

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



**Efectos de la co-estimulación con corticoides e IL-6 sobre la expresión y secreción de VEGF A en condrocitos murinos en etapa de diferenciación hipertrófica.**

**Ricardo Andrés Henríquez Flores**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLOGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dr.(a) Julia Guerrero**

**Director de Tesis: Prof. Dr.(a) Annelise Goecke**

**2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

**RICARDO ANDRÉS HENRÍQUEZ FLORES**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Fisiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 11 de septiembre de 2015

**Prof. Dra. Julia Guerrero**  
Directora de Tesis

**Prof. Dra. Annelise Goecke**  
Directora de Tesis

Programa de Fisiología, ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DR. MAURICIO HENRÍQUEZ L.**

**PROF. DR. MAURO PARRA C.**

**PROF. DR. MARIO GALINDO D.**

*Presidente Comisión de Examen*

*A todas las personas que han participado en este camino, en especial a mi familia por apoyarme y estar conmigo en todo momento.*

## Agradecimientos

Mis principales agradecimientos van para el equipo del laboratorio, en especial a la Dra. Julia Guerrero por su apoyo constante, su guía en todo momento y por enseñarme a cambiar mi forma de ver la ciencia.

A la Dra. Annelise Goecke por su apoyo y guía en esta investigación.

A Rosario y Bernardita por la ayuda en el laboratorio, la compañía, la miles de conversaciones tratando de arreglar el mundo y en especial por sus palabras de aliento en todo momento.

Y finalmente, agradezco a toda la gente que participó de una u otra manera en este proceso.

## **Índice:**

Resumen.....	6
Abstract.....	8
Introducción.....	10
Hipótesis y Objetivos.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Resultados.....	25
Discusión.....	38
Conclusión.....	44
Bibliografía.....	45

**Resumen:** La artritis reumatoidea juvenil (ARJ) es una enfermedad inflamatoria articular autoinmune de alta prevalencia en la niñez y se caracteriza por un aumento de citoquinas proinflamatorias tales como interleuquina-6 (IL-6). Estos pacientes son tratados con fármacos antiinflamatorios, incluyendo los glucocorticoides (GCs). Se ha demostrado que en pacientes con ARJ el proceso de osificación endocondral (OE) puede estar alterado con potenciales consecuencias en el crecimiento del niño. Uno de los factores más importantes en el proceso de OE es el factor de crecimiento vascular endotelial de tipo A (VEGF A), factor que media el proceso de invasión vascular desde la diáfisis osificada hacia los condrocitos hipertróficos (CH) del cartílago de crecimiento. Los condrocitos en etapa de diferenciación hipertrófica (CDH) se caracterizan por expresar factores de transcripción como el RUNX 2, generar matriz extracelular rica en colágeno tipo X y secretar factores como el VEGF A. En situaciones de hipoxia este factor es secretado en respuesta a la inducción del factor hipóxico isquémico (HIF 1alfa) mientras que en normoxia RUNX 2 induce a VEGF A de manera directa uniéndose a su promotor y de modo indirecto al impedir la degradación de HIF 1alfa. Se ha descrito que la IL-6 puede aumentar la expresión de VEGF A por mecanismos que involucran a la vía de señalización de STAT3. Por otra parte se ha reportado que los GCs pueden disminuir la expresión de VEGF A al interactuar con los factores de transcripción que lo regulan. Se desconoce si la co-estimulación de GCs más IL-6 a concentraciones encontradas en pacientes con ARJ activa en tratamiento con GCs, modula la expresión y secreción de VEGF A en CDH. Y, de ocurrir esta modulación, tampoco se sabe si RUNX 2 también sufre variaciones de su expresión. El objetivo del presente estudio fue evaluar en un modelo de CDH murino los efectos de dexametasona (Dex) e IL-6, por separado y en combinación, sobre los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 y sobre la secreción de VEGF A. Para ello, células ATDC5 fueron cultivadas y diferenciadas a CDH. Una vez diferenciadas fueron tratadas con Dex  $10^{-8}$  molar (M) e IL-6 120pg/ml, por separado y en combinación por 3 horas. Se extrajo el RNA total y se evaluaron los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y RUNX 2 por medio de PCR tiempo real. Se almacenó el sobrenadante y se evaluó la cantidad de proteína de VEGF A secretada por medio de un ELISA. Se observó que (i) Dex disminuyó significativamente los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y RUNX 2 en CDH murinos; (ii) IL-6 indujo un aumento significativo en los niveles de expresión del mRNA de VEGF A, pero no produjo cambios significativos en los niveles de expresión del mRNA

RUNX 2 y que (iii) la combinación de Dex más IL-6 no producen cambios en los niveles de expresión del mRNA de VEGF A ni de RUNX 2.

En relación a la secreción de VEGF A se observó que (i) Dex disminuyó significativamente los niveles de proteína secretada; (ii) IL-6 produjo un aumento significativo mientras que (iii) la combinación de Dex más IL-6 no produjo cambios en los niveles de proteína secretada.

Con estos resultados podemos concluir que Dex a concentraciones similares a las conseguidas por dosis farmacológicas utilizadas en la terapia de pacientes con crisis aguda de ARJ, disminuye los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 así como de la proteína VEGF A secretada. Por otra parte, Dex en combinación con IL-6 no modifica los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 así como tampoco modifica los niveles de VEGF A secretado.

**Abstract:** Juvenile rheumatoid arthritis (JRA) is an autoimmune inflammatory joint disease highly prevalent in childhood. This condition is characterized by increase of proinflammatory cytokines such as interleukin 6 (IL-6). These patients are treated with a mixture of anti-inflammatory drugs including glucocorticoids (GCs). It has been shown that in patients with JRA the process of endochondral ossification (OE) can be altered, with potential consequences for the child's growth. One of the most important factors in the process of OE is the vascular endothelial growth factor A (VEGF A), the VEGF A mediates the process of vascular invasion from ossified shaft to hypertrophic chondrocytes (CH) growth plate. Hypertrophic chondrocyte differentiation stage (CDH) are characterized by expressing transcription factors such as RUNX 2, produce extracellular matrix rich in type X collagen and secrete factors such as VEGF A in hypoxia . The VEGF A is secreted in response to hypoxic ischemic induction factor (HIF 1alpha) while in normoxia RUNX 2 induces VEGF A indirectly by preventing the degradation of HIF 1alpha. It described that IL-6, can increase the expression of VEGF A by mechanisms involving the STAT3 signaling pathway. Furthermore it has been reported that GCs can decrease the expression of VEGF A to interact with transcription factors that regulate it. It is unknown whether costimulation GCs more IL-6 concentrations found in patients with active JRA treated with GCs, modulates the expression and secretion of VEGF-A in CDH. And, this modulation occur, assess whether RUNX also suffers variations expression. The aim of this study is to evaluate the effects of dexamethasone (Dex) and IL-6, separately and in combination, on the levels of VEGF mRNA and RUNX A 2 and on the secretion of VEGF A, a model of CDH murine. ATDC5 cells were cultured and differentiated stage of CDH. Once differentiated Dex were treated with 8.10 molar (M) and IL-6 120pg / ml, separately and in combination for 3 hours. Total RNA was extracted and mRNA levels of VEGF A and RUNX 2 were evaluated by real time PCR. The supernatant was stored and the secreted VEGF A protein was evaluated by an ELISA kit.

Dex was observed that significantly decreased mRNA levels of VEGF A and RUNX 2 in CDH murine.



IL-6 induced a significant increase levels of VEGF A mRNA, but no significant changes in RUNX 2 mRNA levels.

The combination of IL-6 plus Dex not result in changes in mRNA levels of VEGF A or RUNX 2.

In evaluating VEGF secretion A it shows that Dex significantly decreased levels of secreted protein. In turn, IL-6 produce a significant increase while the combination of Dex more IL-6 produced no change in the levels of secreted protein.

With these results we can conclude that Dex similar to those achieved by pharmacological doses used in therapy of patients with JRA acute crisis levels, reduces the levels of VEGF A mRNA and RUNX 2 and VEGF A protein secreted. Moreover, Dex in combination with IL-6 does not alter the levels of VEGF A mRNA and RUNX 2 and teh combination does not alter the levels of secreted VEGF A protein.

## Introducción

### *Artritis reumatoidea Juvenil*

La artritis reumatoidea juvenil (ARJ) es la enfermedad reumatológica más común durante la niñez, con una incidencia de entre 6 a 19 por cada 100.000 habitantes y una prevalencia de 1 en 1000 habitantes (Andersson 1999). La ARJ se define como un cuadro caracterizado por inflamación de las articulaciones en personas con menos de 16 años de edad, por un mínimo de 6 semanas (Petty *et al.*, 1998). Esta enfermedad se ha clasificado en diferentes subtipos de acuerdo a criterios clínicos propuesto por la Liga Internacional contra el Reumatismo (ILAR), donde una de sus presentaciones más dramáticas es la artritis sistémica que se manifiesta de manera poliarticular y con una distribución simétrica (Ravelli & Martini, 2007; Petty *et al.*, 2001).

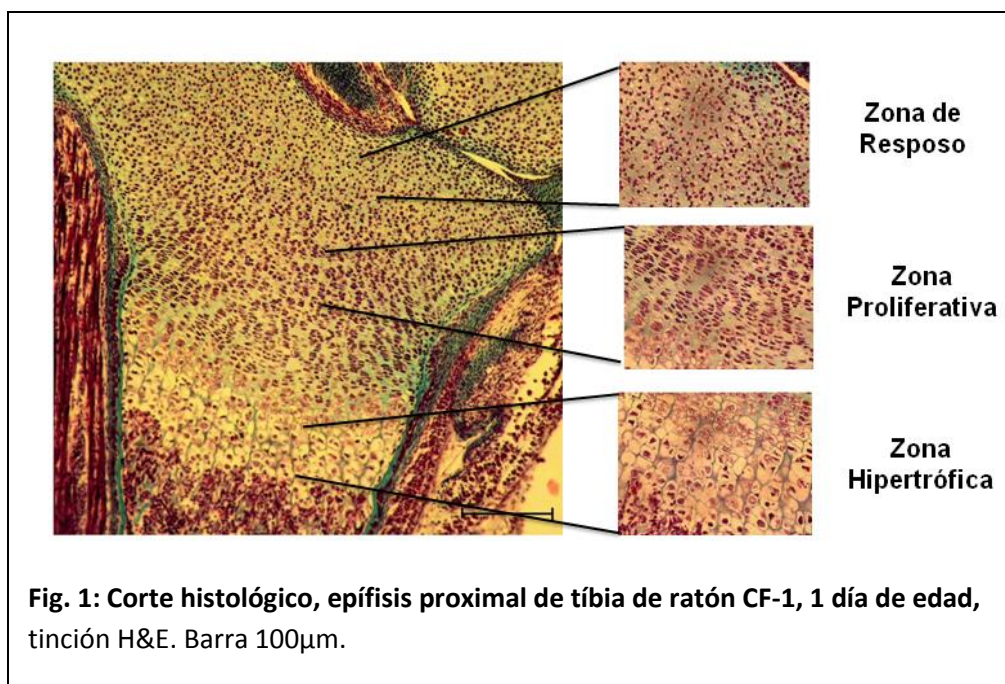
La ARJ no solo presenta inflamación articular, sino también de otros tejidos corporales como ligamentos, músculo esquelético y órganos internos. La actividad persistente de esta enfermedad se asocia a rigidez, deformaciones de las articulaciones afectadas y pueden provocar un significativo retardo de crecimiento (Wang *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2003). El retardo del crecimiento longitudinal en niños con ARJ es especialmente severo cuando la actividad inflamatoria es elevada por largos periodos de tiempo, retardo que asociados con altos niveles de citoquinas proinflamatorias, especialmente interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF) alfa (Valta *et al.*, 2007; Kutukculer *et al.*, 1998). Se ha observado que estas citoquinas pueden reducir la secreción de hormona del crecimiento o actuar directamente sobre el cartílago de crecimiento (CC) de los huesos largos (Mainardi *et al.*, 2002; Martensson *et al.*, 2007). Wong *et al.* (2008) observaron en pacientes con ARJ que altas concentraciones de IL-6, pero no de IL-1 o TNF alfa, se correlacionaban en forma inversamente proporcional con la estatura ajustada a la etapa puberal. Por otra parte, De Benedetti *et al.* (1997) destacaron que existe una correlación directamente proporcional entre el aumento de IL-6 y la severidad de presentación de la ARJ (De Benedetti *et al.*, 1994; 1997).

La IL-6 se encuentra especialmente alta en pacientes con el subtipo sistémico de la patología, alcanzando concentraciones plasmáticas promedio de 120pg/ml en crisis (Yilmaz *et al.*, 2001). Un aumento en la IL-6 circulante está relacionado con alteraciones del crecimiento óseo y la osificación endocondral. Se sabe que IL-6 en alta concentración, afecta de manera indirecta la osificación endocondral al inducir una disminución de la producción de IGF 1 (De Benedetti *et al.*, 1997) y de los niveles circulantes de la proteína transportadora de IGF tipo 3 (IGFBP-3) (De Benedetti *et al.*, 2001). Por otra parte se ha demostrado que condrocitos hipertróficos (CH) del CC expresan receptores de membrana para IL-6 (Nakajima *et al.*, 2009), pero se desconoce si IL-6 afecta directamente la producción de factores locales del CC.

#### *Osificación endocondral.*

El proceso de osificación endocondral es uno de los mecanismos de formación del tejido óseo que ocurre principalmente en los huesos largos (Long, 2012). Este proceso es iniciado por la agregación de células mesenquimales indiferenciadas que formarán una condensación. Según la posición, forma y tamaño, las células se diferenciarán en pre condrocitos y originarán los diferentes elementos del esqueleto (Long, 2012).

Una de las características del proceso de crecimiento longitudinal óseo es la presencia de CC (Fig.1). Este cartílago está compuesto por 3 zonas: la **zona de reposo** (*resting zone*)



**Fig. 1:** Corte histológico, epífisis proximal de tibia de ratón CF-1, 1 día de edad, tinción H&E. Barra 100µm.

que contienen células progenitoras de condrocitos capaces de formar nuevos clones para su proliferación; la **zona proliferativa** que está compuesta por clones de condrocitos organizados en columnas paralelas al eje axial del hueso, cuyos condrocitos presentan una alta tasa proliferativa; y la tercera zona, denominada **zona hipertrófica**, que está compuesta por CH y condrocitos en etapa de diferenciación hipertrófica (CDH), los cuales son células que dejan de dividirse y se caracterizan por un aumento de expresión de RUNX 2 , entre otros factores de transcripción (Akiyama *et al.*, 1999). Morfológicamente los CH se caracterizan por presentar un citoplasma ensanchado producto del aumento del tamaño de su retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, reflejando el aumento de la producción de matriz extracelular, rica en colágeno tipo X (Col X) (Buckwalter *et al.*, 1986).

Una etapa clave en el proceso de osificación es la apoptosis de los CH y el comienzo del proceso de angiogénesis que servirá de vía de ingreso de osteoblastos hacia la zona a osificar (Brandi & Collin-Osdoby, 2006). La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos a partir de una red vascular ya existente, con el fin de irrigar los diferentes tejidos, permitiendo distribuir el oxígeno y nutrientes, y a la vez remover el dióxido de carbono y los metabolitos de desecho producidos por las células (Shibuya, 2008). Numerosas moléculas han sido implicadas como reguladores positivos de la angiogénesis, incluyendo factores de crecimiento derivado de fibroblastos, factor de crecimiento transformante alfa y beta, factor de crecimiento hepático e interleuquina-8, entre otros (Folkman & Shing, 1992; Yancopoulos *et al.*, 2000).

