGF-I está regulada por la GH principalmente, aunque también influyen otros factores, como son los nutricionales (Sara et al, 1990; Rutanen et al, 1990, Binoux, 1995). En los otros tejidos la

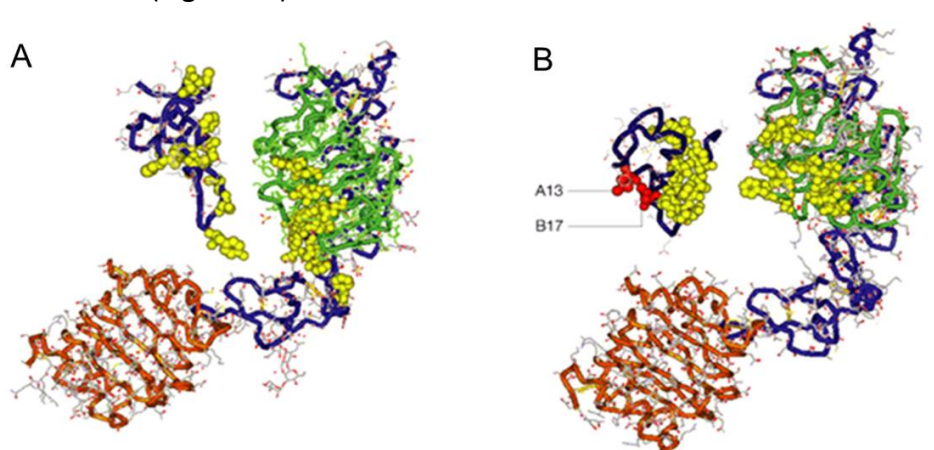
regulación es menos dependiente de GH, dependiendo también de las hormonas tróficas, agresiones y fases del desarrollo. La insulina no parece tener influencia sobre la expresión génica del IGF-I (Sara et al, 1990).

### 1.3.2. Receptores de IGF-I

Así como la estructura y actividad de IGF-I y de la insulina pueden ser equiparables, los receptores de cada una de dichas sustancias son específicos. Los receptores tipo 1 (IGF-IR) son genética y estructuralmente similares al receptor de la insulina (IR), presentando alta afinidad para IGF-I y menor afinidad por la insulina y el IGF-II. Los receptores tipo 2, presentan alta afinidad para IGF-II, aunque también se une IGF-I. Este último puede unirse también a los receptores propios de la insulina, aunque con menos afinidad que a los receptores tipo 1 (Sara et al, 1990; Cohick et al, 1993; Rubin et al, 1995).

Las acciones metabólicas de IGF-I y de insulina son muy diferentes, pero parece que sus respectivos receptores median efectos biológicos similares dentro de la célula en condiciones *in vitro*; por lo que la especificidad de acción de los receptores viene determinada por su expresión tisular (Siddle et al, 2001).

El IR y el IGF-IR, junto al IRR (Insulin-receptor-related receptor), forman un subgrupo de receptores tirosina kinasa, siendo los dos primeros semejantes en un 70 % de su estructura (Figura 10).



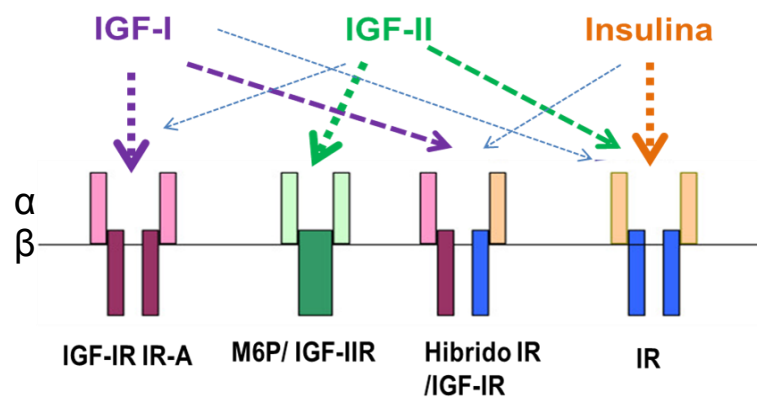
**Figura 10.** (A) Estructura tridimensional del IGF-I y su receptor y (B), insulina y su receptor.

El gen del receptor IGF-I está localizado en el cromosoma 15, consta de 21 exones, 100 Kpb y tiene en común con el de la insulina el tamaño y número de exones. Son diferentes en su partición proteolítica y en los enlaces disulfuro de los monómeros

de pro-receptor que generan receptores maduros con una estructura de subunidades  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ , consistentes en heterodímeros glicoproteicos ( $M_r \approx 300$ - $350$  KDa).

Los IR e IGF-IR son relativamente específicos para sus respectivos ligandos, aunque a altas concentraciones se producen reacciones cruzadas de la insulina con IGF-IR y de IGFs con IR.

El receptor IGF-I posee, al igual que IR, una subunidad extracelular y otra intracelular. La subunidad extracelular o  $\alpha$ , es el lugar de unión a IGF-I. La subunidad  $\beta$ , posee un extremo extracelular y otro intracelular, el cual tiene actividad tirosin-kinasa sobre diferentes sustratos celulares, mecanismo que determinará las acciones biológicas de IGF-I (Cohick et al, 1993; Rubin et al, 1995).

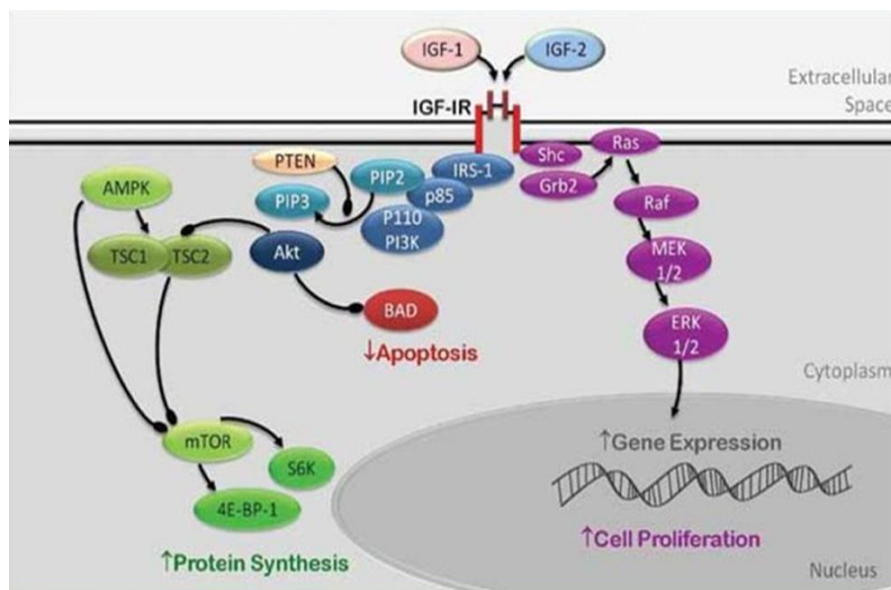


**Figura 11.** Imagen tridimensional de receptores IGF-I (modificada de Wu et al, 2011). El grosor del trazo de las flechas expresa la mayor o menor afinidad.

