

UCH-FCC
Biotecnología
R 741
C-1



Universidad de Chile - Facultad de Ciencias

Escuela de Pregrado



**Estudio comparativo de dos dosis de DKK-1 en la inhibición
de cambios hipertróficos en pellets de Células Madre
Mesenquimáticas**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Andrea Rojas Moreira

Director del Seminario de Título: Dr. Facundo las Heras

Co-Director: Dr. Mario Galindo

Profesor Patrocinante: Dra. Verónica Palma

Julio, 2016

Santiago -Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

ANDREA PAZ ROJAS MOREIRA

“Estudio comparativo de dos dosis de DKK-1 en la inhibición de cambios hipertróficos en pellets de Células Madre Mesenquimáticas”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Facundo Las Heras
Director Seminario de Título

Mario Galindo
Co-Director Seminario de Título

Dra. Verónica Palma
Prof. Patrocinante del Seminario



Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Alejandro Roth
Presidente

Dr. Alexander Vargas
Evaluador

Santiago, Julio de 2016

Biografía

Mi nombre es Andrea Rojas Moreira, soy parte de una familia de 5 integrantes. Una hermana melliza, loca como ella sola, pero tremendamente buena, de un corazón gigante. Un hermano mayor, que velo por que crezca fuerte (con exceso de comida) y nos guío, junto con mi hermana, por el deporte, los viajes y las risas. Y mis padres incondicionales, siempre apoyándome, guiándome y regalomeándome.



Mis estudios de enseñanza básica los realicé en Maipú, en el colegio Alberto Widmer, donde jugué por montones. Luego, llegó la exigencia académica junto con el baile en el Liceo N°1 Javiera Carrera. Allí di mis primeros pasos en el baile, que me acompañan día a día. Ingresé a la Universidad de Chile el año 2010 a la carrera de Biología con mención en medio ambiente, donde conocí hermosas personas, muy alegres y sencillas, que llenaron de risas y buenos momentos mi estadía por la Universidad. El 2011 me cambié a la carrera de Ingeniería en Biotecnología molecular, carrera que culminó con este seminario de título. Conocí dos hermosas mujeres, junto con nuevos amigos. En esta carrera descubrí lo que me gusta, la biomedicina, contribuir por medio de la ciencia a mejorar la calidad de vida de las personas.

Agradezco a mi familia hermosa, a mis amigos y

al baile que alegran mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tejido cartilaginoso.....	1
1.2 Condrogénesis y osificación endocondral	3
1.3 Vía WNT canónica.....	6
1.4 Lesiones condrales	8
1.5 Terapias quirúrgicas y celulares de lesiones condrales	9
1.6 Uso de CMMs para regeneración de cartílago.....	11
1.7 Inhibición de cambios hipertróficos	12
1.8 Hipótesis.....	17
1.9 Objetivo general.....	17
2.0 Objetivos específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 Materiales	18
2.1.1 Material Plástico y Vidrio.....	18
2.1.2 Materiales utilizados para Cultivo Celular	18
2.1.3 Materiales utilizados para Histología	19
2.1.4 Ensayo viabilidad celular.....	19
2.1.5 Cultivos Celulares	19
2.1.6 Materiales utilizados para Western Blot.....	19
2.1.7 Anticuerpos	19
2.2 Metodología.....	20
2.2.1 Extracción y expansión de CMMs.....	20
2.2.2 Ensayo de viabilidad celular.....	20

2.2.3 Diferenciación condrogénica en pellet	21
2.2.4 Inhibición de la vía WNT canónica.....	22
2.2.5 Tinción de fosfatasa alcalina (FAL).....	22
2.2.6 Procesamiento para análisis histológico e inmunohistoquímica	23
2.2.7 Detección de Glicosaminoglicanos (GAGs).....	23
2.2.8 Inmunohistoquímica (IHQ)	23
2.2.9 Análisis de tamaño celular	24
2.2.10 Western Blot.....	24
RESULTADOS.....	26
3.1 Viabilidad celular de CMMs tratadas con DKK-1	26
3.2 Inhibición de la vía WNT canónica por DKK-1 durante la diferenciación condrogénica de CMMs	27
3.3 Inhibición de cambios hipertróficos durante la diferenciación <i>in vitro</i> de condrocitos a partir de CMMs	33
3.4 Inducción de la expresión de marcadores de cartilago hialino	40
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: VIABILIDAD CELULAR DE CMMS TRATADAS CON DKK-1.	27
FIGURA 2: PELLET CELULAR.....	28
FIGURA 3: PRESENCIA DE B-CATENINA MEDIANTE IHQ.....	30
FIGURA 4: NIVEL DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT CANÓNICA POR WESTERN BLOT Y SU ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO..	32
FIGURA 5: PRESENCIA DE COL X MEDIANTE IHQ.....	34
FIGURA 6: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FAL.....	36
FIGURA 7: ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA Y TAMAÑO CELULAR.....	39
FIGURA 8: PRESENCIA DE COL II AL DÍA 21 POR IHQ.....	41
FIGURA 9: PRESENCIA DE GAGS MEDIANTE TINCIÓN DE AZUL DE TOLUIDINA.....	42