#### *Factor de crecimiento vascular endotelial.*

Por décadas ha sido estudiado el rol del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en la regulación de la angiogénesis. Se sabe que la formación de nuevos vasos y la maduración de éstos es resultado de procesos de alta complejidad, que requieren una activación secuencial de numerosas cascadas moleculares (Ferrara, 2002). Aun así se ha demostrado que el VEGF representa el paso crítico limitante que permite el proceso de la angiogénesis fisiológica (Yancopoulos *et al.*, 2000; Ferrara & Alitiano, 1999) y patológica (Ferrara & Smyth, 1997). A la fecha se ha descrito toda una familia de factores de crecimiento vascular, destacando el VEGF A como el factor con mayor acción angiogénica (Ferrara,

2002). Modelos animales genéticamente modificados demuestran que individuos ya sea sin producción de VEGF A o con una producción disminuida de éste, mueren durante la etapa de embrión, con alteraciones notables en su proceso de angiogénesis (Ferrara *et al.*, 1996), lo cual no ocurre en individuos que presentan deficiencias de otros de los miembros de esta familia (Carmellet *et al.*, 1996).

Dependiendo de la cantidad de aminoácidos del VEGF A se han descrito subtipos de él. En humanos los más predominantes son VEGF A 121, VEGF A 189 y VEGF A 165 (Ferrara & Smyth, 1997). Este último subtipo es el dominante en términos de actividad biológica (Shibuya 2008), mientras que en roedores el subtipo dominante es el VEGF A 164 (Maes *et al.*, 2002).

La familia de receptores de VEGF (VEGFR) consiste en 3 miembros: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. Estructuralmente son receptores de la familia tirosina quinasa y tienen 7 dominios similares a inmunoglobulina en la región extracelular (Matthews *et al.*, 1991; Ternan *et al.*, 1991). VEGFR1 y VEGFR2 ligan al VEGF A y juegan un rol muy importante en los procesos de angiogénesis (Olsson *et al.*, 2006), mientras que VEGFR3 liga otros miembros de esta familia importantes para los procesos de linfangiogénesis (Alitalo *et al.*, 2002, Veikkola *et al.*, 2001).

Se ha descrito que el VEGF A es expresado por los CH en cultivos (Bluteau *et al.*, 2007), permitiendo inferir un rol en el proceso de angiogénesis ósea. Ryan *et al.* (1999) trataron a monos adultos con un anticuerpo monoclonal anti-VEGF por vía intravenosa por 13 semanas observando un aumento en la cantidad de CH y la inhibición de la invasión vascular en el CC, demostrando una alteración en el proceso de osificación de la zona hipertrófica del CC.

#### *Regulación de la expresión de VEGF A.*

Uno de los estímulos que regula de manera indirecta la expresión de VEGF A es la hipoxia. Se ha observado que en estados de hipoxia aumenta la expresión y disminuye la degradación del factor HIF 1alfa con el consecuente aumento del contenido celular y de su actividad biológica (Semenza, 2002). El HIF 1alfa es un factor de transcripción que se

encuentra en el citoplasma y que al trasladarse al núcleo se une al promotor de VEGF aumentando su expresión, permitiendo así generar procesos de angiogénesis (Brahimi-Horn, 2001). Al volver a estados de normoxia, el HIF 1alfa citoplasmático es rápidamente degradado por la ubiquitinización mediada por el factor von Hippel-Lindau (pVHL) (Ivan *et al.*, 2001). Interesantemente, en ciertos tipos celulares se ha encontrado que en estados de normoxia el HIF 1alfa no es degradado, ya que el factor RUNX 2 permite estabilizar a HIF 1alfa, impidiendo la degradación inducida por el pVHL, logrando que en situaciones de normoxia se pueda generar la expresión de VEGF A (Lee *et al.*, 2012). Por otro lado, Zelzer y su grupo, describieron que RUNX 2 se puede unir al promotor de *vegfa* aumentando la expresión de este factor de manera directa. (Zelzer *et al.*, 2001).

Otros de los estímulos que pueden regular la expresión de VEGF A son los factores de crecimiento y citoquinas. Se ha reportado que factores como el TGF-alfa y beta y citoquinas como IL-6 aumentan la expresión de VEGF A en distintos tipos celulares (Neufeld *et al.*, 1999), desconociéndose hasta fecha si IL-6 puede aumentar la expresión de VEGF A en CDH.

#### *Regulación de la secreción de VEGF A*

El mRNA transcrito primario, luego del *splicing* alternativo, generará mRNA maduros que darán origen, a diferentes isoformas proteicas del VEGF A que se diferencian entre ellas por la cantidad de amino ácido: VEGF A<sub>121</sub>, VEGF A<sub>165</sub>, VEGF A<sub>185</sub>, VEGF A<sub>201</sub>. La proteína VEGF A es sintetizada en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER), donde ocurren modificaciones postraduccionales tales como dimerización a través de uniones disulfuro y glicosilación (Tischer *et al.*, 1991). Finalmente, la proteína madura es almacenada en gránulos hasta su posterior secreción (Yoshino *et al.*, 2006). Esta secreción se puede diferenciar en (i) secreción constitutiva, controlada por la vía p38/ MAPK, y (ii) secreción inducida, la que es controlada por la vía ERK (Klettner *et al.*, 2009)

#### *Interleuquina 6 (IL-6) y desarrollo óseo.*

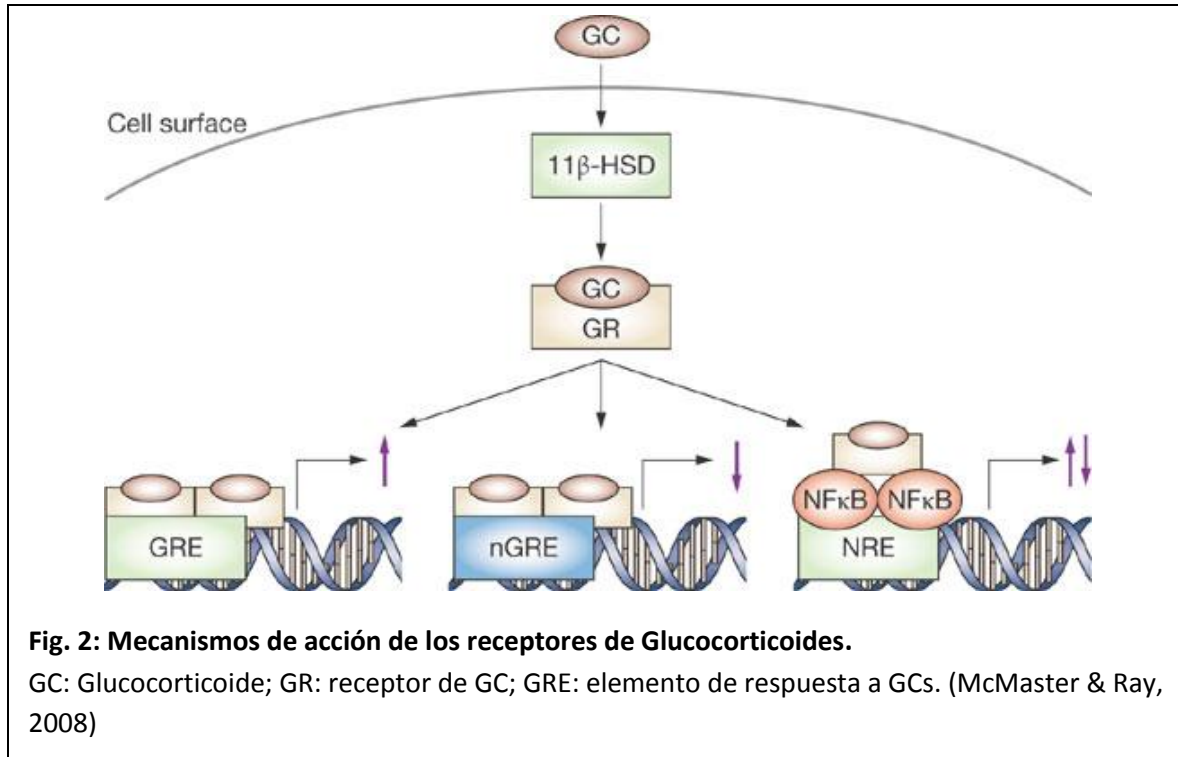
IL-6 es una citoquina inflamatoria secretada por células inmunes en respuesta a procesos inflamatorios agudos. Esta citoquina se une a un receptor de membrana celular (mIL-6R) el cual se ha descrito que puede activar principalmente dos vías intracelulares de

señalización: JAK/STAT3 y SHP/ERK (Ishihara & Hirano 2002). Existen una serie de reportes que describen que la activación de estas vías regulan procesos de diferenciación y sus mediadores en osteoblastos (Le Goff *et al.*, 2010) (Franchimont *et al.*, 2005). Es interesante destacar que en osteoblastos dependiendo de si se activa la vía SHP/ERK o la vía JAK/STAT3, en respuesta al estímulo con IL6, el efecto sobre la expresión de RUNX 2 puede ocurrir de dos maneras opuestas. Kaneshiro y su grupo observaron que en osteoblastos in vitro IL-6 puede inhibir la expresión de RUNX 2 vía SHP/ERK inhibiendo la diferenciación celular, mientras que la vía de JAK/STAT3 puede aumentar la expresión de RUNX 2, promoviendo la diferenciación celular (Kaneshiro *et al.*, 2013). No existen datos a la fecha sobre el efecto de IL-6 sobre la expresión de RUNX 2 en CDH.

Por otro lado, Loeffler *et al.* (2005) demostraron que en astrocitos en cultivo, IL-6 induce aumentos en la expresión del mRNA de VEGF A. Se desconocen los efectos que esta citoquina podría tener en la expresión VEGF A en CDH. A su vez estudios en cultivo de epitelio pigmentario de retina han demostrado que alteraciones en la vía ERK pueden producir variaciones a corto plazo en la secreción inducida de VEGF A (Kunchithapautham *et al.*, 2011). A la fecha, se desconoce si IL-6 en su rol de activador de la vía ERK podría alterar la secreción de VEGF A en CDH.

*Glucocorticoides y Cartílago del crecimiento.*

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroidales secretadas por la glándula



**Fig. 2: Mecanismos de acción de los receptores de Glucocorticoides.**

GC: Glucocorticoide; GR: receptor de GC; GRE: elemento de respuesta a GCs. (McMaster & Ray, 2008)

suprarrenal en respuesta a la activación del eje hipotálamo- hipófisis. Los GCs tienen numerosas acciones biológicas, en el hueso se destaca su actividad de reguladores del CC y sus procesos de osificación y crecimiento longitudinal. Las acciones biológicas de los GCs requieren de su unión a su receptor (receptor de GCs, GR) el cual está localizado en el citoplasma celular. Por su naturaleza lipídica, los GCs cruzan la membrana plasmática y en el citoplasma se unen su receptor, el cual modifica su estructura desacoplándose de las proteínas que lo mantienen en el citoplasma y exponiendo una señal de localización nuclear que permite que el complejo GC-GR trasloque al núcleo y module la expresión de genes sensibles a los GCs (McMaster & Ray, 2008). Este efecto de los GCs puede ocurrir por unión directa a los promotores de genes sensibles a GCs, esto es, en secuencias específicas del DNA denominados elementos de respuesta a GCs (GRE), aumentando la actividad del promotor; los GCs pueden también inhibir la actividad de un promotor al unirse a secuencias específicas del DNA denominadas elementos de respuesta a GCs negativo (nGRE). Además, los GCs pueden modular la actividad de genes sin que para ello requieran unirse al DNA, y esto es mediado por la unión del complejo GC-GR a otros factores de transcripción (Fig. 2) (McMaster & Ray,



2008). Estudios han demostrado que cuando los niveles de GCs sobrepasan las concentraciones plasmáticas fisiológicas, éstos pueden inhibir el crecimiento óseo longitudinal (Baron et al., 1992). Este efecto puede estar mediado por su acción sobre factores endocrinos, con efectos finales que implican la alteración del eje de la hormona del crecimiento. Se ha descrito que los GCs disminuyen la producción del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF I) dependiente de la hormona del crecimiento y, por otra parte, alteran la expresión de receptores de la hormona del crecimiento en condrocitos (Jux et al., 1998). Se ha propuesto también que los GCs inducen un cambio en la producción de factores locales en el CC. Estudios realizados en un modelo de conejo *in vivo* pusieron en evidencia la alteración en la producción de factores locales mediadas por el tratamiento con GCs sintéticos administrado directamente en el cartílago del crecimiento: mientras que en el hemicuerpo tratado se observó una disminución de la velocidad del crecimiento óseo, en el hemicuerpo contralateral, el cartílago mantuvo su velocidad de crecimiento (Baron *et al.*, 1992). Entre los factores de producción local se encuentra el VEGF A, principal regulador de la angiogénesis ósea en el proceso de osificación del CC (Maes *et al.*, 2002), el cual es expresado principalmente por los CH (Bluteau *et al.*, 2007). Koedam *et al.*, (2002) demostraron en un cultivo *in vitro* de CC de conejo que tratamientos con GCs sintéticos, como la dexametasona (Dex), a dosis mayores a las farmacológicas son capaces de disminuir la secreción de VEGF y la abundancia de mRNA de VEGF, inhibiendo su expresión en CH. Li y su grupo, describieron que Dex inhibe la expresión proteica de RUNX 2 en osteoblastos *in vivo* en proceso de diferenciación. (Li *et al.*, 2012), sin que esto haya sido hasta la fecha demostrado en CDH de CC. Con estos antecedentes, es posible plantear que los GCs podrían modular la expresión de factores de regulación local, inhibiendo la expresión de VEGF (Koedam *et al.*, 2002) por medio de la modificación de la expresión de factores tales como HIF 1alfa o RUNX 2 (Lee *et al.*, 2012).

En niños con ARJ del tipo sistémico o poli-articular, se sabe que hay reducción del crecimiento longitudinal y uno de los factores responsables de ello es el tratamiento con GCs por largos periodos, (Brochers *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2002). En periodos de crisis, estos pacientes son tratados con GCs y las dosis necesarias para el control de la inflamación puede ser tan alta como 1 mg/kg de prednisona con un máximo de 40 mg diarios equivalentes (Kim, 2010). Hasta la fecha se desconoce si estas dosis de GCs sistémicos y sus respectivas concentraciones plasmáticas equivalentes, podrían tener algún efecto sobre la producción de

factores locales involucrados en el crecimiento óseo longitudinal tales como el VEGF A y la expresión de RUNX 2 en CDH.

Kunchithapautham y su grupo estudiaron el proceso de secreción de los gránulos intracelulares de VEGF A en un cultivo de células de epitelio pigmentario de retina, y demostraron que es posible variar la secreción de VEGF A en tiempos cercanos a las 3 hrs de cultivo (Kunchithapautham *et al.*, 2011). Se sabe que la secreción constitutiva de VEGF A es regulada por la vía MAPK/p38 (Klettner *et al.*, 2009). Sonya y colaboradores demostraron que fibroblastos humanos cultivados *in vitro* en presencia de Dex disminuyen la actividad de la vía MAPK/p38 y esto estaba mediado por la inhibición de la fosforilación de p38 secundaria al aumento de la expresión MKP1 mediado por Dex (Sonya *et al.*, 2002). Estos resultado permiten plantear que este mecanismo podría explicar el efecto de los GCs para modular la secreción de VEGF A. Sin embargo, se desconoce si los GCs pueden en CDH cultivados por 3h, efectivamente modificar los niveles de mRNA VEGF A y los niveles de VEGF A secretado.