Estructuralmente el IGF-IR posee seis dominios de aproximadamente 150 aminoácidos, designados como L1, CR (cysteine-rich), L2, Fn1, Fn2 y Fn3. El dominio Fn2 es una estructura de 135 aminoácidos, contiene el lugar de unión entre la subunidad  $\alpha$  y la  $\beta$ . Los dominios L1, CR y L2, constituyen una estructura de unos 462 aminoácidos, se configuran de tal manera que rodean un espacio central donde se localiza una molécula de ligando (Lou M. et al. 2006); sin embargo este fragmento por sí mismo no es capaz de unirse a IGF-I. En la porción intracelular, el dominio TK, se encuentra situado entre los dominios JM (yuxtamembrana) y C-terminal (CT). Los dominios tirosin-Kinasa (TK) son las regiones más altamente conservadas de los receptores, con un 84% de similitud en su cadena de aminoácidos. La activación inducida por el ligando tiene lugar vía trans o autofosforilación intramolecular entre las subunidades  $\beta$ . Los dominios yuxtamembrana (JM) contienen un sitio de autofosforilación en una secuencia Asn-Pro-Glu-Tyr que participa en la unión al sustrato. La función de los dominios CT no está clara; de hecho,

la delección o sobreexpresión de su secuencia no afecta la función del receptor. La mayor divergencia de secuencia de CT en comparación con los dominios TK y JM, le confiere especificidad en las vías de señalización o en la regulación específica del receptor.

Un rasgo diferente de la familia IR/IGFR es la dependencia de la fosforilación de sustratos intracelulares como oposición a la autofosforilación, para el reclutamiento de componentes de la cascada molecular “hacia abajo” (Bernal et al, 1998). Tanto IR como IGF-IR fosforilan sustratos IRS y proteínas Shc con homología Scr/colágeno (p46/p52/p66) activando las cascadas moleculares (Rakatzi et al, 2006) (Figura 12).



**Figura 12.** Segundos mensajeros intracelulares tras la estimulación del receptor del IGF-I

### 1.3.3. Proteínas transportadoras de IGF-I (IGFBPs)

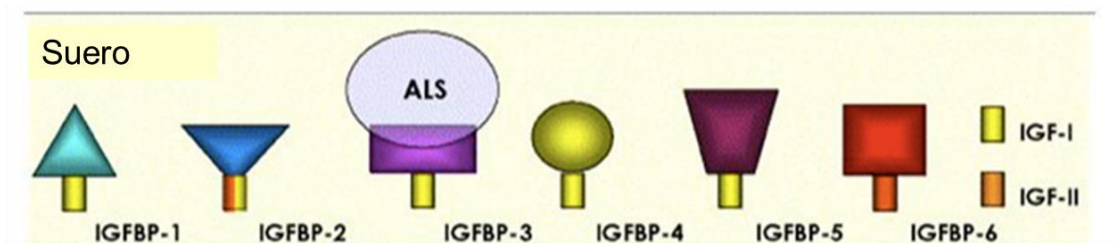
Las acciones de IGF-I están moduladas por sus receptores en los tejidos diana y por sus proteínas transportadoras en el plasma: las IGFBPs (*IGF-binding proteins*), que ligan y transportan de forma específica dichos factores de crecimiento (Rutanen, 1990; Sara, 1990).

Existen 10 variedades de IGFBP, con denominaciones desde IGFBP-1 hasta IGFBP-10, cuya localización cromosómica es 7, 2, 7, 17 y 5 (Baxter, 1989), 12 y 12 (Oh et al, 1997), 6, 8 y 1, respectivamente.

Son péptidos de 200-300 aminoácidos con puentes disulfuro en su interior, que son fundamentales para su unión con IGF-I; y secuencias con carbohidratos, que juegan un papel importante en la interacción con la superficie celular (Cohick W).

El IGF-I circulante se encuentra ligado a las IGFBPs en un 90 % (Yamamoto et al, 1995). La mayor fuente de las IGFBPs circulantes es el hígado. Las IGFBPs se encuentran presentes en prácticamente todos los fluidos biológicos; líquido folicular, líquido amniótico, humor vítreo, linfa, plasma seminal, líquido cefalorraquídeo y en todas las secreciones gastrointestinales. Se expresan en prácticamente todos los tejidos y son secretadas por células normales y transformadas en cultivo, sugiriendo un papel modulador del IGF-I a nivel local y sistémico (Jones et al, 1995).

Existen, al menos 10 proteínas transportadoras, denominadas insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP1-10). En la *Figura 16* mostramos un esquema con las seis proteínas transportadoras de mayor afinidad y su capacidad de unión a IGF-I e IGF-II.



**Figura 13.** Proteínas transportadoras de IGFs-(IGFBPs) de mayor afinidad

Dichas proteínas se localizan en prácticamente todos los fluidos biológicos, secreciones gastrointestinales y en casi la totalidad de tipos tisulares. *In vitro* todas las IGFBPs inhiben la actividad biológica libre, sugiriendo que podrían tener función controladora sobre esta hormona, impidiendo su unión al receptor celular. No sólo se encargan de transportar IGF-I, sino que además controlan su distribución tisular, regulando su disponibilidad y su actividad a nivel celular.

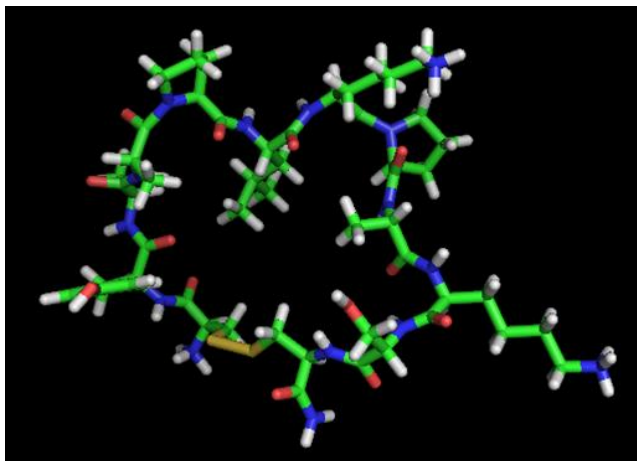
#### 1.3.4. Péptido-1 derivado de IGF-I

La activación del receptor de IGF-I por su ligando, como ya se ha descrito anteriormente, juega un papel central en el crecimiento de la mayoría de los tipos celulares –fibroblastos, células hematopoyéticas, condrocitos, osteoblastos y otras. Sin embargo, IGF-I también puede ser responsable de dramáticos efectos en la proliferación celular, favoreciendo el crecimiento y desarrollo de distintos tipos de cáncer humano.

Zbigniew Pietrkowski y colaboradores han empleado las técnicas de química computacional para diseñar y sintetizar diversos análogos novedosos de IGF-I, capaces de inhibir la autofosforilación del receptor de IGF-I así como el crecimiento de distintos tipos celulares, incluidas células de carcinoma de próstata (Pietrkowski et al, 1992).

Los análogos sintéticos parecen mostrar un gran potencial tanto por su estructura como por su tamaño y topología, con afinidad por IGF-IR, y por consiguiente con actividad celular, pero diseccionando solo determinadas vías de la cascada de señalización de IGF-I. Además, estos análogos peptídicos de IGF-I, por competencia con el ligando, inhibirían la activación del receptor y, por tanto, determinadas rutas de la proliferación celular. Por otro lado, estos análogos mostrarían un perfil diferente y más selectivo de unión a las IGF-BPs lo que supondría un cambio importante frente a IGF-I en lo que a su distribución en los diferentes tejidos se refiere. En resumen, en condiciones controladas, estos análogos podrían ser nuevas estrategias clínicas para el control del crecimiento y de las múltiples vías de señalización celular de IGF-I.

Uno de estos análogos derivados de IGF-I es el péptido-1, conocido en la literatura científica como JB1 (Figura 14). Se trata de un péptido análogo de IGF-I, antagonista del IGF-IR. JB1 es un péptido cíclico formado por 12 aminoácidos, de secuencia: CYAAPLKPAKSC, empleado en investigación en diversos ámbitos para inhibir la actividad de IGF-I impidiendo su unión a IGF-IR. Tiene un peso molecular de 1248,50 Da y su fórmula empírica es:  $C_{55}H_{88}N_{14}O_{15}S_2$ .