ABREVIATURAS

CMMs	: Células Madres Mesenquimáticas
Col II	: Fibras de colágeno tipo II
Col X	: Fibras de colágeno tipo X
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DKK-1	: Dickkopf-1
EDTA	: Ácido etilen diamino tetraacético
FAL	: Fosfatasa Alcalina
GAGs	: Glicosaminoglicanos
HLA	: Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad.
ISCT	: Sociedad Internacional de Terapia Celular
ME	: Medio de Expansión
MIC	: Medio Inductor a Condrogénesis
MMP13	: Metaloproteinasa 13
PBS	: Tampón fosfato salino estéril
Runx2	: Factor de Transcripción Relacionado a Runt 2
Rpm	: Revoluciones por minuto
Saos-2	: Células de Osteosarcoma Humano
SFB	: Suero Fetal Bovino
Sox9	: Factor de transcripción de linaje condrogénico
TGF-β	: Factor de Crecimiento Transformante Beta
VEGF	: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

RESUMEN

Las lesiones de cartílago articular son frecuentes en pacientes de edad avanzada y en deportistas. Se caracterizan por la disrupción del tejido cartilaginoso, originando una fisura que en etapas avanzadas puede ocasionar dolor y pérdida de la función articular. Estas lesiones deben ser tratadas debido a la limitada capacidad de regeneración tisular y a la progresiva degeneración del tejido dañado. Actualmente existen técnicas quirúrgicas que alivian dolores y permiten la funcionalidad articular, pero no son capaces de frenar la progresiva degeneración del cartílago.

El uso de Células Madre Mesenquimáticas (CMMs) para la regeneración de cartílago articular tiene un futuro promisorio debido a las variadas fuentes de obtención y a su inherente capacidad de diferenciación condrogénica. Sin embargo, su diferenciación *in vitro* a linaje condrogénico estimula la diferenciación terminal de estas, imitando el proceso de osificación endocondral. Los condrocitos adquieren un fenotipo hipertrófico que promueve la mineralización del tejido, en vez de adquirir un fenotipo condrocitario estable, presente en el tejido cartilaginoso sano. Este fenotipo hipertrófico está regulado principalmente por la vía WNT/ β -catenina, por lo que la inhibición de esta mediante el uso de un antagonista natural presente en el cartílago articular sano, Dickkopf-1 (DKK-1), puede ser un tratamiento promisorio para mejorar la diferenciación de CMMs y poder desarrollar terapias celulares capaces de regenerar el tejido dañado en el cartílago articular.

En este trabajo se estudió el efecto de dos dosis de DKK-1 (50 y 200 ng/ml) en la inhibición de cambios hipertróficos. Para ello, pellets de CMMs de médula ósea se cultivaron en medio inductor a condrogénesis por 21 días, adicionando DKK-1

desde el tercer día de inducción. Ambas dosis estudiadas mostraron no afectar la viabilidad celular. Se analizó la presencia de marcadores de cartílago hialino sano (Col II y GAGs) e hipertrófico (Col X, FAL, β -catenina nuclear e incremento del tamaño celular). El tratamiento con ambas dosis disminuyó la expresión de marcadores de hipertrofia y aumentó la expresión de marcadores de cartílago hialino sano. La dosis con mejor resultado fue 200 ng/ml de DKK-1. Con esta dosis se logró un incremento en la expresión de Col II y GAGs al día 21. Un retraso en la expresión de Col X al día 14 y una disminución de Col X y FAL al día 21. Consecuentemente, se disminuyó la localización nuclear de β -catenina, observándose además, una disminución del tamaño celular (menor porcentaje de condrocitos hipertróficos) y una morfología más similar a condrocitos quiescentes. Estos resultados permiten acercarse a un fenotipo condrocitario estable para el desarrollo de terapias celulares con CMMs para la regeneración de tejido cartilaginoso.

