

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ANALISIS DE LOS EFECTOS DE LOS
GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR
Y LA SINTESIS DE COLAGENO.**

Estudio experimental en cultivo de osteoblastos humanos

TESIS DOCTORAL

Presentada por: M^a Victoria Hernández Miguel

Dirigida por: Dra. Nuria Guañabens Gay

Barcelona, 23 de Octubre de 2003

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nuria Guañabens Gay, directora de esta tesis doctoral por su estímulo, dirección y ayuda en el desarrollo de este trabajo, y a la que siempre le estaré agradecida por darme la oportunidad de formar parte de su equipo.

A la Dra. Ana Monegal por su colaboración y ayuda en la realización del análisis estadístico de este trabajo.

A la Dra. Luisa Alvarez del Servicio de Bioquímica del Hospital Clínic de Barcelona por su iniciativa y participación en la realización de las determinaciones y análisis de los marcadores óseos de esta tesis doctoral.

A la Dra. Guadalupe Ercilla del Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona por su ayuda en la realización de la técnica de inmunocitoquímica.

A la Dra. Pilar Peris por su amistad durante estos años y su ayuda en el campo de la Patología Metabólica Ósea.

Al Dr. Josep Riba y a los compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínic de Barcelona por su colaboración al facilitar las muestras necesarias para la realización de este proyecto.

A la Dra. M^a Jesús Martínez de Osaba del Servicio de Hormonal del Hospital Clínic de Barcelona por su interés en la realización de este proyecto.

A la Dra. Montse Nacher del Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques de Barcelona por su ayuda como consultora en la técnica de cultivos celulares.

Al Dr. José Muñoz-Gómez, Jefe de Servicio de Reumatología durante mis años de residencia en el Hospital Clínic de Barcelona, por su interés y colaboración durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Xavier Surís que me introdujo y me ayudó en mis inicios en el campo de los cultivos celulares de células óseas.

Al resto de compañeros del Servicio de Reumatología del Hospital Clínic de Barcelona, que contribuyeron en mi formación como especialista en Reumatología.

Al Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona, en particular a Marisol Pastor y a la Dra. Odette Viñas por su ayuda en la realización de la parte técnica de isótopos radiactivos.

Al Hospital Clínic de Barcelona por subvencionar este proyecto mediante la concesión del Premi Fi de Residència.

INDICE

INTRODUCCION	1
1. JUSTIFICACION DEL TEMA	3
2. ESTRUCTURA OSEA	5
2.1. Osteoblasto	6
2.1.1. Linaje osteoblástico	8
2.1.2. Funciones del osteoblasto	10
2.1.2.1. Síntesis y secreción de colágeno	11
2.1.2.2. Mineralización de la matriz colágena	15
2.1.2.3. Síntesis de proteínas no colágenas	17
2.2. Osteoclasto	20
3. REMODELADO OSEO	23
3.1. Proceso de remodelado	24
3.2. Regulación del remodelado óseo	27
3.2.1. Factores	27
3.2.1.1. Sistémicos	27
3.2.1.2. Locales	30
3.2.2. Regulación	33
4. MARCADORES BIOQUIMICOS DEL REMODELADO OSEO	37
4.1. Fosfatasa alcalina total e isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina	39
4.2. Osteocalcina	40
4.3. Propéptido carboxiterminal del procolágeno I	42

4.4. Propéptido aminoterminal del procolágeno I	44
5. OSTEOPOROSIS	47
6. OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES	49
6.1. Factores que influyen en el desarrollo de la osteoporosis inducida por glucocorticoides	50
6.1.1. Dosis	51
6.1.2. Duración	52
6.1.3. Tipo de glucocorticoide	52
6.1.4. Vía de administración	53
6.1.5. Factores individuales	54
6.1.6. Enfermedades de base	55
6.2. Características de la osteoporosis inducida por glucocorticoides	55
6.2.1. Localización esquelética	55
6.2.2. Ritmo	56
6.2.3. Reversibilidad	57
6.2.4. Efecto en los parámetros bioquímicos y en la concentración de PTH y vitamina D	58
6.2.5. Efectos en los marcadores bioquímicos de formación ósea	59
6.3. Fisiopatología de la osteoporosis inducida por glucocorticoides	60
6.3.1. Efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo mineral	60
6.3.2. Efectos de los glucocorticoides a nivel óseo	63
6.3.3. Otros efectos de los glucocorticoides	65
6.4. Mecanismos celulares de la osteoporosis inducida por glucocorticoides	69
6.4.1. Efectos de los glucocorticoides sobre la resorción ósea	69
6.4.2. Efectos de los glucocorticoides sobre la formación ósea	71

6.4.2.1. Acción directa de los glucocorticoides sobre los osteoblastos	72
6.4.2.1.1. Efectos sobre la proliferación celular	72
6.4.2.1.2. Efectos sobre los precursores osteoblásticos	75
6.4.2.1.3. Efectos sobre la apoptosis	76
6.4.2.1.4. Efectos sobre la función celular: síntesis proteica	77
6.4.2.1.4.1. Efectos sobre la síntesis de osteocalcina	79
6.4.2.1.5. Efectos sobre la producción de fosfatasa alcalina	80
6.4.2.2. Acción indirecta de los glucocorticoides sobre los osteoblastos	81
7. CULTIVOS CELULARES	85
7.1. Tipos de cultivos celulares	86
7.2. Cultivos de células osteoblásticas	87
7.2.1. Cultivos de células osteoblásticas de origen animal	87
7.2.2. Cultivos de células osteoblásticas tumorales	88
7.2.3. Cultivo de células osteoblásticas humanas	89
7.2.3.1. Aislamiento	89
7.2.4. Cultivo de células osteoblásticas humanas modificadas	91
7.3. Aplicabilidad de los cultivos celulares de osteoblastos humanos	91
OBJETIVOS	95
1. OBJETIVO GENERAL	97
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	97
MATERIAL Y METODOS	99
1. CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS	101
1.1. Material para el establecimiento del cultivo	101

1.1.1. Instrumental	101
1.1.2. Reactivos	102
1.1.2.1. Preparación de los reactivos	104
1.1.2.1.1. Reactivos del cultivo de osteoblastos humanos	104
1.1.2.1.2. Reactivos del ensayo experimental	108
1.2. Selección de los pacientes y obtención de piezas óseas	109
1.3. Procesamiento de las muestras	110
1.4. Mantenimiento del cultivo celular	111
1.5. Tripsinización y recuento celular	112
2. ENSAYO EXPERIMENTAL	113
2.1. Caracterización celular	113
2.2. Diseño del estudio	114
2.2.1. Tratamiento de las células	114
2.2.2. Ensayo experimental	115
2.3. Estudio de la proliferación celular	116
2.4. Determinación de la síntesis de procolágeno I intracelular	117
2.5. Estudio de la secreción de los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno I: PINP y PICP en el medio de cultivo	119
3. ESTUDIO ESTADISTICO	121
RESULTADOS	123
1. CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS	125
1.1. Obtención de piezas óseas. Selección de pacientes	125

1.2. Procesamiento de las muestras y mantenimiento del cultivo celular	125
1.3. Tripsinización y pase celular	129
1.4. Caracterización celular	129
2. ENSAYO EXPERIMENTAL	132
2.1. Pacientes	132
2.1.1. Sexo	133
2.1.2. Edad	133
2.2. Estudio de la proliferación celular	133
2.3. Determinación de la síntesis de procolágeno I intracelular	135
2.4. Estudio de la secreción de los propéptidos amino y carboxi terminal del procolágeno I en el medio de cultivo	142
2.5. Correlación entre la síntesis de procolágeno I intracelular y los propéptidos amino y carboxiterminal secretados en el medio de cultivo	145
DISCUSION	147
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFIA	165
ANEXO	206

INTRODUCCION

1. JUSTIFICACION DEL TEMA

La osteoporosis es uno de los principales problemas médicos secundarios al tratamiento continuado con glucocorticoides. Aunque este aspecto está universalmente aceptado, su patogenia es discutida y, a nivel celular, el mecanismo por el que actúan no es bien conocido.

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido el estudio de los efectos de los glucocorticoides sobre la proliferación y función celular de osteoblastos humanos para analizar los mecanismos celulares de la osteoporosis inducida por dichos fármacos. Ello ha sido posible gracias al desarrollo de una línea de cultivo de células óseas, el cultivo de osteoblastos humanos, continuando la línea de investigación iniciada previamente en el Servicio de Reumatología con el cultivo de células óseas tumorales. El cultivo de osteoblastos humanos, establecido a partir de hueso trabecular humano, permite la realización del análisis del comportamiento celular en células óseas "normales", es decir, no obtenidas a partir de otras especies o de tumores óseos, aspectos que pueden modificar la información aportada por el estudio.

La realización de este proyecto de investigación nos ha permitido profundizar en el estudio de los efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo de la célula ósea y, por tanto, en la etiopatogenia de la osteoporosis inducida por glucocorticoides.

2. ESTRUCTURA OSEA

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que, junto con el cartílago, compone el sistema esquelético. Dicho sistema tiene tres funciones:

- mecánica, de soporte muscular para locomoción;
- protectora, de órganos vitales y médula ósea; y
- metabólica, de reserva de iones para todo el organismo, especialmente calcio y fósforo.

En el esqueleto adulto el 80% del volumen óseo corresponde a hueso cortical y el 20% restante a hueso trabecular o esponjoso. Los constituyentes fundamentales del tejido óseo son las células y la matriz orgánica extracelular, constituida esta última en un 90% por fibras de colágeno tipo I y en un 10% por proteínas no colágenas.

La disposición de las fibras colágenas permite clasificar el tejido óseo en un tipo maduro o laminar y en otro inmaduro o plexiforme. El tejido óseo maduro constituye el esqueleto adulto y se caracteriza por la disposición ordenada, en láminas paralelas, de las fibras colágenas de la matriz orientadas en una dirección preferente que alterna de capa a capa proporcionando al hueso adulto la típica estructura lamelar, permitiendo la

mayor densidad de colágeno por unidad de volumen de tejido. El hueso plexiforme, con menor densidad mineral, se caracteriza por una disposición desordenada de las fibras.

La matriz ósea mineralizada es metabólicamente activa, y se halla formada por el depósito de iones minerales en forma de cristales de hidroxapatita en una red de colágeno tipo I (65 % material cristalino inorgánico y 35 % matriz orgánica).

2.1. OSTEOLASTO

El osteoblasto, o célula formadora ósea, es la célula responsable de la producción de los constituyentes de la matriz ósea (colágeno y proteínas no colágenas), así como de su mineralización. Se origina de células madre de origen mesenquimal. Estas células, tras ser estimuladas, proliferan y se diferencian en preosteoblastos y, posteriormente, en osteoblastos maduros.

A microscopía óptica, el osteoblasto se caracteriza por presentar un núcleo redondo en la base de la célula, opuesto a la superficie ósea; un citoplasma marcadamente basófilo; y un aparato de Golgi prominente, localizado entre el núcleo y el vértice de la célula. La orientación de sus organelas es polarizada. Cerca de la superficie ósea del osteoblasto se halla una gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso (RER) el cual se halla separado del núcleo excéntrico por el complejo de Golgi. Sus características histológicas reflejan que es una célula metabólicamente muy activa. Su núcleo presenta un material similar al de otras células eucariotas y permanece en estado no condensado durante la interfase. Presenta, generalmente, de uno a tres

nucleolos. Tradicionalmente se establecía que el osteoblasto maduro no se dividía, de modo que las fases de la mitosis (profase, metafase, anafase, telofase) no aparecían en los osteoblastos. Sin embargo, recientemente se han publicado estudios que establecen que el osteoblasto es capaz de dividirse bajo un estímulo adecuado ¹.

A nivel ultraestructural, el osteoblasto se caracteriza por la presencia de un desarrollado retículo endoplasmático rugoso (RER) con cisternas dilatadas y un contenido granular denso profundamente basófilo, más pronunciado en células activas. Su aspecto granular es debido a la presencia de una gran cantidad de ribosomas asociados al RNAm. La abundancia de RER es esperable debido a la marcada actividad de síntesis proteica y secretora de estas células. Asimismo, es característico de estas células un gran complejo de Golgi circular, situado entre el núcleo y el RER, presente debido a la gran cantidad de colágeno tipo I secretado por estas células. Generalmente, este aparato no se tiñe intensamente y aparece como una zona clara en el centro de la célula. Se ha demostrado que el osteoblasto posee receptores para estrógenos ² y 1,25 dihidroxivitamina D₃ a nivel nuclear ^{3, 4}, para andrógenos ⁵ y glucocorticoides en su citoplasma ⁶, así como receptores para la hormona paratiroidea (PTH) a nivel de la membrana basal ⁷.

Las prolongaciones citoplasmáticas del polo secretor de la célula se extienden en profundidad en la matriz osteoide y entran en contacto con los canalículos de los procesos del osteocito. A menudo también se hallan complejos de unión (gap junctions) entre los osteoblastos.

Una de las características del fenotipo osteoblástico es la síntesis de fosfatasa alcalina (FA), el marcador de diferenciación más ampliamente utilizado para identificar

esta célula ósea ⁸. La fosfatasa alcalina del esqueleto se halla principalmente en la membrana basal del osteoblasto, característicamente rica en esta enzima. A pesar de hallarse presente en grandes cantidades todavía no se ha identificado su verdadera función, aunque parece tener un papel en la mineralización ósea. Así, el hallazgo de FA en las vesículas de la matriz extracelular que está en proceso de mineralización y el hecho de que sea capaz de hidrolizar el pirofosfato, inhibidor de la deposición de hidroxiapatita, sugieren su intervención en este proceso. Parece ser que la FA presente en dichas vesículas hidroliza los ésteres de fosfato y pone en contacto los aniones fosfato con el calcio, produciendo la formación del fosfato cálcico, base de la cristalización de la hidroxiapatita. Asimismo, recientemente se ha publicado un estudio “in vitro” cuyos resultados apoyan la necesidad de una marcada actividad FA de los osteoblastos en los estadios iniciales de la formación ósea para la mineralización de la matriz ⁹. Otras teorías implican un papel de esta enzima en la regulación de la proliferación celular y el transporte de fosfato ¹⁰.

2.1.1. Linaje osteoblástico

Se conocen tres formas de linaje de células osteoblásticas: preosteoblastos o células osteoprogenitoras, osteoblastos maduros y osteocitos. Desde un punto de vista filogenético, los osteoblastos proceden de células del tejido mesenquimatoso.

Los preosteoblastos, células progenitoras destinadas a ser osteoblastos, se hallan físicamente cerca de las superficies formadoras de hueso, estando generalmente presentes cuando los osteoblastos maduros activos están sintetizando tejido óseo. Su

aparición es de una célula alargada con un núcleo elongado. Estas células tienen la capacidad de dividirse y frecuentemente se hallan en fase de mitosis. Además, estas células presentan una tinción poco intensa para FA y no hay evidencia de RER, es decir, no han adquirido aún muchas de las características diferenciadoras de los osteoblastos maduros.

El osteoblasto maduro deriva del preosteoblasto y expresa todas las funciones diferenciadas requeridas para sintetizar tejido óseo. El paso de una célula a otra es un gradiente de diferenciación que se expresa de forma completa cuando la forma madura de la célula alcanza la superficie ósea. Una vez el osteoblasto ha alcanzado dicha superficie su función es sintetizar y secretar colágeno y posteriormente mineralizarlo.

Los osteoblastos activos se hallan en las superficies de formación ósea, generalmente en grupos de células cuboidales tapizando una capa de matriz extracelular que ellos están produciendo, formada por colágeno maduro no mineralizado. Esta capa es conocida como “ribete osteoide” y no se halla mineralizada debido al intervalo de tiempo que existe entre la formación de la matriz y su posterior mineralización (aproximadamente 10 días). En su extremo final, a 5-50 μm de distancia de la superficie osteoblástica, se halla el “frente de mineralización” donde ocurre el proceso de crecimiento del cristal de hidroxapatita, y constituye el límite de la posterior mineralización.

Los osteoblastos se encuentran orientados en el hueso según las fibras de la matriz subyacente. Tras el osteoblasto se hallan generalmente una o dos capas de células, células mesenquimatosas activadas y preosteoblastos. Las superficies óseas

inactivadas están revestidas por células aplanadas que se cree que son osteoblastos inactivos (células de revestimiento óseo).

Hacia el final del proceso de formación ósea los osteoblastos determinan su propio destino, llegando a ser una célula plana basal o bien un osteocito. Aproximadamente se calcula que el 10-20 % de los osteoblastos llegan a ser osteocitos. En el momento en que dichas células quedan atrapadas en la matriz ósea, la actividad metabólica de la célula disminuye intensamente debido a la falta de difusión de nutrientes y oxigenación siendo su única fuente a través de pequeños canales conocidos como canaliculos. Estos, remanentes de los procesos celulares osteoblásticos, forman una extensa red de túbulos conectados y se ha especulado que dichos túbulos sirven, asimismo, de comunicación intercelular.

2.1.2. Funciones del osteoblasto

El osteoblasto regula una serie de pasos secuenciales en la formación del tejido óseo calcificado:

- la síntesis y el procesamiento intracelular del procolágeno tipo I;
- la secreción y el procesamiento extracelular del colágeno tipo I;
- la formación de microfibrillas, fibrillas y finalmente fibras de colágeno;
- la maduración de la matriz colágena con la consiguiente nucleación y crecimiento de los cristales de hidroxapatita y

- la síntesis de proteínas no colágenas.

2.1.2.1. Síntesis y secreción de colágeno

El colágeno es la proteína más abundante del organismo y el principal componente del tejido conectivo. Hasta 1992 se habían descrito 13 tipos de colágeno ¹¹, pero actualmente se han identificado al menos 19 tipos de moléculas de colágeno genéticamente distintas ¹², dividiéndose, en base a su estructura primaria y unión molecular, en fibrilares y no fibrilares. El colágeno tipo I es la forma más abundante de colágeno y se halla ampliamente distribuido localizándose a nivel de ligamentos, dentina, esclerótica, aponeurosis y cápsulas y, en altas concentraciones, a nivel de piel, hueso y tendones, de forma que aproximadamente el 50-70 % del colágeno tipo I del cuerpo está en el esqueleto.

El colágeno tipo I es el mayor componente proteico del hueso, constituyendo el 90 % de la matriz orgánica, y distinguiéndose del tipo I de otras localizaciones por su capacidad para retener mineral.

La estructura básica de la red de fibras de la matriz ósea es la molécula de colágeno tipo I. Cada molécula de colágeno se halla formada por tres cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas α (alfa), enrolladas entre sí en forma de espiral, formando un cordón y constituyendo una triple hélice. El colágeno tipo I consta de dos cadenas idénticas α -1 (I), y una estructuralmente similar pero genéticamente distinta α -2 (I). Los genes que regulan la síntesis de las cadenas colágenas α 1 (I) y α 2 (I) se hallan en los cromosomas 17 y 7 respectivamente ¹³. Cada cadena α tiene una estructura

primaria relativamente simple y muy repetitiva: glicina-X-Y. La glicina ocupa cada tercera posición de aminoácido (AA) de cada dominio helicoidal de cada cadena. Debido a su pequeño tamaño y a la no existencia de una cadena contraria predominante, proporciona un elemento plegadizo conveniente para la molécula, confiriéndole la capacidad de incurvarse y adoptar su estructura típica en espiral. Los AA X e Y son, a menudo, prolina e hidroxiprolina. La hidroxiprolina se forma por hidroxilación postranslacional de la prolina durante la síntesis de procolágeno y contribuye a la estabilidad de las fibras de colágeno por formación de uniones de hidrógeno.

La síntesis de colágeno es relativamente compleja, con un proceso intracelular y otro extracelular. A nivel intracelular sucede su síntesis en forma de un precursor denominado procolágeno I. Dicho proceso intracelular se inicia con la transcripción del RNAm desde un gen del colágeno. En el citoplasma el RNAm se une a los ribosomas y a nivel del retículo endoplasmático rugoso (RER) son sintetizadas las cadenas proalfa del procolágeno por traslación del RNAm correspondiente en los ribosomas. El RNA mensajero de cada cadena de colágeno codifica un precursor de la cadena de procolágeno de 160000 Da de tamaño. Tras la extracción de una corta secuencia guía (aproximadamente 20 AA), la cadena de procolágeno consiste en una zona central con forma final hendida de 100000 Da, con extensiones propéptidas unidas a ambos extremos amino y carboxiterminal de 25000 y 35000 Da respectivamente para la cadena α -1 (I). El propéptido carboxiterminal (PICP) facilita el plegamiento molecular del procolágeno, hallándose toda la información necesaria para ello en la primera secuencia de cada cadena colágena. Una vez se ha formado la triple hélice del precursor, el procolágeno es transportado al aparato de Golgi y preparado para su secreción por

exocitosis. De allí es transportado a la superficie celular y excretado. Previamente a su secreción tienen lugar diversas modificaciones del colágeno a nivel intracelular (procolágeno). Estas modificaciones incluyen la hidroxilación de residuos específicos de prolina y lisina, requiriendo este proceso la presencia, entre otros factores, de vitamina C; la glucosilación de residuos de hidroxilisinas y del propéptido carboxiterminal; la formación de enlaces de hidrógeno intra e intercatenarios que estabilizan las interacciones de los polipéptidos; y la formación de puentes disulfuro entre los propéptidos carboxiterminales de las tres cadenas alfa, hecho que facilita el plegamiento de la molécula de colágeno.

Concomitantemente o bien después de su secreción celular, las extensiones peptídicas de la molécula de procolágeno son extraídas mediante peptidasas específicas aminoterminal y carboxiterminal. Estas enzimas se adhieren a dichos extremos peptídicos durante el proceso de formación de las fibras colágenas¹⁴. Estos propéptidos pueden quedar atrapados en la matriz ósea¹⁵ o pueden pasar al torrente sanguíneo, siendo útil su determinación como marcadores bioquímicos de formación ósea derivados del colágeno¹⁶.

Tras la liberación de los propéptidos terminales, las moléculas de colágeno precipitan espontáneamente en el espacio extracelular formando fibrillas que se colocan de forma consecutiva. Estas moléculas de colágeno se hallan unidas quedando un pequeño espacio entre ellas llamado "gap". Este espacio parece tener una importancia funcional en la nucleación de los cristales de hidroxapatita durante el proceso de mineralización del osteoide. Las fibras, a su vez, se hallan unidas lateralmente en un orden escalonado 1/4 de modo que cada molécula se halla separada de su vecina por

aproximadamente 1/4 de su longitud. Esta composición tridimensional constituye la estructura de la fibra de colágeno hallada en la matriz ósea extracelular. (Figura 1)

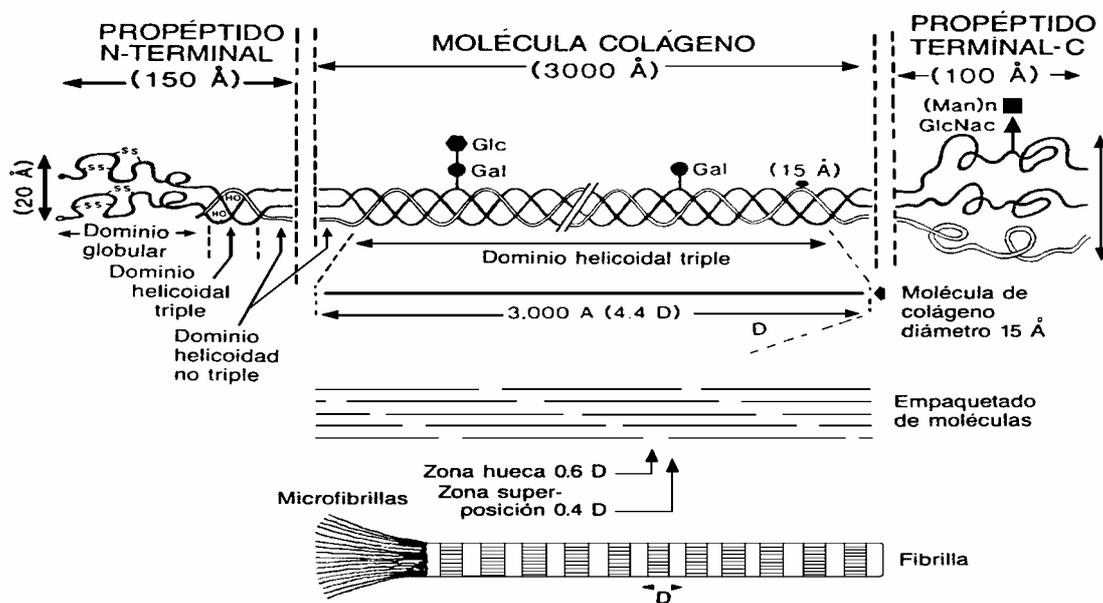


Figura 1: Síntesis y secreción de la molécula de colágeno I.

A nivel extracelular, tras la formación de fibrillas, se producen una serie de modificaciones entre las que se incluyen el desarrollo de puentes intra e intermoleculares y la unión con proteínas no colágenas. La acción de la lisiloxidasas sobre los residuos de lisina y/o hidroxilisina^{17, 18} de las regiones telopeptídicas de moléculas de colágeno adyacentes permite la formación de uniones covalentes entre ellas. Además, los aldehídos resultantes reaccionan con los residuos de hidroxilisina de

las moléculas de colágeno adyacentes formando puentes intermoleculares inicialmente divalentes, que posteriormente maduran en estructuras trivalentes (anillo piridinólico) e incluso tetravalentes. La gran cantidad de enlaces covalentes intra e intermoleculares, cuyo tipo y patrón difiere del de los tejidos conectivos blandos, convierten a las fibras colágenas óseas en altamente insolubles ¹⁹. Estos enlaces son liberados en la degradación de las fibras de colágeno mineralizadas durante la resorción ósea.

2.1.2.2. Mineralización de la matriz colágena

La segunda función importante del osteoblasto es la mineralización de la estructura colágena. En el hueso calcificado completamente maduro, el mineral se halla en forma de cristales de hidroxiapatita carbonados. Estos cristales tienen forma de aguja y tienen un diámetro de 30-50 Å y una longitud de hasta 600 Å. Aunque se ha sugerido que se depositan linealmente sobre las fibras colágenas, el proceso de precipitación del mineral no es bien conocido.

Los osteoblastos podrían contribuir a la mineralización del colágeno tipo I extracelular eliminando inhibidores de la nucleación, tales como el pirofosfato, y aportando cantidades adecuadas de fosfato inorgánico para el proceso de mineralización. Así, en los osteoblastos hallamos diversas fosfohidrolasas, que son secretadas a la matriz extracelular en forma de vesículas, que pueden servir para ambas funciones, como la fosfatasa alcalina que desdobla fosfatos orgánicos para ofrecer fosfato inorgánico en los puntos iniciales de mineralización. Asimismo, se ha demostrado, en células óseas en cultivo, la mineralización de la matriz extracelular en presencia de beta-glicerolfosfato, un sustrato fosfato orgánico ^{20, 21}.

La mineralización se inicia entre 2 y 10 μm de distancia de la superficie de la célula osteoblástica y tiene lugar entre 24 horas y 10 días después del precipitado de osteoide no mineralizado, recién sintetizado. El precipitado de hidroxiapatita se puede producir mediante vesículas de la matriz, predominante en el hueso plexiforme, o por precipitado a lo largo de fibrillas colágenas. En el hueso laminar, que predomina en el hueso adulto y contiene un grueso estrato osteoide (aproximadamente 10 μm), la mineralización se realiza a través del depósito directo de cristales de hidroxiapatita en las fibrillas de colágeno, a nivel de los espacios entre las triples hélices de colágeno. No se conoce bien el mecanismo por el cual el colágeno actúa como punto de nucleación aunque se ha sugerido como posibilidad su fosforilación. Asimismo, la fijación de proteínas no colágenas a fibrillas colágenas puede actuar también como nucleador para el depósito de hidroxiapatita. En este sentido, la osteocalcina podría modular el crecimiento del cristal acorde con el crecimiento del tejido en el que se está produciendo la mineralización.

Por otro lado, algunos resultados obtenidos a partir de estudios experimentales que analizan el proceso de mineralización²² ponen de manifiesto la posible existencia de una barrera iónica entre hueso y sangre que evitaría que el fluido extracelular y la sangre pudieran ser deplecionados de calcio y fosfato a expensas de la formación de hidroxiapatita. Una vez se ha formado el cristal de hidroxiapatita, su posterior crecimiento podría ocurrir en ausencia de actividad celular, y esta es la razón por la que el hueso desvitalizado puede mineralizarse si es implantado en tejidos irrigados o bañados en soluciones fisiológicas de calcio y fosfato. Por tanto, el continuo proceso de

mineralización parece estar controlado tanto en estados iniciales como en los estados de formación de hidroxapatita.

2.1.2.3. Síntesis de proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas constituyen el 10-15 % del total de proteínas óseas. Aproximadamente una cuarta parte de las proteínas no colágenas óseas son de procedencia exógena, quedando atrapadas en el espacio de la matriz ósea ²³. Esta fracción está compuesta principalmente por proteínas séricas de carácter ácido unidas a la hidroxapatita. El resto de las proteínas no colágenas son sintetizadas por el osteoblasto. Se calcula que la célula ósea sintetiza y secreta tantas moléculas de colágeno como de proteínas no colágenas. Estas se podrían dividir en cuatro grupos principales:

- proteínas de adhesión celular,
- proteoglicanos,
- proteínas gamma-carboxiladas y
- factores de crecimiento

Las células óseas sintetizan cuatro proteínas que afectan a la adhesión celular: fibronectina, trombospondina, osteopontina y sialoproteína ósea ^{24, 25}. Las tres últimas son potentes fijadores de calcio iónico y se hallan en la matriz ósea extracelular mineralizada ^{24, 26}, aunque la osteopontina se ha hallado también en otros tejidos como riñón y tejido nervioso ²⁷.

Los proteoglicanos son macromoléculas que contienen cadenas de polisacáridos ácidos (glicosaminoglicanos) adheridas a una proteína nuclear central. A nivel óseo hallamos dos tipos de glicosaminoglicanos: condroitín sulfato (polímero de N-acetilgalactosamina sulfatada y ácido glucurónico), que es la forma predominante, y heparín sulfato (polímero de N-acetilglucosamina sulfatada y ácido glucurónico).

Proteínas gamma-carboxiladas: Existen dos proteínas no colágenas, la osteocalcina (bone gla-protein) y la MGP (matrix-gla-protein) que se caracterizan por poseer residuos glutamyl dicarboxílicos (gla). Así como la osteocalcina es una proteína predominantemente ósea, aunque también se halla en la dentina, la MGP se halla en cartílago y hueso ²³. El ácido gamma-carboxiglutámico (gla) es un aminoácido que resulta de la carboxilación del ácido glutámico, requiriendo para esta reacción la presencia de vitamina K y de una carboxilasa. Forma parte de la protrombina y de otros factores de coagulación dependientes de la vitamina K, donde la unión del calcio a cadenas gla es importante para la bioactividad de estas moléculas.

La osteocalcina es una proteína sintetizada exclusivamente por los osteoblastos ²⁸ y los odontoblastos ²⁹. Forma parte del 1 % de la matriz ósea y constituye el 25 % de las proteínas no colágenas del hueso en el adulto, siendo la principal proteína no colágena de la matriz ósea ²⁸. Su síntesis ósea es fuertemente estimulada por la 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ ^{30, 31}, de forma que el calcitriol aumenta la expresión de osteocalcina interactuando a través de un complejo hormona-receptor.

La osteocalcina es una gla-proteína de 6 kDa de tamaño aproximado, constituida por una sola cadena polipeptídica compuesta por 49 amino ácidos con un peso

molecular de 5800 D; contiene tres residuos de gla situados en las posiciones 17, 21 y 24, así como un puente disulfuro en posición 23-29, lo que caracteriza a la molécula. Estos residuos de gla facilitan la unión de la osteocalcina a la hidroxapatita favoreciendo, de este modo, la formación ósea y su mineralización. Además, la osteocalcina parece tener un papel como señal en la cascada del remodelado óseo.

Por otro lado, del 10 al 25 % de la osteocalcina recién sintetizada por los osteoblastos no se deposita en la matriz ósea sino que es liberada a la circulación, donde es posible medirla por inmunoanálisis. La determinación de osteocalcina en suero ha demostrado ser válida como marcador bioquímico de recambio óseo en diversas patologías metabólicas óseas ³².

Los factores de crecimiento, como el factor transformante beta (TGF- β) y los factores de crecimiento derivados de la insulina (insulin-like growth factors), son secretados por los osteoblastos y pueden estimular el crecimiento de las células osteoblásticas de forma autocrina o paracrina ^{33, 34}.

Otra proteína no colágena producida por las células óseas es la osteonectina, una glicoproteína fosforilada, que constituye la principal glicoproteína secretada por los osteoblastos. Sus funciones a nivel óseo son múltiples y se ha relacionado con el crecimiento y/o proliferación osteoblástica, así como con la mineralización de la matriz ósea.

2.2. OSTEOCLASTO

El osteoclasto es, en condiciones fisiológicas, la célula ósea responsable de la resorción ósea. Es una célula gigante multinucleada, generalmente en contacto con una superficie ósea calcificada y una laguna (laguna de Howship), resultado de su propia actividad resorptiva. Los osteoclastos proceden de células madre precursoras, comunes con otras células hemáticas como los macrófagos, que se encuentran en la médula ósea, en el tejido hematopoyético. Su desarrollo parece exigir la presencia de células de estirpe osteoblástica, y es probable que esta exigencia implique no sólo la producción por el osteoblasto de sustancias que actúen sobre el osteoclasto inmaduro, sino incluso el propio contacto físico entre ambos tipos de células. Después de su desarrollo, los osteoclastos maduros emigran a las superficies del hueso donde se fijan e inician la resorción.

A microscopía óptica, el núcleo puede tener una apariencia variable: redondo y eucromático o bien de contorno irregular y heterocromático, posiblemente reflejando la fusión asincrónica de precursores mononucleares. Su citoplasma es de aspecto esponjoso, con múltiples vacuolas. La zona de contacto o fijación en el hueso se caracteriza por la presencia del característico “ribete en cepillo” rodeado de una zona clara libre de organelas conteniendo filamentos de actina ³⁵.

A nivel ultraestructural se caracteriza por una marcada presencia de mitocondrias, vesículas transportadoras cargadas con enzimas lisosómicas y complejos de Golgi, dispuestos característicamente alrededor de cada núcleo. Son características del osteoclasto la fosfatasa ácida tartrato-resistente ³⁶, la catepsina B y la anhidrasa

carbónica. Sin embargo, la característica más destacada del osteoclasto es la existencia de pliegues profundos de la membrana plasmática en el área que reviste la matriz ósea, formando el denominado “ribete en cepillo” que se halla rodeado por un anillo de proteínas contráctiles que sirven de anclaje de la célula a la superficie ósea. Constituye el punto de resorción. Sus proyecciones se encuentran entrelazadas con mineral óseo en fase de resorción, pudiéndose identificar en esta interfase fibrillas colágenas y cristales minerales, siendo los cristales probablemente fagocitados y divididos en vacuolas citoplasmáticas. Se cree que los osteoclastos sin “ribete en cepillo” constituyen la forma móvil de la célula.

No se conoce bien la finalización de la actividad del osteoclasto, aunque se considera la posibilidad de que tras finalizar su función de resorción ósea se produciría una migración de los osteoclastos hacia los espacios medulares adyacentes donde experimentarían una degeneración y posterior desintegración (apoptosis).

3. REMODELADO OSEO

El tejido óseo no es una estructura estática sino un tejido con una marcada capacidad de renovación. Este fenómeno de renovación se denomina “remodelado”, y tiene una doble finalidad:

- mantener la integridad mecánica del esqueleto y
- contribuir a la regulación de la homeostasis fosfocálcica.

Por tanto, el tejido óseo sufre un continuo recambio existiendo, en condiciones normales, un equilibrio entre formación y resorción actuando de forma coordinada los osteoblastos (células formadoras) y los osteoclastos (células resorptivas) en numerosas zonas microscópicas distribuidas por todo el esqueleto, constituyendo las unidades de remodelado óseo (Bone remodelling unit: BRU), denominándose el nuevo segmento de tejido óseo resultante de la acción de una BRU unidad estructural ósea (Bone structural unit: BSU). El volumen de hueso preexistente que es sustituido por otro nuevo por unidad de tiempo se conoce como recambio o “turnover” óseo, y depende, principalmente, del número de unidades de remodelación activas. La diferencia entre el volumen de hueso formado y resorbido por unidad de tiempo se denomina balance óseo.

Este fenómeno de coordinación temporal y espacial por los osteoblastos y los osteoclastos es conocido como acoplamiento.

En condiciones normales, la formación y resorción óseas se hallan en equilibrio y en el adulto se produce un recambio anual de, aproximadamente, un 10 % de la masa esquelética. Sin embargo, en los estados de aumento persistente de la resorción ósea o disminución de su formación se presenta, de manera característica, ciclos de remodelado con balance negativo que dan lugar a un déficit irreversible y acumulativo de masa ósea que resulta en una osteoporosis.