#### *Modelo celular de condrogénesis*

ATDC5 es una línea celular derivada de un carcinoma de condrocitos murino embrionarios (Atsumi *et al.*, 1990). Esta línea celular ha demostrado ser modelo útil para estudiar *in vitro* la proliferación celular, síntesis de matriz extracelular, hipertrofia celular, mineralización de la matriz, secreción de factores de localización e invasión vascular y apoptosis celular, característicos de los procesos de maduración de condrocitos del CC (Shukunami *et al.*, 1997). Es por estas características que esta línea celular provee un muy buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares que regulan la maduración del CC y la formación de hueso endocondral (Yoshikawa *et al.*, 2013). Por las razones expuestas, la línea celular ATDC5 se utilizará en este estudio como modelo de condrocitos diferenciados a CDH.

En suma, existe evidencia que en pacientes con ARJ el proceso de OE puede estar alterado. Alteraciones en la OE pueden ser causa de retardo del crecimiento longitudinal del niño. Uno de los factores más importantes en el proceso de OE es el VEGF A, factor que media el proceso de invasión vascular desde la diáfisis osificada hacia los CH del CC. La ARJ se caracteriza por aumento de citoquinas proinflamatorias como IL-6, la cual, en otros

modelos celulares, ha demostrado que puede alterar la expresión de factores locales como el VEGF A, pero hasta la fecha se desconoce los efectos de IL-6 sobre los niveles de mRNA VEGF A de CDH. Existe evidencia que IL-6 puede regular la actividad de la vía ERK, la cual a su vez ha sido relacionada con el control de la secreción inducida de VEGF A, pero se desconoce si IL-6 puede alterar los niveles de VEGF A secretado por CDH. Entre las estrategias terapéuticas de pacientes con ARJ se incluye el uso de los GCs. En estudios in vitro se ha observado que al tratar CDH con dosis mayores a las farmacológicas se disminuye la expresión de VEGF A. Se desconocen si estos efectos de los GCs pueden también ser observados al tratar con concentraciones similares a las alcanzadas durante los tratamientos de ARJ. Finalmente, se desconoce el efecto de la co-estimulación con GCs más IL-6 a concentraciones encontradas en pacientes con ARJ activa, sobre los niveles de expresión del mRNA y la secreción de VEGF A en CDH.

Se sabe que el VEGF A es secretado en situaciones de hipoxia inducido por el factor hipóxico isquémico (HIF 1alfa). En normoxia RUNX 2 induce VEGF A de manera directa uniéndose al promotor del VEGF e indirectamente impidiendo la degradación de HIF 1alfa. A la fecha, se desconoce si IL-6 y GCs, en combinación y por separado, pueden modular la expresión de RUNX 2 en CDH.

Este estudio plantea evaluar los efectos de Dex e IL-6 en factores relevantes para el proceso de osificación. Se espera encontrar que Dex disminuya los niveles de mRNA de VEGF A, que IL-6 los aumente y que la combinación Dex + IL-6 no los modifique. Además se espera encontrar que Dex disminuya los niveles de proteína secretada de VEGF A, que IL-6 los aumente y que la combinación Dex + IL-6 no los modifique. Con estos resultados tentativos, se podría plantear que en periodos de crisis de ARJ sistémica con aumentos de IL-6 y tratamiento de GCs los niveles de mRNA de VEGF A y VEGF A secretado por CDH, con el fin de regular el proceso de invasión vascular al CC, no deberían estar alterados. Situación que no ocurriría de presentarse un desbalance en alguno de estos factores, como es el caso de crisis con aumento de IL-6 sin tratamiento de GCs o tratamientos de GCs en periodos sin aumentos de IL-6.

En base a estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis: “En un modelo *in vitro* de condrocitos murinos en etapa de diferenciación hipertrófica, la estimulación con IL-6 inducirá aumentos en la expresión de VEGF A, RUNX 2 y la secreción de VEGF A, efectos que serán revertidos por la estimulación con Dexametasona.”

El objetivo del presente estudio es evaluar los efectos de Dex e IL-6, por separado y en combinación, sobre los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 y en la secreción de VEGF A, en un modelo *in vitro* de condrocitos murinos en etapa de diferenciación hipertrófica.

### **Objetivos:**

#### *Objetivo general*

Evaluar los efectos de Dex e IL-6, por separado y en combinación, sobre los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 y sobre la secreción de VEGF A, en un cultivo *in vitro* de condrocitos murinos en etapa de diferenciación hipertrófica.

#### *Objetivos específicos*

- 1) Determinar los efectos de dexametasona a concentraciones similares a las alcanzadas en sangre durante los tratamientos de crisis de ARJ sistémica, sobre los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 y sobre la secreción de VEGF A, en un cultivo *in vitro* de condrocitos murinos en etapa de diferenciación hipertrófica.
- 2) Determinar los efectos de IL-6 a concentraciones similares a las concentraciones sanguíneas descritas durante crisis de ARJ sistémica, sobre los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 y sobre la secreción de VEGF A, en un cultivo *in vitro* de condrocitos murinos en etapa de diferenciación hipertrófica.
- 3) Determinar los efectos de la coestimulación con IL-6 y dexametasona en las mismas condiciones antes señaladas, sobre los niveles de expresión del mRNA de VEGF A y de RUNX 2 y sobre la secreción de VEGF A, en un cultivo *in vitro* de condrocitos murinos en etapa de diferenciación hipertrófica.

## Metodología

### *Cultivo celular*

Se utilizó células ATDC5 (línea celular de condrocitos de origen murino) cultivadas en medio de proliferación: DMEM/F-12 (Invitrogen) suplementado con 5% de FBS,  $3 \times 10^{-8}$  M sodio selenito (Sigma Aldrich), 10  $\mu$ g/ml transferrina humana (Sigma Aldrich) y 0,5% penicilina-estreptomicina (Invitrogen). Posteriormente se indujo la diferenciación con medio de diferenciación: medio de proliferación más 10  $\mu$ g/ml de insulina bovina (Sigma Aldrich). El medio fue cambiado cada dos días.

Cuando las células alcanzaron una confluencia de 70 a 80% fueron desprendidas con tripsina EDTA 0,25%, sembradas en platillos a una densidad final de  $10^5$  células por pocillo y se adicionó el medio de diferenciación por 15 días. Durante este periodo se evaluó la morfología celular y los niveles de expresión del mRNA de RUNX 2 y Col X con el objetivo de evidenciar la diferenciación a condrocitos de tipo hipertrófico. Una vez confirmado esta diferenciación se realizaron los experimentos propuesto.

### *Curva dosis y tiempo /respuesta*

Se evaluó la expresión de mRNA de VEGF A de CDH a diferentes tiempos de exposición a Dex (0,5h, 1h, 3h y 6h) y a una misma concentración de Dex ( $10^{-6}$  M); según este resultado se determinó la variable tiempo a utilizar en los experimentos posteriores.

Luego, se evaluó la expresión de mRNA de VEGF A de CDH a diferentes concentraciones de Dex ( $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M  $10^{-8}$ M) y según este resultado se determinó la concentración de Dex a utilizar en los experimentos posteriores.

### *Diseño experimental*

Fueron diseñados 4 grupos experimentales:

-Grupo 1: tratado solo a medio diferenciador (grupo control)

-Grupo 2: tratado con medio diferenciador más Dex a una concentración determinada por la curva dosis respuesta.

-Grupo 3: tratado con medio diferenciador más IL-6 a una concentración de 120 pg/ml (Yilmaz *et al.*, 2001).

-Grupo 4: tratado con medio diferenciador más Dex a la concentración determinada por la curva dosis respuesta e IL-6 a una concentración de 120 pg/ml.

Los tiempos de exposición serán determinados según la curva tiempo de exposición/respuesta.

#### *Extracción RNA.*

La extracción de RNA se realizó por el método del Trizol Reagent (Total RNA Isolation Reagent, Life Technologies). Las células fueron centrifugadas a 800 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y luego fueron re-suspendidas en PBS 1X. Posteriormente se volvieron a centrifugar a 7500 rpm por 25 segundos a 4°C, se eliminó nuevamente el sobrenadante y se agregó 250 µl de PBS 1X, 750 µl de Trizol y 200 µl de cloroformo para continuar con una nueva centrifugación a 12000 rpm por 10 min. Del resultado de este proceso se recogió la fase acuosa para luego agregarle 500 µl de isopropanol y centrifugar nuevamente a 12000 rpm por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó etanol al 75%. Nuevamente la muestra fue centrifugada a 7500 rpm por 5 min a 4°C, eliminando el sobrenadante para finalmente re suspender en 10 µl de agua RNase free (Invitrogen). La muestra se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

#### *RT PCR*

VEGF A, RUNX 2 y el housekeeping (Beta actina) serán evaluados por técnica de RT-PCR.

#### *Transcripción reversa*

Luego de la cuantificación del RNA por espectrofotometría, las muestras fueron tratadas para eliminar la posibilidad de contaminación con DNA genómico, para ello, se utilizó el kit DNase (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, a

2µg de RNA se le agregó 1 µl de *random primers*, luego el RNA fue tratado en termociclador por un ciclo consistente en 5 minutos a 70°C y 5 minutos a 4°C. Posteriormente se preparó un *mix* con buffer 5X, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTP 10mM, Rnasin, transcriptase reverse y agua RNase free, para ser agregado a 5µl de muestra, una vez adicionado el mix a la muestra se le realizó un spin y luego fue tratada por 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, 15 minutos a 70°C y 15 minutos a 4°C y el resultante del proceso descrito se guardó a -20°C para su posterior análisis.

Con el fin de asegurar las condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima limitante del proceso, se realizó un ensayo que busca probar la concentración óptima de magnesio. Para ello, se preparó un *mix* con buffer 5X, dNTP 10 mM, Gotaq<sup>®</sup> 5u/µl y los *primers* específicos para VEGF A murino (Tabla 1) y se agregó el cDNA, *mix* y distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> 25mM. Cada una de estas mezclas se llevo a un programa de PCR convencional consistente en: 5 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C, terminando con 10 minutos de 72°C y hold 4°C. Finalmente las muestras se corrieron en un gel de agarosa 2% y se escogió el magnesio que generó la banda de mejor calidad en este amplificado.

Los partidores fueron diseñados a partir de la base de datos genéticos de NCBI, en conjunto con el programa AmplifX 1.5<sup>®</sup>. Las secuencias seleccionadas se describen en la Tabla 1. .

	Forward	TM	Reverse	TM
VEGF A (173 pb)	GCGAGGCAGCTTGAGTTAAA	58,84	AGGACTGTTCTGTCAACGGT	58,88
RUNX 2 (199 pb)	TCCAACCCACGAATGCACTA	59,31	AGGATGCTGACGAAGTACCA	58.44
Col X (181 pb)	TAACAGGTATGCCCGTGTCT	58,44	TTCACATGCACGTGGTAGGA	59,32
Beta Actina (283 pb)	ACCACAGTCCATGCCATCAC	59,32	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	58,56

Tabla 1: Primers para RT PCR tiempo real.

Para analizar el mRNA de VEGF A y RUNX 2 para cada situación experimental, al cDNA se le adicionó un mix consistente en: buffer 5X, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTP 10mM, GotaQ 5u/μl, primers, Syber 1/2000 y agua RNAsa free. Luego se realizó un PCR tiempo real con el siguiente programa: 5 minutos a 95°C luego 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C, terminando con 10 minutos de 72°C y seguido por 4 °C hold. La cuantificación de los niveles de expresión del mRNA de cada muestra se realizó por el método de cuantificación absoluta de número de copias de cDNA obtenidas como resultado del programa de RT-PCR (Pfaffi M. 2004).

#### *Cuantificación de la secreción de VEGF A*

Luego de que las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de los diferentes estímulos, el VEGF A secretado fue cuantificado en el sobrenadante del medio de cultivo. Para cada situación experimental, 1 ml de medio de cultivo fue recolectado y luego se almacenó a -20°C hasta su análisis. La concentración del VEGF A fue cuantificado por método de ELISA utilizando un kit comercial (kit RAB0509 Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados fueron analizados por medio de estadística descriptiva expresados en promedio y error estándar de la media (SEM). Se analizó la distribución de la muestra mediante el test Shapiro Wilk. En el caso que se compararan más de dos grupos se utilizó la prueba de ANOVA de una vía seguida por un post-hoc Newman–Keuls. En el caso que se comparara 2 grupos entre si se utilizó el test T de student para datos paramétricos o el test U de Mann Whitney para datos no paramétricos. Se consideró diferencia significativa cuando el valor de p fue menor a 0,05 ( $p < 0,05$ ).



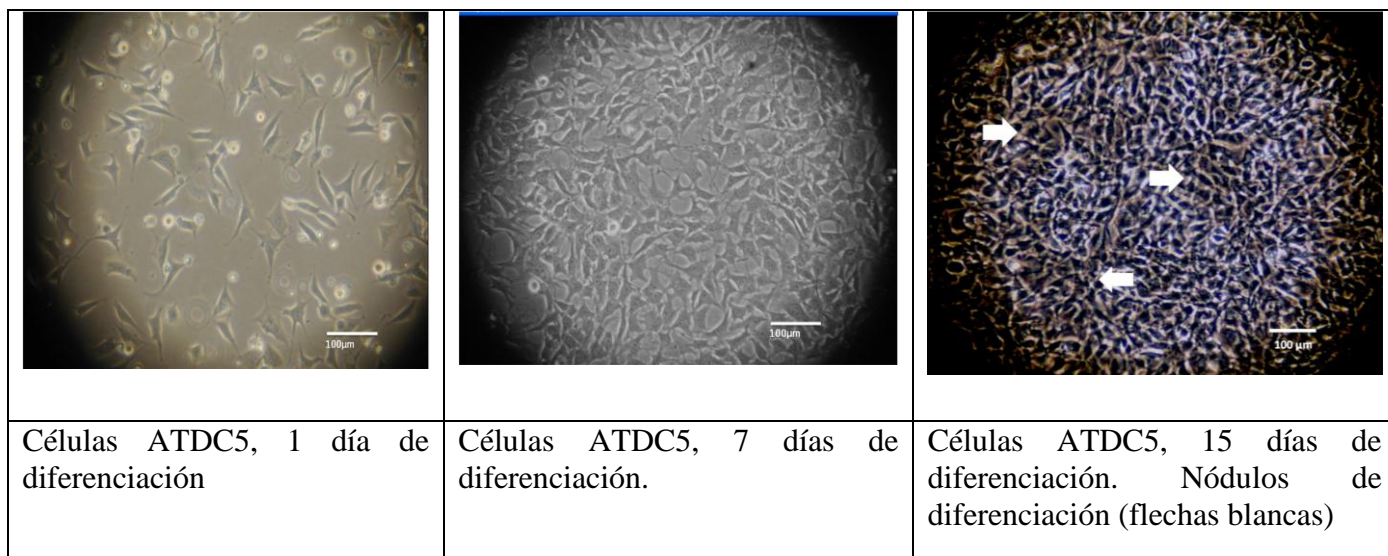
## Resultados obtenidos

### *Diferenciación de células ATDC5:*

Para valorar el estado de condrocito hipertrófico durante la diferenciación de las células ATDC5, fueron evaluadas características morfológicas, la expresión de uno de los factores de transcripción característico de procesos de diferenciación (RUNX 2), y la expresión de Col X, proteína que se expresa exclusivamente en condrocitos hipertróficos y CDH.