**Figura 14:** Estructura tridimensional del péptido-1 (JB1), análogo de IGF-I.

Teniendo en cuenta las dos cascadas de señalización intracelular que se activan como consecuencia de la unión de IGF-I a su receptor y la analogía estructural del péptido-1 con IGF-I, nos planteamos la hipótesis de una posible inhibición selectiva del análogo sintético que consiga inactivar la cascada MEK-ERK, conducente a la proliferación celular, como han probado diversos autores (Pietrzkowski et al, 1992) y, en cambio, una posible activación de la vía Akt, responsable de la producción de proteínas constitutivas de la matriz extracelular.



## OBJETIVOS

El proyecto de este Trabajo Fin de Máster pretende el estudio de la influencia de la administración de diversas dosis de IGF-I y del péptido-1 (JB1), análogo de IGF-I, inhibidor del receptor de IGF-I (IGF-IR), sobre cultivos celulares de condrocitos humanos, con objeto de investigar las rutas de señalización intracelulares que se activarían como consecuencia de la unión de la citada hormona y su derivado sintético al IGF-1R.

Con este fin, hemos cultivado *in vitro* poblaciones celulares de condrocitos y hemos puesto a punto un método de identificación de proteínas mediante inmunodetección por *Western blot* –electroforesis en gel de poliacrilamida con transferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior incubación con anticuerpos específicos- para detectar, mediante quimioluminiscencia, las proteínas de interés en este estudio: IGF-IR total, IGF-IR fosforilado, Akt y ERK.

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### *II.1. Materiales y Métodos*

### Reactivos y anticuerpos

- Medio de cultivo DMEM (Sigma®, Dulbecco's modified Eagle's medium, D5546. Lot. RNBC 2235. Exp 07/2013), suplementado con suero de ternera (FBS) al 10% (Biochrom® AG); glutamina 2mM, nutriente, al 2% (Gibco®); antibióticos, al 1% (Sigma®), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.
- IGF-1 se obtuvo de Igefercia®SL, 2003, CIF B83752097; PM: 7,65 kDa
- Péptido-1 derivado de IGF-1, sintetizado por el Dr. David Andrew del Laboratorio de Péptidos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central de Barcelona; PM: 1248,52 kDa; Secuencia Pep1: CYAAPLKPAKSC
- Trip/EDTA, suministrada por Gibco®
- Buffer de lisis: Ripa, enriquecido con ortovanadato sódico, inhibidor de fosfatasas, al 1% y fluoruro sódico, inhibidor de proteasas, al 1% (Sigma®)
- El Kit ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents de GE Healthcare, de Amersham
- Los anticuerpos provienen de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA): primarios: anti-IGF-1rβ- rabbit MAB y anti-β-actin-goat; secundarios: anti-rabbit y anti-goat.

### Cultivo de condrocitos

El cartílago normal de rodilla humana se obtuvo por donación de tejido sin historial clínico de osteoartritis (OA) del Hospital Público de Parla (Madrid), en intervención quirúrgica realizada por el Dr. Argüello, colaborador en el proyecto de investigación coordinado por el Dr. Forriol.

#### **Procedimiento de disgregación del tejido para la obtención del cultivo primario:**

- (1) La biopsia de cartílago articular se obtuvo por raspado y se seccionó en pequeños cubos de aproximadamente 1-3 mm<sup>3</sup>, con ayuda de bisturí y pinzas estériles.
- (2) Se introdujo el cartílago con las manos, para palpar que no hubiera hueso, en un tubo Falcon de 50 ml con 15 ml de medio de lavado, previamente preparado (500 ml de suero salino con 2 ml de gentamicina, 40mg/ml).
- (3) Después de retirar el suero de lavado, se añadieron 10 ml de una solución de *tripsina* (Lonas Cat. BE17-161E). Se selló el Falcón con parafilm y se dejó en agitación en el baño 15 min, a 37 °C.

- (4) Se retiró la tripsina con ayuda de una pipeta Pasteur con cuidado de no arrastrar los trozos de cartílago.
- (5) Añadir 20 ml de una solución de colagenasa tipo IV (20 ml de medio DMEM (Lonas BE12-614F) al 10% en FBS, 1% en glutamina y 1% en peniestreptomina) con 0,02 g de *colagenasa tipo IV*, Sigma: C5138-5G, con la precaución de filtrarla antes de añadirla al medio). Se selló con parafilm y se dejó en el baño, en agitación a 37 °C, 5 h.
- (6) Transcurrido este tiempo, se recogió todo el líquido posible, sin retirar los trozos de cartílago del fondo, que se trasvasaron a un nuevo tubo Falcón. Si el cartílago no se hubiera disgregado bien, podríamos haber añadido colagenasa para dejarla actuar un par de horas más.
- (7) Se centrifugó durante 5 min, a 500 g, a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante.
- (8) Se resuspendió el *pellet* y se sembraron 10-12 ml por placa Petri, para formar un cultivo primario que, una vez alcanzada la confluencia, se tripsinizó para proceder a su recuento en cámara de Neubauer y su posterior congelación en FBS al 10% en DMSO (di-metil-sulfóxido). Se conservó en un criotubo, en nitrógeno líquido (-169°C).

Los protocolos de cada técnica de laboratorio empleada en este trabajo se describen en Anexo. El manejo de las células en cultivo se realizó siempre en ambiente controlado en la campana de flujo laminar TELSTAR Bio II A de Burdinola®. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific®), a una atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 100%.

***Propagación de las células del cultivo primario en subcultivos:***

- (1) Se descongeló el criotubo que contenía las células obtenidas en cultivo primario, a 37°C y se trasvasó su contenido a un tubo Falcón para añadirle 5 ml de medio DMEM completo (Sigma®, Dulbecco's modified Eagle's medium, D5546, con FBS 10%, glutamina 2% y antibióticos 1%) con objeto de diluir el DMSO, que es tóxico para las células a temperatura ambiente.
- (2) Se centrifugó durante 10 min a 1200 rpm (centrífuga Thermo Scientific®).

- (3) Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 12 ml para sembrar esta suspensión de células en 2 *flask* 75, para formar un subcultivo, que fue el pase 2 (#2).

Se han realizado sucesivos pases a los cultivos, una vez alcanzada una confluencia de, al menos, el 80%. Hemos hecho, hasta el momento, 9 pases.

El seguimiento de los cultivos se llevó a cabo por observación de las células en microscopio invertido Leica®, con cámara fotográfica incorporada regulable desde el *software* Leica LAS EZ 3.0 (*microscope imaging software*). Además, en cada pase se procedió al recuento en cámara de Neubauer, tal como se describe en el protocolo recogido en Anexo. Se sembraron, al menos, 600.000 células por cada nueva placa.

Para el mantenimiento de los cultivos se procedió al cambio total del medio de cultivo DMEM completo -suplementado con FBS 10%, glutamina 2% y antibióticos 1%-, calentado previamente a 37°C para evitar cambios bruscos de temperatura para las células en cultivo, cada 3-4 días.

### **Estudios de señalización de condrocitos:**

#### **Tratamiento con IGF-I**

Se realizaron experimentos en cultivos de condrocitos crecidos en monocapa en 6 placas Petri, con una confluencia del 80-90%. El diseño de la prueba consistió en el tratamiento con distintas dosis de IGF-I (5nM y 10nM) por un tiempo de 30 y 60 minutos para cada dosis, dejando 2 de las placas como controles que no recibieron tratamiento.

Se empleó la técnica de inmunodetección por *Western blot*, como se describe en el protocolo del Anexo. En resumen, la cantidad total de proteína en cada placa se obtuvo de la siguiente manera:

- (1) Se retiró el medio de cultivo de cada placa, a los 30 min del inicio del experimento, a 3 placas (control, 5nM IGF-I y 50 nM IGF-I ) ó, a los 60 min, a las otras 3, según el diseño ya descrito. Se lavó con PBS.
- (2) Se añadieron 200 µl de *buffer* de lisis Ripa enriquecido con un inhibidor de proteasas (fluoruro sódico) y de fosfatasas (ortovanadato sódico), de Sigma®, a cada placa. Con ayuda del émbolo de una jeringa, se raspó la base de cada placa para arrastrar las células. Este volumen con fragmentos de células en

suspensión se llevó a tubos *ependorf* de 1,5 ml, previamente rotulados con las condiciones del experimento, en frío. Se llevaron, después, a -80°C.