3.1. PROCESO DE REMODELADO

Los conceptos de remodelado óseo y acoplamiento nacen de las ideas originales de Frost ³⁷. El ciclo de remodelación ósea se ha dividido en una serie de fases que siguen las BRU siempre de forma similar, activándose cada 10 segundos en el adulto sano. Este proceso consta de una fase de activación tras la que se produce la fase resorción ósea, una fase de inversión, seguida de la fase formación ósea, y una fase de reposo o quiescencia ³⁸ (Figura 2).

La fase de activación se inicia cuando se produce un retraimiento de las células de revestimiento, de estirpe osteoblástica, situadas en la superficie ósea. Seguidamente, las células precursoras osteoclasticas alcanzan la superficie ósea mineralizada y experimentan una transformación hacia osteoclastos, iniciándose la fase de resorción. Una vez en contacto con el hueso, los osteoclastos excavan la superficie ósea dando lugar a una cavidad de forma y dimensiones características. En el hueso trabecular dicha

cavidad recibe el nombre de laguna de Howship y en el cortical el de cono penetrante. Además, debe eliminarse una capa de material colágeno situada entre las células de revestimiento y el hueso mineralizado. Esta acción se realiza a través de colagenasas secretadas por estas mismas células. Este proceso dura de una a tres semanas.

Tras una fase de inactividad (fase de inversión), con una duración aproximada de dos semanas, se inician, una vez llegados a la zona los precursores osteoblásticos, los procesos que permitirán la neoformación ósea. A diferencia de la resorción, la formación ósea se produce en dos etapas separadas, tanto en el tiempo como en el espacio. En primer lugar, los precursores osteoblásticos, diferenciados ya a osteoblastos, generan los componentes orgánicos de la matriz ósea (colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, fibronectina, proteoglicanos y otros) y rellenan las cavidades previamente formadas por los osteoclastos. Finalmente, la nueva matriz sintetizada comienza a mineralizarse. En el transcurso de esta fase, de una duración aproximada de tres meses, los osteoblastos rellenan con hueso nuevo la zona excavada por los osteoclastos. Entre el inicio del depósito de osteoide y el inicio de su mineralización existe un tiempo de demora de unos 10 días (tiempo de desfase de la mineralización). La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina frente de mineralización. A medida que este frente se desplaza va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada en forma de cristales de hidroxapatita. Por consiguiente, el espesor del osteoide, que en condiciones normales es de unas 9 μm , es directamente proporcional a la velocidad de

formación de matriz orgánica e inversamente proporcional a la velocidad de avance del frente de mineralización (Mineral appositional rate).

Finalizada la fase de formación ósea, las células que quedan en la superficie ósea completan su transformación morfológica y funcional a células de revestimiento, iniciándose la fase de reposo o quiescencia que se mantendrá hasta el inicio de un nuevo ciclo de remodelado óseo.

A partir de los 40 o 50 años, en cada BRU se produce un cierto desacoplamiento, de manera que el volumen de hueso sintetizado por los osteoblastos es menor que el degradado previamente por los osteoclastos. En este momento el balance óseo es negativo, lo cual justifica la pérdida fisiológica de masa ósea que se produce con la edad.

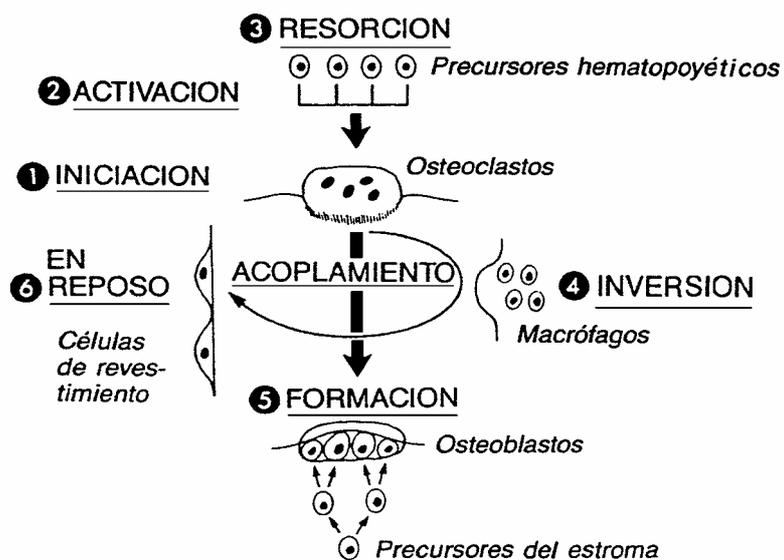


Figura 2: Fases del remodelado óseo.

3.2. REGULACION DEL REMODELADO OSEO

3.2.1. Factores

El proceso de remodelado óseo viene regulado por una serie de factores locales y generales que actúan conjuntamente para preservar la masa ósea ^{39, 40}. En líneas generales, se halla sometido a dos tipos de controles:

- sistémico, constituido por diversas hormonas, principalmente por la hormona paratiroidea (PTH), el calcitriol y las hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos).

- local, constituido por factores de naturaleza física y, fundamentalmente, humoral. Los factores humorales estarían integrados por factores locales de crecimiento, citocinas y prostaglandinas.

3.2.1.1. Factores sistémicos

El metabolismo óseo es regulado por una variedad de hormonas que actúan sobre las células formadoras y resorptivas óseas de forma directa, o bien de forma indirecta modulando la acción de un factor local (su síntesis, activación, unión al receptor y unión a proteínas de este factor) que, a su vez, podría estimular o inhibir la formación o resorción ósea. Entre los factores sistémicos destacan: la hormona paratiroidea (PTH), el calcitriol, las hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos), la calcitonina, la insulina, la hormona de crecimiento, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas.

La hormona paratiroidea (PTH) es una hormona hipercalcemiente que actúa a nivel óseo estimulando la resorción, al aumentar el número y la actividad de los osteoclastos. Esta acción es de forma indirecta ya que los osteoclastos carecen de receptores para la PTH, receptores que sólo se han hallado en los osteoblastos ⁷. En estas células se ha demostrado que la PTH se une a su receptor específico y estimula el AMPc; actúa de mediadora del transporte de iones y aminoácidos, y regula la síntesis de colágeno ⁴¹⁻⁴³. Aunque la PTH es, en principio, una hormona fundamentalmente osteorresortiva, cuando se administra de forma intermitente a dosis bajas, desarrolla un efecto opuesto, osteoformador ⁴⁴. Se cree que ello se debe a que dicha forma de administración conduce a un aumento en la síntesis de ciertos factores locales como los factores de crecimiento derivados de la insulina (IGF I y II), cuyo efecto osteoformador predominaría sobre el contrario de la PTH, que tal vez sería más breve. Asimismo, la PTH actúa a nivel renal estimulando la reabsorción tubular de calcio y, de forma indirecta, a través de la síntesis de calcitriol, a nivel intestinal aumentando la absorción intestinal de calcio. Constituye el principal factor controlador de la homeostasis cálcica.

La 1-25 dihidroxivitamina D₃ o calcitriol, metabolito activo de la vitamina D, actúa sobre el tejido óseo estimulando la síntesis osteoblástica de fosfatasa alcalina ^{45, 46} y osteocalcina ³⁰ tras la unión a su receptor ^{3, 4} y, a dosis elevadas, aumenta la resorción ósea. Asimismo actúa a nivel intestinal estimulando la absorción de calcio y fosfato.

Las hormonas sexuales, estrógenos y andrógenos, son importantes en la maduración esquelética de individuos en crecimiento. En adultos, previenen la pérdida de masa ósea asociada a la edad ya que frenan la resorción ósea. Aunque se ha

demostrado que los osteoblastos poseen receptores para estrógenos a nivel nuclear ² y para andrógenos en su citoplasma ⁵, el efecto antirresortivo podría ser indirecto, a través de la inhibición de la síntesis de ciertos factores locales como interleucinas. Así, se ha descrito un aumento de resorción ósea mediada por citocinas en situaciones de déficit estrogénico ⁴⁷.

La calcitonina es la única hormona que actúa directamente sobre los osteoclastos. Estas células poseen numerosos receptores para la calcitonina en su superficie ⁴⁸, produciendo esta hormona una inhibición directa de la resorción ósea al disminuir el número y actividad de las células resorptivas óseas.

La insulina produce un aumento de la formación al estimular la síntesis de la matriz ósea y favorecer su mineralización, de forma directa o a través del IGF-1.

La hormona de crecimiento es necesaria para el mantenimiento de una masa ósea normal. Estimula la formación ósea a través del aumento local de IGF-1, la absorción intestinal de calcio a través del aumento de síntesis de vitamina D, y la mineralización ósea, produciendo un aumento de masa esquelética.

Los glucocorticoides disminuyen la acción de los osteoblastos y estimulan, de forma indirecta, la secreción de PTH al disminuir la absorción intestinal de calcio, produciendo un descenso de masa ósea. A lo largo de este proyecto se discutirán sus diferentes efectos de forma más detallada.

Las hormonas tiroideas son necesarias para el crecimiento y desarrollo normal. Tienen un efecto estimulador directo sobre el crecimiento y maduración del cartílago.

Sin embargo, sus efectos sobre la formación ósea son indirectos mediados, en parte, por el IGF-1.

3.2.1.2. Factores locales

- de naturaleza física: se ha propuesto la existencia de un mecanismo que regularía la cantidad de masa ósea en función de la sobrecarga que el hueso tuviera que soportar ⁴⁹.

- de naturaleza humoral: Son los más importantes. Generalmente son sintetizados por las células óseas. Están integrados por:

- factores locales de crecimiento:

- factor de crecimiento derivado de la insulina
- factor transformante beta ("transforming growth factor- β ")
- factor de crecimiento de los fibroblastos
- factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

- citocinas:

- interleucinas
- factor de necrosis tumoral
- factores estimuladores de colonias de macrófagos y granulocitos
- interferón gamma

- prostaglandinas.

Los factores locales de crecimiento son polipéptidos secretados por las células óseas que regulan su replicación, diferenciación, reclutamiento y acción. Los más importantes son:

- Los factores de crecimiento derivados de la insulina (IGF). Son polipéptidos dependientes de la hormona de crecimiento. Existen dos: IGF I y IGF II, siendo el primero más potente que el segundo. Se encuentran entre los factores de crecimiento más abundantes en el esqueleto. Se ha demostrado que el IGF I aumenta la síntesis de colágeno I y de la matriz ósea ejerciendo un papel fundamental en el proceso de formación ósea y en el mantenimiento de la masa ósea. Este es a su vez regulado por hormonas como la PTH y los glucocorticoides, y por factores locales como la prostaglandina E₂. Los IGF se encuentran formando grandes complejos, unidos a diversos tipos de proteínas fijadoras (IGFBPs), sintetizadas por los osteoblastos. Se conocen seis de éstas y su interés estriba en que controlan la biodisponibilidad de los IGF regulando la cantidad de IGF disponible, su específica localización tisular y celular, y modulando la interacción con sus receptores. La formación de las IGFBP está regulada por la PTH, los estrógenos, los glucocorticoides y diversos factores locales.

- Los factores transformantes beta (TGF- β), son una familia de polipéptidos. A nivel óseo están presentes tres formas, las tres con similar actividad biológica: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Estos factores estimulan la síntesis de colágeno y disminuyen asimismo la resorción ósea. El TGF beta es secretado en forma latente, depositándose en el hueso y siendo activado, en su momento, por la enzima proteolítica plasmina. Parece ser que los estrógenos estimulan la formación de TGF beta.

- Los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) estimulan la replicación de las células óseas produciendo un aumento de la síntesis de colágeno.

Diversas citocinas, entre las que se incluyen: interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF) y factores estimuladores de colonias de macrófagos y granulocitos (CSF-GM/M) actúan de forma directa sobre las células óseas. Estos factores tienen importantes efectos en el remodelado óseo estimulando la resorción ósea. El interferón gamma es una linfocina producida por los linfocitos T activados que inhibe la resorción ósea osteoclástica.

Las prostaglandinas poseen efectos múltiples y complejos y el hueso es una abundante fuente de ellas, sobre todo de prostaglandina E₂ (PGE₂) y de prostaciclina (PGI₂), producidas por los osteoblastos. La PGE₂ es un potente estimulador de la resorción ósea, mientras que a nivel de la formación ósea su efecto es bifásico: estimulante a bajas concentraciones e inhibitoria a elevadas concentraciones. La PGI₂ también estimula la resorción ósea, aunque su efecto es menos intenso que el de PGE₂. Las hormonas sistémicas y algunos factores locales pueden actuar, en parte, a través de la producción de prostaglandinas, y éstas tener un importante papel en el control local del metabolismo óseo.

3.2.2. Regulación del remodelado óseo

La regulación del proceso del remodelado óseo sugiere la existencia de una comunicación entre las células formadoras y resorptivas óseas. La actividad de osteoblastos y osteoclastos se halla estrechamente relacionada y se cree que la información es transferida desde células de linaje osteoblástico hacia los osteoclastos^{35, 50}. De forma semejante, la información pasaría de los osteoclastos o de las zonas de resorción hacia los osteoblastos maduros, indicándoles la necesidad de iniciar un nuevo ciclo de formación ósea. La base bioquímica de esta comunicación no está totalmente establecida. La existencia de un factor único de acoplamiento capaz de explicar la comunicación intercelular ha sido discutida ampliamente pero no ha podido ser demostrada^{51, 52}.

Recientemente se ha implicado como posible factor en el proceso de acoplamiento el ligando de la osteoprotegerina (RANKL), también llamado factor de diferenciación osteoclástica (ODF). Este es una glicoproteína de la familia del receptor de TNF sintetizada por los osteoblastos que, uniéndose a un receptor de membrana de los osteoclastos denominado RANK, produce un estímulo de la diferenciación osteoclástica, favoreciendo, como consecuencia la resorción ósea. La actividad biológica de este factor sería regulada por la osteoprotegerina, receptor soluble de la familia TNF, sintetizado también por los osteoblastos⁵³, que inhibe la diferenciación osteoclástica al unirse al RANKL. El hecho de que los osteoblastos sinteticen osteoprotegerina y RANKL sugiere la existencia de un bucle de retroalimentación negativo en el que el osteoblasto podría modular, por sí mismo, la diferenciación de

precursores osteoclásticos al presentar moléculas de RANKL en su superficie celular, cuya actividad sería regulada, a su vez, por la producción de osteoprotegerina ⁵⁴.

No obstante, se conoce un gran número de procesos que acontecen localmente en el hueso y que podrían, de alguna forma, influir sobre el fenómeno del remodelado sin necesidad de involucrar por ello a un único factor de acoplamiento. Así, ciertas hormonas y factores locales como la PTH, el calcitriol o las prostaglandinas actúan sobre el osteoblasto produciendo un aumento del activador del plasminógeno, contribuyendo, de esta manera, a la degradación de la matriz ósea durante el proceso de resorción ósea ⁵⁵. Asimismo, el factor estimulante de colonias, las prostaglandinas y la IL-1 podrían también actuar como activadores del osteoclasto a través de la IL-6; mientras que el TGF y el interferón gamma (IF- γ) podrían inhibir su formación a través de la acción de las prostaglandinas E₂ e I₂.

En el proceso de remodelado se podría aceptar que los primeros factores en actuar serían los que ponen en marcha la diferenciación del precursor del osteoclasto hacia la forma madura del mismo. En ello estarían implicados el ligando de la osteoprotegerina (RANKL), el "stem cell factor" (SCF), la interleucina 3 (IL-3), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos (GM-CSF), la IL-1, el TNF alfa, la IL-6, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la interleucina 11 (IL-11). La mayoría de estos factores son producidos por osteoblastos, células del estroma de la médula, células endoteliales, macrófagos y linfocitos del microambiente medular. Su producción está, en parte, regulada por hormonas sistémicas como el calcitriol y la PTH, y por algunos de estos mismos factores locales, incluyendo las prostaglandinas.

Junto a las citocinas favorecedoras de la resorción ósea, deben señalarse las inhibidoras de la misma, entre las que destacan las interleucinas 4 y 13 (IL-4, IL-13) y el interferón, que antagonizan los efectos de la IL-1, TNF e IL-6. El IF- γ es un potente inhibidor del desarrollo de la formación y maduración de los osteoclastos.

También juegan un papel importante en la regulación del remodelado los receptores de los factores locales referidos, que pueden desarrollar distintas funciones según la forma en que se encuentran (unido a la membrana o en forma soluble). Los receptores de la IL-6 parecen ser inhibidos por los estrógenos y andrógenos, y estimulados por la PTH, el calcitriol y la IL-1.

En el desarrollo de los osteoblastos intervienen, de forma primordial, el TGF beta, las “bone morphogenetic proteins” (BMP) y los IGF I y II. Estos factores son secretados por los propios osteoblastos durante la fase de formación, quedando en la matriz ósea, y siendo liberados en un ciclo de renovación posterior cuando los osteoclastos inician la resorción, quedando entonces dispuestos para estimular una nueva generación de osteoblastos. Por este motivo, podría considerárselos mediadores del fenómeno de acoplamiento. En la regulación de su secreción intervienen las hormonas calciotropas, que la estimulan, y otros factores locales. Las BMPs son un grupo de proteínas presentes en la matriz ósea pertenecientes, con la excepción de la BMP-1, a la superfamilia TGF- β . Intervienen en la diferenciación celular hacia el linaje osteoblástico.

Por otro lado, los factores de crecimiento se hallan también a nivel sanguíneo y podrían actuar como reguladores sistémicos aunque, probablemente, el factor local

tendría una función más directa y también más importante en el crecimiento celular. Los factores de crecimiento pueden jugar un papel crítico en el acoplamiento de la formación ósea a la resorción ósea y, posiblemente en procesos fisiopatológicos.

En resumen, el remodelado óseo es un proceso complejo regulado por hormonas sistémicas y factores locales. Las hormonas regulan la síntesis, activación, efectos y unión a proteínas de los factores locales, los cuales tienen una acción directa sobre el metabolismo celular y modifican la replicación o la función diferenciada de células de estirpe osteoblástica u osteoclástica. Es posible que el papel de las hormonas sea proveer de especificidad tisular a un factor de crecimiento dado, ya que muchos de estos factores son sintetizados por una variedad de sistemas esqueléticos y no esqueléticos.

4. MARCADORES BIOQUIMICOS DEL REMODELADO OSEO

El análisis de los trastornos del remodelado óseo se puede realizar “in vivo” de forma directa, mediante la realización de biopsia ósea y su estudio histológico sin descalcificación previa, o de forma indirecta, mediante la determinación de marcadores bioquímicos que reflejan el grado de formación y de resorción ósea.

Los marcadores bioquímicos utilizados valoran la actividad sérica de enzimas que provienen de las células óseas, como la fosfatasa alcalina y la fosfatasa ácida resistente al tartrato; o bien detectan, en suero u orina, componentes de la matriz ósea liberados a la circulación durante los procesos de formación y resorción ¹⁶. En la Tabla 1 se exponen los marcadores del recambio óseo habitualmente utilizados en clínica.

Entre los marcadores de resorción hallamos la fosfatasa ácida resistente al tartrato, los telopéptidos amino y carboxiterminal del colágeno tipo I, la hidroxiprolina y la piridinolina y deoxipiridinolina. Todos ellos, salvo la fosfatasa ácida, derivan de la liberación de fragmentos de la molécula de colágeno tipo I durante el proceso de resorción ósea.

Entre los marcadores de formación ósea se hallan la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y los propéptidos carboxi y aminoterminal del procolágeno I. La fosfatasa

alcalina es una enzima presente en la membrana del osteoblasto. El resto de marcadores reflejan la actividad de los osteoblastos: la osteocalcina, proteína no colágena sintetizada por los osteoblastos ³²; y los propéptidos carboxi (PICP) y aminoterminal (PINP) del procolágeno tipo I que se liberan durante el paso de procolágeno a colágeno tipo I ⁵⁶.

TABLA 1. MARCADORES BIOQUIMICOS DEL REMODELADO OSEO

<u>FORMACION</u>	<u>RESORCION</u>
. Fosfatasa alcalina (s)	. Fosfatasa ácida tartrato resistente (s)
* total	
* isoenzima óseo	. Telopéptidos del colágeno tipo I:
	*carboxiterminal (ICTP) (s)
. Propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (PICP) (s)	*aminoterminal (NTX) (s) (o)
	*carboxiterminal (CTX) (s) (o)
. Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (PINP) (s)	. Piridinolina y deoxipiridinolina (o)
	. Hidroxiprolina (o)
. Osteocalcina (s)	

(s): Determinación en suero; (o): Determinación en orina.

4.1. FOSFATASA ALCALINA TOTAL E ISOENZIMA OSEA DE LA FOSFATASA ALCALINA

La fosfatasa alcalina (FA) está presente, además de en el tejido óseo, en la placenta, intestino, hígado, riñón y leucocitos. Existen cuatro grupos principales de isoenzimas de la fosfatasa alcalina: intestinal, placentaria, placentaria “like” y hepática-renal-ósea. El verdadero marcador bioquímico de formación ósea corresponde a los niveles séricos de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina, de mayor especificidad y sensibilidad que la FA. Sin embargo, cuando determinamos la fosfatasa alcalina total en suero, su actividad es debida fundamentalmente a las isoenzimas ósea y hepática. En el adulto, ambas isoenzimas se encuentran en suero, en condiciones normales, en igual proporción ⁵⁷. A pesar de esta falta de especificidad, en ausencia de patología hepática, la actividad total de la fosfatasa alcalina sérica se ha utilizado clásicamente como marcador de formación ósea siendo un marcador útil en patologías óseas con un marcado aumento del recambio óseo, como la enfermedad de Paget. Sin embargo, en otras patologías como la osteoporosis, la FA no es suficientemente sensible como marcador de formación ósea, teniendo una mayor sensibilidad la osteocalcina. La isoenzima ósea de la FA tiene una mayor especificidad y sensibilidad que la FA, pero un menor balance coste/beneficio en pacientes osteoporóticos.

La determinación de FA se realiza por método paranitrofenilfosfato-DEA y la de su isoenzima ósea puede realizarse mediante anticuerpos monoclonales, enzimoimmunoanálisis o por técnica inmunoradiométrica (IRMA).

4.2. OSTEOCALCINA

Como se ha descrito previamente, la osteocalcina es una proteína producida por los osteoblastos, cuya síntesis es estimulada por la 1,25 dihidroxivitamina D₃. Tras su síntesis por el osteoblasto, parte de esta proteína pasa al suero y otra parte se incorpora a la matriz ósea, permaneciendo unida al hueso. A nivel sérico, la cantidad de osteocalcina presente es directamente proporcional a la cantidad de proteína sintetizada, aunque, al producirse la resorción ósea, también pasa al suero parte de la osteocalcina unida al hueso. Sin embargo, la osteocalcina constituye un marcador de remodelado óseo que parece reflejar mejor la actividad de los osteoblastos que los productos de degradación de la matriz ósea. Dada su procedencia específica del osteoblasto, los niveles de osteocalcina se han considerado como un marcador bioquímico muy específico de formación ósea⁵⁸⁻⁶¹. Así, se han hallado niveles elevados de osteocalcina en mujeres postmenopáusicas con aumento del remodelado óseo y, por tanto de la formación ósea; y valores disminuidos en casos de baja actividad osteoblástica⁶¹. Sin embargo, la osteocalcina también constituye un marcador de recambio óseo en aquellos procesos que cursan con acoplamiento entre formación y resorción^{32, 62, 63}.

En la osteoporosis inducida por glucocorticoides se observa una disminución de los niveles séricos de osteocalcina^{58, 64, 65}, efecto que se aprecia en la primera semana de administración del fármaco⁶⁶⁻⁶⁸, manteniéndose unos niveles bajos incluso con pequeñas dosis de glucocorticoides. Tras la suspensión del tratamiento los valores de osteocalcina se normalizan en un corto plazo de tiempo volviendo a cifras pretratamiento⁶⁶⁻⁶⁹. Asimismo, se ha descrito una relación inversa entre los niveles de

osteocalcina y la dosis diaria de prednisona recibida ^{58, 70}. En pacientes afectados de hipercorticismo endógeno se han hallado también niveles de osteocalcina sérica significativamente menores que en individuos sanos ^{71, 72}, lo cual refleja, de forma indirecta, la supresión de la formación ósea que ocurre en estos pacientes. Igualmente, estos valores vuelven a la normalidad tras la corrección del exceso de cortisol ^{72, 73}.

La osteocalcina circulante experimenta un metabolismo de degradación por parte del hígado y del riñón, de modo que la proteína sérica no se halla sólo en forma de osteocalcina intacta, sino de diversos fragmentos de la misma. Debido a ello, es fundamental tener en cuenta la inmunorreactividad del ensayo de osteocalcina utilizado, ya que los distintos métodos comerciales presentan especificidades distintas para los distintos fragmentos de osteocalcina ^{74, 75}.

La determinación de los niveles circulantes de osteocalcina ha sido validada por numerosos estudios en los últimos 15 años. El método tradicional de determinación era por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando estándares y trazadores de osteocalcina bovina, que sólo difiere de la humana en cinco aminoácidos. Sin embargo, estos ensayos han manifestado un uso limitado debido a que los anticuerpos policlonales frente a osteocalcina bovina muestran una afinidad variable por la osteocalcina humana. Recientemente se ha desarrollado la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para determinados epítopes de la molécula de osteocalcina humana, permitiendo la aparición de los nuevos métodos inmunoradiométricos (IRMA) para medir osteocalcina. Esta técnica tiene una mayor sensibilidad y especificidad que la detección mediante RIA, y permite reconocer la molécula intacta y el fragmento medio amino-terminal 1-43 que se libera de la molécula intacta tanto “in vitro” como “in vivo” ⁷⁶.

4.3. PROPEPTIDO CARBOXITERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO I

El colágeno tipo I es sintetizado por el osteoblasto en forma de un precursor intracelular, la molécula de procolágeno, que tiene unas secuencias adicionales en los extremos. A su salida al exterior de la célula son escindidos, por división endoproteolítica, los dos fragmentos terminales del procolágeno I, denominándose a la molécula final colágeno I. Estos dos fragmentos liberados constituyen los propéptidos aminoterminal (PINP) y carboxiloterminal (PICP) de la molécula de procolágeno, que pasan a la sangre donde pueden determinarse ¹⁶. Puesto que, por cada molécula de colágeno sintetizada, se libera una de PICP y una de PINP (relación molar 1:1), la concentración de ambos propéptidos en suero refleja, de forma indirecta, el proceso de formación ósea.

El PICP es una glicoproteína globular de 100 kD. Aunque el colágeno tipo I también se halla en otros tejidos, el PICP refleja con aceptable fidelidad la síntesis de colágeno en hueso, ya que la actividad metabólica del colágeno tipo I del tejido óseo es superior a la de los tejidos blandos. Los valores séricos de PICP se han correlacionado significativamente con los parámetros histológicos de formación en biopsias óseas analizadas mediante histomorfometría ^{56, 77}. Asimismo, se ha demostrado su utilidad en la detección de alteraciones en enfermedades metabólicas óseas ⁷⁸.

Los niveles de PICP aumentan durante la época de crecimiento. En adultos sanos dichos niveles siguen un ritmo circadiano, con valores un 20 % mayores en la madrugada ⁷⁹. Asimismo, en varones la concentración sérica de PICP se halla

inversamente relacionada con la edad, no habiéndose demostrado estas diferencias en mujeres ⁸⁰. Sin embargo, tras la menopausia los valores de PICP aumentan un 20 %, volviendo a valores premenopáusicos tras seguir terapia hormonal sustitutiva ^{81,82}.

En pacientes sometidos a tratamiento con glucocorticoides se han demostrado unos niveles séricos disminuidos de PICP que vuelven a valores normales tras la suspensión del tratamiento ^{83,84}.

En estudios realizados en animales se ha demostrado que, en suero, la vida media del PICP es de 6 minutos, y que esta proteína es eliminada de la sangre por endocitosis mediada por un receptor de manosa en las células endoteliales del hígado ⁸⁵.

El suero para determinación de PICP puede mantenerse incluso durante 2 semanas a 4° C o a temperatura ambiente, pero si debe almacenarse más tiempo es necesario congelarlo a -20° C ⁸⁰. El PICP es estable durante el almacenamiento y resiste los procesos de congelación y descongelación, aunque no se debería someter a los sueros a más de tres ciclos de congelación y descongelación.

En 1974 ya se describió el primer método de determinación de procolágeno por técnica de radioinmunoanálisis ⁸⁶, aunque no se desarrolló comercialmente hasta 1990 ⁸⁰, permitiendo su utilización el desarrollo de diferentes estudios sobre este marcador bioquímico como índice de formación ósea. Recientemente se ha descrito un método por radioinmunoanálisis en el cual se utiliza PICP humano intacto ⁸⁷, cuyas secuencias de AA son idénticas al PICP producido “in vivo”.

4.4. PROPEPTIDO AMINOTERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO I

El propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (PINP) es una proteína fosforilada, parcialmente globular y parcialmente helicoidal, de 35 kD. Al igual que el PICP, deriva también de la molécula de procolágeno I, pero difiere de PICP en su liberación de las moléculas de colágeno sintetizadas y en su posterior metabolismo como propéptido libre. Así como el PICP es liberado rápidamente tras la síntesis de procolágeno, el PINP puede encontrarse en la superficie de las finas fibras de colágeno formando el pN-colágeno. El PINP circula en sangre principalmente en su forma intacta, formada durante la síntesis de colágeno, y es metabolizado por las células endoteliales hepáticas a través de un receptor “scavenger”⁸⁸, cuya regulación, a diferencia del receptor “manosa” de PICP⁸⁵, es independiente del control hormonal, manteniéndose la tasa de eliminación de PINP, probablemente, constante. Además del PINP intacto se pueden hallar en sangre productos de degradación del PINP de bajo peso molecular denominados PINP Col 1, que son aclarados por vía renal. Sin embargo, estos productos parece que, probablemente, deriven más de la degradación de moléculas de colágeno (pN-colágeno, o colágeno que retiene el propéptido aminoterminal adherido a sus fibras) que del PINP intacto.

La determinación de PINP en sangre permite valorar la formación de colágeno y, de forma indirecta, la formación ósea, habiéndose demostrado que correlaciona bien con otros parámetros de formación ósea como la osteocalcina y la fosfatasa alcalina⁸⁹. Asimismo se ha descrito también una buena correlación entre el PINP y el PICP en sujetos sanos⁹⁰ y en mujeres postmenopáusicas⁸².

Aunque son escasos los trabajos publicados sobre el efecto de los glucocorticoides en los niveles séricos de PINP, debido a que su determinación en la práctica clínica es relativamente reciente, se ha demostrado un descenso de sus niveles en pacientes adultos ⁹¹ y niños ⁹² sometidos a este tratamiento.

Para su detección en suero se han desarrollado diversos ensayos ^{93, 94} siendo la técnica de medición mayormente empleada actualmente la que permite la detección del PINP intacto por radioinmunoanálisis (RIA) ⁹³. Esta técnica utiliza como inmunógeno un propéptido aminoterminal trimérico del procolágeno tipo I humano, altamente purificado, y un antisuero policlonal de conejo contra la variante alfa1-homotrímica de este propéptido ⁹³. Este ensayo forma parte de un kit comercial (Orion Diagnostica) y utiliza [¹²⁵I] como trazador. Detecta, preferentemente, la forma intacta del propéptido, mostrando sólo un 1.2 % de reacción cruzada con los productos de degradación del PINP hallado en suero y evitando así la influencia de la función renal en los resultados. Asimismo, este ensayo refleja mejor la síntesis de colágeno ósea ya que no detecta el PINP Col 1, procedente del pN-colágeno tipo I o del PINP de tejidos blandos, pero ausente en la matriz ósea mineralizada.

5. OSTEOPOROSIS

Cuando existe un desequilibrio entre los procesos de formación y resorción ósea (remodelado óseo), por un aumento de actividad resortiva o por un déficit de formación ósea en diversas unidades, se produce una pérdida de masa ósea y, por tanto, una osteoporosis. La osteoporosis se define como una enfermedad ósea sistémica caracterizada por una masa ósea disminuida asociada a una alteración de la microarquitectura del tejido óseo, lo que resulta en un aumento de la fragilidad ósea y, por tanto, en una mayor facilidad para el desarrollo de fracturas.

La osteoporosis es una enfermedad extraordinariamente frecuente que actualmente se ha convertido en un problema de salud pública que genera una demanda de atención sanitaria cada vez mayor, con un consiguiente coste económico debido, fundamentalmente, a los costes derivados de sus consecuencias, las fracturas, sobre todo las que afectan a la cadera.

La etiología de la osteoporosis es multifactorial habiéndose implicado en su aparición diversos factores. La existencia de una enfermedad subyacente o la administración de ciertos fármacos pueden provocar de forma secundaria osteoporosis. La administración exógena de glucocorticoides constituye la causa más frecuente de osteoporosis secundaria.

6. OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES

Los efectos de los glucocorticoides sobre el hueso se conocen desde 1932 en que Cushing describió el desarrollo de desmineralización esquelética en el contexto de una hiperproducción de hormona corticotropa ⁹⁵ y pueden manifestarse conjuntamente con otras características clínicas del síndrome de Cushing. La osteoporosis inducida por glucocorticoides se observa, además, en pacientes expuestos durante un tiempo prolongado a estos fármacos. Con la utilización de los glucocorticoides como agentes antiinflamatorios e inmunosupresores en el tratamiento de diferentes enfermedades (reumatológicas, hematológicas, neurológicas, respiratorias, trasplante de órganos) su incidencia ha aumentado de forma notable en los últimos años siendo, actualmente, la tercera causa de osteoporosis, tras la postmenopáusica y la senil.

La utilización crónica de dosis moderadas y altas de glucocorticoides se asocia a una disminución de masa ósea y a un mayor riesgo de fracturas, constituyendo un problema sanitario de importante magnitud debido a su morbilidad y mortalidad. Así, se considera que, aproximadamente, el 50 % de los pacientes que requieren tratamiento con corticoides a largo plazo sufren una osteopenia severa y que el 30-50 % de ellos sufren fracturas osteoporóticas ^{96, 97}.

6.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE LA OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES

Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de osteoporosis inducida por glucocorticoides⁹⁸⁻¹⁰¹.

- Dosis.
- Duración.
- Tipo de glucocorticoide.
- Vía de administración.
- Factores individuales:
 - Edad.
 - Postmenopausia.
 - Factores generales de riesgo de osteoporosis:
 - sexo femenino
 - raza blanca
 - inmovilización
 - baja masa corporal
 - antecedentes familiares
 - antecedentes de fractura por fragilidad
- Enfermedades de base.

6.1.1. Dosis

Los glucocorticoides pueden inducir la aparición de osteoporosis si el tejido óseo se expone a cantidades excesivas de estos esteroides. El grado de pérdida ósea está relacionado, por tanto, con la dosis utilizada y la duración del tratamiento, de modo que en la inducción de la osteoporosis influye, probablemente, tanto la dosis diaria como el tiempo de administración. Además, esta pérdida de masa ósea no es uniforme a lo largo del tiempo sino que se produce de forma precoz tras el inicio del tratamiento con glucocorticoides. Así, en la actualidad se considera que se debería prevenir la osteoporosis inducida por glucocorticoides en aquellos pacientes que reciban dosis iguales o superiores a 5 mg/d de prednisona o equivalentes durante tres o más meses ¹⁰².

Otros autores defienden que la severidad de la pérdida ósea y, por tanto el riesgo de fracturas, depende de la dosis acumulada ⁹⁹, hallando un riesgo de osteopenia significativo con dosis acumulada de prednisona superior a 10 gr. Varonos et al ¹⁰³ estudiaron a niños con artritis crónica juvenil tratados con glucocorticoides y observaron fracturas vertebrales tras una dosis acumulada de prednisolona igual o superior a 5 gr. Sin embargo, en otro estudio realizado previamente en pacientes adultos afectados de artritis reumatoide se observó que el calcio corporal total se correlacionaba inversamente con la dosis diaria de glucocorticoides pero no con la dosis acumulada o la duración del tratamiento ¹⁰⁴.

La administración de glucocorticoides a días alternos se ha mostrado efectiva en el mantenimiento de la supresión de actividad de enfermedades inflamatorias, causando menos efectos secundarios que la terapia diaria. En este sentido, parece tener un efecto

beneficioso sobre la supresión del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal. Sin embargo, diversos estudios realizados sobre la utilización de glucocorticoides a días alternos no han demostrado una reducción de los efectos adversos sobre el esqueleto ¹⁰⁵ ni una prevención de la pérdida de masa ósea ¹⁰⁶ respecto a la terapia diaria.

Asimismo, se ha demostrado que ciertos marcadores de formación ósea como la osteocalcina y, de forma menos acusada, la fosfatasa alcalina pueden experimentar un descenso de sus concentraciones séricas según la dosis de glucocorticoides recibida, observándose una relación inversamente proporcional a la dosis de glucocorticoides administrada, sugiriendo una relación dosis dependiente ^{70, 107}.