### *Evaluación morfológica*

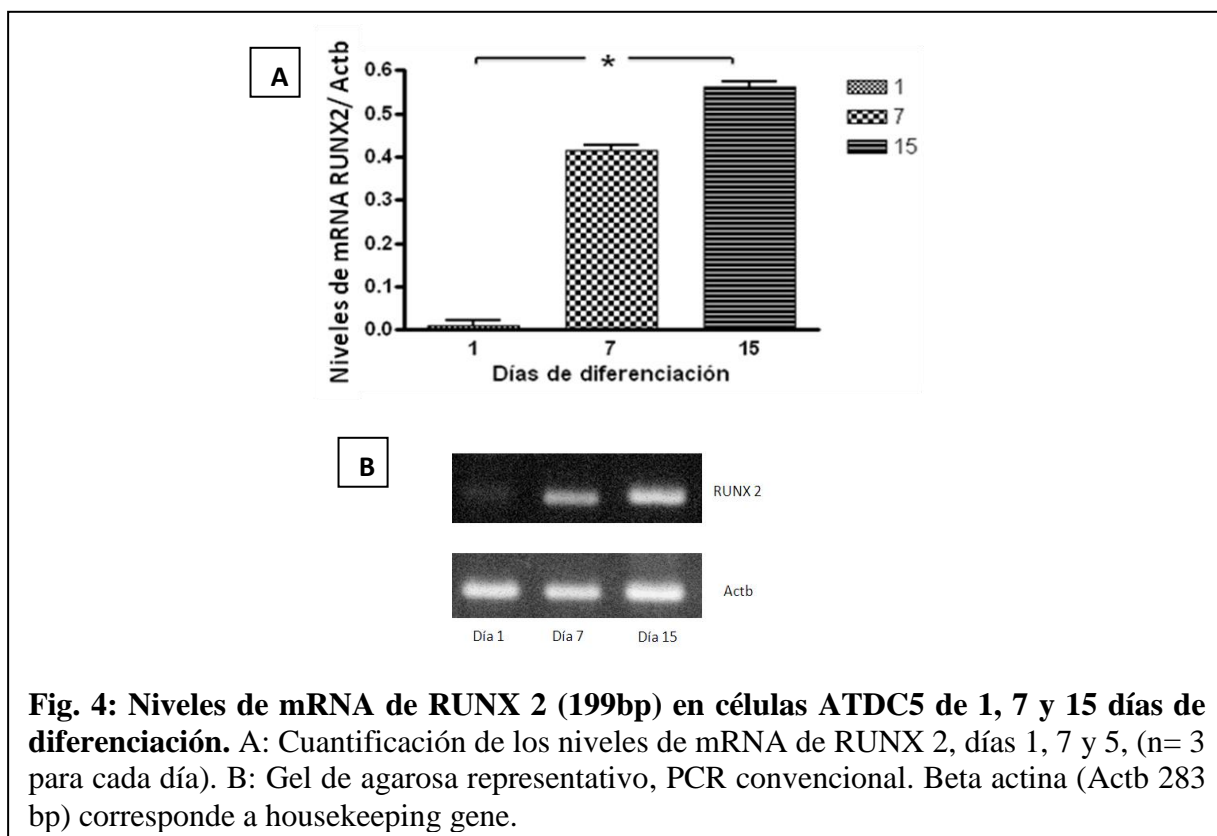
Se evaluó la morfología durante los días 1, 7 y 15 de diferenciación y se encontró que a los 15 días de cultivo con medio diferenciador se observaba la formación de nódulos correspondientes a la superposición de planos celulares en diferentes zonas de la placa de cultivo celular (Fig. 3).



**Fig.3: Análisis de morfología en cultivo células ATDC5 en diferentes estadios de diferenciación.**

### *Niveles de expresión del mRNA de RUNX 2*

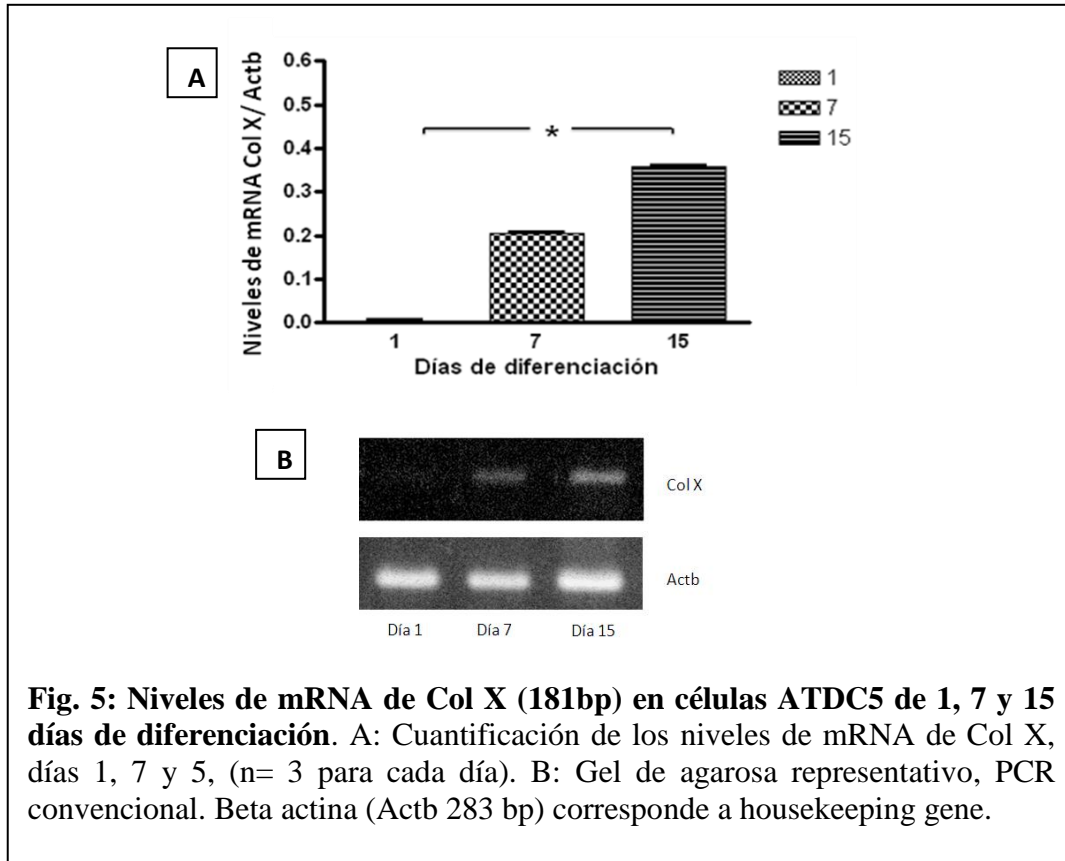
Se evaluó la expresión de RUNX 2 durante los días 1, 7 y 15 de diferenciación. Se



observó un incremento progresivo en la expresión de este gen. Tal como se observa en la Fig. 4, a los 15 días de cultivo con medio diferenciador existe un expresión de RUNX 2 significativamente mayor respecto al día 1 de cultivo., p valor = 0,035 (Fig. 4).

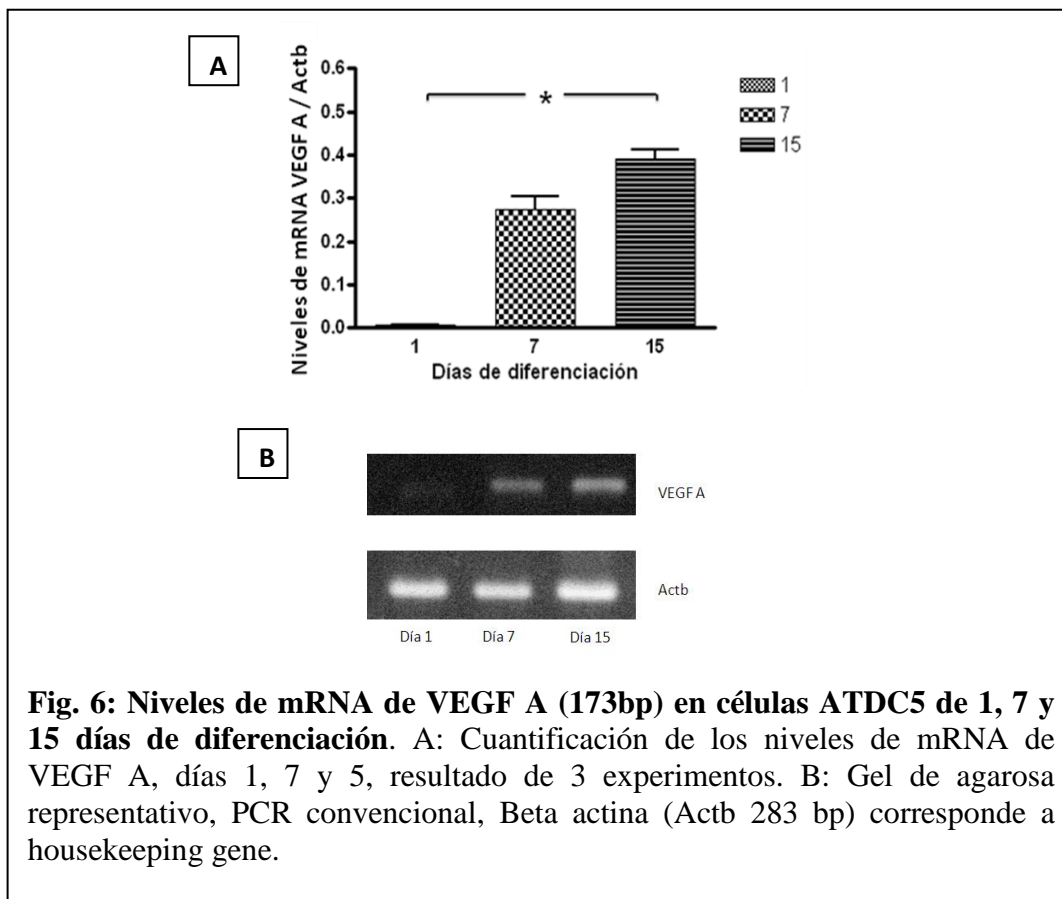
#### *Niveles de expresión del mRNA de Colágeno tipo X*

Se evaluó la expresión de Col X durante los días 1, 7 y 15 de diferenciación y se observó un incremento progresivo en la expresión de este gen. A los 15 días de cultivo en presencia de medio diferenciador se observó una expresión significativamente mayor de Col X con respecto al día 1 de cultivo, p valor= 0,046 (Fig. 5).



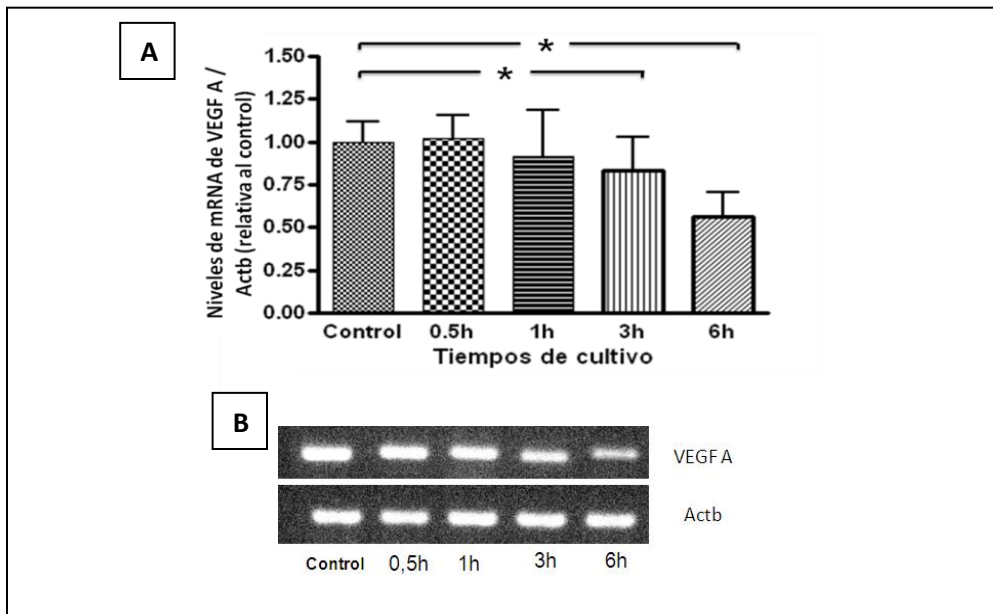
#### *Niveles de expresión del mRNA de VEGF A*

Se evaluó la expresión de VEGF A durante los días 1, 7 y 15 de diferenciación y se observó un incremento progresivo en la expresión de este gen. Al día 15 de cultivo en presencia de medio diferenciador se cuantificó que la expresión de VEGF A fue significativamente mayor con respecto al día 1 de cultivo (Fig. 6).



*Efectos de diferentes tiempos de exposición a dexametasona en los niveles de expresión del mRNA de VEGF A.*

A fin de evaluar el efecto de Dex en el contenido celular del mRNA de VEGF A de CDH, se realizó una curva de tiempo utilizando para ello Dex a concentración de  $10^{-6}$  M, valor obtenido de la literatura (Koedam et al., 2012). Como se muestra en la figura 7, CDH cultivados por 6 y 3 horas con Dex  $10^{-6}$  M muestran una disminución significativa de la expresión de VEGF A en las células ATDC5 (p 0,0179 y 0,0411, respectivamente). Como se observa en la misma figura 7 (Fig. 7), tiempos menores de cultivo (0,5h y 1h) no modificaron la expresión de VEGF A (p valor de 0,2857 y 0,2857, respectivamente) en relación al control.