- (3) Para proceder a la cuantificación de proteína de cada muestra, se descongelaron los tubos *ependorf* en hielo y se centrifugaron 15 min, a 3000 rpm. Se recogió el sobrenadante (incluye las proteínas) en tubos nuevos y se desechó el tubo con el *pellet*.
- (4) El volumen recogido de cada tubo *ependorf* se alicuotó distribuyendo 50 µl en tubos de 0,5 ml, en frío.
- (5) Se empleó el método de Bradford para la cuantificación de proteína de cada muestra, preparando previamente una curva de calibrado con soluciones de concentración conocida de BSA y determinación de las lecturas de absorbancia a 630 nm en espectrofotómetro Varioscan de Scanlab® (véase protocolo de cuantificación según el método de Bradford en Anexo).
- (6) Se prepararon las muestras para comenzar la técnica de *Western blot* para la separación de proteínas mediante electroforesis, según se describe en Anexo, haciendo los cálculos oportunos de manera que en cada pocillo del gel de poliacrilamida donde se llevaría a cabo la electroforesis, hubiera un volumen de 20 µl de muestra que contuviera 15 µg de proteína. Se añadió la cantidad conveniente de *buffer* que contiene β-mercaptoetanol y azul de bromofenol como marcador del frente de electroforesis (*electrophoresis sample buffer*), para desnaturalizar y solubilizar las proteínas. Además, se llevaron 5 min a 95°C en Termobloc, Accublok® (digital dry bath labnet), para completar la desnaturalización. A continuación, se les aplicó un pulso en la centrífuga Minispin, de Eppendorf®.
- (7) Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) (cfr. Anexo) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) que, tras la tinción con rojo Ponceau para asegurar la eficacia de la transferencia, se incubó con anticuerpos específicos para la actina y para IGF-IR. A saber, después de la adición del tampón de bloqueo con leche en polvo (caseína) al 5% en TBS-Tween, se realizó la incubación con el anticuerpo primario del control positivo (actina) y del IGF-IR, a una concentración de anticuerpo 1:1000, durante toda la noche, a 4°C en agitación suave. A la mañana siguiente, tras los lavados descritos en Anexo con TTBS, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (1:2000),

durante 1h, en las mismas condiciones de agitación y temperatura, tras los cuales se lavó la membrana para proceder al revelado.

- (8) La detección de la señal se llevó a cabo por quimioluminiscencia, mediante el kit ECL plus (GE Healthcare, de Amersham) en un transiluminador MF-ChemiBIS 3.2 (Grupo Taper), con cámara de sensor CCD y resolución de 3,2Mpixels (2.184 x 1.510) y luz ultravioleta, controlada desde el software *Genesys*, con análisis de la imagen: TL-100 para 1D de *Nonlinear Dynamics*.

#### ***Tratamiento con péptido-1 inhibidor de IGF-I***

El experimento consiste en administrar dosis conocidas de péptido-1 inhibidor de IGF-I (100 ng/ml, 500 ng/ml y 1 µg/ml), en 6 placas, durante 1 h. En 3 de ellas, se añadirá a los 30 min de inicio del experimento, una dosis 50 nM de IGF-I. Habrá 2 placas control: en una de ellas no habrá péptido-1 ni adición de IGF-I; en la otra, no habrá péptido-1 pero se adicionará IGF-I a los 30 min de inicio de la prueba.

Pretendemos observar si tiene lugar una inhibición de la fosforilación del IGF-IR como consecuencia de la adición del péptido-I, así como observar las bandas correspondientes a Akt fosforilado y a ERK fosforilado.

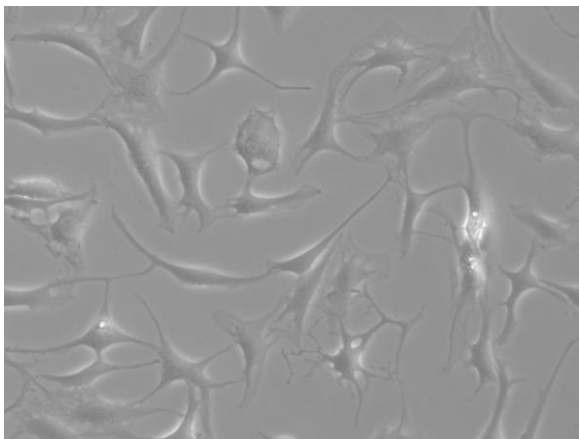
Una vez realizado el experimento se procederá a la recogida de proteína con *buffer* de lisis para, posteriormente, separarlas mediante la técnica de *Western blot* por electroforesis en gel, transferencia a una membrana de nitrocelulosa e incubación con los anticuerpos específicos de IGF-IR fosforilado, Akt fosforilado y ERK fosforilado.

## II.2. Resultados

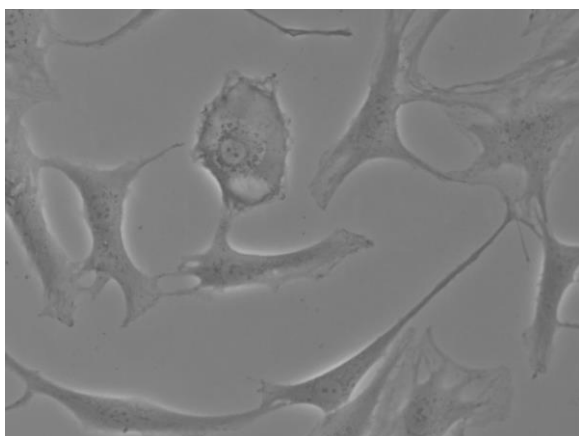
### Cultivo de condrocitos

La observación de las células crecidas en cultivo se llevó a cabo mediante el microscopio invertido Leica<sup>®</sup>, con cámara fotográfica integrada, regulada mediante el *software* LAS EZ, como se ha descrito en el capítulo anterior, que permitió obtener fotografías para el seguimiento de la evolución de los sucesivos subcultivos de condrocitos.

Como muestra, recogemos en esta memoria varias imágenes de condrocitos crecidos *in vitro*, en distintos subcultivos. Las figuras 15 y 16 muestran fotografías de cultivos en pase 2, con una morfología estrellada característica, debida a las prolongaciones citoplasmáticas que se adhieren al sustrato. La mayoría de los tipos celulares crecen en cultivo adheridas a un sustrato. El seguimiento del cultivo al microscopio permite observar, también, la ausencia de artefactos o contaminación microbiana.



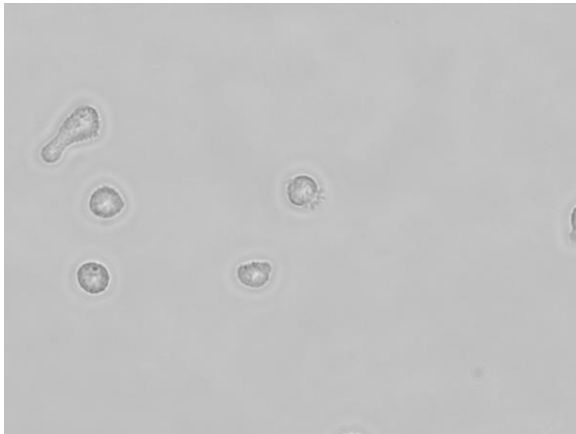
**Figura 15:** Fotografía en microscopio invertido Leica<sup>®</sup> (10x), de un cultivo de condrocitos en pase 2, a los 7 días de la siembra.