6.1.2. Duración

La osteopenia inducida por glucocorticoides es también dependiente del tiempo de administración de la terapia, aunque la duración exacta capaz de producir pérdida ósea no ha sido determinada. Así, la mayoría de pacientes que han recibido tratamiento esteroideo durante al menos un año tienen un mayor riesgo para desarrollar una osteopenia ¹⁰¹, siendo éste mayor en mujeres postmenopáusicas debido a la existencia de otros factores de riesgo adicionales como la edad y la menopausia.

6.1.3. Tipo de glucocorticoide

Estudios clínicos han sugerido que el deflazacort, derivado oxazolínico de la prednisolona, podría producir una menor alteración sobre el metabolismo óseo que otros

glucocorticoides como la prednisona, manteniendo una acción antiinflamatoria e inmunosupresiva comparable. Así, se ha descrito un menor efecto de este fármaco sobre el metabolismo mineral ^{108, 109}; una menor alteración de la absorción intestinal de calcio ¹¹⁰; una menor disminución de los niveles séricos de osteocalcina ¹¹¹ y una marcada reducción en la tasa de pérdida ósea de hueso trabecular valorada mediante histomorfometría ¹¹². Sin embargo, la mayoría de estos estudios se realizaron a una dosis de deflazacort inferior a la que posteriormente se ha estimado como equivalente con prednisona, y estudios posteriores no han demostrado un efecto protector de este medicamento sobre el hueso cuando se utiliza a una dosis terapéutica equivalente ⁹⁸.

6.1.4. Vía de administración

Se considera que muchos de los efectos sistémicos que producen los glucocorticoides administrados por vía oral, entre ellos la alteración del metabolismo cálcico, pueden reducirse cuando son administrados por vía inhalatoria ¹¹³. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los corticoides inhalados pueden también producir un efecto deletéreo a nivel óseo. Así, en pacientes que recibieron tratamiento con beclometasona inhalada a altas dosis se observó un aumento de los marcadores bioquímicos de resorción ósea ¹¹⁴ y una reducción de la densidad mineral ósea a nivel vertebral ¹¹⁵. Asimismo, en pacientes que habían recibido tratamiento con triamcinolona inhalada a dosis de 1200 µg/día se halló una disminución de la densidad mineral ósea a nivel de columna lumbar y de fémur a los tres años de tratamiento ¹¹⁶. Igualmente, en otro estudio realizado ¹¹⁷ se ha hallado una correlación negativa entre la

dosis acumulada de corticoides inhalados y la densidad mineral ósea a nivel de fémur y columna lumbar.

Parece ser que la magnitud de los efectos de los glucocorticoides inhalados sobre el hueso sea un efecto primariamente dosis dependiente, calculándose que dosis inferiores a 1 mg/día de beclometasona o budesonida no parecen ejercer una influencia sobre el metabolismo óseo en adultos ⁹⁸. A igual dosis, los efectos secundarios sistémicos son menores con budesonida que con beclometasona ^{114, 118}.

Recientemente se ha publicado un estudio en el se concluye que la utilización de corticosteroides inhalados tiene un aumento del riesgo de fractura sobre todo a nivel de columna vertebral y fémur, aunque tal vez este aumento del riesgo pueda estar relacionado más con la enfermedad respiratoria de base que con la utilización de corticosteroides inhalados ¹¹⁹.

6.1.5. Factores individuales

En la génesis de las fracturas influyen no sólo la dosis y el tiempo de administración de los glucocorticoides sino también otros factores independientes de la terapia corticoidea relacionados con el propio individuo y la enfermedad de base. La edad, el nivel de actividad y el estado menopáusico son determinantes importantes del riesgo de fractura. La incidencia de osteoporosis inducida por glucocorticoides sintomática parece mayor en niños en crecimiento, individuos relativamente inmovilizados y mujeres postmenopáusicas. En niños, una tasa de remodelado alta es, aparentemente, el factor que predispone a la rápida aparición de osteopenia severa,

mientras que en pacientes con actividad física reducida y en mujeres postmenopáusicas la relativamente baja masa ósea inicial facilita una rápida reducción del contenido mineral óseo a niveles que corresponden a una osteopenia clínicamente significativa.

6.1.6. Enfermedades de base

La existencia de enfermedades concomitantes como artropatías inflamatorias crónicas también influye en el descenso de la masa ósea, habiéndose demostrado un mayor riesgo de fractura ¹²⁰. Estos pacientes presentan un mayor grado de pérdida ósea debido a los efectos sistémicos del aumento de IL-1, IL-6 y TNF producidos por la enfermedad inflamatoria ¹²¹, aunque otros factores como la terapia glucocorticoidea, el grado de discapacidad funcional y la inmovilización relativa que sufren estos pacientes contribuyen a esta osteopenia ¹²².

6.2. CARACTERISTICAS DE LA OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES

6.2.1. Localización esquelética

Los pacientes con osteoporosis inducida por glucocorticoides presentan una mayor pérdida mineral ósea, valorada mediante densitometría o tomografía computerizada, en aquellas regiones del esqueleto con alto contenido de hueso trabecular, como las costillas, columna vertebral ^{98, 106, 123, 124} o región distal de radio ⁹⁶,

¹²⁴. Estos resultados se reflejan en la expresión clínica de la osteoporosis inducida por glucocorticoides, en la que las fracturas ocurren más comúnmente en las zonas del esqueleto con alto contenido en hueso trabecular como la columna vertebral, costillas, pelvis y región distal de radio ^{96,99}.

Sin embargo, otros estudios muestran también una influencia del tratamiento esteroideo sobre el tejido óseo cortical, disminuyendo su densidad mineral o aumentando su fragilidad. Así, en el estudio experimental realizado por Ortoft y colaboradores en hueso cortical derivado de rata se halló un aumento de fragilidad del tejido óseo cortical tras ser expuesto a tratamiento con glucocorticoides durante 3 m, debido a una disminución de la resistencia ósea ¹²⁵. Por otro lado, en un estudio longitudinal en pacientes sometidos a tratamiento con dosis elevadas de glucocorticoides durante un tiempo igual o superior a un año, se constató una disminución de la densidad mineral ósea a nivel de fémur proximal ¹²⁶. Sin embargo, la pérdida de masa ósea a nivel cortical no parece significativa durante los primeros 12 meses de iniciada la terapia ¹⁰⁶.

6.2.2. Ritmo

Tras el inicio del tratamiento con glucocorticoides se produce una pérdida rápida de tejido óseo, predominantemente de hueso trabecular, seguida de una disminución más lenta, pero continua, de la densidad mineral del hueso ^{98, 112, 126, 127}. La pérdida ósea asociada con el tratamiento con glucocorticoides no es, por tanto, uniforme a lo largo de todo el tiempo de administración sino que la máxima pérdida ocurre en los primeros 6-

12 meses tras el inicio de la terapia ^{126, 127}. Así, se ha demostrado en biopsias óseas de pacientes sometidos a tratamiento con glucocorticoides que el volumen de hueso trabecular disminuye muy rápidamente tras 6 meses de tratamiento, experimentando una pérdida más lenta posteriormente ¹²⁷.

Por ello, en pacientes sometidos a tratamiento prolongado con glucocorticoides se recomienda la realización de evaluaciones periódicas de la densidad mineral ósea ¹⁰², para determinar y prevenir este efecto.

6.2.3. Reversibilidad

Finalmente, estudios de pacientes con síndrome de Cushing que han sido tratados quirúrgicamente con éxito muestran una mejoría significativa en la densidad mineral ósea, sugiriendo que es posible la recuperación de masa ósea ^{73, 128, 129}. En un estudio en pacientes con síndrome de Cushing ⁷³ se realizó, tras finalizar el tratamiento, un análisis histomorfométrico mediante biopsia ósea que mostró una mejoría de los índices de formación ósea. Asimismo, estos pacientes presentaron un aumento rápido y persistente de los niveles de osteocalcina sérica así como de la densidad mineral ósea a nivel femoral y lumbar, sugiriendo que, al menos en pacientes relativamente jóvenes (<50 años) tratados con éxito de síndrome de Cushing, los efectos deletéreos de los glucocorticoides en el esqueleto son reversibles. Asimismo, en otro estudio realizado en pacientes afectos de enfermedad de Cushing tratada quirúrgicamente se observó un aumento de la actividad osteoblástica en la biopsia ósea realizada 3 meses postadrenalectomía ¹³⁰.

A diferencia de la enfermedad de Cushing, existen escasos estudios sobre la reversibilidad de la osteoporosis inducida por glucocorticoides exógenos, debido, probablemente, a la dificultad de retirar este tratamiento tras su utilización durante largo tiempo sin causar recidivas. No obstante, en casos en que se ha podido suspender este tratamiento se ha observado una recuperación de la masa ósea sugiriendo que esta osteopenia es parcialmente reversible ¹³¹, sobre todo en pacientes menores de 45 años ¹³².

6.2.4. Efecto en los parámetros bioquímicos y en la concentración de PTH y vitamina D

Los cambios bioquímicos en pacientes con osteoporosis inducida por glucocorticoides no son, generalmente, llamativos hallándose las cifras de calcemia y fosforemia dentro de los límites de la normalidad ¹⁰⁰.

Sin embargo, en estos pacientes se ha sugerido una alteración del metabolismo de la vitamina D, habiéndose descrito valores de 25-OH vitamina D₃ tanto disminuidos ^{130, 133, 134} como normales ^{107, 127, 133, 135-137}. Del mismo modo, los niveles de 1,25 (OH)₂ vitamina D₃, metabolito activo de la vitamina D, se han hallado disminuidos ¹³⁸, sugiriendo un aumento del metabolismo del calcitriol inducido por los glucocorticoides; normales ^{127, 134, 137}; o aumentados ^{107, 136}, como respuesta fisiológica al estado de hiperparatiroidismo secundario producido por estos fármacos.

Asimismo, en estos pacientes, la concentración sérica de PTH se ha hallado normal^{107, 127, 134, 136, 137, 139, 140} o levemente elevada^{108, 130, 135, 141, 142}, como consecuencia de un balance cálcico negativo producido por estos fármacos.

6.2.5. Efecto en los marcadores bioquímicos de formación ósea

En pacientes en tratamiento con glucocorticoides se ha hallado una disminución de los valores de marcadores óseos de formación derivados del colágeno I. Así, se han demostrado valores séricos de PINP disminuidos tanto en adultos⁹¹ como en niños⁹² así como niveles menores de PICP en pacientes tratados con glucocorticoides que volvían a la normalidad tras la suspensión del tratamiento^{83, 84}.

Asimismo, se ha descrito una disminución de los niveles séricos de fosfatasa alcalina (FA) y de osteocalcina tras el inicio de la terapia glucocorticoidea, reflejando la disminución de la actividad osteoblástica observada en estos pacientes^{58, 64, 68}. Los valores de FA descienden de forma más gradual y menos acusada que los de osteocalcina. Este hecho podría ser debido, en parte, a la contribución de diferentes tejidos en la síntesis de FA⁵⁷, de modo que su concentración sérica final no reflejaría sólo el metabolismo óseo. Asimismo, la vida media de la FA es mayor que la de la osteocalcina, por lo que sus valores en sangre se modifican más lentamente. Estas diferencias en la producción y degradación de estos marcadores podrían explicar que la FA sea un marcador óseo menos específico y sensible que la osteocalcina en esta patología^{64, 65, 84}. En general, en la osteoporosis inducida por glucocorticoides hallamos

unas concentraciones séricas de FA normales que pueden aumentar transitoriamente tras la producción de fracturas.

Los valores de osteocalcina, además de experimentar un descenso agudo, dosis-dependiente, tras la administración de glucocorticoides, se mantienen en niveles inferiores a la normalidad mientras dura el tratamiento, normalizándose sus valores tras la suspensión del mismo ^{66-68, 84}. En aquellos pacientes en que la duración del tratamiento es prolongada persiste el descenso de este marcador mientras dura el tratamiento, habiéndose detectado una concentración media de osteocalcina 50 % menor que en pacientes control que no recibían glucocorticoides ^{58, 64}.

6.3. FISIOPATOLOGIA DE LA OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides producen una osteopenia que incrementa el riesgo de fractura ¹²³. La disminución de masa ósea observada en estos pacientes se debe en parte a los efectos directos de los glucocorticoides sobre el tejido óseo, y en parte a sus efectos sobre el metabolismo mineral.

6.3.1. Efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo mineral

A nivel del metabolismo mineral los glucocorticoides producen una reducción de la absorción intestinal de calcio y un aumento de la excreción urinaria de este mineral.

El efecto sobre la absorción intestinal de calcio ocurre en las primeras semanas de administración del fármaco y se correlaciona inversamente con la dosis de glucocorticoides ^{110, 133, 136}, alterándose la absorción activa ¹⁴³ y permaneciendo inalterada la absorción difusional. El mecanismo exacto por el que se produce la alteración de la absorción de calcio no está aclarado, aunque en animales de investigación que habían recibido cortisol se ha demostrado una disminución de la fracción soluble de la proteína transportadora de calcio, dependiente de vitamina D, a nivel de las células de la mucosa intestinal ¹⁴⁴.

Inicialmente, ciertos estudios sugerían que la disminución de la absorción intestinal de calcio observada en el tratamiento con glucocorticoides era mediada por una alteración del metabolismo de la vitamina D, bien a nivel de los procesos de hidroxilación hepática o renal o bien antagonizando sus efectos a nivel intestinal ¹³³. Esta hipótesis se veía apoyada al observar en estos pacientes una mejoría de la absorción intestinal de calcio tras tratamiento con calcitriol ¹³³. Sin embargo, el hecho de que en la mayoría de pacientes tratados crónicamente con glucocorticoides los niveles de 1,25 (OH)₂ D₃ y de 25-OH vitamina D₃ suelen ser normales ^{107, 127, 134-137} aun persistiendo la inhibición de la absorción cálcica intestinal, y de que los efectos depresores de la absorción intestinal de calcio sólo remiten parcialmente con la administración de dosis farmacológicas de calcitriol ¹⁴⁵, han sugerido un efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre las células intestinales no dependiente de vitamina D ¹⁴³.

Recientemente se ha postulado que los glucocorticoides podrían alterar la absorción intestinal de calcio mediante un efecto combinado: bloquear la diferenciación

de las células de las criptas intestinales, causando un estado de vitaminoD-resistencia; e inhibir, de forma directa, el transporte intestinal de calcio ¹⁴⁶.

En pacientes tratados crónicamente con glucocorticoides se ha observado un aumento de la excreción urinaria de calcio, a pesar de que la absorción intestinal de calcio se halla disminuida ¹³³, siendo su valor dos veces superior a la detectada en controles ^{107, 142, 147}. Los datos de estos autores sugieren que la hipercalciuria observada en estos pacientes podría ser el reflejo del calcio no depositado en el hueso debido a la supresión de la actividad osteoblástica con mantenimiento de la resorción ósea ¹⁰⁷, combinado con un efecto directo de los glucocorticoides sobre las células renales ¹⁴² que produciría una disminución de la reabsorción tubular de calcio ¹⁴⁷.

Aunque algunos autores han hallado valores séricos de PTH normales ^{107, 127, 134, 136, 139, 140}, se ha descrito un aumento de la actividad paratiroidea ^{108, 135, 141, 142} en pacientes tratados con glucocorticoides. Este hiperparatiroidismo se ha considerado secundario al balance negativo de calcio producido por estos fármacos como consecuencia de la disminución de la absorción intestinal de calcio y del aumento de su excreción urinaria. Su desarrollo probablemente se halle relacionado con la dosis y la duración de la terapia corticoidea recibida ¹⁴². El hecho de que en animales de investigación sometidos a tratamiento con glucocorticoides se haya demostrado una hiperplasia de las glándulas paratiroideas apoyaría la existencia de este hiperparatiroidismo ¹⁴⁸. Asimismo, los glucocorticoides podrían alterar el punto de regulación de calcemia de las células paratiroideas produciendo, en estos pacientes, una mayor secreción de PTH para un determinado nivel de calcio sérico. Además, los

glucocorticoides podrían aumentar la respuesta tisular a la PTH. Así, estudios “in vitro” han demostrado que estos fármacos aumentan la expresión de los receptores de PTH en osteoblastos ¹⁴⁹ y potencian la sensibilidad de estas células a la PTH actuando las células osteoblásticas como mediadoras del aumento de resorción ósea inducido por PTH ¹⁵⁰. Este hiperparatiroidismo contribuiría a la disminución de la masa ósea observada en estos pacientes al aumentar, a nivel renal, la excreción urinaria de calcio ¹⁰⁸ y al inducir, a nivel óseo, un aumento de la frecuencia de activación de las unidades del remodelado óseo y de la resorción osteoclástica en cada unidad.

6.3.2. Efectos de los glucocorticoides a nivel óseo

La disminución de masa ósea producida por los glucocorticoides tiene un origen multifactorial, ya que gran parte de las acciones de estos fármacos sobre el metabolismo óseo “in vivo” son indirectas (Esquema 1). Sin embargo, los glucocorticoides pueden también producir un efecto directo sobre el tejido óseo.

Los análisis de biopsias óseas de cresta iliaca realizadas en pacientes tratados con glucocorticoides han demostrado una disminución del volumen de hueso trabecular ^{112, 127, 151, 152}. En estos pacientes, la cantidad total de hueso reemplazado en cada ciclo de remodelado se halla reducida ¹⁵³. Como consecuencia, se produce una pérdida de masa ósea a expensas de una disminución del volumen de hueso trabecular, conservando el número de trabéculas pero disminuyendo su grosor ¹⁵²⁻¹⁵⁴, aunque, recientemente, se ha descrito que la aparición de perforaciones en las trabéculas podría ocurrir cuando el grosor trabecular fuera inferior a 70 μm ¹⁵². Los estudios

histomorfométricos, por tanto, confirman la disminución de masa ósea, principalmente de hueso trabecular, producida por los glucocorticoides. Sin embargo, ciertos estudios han sugerido también que estos fármacos pueden afectar el hueso cortical ^{125, 126}.

Esta disminución de la masa ósea clásicamente se había atribuido a una disminución de la formación ósea, sin alteración de la mineralización, y a un aumento de la actividad resortiva, observado en las biopsias óseas de pacientes en tratamiento con glucocorticoides ^{130, 151}.

En la osteoporosis inducida por glucocorticoides existen suficientes datos histológicos que sugieren que estos fármacos inducen en el tejido óseo humano una reducción de la función osteoblástica, y, como consecuencia, una disminución de la formación ósea. Así, se ha hallado una alteración del número y la morfología de los osteoblastos, en el sentido de que presentan un aspecto inactivo; una reducción del índice de aposición mineral ósea, medida mediante doble marcaje de tetraciclinas; y, en algunos casos, una disminución del número de bandas de osteoide ^{123, 130, 151}, y como consecuencia, una reducción de la fase de formación ósea en cada ciclo de remodelado ¹⁵¹.

Asociado a esta supresión de la formación ósea, se ha observado también un aumento relativo de la resorción ósea ^{101, 151} habiéndose hallado un aumento de los parámetros de resorción ósea, tales como la superficie relativa de resorción y la superficie relativa de resorción activa y observándose, además, una tendencia al aumento del número y actividad de los osteoclastos. Este aumento de resorción ósea no se considera un efecto directo de los glucocorticoides, sino que se ha atribuido a la

existencia de un hiperparatiroidismo secundario. Sin embargo, el aumento de PTH no suele producir una reducción en el volumen de hueso trabecular, ya que en esta situación la formación y la resorción óseas se hallan generalmente acopladas, y además se suele observar una disminución principalmente del hueso cortical.

Ello nos indica que en la osteoporosis inducida por glucocorticoides hay, generalmente, un defecto en la formación ósea asociado a una alteración del acoplamiento del remodelado óseo, con una formación disminuida y una resorción relativamente conservada. Teniendo esto en cuenta, parece que la reducción de la formación ósea es debida a que la población de osteoblastos en cada BRU permanece en estado inactivo durante una proporción anormalmente elevada de su vida total ¹⁵¹. Los efectos de los glucocorticoides parecen mediados directamente, actuando a través de receptores, sobre estas células.

En resumen, los datos histomorfométricos indican que los glucocorticoides frenan la función osteoblástica y que los efectos inhibidores de estos en la masa ósea se hallan exacerbados por un aumento de la frecuencia de activación de las unidades de remodelado óseo, probablemente debido a una hipersecreción de PTH.

6.3.3. Otros efectos de los glucocorticoides

- Disminuyen la actividad del IGF-1, que posee una importante actividad anabólica sobre el hueso, por diferentes mecanismos: inducen un aumento de los niveles de IGF-1-inhibidor ¹⁵⁵, inhiben la transcripción de IGF-1 ¹⁵⁶ e inducen un aumento de la proteína transportadora del IGF-1 ¹⁵⁷. Aunque se ha demostrado unos niveles séricos

normales tanto de IGF-1 como de hormona de crecimiento ¹²³, la actividad de IGF-1 se halla disminuida en pacientes en tratamiento con glucocorticoides.

- Producen también efecto sobre las hormonas sexuales. Los glucocorticoides alterarían la función gonadal por dos mecanismos:

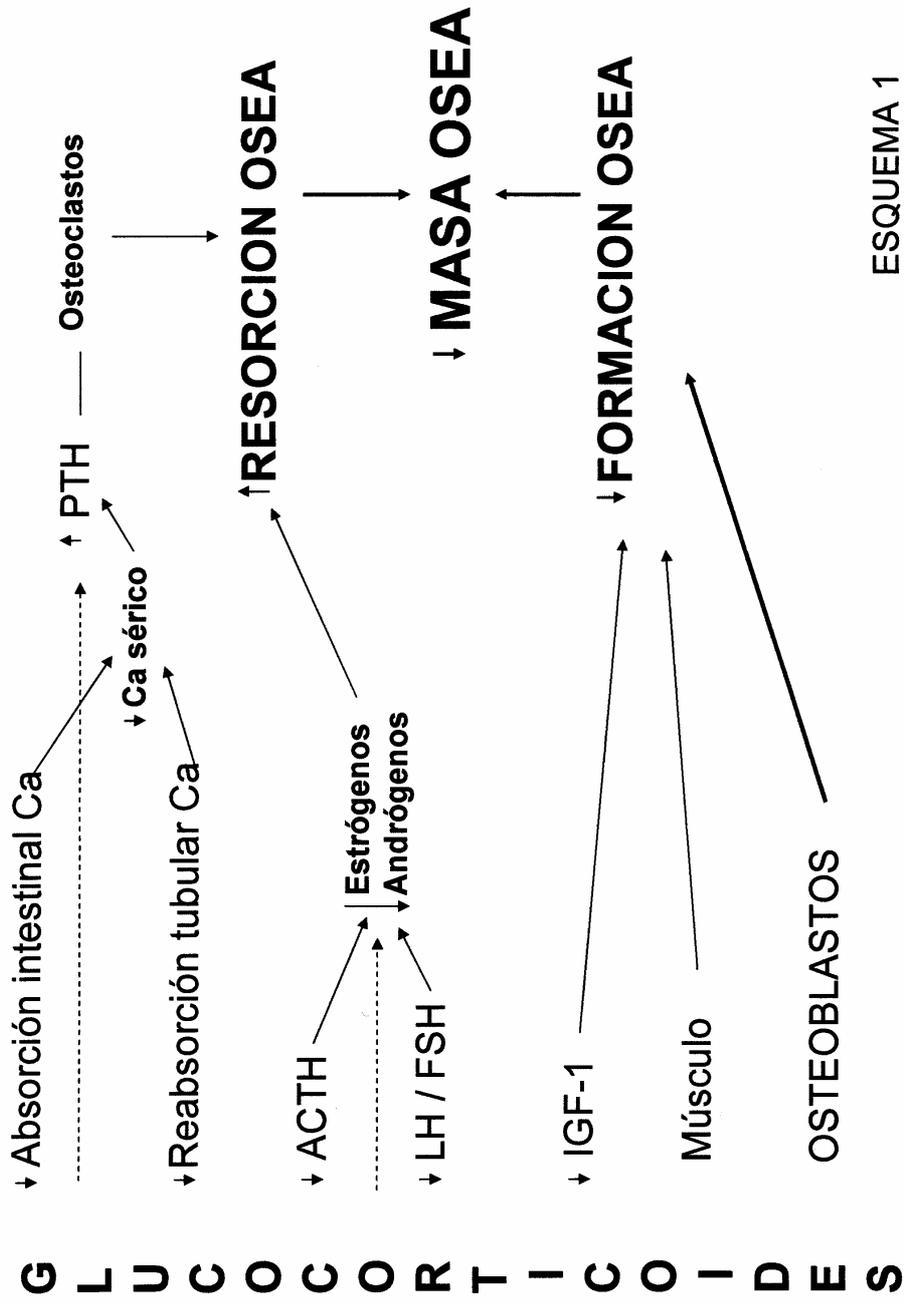
- indirecto: - a través de la inhibición de la secreción hipofisaria de gonadotrofinas ¹²³. Los glucocorticoides inhiben la secreción de LH en respuesta a LHRH tanto en varones como en mujeres, produciendo una disminución de la síntesis de estrógenos y testosterona a nivel de ovarios y testículos. Por otro lado, estudios en animales de investigación han sugerido que los glucocorticoides pueden también reducir el nº de sitios de unión de las gonadotrofinas en las células testiculares, disminuyendo su acción ¹⁵⁸.

- debido al efecto inhibitor de los glucocorticoides sobre la ACTH, lo que produce una disminución de la producción androgénica suprarrenal en ambos sexos. En mujeres postmenopáusicas la supresión de ACTH reduciría las concentraciones de andrógenos y estrógenos ¹⁵⁹ debido a la inhibición de la formación de estrona a partir de la androstendiona, disminuyendo los niveles séricos de la hormona estrogénica más importante en la menopausia.

- efecto directo sobre ovario o testículos, que parece ser el mecanismo principal de actuación de estos fármacos. En varones tratados con glucocorticoides de forma crónica se ha hallado una reducción de más del 50 % de los niveles séricos de testosterona, debido a una disminución de su producción por los testículos ¹⁶⁰. Asimismo, los glucocorticoides inhiben la producción de estrógenos inducida por FSH a

nivel del ovario, como se ha demostrado en cultivo de células de la granulosa de rata ¹⁶¹. Este efecto sobre la producción de testosterona y estradiol se cree que es debido muy probablemente a una acción directa de los glucocorticoides sobre las gónadas, produciéndose un aumento de gonadotrofinas (FSH/LH) como respuesta hipofisaria adecuada.

- Los efectos miopáticos inducidos por los glucocorticoides también favorecen indirectamente la pérdida ósea ¹²³. Esta miopatía puede desarrollarse tras una corta exposición al tratamiento esteroideo y no es siempre dosis dependiente. Parece ser que existe una asociación importante entre la existencia de miopatía esteroidea y osteoporosis. La debilidad muscular resultante puede contribuir a la pérdida ósea debido a la desaparición de las fuerzas normales producidas sobre el hueso por la contracción muscular fuerte, y a la inmovilización relativa como consecuencia de la debilidad muscular.



6.4. MECANISMOS CELULARES DE LA OSTEOPOROSIS INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES

Los mecanismos celulares implicados en la osteoporosis inducida por glucocorticoides no son bien conocidos. Aunque el efecto de los glucocorticoides a nivel óseo podría ser ejercido en distintas células diana, actuando sobre los osteoblastos (cél. formadoras) y/o sobre los osteoclastos (cél. resorptivas), basándonos en los datos observados en pacientes sometidos a tratamiento con glucocorticoides, parecería que el efecto fundamental de estos fármacos sería sobre la formación ósea actuando, probablemente, sobre los osteoblastos. La introducción de estudios “in vitro”, utilizando huesos órgano-cultivados o diversos sistemas celulares aislados, ha permitido un mejor conocimiento de estos mecanismos celulares, como se comenta seguidamente, aunque aún quedan aspectos por esclarecer.

6.4.1. Efectos de los glucocorticoides sobre la resorción ósea

Los estudios realizados para demostrar los efectos de los glucocorticoides sobre la resorción ósea “in vitro” han resultado, aparentemente, en datos contradictorios, habiéndose descrito tanto un efecto estimulador como inhibidor.

Así, estudios realizados “in vitro” demostraron que los glucocorticoides producían una inhibición específica, dosis-dependiente, tanto de la resorción ósea basal, actuando directamente sobre los osteoclastos a través de su receptor ¹⁶², como de la resorción ósea estimulada por PTH o 25-OH-D₃ ¹⁶³. Esta disminución de la resorción podría ser debida a un descenso en la proliferación de los precursores osteoclasticos; o

bien, a una estimulación de la apoptosis de estas células producida por los glucocorticoides actuando a través de su receptor ¹⁶⁴.

Sin embargo, “in vivo”, la inhibición de la resorción ósea producida por los glucocorticoides desempeña un papel menor. Una posible explicación a este hecho podría ser las diferencias observadas inter-especies. Así, se ha observado este efecto inhibitorio en cultivo de osteoclastos derivado de rata ¹⁶⁴; sin embargo en ratón se ha hallado consistentemente una estimulación de la resorción ósea ¹⁶⁵. Además, “in vivo” la existencia de un hiperparatiroidismo secundario asociado podría enmascarar la inhibición de la resorción ósea observada “in vitro”.

Contrariamente, otros estudios han demostrado que los glucocorticoides producen una estimulación de la resorción ósea en cultivos de células óseas procedentes de animales ¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Este efecto estimulador sucedería en las primeras 24 h de su administración y produciría un aumento transitorio de la resorción ósea ¹⁶⁷ al aumentar el número y la actividad de los osteoclastos ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. El aumento de la resorción ósea observada podría deberse a un efecto directo de estos fármacos sobre los osteoclastos, actuando a través de su receptor ¹⁶⁸, o bien a un efecto indirecto, mediado por macrófagos ¹⁶⁶ o por la inducción de receptores de IL-6 en las células esqueléticas ¹⁷⁰ al producir la IL-6 el reclutamiento de osteoclastos ⁴⁷, desempeñando un papel clave en la resorción ósea. Estos hechos concordarían con los efectos observados “in vivo”.

Además, de forma indirecta, los glucocorticoides podrían estimular la resorción ósea al disminuir los niveles de osteoprotegerina (OPG), disminuyendo, como consecuencia, la inhibición producida por la OPG del factor de diferenciación

osteoclástica o RANKL; a la vez que producen un aumento de los niveles de RANKL⁵⁴, aumentando, por tanto, la actividad osteoclástica, hecho que podría explicar, en parte, la resorción ósea observada en la osteoporosis inducida por glucocorticoides.

Recientemente se ha descrito, en un modelo de implantes óseos subdérmicos en ratas, que los glucocorticoides podrían tener unos efectos disociados en diferentes fases de la resorción ósea: inhibiendo la recaptación y diferenciación de las células resorptivas óseas cuando se administra dexametasona en el mismo momento del implante, pero estimulando la actividad de los osteoclastos y aumentando la resorción ósea al añadir este fármaco siete días después del implante¹⁶⁸.

6.4.2. Efectos de los glucocorticoides sobre la formación ósea

Diversos estudios apoyan el hecho de que el efecto inhibitorio realizado por los glucocorticoides sobre la actividad osteoblástica tiene un papel primordial en el desarrollo de la enfermedad metabólica ósea como resultado del exceso de estos fármacos^{123, 151, 171}.

En este sentido, el resultado principal de la exposición a un exceso de glucocorticoides podría ser la reducción de la formación ósea, con descenso de la capacidad proliferativa y función de los osteoblastos así como disminución del número de precursores osteoblásticos, por lo que el efecto inhibitorio de la función osteoblástica sería el factor más importante en la osteoporosis inducida por glucocorticoides¹⁷¹. Sin embargo, en la actualidad, se desconocen múltiples aspectos de este efecto.

6.4.2.1. Acción directa de los glucocorticoides sobre los osteoblastos

Entre los mecanismos de acción de los glucocorticoides sobre los osteoblastos, se ha propuesto una acción inhibitoria directa basándose en la identificación en estas células de receptores específicos para glucocorticoides. Así, se ha demostrado la existencia de estos receptores en cultivos de osteoblastos aislados de calota fetal de rata¹⁷²⁻¹⁷⁴, en líneas celulares de sarcoma osteogénico¹⁷⁵ y, más recientemente, en osteoblastos humanos⁶. Estos receptores, a su vez, pueden interactuar de forma positiva o negativa con varios factores nucleares.

A nivel molecular los glucocorticoides difunden pasivamente a través de la membrana celular para unirse a receptores específicos en el citoplasma y núcleo de los osteoblastos. En su unión se produce un complejo esteroide-receptor activado capaz de unirse a componentes específicos nucleares, induciendo la alteración de la expresión de los genes adyacentes y pudiendo alterar la función celular hasta el grado de producir cambios en el crecimiento y en la diferenciación celular.

6.4.2.1.1. Efectos sobre la proliferación celular

Estudios “in vitro” han demostrado que la administración de glucocorticoides disminuye la incorporación de [³H]-timidina al DNA de las células óseas de forma dosis-dependiente en cultivos a largo plazo (96 h)^{172, 176-179}, aunque algunos autores hallan una disminución que ya se observa tras 24 h de exposición al fármaco¹⁸⁰⁻¹⁸⁴. Esta inhibición de la proliferación celular al utilizar concentraciones elevadas de glucocorticoides se ha demostrado en cultivo de varios sistemas celulares: calota fetal

de rata ^{172, 176, 178, 181}, calota de ratón ¹⁷⁷; células MC3T3-E1 ¹⁸⁰; células osteosarcomatosas ^{179, 182} y osteoblastos humanos ¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

Sin embargo, los efectos de los glucocorticoides sobre la proliferación celular pueden diferir dependiendo de la especie y de las condiciones experimentales del cultivo. En este sentido, se ha demostrado que en cultivos con elevada concentración de células, los glucocorticoides reducen la proliferación de células osteoblásticas de ratón y aumentan la proliferación de osteoblastos de rata, mientras que en cultivos poco densos inhiben la proliferación celular de ambas especies ¹⁷⁷. Estos hechos enfatizan la importancia de las diferencias entre especies y la dificultad de comparar un sistema a otro, incluso en especies estrechamente relacionadas como el ratón y rata. Además, los datos muestran que las condiciones del cultivo en el momento del tratamiento influyen notoriamente en las respuestas de estas células a los glucocorticoides.

Otro factor que puede influir en los efectos de los glucocorticoides sobre la proliferación celular es el tiempo de adición del fármaco al cultivo celular. Así, se ha observado que cuando los glucocorticoides están presentes desde el inicio del cultivo su efecto es estimulador, pero si son añadidos tras un período de expansión in vitro, su efecto es inhibitorio ¹⁸⁵.

En cultivo de osteoblastos humanos sometidos a tratamiento con glucocorticoides se ha observado un efecto bifásico sobre la proliferación celular ¹⁸⁶: a corto plazo (3 días) se observó que la dexametasona estimulaba la proliferación celular de forma dosis-dependiente. Sin embargo, en cultivos a largo plazo (igual o superior a 6 días), la dexametasona ejercía un efecto bifásico, estimulando la proliferación celular a

dosis baja (1-10 nM) e inhibiéndola a dosis elevada (igual o superior a 100 nM). Asimismo se observó que otros glucocorticoides testados como hidrocortisona, prednisolona y deflazacort ejercían casi idénticos efectos bifásicos en la proliferación celular en cultivos de 12 días, produciendo una estimulación a bajas concentraciones (1-10 nM) y una marcada inhibición, superior al 50-60 %, a dosis iguales o superiores a 100 nM.

Asimismo, en otro estudio realizado en cultivo de osteoblastos humanos ¹⁸⁷ se observó una estimulación de la síntesis de DNA tras 6-12 h de exposición al tratamiento con glucocorticoides, y una inhibición a las 48 h, más evidente en cultivos sometidos a tratamiento con dexametasona y metilprednisolona.

Estos datos sugerirían que los glucocorticoides tienen dos efectos distintos en la tasa de proliferación de osteoblastos humanos: un efecto estimulador débil observado en períodos cortos de incubación y bajas concentraciones, y un efecto bifásico a largo plazo: estimulador a dosis bajas e inhibitorio a altas dosis, efecto que superaría el efecto estimulador inicial.

En cultivos derivados de calota fetal de rata ¹⁸¹ tratados con deflazacort, glucocorticoide con menor efecto osteopenizante, a dosis 1-100 nM durante 72 h se ha observado también una inhibición de la proliferación celular. En cultivo de osteoblastos humanos sometidos a tratamiento prolongado con deflazacort (12 d) se ha observado, asimismo, un efecto bifásico, con estimulación a dosis 1-10 nM, e inhibición superior a 50-60 % respecto a control con dosis iguales o superiores a 100 nM. ¹⁸⁶.

6.4.2.1.2. Efecto sobre los precursores osteoblásticos

A concentraciones fisiológicas, los glucocorticoides inducen la diferenciación de las células preosteoblásticas en células maduras, capaces de expresar el fenotipo osteoblástico¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Así, se ha descrito, en cultivo de osteoblastos humanos, que dosis fisiológicas de dexametasona producen un aumento significativo de la actividad fosfatasa alcalina¹⁸⁵, reflejando que los glucocorticoides estimulan un fenotipo osteoblástico más diferenciado. Asimismo, la presencia de glucocorticoides es necesaria para la mineralización de la matriz ósea recién sintetizada^{188, 189}.