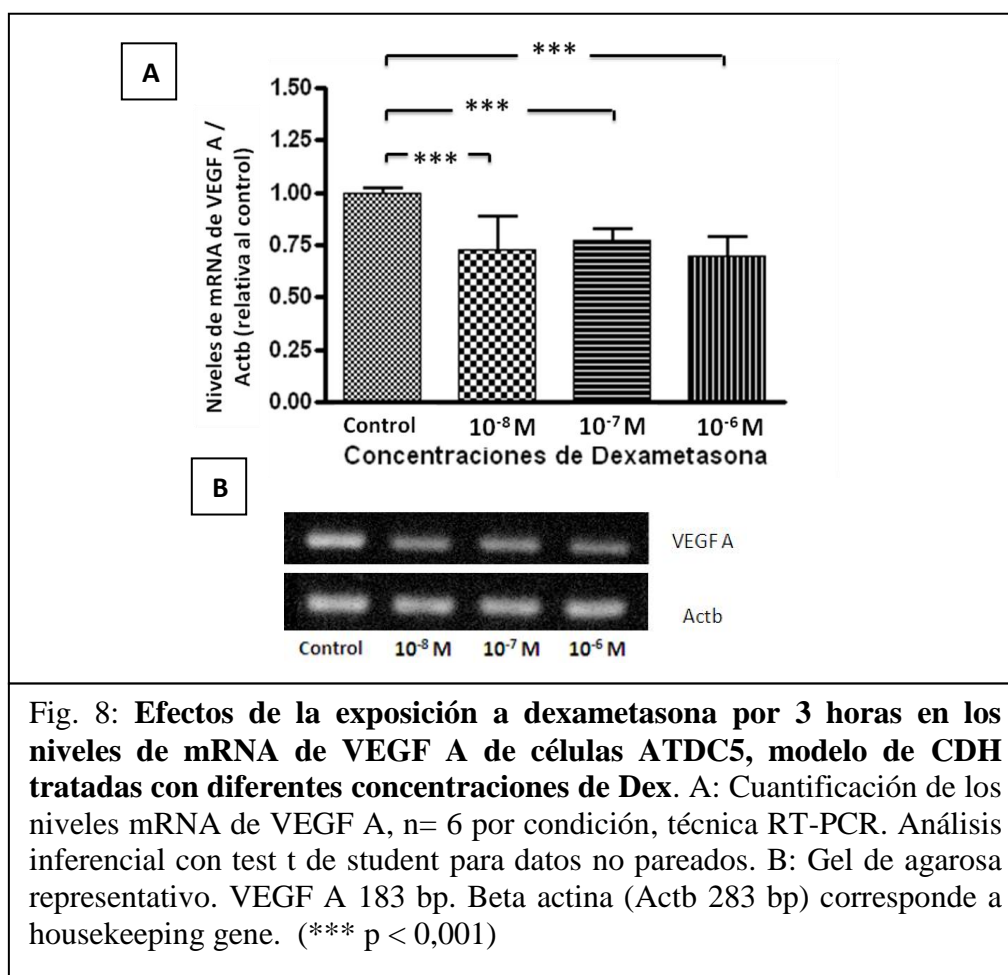
**Fig. 7: Efectos de dexametasona ( $10^{-6}$  M) en los niveles de mRNA de VEGF A de células ATDC5, modelo de CDH, tratadas con diferentes tiempos de exposición.** A: Cuantificación de los niveles mRNA de VEGF A, n= 6 por condición (\* p < 0,05), técnica RT-PCR. Análisis inferencial con test t de student para datos no pareados. B: Gel de agarosa representativo. VEGF A 183 bp, Beta actina (Actb 283 bp) corresponde a housekeeping gene.

*Efectos de diferentes concentraciones de dexametasona en los niveles de expresión del mRNA de VEGF A.*

Según los últimos consensos de tratamientos de la ARJ (Dewitt et al., 2012; Kim, 2010; MINSAL, 2010) las dosis terapéuticas de prednisona con las que estos pacientes son tratados corresponden a concentraciones plasmáticas equivalentes a un rango entre  $10^{-8}$  M a  $10^{-7}$  M de dexametasona (Rose et al., 1980).

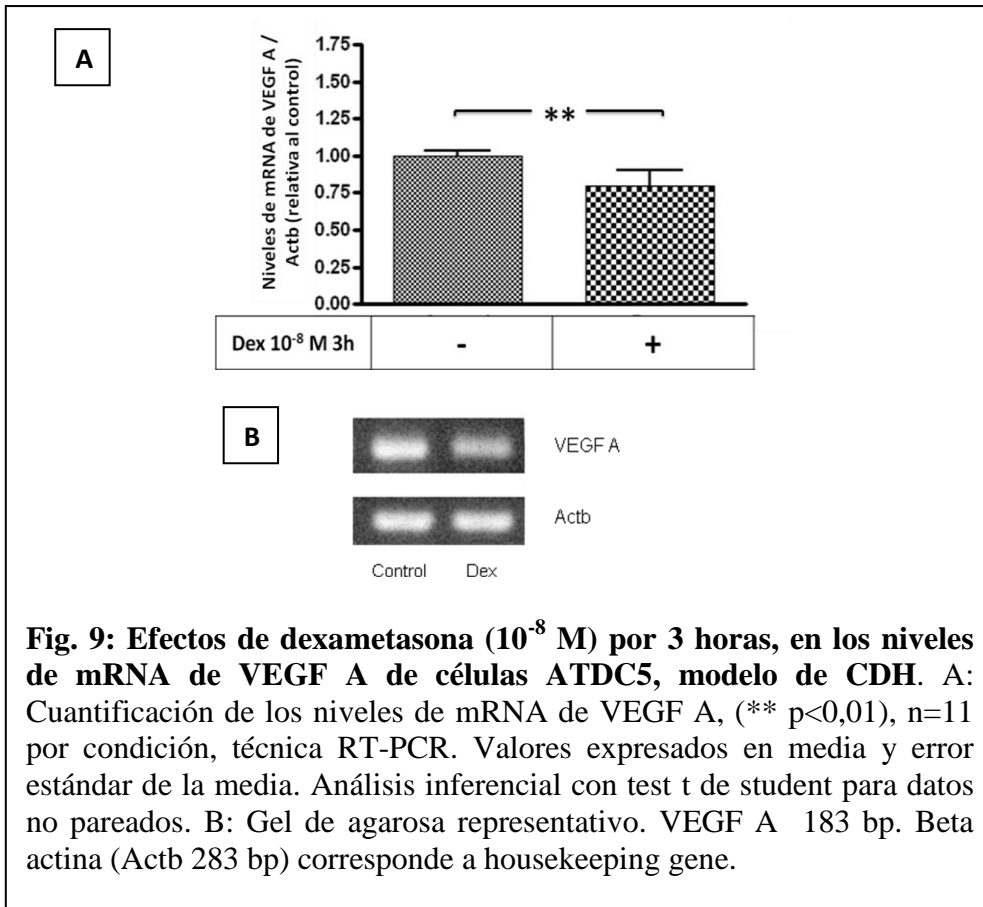
Teniendo en consideración este antecedente, valoramos el efecto de concentraciones de Dex equivalentes a la utilizadas en clínica en la expresión del mRNA de VEGF A. Para ello, CDH de células ATDC5 fueron tratadas con concentraciones Dex de  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  M por 3 horas. Como se observa en la figura 8 (Fig. 8), todas las concentraciones de Dex utilizadas indujeron una disminución significativa en la expresión del mRNA de VEGF A, con un p valor de 0,0058, 0,0001 y 0,0202 respectivamente. Además interesantemente, se demostró que

no hubo diferencia en el efecto observado para las diferentes concentraciones de Dex estudiadas.



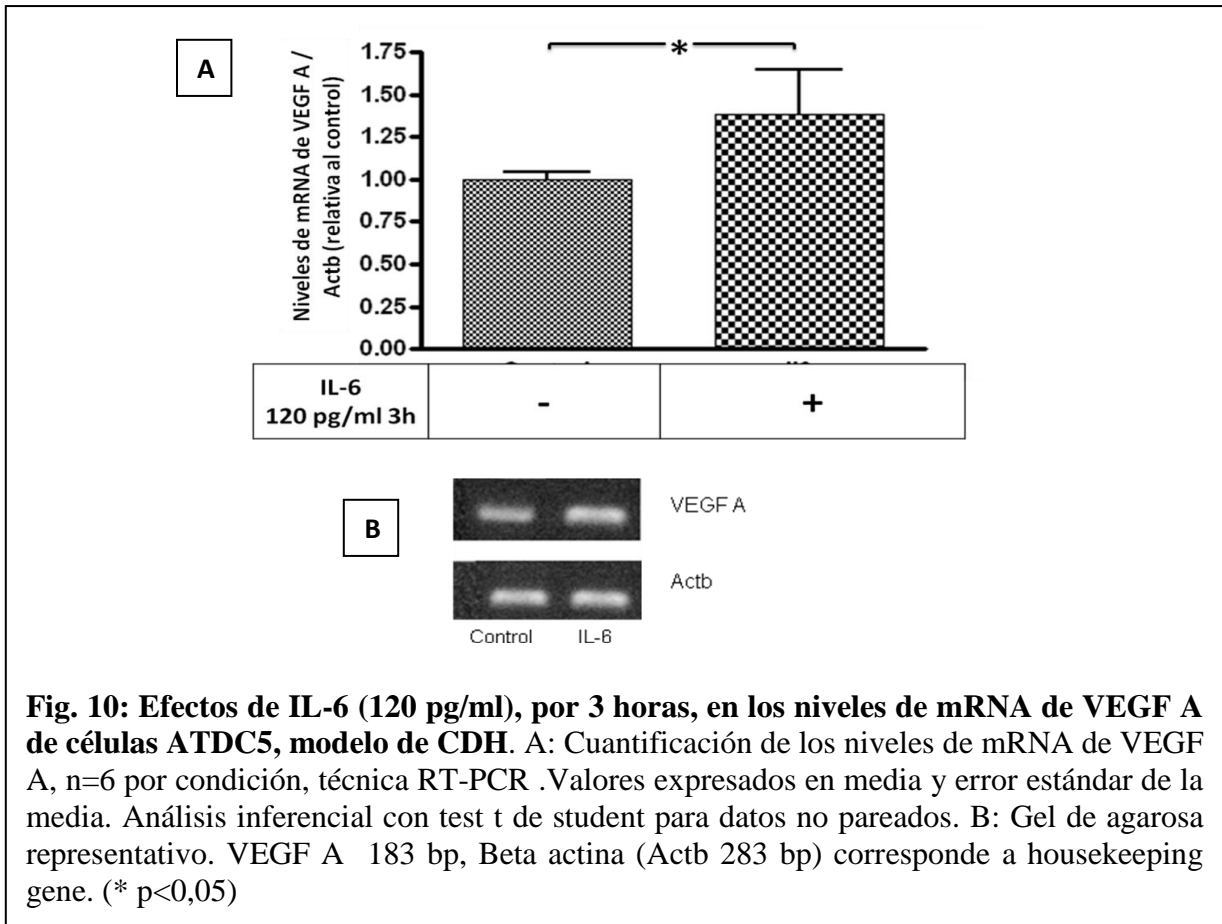
#### *Efectos de dexametasona en los niveles de expresión de mRNA de VEGF A*

Células ATDC5 diferenciadas a CDH fueron tratadas con Dex 10<sup>-8</sup> M por 3 horas. Como se observa en la figura 9 (Fig. 9), Dex disminuyó significativamente los niveles de expresión del mRNA de VEGF A en CDH, con un p valor de 0,0034.



#### *Efectos de IL-6 en los niveles de expresión del mRNA de VEGF A*

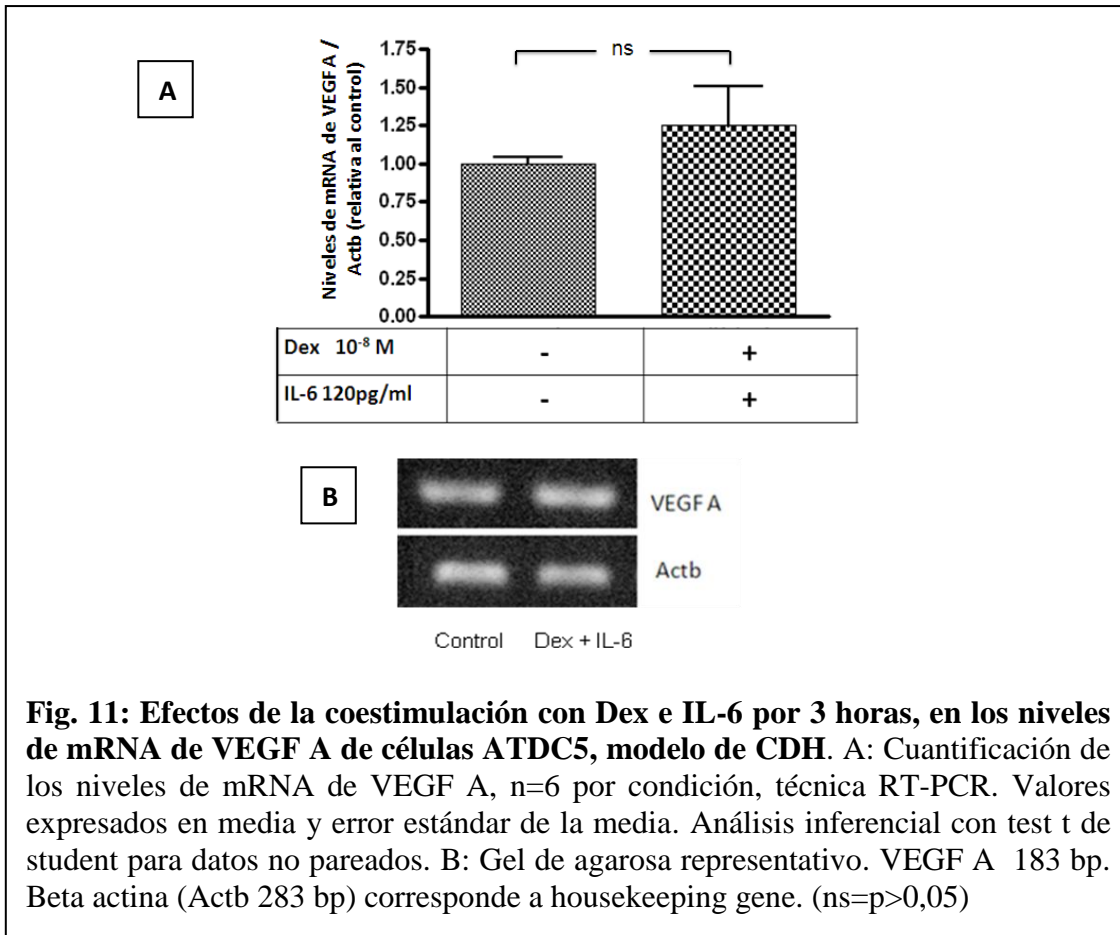
Con el fin de valorar el efecto de IL-6 en CDH de células ATDC5, estas fueron cultivadas por 3h en presencia de 120pg/ml de IL-6, valor que corresponde a la concentración sanguínea descrita para pacientes en crisis de ARJ (Yilmaz et al., 2001). Como se observa en la figura 10, IL-6 indujo un aumento significativo en la expresión de mRNA de VEGF A, en relación al control (Fig. 10).