**Figura 16:** Fotografía en microscopio invertido Leica<sup>®</sup> (20x), de un cultivo de condrocitos en pase 2, a los 7 días de la siembra.



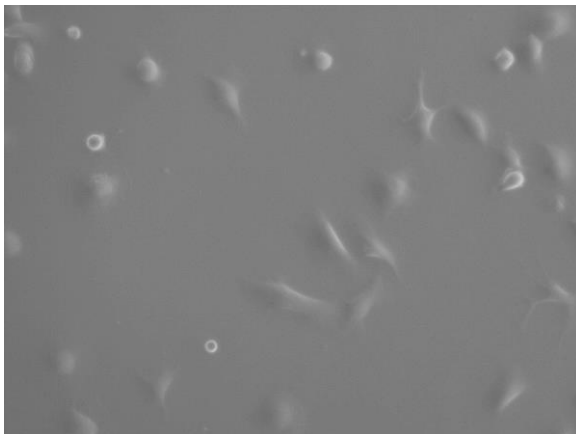
Una vez alcanzada una confluencia aproximada del 80%, procedimos rutinariamente al levantamiento de las células mediante la técnica de tripsinización, como se describe en Anexo, para poder propagarlas en otras placas de cultivo. Para comprobar si las células se despegaban del sustrato, una vez transcurridos los 5 min de incubación a 37 °C con la solución de tripsina, observamos que hubieran adquirido una morfología redondeada y brillante, al microscopio, como muestra la figura 17.



**Figura 17:** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos, tras la tripsinización de un pase 3. Se observan las células despegadas del sustrato, a los 5 min de incubación con tripsina.

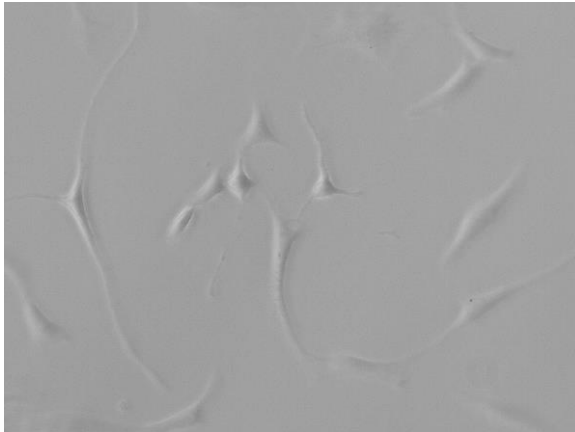
Procedimos, por tanto, a la tripsinización de los 2 *flasks* de células en pase 3, de confluencia semejante, aproximada al 80%, en observación al microscopio. El contenido de uno de ellos, se preparó para su congelación y conservación para posteriores usos. Y, el otro, tras el recuento en cámara de Neubauer que mostró un valor de 997.500 células –aproximadamente 1 millón–, fue resuspendido en medio de cultivo DMEM para su propagación en 3 nuevos *flasks* de pase 4.

Transcurridas varias horas desde la siembra, observamos al microscopio el fenómeno incipiente de adherencia de las células al sustrato para su crecimiento (Figura 18).

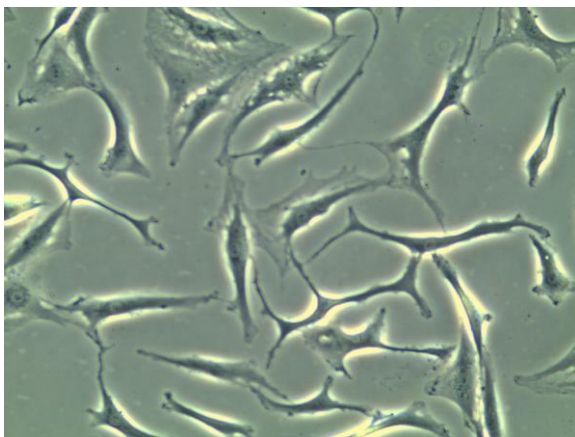


**Figura 18:** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 3, a las 4 h de la siembra. Se observan algunas células con prolongaciones citoplasmáticas adhiriéndose al sustrato.

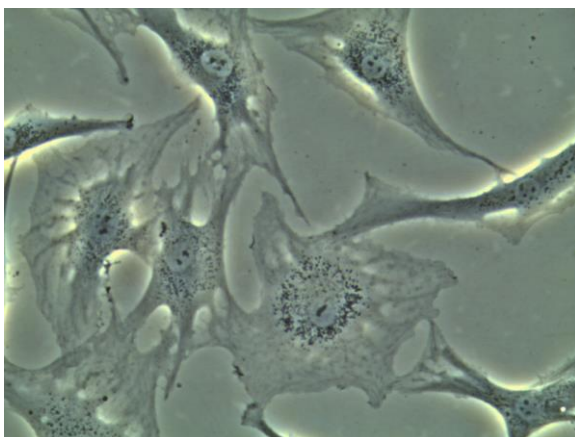
Se realizaron sucesivos pases. Las figuras 19 y 20 muestran uno de los cultivos en pase 4, a los 3 días de la siembra y a los 10 días, respectivamente. Para el mantenimiento de las células en cultivo, se renovó completamente el medio DMEM, cada 3-4 días.



**Figura 19:** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 4, a los 3 días de la siembra. Se observa una confluencia baja, aproximadamente de un 30-40%.



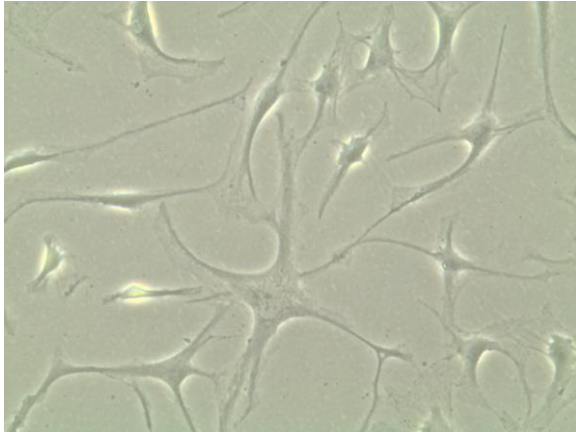
**Figura 20 (a):** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 4, a los 10 días de la siembra. Se observa una confluencia del 80-90%.



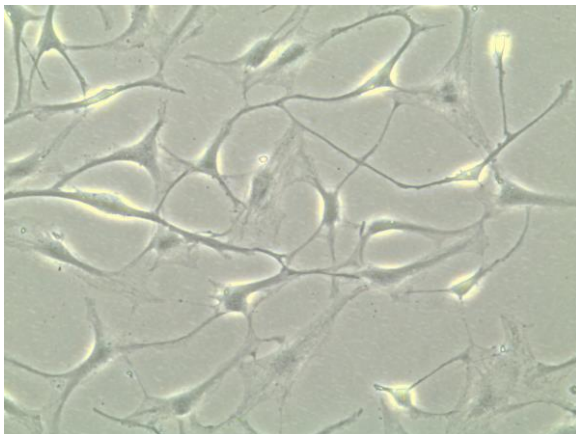
**Figura 20 (b):** Fotografía 20x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 4, a los 10 días de la siembra. Se observa una confluencia del 80-90%.

Las dos placas de cultivo de pase 7 se tripsinizaron y se contaron en la cámara de Neubauer. Una de las placas contenía 779.800 células y, la otra, 700.000 células. El total de células, 1.479.800, se resuspendió en 8 ml de medio DMEM para sembrar 8 placas de pase 8 (184.975 células/placa).