Sin embargo, a dosis farmacológicas los glucocorticoides producen una disminución del nº de precursores osteoblásticos ya que reducen la replicación de las células preosteoblásticas. En este sentido, en estudios realizados en cultivos de osteoblastos derivados de calota fetal de rata^{172, 176, 178} se ha observado una inhibición de la proliferación de los precursores osteoblásticos en cultivos a largo plazo (96 h). En estos casos se observa, además, una inhibición más generalizada, afectando no sólo a la síntesis de DNA sino también a la síntesis de colágeno y de proteínas no colágenas, como consecuencia de la disminución del nº de precursores osteoblásticos. Esta inhibición, dosis-dependiente, comportaría, a largo plazo, una disminución de la nueva formación ósea, al reducirse la población de células osteoprogenitoras, deteniéndose gradualmente la síntesis de matriz ósea.

De este modo, dependiendo de la dosis utilizada, los glucocorticoides ejercen efectos paradójicos sobre la función de las células óseas, inhibiendo la proliferación de

células del linaje osteoblástico e induciendo su diferenciación, así como inhibiendo aspectos específicos de la función diferenciada de los osteoblastos.

6.4.2.1.3. Efectos sobre la apoptosis

Otro mecanismo por el que los glucocorticoides pueden afectar la proliferación y función celular de los osteoblastos es a través del control de la muerte celular programada. Diversos estudios han demostrado que los glucocorticoides producen una disminución del número de osteoblastos maduros y de osteocitos por apoptosis^{191, 192}. Así, en los análisis histomorfométricos de biopsias óseas de ratones y de pacientes humanos que habían recibido tratamiento de forma prolongada con glucocorticoides se observa una elevada proporción de osteoblastos que muestran apoptosis¹⁹¹. Como consecuencia, la vida media activa de los osteoblastos se vería reducida lo que provocaría como resultado una disminución de la formación ósea.

Asimismo, se ha observado “in vitro” un aumento dosis-dependiente del número de células apoptóticas en cultivos de osteoblastos de rata y de ratón tras 72 h de tratamiento con glucocorticoides¹⁹².

Así, la disminución de la formación ósea producida por los glucocorticoides puede ser debida, en parte, a un aumento de la apoptosis.

6.4.2.1.4. Efectos sobre la función celular: síntesis proteica

Otro aspecto importante del efecto de los glucocorticoides es su acción sobre la función osteoblástica. Estos fármacos, probablemente, modifican su síntesis proteica. Se ha demostrado que dosis farmacológicas de glucocorticoides producen una inhibición de la síntesis proteica en cultivo de osteoblastos derivados de calota de ratón¹⁹³ y de calota fetal de rata¹⁸³, a las 24 h y 96 h respectivamente de exposición al tratamiento.

Sin embargo, en otros ensayos experimentales se ha sugerido un efecto bifásico dependiendo de las condiciones del cultivo, de forma que dosis fisiológicas y períodos cortos de exposición inducirían una estimulación de la síntesis de colágeno, no asociado con ningún incremento en la incorporación de [³H]-timidina al ADN, mientras que dosis suprafiológicas y períodos de exposición prolongados inhibirían la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas¹⁷⁶. Así, se ha demostrado en cultivo de osteoblastos derivados de calota fetal de rata¹⁷⁸ que los glucocorticoides producirían a corto plazo (24 h) una estimulación de la síntesis de colágeno a dosis fisiológicas (10 nM) y una inhibición a dosis farmacológicas (1-10 μM), valorado por la incorporación de [³H]-prolina. A largo plazo (96 h) se observa un descenso en la síntesis de colágeno dosis-dependiente, efecto atribuido en parte a la disminución de la conversión de precursores osteoblásticos en osteoblastos maduros. Basándonos en estos resultados, los glucocorticoides ejercerían un efecto dual en la síntesis de colágeno tipo I en cultivo de osteoblastos de calota fetal de rata: un efecto estimulador transitorio y observable sólo a dosis bajas y un efecto inhibitorio tras largo plazo de exposición. El efecto estimulador observado sobre la síntesis proteica a concentraciones fisiológicas

sugeriría que los glucocorticoides pueden ser importantes para el mantenimiento de la función diferenciada de los osteoblastos.

Por otra parte, se han demostrado efectos antagónicos de los glucocorticoides sobre la síntesis proteica, estimulándola o inhibiéndola, en líneas celulares de osteoblastos derivados de osteosarcoma de rata ¹⁷⁹, demostrando que estas líneas celulares son fenotípicamente heterogéneas, y sugiriendo que en el hueso normal pueden existir distintas subpoblaciones de osteoblastos con rasgos fenotípicos diversos con respecto a la regulación de la síntesis proteica.

Además, al reducir la replicación celular, los glucocorticoides disminuyen, de forma indirecta, la síntesis proteica ya que disminuyen una población celular que es capaz de sintetizar colágeno óseo ¹⁷⁶.

Otro mecanismo por el que estos fármacos alteran la síntesis proteica es que los glucocorticoides reducen la velocidad de transcripción del gen de la cadena α_1 del procolágeno I a nivel osteoblástico de forma dosis y tiempo-dependiente. Asimismo, producen una disminución de la estabilidad del ARNm de la cadena α_1 I sintetizado, produciéndose, como consecuencia, una disminución de la síntesis de colágeno tipo I por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales ¹⁹⁴.

Asimismo, los glucocorticoides regulan la síntesis de las metaloproteinasas de la matriz ósea ^{195, 196}, familia de enzimas proteolíticas entre las que se incluyen colagenasas, gelatinasas y estromelisininas ¹⁹⁷, importantes en el proceso de remodelado óseo. Así, se ha demostrado, en cultivo de osteoblastos derivados de calota fetal de rata,

que el cortisol estimula la expresión de colagenasa intersticial mediante mecanismos postranscripcionales, al aumentar la estabilidad de los transcritos ¹⁹⁵. Por otro lado, los glucocorticoides reducen la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 a nivel osteoblástico ¹⁷¹, glicoproteína que inhibe una variedad de metaloproteinasas incluyendo la colagenasa intersticial. De este modo, el aumento de la colagenasa junto con la reducción del inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 pueden desempeñar un papel en la degradación del colágeno tipo I y contribuir a la reducción de la matriz colágena del hueso. Al ser el colágeno tipo I la principal proteína estructural de la matriz ósea, una disminución de su expresión y un aumento de su degradación son factores importantes para el desarrollo de las acciones inhibitoras de los glucocorticoides sobre la matriz y la masa óseas, y explican muchas de las acciones inhibitoras de los glucocorticoides sobre la formación ósea observadas “in vitro”.

6.4.2.1.4.1. Efectos sobre la síntesis de osteocalcina

Se ha demostrado una disminución de la secreción de osteocalcina en cultivos de células derivadas de osteosarcoma humano ¹⁹⁸ y de osteoblastos humanos ^{6, 31, 185, 187, 198} sometidos a tratamiento con glucocorticoides. Esta inhibición sería dosis-dependiente, observándose tanto en cultivos con exposición corta o prolongada a glucocorticoides, e independiente de los cambios en la síntesis total de proteínas, de colágeno o en la actividad fosfatasa alcalina ³¹.

Sin embargo, en cultivos celulares de osteoblastos derivados de calota fetal de rata ¹⁹⁹ los glucocorticoides producen un leve efecto estimulador sobre la síntesis de osteocalcina. Esta diferencia observada en la producción de osteocalcina en ciertas

especies animales respecto a humanos podría sugerir que la disminución de la síntesis de osteocalcina tras exposición a glucocorticoides sería una característica de las células osteoblásticas trabeculares humanas.

A nivel celular, se han demostrado múltiples sitios de unión del receptor de los glucocorticoides en el promotor de osteocalcina²⁰⁰, cercanos a elementos respondedores a vitamina D. Los glucocorticoides, actuando a través de su receptor, podrían interaccionar con secuencias de ADN del gen de la osteocalcina estimuladas por la 1,25-dihidroxitamina D₃ alterándolas, produciendo una reducción de la transcripción de dicho gen y, como consecuencia, una disminución de la síntesis de osteocalcina. Sin embargo, la inhibición del promotor de la osteocalcina no parece un modelo de represión simple, sino que sugiere además la existencia de ciertos factores, regulados por los glucocorticoides, que se unirían a los elementos respondedores a vitamina D²⁰¹.

6.4.2.1.5. Efectos sobre la producción de fosfatasa alcalina

Se han descrito efectos variables de los glucocorticoides sobre la actividad fosfatasa alcalina según el tiempo de exposición. Así, en cultivo de osteoblastos derivados de calota fetal de rata¹⁷⁸ y de calota neonatal de rata²⁰² estos fármacos causan un pequeño y transitorio aumento en la actividad FA, no dosis dependiente tras 12-24 h de tratamiento; mientras que tras 48-96 h de exposición, el efecto es inhibitorio y dosis dependiente. Estos efectos no podrían ser atribuidos a cambios en la liberación del enzima de hueso a medio dado que los glucocorticoides no afectan la actividad FA en el medio de cultivo.

Por otro lado se ha descrito, en cultivo de osteoblastos obtenidos a partir de explantes de periostio de embrión de pollo, que dosis 10^{-7} M de dexametasona aumentan la expresión de FA tras 3 días de tratamiento ²⁰³. Asimismo se ha descrito tanto en cultivo de células del estroma medular de rata ¹⁹⁰ y del estroma medular humano ¹⁸⁹ como en osteoblastos humanos ^{6, 185}, un aumento significativo de la actividad fosfatasa alcalina tras largo tiempo de exposición a dosis fisiológicas de dexametasona, sugiriendo que los glucocorticoides favorecerían la diferenciación celular en células maduras con un fenotipo más osteoblástico.

6.4.2.2. Acción indirecta de los glucocorticoides sobre los osteoblastos

Los glucocorticoides pueden también actuar sobre los osteoblastos de forma indirecta modulando su respuesta a la acción de diversos agentes como la hormona paratiroidea (PTH), 1,25 dihidroxivitamina D₃, prostaglandinas y factores de crecimiento ¹⁴⁶.

Los glucocorticoides aumentan la sensibilidad de los osteoblastos a la PTH ^{149, 193, 202}, aumentando el número de receptores para la PTH ^{149, 204}, y la respuesta de la adenilato-ciclasa a esta hormona, hecho observado en cultivo de osteoblastos derivados de calota fetal de rata ²⁰⁵ y de osteosarcoma de ratón ²⁰⁶, con el consiguiente incremento de la producción de AMPc.

Asimismo, se ha sugerido una regulación del número de receptores de 1,25 dihidroxivitamina D₃ identificados en osteoblastos ³ por parte de los glucocorticoides.

Así, en cultivo de osteoblastos derivados de calota fetal de rata se ha demostrado un aumento del número de receptores de calcitriol ^{207, 208} tras tratamiento con glucocorticoides, debido, probablemente a una inhibición de su degradación, produciéndose, como consecuencia, un aumento de la magnitud de las biorrespuestas dependientes de la 1,25 dihidroxivitamina D₃. Por otra parte, se ha demostrado, en cultivo de células derivadas de ratón que los glucocorticoides aumentan la sensibilidad celular al calcitriol ²⁰⁹. Esta potenciación por parte de los glucocorticoides de la actividad del calcitriol iría en paralelo con la previamente descrita de la PTH. Así, a través de la regulación del nº de receptores de estas dos hormonas, los glucocorticoides podrían ejercer parte de sus acciones de forma indirecta, amplificando la respuesta de estas hormonas.

Sin embargo, los efectos de los glucocorticoides sobre los receptores de calcitriol varían según las diferentes especies. Así, en cultivo de osteoblastos de ratón ²¹⁰ y de células derivadas de osteosarcoma humano ²¹¹, se ha demostrado una disminución del nº de receptores del calcitriol tras tratamiento con glucocorticoides, al inhibir la transcripción de RNAm del receptor de vitamina D.

Los glucocorticoides modifican la producción de prostaglandinas, principalmente PGE₂, por parte de los osteoblastos, inhibiendo su síntesis y produciéndose, seguidamente, una disminución en la síntesis de DNA que es revertida significativamente al añadir PGE₂ a los cultivos ¹⁸⁰. Basándose en este hecho, se ha sugerido que la disminución de la proliferación osteoblástica producida por los glucocorticoides podría estar mediada, parcialmente, por un descenso de la síntesis de PGE₂.

También se ha demostrado que los efectos estimuladores de los factores de crecimiento sobre la proliferación celular y la síntesis de colágeno son directamente inhibidos por los glucocorticoides:

- IGF-I: En cultivo de osteoblastos de rata ¹⁵⁶ y humanos ²¹² se ha demostrado que dosis farmacológicas de glucocorticoides (cortisol a dosis 10^{-6} M) inhiben la expresión de IGF-I, probablemente de forma directa, ya que esta inhibición es ya aparente a las 6 h del inicio del tratamiento con glucocorticoides ²¹³. Asimismo, se ha demostrado que la disminución de PICP inducida por los glucocorticoides se normaliza tras la adición de IGF-I al medio de cultivo ²¹⁴. Este hecho sugiere que algunos de los efectos de los glucocorticoides sobre la formación ósea pueden ser mediados por el descenso de IGF-I. Además, se ha demostrado que los glucocorticoides disminuyen los niveles de proteínas transportadoras de IGF (IGFBP) en cultivo de osteoblastos derivados de rata ²¹⁵ y de osteoblastos humanos ²¹⁶, indicando que parte de las acciones de estos fármacos pueden deberse a la regulación de la producción de estas proteínas, modulando, como consecuencia y de forma indirecta, los niveles de IGF-I.

- TGF-β: Los glucocorticoides alteran la unión de TGF β1 a los osteoblastos, disminuyendo sus efectos anabólicos a nivel óseo ²¹⁷. En cultivo de osteoblastos derivados de calota fetal de rata ²¹⁷, el tratamiento con cortisol (100 nM) reduce los efectos estimulatorios de TGF-β1 (una de las 3 isoformas de TGF-β) sobre la replicación celular y la síntesis de colágeno, al disminuir su unión a los receptores implicados en la transducción de la señal intracelular (complejos de unión I y II), y favorecer su unión al complejo receptor tipo III, sitio de reserva de TGF-β extracelular.

De este modo se disminuye la bioefectividad del TGF- β 1, sugiriendo que parte de los efectos de los glucocorticoides pueden ser mediados por cambios en las acciones locales de TGF- β en el tejido esquelético.

El tratamiento con glucocorticoides puede, asimismo, modular la función de los osteoblastos a través de su efecto en la expresión de integrinas, receptores de superficie celular que modulan la adhesión de los osteoblastos a las proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno I. Así, se ha descrito recientemente en cultivo de osteoblastos derivados de calota de rata ^{218, 219} y de células derivadas de osteosarcoma de rata ²¹⁹ que los glucocorticoides disminuyen la producción del receptor de superficie celular β_1 , principal subunidad β integrina de los osteoblastos, disminuyendo, como consecuencia, la habilidad de los osteoblastos para unirse a estas proteínas de la matriz ósea. Esta inhibición de la adhesión osteoblástica puede contribuir al descenso de la síntesis de la matriz ósea, inhibiendo, como consecuencia, la formación ósea.

En resumen, hemos revisado los diferentes mecanismos celulares descritos hasta la actualidad implicados en la osteoporosis inducida por glucocorticoides. No obstante, y a pesar de los numerosos estudios realizados, los resultados son, en muchos casos, contradictorios, y son escasos los estudios realizados en osteoblastos humanos, modelo que, como veremos a continuación, refleja mejor el comportamiento de las células en el organismo.

7. CULTIVOS CELULARES

Para la evaluación de los mecanismos implicados en la fisiopatología ósea es importante el desarrollo de ciertas técnicas que permitan el estudio del metabolismo óseo bajo condiciones controladas de experimentación. En este sentido, la utilización de cultivos celulares como modelo experimental constituye una poderosa herramienta para el estudio de defectos intrínsecos celulares o bien de alteraciones producidas por estímulos externos. Además, eliminan la presencia de otros factores, como son los efectos sistémicos sobre el metabolismo mineral, que podrían conducir a conclusiones erróneas. Los cultivos celulares son un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de células vivas en un medio artificial que permite reproducir, de forma bastante fiable, las condiciones biológicas que las células tienen en su lugar de origen.

Para el estudio de la patología metabólica ósea el cultivo celular idóneo sería el de células obtenidas del órgano de interés, en este caso de hueso. Dado que en la osteoporosis inducida por glucocorticoides existen suficientes datos que sugieren que el factor patogénico principal es la alteración de la formación ósea, el modelo experimental que mejor nos ayudaría a estudiar su fisiopatología sería la utilización del cultivo de células osteoblásticas.

7.1. TIPOS DE CULTIVOS CELULARES

Se han desarrollado diversas técnicas de cultivo de células osteoblásticas "in vitro" y existen numerosos modelos de cultivos celulares según su procedencia: de órgano, de tejido o de células aisladas.

- En los cultivos de órgano se utiliza hueso obtenido generalmente de calota^{34, 165, 174, 176, 178, 181, 183, 202, 218}, fémur^{51, 163} o tibia⁵¹ cultivándose "in vitro" de forma intacta. Contienen osteoblastos totalmente diferenciados así como sus precursores celulares, permitiendo el estudio de la síntesis de la matriz ósea. Sin embargo, al hallarse presentes en el cultivo de órgano múltiples tipos celulares como osteoclastos o células de la médula ósea, el estudio de la respuesta a un agente particular puede verse interferido por la presencia de mediadores locales, siendo difícil identificar su mecanismo de acción.

- El cultivo de tejido resulta más específico que el de órgano, dada su función más especializada, utilizándose, frecuentemente, tejido perióstico^{20, 203} o médula ósea^{53, 189, 190, 219-222}.

- Sin embargo, aunque inicialmente se utilizaron cultivos de órgano o tejido, actualmente el tipo de cultivo más utilizado es el de células aisladas ya que permite estudiar de forma más simple los mecanismos fisiológicos o patológicos a nivel óseo, evitando la complejidad del cultivo de órgano con más de un tipo celular con diferentes funciones. Este cultivo logra la supervivencia fuera del organismo de células independientes capaces de mantener sus funciones "in vitro".

7.2. CULTIVOS DE CELULAS OSTEOLASTICAS

7.2.1. Cultivos de células osteoblásticas de origen animal

Inicialmente, la mayoría de los cultivos de células osteoblásticas eran obtenidos de animales jóvenes, recién nacidos o fetales. Así, se han obtenido cultivos celulares derivados de calota fetal de rata ^{156, 172, 173, 177, 181, 188, 194, 195, 199, 205, 207, 208, 213, 215, 217, 219} de calota neonatal de rata ^{45, 150}, de calota neonatal de ratón ^{177, 193, 209, 210}, de hueso de embriones de pollo ^{51, 52} y bovino fetal ³³. En estos casos, el hueso obtenido es fragmentado y sometido a digestión secuencial con colagenasa, obteniéndose la población celular.

También se han obtenido clones celulares como el cultivo de células MC3T3-E1, clon de línea osteoblástica de calota de ratón ¹⁸⁰, o el cultivo de células UMR 201 que es un clon de células no transformadas derivadas de calota neonatal de rata ²²³. La utilización de estos clones celulares evita el potencial de crecimiento de células no osteoblásticas, disminuyendo el riesgo de contaminación por otras series celulares.

Sin embargo, aunque estos cultivos exhiben diversas propiedades y características típicas de osteoblastos, el comportamiento de estas células dista de ser análogo del de las células óseas humanas adultas debido al distinto desarrollo (embriones, fetos, neonatales) y a diferencias interespecies. En los estudios realizados se han observado diferencias en relación con las diversas especies animales pudiendo, por tanto, modificar la información aportada por el estudio y no siendo, como consecuencia, modelos apropiados para el estudio de la fisiopatología ósea humana.

7.2.2. Cultivo de células osteoblásticas tumorales

Otro tipo de cultivo de células osteoblásticas es el establecido a partir de tumores óseos, fundamentalmente de sarcoma osteogénico. Se han obtenido cultivos a partir de osteosarcoma de rata y humano. Las líneas celulares ROS 17/2^{30, 33, 43, 175, 179, 182, 204}, ROS 17/2.8^{41, 149, 179, 195, 200, 206, 219}, ROS 2/3¹⁸², OS 12¹⁷⁵, UMR 106³³ y UMR 106-01⁵⁵ son clones de líneas celulares de sarcoma osteogénico de rata. Entre las líneas celulares derivadas de osteosarcoma humano destacan: MG-63^{53, 157, 186, 190, 211, 224}, SAOS-2^{53, 190, 220}, TE-85^{157, 190} y U2 OS^{157, 190}.

Las líneas celulares derivadas de osteosarcoma permiten la utilización de grandes cantidades de células genotípicamente homogéneas que retienen su fenotipo tras múltiples pases de cultivo. Son fáciles de cultivar dado su rápido crecimiento y pueden ser útiles para el estudio de los efectos de un factor simple en un medio definido así como para el aislamiento de productos sintetizados por estas células.

Sin embargo, son células transformadas y aunque presentan algunas características del fenotipo osteoblástico, no expresan el fenotipo completo del osteoblasto humano. Así, difieren en sus procesos de control de crecimiento, organización citoesquelética, expresión de oncogenes y producción de factores de crecimiento. Por este motivo, pueden responder anormalmente a hormonas o factores de crecimiento, como consecuencia de procesos relacionados con la transformación tumoral de las células.

7.2.3. Cultivo de células osteoblásticas humanas

La introducción del cultivo de osteoblastos humanos ha permitido la obtención de un modelo experimental más fidedigno para el estudio de la patología metabólica ósea, evitando las posibles conclusiones erróneas al utilizar otro tipo de cultivos celulares que, como consecuencia, no permitiera una extrapolación de sus resultados a lo que sucede “in vivo”.

7.2.3.1. Aislamiento

Para el aislamiento de células óseas humanas se desarrollaron una serie de métodos:

- a partir del estroma óseo: obteniéndose cultivos de médula ósea de los que se derivan células que sufren una diferenciación osteoblástica, capaces de sintetizar proteínas óseas como osteonectina u osteocalcina ^{53, 189, 220-222, 225}

- a partir de periostio: se han establecido cultivos de osteoblastos humanos obtenidos de periostio de huesos largos como fémur ²²⁶ o cúbito ²²⁷. Las muestras obtenidas son fragmentadas y mantenidas en medio de cultivo hasta que las células osteoblásticas inician su crecimiento a partir de los explantes de periostio. Estas células poseen la capacidad de diferenciarse en osteocitos y formar tejido óseo humano calcificado “in vitro” ²²⁶.

- a partir de hueso trabecular: El método original descrito por Beresford³¹ permite la obtención de células semejantes a osteoblastos humanos por crecimiento a partir de fragmentos de hueso trabecular adulto^{46, 53, 185-187, 212, 214, 228, 229}.

Una variación de esta técnica es el método utilizado por Marie²³⁰, en el que se produce una migración sobre una malla de nylon de las células proliferadas desde la superficie trabecular ósea. Con ello se evita la contaminación con células de la médula ósea al no adherirse éstas a la malla. Posteriormente esta malla es transferida a placas de cultivo y las células adheridas a la malla separadas mediante tripsina y posteriormente cultivadas hasta su confluencia.²³¹⁻²³⁶.

Además del método de Beresford, uno de los más utilizados es el método de Robey -Terminé²³⁷. El hueso trabecular humano obtenido para cultivo, una vez fragmentado, es sometido a una digestión secuencial con colagenasa. Con ello se evita la contaminación de células de la médula ósea (hematopoyéticas, adipocitos) así como del tejido conectivo (fibroblastos). Posteriormente, los fragmentos óseos son sembrados para el inicio del crecimiento celular^{2, 6, 24, 157, 190, 198, 220}.

- finalmente, otro método de obtención de cultivo de células con características osteoblásticas ha sido a partir de células aisladas tras pretratamiento con colagenasa^{220, 228, 237, 238}: En este caso se utilizan las células liberadas en el sobrenadante tras tratamiento de los explantes óseos con colagenasa. El problema reside en que podemos detectar en este cultivo la producción de colágeno tipo III, lo que es indicación de contaminación fibroblástica.

7.2.4. Cultivo de células osteoblásticas humanas modificadas

- Otro tipo de cultivos utilizados son las células HOBIT (human osteoblast-like initial transfectant). Esta es una línea celular establecida a partir de hueso trabecular humano adulto transferido con el plásmido pSV3neo, que incluye secuencias y promotores para los antígenos T del virus SV-40 (virus simio 40) ^{157, 239}. Aunque presentan características osteoblásticas, a diferencia de los osteoblastos humanos su proliferación es más rápida y no muestran actividad adenilato ciclasa en respuesta a tratamiento con PTH (1-34).

Otras líneas celulares similares son:

- FOB en la que el virus SV-40 se ha transferido a hueso trabecular fetal humano ¹⁵⁷.

- SV-HFO ⁹, derivada de calota humana inmortalizada con el virus SV-40. Al ser una línea inmortalizada, pierde parte de las características osteoblásticas, y tiene una naturaleza más mesenquimal, mostrando escasa actividad fosfatasa alcalina y mínima producción de osteocalcina.

7.3. APLICABILIDAD DE LOS CULTIVOS CELULARES DE OSTEOLASTOS HUMANOS

El sistema celular de osteoblastos humanos aislados de explantes trabeculares ha demostrado ser un modelo fiable y efectivo para el estudio de la regulación osteoblástica. Constituye un modelo válido para el análisis de las características de las

células osteoblásticas humanas y su capacidad osteogénica en relación con la formación ósea. En este sentido, constituye el único modelo experimental que permite estudiar el comportamiento de dichas células en condiciones semejantes al tejido óseo normal. Además, una de las ventajas de este método es la pequeña cantidad de material necesario para la obtención del cultivo celular. Las células óseas obtenidas de hueso trabecular humano muestran características osteoblásticas (actividad fosfatasa alcalina, síntesis de colágeno I, síntesis de osteocalcina, actividad AMPc tras estímulo con PTH). Su utilización permite un sistema experimental que puede ser utilizado para el estudio de las funciones osteoblásticas en condiciones normales y patológicas.

Los estudios iniciales realizados por Mills ²⁴⁰ demostraron la posibilidad de realizar cultivos celulares prolongados a partir de hueso obtenido de pacientes con enfermedad de Paget.

Posteriormente, y durante estos años, diversos estudios ^{231, 241, 242} han demostrado la utilidad de estos cultivos en la evaluación de la función osteoblástica, correlacionándose los resultados obtenidos en cultivos celulares “in vitro” con la actividad celular ósea “in vivo” a través del análisis de biopsias óseas. Estos estudios han sugerido que las células derivadas de hueso trabecular pueden ser de potencial interés para identificar un defecto celular o molecular en pacientes afectados de patologías óseas, permitiéndonos analizar las alteraciones a nivel celular responsables de un aumento o disminución de la formación ósea observada histológicamente.

Se han desarrollado diversos estudios “in vitro” utilizando osteoblastos humanos derivados de hueso trabecular para valorar las anomalías osteoblásticas asociadas con alteraciones de la formación ósea en diversas patologías óseas:

- En pacientes afectados de enfermedades óseas congénitas como osteogénesis imperfecta ²⁴², raquitismo resistente a vitamina D ²⁴³ e hiperfosfatasa ²⁴³ se observó que los cultivos de células óseas humanas obtenidos de ellos comparados con células de pacientes control permitían el estudio de defectos intrínsecos de la función osteoblástica.

- En pacientes con insuficiencia renal terminal que presentaban osteítis fibrosa y enfermedad ósea adinámica se observó que la tasa anormal de formación ósea, analizada mediante histomorfometría en biopsias de cresta ilíaca, se correlacionaba con una alteración paralela en la tasa de proliferación celular “in vitro” ^{1, 231, 232}.

- Otros estudios realizados en mujeres con osteoporosis postmenopáusica, hombres osteoporóticos eugonadales y pacientes con varias enfermedades óseas ^{231, 233-235} mostraron que la alteración de la formación ósea observada en estas enfermedades se asociaba con una anomalía concomitante en la proliferación celular “in vitro” de osteoblastos derivados de superficie ósea. Las correlaciones halladas entre los parámetros de replicación celular “in vitro” y los índices histomorfométricos de formación ósea sugieren que la reducción en la formación ósea en estas enfermedades óseas puede ser consecuencia de una menor actividad proliferativa de las células derivadas de la superficie celular.

Asimismo, otros estudios han demostrado que el aumento de formación ósea y de volumen de hueso trabecular, analizado por histomorfometría, inducido por fluoruro en pacientes osteoporóticos se correlaciona con un incremento “in vitro” de la proliferación de osteoblastos humanos obtenidos de hueso trabecular ²³⁶.

Los estudios “in vitro” disponibles demuestran que la capacidad proliferativa de los osteoblastos en cultivo refleja la tasa de formación ósea. De este modo, la monitorización de la replicación osteoblástica “in vitro” puede ser una vía funcional para valorar la formación ósea y determinar si su alteración en patología metabólica ósea es el resultado de una alteración en la capacidad proliferativa y/o de síntesis de los osteoblastos.

El desarrollo de estos estudios comparando el comportamiento de células osteoblásticas humanas “in vitro” y formación ósea sugiere que los cultivos de osteoblastos pueden ser una interesante aproximación al estudio de otras anormalidades adquiridas de la formación ósea como es la osteoporosis inducida por glucocorticoides, al permitirnos valorar la función osteoblástica en pacientes sometidos a este tratamiento.

La utilización de cultivo de osteoblastos humanos permite el análisis de los efectos de los glucocorticoides “in vitro”, en condiciones similares a “in vivo”, evitando las diferencias en el comportamiento celular observadas en cultivos obtenidos de animales, debido a las diferentes respuestas observadas entre especies, o en cultivos de líneas tumorales, que pueden responder de forma anormal a hormonas o factores de crecimiento como consecuencia de su transformación tumoral.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue estudiar el efecto de los glucocorticoides, a distintas concentraciones y tiempos de exposición, sobre la proliferación y la función celular de osteoblastos humanos “in vitro” para analizar los mecanismos celulares de la osteoporosis inducida por glucocorticoides.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.1. Establecer el cultivo de células osteoblásticas a partir de fragmentos de hueso trabecular humano.

2.2. Analizar los efectos de distintas concentraciones y tiempos de exposición de glucocorticoides en cultivo de osteoblastos humanos.

Este objetivo se concretó en dos aspectos:

2.2.1. Determinar el efecto de los glucocorticoides sobre la proliferación celular de osteoblastos humanos a través de la síntesis de DNA por la incorporación de timidina marcada.

2.2.2. Analizar la influencia del tratamiento con glucocorticoides en la función celular de osteoblastos humanos, valorada mediante la síntesis de colágeno I.

La síntesis de colágeno tipo I fue valorada mediante:

2.2.2.1. La determinación de la síntesis de procolágeno tipo I intracelular, por técnica de inmunoperoxidasa.

2.2.2.2. La secreción de los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno tipo I en el sobrenadante de los cultivos, por técnica de radioinmunoanálisis.

MATERIAL Y METODOS

1. CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS

1.1. MATERIAL PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO

Para la preparación de los reactivos así como para el procesamiento de las muestras y la obtención y el mantenimiento del cultivo celular es necesario trabajar siempre en condiciones estériles, utilizando material de protección esterilizado desechable (guantes, bata, mascarilla) y realizando el procedimiento en campana de flujo laminar para evitar el riesgo de contaminación. Se trabajó en el laboratorio de Inmunología utilizando campana de flujo laminar vertical, previa exposición a radiación ultravioleta durante 5 minutos, cada vez que se iniciaba su utilización, para asegurar la realización del proceso en condiciones estériles. Durante la preparación de los diferentes reactivos así como del cultivo celular se utilizaba hipoclorito sódico como desinfectante de superficies para mantener las condiciones de asepsia.

1.1.1. Instrumental

El instrumental utilizado para la preparación de los reactivos fue, principalmente, de vidrio, debiendo utilizarse siempre previamente esterilizado. Utilizamos pipetas serológicas estériles de vidrio (CORNING) de 5, 10 y 25 ml y

pipetas Pasteur (230 x 7 mm) para la preparación de los reactivos y el mantenimiento del cultivo. Para la preparación de diluciones se emplearon jeringas estériles de 50 ml (3 cuerpo luer lock) y filtros millipore steril 0.22 μm (Millex-GS SLGS 025 BS, MILLIPORE).

1.1.2. Reactivos

Los reactivos utilizados son específicos para la realización de cultivos celulares y previamente han sido sometidos a diferentes tests para excluir cualquier posible agente infeccioso, como bacterias, virus o micoplasma, que pudiera contaminar el cultivo celular. Los medios de cultivo utilizados ²⁴⁴⁻²⁴⁷ se hallan formados fundamentalmente por (Anexo 1):

- sales inorgánicas (Earle's balanced salt solutions), entre las que destaca el bicarbonato. Su presencia es necesaria debido a sus beneficios nutricionales sobre el metabolismo celular y a que es requerido por la mayoría de líneas celulares de mamíferos.

- glucosa, como nutriente básico.

- aminoácidos (AA) esenciales y no esenciales, requeridos para el crecimiento celular. Aunque, a diferencia de los AA esenciales, la célula sea capaz de sintetizar los AA no esenciales, éstos suelen añadirse igualmente para compensar la incapacidad celular de sintetizarlos en suficiente cantidad o bien su difusión en el medio de cultivo.

- vitaminas

Además de estos componentes básicos, los medios de cultivo pueden contener otros compuestos adicionales como:

- metales: Cu, Zn, Fe, necesarios para el metabolismo celular.
- tampones: necesarios para equilibrar el pH del medio. El bicarbonato tiene una reducida capacidad de tamponamiento a pH fisiológico y su presencia puede influir en los cambios de pH. Es necesario la adición de otro compuesto al medio de cultivo como HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulphonic Acid) el cual proporciona un tamponamiento adicional manteniendo un control de pH entre 7.2 y 7.6, evitando las fluctuaciones de pH debidas a cambios en el metabolismo celular y en el medio ambiente del cultivo que podrían interferir en el crecimiento celular al inhibirlo. Es el tampón mayormente utilizado para estabilizar el pH pues no tiene las limitaciones o toxicidad de otros, como es el caso del bicarbonato o Tris, respectivamente.

- indicadores, como el rojo fenol.

Una vez constituido el medio de cultivo éste suele estar suplementado por varios compuestos como:

- albúmina (suero bovino fetal)
- factores de crecimiento como insulina-transferrina-selenio
- ácido ascórbico, necesario para la síntesis de colágeno
- antibióticos, como gentamicina. La gentamicina es un antibiótico que se utiliza en cultivos celulares debido a su ausencia de toxicidad celular y a su amplio espectro, con cobertura de bacterias grampositivas y gramnegativas así como actividad

antimicoplasma. A diferencia de la combinación penicilina/ estreptomicina (PS), utilizada también como antibiótico en cultivos celulares, la gentamicina es activa también contra Pseudomonas y contra cadenas de Proteus y Estafilococos que pueden ser resistentes a PS. Asimismo, la gentamicina se mantiene estable en el medio de cultivo a 37° C aunque haya variaciones de pH (rango: 2-10), mientras que la penicilina y la estreptomicina a pH ácidos o alcalinos son inadecuadas o se destruyen. La gentamicina se utiliza en concentración: 5-50 µg/ml y su estabilidad en medio de cultivo a 37° C son 5 días. Su actividad no se altera por la presencia de suero en el medio de cultivo, mientras que la penicilina ve reducida el 30 % de su actividad cuando se añade a un medio de cultivo que contiene suero.

1.1.2.1. Preparación de los reactivos

Seguidamente se detalla el procedimiento realizado para la preparación de los diferentes reactivos utilizados en el procesamiento y mantenimiento del cultivo celular de osteoblastos humanos:

1.1.2.1.1. Reactivos del cultivo de osteoblastos humanos

- Medios de cultivo:

- Medio 1: En un frasco de 500 ml, previamente esterilizado en autoclave, añadir 250 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X), con 4500 mg/l de glucosa, 25 mM HEPES, bicarbonato y glutamina, sin piruvato sódico; con rojo fenol)²⁴⁴ de GIBCO, 250 ml de HAM F-12 (Nutrient mixture Ham's Fórmula-

12 (1X), con glutamina y bicarbonato)²⁴⁵ de GIBCO, 100 ml de suero bovino fetal (FBS) (al 20 %), previamente descomplementado, 1 ml de la dilución de insulina-transferrina-selenio, 5 ml de la dilución de ácido ascórbico, previamente descongelada, y 0.5 ml de sulfato de gentamicina. Se mantiene en nevera, a 4° C, con parafilm, cubierto de betaplate.

- Medio 2: En frasco de 500 ml, autoclavado, añadir 250 ml de DMEM, 250 ml de HAM F-12 y 0.5 ml de sulfato de gentamicina. Se guarda en nevera, a 4° C, con parafilm, cubierto de betaplate.

- Medio 3: En frasco de 500 ml, autoclavado, añadir 250 ml de DMEM, 250 ml de HAM F-12, 50 ml de FBS (al 10 %), previamente descomplementado, 1 ml de la dilución de insulina-transferrina-selenio, 5 ml de l-glutamina, previamente descongelada, 5 ml de la dilución de ácido ascórbico y 0.5 ml de sulfato de gentamicina. Guardar en nevera, a 4° C, con parafilm, cubierto de betaplate.