*Efectos de la co-estimulación con Dex e IL-6 en los niveles de expresión del mRNA de VEGF A*

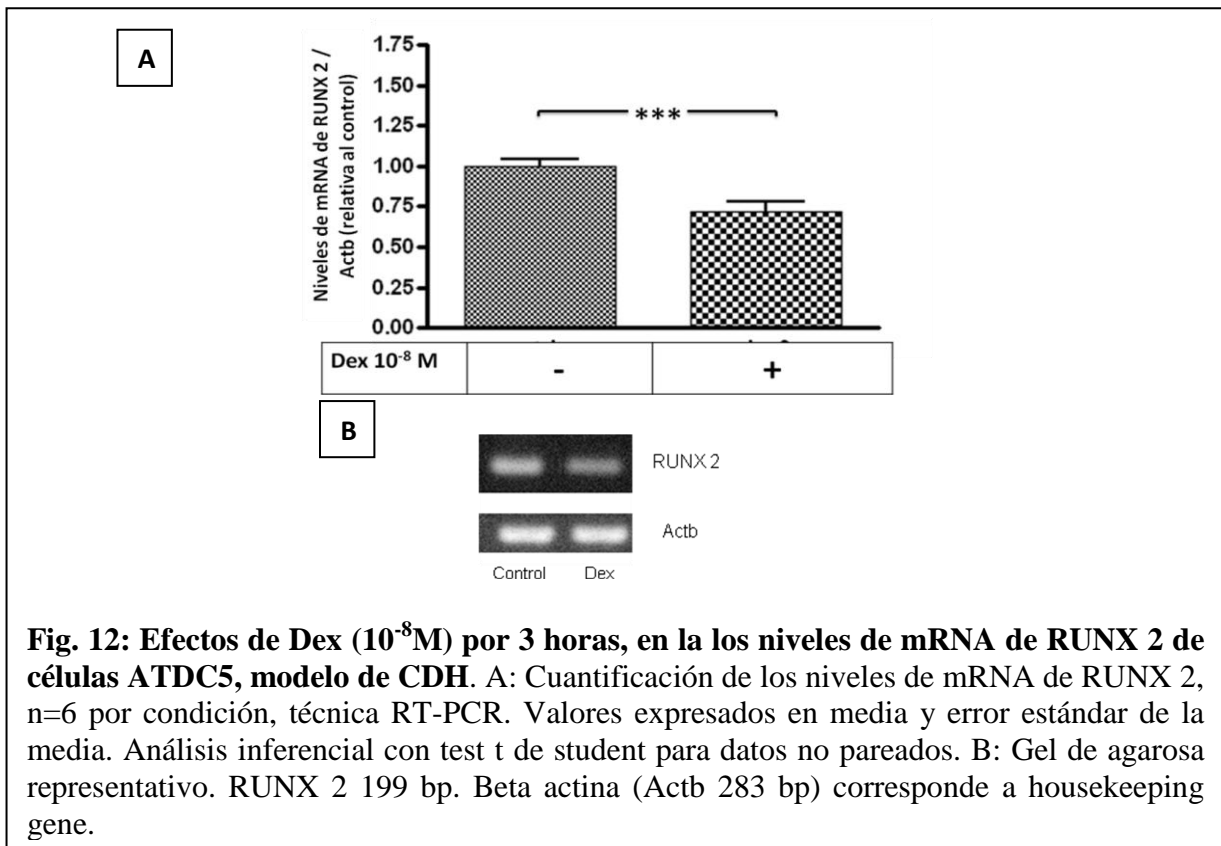
Con el objeto de valorar si la combinación de Dex e IL-6 tenía algún efecto en la expresión de VEGF A de CDH de células ATDC5, éstas fueron cultivadas por 3h en presencia de Dex a  $10^{-8}$  M y 120pg/ml IL-6. Como se observa en la figura 11, la combinación de Dex e IL-6 no modificó de modo significativa la expresión de VEGF A en relación al control, con un p valor de 0,5 (Fig. 11).





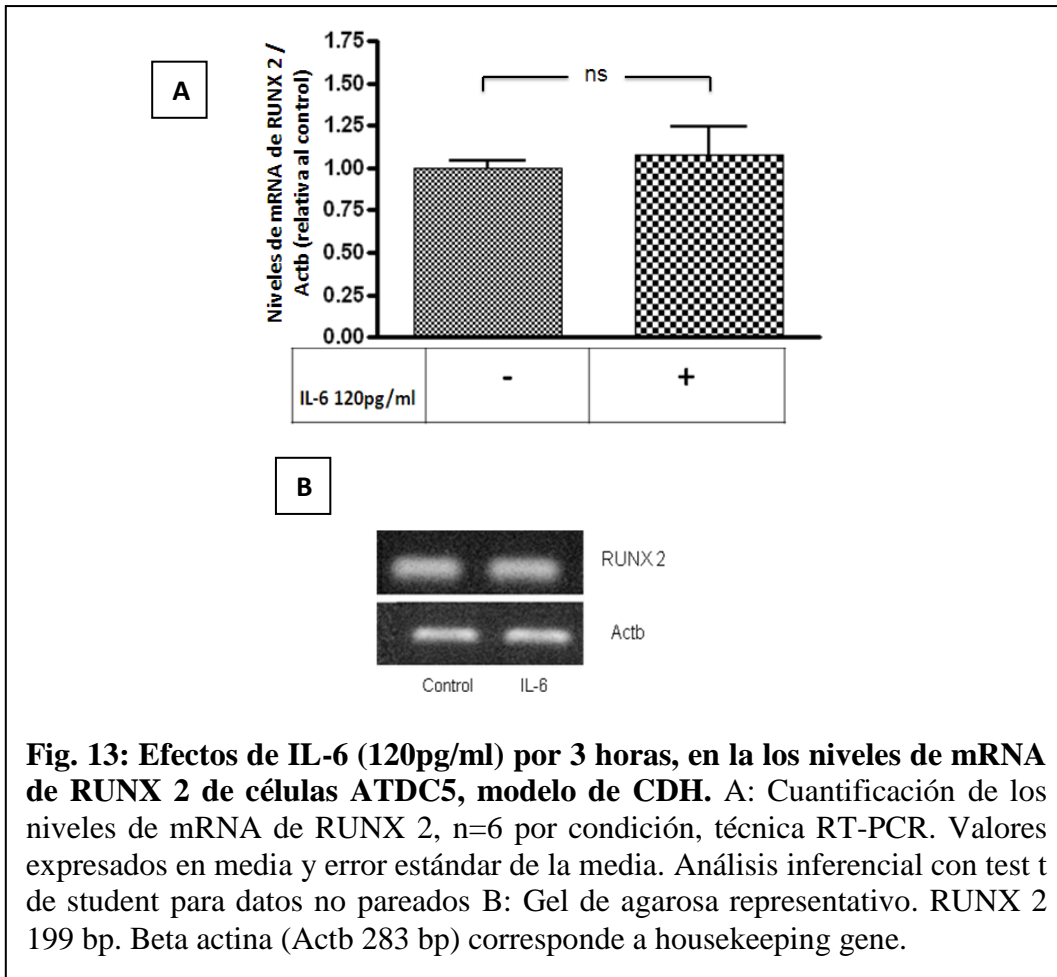
*Efectos de dexametasona en los niveles de expresión del mRNA de RUNX 2*

A fin de evaluar el efecto de Dex en el contenido celular del mRNA de RUNX 2 de CDH de células ATDC5, éstas fueron cultivadas con Dex 10<sup>-8</sup> M por 3h. Como se observa en la figura 12, Dex a la concentración estudiada indujo una disminución significativa de la expresión de RUNX 2, con un p valor de 0,0003 (Fig. 12).



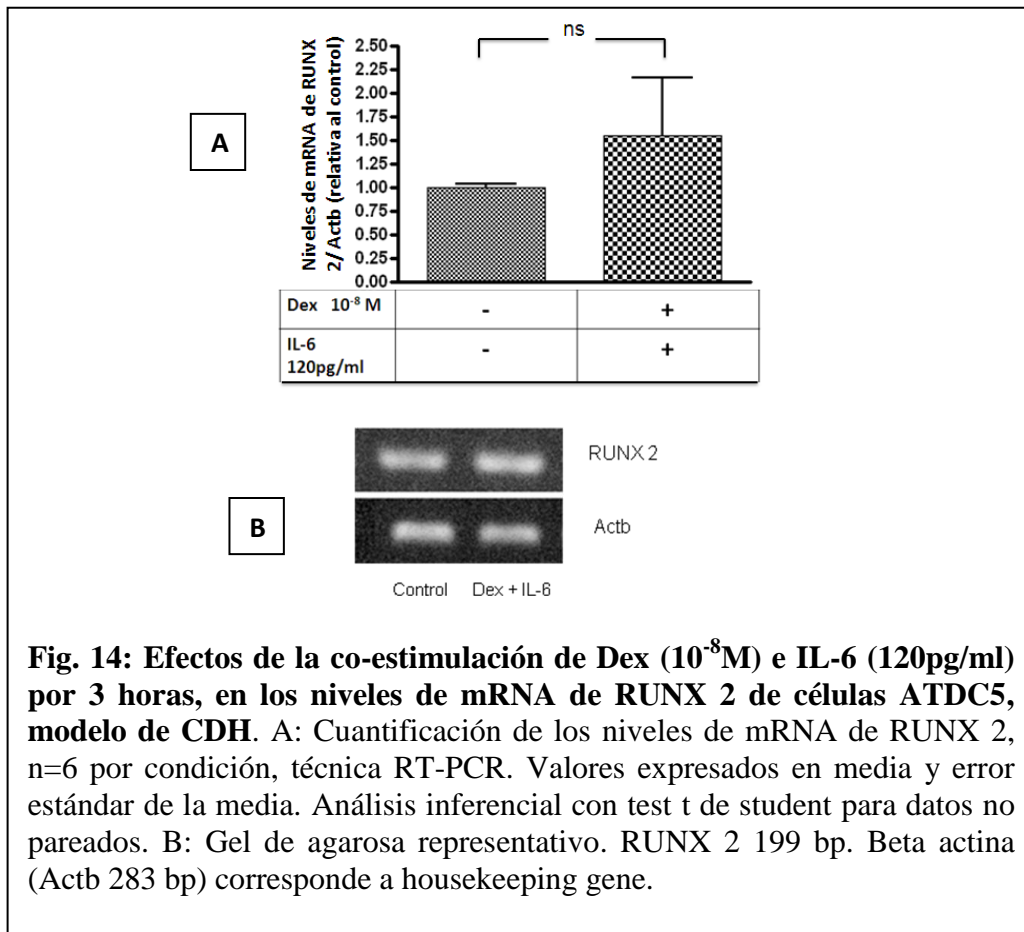
#### *Efectos de IL-6 sobre los niveles de expresión del mRNA RUNX 2*

Con el fin de valorar el efecto de IL-6 en la expresión de RUNX 2 de CDH de células ATDC5, éstas fueron cultivadas por 3h en presencia de 120pg/ml de IL-6, valor que corresponde a la concentración plasmática descrita para pacientes en crisis de ARJ (Yilmaz et al., 2001). Como se observa en la figura 13, IL-6 en las condiciones experimentales aquí descritas no indujo modificación significativa de la expresión del mRNA de RUNX 2, p valor igual a 0,5 (Fig. 13).



*Efecto de la combinación de dexametasona e IL-6 en los niveles de expresión del mRNA de RUNX 2*

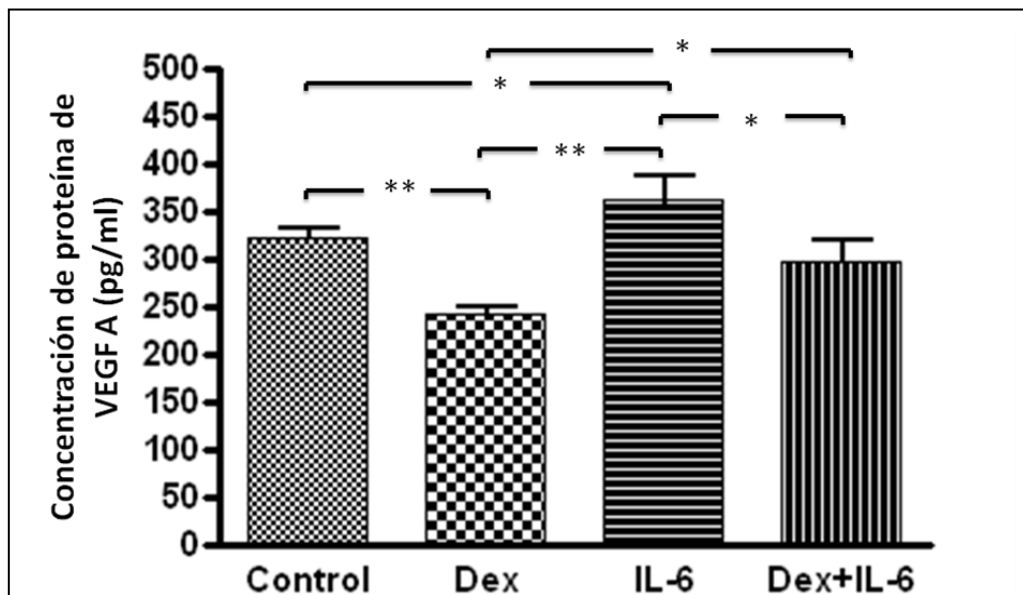
Con el objeto de valorar si la combinación de Dex e IL-6 tenía algún efecto en la expresión de RUNX 2 de CDH de células ATDC5, éstas fueron cultivadas por 3h en presencia de Dex a  $10^{-8}$  M e IL-6 120pg/ml. Como se observa en la figura 14, esta combinación no modificó de modo significativo la expresión de RUNX 2 en relación al control, con un p valor de 0,5 (Fig 14).



*Efectos de dexametasona e IL-6 por separado y en combinación en los niveles de proteína en el sobrenadante de las células ATDC5*

A fin de evaluar el efecto de Dex en el contenido proteico de VEGF A del sobrenadante de CDH de células ATDC5, éstas fueron cultivadas con Dex  $10^{-8}$  M por 3h. Como se observa en la figura 15, Dex a la concentración estudiada indujo una disminución significativa en la concentración de proteína VEGF A en el sobrenadante de las células con respecto al control, con un valor de  $p = 0,0022$  (Fig. 15). Al analizar los efectos de la estimulación con IL-6, observamos que ésta induce un aumento significativo en la concentración de proteína de VEGF A en el sobrenadante en relación al control, con un valor de  $p = 0,0011$ . (Fig. 15).

A fin de evaluar el efecto de Dex más IL-6 en el contenido proteico de VEGF A del sobrenadante de células ATDC5 diferenciadas a CH, estas fueron cultivadas con Dex  $10^{-8}$  M y IL-6 120 pg/ml por 3h. Como se observa en la figura 15, la combinación a la concentración estudiada no indujo una diferencias significativas en la concentración de proteína VEGF A en



**Figura 15: Efectos de Dex ( $10^{-8}$ M) e IL-6 (120pg/ml) por 3 horas, por separado y en coestimulación, en las concentraciones de proteína de VEGF- A en el sobrenadante de células ATDC5, modelo de CDH. n=6 por condición, valores expresados en media y error estándar de la media, análisis inferencial con test Mann Whitney. \* =  $p < 0,05$  \*\* =  $p < 0,01$**

el sobrenadante de las células en relación al control, con un valor de  $p = 0,1328$  (Fig. 15).

La estimulación con Dex induce una disminución significativa de la concentración de proteína de VEGF A en el sobrenadante, en comparación con la co-estimulación con Dex e IL-6, con un  $p = 0,046$  (Fig.15). Sin embargo al comparar los efectos de la co-estimulación en relación a la estimulación con IL-6 sola, observamos que la combinación disminuye significativamente los niveles de proteína en el sobrenadante,, con un valor de  $p = 0,046$  (Fig. 15).

## **Discusión**

### *Diferenciación celular*

El presente estudio plantea estudiar los efectos de GCs e IL-6 en células ATDC5 en etapa de diferenciación a CH. Para ello, la primera tarea consistió en diferenciar el cultivo de condrocitos murinos a CDH. Siguiendo lo reportado previamente por Mushtaq *et al.* (2002), las células fueron cultivadas en un medio de diferenciación utilizando insulina bovina. Al día 15 de seguimiento, se observó expresión de un marcador de diferenciación como es el RUNX 2 (Fig. 4) y un marcador específico para CDH, como lo es el Col X (Fig. 5), acompañado de la formación de nódulos en las placas de cultivo (Fig. 3), demostrando el estadio de CDH del cultivo celular tratado. Resultado similar es expuesto por Mushtaq *et al.* (2002), quienes describen que a los 15 días de diferenciación comienza la etapa de CDH marcado por un aumento significativo en la expresión de Col X.