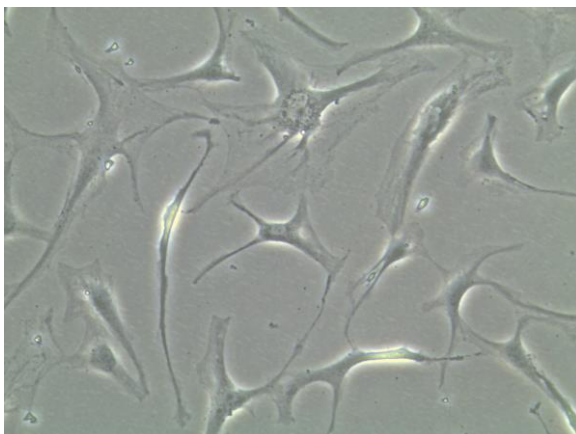
La figura 21 muestra las imágenes de diversas placas de cultivo de condrocitos de pase 8, a 10x, en microscopio invertido Leica®.



**Figura 21 (a):** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 8, a los 7 días de la siembra. Se observa una confluencia del 70-80%.

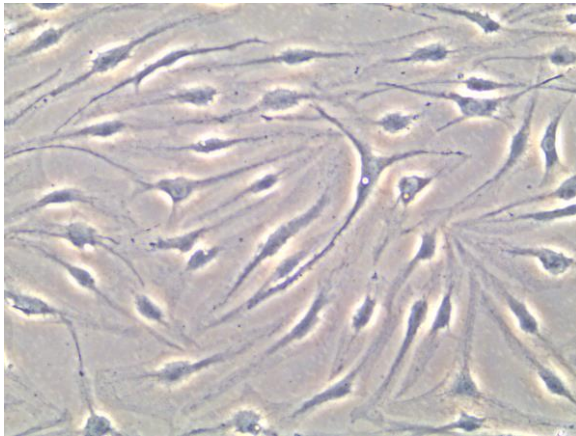


**Figura 21 (b):** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 8, a los 7 días de la siembra. Se observa una confluencia del 80%.

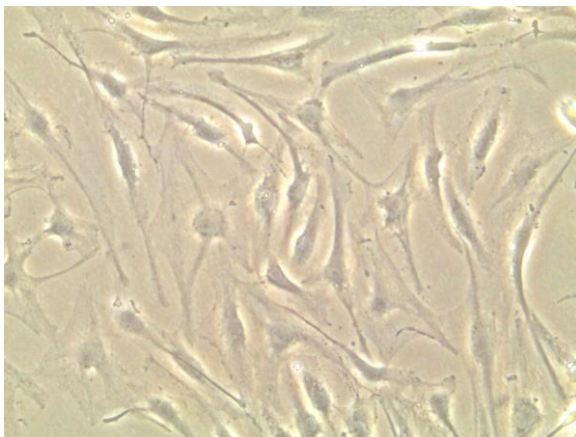


**Figura 21 (c):** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 8, a los 7 días de la siembra. Se observa una confluencia del 70-80%.

El subcultivo 8 ha experimentado un crecimiento más lento que los anteriores pases ya que, hasta el día 18 de la siembra, no alcanzó la suficiente confluencia como para realizar la tripsinización y propagación de las células a un número suficiente de placas que nos permita realizar los próximos experimentos con el péptido-1, análogo de IGF-I. Se muestran a continuación las imágenes del cultivo en pase 8, a los 18 días de la siembra (Figura 22).



**Figura 22 (a):** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 8, a los 18 días de la siembra. Se observa una confluencia del 90%.



**Figura 22 (b):** Fotografía 10x (Leica®) de un cultivo de condrocitos en pase 8, a los 18 días de la siembra. Se observa una confluencia del 90-95%.

Se tripsinizaron las células de las 8 placas de cultivo en pase 8 y se contaron en la cámara de Neubauer. El recuento total de las células de las 8 placas fue de 15.285.600 de células, que se resuspendieron en 24 ml para sembrar 24 placas Petri (636.900 células/placa) que darían lugar al subcultivo 9.

## *Estudios de señalización de condrocitos*

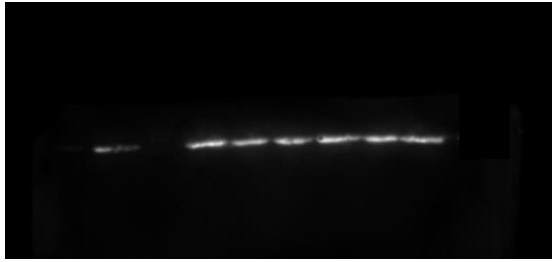
### **Tratamiento con IGF-I**

Se cultivaron los condrocitos para su propagación en fase 7, en 6 placas Petri y, cuando alcanzaron la confluencia, se administró el tratamiento con dosis diversas de IGF-I: 5 nM y 50 nM, en un tiempo de incubación de 30 y de 60 min.

Tras la recogida y tratamiento de la muestra de proteína, se procedió al ensayo de inmunodetección por *Western blot* comenzando por la electroforesis en gel (PAGE-SDS), seguida de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó con anticuerpos específicos y se analizó mediante quimioluminiscencia (cfr. Anexo: 5.5 Análisis).

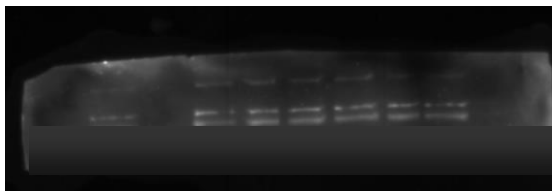
Se muestran a continuación las fotografías tomadas desde la cámara del transiluminador MF-ChemiBIS 3.2 (Grupo Taper), regulada desde el software *Genesys* (Figuras 22 y 23). La figura 22 corresponde a la membrana de transferencia incubada con anticuerpo primario anti- $\beta$ -actin-goat (1:1000) y, secundario, anti-goat (1:2000), como control de calidad del *Western blot*. La intensidad de luz revelada es homogénea en la banda de actina (45 kDa). Esto indica que las muestras cargadas en el gel contenían, como requiere esta técnica, la misma cantidad de proteína, ya que la actina está codificada por un gen que la célula sintetiza de forma constitutiva en niveles basales de expresión de proteína. Como es bien sabido, se trata de una proteína globular que forma los microfilamentos del citoesqueleto celular, tanto en su forma polimerizada como no polimerizada. Las funciones de los microfilamentos de actina son la contracción muscular, la formación de pseudópodos, el mantenimiento de la morfología celular y, en la citocinesis de células animales, forma un anillo contráctil que divide la célula en dos.

La cantidad de actina es constante en cada tipo celular, independientemente de las condiciones del experimento al que se sometan las células. Por tanto, la observación de una señal semejante de actina en los distintos carriles de una membrana de *Western blot*, indica que la cantidad total de proteína cargada en cada pocillo ha sido la misma.



**Figura 22:** Fotografía de detección de actina (45 kDa) por quimioluminiscencia en transiluminador MF-ChemiBIS 3.2, tras la incubación de la membrana de nitrocelulosa con anticuerpo primario anti- $\beta$ -actin-goat (1:1000) y anticuerpo secundario, anti-goat (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

La figura 23 muestra la imagen del revelado fotográfico de la membrana de transferencia incubada en presencia del anticuerpo primario específico del receptor de IGF-I (IGF-IR), anti-IGF-1 $\beta$ - rabbit MAB (1:1000) y su anticuerpo secundario, anti-rabbit (1:2000).



**Figura 23:** Fotografía de detección de IGF-1R (95 kDa) total por quimioluminiscencia en transiluminador MF-ChemiBIS 3.2, tras la incubación de la membrana de nitrocelulosa con anticuerpo primario anti-IGF-1 $\beta$ - rabbit MAB (1:1000) y anticuerpo secundario, anti-rabbit (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

El carril de la izquierda corresponde al marcador de peso molecular *Kaleidoscope* y *Precision Plus Protein Standards Dual Color*. De izquierda a derecha, tal como se describe en Anexo (cfr. Anexo 4. Técnica de electroforesis), los carriles del gel corresponden con las siguientes muestras del experimento con IGF-I:

1º pocillo: 4  $\mu$ l de **control de carga** (control de PM). El avance del frente de electroforesis, dio lugar a un despliegue de bandas de colores que sirven de referencia de cada PM.