- Medio 4: En frasco de 500 ml, autoclavado, añadir 250 ml de DMEM, 250 ml de HAM F-12, 1 ml de la dilución de insulina-transferrina-selenio, 5 ml de l-glutamina, 25 ml de la dilución de ácido ascórbico y 0.5 ml de sulfato de gentamicina. Guardar en nevera, a 4° C, con parafilm, cubierto de betaplate.

- MEM: (Minimum Essential Medium) (Eagle MEM)²⁴⁶, de GIBCO. Suplementado con FBS al 2 %, l-glutamina, gentamicina y anfotericina B. Guardar en nevera a 4° C.

- Suero bovino fetal (FBS sterile for cell culture), botellas de 500 ml de ICN. Previamente a su utilización se ha de descomplementar. Para ello, se ha de descongelar la botella que contiene el FBS manteniéndola a temperatura ambiente. Seguidamente, el FBS se calienta a 56° C, al baño María, manteniéndolo durante 30 minutos, con agitación intermitente. Aliquotar en tubos de 50 ml y cubrir con parafilm. Guardar en congelador a -20° C para su utilización, apuntando el n° de categoría, el n° de lote y la fecha de preparación.

- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), botella de 100 ml (10X) de GIBCO, sin bicarbonato sódico. Repartir los 100 ml de HBSS (10X), en 2 botellas autoclavadas de 500 ml (50 ml/ botella). Añadir 450 ml de agua bidestilada (MEIN) autoclavada en cada botella. Guardar en nevera a 4° C, con identificación y fecha, cubierto con parafilm.

- Insulina-transferrina-selenio (ITS), vial con 25 mg de insulina, 25 mg de transferrina y 25 µg de selenio, de SIGMA. Añadir 10 ml de HBSS (1X) en el vial y disolver bien. Guardar en nevera a 4° C, cubierto con parafilm.

- Ácido ascórbico (L-ascorbic acid, sodium salt), 25 g de SIGMA. Pesar 100 mg de ácido ascórbico en balanza de precisión con betaplate y colocarlos en botella estéril con 100 ml de HBSS (1X). Filtrar la solución con jeringa estéril de 50 ml y filtros millipore y aliquotar en tubos estériles de 15 ml (NUNC), con 5 ml/ tubo (5000 µg/ tubo). Cubrir con betaplate y congelar a -20° C.

- Sulfato de gentamicina, vial 80 mg de BRAUN. Se utiliza pura. Guardar en nevera a 4° C.

3. MATERIAL Y METODOS

- L-glutamina, botella de 100 ml (100X) 200 mM (29.2 mg/ml), de GIBCO. Se utiliza sin diluir. Aliquotar en tubos estériles (NUNC), 5 ml/ tubo y guardar en congelador a -20° C.

- Colagenasa tipo V, 100 mg, de SIGMA. Mantener en congelador a -20° C. Debe permanecer a temperatura ambiente antes de utilizarla. Poner 90 ml de medio de cultivo DMEM/ HAM F-12 sin suero (medio 2) en botella autoclavada de 100 ml. Añadir los 100 mg de colagenasa previamente diluidos en 10 ml de medio 2. Disolver bien y hacer aliquots de 5 ml (concentración 1 mg/ml). Guardar en congelador a -20° C.

- Tripsina-EDTA, Tripsina liquid 2.5% (1:250) (25g/l) (10X) 20 ml de GIBCO y EDTA 100 g de SIGMA. Se prepara solución de tripsina 0.025 % y EDTA 0.5 %. Disolver 0.5 g de EDTA en 100 ml de agua bidestilada. Utilizar agitador magnético en platina rotatoria y añadir NaOH hasta que su pH sea de 8. Autoclavar. Retirar 1 ml de la solución de EDTA 0.5 % y añadir 1 ml de tripsina pura 2.5 %, previamente descongelada. Aliquotar en tubos de 1 ml y congelar a -20° C. Se utiliza para la disociación de células en monocapa ya que permite la separación celular de forma efectiva manteniendo su viabilidad.

- Azul Trypan: 0.4 %, de GIBCO. Preparado en solución salina 0.85 %. Guardar a temperatura ambiente. Se utiliza para valorar la viabilidad celular, mostrando las células muertas una tinción positiva con azul Trypan.

- Ácido α -naftilfosfato, monosodium salt. 1 gr, de SIGMA.

- Tris HCl: Trizma base 100 g de SIGMA. Disolver 6 g de Trizma base en 500 ml de agua bidestilada. Agitar bien. Ajustar pH con pHmetro añadiendo HCl hasta que el pH final de la solución sea de 10. Guardar a temperatura ambiente.

- Fast Blue RR salt crystalline, 5 g, de SIGMA.

- Anfotericina B (Fungizona) viales 50 mg. Se utiliza a concentración de 0.25 – 2.5 µg/ ml. Disolver el vial de 50 mg con 10 ml de agua bidestilada filtrada. Aliquotar en 40 tubos Eppendorf con 0.25 ml/ tubo (= 1.25 mg de anfotericina B/ tubo). Cubrir con betaplate y guardar a -20° C. Se utiliza 1 tubo por cada frasco de medio de cultivo, obteniendo una concentración final de 0.0025 mg/ ml = 2.5 µg/ml. Es activa contra hongos y levaduras y su estabilidad en medio de cultivo a 37° C es de 3 días.

1.1.2.1.2. Reactivos del ensayo experimental

- Dexametasona water soluble 100 mg, de SIGMA. (Peso molecular: 392.5). Añadir 5 ml de agua bidestilada filtrada al vial de dexametasona (DEX), obteniendo una concentración de DEX de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Disolver 0.5 ml de esta solución en 49.5 ml de medio 4, obteniendo una concentración final de DEX de $5 \cdot 10^{-4}$ M. A partir de esta solución se preparan las dos soluciones que se utilizarán en el ensayo experimental:

- $3 \cdot 10^{-6}$ M. Añadir 300 L de solución $5 \cdot 10^{-4}$ M en 50 ml de medio 4.

- $3 \cdot 10^{-7}$ M. Añadir 30 L de solución $5 \cdot 10^{-4}$ M en 50 ml de medio 4.

Las concentraciones de DEX han de ser (3X) ya que en cada pocillo (300 L) se añade una cantidad de solución de DEX de 100 L.

- Medio suplementado con vitamina D: Para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina se suplementó el medio de cultivo con la adición de 1, 25 (OH)₂ vitamina D₃. Vial disuelto en etanol 100 % a concentración de 10⁻⁴ M, conteniendo 1.007 mg de 1alfa, 25-dihidrocolecalfiferol (Peso molecular: 416.65). Esta vitamina no se halla comercializada para su utilización en cultivos celulares, y fue cedida por los Drs. U. Fischer y P. Weber, de F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suiza. Guardar cubierta de betaplate a -20° C. Se utiliza a concentración final de 10⁻⁸ M.

- RPMI 1640 500 ml ²⁴⁵, de GIBCO. Suplementado con FBS, l-glutamina y gentamicina. Guardar en nevera a 4° C.

- 3,3'-Diaminobenzidine (3,3', 4,4'-tetraaminobiphenil) (DAB), 100 mg, SIGMA.

1.2. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y OBTENCION DE PIEZAS OSEAS

El cultivo celular de osteoblastos humanos se estableció a partir de hueso trabecular humano obtenido de pacientes sometidos a intervención quirúrgica, en el Quirófano de Cirugía Ortopédica, para colocación de una prótesis articular, en la mayoría de los casos de cadera. Las muestras fueron obtenidas de acuerdo con el proceso aprobado por el comité ético de la Institución. La utilización de los fragmentos óseos para el estudio experimental se realizó previo consentimiento de la intervención quirúrgica (Anexo 2).

Este material se obtuvo de los fragmentos de cabeza femoral que son resecados mediante broca perforada según instrumental de Müller para la colocación de la prótesis y que son remitidos habitualmente al Servicio de Anatomía Patológica para su análisis. El tamaño aproximado de las piezas óseas fue de 1 cm. de diámetro y 2 cm. de altura. En ningún caso la utilización de dichos fragmentos modificó la intervención quirúrgica ni interfirió en el estudio anatomopatológico. Asimismo, se excluyeron aquellos pacientes con sospecha clínica de osteoporosis a partir de un análisis de factores de riesgo para esta enfermedad (Anexo 3).

1.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tejido óseo obtenido fue colocado en tubo estéril de 50 ml con medio de cultivo nº 2 (DMEM/ HAM F-12 1:1), manteniéndose a 4° C hasta su utilización, en las primeras 24 horas de la intervención. La obtención del cultivo de osteoblastos humanos se realizó siguiendo una modificación del método de Robey -Terminé²³⁷.

La muestra ósea obtenida fue lavada repetidamente con medio de cultivo nº 2 para eliminar los restos hemáticos y, seguidamente, fragmentada mediante la utilización de tijeras rectas y posteriormente bisturí, en partículas de 2 mm² después de haber retirado la envoltura cortical.

Las partículas trabeculares fueron colocadas en frasco estéril para ser digeridas con dilución de colagenasa tipo V (1 mg/ ml) en estufa a 37° C, durante 60 minutos, con rotación permanente mediante colocación de barra imantada en el frasco estéril y soporte de platina rotatoria, manteniéndola a velocidad media (nº 5). Seguidamente, el

sobrenadante fue aspirado y los fragmentos óseos cubiertos con una nueva dilución de colagenasa según el procedimiento anteriormente descrito.

Después de la tercera digestión con colagenasa, se lavaron las piezas óseas con HBSS 20 ml x 2 veces para eliminar la colagenasa y posteriormente con medio de cultivo n° 3 (DMEM/ HAM F-12 1:1 con 10 % de FBS), 25 ml x 2 veces. Los fragmentos óseos se sembraron en placas de cultivo con tapa, de 90 mm de diámetro (NUNC) (área: 63.6 cm²), con 15 ml. de medio de cultivo n° 1 (DMEM/ HAM F-12 1:1 suplementado con suero bovino fetal al 20 %, mezcla de insulina-transferrina-selenio (ITS) disuelta en Hank's buffered solution (HBSS) con una concentración final de 1 %, ácido ascórbico 10 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml). El cultivo se mantuvo a temperatura constante en estufa a 37° C en una atmósfera humidificada (95 %) con una concentración de 95 % O₂ y 5 % CO₂.

1.4. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

El medio de cultivo, suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 20 %, (medio n° 1) se cambió cada 48 horas hasta el inicio del crecimiento celular, mediante pipeta Pasteur evitando el desplazamiento de los fragmentos óseos. Tras la aparición de células, la concentración de FBS del medio de cultivo se redujo al 10 %, añadiéndose l-glutamina 2 mM (medio n° 3), y manteniéndose la concentración inicial de ácido ascórbico, ITS y gentamicina hasta que las células fueron confluentes.

1.5. TRIPSINIZACION Y RECUENTO CELULAR

Tras alcanzar la confluencia, las células se mantuvieron en cultivo durante veinticuatro horas con DMEM/ HAM F-12 1:1 sin suero bovino fetal (medio nº 4). Seguidamente se incubaron con 10 ml de solución de EDTA 0.5% / tripsina 0.025% disuelta en HBSS, durante 4 minutos a 37° C, añadiéndose posteriormente 10 ml de medio de cultivo con 10 % de FBS para parar la reacción (medio nº 3). Tras la tripsinización, las células óseas se despegaron del frasco de cultivo con "cell scraper" (COSTAR) centrifugándose el sobrenadante del cultivo a 1000 rpm durante 10 minutos a 20° C y decantándose posteriormente conservando sólo el "pellet" celular.

El "pellet" obtenido se resuspendió en 1 ml de medio (DMEM/ HAM F-12) sin suero (medio nº 4). De dicha solución se tomaron 10 L para la realización del recuento celular en cámara de contaje (Neubauer), valorándose el nº de células al microscopio óptico (10 aumentos). El nº total de células se obtuvo según la fórmula:

$$\underline{\text{Nº cél totales}} = \text{recuento celular} \times 10 / \text{nº campos contados} \times 10^{-4}$$

Asimismo se estudio la viabilidad celular mediante la tinción con azul Trypan:

$$\underline{\text{Viabilidad}} = \text{nº cél vivas (no teñidas)} / \text{nº cél totales (\%)}$$

2. ENSAYO EXPERIMENTAL

2.1. CARACTERIZACION CELULAR

Previamente al ensayo experimental, las células obtenidas de cada cultivo de hueso trabecular se sembraron en portas con cámara (“chamber slides” con 16 pocillos, de NUNC) para determinar la actividad fosfatasa alcalina (FA) que confirma su fenotipo osteoblástico. La determinación de la actividad FA se realizó por método citoquímico²⁴⁶ utilizando ácido α -naftilfosfato como sustrato para la reacción enzimática de la fosfatasa, a pH alcalino, y una sal de diazonio (Fast Blue RR) como revelador de la reacción colorimétrica.

Las células sembradas se incubaron a 37° C durante 72 horas con medio de cultivo DMEM/ HAM F-12 suplementado con 1,25 vitamina D₃ 10⁻⁸ M, para estimular la síntesis de FA, 100 μ g/ml de ácido ascórbico y antibióticos. Posteriormente, las células en cultivo se lavaron dos veces con 2 ml de HBSS y a continuación se fijaron con 2 ml de metanol / acetona (1:1) durante 5 minutos a 4° C.

Seguidamente se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de ácido α -naftilfosfato al 0.1% en buffer Tris HCl 0.1 M con pH 10, al que se había añadido 0.1% de Fast Blue RR para contrastar. Lavado y montaje en glicerina.

Las células que presentaban actividad fosfatasa alcalina se identificaron por microscopía óptica presentando una tinción positiva. Los resultados se expresaron en porcentaje de células teñidas respecto al total de células, por pocillo.

Como control del cultivo de osteoblastos se utilizó el cultivo de fibroblastos humanos (células MRC-5) para comparar la morfología y características bioquímicas respecto al cultivo de osteoblastos.

Los fibroblastos humanos fueron cultivados en medio MEM suplementado con 2% FBS, glutamina, gentamicina y anfotericina B. Una vez confluentes, se realizó la tripsinización celular, y las células se sembraron en portas con cámara con medio de cultivo a 37° C. Se mantuvieron en cultivo durante 72 h y, posteriormente, fueron fijadas con metanol / acetona para valorar su actividad FA.

2.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Tras su caracterización celular como osteoblastos humanos, las células obtenidas de cada pieza ósea se sembraron en placas de 96 pocillos con tapa (NUNC), o bien en portas con cámara de 16 pocillos (NUNC) a una densidad de 2×10^4 células / cm², siendo el área de cada pocillo 0.328 cm², para la realización del ensayo experimental.

2.2.1. Tratamiento de las células

Se establecieron tres grupos de estudio:

- Control: cultivo de osteoblastos humanos en medio de cultivo (n° 4) libre de glucocorticoides para valorar su proliferación celular y síntesis proteica en condiciones basales.

- Estudio: cultivo de osteoblastos humanos en medio de cultivo con adición de glucocorticoides (dexametasona) a distintas concentraciones suprafisiológicas:
 - grupo estudio 1: incubación de osteoblastos humanos con dexametasona a concentración 10^{-6} M.

 - grupo estudio 2: incubación de osteoblastos humanos con dexametasona a concentración 10^{-7} M.

2.2.2. Ensayo experimental

El ensayo experimental se subdividió con el fin de analizar los efectos de los glucocorticoides sobre la proliferación y función celular de osteoblastos humanos:

- A. Estudio de la proliferación celular, a través de la síntesis de DNA por la incorporación de timidina tritiada.

- B. Estudio de la función celular, valorado a través de la síntesis de colágeno I.

La síntesis de colágeno I fue valorada mediante:

B.1. La síntesis de procolágeno tipo I intracelular por técnica de inmunocitoquímica.

B.2. La secreción de los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno tipo I (PINP y PICP) en el sobrenadante de los cultivos mediante su cuantificación por técnica de radioinmunoanálisis.

Cada parte del ensayo experimental (A, B1, B2) se realizó, al menos, por duplicado en cada uno de los grupos estudio y control de las muestras óseas obtenidas. Los parámetros estudiados se determinaron a las 24 y 48 horas del inicio del ensayo experimental.

2.3. ESTUDIO DE LA PROLIFERACION CELULAR

El estudio de la proliferación celular se determinó de forma indirecta a través de la síntesis de DNA por la incorporación de timidina marcada ²⁴⁸. Los cultivos de osteoblastos humanos fueron sembrados en placas de 96 pocillos a densidad de 2×10^4 cél/ cm², y cultivados con y sin adición de glucocorticoides. Se añadió 1.25 µCi de timidina tritiada en cada pocillo durante las doce últimas horas del tiempo de incubación establecido (24 ó 48 horas) para inferir la síntesis de DNA.

Esta medición se realizó fijando los núcleos en papel de Betaplate previa lisis celular en Cell Harvester (1295-001 Wallac). Se determinó la cantidad de [³H]-timidina incorporada al material precipitable de ácido tricloroacético en medidor de centelleo Betaplate 1205 (Wallac). Los resultados finales se expresaron en nº de cuentas por minuto (cpm) por pocillo. El estudio de la proliferación celular mediante isótopos radiactivos se realizó en el Laboratorio de Inmunología.

2.4. DETERMINACION DE LA SINTESIS DE PROCOLAGENO I INTRACELULAR

El estudio de la función celular se realizó mediante la determinación de la síntesis de procolágeno tipo I intracelular por técnica de inmunoperoxidasa. Una vez confluentes, las células se tripsinizaron y sembraron en portas con cámara (“chamber-slides”) a una densidad de 2×10^4 cél /cm², y fueron incubadas en el medio de cultivo con y sin adición de dexametasona, durante 24 ó 48 horas. Una vez finalizada la incubación, las células se lavaron con HBSS y, posteriormente, fueron fijadas con metanol / acetona (1:1) para la determinación de procolágeno I por técnica de inmunocitoquímica.

Técnica de inmunocitoquímica: Las células fijadas se hidrataron con HBSS y se colocaron en cámara húmeda para su incubación con un anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti fracción aminoterminal de procolágeno I, en nevera a 4° C durante una noche.

. Obtención del anticuerpo monoclonal: Este Ac monoclonal fue obtenido a partir de la purificación del sobrenadante de la línea celular SP1-D8, hibridoma murino cedido por la Dra. C. Frondoza (Department of Orthopaedic Research, Johns Hopkins Medical Institution, Baltimore, USA), que fue mantenida en cultivo con RPMI 1640 suplementado con FBS, l-glutamina y gentamicina. La purificación del Ac monoclonal IgG1 se realizó a partir del sobrenadante de la línea celular SP1-D8 con columna de afinidad Protein G HiTrap Column (Amersham Biosciences). Se utilizaron 4 tampones diferentes: tampón de inicio (fosfato disódico 20 mM pH 7.0), tampón de elución (glicina 0.1 M pH 2.7), tampón de equilibrado (fosfato disódico 1 M pH 9.0) y tampón de conservación (fosfato disódico 20 mM pH 7.0 con 0.01% de azida sódica). Se realizó lavado y equilibrado de la columna de afinidad con 6 volúmenes de tampón de inicio. Se pasó el sobrenadante de la línea celular lentamente por la columna y se realizaron lavados con 5 volúmenes de tampón de inicio hasta que la densidad óptica a 280 nM fue nula. Se diluyó con tampón de elución hasta que la absorbancia de las fracciones fue cero. Se recogieron las fracciones de 3 ml con 10 % del volumen total de tampón de equilibrado para tamponar la muestra. La concentración de la dilución se midió en el espectrofotómetro, siendo la máxima concentración de la dilución de 0.850 UDO, que corresponde a una concentración de anticuerpo de 0.60 mg/ml. La concentración final de anticuerpo monoclonal en la técnica de inmunocitoquímica fue de 60 µg/ml.

Una vez incubadas las células con el anticuerpo monoclonal IgG1 se aplicó sobre este anticuerpo primario, previo lavado con HBSS para eliminar el anticuerpo no fijado, un anticuerpo secundario biotinilado que forma parte de un kit comercial (ABC

kit IgG de ratón, PK 4002 de Lab. VECTOR) manteniéndolo en cámara húmeda cubierta durante 30 minutos a temperatura ambiente. Basándose en la extraordinaria afinidad entre biotina y avidina (k afinidad $> 10^{15} \text{ M}^{-1}$) se aplicó, sobre este anticuerpo secundario un conjugado covalente de avidina con una enzima (complejo avidina-biotina-peroxidasa) ²⁴⁹ que permite la fijación de peroxidasa al anticuerpo secundario. Las células fueron lavadas con HBSS para eliminar el anticuerpo secundario no fijado, e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con peróxido de hidrógeno como sustrato de la reacción de inmunoperoxidasa, utilizándose clorhidrato de níquel como intensificador de sustrato y diaminobenzidina (DAB) para la reacción colorimétrica. Lavado y secado a temperatura ambiente. Finalmente las preparaciones se incluyeron en glicerina y se analizaron de forma cualitativa al microscopio óptico identificándose las células que presentaban una tinción positiva. Los resultados se expresaron en porcentaje de células teñidas respecto al total de células, por pocillo.

Como control negativo de la inmunotinción, se utilizó un anticuerpo IgG irrelevante, el anticuerpo monoclonal de ratón antiCD3 (antilinfocito), dilución 1/500, como anticuerpo primario en lugar del anticuerpo antiprocólágeno I, para obviar una posible unión inespecífica de la fracción ab.

2.5. ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE LOS PROPEPTIDOS AMINO Y CARBOXITERMINAL DEL PROCOLÁGENO I: PINP Y PICP EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se determinaron las concentraciones de los propéptidos amino y carboxiterminal del procólágeno tipo I, PINP y PICP respectivamente, en los

sobrenadantes de los cultivos de osteoblastos humanos tratados con y sin adición de glucocorticoides. La determinación de ambos resultados se realizó en el Servicio de Bioquímica del Hospital Clínic, por técnica de radioinmunoanálisis.

Al igual que en los estudios anteriores, una vez las células fueron confluentes se tripsinizaron y se sembraron en placas de 96 pocillos o en “chamber slides” a densidad de 2×10^4 cél /cm² y fueron incubadas en el medio de cultivo con y sin adición de dexametasona a dos concentraciones: 10^{-6} M y 10^{-7} M. El sobrenadante de cada pocillo fue aspirado a las 24 ó 48 horas de incubación y mantenido a -70° C.

Al final de los ensayos experimentales se procesaron los sobrenadantes para la cuantificación de PICP y PINP intacto, utilizando los kits de Orion Diagnostica (Espoo, Finlandia). El antisuero PICP reacciona con un propéptido-C trimérico del procolágeno I, el cual contiene ambas cadenas pro-alfa 1 y pro-alfa 2, mientras que el antisuero PINP reacciona con el principal dominio globular aminoterminal de las cadenas pro-alfa 1 del propéptido-N del procolágeno I.

Al realizar las determinaciones se utilizó una saturación secuencial para aumentar la sensibilidad de la técnica en lugar de las condiciones de equilibrio habitualmente recomendadas para las determinaciones séricas. Los resultados se expresaron en ng/ml.

Asimismo, y dado que ambos propéptidos, PINP y PICP, son sintetizados en concentración equimolar (relación 1:1), se analizó la correlación existente entre ellos en el sobrenadante de los cultivos, así como la correlación entre la síntesis de procolágeno I intracelular y cada uno de estos propéptidos, PINP y PICP.

3. ESTUDIO ESTADISTICO

Los resultados de las distintas variables se introdujeron en una matriz de datos para el análisis estadístico. Se analizaron las diferencias entre los pacientes y la relación con la edad y el sexo. Además, se valoró la influencia de la administración de glucocorticoides, la dosis administrada y el tiempo de exposición. El estudio incluyó también el análisis de la correlación existente entre la síntesis intracelular de procolágeno tipo I y los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno I determinados en el sobrenadante de los cultivos. En la Tabla 2 se resumen las distintas variables analizadas.

Para analizar las diferencias entre pacientes se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para comparar las medias de las variables cuantitativas continuas se empleó la "U" de Mann-Whitney. Las diferencias de los resultados de los cultivos celulares tratados y no tratados con glucocorticoides se valoraron utilizando el test de Wilcoxon. La correlación entre la inmunorreactividad para procolágeno I y los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno I se estudió mediante el análisis de regresión lineal.

Los resultados se expresan como media \pm error standard de la media (ES). Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático SPSS (versión 10.0).

TABLA 2. VARIABLES ANALIZADAS EN EL ESTUDIO ESTADISTICO

Parámetros Variables	SINTESIS DNA	PROCOLAGENO I	PINP	PICP
Edad: < 65 a > 65 a	X	X	X	X
Sexo: H M	X	X	X	X
Concentración de glucocorticoides:				
- basal	X	X	X	X
- 10 ⁻⁶ M	X	X	X	X
- 10 ⁻⁷ M	X	X	X	X
Tiempo de incubación:				
- 24 h	X	X	X	X
- 48 h	X	X	X	X

La Tabla 2 resume los distintos datos analizados en el estudio estadístico. En abscisas se describen los distintos parámetros determinados en los cultivos de osteoblastos humanos, y en ordenadas las diversas variables en relación a las que se analizaron los cultivos celulares. Los análisis realizados se expresan mediante x.

RESULTADOS

1 CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS

1.1. OBTENCION DE PIEZAS OSEAS. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se obtuvieron 22 piezas óseas de 21 pacientes, 13 hombres y 8 mujeres, mediante broca perforada según instrumental de Müller en el quirófano de Cirugía Ortopédica. La edad media de los hombres fue 63.3 años (rango: 48-72) y la de mujeres 67.8 años (rango: 28-79). En 21 casos las piezas óseas procedían de cabeza femoral y en 1 caso de cóndilo femoral. Sus características se resumen en la Tabla 3.

1.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Cada muestra obtenida fue procesada según el método modificado de Robey-Termine²³⁷, obteniéndose en todas ellas el cultivo de osteoblastos humanos. En casi todos los pacientes el cultivo se obtuvo por duplicado, 2 líneas celulares de cada fragmento óseo, con características morfológicas y bioquímicas de osteoblastos humanos.

El inicio del crecimiento celular se produjo, en la mayoría de los cultivos, a los 5-7 días de su procesamiento. Estas células suelen emerger alrededor de los fragmentos óseos, aunque también se observan aisladas. Aunque inicialmente las células presentan un aspecto alargado, conforme avanza el crecimiento celular su aspecto se hace más poligonal y estrellado, con un solo núcleo y uno o varios nucleolos, y múltiples prolongaciones citoplasmáticas que permiten contactar con otras células. (Figura 3)

La confluencia celular al 100 % se alcanzó en 3-4 semanas. En ningún caso se observó contaminación por fibroblastos.

Como complicaciones cabe destacar contaminación fúngica de los cultivos 6, 7, 11 y 15, hecho que obligó a la suspensión de dichos cultivos y a la adición al medio de cultivo de anfotericina B, fármaco que no interfiere el cultivo celular. Asimismo, los cultivos 5, 9, 10, 19, 20 y 22 se suspendieron por sospecha de contaminación (cambio de pH, disminución del crecimiento celular), aunque el cultivo microbiológico del sobrenadante resultó negativo.

TABLA 3. CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS

Nº muestra	Patología	Sexo	Edad
1	Coxartrosis D	H	53
2	Coxopatía D	M	28
3	Coxartrosis I	H	66
4	Coxartrosis D	H	67
5	Coxartrosis I	H	65
6	Coxopatía D	M	74
7	Gonartrosis D	M	67
8	Coxartrosis D	H	66
9	Coxopatía I	M	74
10	Coxopatía D	H	52
11	Coxopatía I	M	28
12	Coxartrosis D	M	77
13	Coxartrosis I	H	72
14	Coxartrosis I	H	70
15	Coxartrosis D	M	79
16	Coxartrosis D	H	48
17	Coxartrosis I	M	77
18	Coxartrosis I	H	66
19	Coxartrosis I	H	61
20	Coxartrosis I	H	69
21	Coxartrosis I	H	68
22	Coxartrosis I	M	67

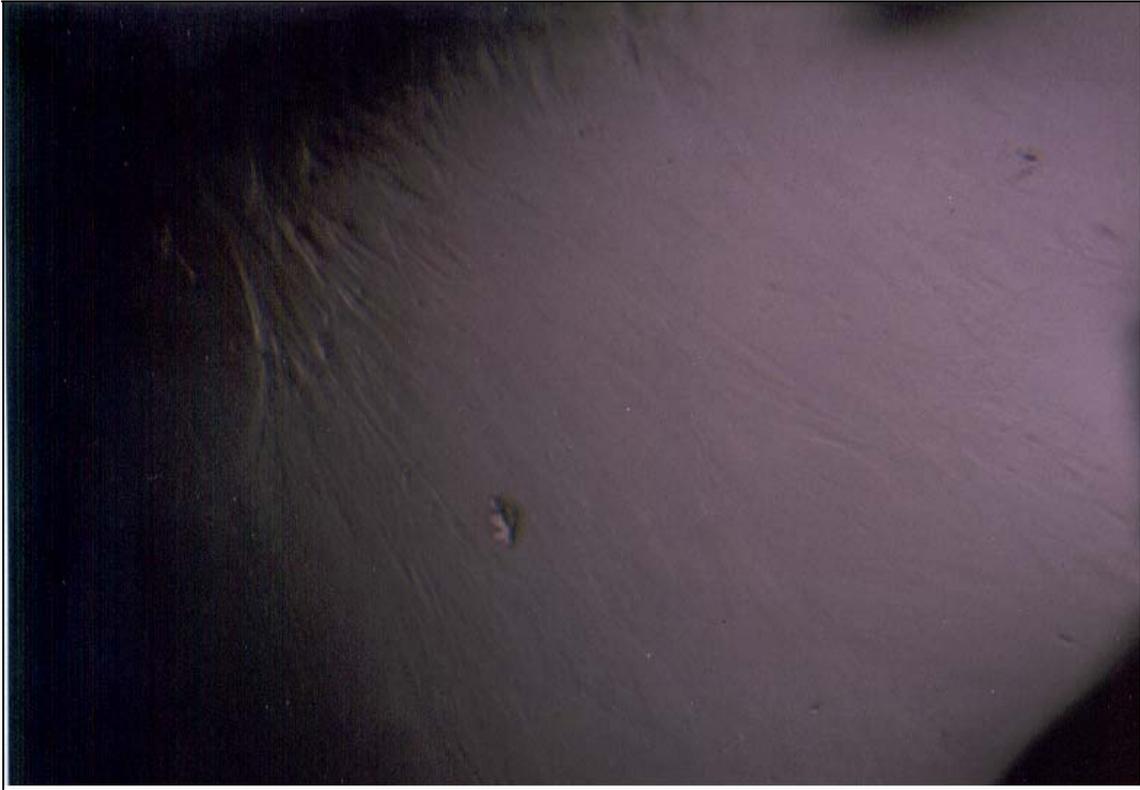


Figura 3 A. Cultivo de células osteoblásticas humanas obtenido a partir de explantes óseos. (Microscopia contraste de fases x 100)



Figura 3.B. Cultivo de células osteoblásticas obtenido de hueso trabecular humano. (Microscopia óptica x 200).

1.3. TRIPSINIZACION Y PASE CELULAR

Tras su confluencia, se realizó el proceso de tripsinización de los cultivos celulares obtenidos de las muestras 1, 2, 3, 4, 8, 12-14, 16-18 y 21 obteniéndose un n° total de células de 10^5 - 10^6 en cada cultivo. La viabilidad analizada en todos ellos mediante la tinción de azul Trypan superó el 95 %.

Una vez realizada la tripsinización celular, los fragmentos óseos que quedan en el frasco de cultivo permiten la realización de un nuevo cultivo de osteoblastos, siguiendo el método de cultivo anteriormente descrito. Este procedimiento se realizó sólo una segunda vez, dado que a partir del segundo pase las células pueden presentar un fenotipo más osteocítico. Dicho proceso se realizó con éxito en las muestras 1, 2, 3, 4, 8, 12-14, 16-18 y 21 (2° pase celular) observándose de nuevo el crecimiento de células con características morfológicas y bioquímicas de osteoblastos humanos.

1.4. CARACTERIZACION CELULAR

La caracterización celular se realizó en los cultivos celulares obtenidos de las muestras 1, 2, 3, 4, 8, 12-14, 16-18 y 21, presentando el 94.4% de las células una tinción positiva para fosfatasa alcalina y tipificándose, por tanto, como osteoblastos (Figura 4). El cultivo de fibroblastos humanos utilizado como control negativo no mostró actividad fosfatasa alcalina (Figura 5).



Figura 4.A. Osteoblasto humano mostrando actividad fosfatasa alcalina valorado mediante técnica citoquímica (ácido α -naftilfosfato y Fast Blue). (Microscopia óptica x 200)

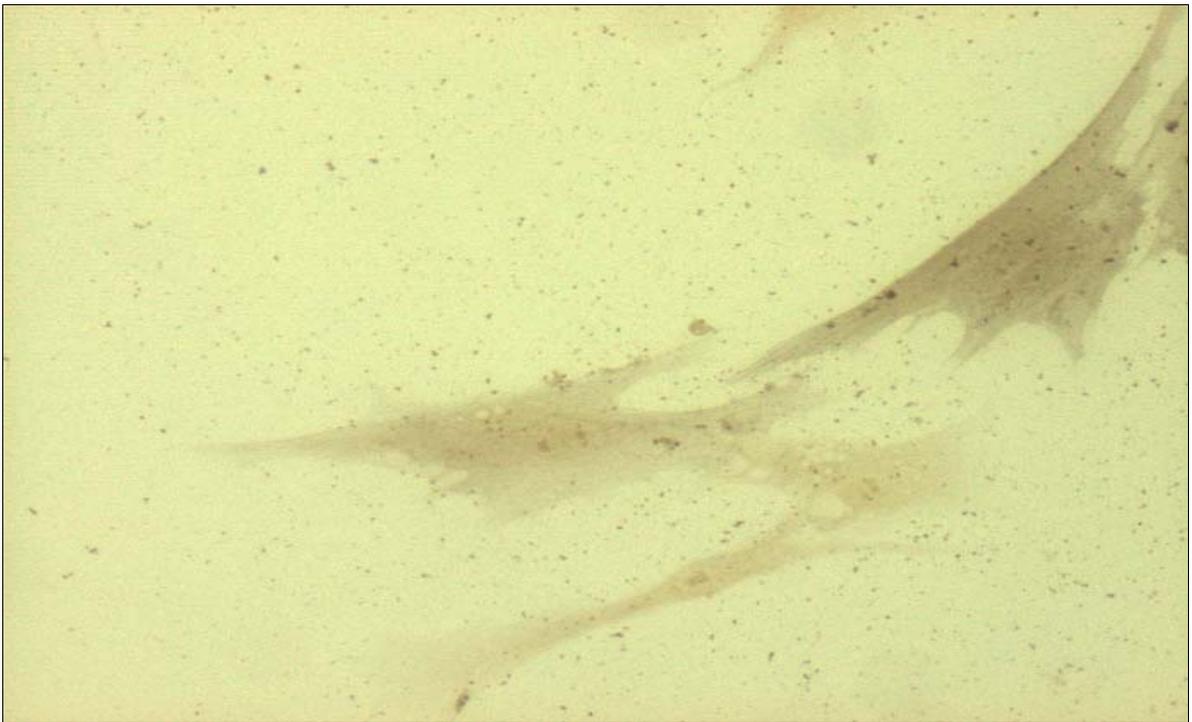


Figura 4.B. Células osteoblásticas humanas que presentan una tinción positiva para fosfatasa alcalina determinada por técnica citoquímica, como se describe en la sección de Material y Métodos. (Microscopia óptica x 200).