### *Efectos de la estimulación con dexametasona sobre los niveles de mRNA*

Entre las terapias recomendadas para los pacientes con ARJ se encuentran los GCs. Las dosis farmacológicas recomendadas para su tratamiento se corresponden con concentraciones plasmáticas equivalentes de Dex del orden de los  $10^{-8}$  M (Rose *et al.*, 1980). A nuestro entender, éste es el primer estudio que analiza las acciones biológicas de los GCs en el CC en

concentraciones similares a las alcanzadas en sangre por esta terapia. Como ha sido señalado, en este modelo de CDH hemos encontrado que los niveles de VEGF A en respuesta al cultivo con Dex  $10^{-8}$  M disminuyen significativamente (Fig. 9). Este resultado podría ser comparado con el obtenido por Koedam *et al.* (2002), quienes observaron que Dex a concentración de  $10^{-7}$  M por 24 horas disminuye significativamente los niveles de mRNA de VEGF A en un modelo de cultivo celular de CH de epífisis de porcino. En una segunda experiencia, Koedam y colaboradores al coestimular con actinomicina D, observaron que estímulos con Dex del orden de  $10^{-7}$  M no altera la estabilidad del transcrito de mRNA, por lo cual posiblemente en este caso Dex esté afectando directamente la transcripción de mRNA de VEGF A. Existen antecedentes que plantean la no existencia de sitios GRE en el promotor de VEGF (Tischer *et al.*, 1991), por lo cual Dex y el receptor de GCs podrían estar afectando indirectamente la actividad del promotor al interactuar con factores de transcripción claves en la expresión del VEGF como es el caso de AP1 (Koedam *et al.*, 2002) o HIF 1 alpha (Hata *et al.*, 2008), y de esta manera inhibir la transcripción del mRNA de VEGF A.

Lee *et al.* (2013) destacan al RUNX 2 como un regulador indirecto de la expresión de VEGF A en células en estado de normoxia. Describen que RUNX 2 es capaz de estabilizar al HIF 1alfa impidiendo que el factor pVHL lo degrade, por lo tanto RUNX 2 indirectamente aumentaría la expresión de VEGF A. En el presente estudio se observó que Dex disminuye la expresión de RUNX 2 (Fig. 12). El efecto de Dex sobre el mRNA de RUNX 2 podría ser una vía de modulación en la concentración de mRNA VEGF A. Este resultado podría ser explicado por la presencia de sitios nGRE en el promotor de RUNX 2 (Zhang 2012), por lo cual Dex con el receptor de GCs podrían inhibir directamente la actividad del promotor. Para estudios futuros sería importante evaluar mediadores intermedios de esta vía para determinar el rol del RUNX 2 en la expresión de VEGF A y su relación con los efectos de los GCs en CDH.

#### *Efectos de la estimulación con IL-6 sobre los niveles de mRNA*

En base a los antecedentes analizados se hipotetizó que IL-6 induciría aumentos en los niveles de mRNA de VEGF A y RUNX 2. Es importante destacar que este es el primer estudio que evalúa los efectos de IL-6 a concentraciones plasmáticas encontradas en pacientes con

ARJ activa en los niveles de mRNA de VEGF A en un modelo de CDH. En el presente estudio se estimuló con IL-6 a una concentración de 120 pg/ml (Yilmaz *et al.*, 2001), aumentando significativamente los niveles de mRNA de VEGF A, confirmando los resultados propuestos por la hipótesis. Estos resultados podrían ser comparados por los obtenidos por Cohen *et al.* (1995) quienes evaluaron el efecto de la estimulación con IL-6 en un cultivo de músculo esquelético de rata, encontrando que IL-6 a concentraciones de 80ng/ml induce la expresión de VEGF A y aumenta la actividad del reportero de actividad de la región genómica del VEGF A. A su vez Loeffler y colaboradores, al estimular un cultivo in vitro de astrocitos con IL-6 (100ng/ml), observo un aumento significativo en la expresión proteica de VEGF, hipotetizando que esto podría ser producido por un aumento de la transcripción del mRNA de VEGF, producto de una estimulación directa de la actividad de su promotor a través de la unión de STAT3 al sitio SBE del promotor, o a través de una estimulación indirecta producida por la interacción proteína-proteína de STAT3 con el factor de transcripción Sp1 (Loeffler *et al.*, 2005).

En el presente estudio la estimulación con IL-6 no produjo cambios significativos en los niveles de mRNA de RUNX2, sin lograr confirmar los resultados propuestos por la hipótesis, resultados similares fueron obtenidos por Kaneshiro y colaboradores al estimular osteoblastos in vitro con IL-6, demostrando que esto se produce por la activación de vías con efectos contrapuesto sobre los niveles de mRNA del RUNX2 (Kaneshiro *et al.*, 2013), antecedente que podría plantear que en el presente estudio IL-6 no cambie significativamente los niveles de mRNA producto de estos efectos contrapuestos de sus vías intracelulares.

#### *Efectos de la co-estimulación con dexametasona e IL-6 sobre los niveles de mRNA*

La hipótesis planteada en base a los antecedentes analizados planteaba que la combinación IL-6 más Dex no produciría diferencias significativas en la expresión de VEGF A, lo cual fue confirmado por los resultados obtenidos en este estudio, planteando que posiblemente la estimulación con Dex revierte los efectos de IL-6 en una modalidad de coestimulación. Estos resultados podría ser explicado por un posible equilibrio entre los efectos contrapuestos de IL-6 y Dex sobre la transcripción del mRNA de VEGF A. Otro antecedente que podría explicar este efecto es el aportado por Barnes & Adcock (2009),



quienes plantean que la vía ERK activada por IL-6 podría fosforilar al receptor de GCs, inhibiendo su actividad (Barnes & Adcock 2009).

#### *Niveles de proteína secretada de VEGF A*

La proteína VEGF A es sintetizada en los ribosomas del RER. La cadena polipeptídica madura se caracteriza por una serie de cambios que ocurren en el RER y Golgi, tales como dimerización a través de uniones disulfuro y glicosilación (Tischer *et al.*, 1991). Finalmente es almacenada en gránulos para su posterior secreción (Yoshino *et al.*, 2006). La secreción de VEGF A estará directamente relacionada con las concentraciones citoplasmáticas de calcio (Rosenthal *et al.*, 2007). Los niveles de proteína secretada en el sobrenadante pueden estar afectados por variaciones en el proceso de liberación de gránulos preformados o por variaciones en el proceso de síntesis y maduración de la proteína. En el caso del VEGF existen antecedentes en cultivos *in vitro* de musculatura lisa que variaciones en la concentración de proteína secretada productora de variaciones de la síntesis *de novo* de VEGF podrían producirse en tiempos cercanos a 4 u 8 horas (Koehne *et al.*, 2000). En base a estos antecedentes, por lo tanto los tiempos (3 horas de estimulación) utilizados en el presente estudio es probable que los resultados en cuanto a los niveles de proteína sean por variaciones en la liberación de gránulos preformados y no por la síntesis *de novo* de la proteína. En base a los antecedentes analizados la hipótesis planteada propone que IL-6 aumentará los niveles de proteína en el sobrenadante y esto será revertido por la estimulación con Dex a modo de coestimulación.

#### *Efectos de la estimulación con dexametasona sobre los niveles de proteína en el sobrenadante*

En el presente estudio se observó que el tratamiento con Dex  $10^{-8}$  M, por 3h, disminuye significativamente los niveles de proteína de VEGF A en el sobrenadante de los CDH (Fig. 15). Este efecto podría estar relacionado con los reportados por Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 2007) quienes estimularon a mastocitos murinos con corticosterona, observando que a los 15 minutos de estimulación disminuye significativamente la secreción de histamina. En experimentos posteriores se observó que este efecto es independiente del receptor de GCs, e independiente del proceso de traducción proteica. En base a estas observaciones los autores

explican que estos posibles efectos no son genómicos y pueden estar mediados por un receptor de GCs ubicado en la membrana celular, que podría regular la permeabilidad de esta.

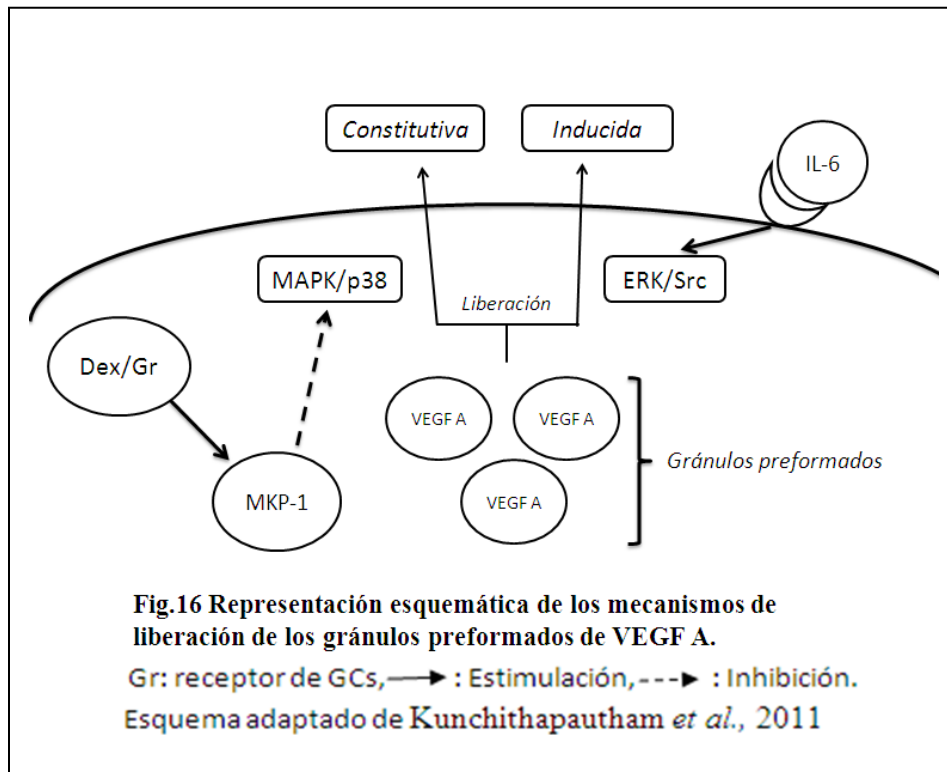
Otra posible explicación para estos resultados está relacionada con los mediadores MAPK/p38 que regulan la secreción constitutiva de VEGF A. Sonya y colaboradores (Sonya *et al.*, 2002) observaron que fibroblastos humanos cultivados *in vitro* en presencia de Dex por 30 minutos disminuyen la actividad de la vía MAPK/p38, inhibiendo la fosforilación de p38 a través del aumento de la expresión MKP-1 (Sonya *et al.*, 2002), este hecho fue relacionado por Klettner y colaboradores (Klettner *et al.*, 2009) con una inhibición de la secreción constitutiva de VEGF A en células de epitelio pigmentario de retina (Fig. 15)

#### *Efectos de la estimulación con IL-6 sobre los niveles de proteína en el sobrenadante*

En el presente estudio se observó que la exposición a IL-6 120pg/ml, por 3h, produjo cambios significativos en los niveles de proteína de VEGF A en el sobrenadante de los CDH (Fig 15), confirmando los resultados propuestos por la hipótesis. La secreción inducida de VEGF A esta mediada por la vía ERK, quien regula los aumentos de calcio citoplasmáticos de origen intracelular (Klettner *et al.*, 2009), y la vía Src kinasa, quien regula la apertura de los canales de calcio regulados por voltaje (Rosenthal *et al.*, 2007). La tendencia obtenida en el presente estudio podrían ser explicados por los efectos de la unión de la IL-6 a su receptor de membrana, esta unión activa la vía intracelular de SHP2, que a su vez fosforila y activa la vía ERK en tiempos cercanos a los 30 min de estimulación (Kaneshiro *et al.*, 2013). ERK activada aumenta la concentración de calcio citoplasmático de origen intracelular, pero a su vez activa la vía Ras, la cual potencia la actividad de Src kinasa (Kunchithapautham *et al.*, 2011), produciendo aumentos de la concentración de calcio citoplasmático de origen extracelular, de esta manera potenciando la secreción del VEGF A que se encuentra almacenado en gránulos (Fig 15).

#### *Efectos de la co-estimulación con dexametasona e IL-6 sobre los niveles de proteína en el sobrenadante*

En el presente estudio se observó que la co-estimulación IL-6 120pg/ml e Dex  $10^{-8}$ M,



por 3h, no produce cambios significativos en los niveles de proteína de VEGF A en el sobrenadante en comparación al control, resultados que concuerdan con lo planteado en la hipótesis y podrían ser explicados por un equilibrio en el proceso de liberación de VEGF A, donde Dex podría estar inhibiendo la liberación constitutiva mientras IL-6 podría estar estimulando la liberación inducida de VEGF A (Fig.16).

Se sabe que el VEGF A tiene un rol muy importante en la osificación endocondral, de modo que aumentos o disminuciones de la secreción de este factor afectarán la osificación, resultando en ambos casos en alteración de la osificación endocondral y una disminución del crecimiento óseo longitudinal (Dai & Rabie 2007). La disminución de la secreción de VEGF por los CDH se ha asociado con una disminución de la invasión vascular y una alteración del proceso de apoptosis de los CH (Carmellet *et al* 1996), alterando la fisiología de la placa epifisaria en general y afectado el crecimiento óseo. Se sabe que el proceso de crecimiento óseo es regulado por factores endocrinos y por factores locales. Al extrapolar los resultados obtenidos en este estudio podríamos especular que en el paciente con ARJ activa sin tratamiento existe un aumento de VEGF A producido y liberado al medio por los CH, lo cual

podría repercutir en alteraciones en la osificación de este CC, produciendo efectos negativos en el crecimiento longitudinal. Por otra parte, cuando la ARJ activa está en tratamiento con GCs se podría esperar que este fármaco revierta los efectos de la inflamación de la ARJ activa, no solo controlando los niveles de citoquinas proinflamatorias, si no también regulando los niveles de VEGF A producidos y liberados por los CH (Fig. 15). De esta manera se podría plantear que el tratamiento con GCs podría estar participando con un nuevo rol, al controlar los efectos de las citoquinas proinflamatorias en el CC y así regular la osificación.

A modo de conclusiones podríamos aseverar:

- La dexametasona a concentraciones alcanzadas por dosis farmacológicas disminuye los niveles de mRNA de VEGF A y RUNX 2 y disminuye los niveles de proteína VEGF A secretada, en un cultivo de CDH murino.
- La IL-6 a concentraciones plasmáticas encontradas en pacientes con ARJ activa aumenta significativamente los niveles de mRNA de de VEGF A pero no produce diferencias significativas en los niveles de mRNA de RUNX 2. A su vez este tratamiento aumenta los niveles de proteína VEGF A en el sobrenadante de un cultivo de CDH murino. Confirmando parcialmente los resultados propuestos por la hipótesis de este estudio.
- La combinación de IL-6 y Dex a concentraciones plasmáticas encontradas en pacientes con ARJ activa en tratamiento no produce diferencias significativas en los niveles de mRNA de VEGF A y RUNX 2, ni tampoco en los niveles de VEGF A secretado. Confirmando los resultados propuestos por la hipótesis de este estudio en relación a los efectos de la co-estimulación.

## **Bibliografía.**

Akiyama, H.; Kanno, T.; Ito, H.; Terry, A.; Neil, J.; Ito, Y.; Nakamura, T. "Positive and negative regulation of chondrogenesis by splice variants of PEBP2aA/CBFA1 in clonal mouse EC cells, ATDC5". *J Cell Physiol.* 181:169– 178,1999.

Alitalo. K.; Carmeliet. P. "Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease". *Cancer Cell.* 1: 219-227, 1992.

Altat ,F. M.; Hering, T. M.; Kazmi, N. H.; Yoo, J. U.; Johnstone, B. "Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells". *Eur Cell Mater.* 12: 64-70, 2006.