2º pocillo: **Muestra 1** (C-30'), placa control de condrocitos, a la que no se ha administrado tratamiento con IGF-1; se procedió al lisado de las células a los 30 min de iniciar el experimento.

3º pocillo: **Muestra 2** (C-60'). Muestra de la placa control, lisada a los 60 min.

4º pocillo: **Muestra 3** (5nM-30'). Placa a la que se administró una dosis 5nM de IGF-1 y se dejó en incubación a 37º durante 30 min.

5º pocillo: **Muestra 4** (5nM-60'). Placa con dosis 5nM de IGF-1, a 37º, 60 min.

6º pocillo: **Muestra 5** (50nM-30'). Placa con dosis 50nM de IGF-1, a 37º, 30 min.

7º pocillo: **Muestra 6** (50nM-60'). Placa con dosis 50nM de IGF-1, a 37º, 60 min.

Las bandas correspondientes al IGF-IR total presentan una intensidad de luz parecida en todas las muestras del experimento llevado a cabo con IGF-I. Esto demuestra que la cantidad de receptor de IGF-I es muy parecida en todas ellas ya que, en estas condiciones de dosis y duración breve del tratamiento, su expresión no se modifica por la presencia de IGF-I. Se necesitaría, quizás, un tiempo de tratamiento más prolongado para poder observar una variación en la expresión del receptor como consecuencia de la acción de IGF-I.

Sin embargo, cabría pensar que la forma activa del receptor de IGF-I sí se vea modificada por la presencia de su ligando en estas condiciones experimentales. Es decir, que probablemente el tratamiento con IGF-I sólo modifique la forma fosforilada de este receptor de tipo tirosina-kinasa, que es su forma activa. Para observar este fenómeno de activación del receptor de IGF-I por la unión a su ligando, en los próximos experimentos haremos el ensayo de detección de IGF-IR fosforilado.

Además, los ensayos de tratamiento con IGF-I y con péptido-1, descritos anteriormente, permitirán esclarecer las principales vías de señalización intracelular que se activan o inhiben en presencia de estos ligandos, por la detección de segundos mensajeros, Akt y ERK, fosforilados.

Estudiaremos, también, el efecto de la acción prolongada (48 h) de IGF-I sobre los parámetros morfológicos de los condrocitos, esto es, en la proliferación celular. Y observaremos el posible aumento en la expresión del receptor total de IGF-I como consecuencia de ese tratamiento prolongado.

En la figura 23, por otra parte, se observa que la banda del IGF-IR aparece desdoblada en dos líneas paralelas de parecido peso molecular, de aproximadamente 95 kDa. Podría deberse a la existencia de dos isoformas del receptor de IGF-I en los condrocitos. No es un fenómeno inusual que aparezcan ligeras variaciones de un mismo receptor que dan lugar a señales próximas.

## II.3. Discusión

### *Cultivo de condrocitos*

Se han obtenido subcultivos *in vitro* de condrocitos humanos en condiciones válidas para el desarrollo de experimentos con factores hormonales como IGF-I y péptido-1 (JB1), análogo de IGF-I. El seguimiento de estos cultivos se ha llevado a cabo mediante observación en microscopio invertido y recuento celular en cada pase, que asegurara los parámetros morfológicos imprescindibles para la viabilidad de los subcultivos.

La velocidad de crecimiento de los condrocitos en cultivo, conforme al patrón típico de proliferación celular con respecto al tiempo, ha sido inversamente proporcional al número de pases realizados. Así, el subcultivo 8 ha tardado 8 días más en alcanzar una confluencia del 80-90% (18 días desde la siembra) que el pase 4, que tardó sólo 10 días en alcanzar este estado de confluencia.

Los equipos empleados en el proceso de crecimiento y conservación de los cultivos, así como las buenas prácticas de asepsia en el laboratorio, han evitado la contaminación de los cultivos celulares durante los pases sucesivos realizados hasta el momento.

### *Estudios de señalización de condrocitos*

Los experimentos con diversas dosis de IGF-I nos han permitido poner a punto la técnica de detección del IGF-IR en condrocitos humanos crecidos en cultivo, mediante la técnica de inmunodetección por *Western blot*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) y transferencia a membrana de nitrocelulosa con detección de proteínas mediante incubación con anticuerpos específicos para su análisis por quimioluminiscencia.

No hemos observado variaciones significativas en la expresión total del IGF-IR en las condiciones experimentales de tratamiento. Sin embargo, son necesarios ensayos de detección del IGF-IR fosforilado para probar la activación del receptor como consecuencia de la unión de su ligando. Por tanto, los próximos experimentos de condrocitos *in vitro* con IGF-I y péptido-1, análogo de IGF-I, permitirán observar la activación del IGF-IR mediante la detección del receptor fosforilado, así como la posible fosforilación de los segundos mensajeros Akt y ERK, como consecuencia de la unión de cada uno de estos ligando al IGF-IR.



## II.4. Conclusiones

- (1) Se han obtenido subcultivos *in vitro* de condrocitos humanos en condiciones válidas para el desarrollo de experimentos con factores hormonales como IGF-I y péptido-1 (JB1), análogo de IGF-I.
- (2) La velocidad de crecimiento de los condrocitos en cultivo, conforme al patrón típico de proliferación celular con respecto al tiempo, ha sido inversamente proporcional al número de pases realizados.
- (3) Para completar la caracterización de los parámetros morfológicos de los condrocitos en cultivo, es conveniente el estudio comparativo de proliferación celular de estas células en presencia de IGF-I y péptido-1, inhibidor de proliferación celular.
- (4) Los experimentos con diversas dosis de IGF-I nos han permitido poner a punto la técnica de detección del IGF-IR en condrocitos humanos crecidos en cultivo, mediante la técnica de inmunodetección por *Western blot*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) y transferencia a membrana de nitrocelulosa con detección de proteínas mediante incubación con anticuerpos específicos para su análisis por quimioluminiscencia.
- (5) No hemos observado variaciones significativas en la expresión total del IGF-IR en las condiciones experimentales de tratamiento. Sin embargo, son necesarios ensayos de detección del IGF-IR fosforilado para probar la activación del receptor como consecuencia de la unión de su ligando.
- (6) Próximos experimentos completarán la caracterización bioquímica de los condrocitos *in vitro* por la detección de segundos mensajeros fosforilados implicados en las cascadas intracelulares de señalización: Akt y ERK, como consecuencia del tratamiento con IGF-I y con péptido-1 (JP1).