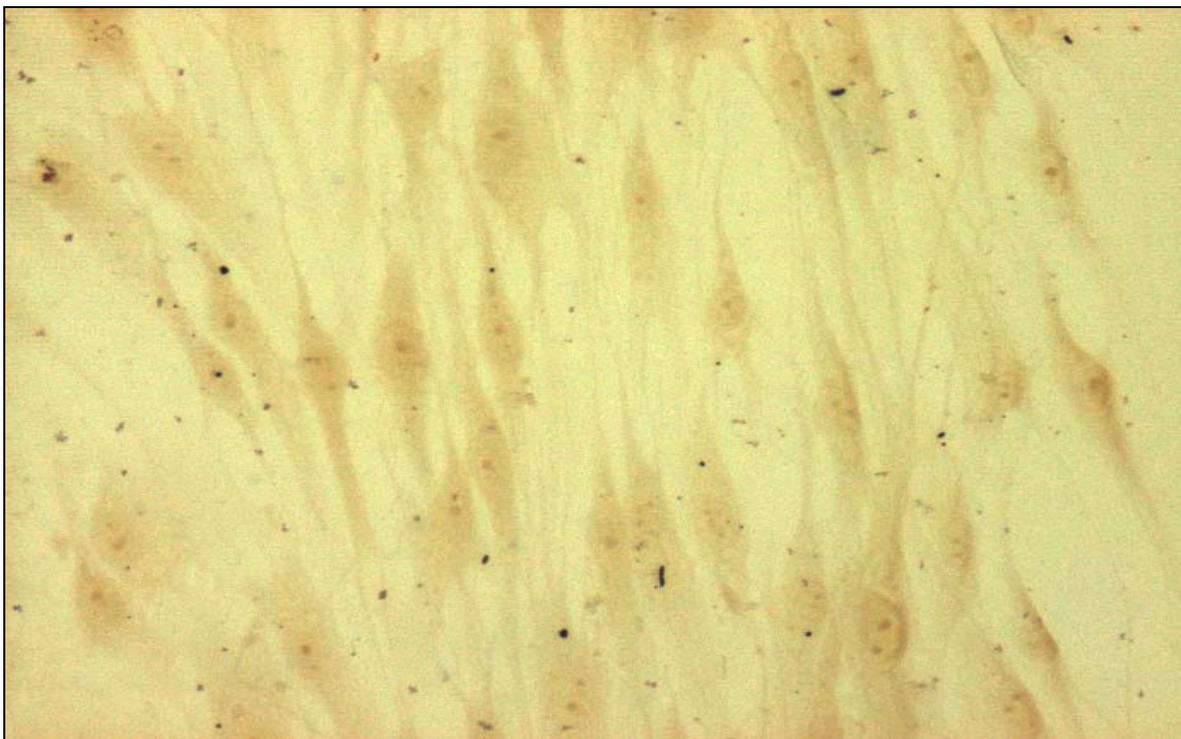


Figura 5. Cultivo de fibroblastos humanos (células MRC-5), que no mostró actividad fosfatasa alcalina. (Microscopia óptica x 200).

2. ENSAYO EXPERIMENTAL

El ensayo experimental se realizó en los cultivos celulares obtenidos de 12 pacientes, 9 hombres y 3 mujeres, correspondientes a los n° de muestra: 1, 2, 3, 4, 8, 12-14, 16-18 y 21 de Tabla 3.

La edad media de los hombres (n=9) fue de 64 años, rango (48-72) años, y la de las mujeres (n=3) de 60.66 años, rango (28-77) años. Del grupo de mujeres, 2 eran postmenopáusicas y una premenopáusica.

Se incluyeron los 12 ensayos experimentales realizados como n° final en el análisis estadístico global de datos.

2.1. PACIENTES

Existían diferencias significativas entre cultivos celulares obtenidos de diferentes pacientes ($p = 0.000$). Como consecuencia, los resultados obtenidos en los grupos estudio y control se analizaron de forma individual para cada paciente (datos apareados), en vez de analizar estos datos de forma global.

2.1.1. Sexo

No se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos de los distintos parámetros analizados y el sexo de los pacientes origen de los cultivos celulares ($p=NS$).

2.1.2. Edad

Se analizó si existía relación entre los diversos parámetros estudiados y la edad de los pacientes de los que se obtuvo el cultivo celular. Se dividieron los pacientes en dos grupos en función de la edad: jóvenes (< 65 años) y viejos (≥ 65 años). Se observó una disminución de los valores basales de todos los parámetros estudiados, en todos los tiempos de incubación, directamente relacionada con la edad, hallándose valores más elevados en pacientes jóvenes. Sin embargo, estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el grupo de PICP ($p=0.048$)

2.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACION CELULAR

Se estudió la proliferación celular analizando la síntesis de DNA a través de la incorporación de timidina tritiada en los 12 ensayos experimentales realizados. Se analizaron las diferencias entre los valores medios de timidina del grupo control respecto a los valores de los distintos grupos de estudio (adición de dexametasona 10^{-6} M y 10^{-7} M) tras 24 y 48 horas de incubación.

4. RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas ($p=NS$) entre el grupo control y el grupo tratado con dexametasona (10^{-6} M y 10^{-7}) en ambos tiempos de exposición (24 y 48 h). (Tabla 4).

TABLA 4. PROLIFERACION CELULAR

	24 horas	48 horas
Control	241.2 ± 34.9	344.0 ± 26.3
DEX 10^{-6} M	252.3 ± 44.5	337.2 ± 40.8
DEX 10^{-7} M	278.5 ± 56.8	298.5 ± 37.9

Los resultados expresan la síntesis de DNA a través de la incorporación de timidina tritiada en cultivos de osteoblastos humanos con y sin adición de diferentes dosis de glucocorticoides. Valores expresados en cpm/pocillo (medias ± ES) de 12 ensayos experimentales. No se observaron diferencias significativas entre los resultados. $p=NS$.

Asimismo, se analizaron las diferencias en relación a los distintos tiempos de incubación, 24 y 48 horas, del grupo control y de los grupos tratados con adición de dexametasona a dosis 10^{-6} M y 10^{-7} . Se observó un aumento de la proliferación celular a las 48 horas respecto a las 24 horas en todos los grupos, siendo estadísticamente significativo en el grupo control ($p=0.015$) y en el grupo estudio de 10^{-6} M ($p=0.050$). (Figura 5)

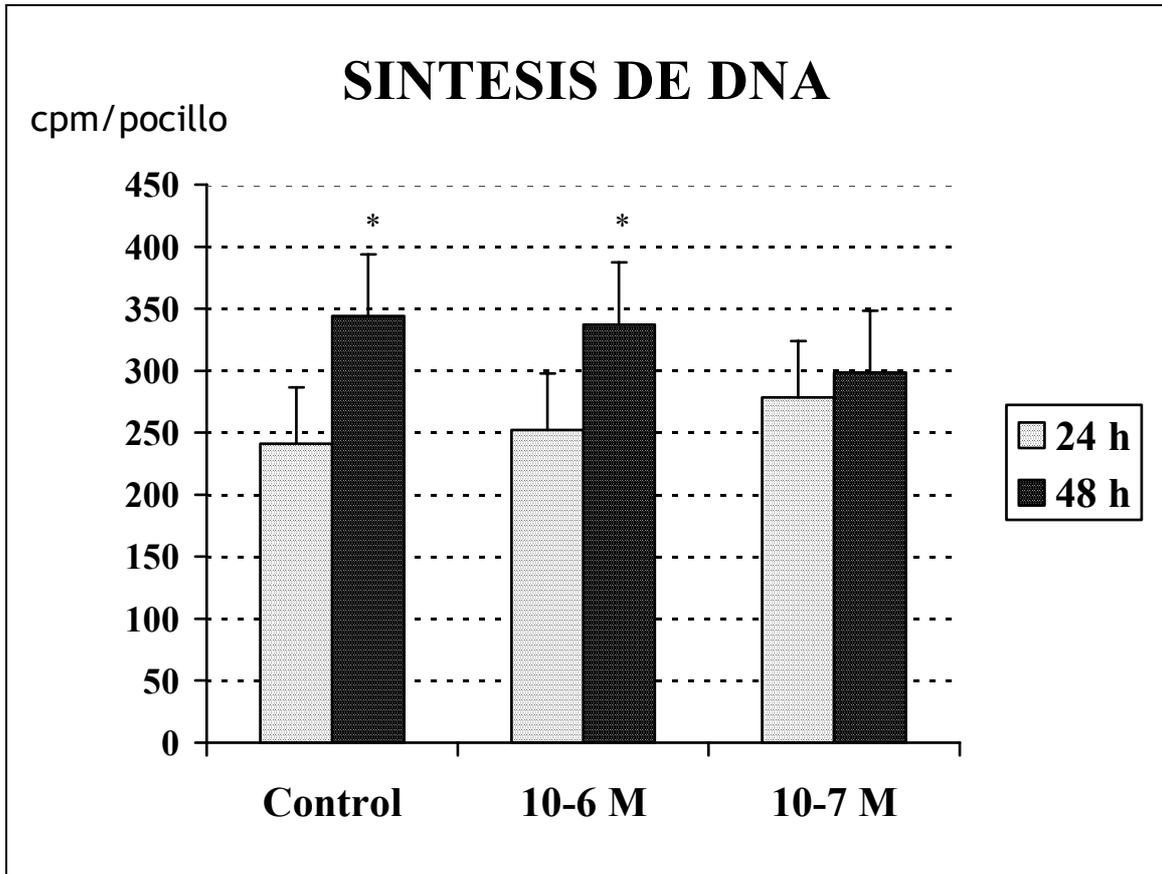


Figura 5. Estudio de proliferación celular, mediante la incorporación de timidina marcada, de los grupos estudio y control de cultivos de osteoblastos humanos en relación con el tiempo de incubación. Se observa un incremento de la síntesis de DNA a las 48 h respecto de las 24 h en todos los grupos, que es significativo en el grupo control y DEX 10^{-6} M. *($p < 0.05$). Valores expresados en cpm/pocillo (medias \pm ES) de doce ensayos experimentales.

2.3. DETERMINACION DE LA SINTESIS DE PROCOLAGENO I INTRACELULAR

Se analizó la síntesis de procolágeno tipo I intracelular, mediante técnica de inmunoperoxidasa, en ocho ensayos experimentales. Las células que presentaron inmunorreactividad para procolágeno I mostraron, a microscopía óptica, una tinción a

nivel del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, observándose, generalmente, un citoplasma uniformemente teñido (Figura 6), debido a la elevada actividad de síntesis proteica de esta célula. En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de células que presentaron una inmunorreactividad positiva para procolágeno tipo I intracelular.

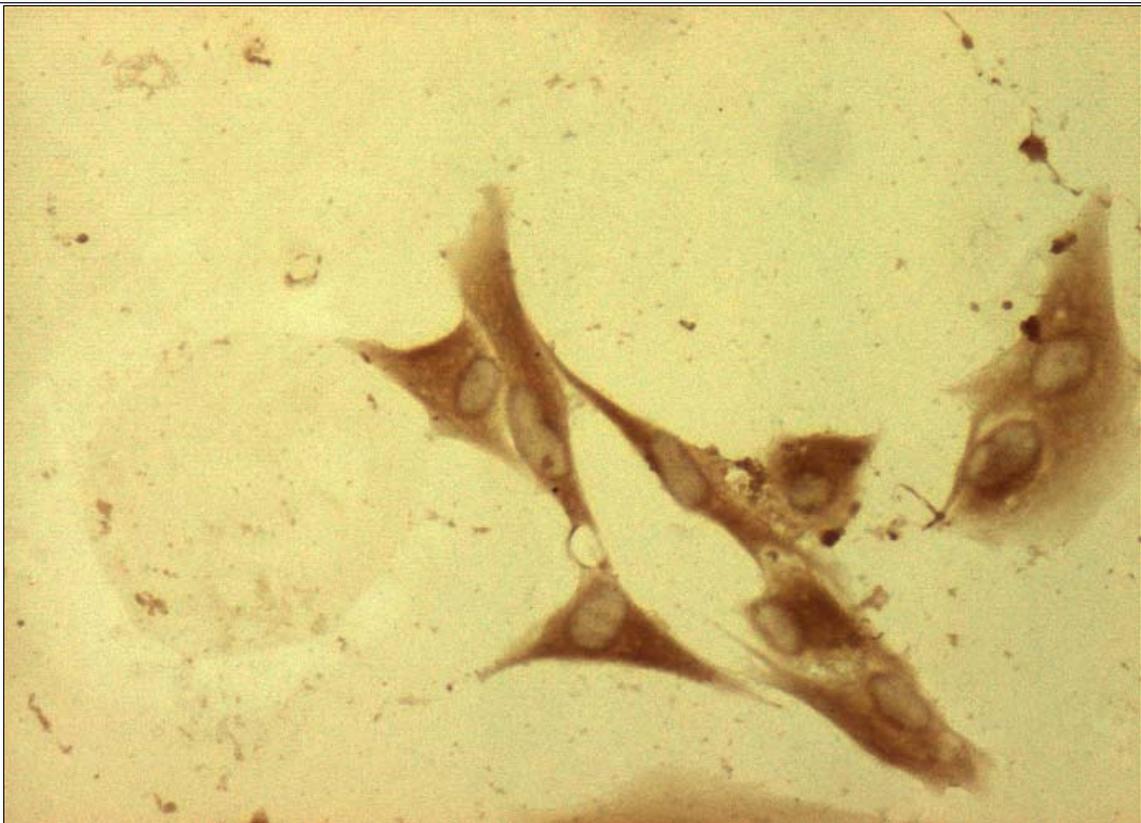


Figura 6. *Células osteoblásticas humanas con tinción citoplasmática positiva, expresando inmunorreactividad para procolágeno tipo I intracelular. Técnica de inmunoperoxidasa utilizando un anticuerpo antiprocolágeno I, como se ha descrito en la sección de Material y Métodos. (Microscopía óptica x 200)*

TABLA 5. INMUNOREACTIVIDAD INTRACELULAR PARA PROCOLAGENO TIPO I

	24 horas	48 horas
Control	70.0 ± 7.0	69.5 ± 4.8
DEX 10⁻⁶ M	47.6 ± 6.6 *	44.1 ± 4.2*
DEX 10⁻⁷ M	49.7 ± 6.9*	41.4 ± 6.0*

Porcentaje de osteoblastos humanos con inmunotinción positiva para procolágeno I en el grupo control y estudio, con adición de glucocorticoides. Valores expresados como medias ± ES de ocho experimentos. * $p < 0.05$ respecto al grupo control.

En los cultivos de osteoblastos humanos tratados con adición de glucocorticoides se observó una inhibición significativa de la inmunorreactividad intracelular respecto al grupo control ($p=0.012$). Esta inhibición fue ya aparente a la 24 h de incubación, y máxima a las 48 h, observándose un descenso del porcentaje de células que presentaban inmunorreactividad del $32.5 \pm 5.5 \%$ a las 24 h, y del $34.9 \pm 6.1 \%$ a las 48 h, en cultivos tratados con DEX 10^{-6} (Figuras 7, 8). El porcentaje de células que mostraron inmunorreactividad celular no mostró diferencias significativas entre ambas concentraciones de dexametasona, 10^{-6} y 10^{-7} M, ($p=NS$). No se hallaron diferencias significativas en relación al tiempo de incubación en ninguno de los grupos, estudio y control, a 24 y 48 h ($p=NS$).

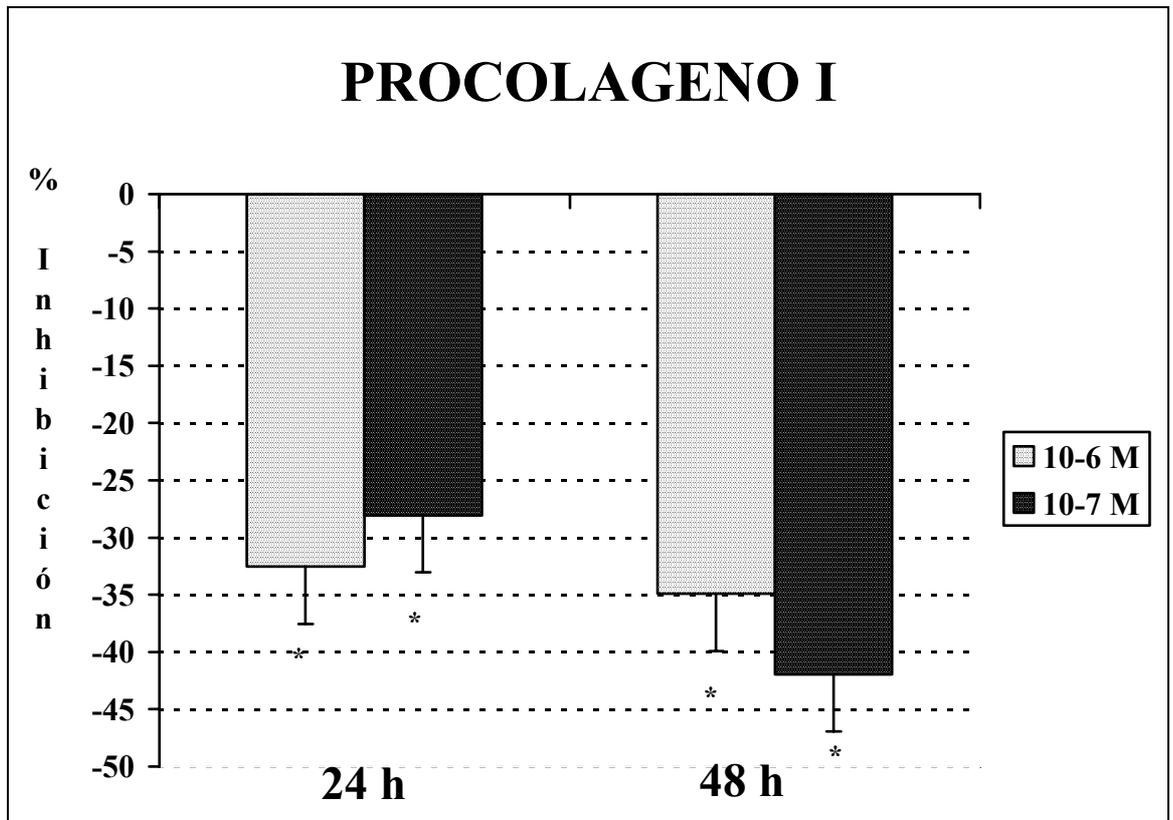


Figura 7. Efecto de dos concentraciones suprafisiológicas de DEX, 10^{-6} y 10^{-7} M, sobre la inmunorreactividad intracelular para procolágeno I en cultivos de osteoblastos, a las 24 y 48 h de incubación. Valores expresados como porcentaje de inhibición de las células tratadas que presentaron inmunotinción positiva respecto a los controles (medias \pm ES). * $p < 0.05$ respecto a control.

Figura 8. En las siguientes figuras (A,B,C), se muestra la inmunorreactividad intracelular de células osteoblásticas humanas, obtenidas del mismo paciente, tratadas con dos diferentes dosis suprafisiológicas de dexametasona (10^{-6} M y 10^{-7} M), respecto al grupo control.

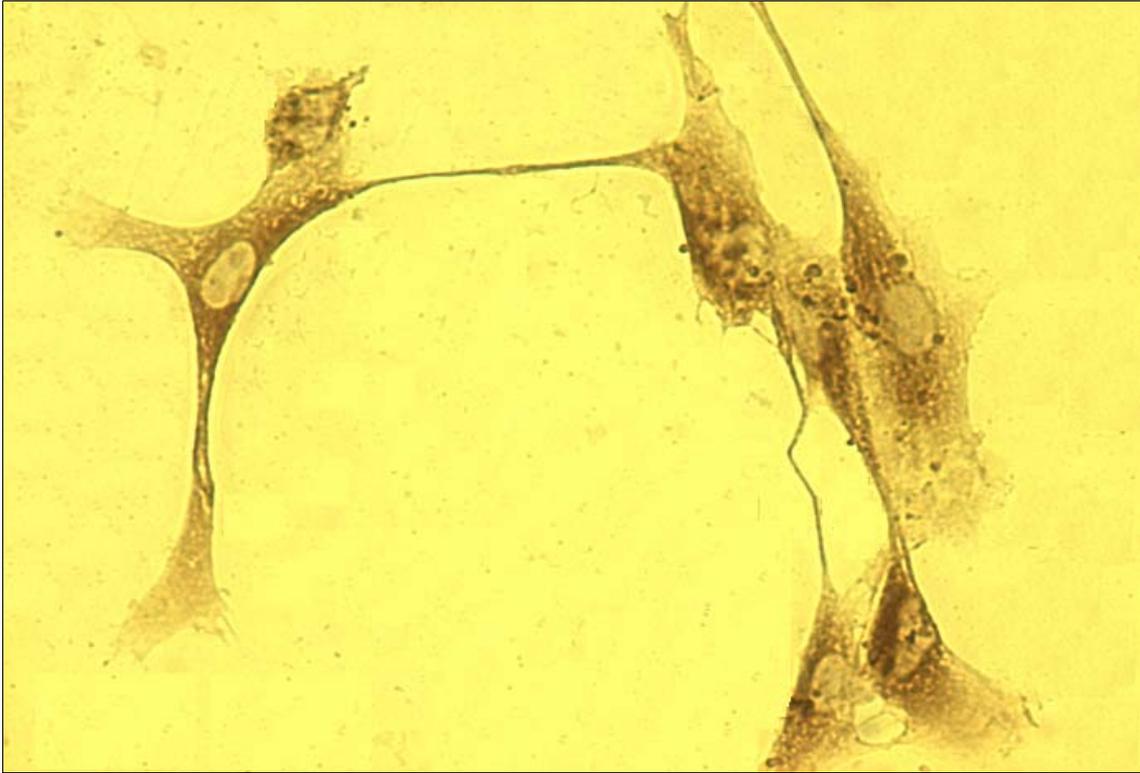


Figura 8.A. Células osteoblásticas humanas sin adición de dexametasona, mostrando una fuerte inmunorreactividad positiva para anticuerpo antiprocólágeno I. (MO x 200).

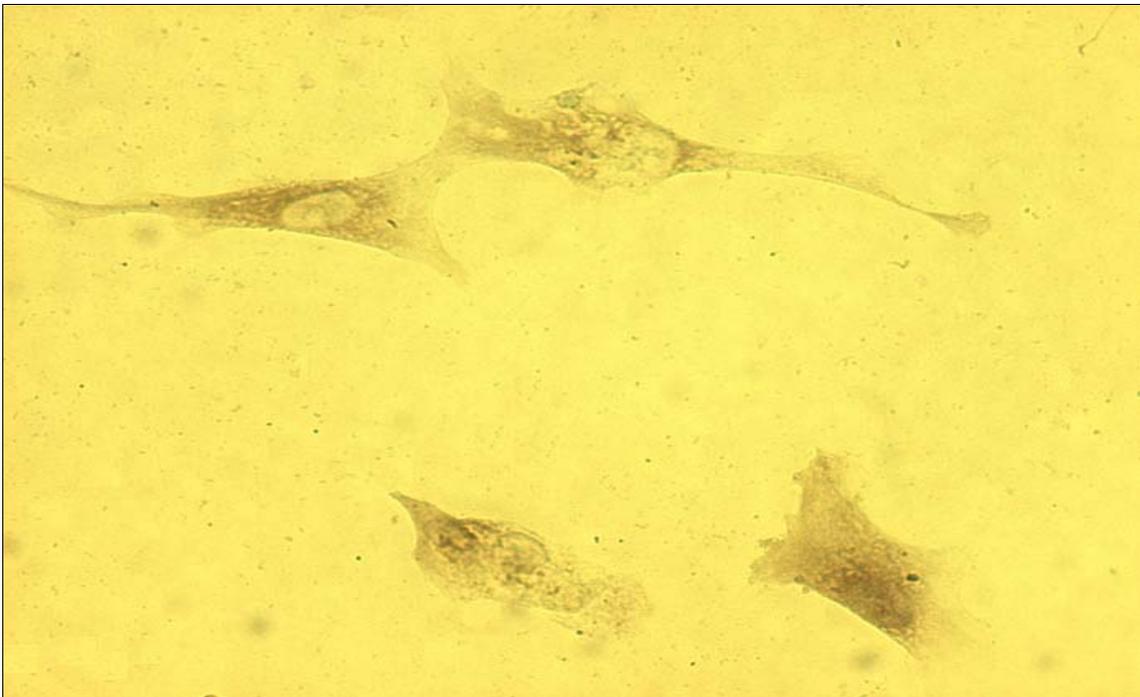


Figura 8.B. Células osteoblásticas humanas tratadas con 10^{-7} M de dexametasona mostrando una inmunotinción moderadamente positiva en comparación con las células del grupo control. (Microscopia óptica x 200).

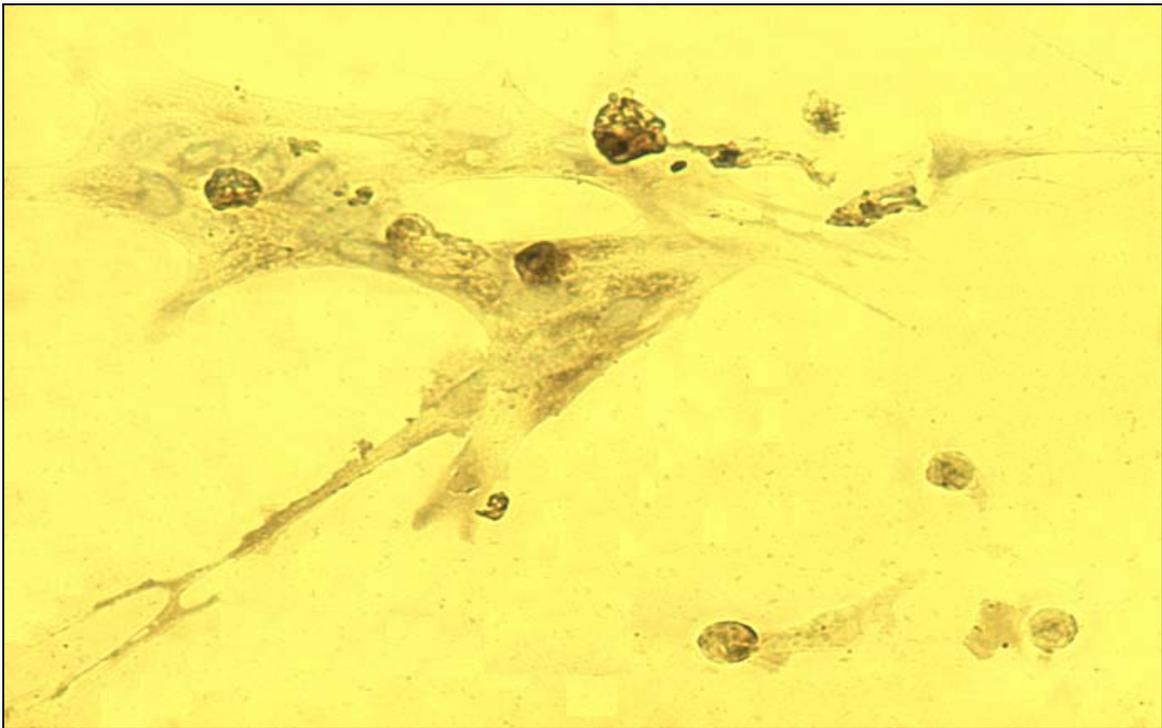


Figura 8.C. Células osteoblásticas humanas tratadas con dexametasona 10^{-6} M mostrando inmunorreactividad débilmente positiva comparado con las células del grupo control y las células tratadas con 10^{-7} M de dexametasona. (Microscopia óptica x 200).

- Control negativo:

Se observaron diferencias significativas entre los cultivos de osteoblastos incubados con anticuerpo anti-CD3 como anticuerpo primario (control negativo) (Figura 9) y los incubados con anticuerpo monoclonal anti-porción aminoterminal del procolágeno tipo I (control positivo) (Figura 10). Ninguno de los tratados con anti-CD3 mostró inmunorreactividad celular positiva para procolágeno. (Figura 9).

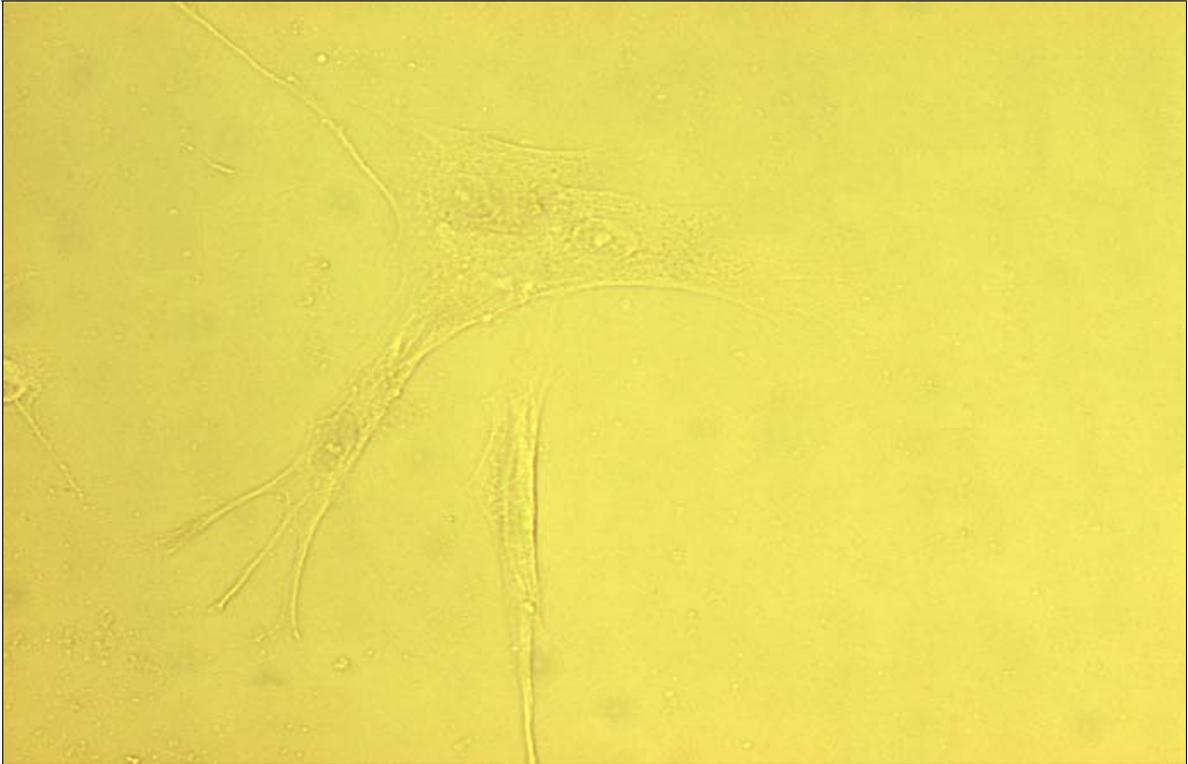


Figura 9. Técnica de inmunoperoxidasa. Osteoblastos humanos con tinción inmunocitoquímica de control, con anti-CD3, mostrando tinción citoplasmática negativa. (MO x 200).

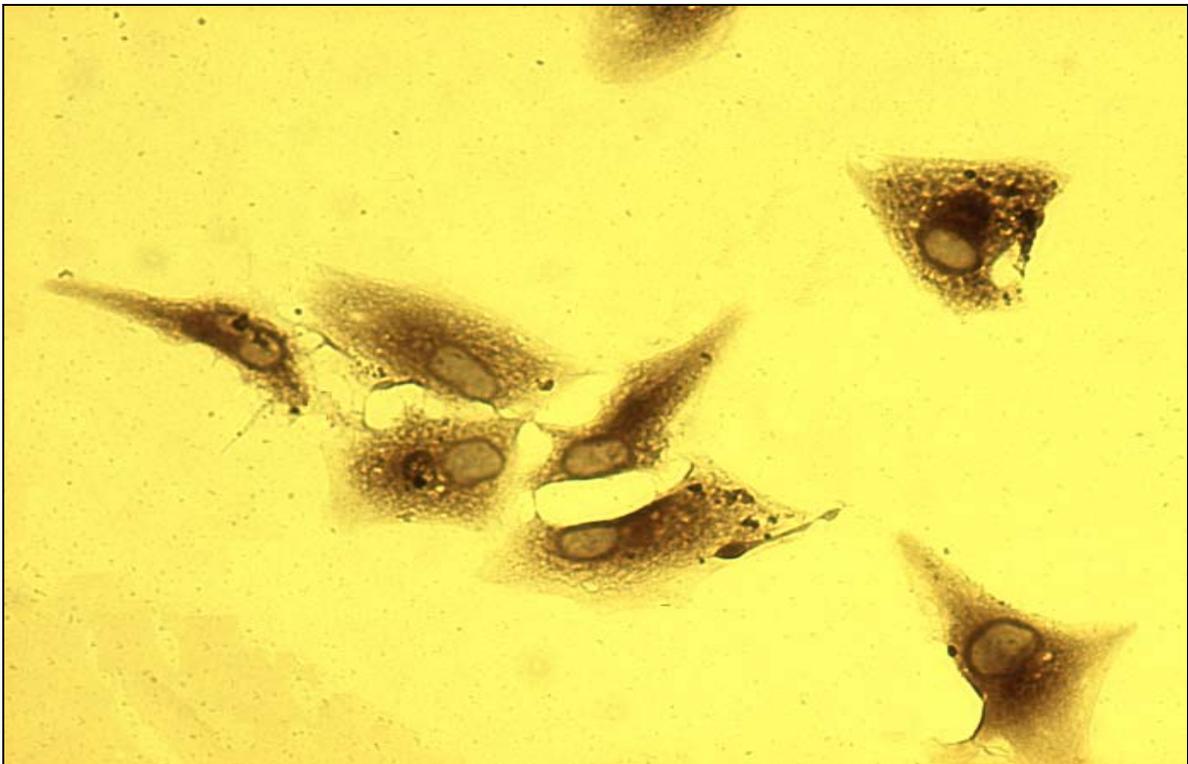


Figura 10. Técnica de inmunoperoxidasa. Osteoblastos humanos tratados con anticuerpo antiprocólágeno I mostrando tinción citoplasmática positiva. (Microscopía óptica x 200).

2.4. ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE LOS PROPEPTIDOS AMINO Y CARBOXITERMINAL DEL PROCOLAGENO I EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se realizaron ocho ensayos experimentales para la determinación de PICP y de PINP en el sobrenadante de los cultivos de los grupos estudio, tratados con dos concentraciones de dexametasona, 10^{-6} M y 10^{-7} M, y el grupo control. Se determinaron los valores a dos tiempos de incubación, 24 y 48 horas.

Se observó una disminución estadísticamente significativa en la secreción de PINP en el medio de cultivo en el grupo de células tratadas con dexametasona respecto al grupo control ($p=0.012$). Este efecto inhibitorio fue de similar magnitud con ambas concentraciones de DEX, 10^{-6} M y 10^{-7} M, y ambos tiempos de incubación (Tabla 6 y Figura 11).

Igualmente, se observó un descenso de la secreción de PICP en el medio de cultivo de las células tratadas con DEX 10^{-6} M y 10^{-7} M ($p=0.012$), sin observarse diferencias entre ambas concentraciones. Aunque parece apreciarse un mayor efecto inhibitorio de DEX a las 24 h, especialmente para PICP, no se observaron diferencias entre ambos tiempos de incubación.

A las 24 h de tratamiento con DEX 10^{-6} M el porcentaje de inhibición de PINP fue de 20.3 ± 7.7 % y de PICP de 22.4 ± 9.9 % ($p<0.05$). Tras 48 h, estos porcentajes fueron 18.6 ± 4.8 % para PINP y 14.3 ± 2.7 % para PICP ($p<0.05$). La adición de DEX a 10^{-7} M presentó análogos efectos en los valores de PINP y PICP.

4. RESULTADOS

TABLA 6. EFECTOS DE DEXAMETASONA SOBRE LA SECRECIÓN DE PINP Y PICP EN EL SOBRENADANTE DE LOS CULTIVOS

	PINP		PICP	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Control	3.8 ± 1.4	5.0 ± 1.4	38.8 ± 15.2	44.1 ± 11.3
DEX 10⁻⁶ M	2.9 ± 1.1 *	4.3 ± 1.3 *	31.9 ± 14.9 *	37.3 ± 10 *
DEX 10⁻⁷ M	2.6 ± 1.0 *	3.9 ± 1.2 *	30.4 ± 12.9 *	37.0 ± 9.4 *

Cuantificación de los péptidos PINP y PICP en el medio de cultivo de osteoblastos humanos con y sin adición de dexametasona a diferentes concentraciones. Los valores son expresados como ng/ml (media ± ES) de ocho experimentos. *p<0.05 respecto a control.

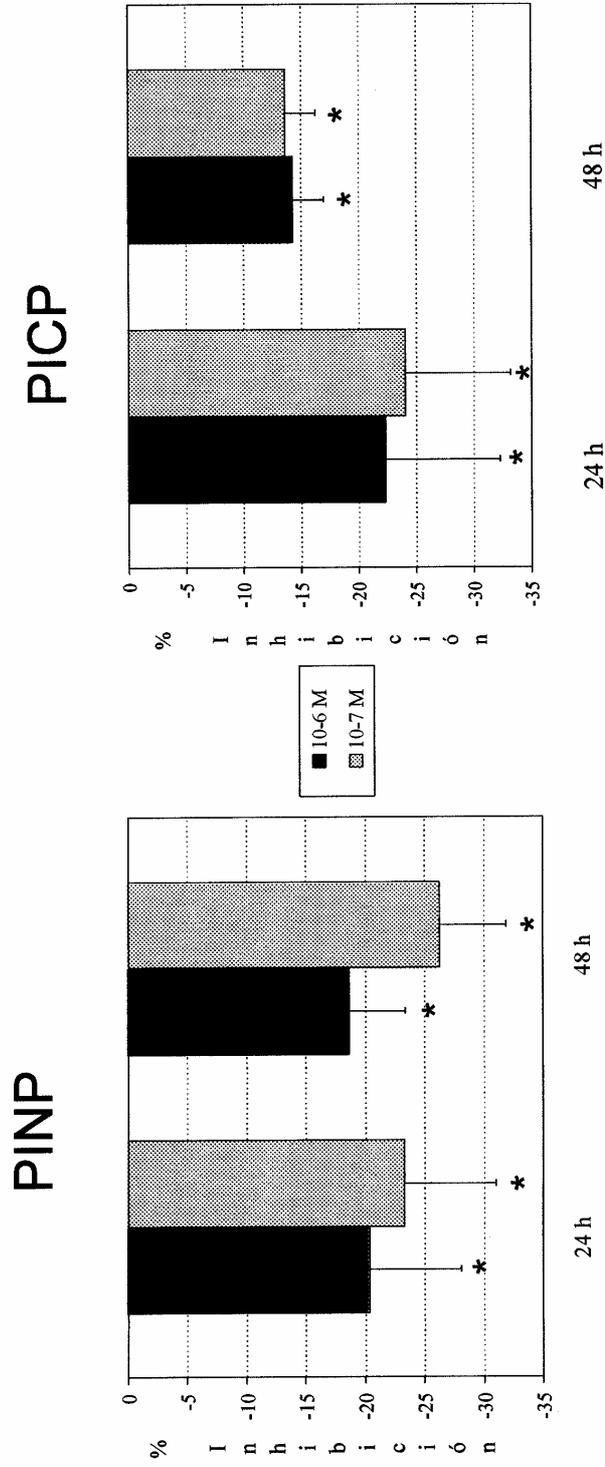


Figura 11. Porcentaje de inhibición de la secreción de PINP y PICP en el sobrenadante de los cultivos con adición de dexametasona respecto al grupo control (medias \pm ES). * $p < 0.05$.