Andersson- Gäre, B. "Juvenile arthritis – who gets it, where and when: a review of current data on incidence and prevalence". *Clin Exp Rheumatol.* 17: 367-374, 1999.

Atsumi, T.; Miwa, Y.; Kimata, K.; Ikawa, Y. "A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells". *Cell Differ Dev.* 30:109-116, 1990.

Barnes, P.; Adcock, I." Glucocorticoid resistance in inflammatory disease". *Lancet.* 373: 1905–17, 2009.

Baron. J.; Huang, Z.; Oerter, K.E.; Bacher, J.; Cutler, G.B. (1992). "Dexamethasone acts locally to inhibit longitudinal bone growth in rabbits". *Am J of Physiol.* 263:489-E492, 1992.

Bluteau, G.; Julien, M.; Magne, D.; Mallein-Gerin, F.; Weiss, P.; Daculsi, G.; Guicheux, J." Vegf and Vegf receptors are differentially expressed in chondrocytes". *Bone.* 40: 568-576, 2007.

Brahimi-Horn, C.; Berra, E.; Pouyssegur, J. "Hypoxia. The tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway". *Trends Cell Biol.* 11: S32–S36, 2001.

Brandi, ML.; Collin-Osdoby, P. " Vascular Biology and the Skeleton". *J Bone Min Res.* 21: 183-192, 2006.

Buckwalter, JA.; Mower, D.; Ungar, R.; Schaeffer, J.; Ginsberg, B. "Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy". *J Bone Joint Surg Am* 68:243–55, 1986.

Carlevaro, MF., Cermelli, S.; Cancedda, R.; Canceda, FD. "Vascular endotelial growth factor (vegf) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation". *J of Cell Sci.* 113: 59-69, 2000.

Carmeliet, P.; Ferreira, V.; Breier, G.; Pollefeyt, S.; Kleckens, L.; Gertsenstein, M.;

Fahrig, M.; Vandenhoek, A.; Harpal, K.; Eberhardt, C.; Declercq, C.; Pawling, J.; Moons, L.; Collen, D.; Risau, W.; Nagy, A. "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele". *Nature* 380: 435-439, 1996.

Cohen, T.; Nahari, LW.; Neufeld, G.; Ben-Zion, L."Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor". *J Biol Chem.* 271: 736-741, 1995.

Dai, J.; Rabie, AB. "VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification". *J Dent Res.* ; 86:937–950, 2007.

De Benedetti, F.; Alonzi, T.; Moretta, A.; Lazzaro, D.; Costa, P.; Poli, V.; Martini, A.; Ciliberto, G.; Fattori, E. "Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulinlike growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation". *J Clin Invest.*99: 643–50, 1997.

De Benedetti, F.; Massa, M.; Pignatti, P.; Albani, S.; Novick, D.; Martini, A. "Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis". *J Clin Invest.* 93: 2114–2119, 1994.

De Benedetti, F, Meazza, C, Oliveri, M. Effect of IL-6 on IGF binding protein-3: a study in IL-6 transgenic mice and in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Endocrinology.* 142:4818–26, 2001.

Dewitt, E.; Kimura, Y.; Beukelman, T.; Nigrovic, P.; Onel, K.; Prahalad, S; Scheneider, R; Stoll, M.; Weiss, C.; Weiss, P.; Ilowitte, N.; Wallance, C. "Consensus treatment plans for new-onset sistemic juvenile idiopathic arthritis". *Arthritis Care Res.* 64:1001-1010, 2012.

Ferrara, N.; Alitalo, K. "Clinical applicatios of angiogenic growth factors and their inhibitors". *Nat Med.* 5:1359-1364, 1999.

Ferrara, N.; Carver-Moore, K.; Chen, H.; Dowd, M.; Lu, L.; O'Shea, KS.; Powell-Braxton, L.; Hillan, KJ.; Moore, MW. "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene". *Nature.* 380: 439-442, 1996.

Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. "The biology of vascular endothelial growth factor". *Endocr rev.*18: 4-25, 1997.

Ferrara, N. "VEGF an the quest for tumour angiogénesis factors". *Nat Rev Cáncer* 2:795-803, 2002.

Folkman, J.; Shing, Y. "Angiogénesis". *J Biol Chem.* 267: 10931-10934, 1992.

Franchimont, N.; Wertz, S.; Malaise, M. "Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation?". *Bone.* 37: 601–606, 2005.

Hata, Y.; Sassa, Y.; Kita, T.; Miura, M; Kano, K.; Kawahara, S.; Arita, R.; Nakao, S.; Shih, J.; Ishibashi, T. (2008). "Vascular endothelial growth factor expression by hyalocytes and its regulation by glucocorticoid". *Br J Ophthalmol.* 92:1540–1544, 2008.

Houck, KA.; Ferrara, N.; Winer, J.; Cachianes, G.; Li, B.; Leung, DW. "The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA". *Mol Endocrinol.* 5: 1806-1814, 1991.

Ishihara, K.; Hirano, T."IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease". *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:357–368, 2002.

Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, JM.; Lane S.; Kaelin, WG. "HIF1 targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation. Implications for O<sub>2</sub> sensing". *Science.* 292: 464–468, 2001.

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

Kaneshiro, S.; Ebina, K.; Shi, K.; Higuchi, C.; Hirao, M.; Koizumi, O.;Tokimitsu Morimoto T .; Yoshikawa, J.; Jun, Hashimoto. "IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro". *J Bone Miner Metab.* 42: 13-18, 2013.

Karsenty, G.; Wagner, EF. "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development". *Dev Cell.* 2: 389-406, 2002.

Kim K. "Treatment of juvenile rheumatoid arthritis". *Korean J Pediatr* 53:936-941, 2010.

Klettner, A.; Roider, J. "Treating age-related macular degeneration - interaction of VEGF-antagonists with their target". *Graefes Arch Clin Exp Ophtalmol.* 247:1487-1492, 2009.

Koedam, JA. ; Smink, J.J.; Buul-Offers, SC. "Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expresión in growth plate chondrocytes". *Mol and Cel Endocrinology.* 187: 35-44. 2002.

Koehne, P.; Willam, C.; Strauss, E.; Schindler, R.; Eckardt, K.; Buhner, C. "Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platelets". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279: H817-H824. 2000.

Kunchithapautham, K.; Rohrer, B. "Sublytic menbrane –attack- complex (MAC) activation alters regulated rather tan constitutive vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in retinal pigment epithelium monolayers". *J Biol Chem.* 286: 23717-23724, 2011.

Kutukculer, N.; Caglayan, S.; Aydogdu, F. “Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1 alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters”. *Clin Rheumatol.* 17:288–92, 1998.

Le Goff, B.; Blanchard, F.; Berthelot, JM; Heymann, D., Maugars, Y. “Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 77:201–205, 2010.

Lee, SH.; Che, X.; Jeong, J.; Choi, JY.; Lee, Y.; Lee, YH.; Bae, SC.; Lee, YM. “RUNX 2 Protein Stabilizes Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  through Competition with von Hippel-Lindau Protein (pVHL) and Stimulates Angiogenesis in Growth Plate Hypertrophic Chondrocytes”. *J Biol Chem.* 287:14760-14771, 2012.

Li, J.; Wang, X.; Zhou, C.; Liu, L.; Wu, Y.; Wang, D.; Jiang, H. “Perioperative glucocorticosteroid treatment delays early healing of a mandible wound by inhibiting osteogenic differentiation”. *Injury.* 43: 1284-1289, 2012.

Liu, C.; Zhou, J.; Zhang, LD.; Wang, XY.; Kang, ZM.; Chen, YZ.; Jiang, CL. Rapid inhibitory effect of corticosterone on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Horm Metab Res.* 39: 273-277, 2007.

Loeffler, S.; Fayard, B.; Weis, J.; Weissenberger, J. “Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1”. *Int J Cancer.* 115: 202–213, 2005.

Long, F. “Pediatric Bone”. Elsevier. 2da edición, cap 3: 39-53. 2012.

Maes, C.; Carmeliet, P.; Moermans, K.; Stockmans, I.; Smets, N.; Collen, D.; Bouillon, R.; Carmeliet, G. “Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188”. *Mech Dev.* 111: 61-73, 2002.

Mainardi, GL.; Saleri, R.; Tamanini, C.; Baratta, M. “Effects of interleukin-1-beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha alone or in association with hexarelin or galanin, on growth hormone gene expression and growth hormone release from pig pituitary cells”. *Horm Res.* 58: 180-6, 2002.

Martensson, K.; Chrysis, D.; Sävendahl, L. “Interleukin-1-beta and TNF-alpha act in synergy to inhibit longitudinal growth in fetal rat metatarsal bones”. *J Bone Miner. Res.* 19: 1805-12, 2007.



Matthews, W.; Jordan, CT.; Gavin, M.; Jenkins, NA.; Copeland, NG.; Lemischka, IR. "A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit". *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 88: 9026-9030, 1991.

McMaster, A.; Ray, DW. "Drug Insight: selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor". *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4; 91 – 101, 2008.

MINISTERIO DE SALUD. "Guía clínica artritis idiopática juvenil / Artritis reumatoidea juvenil". Santiago: MINSAL, 2010.

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

Nakajima, S.; Naruto, T.; Miyamae, T.; Imagawa, T., Mori, M.; Nishimaki, S.; Yokota, S. "Interleukin-6 inhibits early differentiation of ATDC5 chondrogenic progenitor cells". *Cytokine.* 47: 91-97, 2009.

Nakatani, S.; Mano, H.; Im, R.; Shimizu, J.; Wada, M. "Glucosamine Regulates Differentiation of a Chondrogenic Cell Line, ATDC5". *Biol and Pharma Bulletin.* 30: 433-438, 2007.

Neufeld, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal.* 13: 9-22, 1999.

Olsson, AK.; Dimberg, A.; Kreuger, J.; Claesson-Welsh, L. "VEGF receptor signalling-incontrol of vascular function". *Nat Rev Mol Cell Bio.* 7: 359-371, 2006.

Petty, RE.; Southwood, TR.; Baum, J.; Bhattay, E.; Glass, DN.; Manners, P.; Maldonado-Cocco, J.; Suarez-Almazor, M.; Orozco-Alcala, J.; Prieur, AM. "Revision of the proposed classification criteria of juvenile idiopathic arthritis: Durban". *Rheumatol.* 25: 1991-1994, 1998.

Petty, RE.; Southwood, TR.; Manners, P.; Baum, J.; Glass, DN.; Goldenberg, J.; He, XH.; Maldonado-Cocco, J.; Orozco-Alcala, J.; Prieur, AM.; Suarez-Almazor, ME.; Woo, P. "International league of associations for rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: Second revision, Edmonton". *J Rheumatol.* 31: 390 – 392, 2001.

Pfaffi, M. "Quantification strategies in real-time PCR". *Capitulo 3.* 88-108, 2004.

Ravelli, A.; Martini, A. Juvenil idiopathic arthritis. *Lancet.* 369: 767-778, 2007.

Rose, J.; Yurchak, A.; Jusko, W. "Dose dependent pharmacokinetics of prednisone and prednisolone in man". *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 4: 389-417, 1980.

Rosenthal, R.; Heimann, H.; Agostini, H.; Martin, G.; Hansen, L.; Strauss, A. "Ca<sup>2+</sup> channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease". *Mol Vis.* 13: 443-456. 2007.

Ryan, AM.; Eppler, DB.; Hagler, KE.; Bruner, RH.; Thomford, PJ.; Hall, RL.; Shopp, G.; O'Neill, CA. "Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody". *Toxicologic Pathol.* 27:78-86. 1999.

Semenza, G. "Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1". *Biochem Pharmacol.* 64: 993-998, 2002.

Shibuya, M. "Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis". *BMB Rep.* 30:278-86, 2008.

Shukunami, C.; Ishizeki, K.; Atsumi, T.; Ohta, Y.; Suzuki, F.; Hiraki, Y. "Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro". *J. Bone Miner Res.* 12:1174-88, 1997.

Simon, D.; Czernichow, P. "Arthrites juveniles et croissance staturale". *Rev Rheum.* 70: 511-6, 2003.

Simon, D.; Lucidarme, N.; Prieur, AM.; Ruiz, JC.; Czernichow, P. "Treatment of growth failure in juvenile chronic arthritis". *Horm Res.* 58: 28-32, 2002.

Sonya, ML.; Boucheron, AC.; Saklatvala, J.; Clark, AR. "Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) Phosphatase 1 and Phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38". *Mol and Cel Biol.* 22: 7802-7811, 2002.

Terman, BI.; Carrion, ME.; Kovacs, E.; Rasmussen, BA.; Eddy, R.; Shows, TB. "Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase". *Oncogene.* 6: 1677-1683. 1991.

Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, JC.; Abraham, JA. "The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor". *J Biol Chem.* 266:11947-11954, 1991.

Valta, H.; Lahdenne, P.; Jalanko, H.; Aalto, K.; Mäkitie, O. "Bone health and growth in glucocorticoid-treated patients with juvenile idiopathic arthritis". *J Rheumatol.* 34: 831-6, 2007.

Veikkola, T.; Jussila, L.; Makinen, T.; Karpanen, T.; Jeltsch, M.; Petrova, TV.; Kubo, H.; Thurston, G.; McDonald, DM.; Achen, MG.; Stacker, SA.; Alitalo, K. "Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice". *EMBO J.* 20: 1223-1231, 2001.

Wallis, G. "Bone growth: Coordinating chondrocyte differentiation". *Curr Biol.* 6:1577-1580, 1996.

Wang, SJ.; Yang, YH.; Lin, YT.; Yang, CM.; Chiang, BL. "Attained adult height in juvenile rheumatoid arthritis with or without corticosteroid treatment". *Clin. Rheumatol.* 21: 363-8, 2002.

Wong, SC.; MacRae, JA.; Gracie, JA.; McInnes, LB.; Galea, P.; Gardner-Medwin, J.; Ahmed SF. "Inflammatory cytokines in juvenile idiopathic arthritis: Effects on physical growth and the insulin-like-growth factor axis". *Growth Horm IGF Res.* 18:369-378, 2008.

Yancopoulos, GD.; Davis, S.; Gale, NW.; Rudge, JS.; Wiegand, SJ.; Holash, J. "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation". *Nature.* 407, 242-248, 2000.

Yoshikawa, K.; Kitamura, T.; Kukawa, T.; Gong, J.; Nohora, Y. "Hyaluronic acid affects the in vitro induction effects of synthetic PAMPS and PDMAAm hydrogels on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, depending on the level of concentration". *BMC Musculoskelet Di.* 14: 56-62, 2013.

Yoshino, Y.; Aoyagi, M.; Tamaki, M.; Duan, L.; Marimoto, T.; Ohno, K. "Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells". *Int J Oncol.* 29: 981-987, 2006.

Yilmaz, M.; Kendirli, SG.; Altintas, D.; Bingol, G.; Antmen, B. "Cytokine levels in serum of patients with juvenile rheumatoid arthritis". *Clin. Rheumatol.* 20:30-5, 2001.

Zelzer, E.; Glotzer, DJ.; Hartmann, C.; Thomas, D.; Fukai, N.; Soker, S.; Olsen, BR. "Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/RUNX 2". *Mech Dev.* 106: 97-106, 2001.

Zhang, YY.; Li, X.; Qian, S.; Guo, L.; Huang, HY.; He, Q.; Liu, Y.; Ma, C.; Tang, Q. "Down-Regulation of Type I Runx2 Mediated by Dexamethasone Is Required for 3T3-L1 Adipogenesis". *Mol Endocrinol.* 26: 798-808, 2012.