## **BIBLIOGRAFÍA**

Afoke NYP, Byers PD, Hutton WC (1987) Contact pressures in the human hip joints. *Journal of Bone Surgery* 69B: 536-41

Ateshian VC y Wang GAH (1995) A theoretical solution for the frictionless rolling contact of cylindrical biphasic articular cartilage layers. *Journal of Biomechanics* 28: 1341

Augusti-Tocco G y Sato G (1969) Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64: 311

Bader J, Mast-Gerlach E, Popović M, Bajpai R y Stahl U (2010) Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *J Appl Microbiol* 109 (2): 371–387

Ballard FJ, Francis GL, Ross M, Bagley CJ, May B, y Wallace JC (1987) Natural and synthetic forms of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and the potent derivative, destripeptide IGF-1: biological activities and receptor binding. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 149: 398-404

Baxter RC y Martin JL (1989) Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86: 6898-6902

Bay-Jensen AC, Andersen TL, Charni-Ben Tabassi N, Kristensen PW, Kjarsgaard-Andersen P, Sandell L et al (2007) Biochemical markers of type II collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*

Berk AJ y Sharp PA (1977) Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* 12 (3): 721–732

Binoux M (1995) The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab* 21: 330-337

Cao JJ, Kurimoto P, Boudignon B, Rosen C, Lima F y Halloran BP (2007) *J. Bone Miner. Res.* 22: 1271–1279

Cohick WS y Clemmons DR (1993) The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol* 55: 131-153

Couceiro FJ, Carpintero AP y Silva RMT (2002) Cultivo de condrocitos. *Ortop Traumatol* 5: 436-43

Chahine NO, Ateshian GA y Hung CT (2007) The effect of finite compressive strain on chondrocyte viability in statically loaded bovine articular cartilage. *Biomechanics Model Mechanobiology* 6: 103-11

D'avis PY, Frazier CR, Shapiro JR y Fedarko NS (1997) *Biochem. J.* 324, 753–760

De Croos JNA, Dhaliwal SS, Grynblas MD, Pilliar RM y Kandel RA (2006) Cyclic compressive mechanical stimulation induces sequential catabolic and anabolic gene changes in chondrocytes resulting in increased extracellular matrix accumulation. *Matrix Biology* 25: 323-31

Eagle H (1955) The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. *J Biol Chem.* 214(2): 839–852

Froesch ER, Zapf J, Audhya TK, Ben-Porath E, Segen BJ y Gibson KD (1976) Nonsuppressible insulin-like activity and thyroid hormones: major pituitary-dependent sulfation factors for chick embryo cartilage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A;*73: 2904-2908

Green H, Kehinde O y Thomas J (1979) Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA,* 76: 5665–5668

Grey G, Coffman W y Kubicek M (1952) *Cancer Res.* 12: 264

Hay RJ y Strehler BL (1967) The limited growth span of cell strains isolated from the chick embryo. *Exp. Gerontol.* 2: 123-135

Hayflick L y Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25: 585-621

Jones JI, Doerr ME y Clemmons DR (1995) Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFFBPs. *Prog Growth Factor Res* 6 (2-4): 319-27

Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Saamanen AM y Helminen H (1988) Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *Journal of Orthopaedics Research* 6:188-95

Köhler G y Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495-497

Krishnan R, Mariner EN y Ateshian GA (2005) Effect of dynamic loading on the frictional response of bovine articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 38: 1665-73

- Langford KS y Miell JP (1993) The insulin-like growth factor-I binding protein axis: physiology, pathology and therapeutic manipulation. *Eur J. Clin invest*; 23: 503-516
- Lara-Arias J, Mendoza-Lemus OF, Martínez-Rodríguez H, Álvarez-Lozano (2009) Implante de condrocitos autólogos en un defecto osteocondral en la articulación del tobillo. Reporte de un caso. *Medigraphic* 5 (4): 354-360
- Le Roith D (1999) Although both rhGh and rhIGF-I have the potential to provide clinical benefit, each also has the potential to produce unwanted side-effects. *Growth Horm. IGF.Res.* 9: 83
- Le Roith D and Butler AA (1999) Insulin-like growth factors in pediatric health and disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84:4355-4361
- Le Roith D, Karas M, Yakar S, Qu BH, Wu Y y Blakesley VA (1999) The role of the insulin-like growth factors in cancer. *Isr. Med. Assoc. J.* 1: 25-30
- Le Roith D (1999) Insulin-like growth factor. *Horm. Metab Res.* 31: 41-42
- Levi-Montalcini R y Calissano P (1979) The nerve-growth factor, *Scientific American* 240: 68-77
- Leyva-Cobián F (1985) Los cultivos celulares *in vitro*: cien años después. Editorial de *Inmunología* 4 (3): 7-11
- Loeser RF, Shanker G, Carlson CS, Gardin JF, Shelton BJ y Sonntag WE (2000) *Arthritis Rheum.* 43: 2110–2120
- Lotz M, Blanco FJ, Von Kempis J, Dudler J, Maier R, Villiger PM y Geng Y (1995) Cytokine regulation of chondrocyte function. *Journal of Rheumatology* 43: 104-8
- Maracci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L., Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G y Zanasi S (2005) Articular cartilage engineering with Hyalograft® C. 3 year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 435: 96-105
- Martin JA, Ellerbroek SM y Buckwalter JA (1997) *J. Orthop. Res.* 15: 491–498
- Messai H, Duchossoy Y, Khatib AM, Panasyuk A y Mitrovic DR (2000) *Mech. Ageing Dev.* 115: 21–37

Mobasheri A (2009) Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: Applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy. *Histology and histopathology: cellular and molecular biology* 24, 1-3: 347-366

Mow VC, Ateshian GA (1997) Lubrication and wear of diarthrodial joints. In: Mow VC, Hayes WC. Ed. Basic Biomechanics. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 275-315

Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I y Mainil-Varlet P (2006) Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 300-22

Oh-Y, Nagalla S, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E y Rosenfeld RG (1996) Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-7). Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and IGF-II. *J Biol Chem* 29:271 (48): 30322-5

Papadopoulou AK, Papachristou DJ, Chatzopoulos SA, Pirttiniemi P, Papavassiliou AG y Basdra EK (2007) Load application induces changes in the expression levels of Sox-9, FGFR-3 and VEGF in condylar chondrocytes. Federation of European Biochemical Societies. *FEBS Letters* 581: 2041-6

Pietrzkowski Z, Wernicke D, Porcu P, Jameson BA y Baserga R (1995) Inhibition of cellular proliferation by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. *Cancer Research* 52: 6447-6451

Pontén J y Westermarck B (1978) Properties of human malignant glioma cells in vitro. *Med Biol.* 56 (4): 184-193

Rakatzi I, Stosik M, Gromke T, Siddle K y Eckel J (2006) Differential phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 by insulin and IGF-I receptors. *Arch.Physiol Biochem.* 112: 37-47

Rinderknech E y Humbel RE (1978) The amino acid sequence of human insulin like growth factor and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 2769-2772

Rinderknech E y Humbel RE (1978) Primary structure of human insulin like growth factor II. *FEBS Lett* 89: 283-287

Rubin RY y Baserga R (1995) Biology disease. Insulin-like growth factor-I receptor. *Lab Invest* 73: 311-331

Rutanen ME y Pekonen F (1990) Insuline-like growth factors and their binding proteins. *Acta Endocrinologica* (Copenh) 123: 7-13.

Salmon WD, Jr. y Daughaday W H (1948) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab Clin. Med.* 957; 49: 825-836

Sanford KK, Earle WR y Likely GD (1948) The growth *in vitro* of single isolated tissue cells, *J. natn. Cancer Inst.* 9: 229-246

Sara VR y Hall K (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev.* 70: 591-614

Seedhom BB y Wallbridae NC (1985) Walking activities and wear of prostheses. *Annals of the Rheumatic Diseases* 44: 838-43

Siddle K, Urso B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH y Soos MA (2001) Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem.Soc.Trans.* 29: 513-525

Takeda S (2005) Central control of bone remodeling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328: 697-9

Van den Brande JL (1999) A personal view on the early history of the insulin-like growth factors. *Horm. Res.* 51 Suppl 3: 149-175

Van den Brande JL (1992) Structure of the human insulin like growth factors: relationship to function. En: *The Insulin-like growth factors. Structure and biological functions.* Schoffield PN Ed, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, p: 12-43

Wacher MC (2012) Ventajas del uso de Cocultivos en Biotecnología, *BioTecnología* 16: 1

Xu X, Bennett SA, Ingram RL y Sonntag WE (1995) Decreases in growth hormone receptor signal transduction contribute to the decline in insulin-like growth factor I gene expression with age. *Endocrinology* 136: 4551-4557

Yamamoto H y Murphy LJ (1995) Enzymatic conversion of IGF-I to des(1-3)IGF-I in rat serum and tissues: a further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *J.Endocrinol.* 146: 141-148

Yin W, Park JI y Loeser RF (2009) Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation

of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 284, (46): 31972–31981