2.5. CORRELACION ENTRE LA SINTESIS DE PROCOLAGENO I INTRACELULAR Y LOS PROPEPTIDOS AMINO Y CARBOXITERMINAL SECRETADOS EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se observó una correlación estadísticamente significativa entre los valores de inmunorreactividad intracelular para procolágeno I y los valores de PINP ($r = 0.515$; $p < 0.001$) y de PICP ($r = 0.486$; $p < 0.001$) en cultivos de osteoblastos humanos en condiciones basales y tras adición de glucocorticoides.

Asimismo, se observó una correlación estadísticamente significativa entre ambos propéptidos, PINP y PICP, en el sobrenadante de los cultivos ($r = 0.827$; $p < 0.001$). En la Figura 12 se muestra la relación entre los valores de ambos propéptidos en el medio de cultivo y los correspondientes a la inmunorreactividad intracelular de procolágeno I en condiciones basales y experimentales.

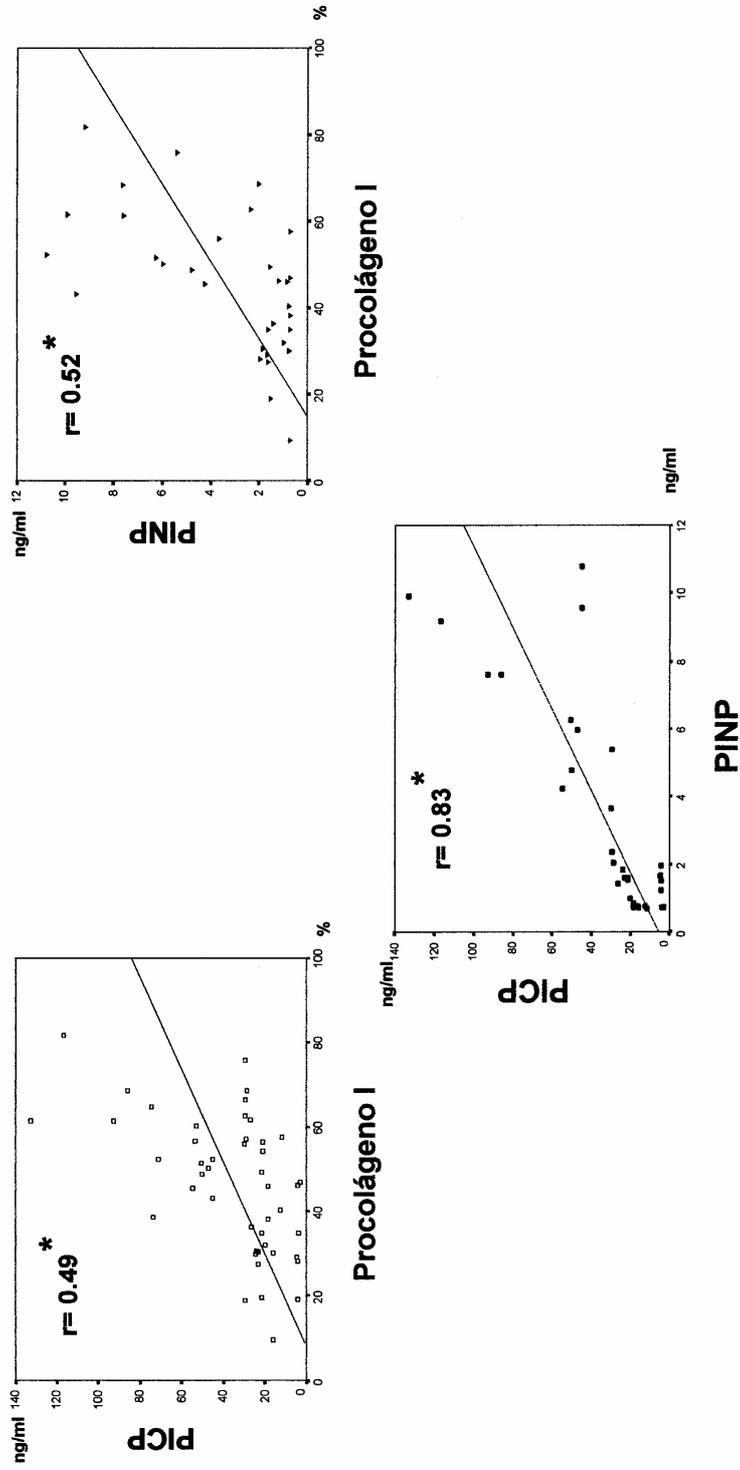


Figura 12. Correlaciones entre la inmunoreactividad intracelular para procolágeno I, PINP y PICP de los cultivos de osteoblastos humanos del grupo estudio y control. Los resultados son el valor medio de cada experimento. * $p < 0.001$.

DISCUSSION

En la primera parte de este estudio se estableció el cultivo de osteoblastos humanos a partir de hueso trabecular, previamente sometido a repetidos lavados con medio de cultivo y a digestión posterior con colagenasa, para evitar la presencia de células hemáticas o fibroblastos que pudieran contaminar el cultivo celular. La elevada actividad fosfatasa alcalina (FA), enzima generalmente localizada en la superficie celular, que presentaba el cultivo celular aislado es uno de los criterios histoquímicos aceptados para la identificación osteoblástica. Además, la elevada inmunorreactividad para procolágeno I intracelular que presentaron estas células en condiciones basales indicaba que la población celular aislada estaba constituida, principalmente, por osteoblastos bien diferenciados.

Una vez establecido el cultivo de osteoblastos humanos como modelo experimental, el objetivo de nuestro estudio fue analizar los efectos de dosis suprafisiológicas de dexametasona sobre la proliferación celular y la síntesis intracelular de procolágeno tipo I, así como sobre la secreción de los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno I en el sobrenadante de los cultivos.

La determinación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares de osteoblastos se realiza, generalmente, mediante la medición de la incorporación de prolina marcada en las proteínas sintetizadas^{46, 176, 178, 179, 181, 183, 186, 193, 199, 202, 217}. Esta técnica radiactiva requiere una instalación apropiada y presenta una alta variabilidad interensayo²⁵⁰, ya que el porcentaje de colágeno I sintetizado es calculado utilizando un factor de corrección debido a la relativa abundancia de prolina en el colágeno comparado con su proporción en las proteínas no colágenas. Además, otro factor que puede contribuir a

una disminución de la precisión de este método es la necesidad de utilizar colagenasa, con el riesgo de una actividad enzimática no específica que podría dar resultados erróneos.

Para el análisis de la síntesis de procolágeno I intracelular nosotros utilizamos la técnica de inmunoperoxidasa (IMP), técnica que ha sido utilizada recientemente en osteoblastos para la inmunolocalización del receptor estrogénico β ²⁵¹ y del péptido relacionado con la hormona paratiroidea²⁵². Esta técnica se basa en un procedimiento inmunocitoquímico utilizando un anticuerpo primario específico contra el antígeno que queremos localizar, y la posterior adición de un anticuerpo secundario biotinilado unido al complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC)²⁴⁹. La localización del antígeno se consigue mediante una reacción colorimétrica con un sustrato precipitable, apropiado para la peroxidasa.

En nuestro estudio el anticuerpo primario fue un anticuerpo monoclonal antiprocolágeno I (SP1-D8), obtenido de un hibridoma murino que, mediante la técnica de IMP, nos permitió determinar el porcentaje de células que presentaban inmunorreactividad y que, por tanto, habían sintetizado procolágeno tipo I. Resulta una técnica específica, no tiñendo otras proteínas de la matriz ósea sintetizadas por el osteoblasto; el color de la tinción se mantiene estable, y evita la utilización de isótopos radiactivos. IMP es, por tanto, un método sensible y sencillo, fácil de realizar, seguro ya que no utiliza material radiactivo, y específico, ya que mide exactamente la presencia intracelular del precursor del colágeno I. El principal inconveniente de IMP es que es una técnica semicuantitativa.

Asimismo, la síntesis de colágeno tipo I puede ser valorada “in vitro” de forma indirecta, por la cuantificación del propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (PICP) en el medio de cultivo²⁵⁰. Sin embargo, hasta la actualidad, la cuantificación del otro propéptido derivado del procolágeno I, el propéptido aminoterminal (PINP), no ha sido previamente valorado como medida de la síntesis del colágeno tipo I “in vitro”.

En este estudio se analizaron los efectos de dos concentraciones de dexametasona sobre la proliferación celular y la síntesis intracelular de procolágeno I, mediante técnica inmunocitoquímica, así como sobre los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno tipo I secretados en el medio de cultivo.

Los resultados de este estudio “in vitro” mostraron que los glucocorticoides, a concentraciones suprafisiológicas, dexametasona 10^{-6} M y 10^{-7} M, producen una inhibición significativa de la síntesis del procolágeno I intracelular, valorada por técnica de inmunoperoxidasa (Tabla 5 y Figura 7 de la sección de Resultados), no derivada de una disminución de la proliferación celular, ya que se observó un aumento de la síntesis de DNA directamente relacionado con el tiempo de incubación (Figura 5 de la sección de Resultados).

Este efecto inhibitorio fue observado a corto plazo, ya que fue evidente a las 24 h de incubación y persistió a las 48 horas. El escaso tiempo transcurrido entre la adición de dexametasona y la inhibición de la síntesis de colágeno I sugiere que los glucocorticoides podrían tener un efecto inhibitorio directo sobre la función celular pudiendo actuar sobre el osteoblasto maduro, probablemente a través de receptores específicos para glucocorticoides, en lugar de sobre los precursores osteoblásticos.

En relación con este efecto, estudios previos realizados por otros autores han hallado también una inhibición de la síntesis de colágeno tanto en cultivos de células osteoblásticas^{181, 193, 199, 217, 253} como en cultivos de órgano^{181, 183} tratados con glucocorticoides.

Sin embargo, otros autores han hallado el efecto contrario. Así, se ha descrito en cultivos de células óseas tratados con cortisol un aumento de la síntesis de colágeno a las 24 horas de tratamiento²⁰², aunque este efecto estimulador fue observado a concentraciones fisiológicas y podría sugerir más una acción de los glucocorticoides sobre la diferenciación celular que un efecto estimulador.

Asimismo, se ha descrito también un efecto bifásico de los glucocorticoides sobre la función celular. Así, en cultivos de calota fetal de rata tratados con dosis fisiológicas de glucocorticoides se observa un efecto estimulador sobre la síntesis de colágeno tras 24 horas de exposición, determinado por la incorporación de [³H]-prolina, no asociado a un aumento de la proliferación celular, mientras que dosis supra fisiológicas producen un efecto inhibitorio¹⁷⁸. Además, se ha hallado un doble efecto de los glucocorticoides dependiendo de la duración del tiempo de incubación. Así, en cultivos de osteoblastos derivados de calota fetal de rata, la síntesis de colágeno I es estimulada en períodos cortos de cultivo e inhibida en cultivos a largo plazo^{176, 254}.

Además, se han descrito también efectos antagónicos de los glucocorticoides sobre la síntesis de colágeno, observándose tanto una estimulación como una inhibición, en cultivos celulares derivados de osteosarcoma de rata¹⁷⁹, demostrando que estas

líneas celulares tienen diferentes expresiones fenotípicas y que se pueden observar efectos contrapuestos en relación con la línea celular.

Estos hechos enfatizan la importancia de la utilización de cultivos de osteoblastos humanos como modelo experimental para evitar conclusiones erróneas debido a las diferencias interespecies. Para minimizar estas diferencias realizamos el ensayo experimental en osteoblastos humanos.

En nuestro estudio no se observó una inhibición de la proliferación celular de osteoblastos humanos tras un corto tiempo de exposición (24-48h) a dosis suprafisiológicas de dexametasona. Estos resultados no se corresponden con los hallazgos descritos por otros autores en osteoblastos humanos, ya que se ha observado, generalmente, un descenso de la proliferación osteoblástica tras tratamiento con glucocorticoides ^{185, 255}. Así, Chevalley et al. hallan una inhibición de la proliferación celular de osteoblastos tras 24 h de tratamiento con dexametasona 10^{-8} M ¹⁸⁴. Sin embargo, se ha observado también un efecto estimulador, dosis-dependiente, en cultivo de osteoblastos humanos, tras tres días de exposición a dexametasona ¹⁸⁶. Asimismo, otros autores han hallado una estimulación de la síntesis de DNA en cultivo de osteoblastos humanos tras 6-12 h de tratamiento con glucocorticoides ¹⁸⁷. Los motivos de estos resultados discordantes no quedan claros. Es posible, sin embargo, que nuestros resultados reflejen los efectos bifásicos de los glucocorticoides sobre las células osteoblásticas ya que los efectos inhibitorios han sido, generalmente, descritos en cultivos a largo plazo.

Además, los estudios de Wong et al.¹⁸⁵ hallan un efecto estimulador de los glucocorticoides cuando éstos están presentes desde el inicio del cultivo de células óseas, pero un efecto inhibitorio si son añadidos tras un período de crecimiento celular “in vitro”. Estos hechos remarcan también la importancia del momento de la adición del glucocorticoide en los efectos observados. Estas observaciones sugieren que los efectos de los glucocorticoides sobre la proliferación celular en osteoblastos humanos pueden ser complejos y, aunque estos fármacos inhiben la osteoblastogénesis y reducen la vida media de los osteoblastos²⁵⁶, en cultivos a corto plazo los glucocorticoides pueden tener un efecto diferente.

Por el contrario, en los resultados de nuestro estudio observamos, de forma constante, un efecto inhibitorio tras la adición de dexametasona sobre la síntesis de procolágeno tipo I intracelular valorado por la técnica de inmunoperoxidasa, así como mediante la cuantificación de los propéptidos secretados en el medio de cultivo. Este efecto fue ya evidente a las 24 horas de exposición, con ambas dosis de glucocorticoides. Es interesante constatar que la disminución de la formación ósea producida por los glucocorticoides, secundaria a la reducción de la síntesis de colágeno, puede agravarse al inducir estos fármacos un aumento de la apoptosis de las células osteoblásticas, como se ha observado tanto en estudios “in vitro”, tras 72 h de tratamiento con corticosterona¹⁹², como en estudios in vivo^{191, 192}. En nuestro estudio la inhibición de la síntesis de colágeno se produjo de forma precoz, en las primeras 24 h tras la adición de dexametasona, mientras que el aumento significativo de la muerte celular programada inducido por el tratamiento con glucocorticoides se observó a las 48 h¹⁹². Este hecho refuerza nuestra hipótesis de que la inhibición de la síntesis de

colágeno tipo I observada en nuestro estudio es debida a un efecto directo de los glucocorticoides sobre los osteoblastos más que a una reducción del número de células óseas inducido por apoptosis.

Al analizar los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno I en el medio de cultivo tras adición de glucocorticoides hallamos una inhibición de la secreción de ambos propéptidos que se observó ya tras 24 h de tratamiento con ambas dosis de dexametasona (Tabla 6 y Figura 11 de la sección de Resultados).

En concordancia con nuestros resultados, otros investigadores han descrito asimismo un efecto inhibitorio de la secreción de PICP en el sobrenadante de los cultivos de osteoblastos humanos tratados con glucocorticoides ^{187, 214}. Asimismo se han descrito valores disminuidos de PICP en cultivo de osteoblastos humanos tras adición de diferentes tipos de glucocorticoides (dexametasona, metilprednisolona, prednisolona y deflazacort) ¹⁸⁷.

Este efecto inhibitorio es consistente con los resultados observados “in vivo” en pacientes tratados con glucocorticoides ^{83, 84}. Así, una disminución de los valores séricos de PICP se ha descrito en el rango de 0.1 mg/ kg/ día de prednisona, lo que corresponde a una concentración molar aproximada de 10^{-7} , dosis similar a la concentración de glucocorticoides que produce una inhibición de la secreción de PICP “in vitro” ⁸³. La disminución de la concentración sérica de PICP observada “in vivo” ⁸³ tuvo lugar en las primeras 48 horas tras el inicio de la terapia con glucocorticoides, indicando una rápida inhibición de la síntesis de colágeno “in vivo” que concordaría con los resultados observados “in vitro”.

La determinación sérica del propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I, PINP, mediante radioinmunoanálisis ha sido desarrollada recientemente ⁹³ para evaluar la formación ósea y, por tanto, la actividad osteoblástica “in vivo”. Hasta la actualidad se han publicado muy pocos artículos analizando los efectos de los glucocorticoides sobre los niveles séricos de PINP, pero tanto en adultos ⁹¹ como en niños ⁹² se han hallado niveles disminuidos de PINP en pacientes que recibían este tratamiento. Sin embargo, su aplicación “in vitro” es aún escasa y, en la actualidad, sólo se ha utilizado para determinar la secreción de PINP en el sobrenadante de cultivo de odontoblastos humanos y de tejido de mucosa oral ²⁵⁷. Hasta el momento presente no se había valorado si los resultados obtenidos mediante la determinación de PINP en cultivos celulares eran equivalentes a los obtenidos mediante la determinación de la síntesis de procolágeno I intracelular o la cuantificación de PICP en el sobrenadante de los cultivos para evaluar la función celular. Tampoco se habían analizado los valores de PINP en cultivos de células óseas tratados con glucocorticoides.

Al analizar la relación existente entre PINP, PICP y la síntesis intracelular de procolágeno I, hallamos una correlación estadísticamente significativa entre los valores de la inmunotinción intracelular y PINP, así como con PICP, sugiriendo que tanto PINP como PICP reflejan, de manera adecuada, la síntesis de procolágeno tanto en condiciones basales como tras tratamiento con glucocorticoides. Estas correlaciones sugieren que es posible valorar la síntesis de procolágeno intracelular mediante análisis en el medio de cultivo. En relación con estos resultados se ha descrito también una correlación significativa entre los valores secretados de PICP y la síntesis de colágeno I, valorada mediante la incorporación de [³H]-prolina, en cultivo de osteoblastos humanos

tratados con diferentes concentraciones de suero humano o bovino fetal ²⁵⁰. Sin embargo, hasta el momento actual no se había descrito la existencia de correlación entre los valores de PINP y la síntesis de colágeno tipo I.

Asimismo, en nuestro estudio observamos una excelente correlación entre los dos propéptidos del procolágeno I tanto en condiciones basales como experimentales (Figura 12 de la sección de Resultados). Teniendo en cuenta que los propéptidos PINP y PICP son secretados en una relación molar 1:1, estos resultados no serían sorprendentes, y este hecho concordaría con algunos resultados observados “in vivo”. Así, se ha descrito una correlación significativa entre las concentraciones séricas de PINP y PICP en sujetos sanos ⁹⁰ y en mujeres postmenopáusicas tanto antes como a los 6 y 12 meses de inicio de tratamiento hormonal sustitutivo ⁸².

Sin embargo, otros estudios realizados “in vivo” han hallado resultados contradictorios al analizar ambos propéptidos, con una mayor sensibilidad para el PINP en la evaluación de la formación ósea ^{82, 90, 258}. Estas discrepancias podrían ser debidas, en parte, a las diferencias en el aclaramiento plasmático de estos propéptidos ²⁵⁹ y, en parte, a la no influencia hormonal en el metabolismo del PINP ⁹⁰

Sin embargo, basándonos en los resultados de nuestro estudio, se podría sugerir que “in vitro” tanto la determinación de PINP como de PICP es igualmente válida para analizar la función osteoblástica.

Además, la determinación de estos propéptidos en el sobrenadante de los cultivos puede realizarse por un procedimiento fácil que permite el estudio de la síntesis osteoblástica de colágeno sin necesidad de fijar las células y, por tanto, permitiendo el

mantenimiento del cultivo celular en condiciones viables. Como consecuencia de la buena correlación con la síntesis intracelular de procolágeno, la especificidad de esta técnica para evaluar la síntesis de colágeno I es buena, sin requerir el examen intracelular. Es un método rápido, específico y reproducible, permitiendo, si fuera necesario, la repetición de nuevas determinaciones al poderse mantener una fracción del sobrenadante de cada muestra congelada.

En conclusión, nuestro estudio revela que los glucocorticoides a dosis suprafisiológicas producen una inhibición de la síntesis de procolágeno I en osteoblastos humanos, no asociada a una disminución de la proliferación celular. Asimismo, la actividad osteoblástica en sobrenadante valorada mediante PINP y PICP se correlaciona directamente con la síntesis intracelular de procolágeno I. Y, finalmente, la determinación de la inmunorreactividad intracelular para procolágeno I mediante inmunocitoquímica y de los propéptidos del procolágeno I secretados en el medio de cultivo son métodos útiles para analizar la función osteoblástica “in vitro”.

CONCLUSIONES

En esta tesis se han investigado los efectos de los glucocorticoides sobre la proliferación y la función celular de osteoblastos derivados de tejido trabecular humano. Para ello se ha estudiado el efecto de distintas concentraciones suprafisiológicas de dexametasona sobre la síntesis de DNA, sobre la síntesis de procolágeno tipo I intracelular, y sobre la secreción de PICP y PINP en el sobrenadante de los cultivos. Tras analizar los resultados de estos experimentos “in vitro”, podemos realizar las siguientes conclusiones:

1. Los glucocorticoides a dosis suprafisiológicas no produjeron una inhibición de la proliferación celular de osteoblastos humanos tras un corto tiempo de exposición, sino que se observó un incremento en relación con el tiempo de incubación.
2. El aumento de la proliferación celular se observó de forma precoz, a las 48 h de incubación, en osteoblastos humanos tratados con glucocorticoides desde el inicio del cultivo celular.
3. No se observó relación entre el aumento de la proliferación celular y la dosis de glucocorticoides administrada.
4. Los glucocorticoides a dosis suprafisiológicas produjeron una inhibición significativa de la síntesis de procolágeno I intracelular en osteoblastos humanos.
5. La inhibición de la síntesis de procolágeno I intracelular fue ya evidente a las 24 horas de incubación, persistiendo a las 48 h.

6. No se hallaron diferencias significativas entre distintas concentraciones suprafisiológicas de dexametasona, 10^{-6} y 10^{-7} M, en la síntesis de procolágeno I.
7. Los glucocorticoides a dosis suprafisiológicas produjeron una inhibición significativa de la secreción de los propéptidos amino y carboxiterminal del procolágeno I (PINP, PICP) en el medio de cultivo.
8. La inhibición de la secreción de PINP y PICP se produjo de forma precoz, siendo ya evidente a las 24 h de incubación.
9. No se observaron diferencias significativas en la secreción de PINP y PICP entre ambas concentraciones de dexametasona.
10. La actividad osteoblástica valorada en el medio de cultivo mediante la determinación de PINP y de PICP se correlacionaba directamente con la síntesis intracelular de procolágeno tipo I.
11. Ambos marcadores derivados del colágeno, PINP y PICP, se correlacionan de forma significativa entre sí “in vitro”.
12. La función osteoblástica “in vitro” puede ser valorada de forma adecuada a través de la determinación de los propéptidos del procolágeno I secretados en el medio de cultivo así como por valoración de la inmunorreactividad intracelular para procolágeno I mediante técnica inmunocitoquímica.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los glucocorticoides a dosis suprafisiológicas producen una inhibición precoz de la síntesis de colágeno tipo I, analizada mediante la determinación de procolágeno I intracelular y de los propéptidos PINP y PICP en el medio de cultivo, no asociada a una disminución de la proliferación celular.
2. La determinación de la inmunorreactividad intracelular para procolágeno I mediante inmunocitoquímica y de los propéptidos del procolágeno I secretados en el medio de cultivo son métodos adecuados para analizar la función osteoblástica “in vitro”.

BIBLIOGRAFIA

1. Serrano S, Mariñoso ML, Torres A, Lorenzo V, Keysers U, Lloreta J, Nacher M, García C, Ballester J, Díez A, Aubia J. Osteoblastic proliferation in bone biopsies from patients with end-stage chronic renal failure. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 191-199.
2. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241: 84-86.
3. Kream BE, Jose M, Yamada S, De Luca HF. A specific high-affinity binding macromolecule for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in fetal bone. *Science* 1977; 197: 1086-1088.
4. McDonnell DP, Pike JW, O'Malley BW. The vitamin D receptor: A primitive steroid receptor related to thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem* 1988; 30: 41-46.
5. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 854-857.
6. Subramaniam M, Colvard D, Keeting PE, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase, osteocalcin, and proto-oncogenes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Biochem* 1992; 50: 411-424.

7. Jüppner H, Abou-Jamra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski Jr LF, Hock J, Potts Jr JT, Kronenberg HM, Segre GV. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991; 254: 1024-1026.
8. Wlodarski KH, Reddi AH Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 382-385.
9. Iba K, Chiba H, Sawada N, Hirota S, Ishii S, Mori M. Glucocorticoids induce mineralization coupled with bone protein expression without influence on growth of a human osteoblastic cell line. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 319-330.
10. Puzas JE. Phosphotyrosine phosphatase activity in bone cells: an old enzyme with a new function. *Adv Prot Phosphatases* 1986; 3: 237-256.
11. Burgeson RE, Nimni ME, Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop* 1992; 282: 250-272.
12. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 403-434.
13. Myers JC, Emanuel BS. Chromosomal localization of human collagen genes. *Collagen Rel Res* 1987; 7: 149-159.
14. Fleischmajer R, Perlsh JS, Olsen BR. Amino and carboxyl propeptides in bone collagen fibrils during embryogenesis. *Cell Tissue Res* 1987; 247: 105-109.

15. Fisher LW, Gehron Robey P, Tuross N, Otsuka AS, Tepen DA, Esch FS, Shimasaki S, Termine JD. The Mr 24,000 phosphoprotein from developing bone is the NH₂-terminal propeptide of the α 1 chain of type I collagen. *J Biol Chem* 1987; 262: 13457-13463.
16. Delmas PD. Markers of bone formation and resorption. En: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2nd ed. New York, Raven Press. 1993: pp 108-112.
17. Yamauchi M, Katz EP, Mechanic GL. Intermolecular cross-linking and stereospecific molecular packing in type I collagen fibrils of the periodontal ligament. *Biochemistry* 1986; 25: 4907-4913.
18. Robins SP, Duncan A. Pyridinium crosslinks of bone collagen and their location in peptides isolated from rat femur. *Biochem Biophys Acta* 1987; 914: 233-239.
19. Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J* 1988; 252: 495-500.
20. Tenenbaum HC and Heersche JNM. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif Tissue Int* 1982; 34: 76-79.
21. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: A model of bone formation?. *Am J Med Genet*

- 1993; 45: 163-178.
22. Puzas JE. The osteoblast. En: Favus MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2nd ed. New York, Raven Press. 1993: pp 15-21.
23. Termine JD. Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2nd ed. New York, Raven Press. 1993: pp 21-25.
24. Gehron Robey P, Young MF, Fisher LW, McClain TD. Thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; 108: 719-727.
25. Somerman MJ, Fisher LW, Foster RA, Sauk JJ. Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblast attachment in vitro. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 50-53.
26. Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 9702-9708.
27. Mark MP, Prince CW, Gay S, Austin RL, Butler WT. 44-kDal bone phosphoprotein (osteopontin) antigenicity at ectopic sites in newborn rats: kidney and nervous tissues. *Cell Tissue Res* 1988; 251: 23-30.

28. Raisz LG, Rodan GA. Cellular basis for bone turnover. Avioli, Krane, eds. Metabolic bone disease and clinically related disorders. Philadelphia, WB Saunders. 1990: pp 1- 41.
29. Butler WT, D'Souza RN, Bronckers ALJJ, Happonen R-P, Somerman MJ. Recent investigations on dentin specific proteins. Proc Finn Dent Soc 1992; 88 Suppl 1: 369-376.
30. Price PA, Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. J Biol Chem 1980; 255: 11660-11663.
31. Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RGG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃, parathyroid hormone, and glucocorticoids. Metab Bone Dis Rel Res 1984; 5: 229-234.
32. Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. J Clin Invest 1980; 66: 878-883.
33. Gheron Robey P, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. J Cell Biol 1987; 105: 457-463.

34. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1988; 122: 22-27.
35. Chambers TJ. The pathobiology of the osteoclast. *J Clin Pathol* 1985; 38: 241-252.
36. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982; 34: 285-290.
37. Frost HM. *Bone Biodynamics*. Little Brown. Boston 1964.
38. Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int* 1984; 36: S37-S45.
39. Canalis E. The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr Rev* 1983; 4: 62-77.
40. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. *N Engl J Med* 1983; 309: 29-35, 83-89.
41. Donahue HJ, Fryer MJ, Eriksen EF, Heath III H. Differential effects of parathyroid hormone and its analogues on cytosolic calcium ion and cAMP levels in cultured rat osteoblast-like cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 13522-13527.
42. Rosenbusch JP, Nichols Jr G. Parathyroid hormone effects on amino acid

- transport into bone cells. *Endocrinology* 1967; 81: 553-557.
43. Kream BE, Rowe D, Smith MD, Maher V, Majeska R. Hormonal regulation of collagen synthesis in a clonal rat osteosarcoma cell line. *Endocrinology* 1986; 119: 1922-1928.
44. Finkelstein JS, Klibansli A, Schaefer EH, Hornstein MD, Schiff I, Neer RM. Parathyroid hormone for the prevention of bone loss induced by estrogen deficiency. *N Engl J Med* 1994; 331: 1618-1623.
45. Fritsch J, Grosse B, Lieberherr M, Balsan S. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is required for growth-independent expression of alkaline phosphatase in cultured rat osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 639-645.
46. Beresford JN, Gallagher JA, Russell RGG. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and human bone-derived cells in vitro: Effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* 1986; 119: 1776-1785.
47. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992; 257: 88-91.
48. Samura A, Wada S, Suda S, Iitaka M, Katayama S. Calcitonin receptor regulation and responsiveness to calcitonin in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-κB ligand and macrophage colony-stimulating factor. *Endocrinology* 2000; 141: 3774-3782.

49. Burr DB, Milgrom C, Fyhrie D, Forwood M, Nyska M, Finestone A, Hoshaw S, Saiag E, Simkin A. In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone* 1996; 18: 405-410.
50. Chambers TJ, McSheehy PMJ, Thomson BM, Fuller K. The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinology* 1985; 60: 234-239.
51. Drivdahl RH, Howard GA, Baylink DJ. Extracts of bone contain a potent regulator of bone formation. *Biochem Biophys Acta* 1982; 714: 26-33.
52. Farley JR, Baylink DJ. Purification of a skeletal growth factor from human bone. *Biochemistry* 1982; 21: 3502-3507.
53. Vidal NOA, Brändström H, Jonsson KB, Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* 1998; 159: 191-195.
54. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2-12.
55. Hamilton JA, Lingelbach S, Partridge NC, Martin TJ. Regulation of plasminogen activator production by bone-resorbing hormones in normal and malignant osteoblasts. *Endocrinology* 1985; 116: 2186-2191.

56. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 127-132.
57. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 1982; 28: 2007-2016.
58. Delmas PD, Malaval L, Arlot ME, Meunier PJ. Serum bone gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985; 6: 339-341.
59. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling; assessment of bone turnover. *Endocr Rev* 1988; 9: 437-449.
60. García-Carrasco M, Gruson M, Vernejoul MC, Denne A, Miravet L. Osteocalcin and bone morphometric parameters in adults without bone disease. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 13-17.
61. Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC, Meunier PJ. Serum bone gla-protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; 1: 1091-1093.
62. Azria M. The value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 7-11.
63. Garrel DR, Delmas PD, Malaval L, Tourniaire J. Serum bone gla protein: a marker of bone turnover in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 1052-1055

64. Reid IR, Chapman GE, Fraser TRC, Davies AD, Surus AS, Meyer J, Huq NL, Ibbertson HK. Low serum osteocalcin levels in glucocorticoid-treated asthmatics. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 379-383.
65. Lukert BP, Higgins JC, Stoskopf MM. Serum osteocalcin is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 1056-1058.
66. Godschalk MF, Downs RW. Effect of short-term glucocorticoids on serum osteocalcin in healthy young men. *J Bone Miner Res* 1988; 3: 113-115.
67. Peretz A, Praet J-P, Bosson D, Rozenberg S, Bourdoux P. Serum osteocalcin in the assessment of corticosteroid induced osteoporosis. Effect of long and short term corticosteroid treatment. *J Rheumatol* 1989; 16: 363-367.
68. Ekenstam E, Stalenheim G, Hällgren R. The acute effect of high dose corticosteroid treatment on serum osteocalcin. *Metabolism* 1988; 37: 141-144.
69. Prummel MF, Wiersinga WM, Lips P, Sanders GTB, Sauerwein HP. The course of biochemical parameters of bone turnover during treatment with corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 382-386.
70. Kotowicz MA, Hall S, Hunder GG, Cedel SL, Mann KG, Riggs BL. Relationship of glucocorticoid dosage to serum bone gla-protein concentration in patients with rheumatologic disorders. *Arthritis Rheum.* 1990; 33:

- 1487-1492.
71. Osella G, Terzolo M, Reimondo G, Piovesan A, Pia A, Termine A, Paccotti P, Angeli A. Serum markers of bone and collagen turnover in patients with Cushing's syndrome and in subjects with adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3303-3307.
72. Sartorio A, Ambrosi B, Colombo P, Morabito F, Faglia G. Osteocalcin levels in Cushing's disease before and after treatment. *Horm Metabol Res* 1988; 20: 70.
73. Pocock NA, Eisman JA, Dunstan CR, Evans RA, Thomas DH, Huq NL. Recovery from steroid-induced osteoporosis. *Ann Intern Med* 1987; 107: 319-323.
74. Díaz Diego EM, Nacher M, Rapado A, Serrano S, Bosch J, Aubia J, de la Piedra C. Immunoreactive osteocalcin forms in conditioned media from human osteoblast culture and in sera from healthy adult control subjects and patients with bone pathologies. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 48-58.
75. Díaz Diego EM, Guerrero R, de la Piedra C. Six osteocalcin assays compared. *Clin Chem* 1994; 40: 2071-2077.
76. Garnero P, Grimaux M, Demiaux B, Preaudat C, Seguin P, Delmas PD. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1389-1398.

77. Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res* 1987; 2: 427-436.
78. Ebeling PR, Peterson JM, Riggs BL. Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1243-1250.
79. Hassager C, Risteli J, Risteli L, Jensen SB, Christiansen C. Diurnal variation in serum markers of type I collagen synthesis and degradation in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1307-1311.
80. Melkko J, Niemi S, Risteli L, Risteli J. Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1990; 36: 1328-1332.
81. Hassager C, Fabbri-Mabelli G, Christiansen C. The effect of the menopause and hormone replacement therapy on serum carboxyterminal propeptide of type I collagen. *Osteoporosis Int* 1993; 3: 50-52.
82. Suvanto-Luukkonen E, Risteli L, Sundström H, Penttinen J, Kauppila A, Risteli J. Comparison of three serum assays for bone collagen formation during postmenopausal estrogen-progestin therapy. *Clin Chim Acta* 1997; 266: 105-116.

83. Oikarinen A, Autio P, Vuori J, Väänänen K, Risteli L, Kiistala U, Risteli J. Systemic glucocorticoid treatment decreases serum concentrations of carboxyterminal propeptide of type I procollagen and aminoterminal propeptide of type III procollagen. *Br J Dermatol* 1992; 126: 172-178.
84. Lems WF, Gerrits MI, Jacobs JWG, van Vugt RM, van Rijn HJM, Bijlsma JWJ. Changes in (markers of) bone metabolism during high dose corticosteroid pulse treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 288-293.
85. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J* 1990; 271: 345-350.
86. Taubmann MB, Goldberg B, Sherr CJ. Radioimmunoassay for human procollagen. *Science* 1974; 186: 1115-1117.
87. Pedersen BJ, Bonde M. Purification of human procollagen type I carboxyl-terminal propeptide cleaved as in vivo from procollagen and used to calibrate a radioimmunoassay of the propeptide. *Clin Chem* 1994; 40: 811-816.
88. Melkko J, Hellevik T, Risteli L, Risteli J, Smedsrod B. Clearance of NH₂-terminal propeptides of types I and III procollagen is a physiologic function of the scavenger receptor in liver endothelial cells. *J Exp Med* 1994; 179: 405-412.
89. Linkhart SG, Linkhart TA, Taylor AK, Wergedal JE, Bettica P, Baylink DJ.

- Synthetic peptide-based immunoassay for amino-terminal propeptide of type I procollagen: application for evaluation of bone formation. *Clin Chem* 1993; 39: 2254-2258
90. Tähtelä R, Turpeinen M, Sorva R, Karonen S-L. The aminoterminal propeptide of type I procollagen: evaluation of a commercial radioimmunoassay kit and values in healthy subjects. *Clin Biochem* 1997; 30: 35-40.
91. Meduri GU, Tolley EA, Chinn A, Stentz F, Postlethwaite A. Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1432-1441.
92. Crowley S, Trivedi P, Risteli L, Risteli J, Hindmarsh PC, Brook CG. Collagen metabolism and growth in prepubertal children with asthma treated with inhaled steroids. *J Pediatr* 1998; 132: 409-413.
93. Melkko J, Kauppila S, Niemi S, Risteli L, Haukipuro K, Jukkola A, Risteli J. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1996; 42: 947-954.
94. Jensen CH, Hansen M, Brandt J, Rasmussen HB, Jensen PB, Teisner B. Quantification of the N-terminal propeptide of human procollagen type I (PINP): comparison of ELISA and RIA with respect to different molecular forms. *Clin Chim Acta* 1998; 269: 31-41.

95. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). Bull Johns Hopkins Hosp 1932; 50: 137-195.
96. Adinoff AD, Hollister JR. Steroid-induced fractures and bone loss in patients with asthma. N Engl J Med 1983; 309: 265-268.
97. Luengo M, Picado C, Del Río L, Guañabens N, Montserrat JM, Setoain J. Vertebral fractures in steroid dependent asthma and involutional osteoporosis: a comparative study. Thorax 1991; 46: 803-806.
98. Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis-mechanisms and management. Eur J Endocrinol 1997; 137: 209-217.
99. Dykman TR, Gluck OS, Murphy WA, Hahn TJ, Hahn BH. Evaluation of factors associated with glucocorticoid-induced osteopenia in patients with rheumatic diseases. Arthritis Rheum 1985; 28: 361-368.
100. Hahn TJ. Steroid and drug-induced osteopenia. En: Favus MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 2nd ed. New York, Raven Press, 1993: pp 250-255.
101. Joseph JC. Corticosteroid-induced osteoporosis. Am J Hosp Pharm 1994;51: 188-197.

102. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: 2001 update. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1496-1503.
103. Varonos S, Ansell BM, Reeve J. Vertebral collapse in juvenile chronic arthritis: Its relationship with glucocorticoid therapy. *Calcif Tissue Int* 1987; 41: 75-78.
104. Reid DM, Kennedy NSJ, Smith MA, Tothill P, Nuki G. Total body calcium in rheumatoid arthritis: effects of disease activity and corticosteroid treatment. *BMJ* 1982; 285: 330-332.
105. Gluck OS, Murphy WA, Hahn TJ, Hahn B. Bone loss in adults receiving alternate day glucocorticoid therapy. A comparison with daily therapy. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 892-898.
106. Rügsegger P, Medici TC, Anliker M. Corticosteroid-induced bone loss. A longitudinal study of alternate day therapy in patients with bronchial asthma using quantitative computed tomography. *Eur J Clin Pharmacol* 1983; 25: 615-620.
107. Nielsen HK, Thomsen K, Eriksen EF, Charles P, Storm T, Mosekilde L. The effects of high-dose glucocorticoid administration on serum bone gamma carboxyglutamic acid-containing protein, serum alkaline phosphatase and vitamin D metabolites in normal subjects. *Bone Miner* 1988; 4: 105-113.

108. Gennari C, Imbimbo B, Montagnani M, Bernini M, Nardi P, Avioli LV.
Effects of prednisone and deflazacort on mineral metabolism and parathyroid hormone activity in humans. *Calcif Tissue Int* 1984; 36: 245-252.
109. Gray RES, Doherty SM, Galloway J, Coulton L, de Broe M, Kanis JA.
A double-blind study of deflazacort and prednisone in patients with chronic inflammatory disorders. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 287-295.
110. Gennari C. Differential effect of glucocorticoids on calcium absorption and bone mass. *Br J Rheumatol.* 1993; 32 (suppl 2): 11-14.
111. Montecucco C, Baldi F, Fortina A, Tomassini G, Caporali R, Cherie-Ligniere EL, Fratino P. Serum osteocalcin (bone gla-protein) following corticosteroid therapy in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. Comparison of the effect of prednisone and deflazacort. *Clin Rheumatol* 1988; 7: 366-371.
112. LoCascio V, Ballanti P, Milani S, Bertoldo F, LoCascio C, Zanolin EM, Bonucci E. A histomorphometric long-term longitudinal study of trabecular bone loss in glucocorticoid-treated patients: prednisone versus deflazacort. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 199-204.
113. Jennings BH, Andersson KE, Johansson SA. The assessment of the systemic effects of inhaled glucocorticosteroids. The effects of inhaled budesonide vs oral prednisolone on calcium metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 41: 11-16.

114. Ali NJ, Capewell S, Ward MJ. Bone turnover during high dose inhaled corticosteroid treatment. *Thorax* 1991; 46: 160-164.
115. Packe GE, Douglas JG, McDonald AF, Robins SP, Reid DM. Bone density in asthmatic patients taking high dose inhaled beclomethasone dipropionate and intermittent systemic corticosteroids. *Thorax* 1992; 47: 414-417.
116. The Lung Health Study Research Group. Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 1902-1909.
117. Wong CA, Walsh LJ, Smith CJP, Wisniewski AF, Lewis SA, Hubbard R, Cawte S, Green DJ, Pringle M, Tattersfield AE. Inhaled corticosteroid use and bone-mineral density in patients with asthma. *Lancet* 2000; 355: 1399-1403.
118. Hodsman AB, Toogood JH, Jennings B, Fraher LJ, Baskerville JC. Differential effects of inhaled budesonide and oral prednisolone on serum osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 530-540.
119. Van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. Use of inhaled corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 581-588.
120. Spector TD, Hall GM, McCloskey EV, Kanis JA. Risk of vertebral fracture in women with rheumatoid arthritis. *BMJ* 1993; 306: 558.

121. Gratacós J, Collado A, Pons F, Osaba M, Sanmartí R, Roqué M, Larrosa M, Muñoz-Gómez J. Significant loss of bone mass in patients with early, active ankylosing spondylitis. A followup study. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2319-2324.
122. Als OS, Gotfredsen A, Christiansen C. The effect of glucocorticoids on bone mass in rheumatoid arthritis patients. Influence of menopausal state. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 369-375.
123. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 1990; 112: 352-364.
124. Seeman E, Wahner HW, Offord KP, Kumar R, Johnson WJ, Riggs BL. Differential effects of endocrine dysfunction on the axial and the appendicular skeleton. *J Clin Invest* 1982; 69: 1302-1309.
125. Ortoft G, Oxlund H. Reduced strength of rat cortical bone after glucocorticoid treatment. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 376-382.
126. Sambrook P, Birmingham J, Kempler S, Kelly P, Eberl S, Pocock N, Yeates M, Eisman J. Corticosteroid effects on proximal femur bone loss. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 1211-1216.
127. LoCascio V, Bonucci E, Imbimbo B, Ballanti P, Adami S, Milani S, Tartarotti D, DellaRocca C. Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. *Bone Miner* 1990; 8: 39-51.

128. Lufkin EG, Wahner HW, Bergstralh EJ. Reversibility of steroid-induced osteoporosis. *Am J Med* 1988; 85: 887-888.
129. Hermus AR, Smals AG, Swinkels LM, Huysmans DA, Pieters GF, Sweep CF, Corstens FH, Kloppenborg PW. Bone mineral density and bone turnover before and after surgical cure of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2859-2865.
130. Bressot C, Meunier PJ, Chapuy MC, Lejeune E, Edouard C, Darby AJ. Histomorphometric profile, pathophysiology and reversibility of corticosteroid-induced osteoporosis. *Metab Bone Dis Rel Res* 1979; 1: 303-311.
131. Laan RFJM, van Riel PLCM, van de Putte LBA, van Erning LJTO, van't Hof MA, Lemmens JAM. Low-dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1993; 119: 963-968.
132. Rizzato G, Montemurro L. Reversibility of exogenous corticosteroid-induced bone loss. *Eur Respir J* 1993; 6: 116-119.
133. Klein RG, Arnaud SB, Gallagher JC, DeLuca HF, Riggs BL. Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism. Role of 25-hydroxyvitamin D and corticosteroid dose. *J Clin Invest* 1977; 60: 253-259
134. Seeman E, Kumar R, Hunder GG, Scott M, Heath III H, Riggs BL. Production, degradation, and circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D in health and in chronic glucocorticoid excess. *J Clin Invest* 1980; 66: 664-669.

135. Hahn TJ, Halstead LR, Teitelbaum SL, Hahn BH. Altered mineral metabolism in glucocorticoid-induced osteopenia: Effect of 25-hydroxyvitamin D administration. *J Clin Invest* 1979; 64: 655-665.
136. Hahn TJ, Halstead LR, Baran DT. Effects of short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolite concentrations in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 111-115.
137. Zerwekh JE, Emkey RD, Harris ED. Low-dose prednisone therapy in rheumatoid arthritis: effect on vitamin D metabolism. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1050-1052.
138. Chesney RW, Mazess RB, Hamstra AJ, DeLuca HF. Reduction of serum-1,25-dihydroxyvitamin-D₃ in children receiving glucocorticoids. *Lancet* 1978; ii; 1123-1125.
139. Sambrook P, Birmingham J, Kelly P, Kempler S, Nguyen T, Stat M, Pocock N, Eisman J. Prevention of corticosteroid osteoporosis. A comparison of calcium, calcitriol and calcitonin. *N Engl J Med* 1993; 328: 1747-1752.
140. Hattersley AT, Meeran K, Burrin J, Hill P, Shiner R, Ibbertson HK. The effect of long- and short-term corticosteroids on plasma calcitonin and parathyroid hormone levels. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 198-202.
141. Fucik RF, Kukreja SC, Hargis GK, Bowser EN, Henderson WJ, Williams GA

- Effect of glucocorticoids on function of the parathyroid glands in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40: 152-155.
142. Suzuki Y, Ichikawa Y, Saito E, Homma M. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism* 1983; 32: 151-156.
143. Hodgson SF. Corticosteroid-induced osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990; 19: 95-111.
144. Feher JJ, Wasserman RH. Intestinal calcium-binding protein and calcium absorption in cortisol-treated chicks: Effects of vitamin D₃ and 1,25-dihydroxivitamin D₃. *Endocrinology* 1979; 104: 547-551.
145. Colette C, Monnier L, Pares Herbute N, Blotman F, Mirouze J. Calcium absorption in corticoid treated subjects. Effects of a single oral dose of calcitriol. *Horm Metabol Res* 1987; 19: 335-338.
146. Bockman RS, Weinerman SA. Steroid-induced osteoporosis. *Orthop Clin North Am* 1990; 21: 97-107.
147. Reid IR, Ibbertson HK. Evidence of decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. *Horm Res* 1987; 27: 200-204.
148. Williams GA, Peterson WC, Bowser EN, Henderson WJ, Hargis GK, Martínez NJ. Interrelationship of parathyroid and adrenocortical function in calcium homeostasis in the rat. *Endocrinology* 1974; 95: 707-712.

149. Ureña P, Iida-Klein A, Kong X-F, Jüppner H, Kronenberg HM, Abou-Samra A-B, Segre GV. Regulation of parathyroid hormone (PTH) /PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids and PTH in ROS 17/2.8 and OK cells. *Endocrinology* 1994; 134: 451-456.
150. McSheehy PMJ, Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 1986; 118: 824-828.
151. Dempster DW. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 137-141.
152. Chappard D, Legrand E, Basle MF, Fromont P, Racineux JL, Rebel A, Audran M. Altered trabecular architecture induced by corticosteroids: a bone histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 676-685.
153. Dempster DW, Arlot MA, Meunier PJ. Mean wall thickness and formation periods of trabecular bone packets in corticosteroid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 410-417.
154. Aaron JE, Francis RM, Peacock M, Makins NB. Contrasting microanatomy of idiopathic and corticosteroid-induced osteoporosis. *Clin Orthop* 1989; 243: 294-305.
155. Unterman TG, Phillips LS. Glucocorticoid effects on somatomedins and somatomedin inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 618-626.

156. Delany AM, Canalis E. Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology* 1995; 136: 4776-4781.
157. Conover CA, Lee PDK, Riggs BL, Powell DR. Insulin-like growth factor-binding protein-1. Expression in cultured human bone cells: regulation by insulin and glucocorticoid. *Endocrinology* 1996; 137: 3295-3301.
158. Saez JM, Morera AM, Haour F, Evain D. Effects of in vivo administration of dexamethasone, corticotropin and human chorionic gonadotropin on steroidogenesis and protein and DNA synthesis of testicular interstitial cells in prepuberal rats. *Endocrinology* 1977; 101: 1256-1263.
159. Sambrook PN, Eisman JA, Champion GD, Pocock NA. Sex hormone status and osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 973-978.
160. Reid IR, Ibbertson HK, France JT, Pybus J. Plasma testosterone concentrations in asthmatics men treated with glucocorticoids. *BMJ* 1985; 291: 574.
161. Hsueh AJ, Erickson GF. Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 1978; 32: 639-648.
162. Tobias J, Chambers TJ. Glucocorticoids impair bone resorptive activity and viability of osteoclasts disaggregated from neonatal rat long bones. *Endocrinology* 1989; 125: 1290-1295.

163. Raisz LG, Trummel CL, Wener JA, Simmons H. Effect of glucocorticoids on bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1972; 90: 961-967.
164. Dempster DW, Moonga BS, Stein LS, Horbert WR, Antakly T. Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J Endocrinol* 1997; 154: 397-406.
165. Reid IR, Katz JM, Ibbertson HK, Gray DH. The effects of hydrocortisone, parathyroid hormone and the bisphosphonate, APD, on bone resorption in neonatal mouse calvaria. *Calcif Tissue Int* 1986; 38: 38-43.
166. Teitelbaum SL, Malone JD, Kahn AJ. Glucocorticoid enhancement of bone resorption by rat peritoneal macrophages in vitro. *Endocrinology* 1981; 108: 795-799.
167. Gronowicz G, McCarthy MB, Raisz LG. Glucocorticoids stimulate resorption in fetal rat parietal bones in vitro. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 1223-1230.
168. Conaway HH, Grigorie D, Lerner UH. Stimulation of neonatal mouse calvarial bone resorption by the glucocorticoids hydrocortisone and dexamethasone. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1419-1429.
169. Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, Nishiyama K, Chihara K. Dexamethasone stimulates osteoclast-like cell formation by directly acting on hemopoietic blast cells and enhances osteoclast-like cell formation stimulated by parathyroid hormone and prostaglandin E₂. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 734-741.

170. Geisterfer M, Richards CD, Gauldie J. Cytokines oncostatin M and interleukin 1 regulate the expression of the IL-6 receptor (gp80. gp130). *Cytokine* 1995; 7: 503-509.
171. Delany AM, Dong Y, Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem* 1994; 56: 295-302.
172. Chen TL, Aronow L, Feldman D. Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. *Endocrinology* 1977; 100: 619-628.
173. Feldman D, Dziak R, Koehler R, Stern P. Cytoplasmic glucocorticoid binding proteins in bone cells. *Endocrinology* 1975; 96: 29-36.
174. Manolagas SC, Anderson DC. Detection of high-affinity glucocorticoid binding in rat bone. *J Endocrinol* 1978; 76: 379-380.
175. Haussler MR, Manolagas SC, Deftos LJ. Glucocorticoid receptor in clonal osteosarcoma cell lines: A novel system for investigating bone active hormones. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 94: 373-380.
176. Dietrich JW, Canalis EM, Maina DM, Raisz LG. Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology* 1979; 104: 715-721.
177. Chen TL, Cone CM, Feldman D. Glucocorticoid modulation of cell proliferation in cultured osteoblast-like bone cells: Differences between rat and mouse. *Endocrinology* 1983; 112: 1739-1745.

178. Canalis E. Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinology* 1983; 112: 931-939.
179. Hodge BO, Kream BE. Variable effects of dexamethasone on protein synthesis in clonal rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1988; 122: 2127-2133.
180. Hughes-Fulford M, Appel R, Kumegawa M, Schmidt J. Effect of dexamethasone on proliferating osteoblasts: inhibition of prostaglandin E₂ synthesis, DNA synthesis, and alterations in actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 1992; 203: 150-156.
181. Canalis E, Avioli L. Effects of deflazacort on aspects of bone formation in cultures of intact calvariae and osteoblast-enriched cells. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1085-1092.
182. Eilam Y, Silbermann M, Szydel N. Growth inhibition of clonal osteosarcoma cell-lines by low concentrations of glucocorticoid hormones. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96: 299-305.
183. Chyun YS, Kream BE, Raisz LG. Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation. *Endocrinology* 1984; 114: 477-480.
184. Chevalley T, Strong DD, Mohan S, Baylink DJ, Linkhart TA. Evidence for a role for insulin-like growth factor binding proteins in glucocorticoid inhibition of normal human osteoblast-like cell proliferation. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 591-

- 601.
185. Wong M-M, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, McBroom R, Aubin JE, Murray TM. Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 803-813.
186. Jonsson KB, Frost A, Larsson R, Ljunghall S, Ljunggren Ö. A new fluorometric assay for determination of osteoblastic proliferation: effects of glucocorticoids and insulin-like growth factor-I. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 30-36.
187. Kasperk C, Schneider U, Sommer U, Niethard F, Ziegler R. Differential effects of glucocorticoids on human osteoblastic cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 120-126.
188. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 1987; 121: 1985-1992.
189. Cheng S-L, Yang JW, Rifas L, Zhang S-F, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; 134: 277-286.
190. Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1991; 146: 370-378.

191. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt M, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1998; 102: 274-282.
192. Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblast in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1999; 140: 5339-5347.
193. Wong GL. Basal activities and hormone responsiveness of osteoclast-like and osteoblast-like bone cells are regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1979; 254: 6337-6340.
194. Delany AM, Gabbitas BY, Canalis E. Cortisol downregulates osteoblast $\alpha 1$ (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biochem* 1995; 57: 488-494.
195. Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S, Canalis E. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270: 26607-26612.
196. Shalhoub V, Conlon D, Tassinari M, Quinn C, Partridge N, Stein GS, Lian JB. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem* 1992; 50: 425-440.
197. Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical

- characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271: 1544-1550.
198. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner* 1991; 14: 237-250.
199. Chen TL, Hauschka PV, Cabrales S, Feldman D. The effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures: receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses. *Endocrinology* 1986; 118: 250-259.
200. Heinrichs AAJ, Bortell R, Rahman S, Stein JL, Alnemri ES, Litwack G, Lian JB, Stein GS. Identification of multiple glucocorticoid receptor binding sites in the rat osteocalcin gene promoter. *Biochemistry* 1993; 32: 11436-11444.
201. Morrison N, Eisman J. Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin promoter. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 969-975.
202. Hahn TJ, Westbrook SL, Halstead LR. Cortisol modulation of osteoblast metabolic activity in cultured neonatal rat bone. *Endocrinology* 1984; 114: 1864-1870.
203. McCulloch CAG, Tenenbaum HC. Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anatom Record* 1986; 215: 397-402.

204. Yamamoto I, Potts JT, Segre GV. Glucocorticoids increase parathyroid hormone receptors in rat osteoblastic osteosarcoma cells (ROS 17/2). *J Bone Miner Res* 1988; 3: 707-712.
205. Chen TL, Feldman D. Glucocorticoid potentiation of the adenosine 3', 5'-monophosphate response to parathyroid hormone in cultured rat bone cells. *Endocrinology* 1978; 102: 589-596.
206. Rodan SB, Fischer MK, Egan JJ, Epstein PM, Rodan GA. The effect of dexamethasone on parathyroid hormone stimulation of adenylate cyclase in ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology* 1984; 115: 951-958.
207. Chen TL, Hauschka PV, Feldman D. Dexamethasone increases 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ receptor levels and augments bioresponses in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1986; 118: 1119-1126.
208. Manolagas SC, Anderson DC, Lumb GA. Glucocorticoids regulate the concentration of 1,25-dihydroxycholecalciferol receptors in bone. *Nature* 1979; 277: 314-315.
209. Wong GL, Lukert BP, Adams JS. Glucocorticoids increase osteoblast-like bone cell response to 1,25 (OH)₂ D₃. *Nature* 1980; 285: 254-257.
210. Chen TL, Cone CM, Morey-Holton E, Feldman D. Glucocorticoid regulation of 1,25 (OH)₂ - vitamin D₃ receptors in cultured mouse bone cells. *J Biol Chem* 1982; 257: 13564-13569.

211. Godschalk M, Levy JR, Downs Jr RW. Glucocorticoids decrease vitamin D receptor number and gene expression in human osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 21-27.
212. Swolin D, Brantsing C, Matejka G, Ohlsson C. Cortisol decreases IGF-I mRNA levels in human osteoblast-like cells. *J Endocrinol* 1996; 149: 397-403.
213. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-I in skeletal cells. *Endocrinology* 1990; 126: 1569-1575.
214. Jonsson KB, Ljunghall S, Karlström O, Johansson AG, Mallmin H, Ljunggren Ö. Insulin-like growth factor I enhances the formation of type I collagen in hydrocortisone-treated human osteoblasts. *Biosci Rep* 1993; 13: 297-302.
215. Chen TL, Chang LY, Bates RL, Perlman AJ. Dexamethasone and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ modulation of insulin-like growth factor-binding proteins in rat osteoblast-like cell cultures. *Endocrinology* 1991; 128: 73-80.
216. Okazaki R, Riggs BL, Conover CA. Glucocorticoid regulation of insulin-like growth factor-binding protein expression in normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1994; 134: 126-132.
217. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Glucocorticoid regulation of transforming growth factor β 1 activity and binding in osteoblast-enriched

- cultures from fetal rat bone. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4490-4496.
218. Doherty WJ, DeRome ME, McCarthy MB, Gronowicz GA. The effect of glucocorticoids on osteoblast function. *J Bone Joint Surg* 1995; 77-A: 396-404.
219. Gronowicz GA, McCarthy MB. Glucocorticoids inhibit the attachment of osteoblasts to bone extracellular matrix proteins and decrease β_1 -integrin levels. *Endocrinology* 1995; 136: 598-608.
220. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993; 91: 1888-1896.
221. Long MW, Williams JL, Mann KG. Expression of human bone-related proteins in the hematopoietic microenvironment *J Clin Invest* 1990; 86: 1387-1395.
222. Bab I, Passi-Even L, Gazit D, Sekeles E, Ashton BA, Peylan-Ramu N, Ziv I, Ulmansky M. Osteogenesis in in vivo diffusion chamber cultures of human marrow cells. *Bone Miner* 1988; 4: 373-386.
223. Ng KW, Manji SS, Young MF, Findlay DM. Opposing influences of glucocorticoid and retinoic acid on transcriptional control in preosteoblasts. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 2079-2085.
224. Lajeunesse D, Frondoza C, Schoffield B, Sacktor B. Osteocalcin secretion by the human osteosarcoma cell line MG-63. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 915-922.

225. Ashton BA, Abdullah F, Cave J, Williamson M, Sykes BC, Couch M, Poser JW. Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: Preliminary assessment of their osteogenicity. *Bone* 1985; 6: 313-319.
226. Koshihara Y, Kawamura M, Oda H, Higaki S. In vitro calcification in human osteoblastic cell line derived from periosteum. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145: 651-657.
227. Ueno K, Katayama T, Miyamoto T, Koshihara Y. Interleukin-4 enhances in vitro mineralization in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 1521-1526.
228. Aufmkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER. Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 228-235.
229. Evans DB, Russell RGG, Brown BL, Dobson PRM. Agents affecting adenylate cyclase activity modulate the stimulatory action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the production of osteocalcin by human bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 1076-1085.
230. Marie PJ, Lomri A, Sabbagh A, Basle M. Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25: 373-380.

231. Marie PJ, de Vernejoul MC. Proliferation of bone surface-derived osteoblastic cells and control of bone formation. *Bone* 1993; 14: 463-468.
232. Marie PJ, Lomri A, de Vernejoul MC, Morieux C, Graulet AM, Guéris J, Llach F. Relationships between histomorphometric features of bone formation and bone cell characteristics *in vitro* in renal osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 1166-1173.
233. Marie PJ, Sabbagh A, de Vernejoul MC, Lomri A. Osteocalcin and deoxyribonucleic acid synthesis *in vitro* and histomorphometric indices of bone formation in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 272-279.
234. Lomri A, Marie PJ. Bone cell responsiveness to transforming growth factor β , parathyroid hormone, and prostaglandin E₂ in normal and postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 1149-1155.
235. Marie PJ, de Vernejoul MC, Connes D, Hott M. Decreased DNA synthesis by cultured osteoblastic cells in eugonadal osteoporotic men with defective bone formation. *J Clin Invest* 1991; 88: 1167-1172.
236. Marie PJ, de Vernejoul MC, Lomri A. Stimulation of bone formation in osteoporosis patients treated with fluoride associated with increased DNA synthesis by osteoblastic cells *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 103-113.
237. Gehron Robey P, Termine JD. Human bone cells *in vitro*. *Calcif Tissue Int*

- 1985; 37: 453-460.
238. Wergedal JE, Baylink DJ. Characterization of cells isolated and cultured from human bone. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 176: 60-69.
239. Keeting PE, Scott RE, Colvard DS, Anderson MA, Oursler MJ, Spelsberg TC, Riggs BL. Development and characterization of a rapidly proliferating, well-differentiated cell line derived from normal adult human osteoblast-like cells transfected with SV40 large T antigen. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 127-136.
240. Mills BG, Singer FR, Weiner LP, Holst PA. Cell cultures from bone affected by Paget's disease. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 1115-1120.
241. Marie PJ. Human osteoblastic cells: A potential tool to assess the etiology of pathologic bone formation. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1847-1850.
242. Puzas JE, Brand JS, Jackman KV. Isolation and characterization of bone cells from a patient with osteogenesis imperfecta type 1b. *Bone Miner* 1986; 1: 373-382.
243. Silve C, Grosse B, Tau C, Garabedian M, Fritsch J, Delmas PD, Cournot-Witmer G, Balsan S. Response to parathyroid hormone and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ of bone-derived cells isolated from normal children and children with abnormalities in skeletal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 583-590.

244. Dulbecco R, Freeman G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 1959; 8: 396-397.
245. Ham RG. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 53: 288-293.
246. Eagle H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 1959; 130: 432-437.
247. Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. *JAMA* 1967; 199: 519-524.
248. Puzas JE, Goodman DB. A rapid assay for cellular deoxyribonucleic acid. *Anal Biochem* 1978; 86: 50-55.
249. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures: *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
250. Nacher M, Serrano S, Mariñoso ML, García MC, Bosch J, Díez A, Lloreta J, Aubia J. In vitro synthesis of type I collagen: quantification of carboxyterminal propeptide of procollagen type I versus tritiated proline incorporation. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 224-228.
251. Braidman IP, Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders PTK, Hoyland JA. Localization of estrogen receptor β protein expression in adult human bone. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 214-220.

252. Nakase T, Miyaji T, Kuriyama K, Tamai N, Horiki M, Tomita T, Myoui A, Shimada K, Yoshikawa H. Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related peptide, Indian hedgehog, and patched in the process of endochondral ossification in the human. *Histochem Cell Biol* 2001; 116: 277-284.
253. Peck WA, Brandt J, Miller I. Hydrocortisone-induced inhibition of protein synthesis and uridine incorporation in isolated bone cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 57: 1599-1606.
254. Kream BE, Petersen DN, Raisz LG. Cortisol enhances the anabolic effects of insulin-like growth factor I on collagen synthesis and procollagen messenger ribonucleic acid levels in cultured 21-day rat calvariae. *Endocrinology* 1990; 126: 1576-1582.
255. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology* 2001; 40: 74-83.
256. Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 2001; 29: 498-505.
257. Palosaari H, Tasanen K, Risteli J, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Baseline

expression and effect of TGF-beta 1 on type I and III collagen mRNA and protein synthesis in human odontoblasts and pulp cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 2001; 68: 122-129.

258. Alvarez L, Peris P, Pons F, Guañabens N, Herranz R, Monegal A. Relationship between biochemical markers of bone turnover and bone scintigraphic indices in assessment of Paget's disease activity. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 461-468.

259. Risteli J, Risteli L. Assays of type I procollagen domains and collagen fragments: problems to be solved and future trends. *Scand J Clin Invest* 1997; 57: 105-113.

ANEXO

ANEXO 1

Dulbecco's Modified Eagle Medium

Component	mg/L
INORGANIC SALTS:	
CaCl ₂ • 2H ₂ O	264.00
CaCl ₂ (anhyd.)	—
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄ (anhyd.)	—
MgSO ₄ • 7H ₂ O	200.00
NaCl	3500.00
NaHCO ₃	3700.00
NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	—
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	125.00

OTHER COMPONENTS:	
D-Glucose	4500.00
Phenol Red	15.00
HEPES	5958.00
Sodium Pyruvate	—
Aminopterin	—
Hypoxanthine	—
Thymidine	—
AMINO ACIDS:	
L-Alanine	—
L-Asparagine	—
L-Arginine • HCl	84.00
L-Aspartic Acid	—
L-Cystine	48.00

L-Cystine • 2HCl	—
L-Glutamic Acid	—
L-Glutamine	580.00
L-Alanyl-L-Glutamine	—
Glycyl-L-Glutamine	—
Glycine	30.00
L-Histidine HCl • H ₂ O	42.00
L-Isoleucine	105.00
L-Leucine	105.00
L-Lysine HCl	146.00
L-Methionine	30.00
L-Phenylalanine	66.00
L-Proline	—
L-Serine	42.00

L-Threonine	95.00
L-Tryptophan	16.00
L-Tyrosine	72.00
L-Tyrosine (disodium salt)	—
L-Valine	94.00
VITAMINS:	
D-Ca pantothenate	4.00
Choline Chloride	4.00
Folic Acid	4.00
I-Inositol	7.20
Nicotinamide	4.00
Pyridoxine HCl	4.00
Riboflavin	0.40
Thiamine HCl	4.00

Nutrient Mixture Ham's F-12

Component	mg/L
INORGANIC SALTS:	
CaCl ₂ (anhyd.)	—
CaCl ₂ • 2H ₂ O	44.00
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.0024
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.83
KCl	223.60
MgCl ₂ (anhyd.)	—
MgCl ₂ • 6H ₂ O	122.00
NaCl	7599.00
NaHCO ₃	1176.00

Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	142.00
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.86
OTHER COMPONENTS:	
D-Glucose	1802.00
Hypoxanthine	4.00
Hypoxanthine (sodium salt)	—
Linoleic Acid	0.084
DL-68 Thioctic Acid	0.20
Phenol Red	1.20
Putrescine 2HCl	0.161
Sodium Pyruvate	110.00
Thymidine	0.70
AMINO ACIDS:	
L-Alanine	8.90

L-Arginine • HCl	211.00
L-Asparagine • H ₂ O	—
L-Asparagine (free base)	13.00
L-Aspartic Acid	13.30
L-Cysteine HCl	36.00
L-Cysteine HCl • H ₂ O	—
L-Glutamic Acid	14.70
L-Glutamine	146.00
L-Alanyl-L-Glutamine	—
Glycine	7.50
L-Histidine • HCl • H ₂ O	21.00
L-Isoleucine	4.00
L-Leucine	13.00

L-Lysine • HCl	36.50
L-Methionine	4.50
L-Phenylalanine	5.00
L-Proline	34.50
L-Serine	10.50
L-Threonine	12.00
L-Tryptophan	2.00
L-Tyrosine	5.40
L-Tyrosine (disodium salt)	—
L-Valine	11.70
VITAMINS:	
Biotin	0.0073
D-Ca Pantothenate	0.50

Choline Chloride	14.00
Folic Acid	1.30
I-Inositol	18.00
Niacinamide	0.036
Pyridoxine HCl	0.06
Riboflavin	0.037
Thiamine HCl	0.30
Vitamin B ₁₂	1.40

Minimum Essential Medium (MEM)

Component	mg/L
INORGANIC SALTS:	
CaCl ₂ (anhyd.)	200.00
CaCl ₂ • 2H ₂ O	—
KCl	400.00
KH ₂ PO ₄	—
MgCl ₂ • 6H ₂ O	—
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67
MgSO ₄ • 7H ₂ O	—
NaCl	6800.00
NaHCO ₃	—
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	140.00

NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	—
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	—
OTHER COMPONENTS:	
D-Glucose	1000.00
HEPES	—
Phenol Red	10.00
AMINO ACIDS:	
L-Alanine	—
L-Arginine • HCl	126.00
L-Asparagine • H ₂ O	—
L-Aspartic Acid	—
L-Cystine	—
L-Cystine • 2HCl	31.29

L-Glutamic Acid	—
L-Glutamine	292.00
L-Alanyl-L-Glutamine	—
Glycine	—
L-Histidine HCl • H ₂ O	42.00
L-Isoleucine	52.00
L-Leucine	52.00
L-Lysine HCl	72.50
L-Methionine	15.00
L-Phenylalanine	32.00
L-Proline	—
L-Serine	—
L-Threonine	48.00

L-Tryptophan	10.00
L-Tyrosine	—
L-Tyrosine (disodium salt)	51.90
L-Valine	46.00
VITAMINS:	
D-Ca pantothenate	1.00
Choline Chloride	1.00
Folic Acid	1.00
I-Inositol	2.00
Nicotinamide	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavin	0.10
Thiamine HCl	1.00

RPMI 1640 Medium

Component	mg/L
INORGANIC SALTS:	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	100.00
KCl	400.00
MgSO_4 (anhyd.)	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100.00
NaCl	6000.00
NaHCO_3	2000.00
Na_2HPO_4 (anhyd.)	800.00
OTHER COMPONENTS:	
D-Glucose	2000.00
Glutathione (reduced)	1.00
HEPES	—
Phenol Red	5.00
AMINO ACIDS:	
L-Arginine (free base)	—
L-Arginine HCl	200.00
L-Asparagine (free base)	50.00
L-Aspartic Acid	20.00
L-Cystine	50.00
L-Cystine $\cdot 2\text{HCl}$	—
L-Glutamic Acid	20.00
L-Glutamine	300.00
L-Alanyl-L-Glutamine	—
Glycyl-L-Glutamine	—
Glycine	10.00
L-Histidine (free base)	15.00
L-Hydroxyproline	20.00
L-Isoleucine	50.00
L-Leucine	50.00
L-Lysine $\cdot \text{HCl}$	40.00
L-Methionine	15.00
L-Phenylalanine	15.00
L-Proline	20.00
L-Serine	30.00
L-Threonine	20.00
L-Tryptophan	5.00
L-Tyrosine	20.00
L-Tyrosine (disodium salt)	—
L-Valine	20.00
VITAMINS:	
D-Biotin	0.20
D-Ca pantothenate	0.30
Choline Chloride	3.00
Folic Acid	1.00
D-Inositol	35.00
Nicotinamide	1.00
Para-aminobenzoic Acid	1.00
Pyridoxal HCl	1.00
Riboflavin	0.20
Thiamine HCl	1.00
Vitamin B ₁₂	0.005

Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS)

Component	g/L
INORGANIC SALTS:	
CaCl_2 (anhyd.)	1.40
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	—
KCl	4.00
KH_2PO_4	0.60
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.00
MgSO_4 (anhyd.)	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00
NaCl	80.00
NaHCO_3	—
Na_2HPO_4	—
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.90
OTHER COMPONENTS:	
D-Glucose	10.00
Phenol Red ^c	0.10

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE

La osteoporosis es una enfermedad metabólica ósea que afecta principalmente a personas mayores de 50 años produciendo una fragilidad ósea y un aumento del riesgo de fracturas. Además de la edad, existen otros factores que aumentan el riesgo de padecer dicha enfermedad como son la existencia de ciertas enfermedades o la ingesta de determinados medicamentos como los glucocorticoides.

El objetivo de nuestro estudio es investigar, a nivel celular, los mecanismos implicados en la osteoporosis inducida por glucocorticoides. Para ello realizaremos un estudio experimental in vitro en el cual analizaremos los efectos que producen los glucocorticoides sobre las células óseas.

En el transcurso de la intervención quirúrgica que usted precisa por su patología de cadera se le extraerán unos fragmentos óseos para la colocación de la prótesis. Posteriormente y, en el caso de que Vd. dé su consentimiento, se utilizarán dichos fragmentos para la realización del estudio experimental antes mencionado.

Este estudio contribuirá a un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de esta enfermedad y, como consecuencia, a un abordaje terapéutico más específico.

Fdo.: El Paciente

DNI

El Médico

Nº colegiado