ABSTRACT

Articular cartilage injuries are highly prevalent in elderly patients as well as in athletes. They are characterized by disruption of cartilage tissue, causing a surfacing fissures that in advanced stages can cause pain and loss of joint function. These lesions should be treated due to the limited capacity of tissue regeneration and progressive degeneration of damaged tissue. Currently surgical techniques can relieve pain and can allow joint function but are unable to stop the progressive degeneration of tissue.

The use of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) for regeneration of articular cartilage has a promising future due to various obtention sources and their inherent ability of chondrogenic differentiation. However, the *in vitro* differentiation of these cells into chondrogenic lineage stimulates terminal differentiation, imitating the process of endochondral ossification. Chondrocytes acquire a hypertrophic phenotype that promotes mineralization of the tissue, rather than acquire a stable phenotype present in the healthy cartilaginous tissue. This hypertrophic phenotype is mainly regulated by the WNT/ β -catenin pathway. Inhibition of this by a natural antagonist present in healthy articular cartilage, Dickkopf-1 (DKK-1), may be a promising treatment to improve the differentiation of MSCs and to develop cell therapies able to regenerate damaged articular cartilage tissue.

We studied the effect of two doses of DKK-1 (50 and 200 ng/ml) in the inhibition of hypertrophic changes. For this, bone marrow MSCs pellets culture were grown in chondrogenic medium for 21 days, in the presence of DKK-1 from the third day onwards. Both doses studied showed not affect cell viability. The presence of markers of healthy hyaline cartilage (and GAGs Col II) and hypertrophic cartilage (Col

X, FAL, nuclear β -catenin and increased cell size) was analyzed. Treatment with both doses decreased the expression of hypertrophy markers and increased expression of healthy hyaline cartilage markers. The most effective dose was 200 ng/ml of DKK-1. This dose achieved an increase in Col II and GAGs expression at day 21. A delayed expression of Col X at day 14 and a decreased expression of Col X and FAL by day 21. Consequently, the nuclear localization of β -catenin was decreased, observing a decrease in cell size (decrease percentage of hypertrophic chondrocytes) and morphology similar to quiescent chondrocytes. These results are a better approach to a stable chondrogenic phenotype for the development of cell therapy with MSCs for cartilage tissue regeneration.

INTRODUCCIÓN

1.1 Tejido cartilaginoso

El cartílago es un tejido conectivo altamente especializado presente en articulaciones, vías respiratorias, pabellón auricular y cartílagos costales. Se caracteriza por ser un tejido avascular, aneural y alinfático (Ghadially, 1978). Su principal función durante la adultez es de sostén, pero además tiene una importante función durante el desarrollo embrionario ya que permite la formación de huesos.

Existen tres tipos de cartílago (hialino, elástico y fibroso) formados por un único componente celular (condrocitos) y una abundante matriz extracelular (MEC) que varía en su composición en cada uno. El cartílago hialino es el más abundante en el organismo y está presente principalmente en articulaciones.

El cartílago articular presenta una superficie lisa y perfectamente lubricada por el líquido sinovial, proporcionando una interfaz dinámica que facilita la movilidad sin dolor ni fricción. Permite resistir, distribuir y transmitir cargas compresivas y fuerzas de cizallamiento, gracias a la composición de su MEC. Esta última está compuesta principalmente por agua, fibras de Col II y proteoglicanos, y en menor medida por otras fibras de Col IX, XI y proteínas no colagénicas, menos abundantes, como fibronectinas, proteína de matriz oligomérica de cartílago (COMP), biglican, decorinas, matrilinas, entre otras. Dichos componentes de MEC interactúan entre ellos y con condrocitos. Las interacciones célula-MEC ocurre principalmente mediante receptores de membrana celular tipo integrinas (Shakibaei & Mobasheri, 2003; Mobasheri y col., 2002), que interactúan con fibronectinas y fibras de Col II (Camper y col., 1998), o

mediante proteínas de superficie como CD44 que interactúa con ácido hialurónico (Ishida y col., 1997). De esta manera es posible una comunicación con el medio extracelular, el cual promueve la diferenciación condrogénica y estimula a su vez la síntesis de MEC (Sah y col., 1989; Steinmeyer y col., 1997).

Entre los componentes orgánicos de la MEC del cartílago hialino, el Col II (Col2A1) es el más abundante y característico del cartílago articular sano, representando el 95% de las fibras colagénicas (Sophia y col., 2009). Permite resistir las fuerzas compresivas a las que está expuesta la articulación a diario gracias a su distribución diferencial (fibras paralelas a la superficie en la zona más superficial y perpendiculares en la zona más cercana al hueso subcondral) a lo largo del cartílago.

El segundo componente orgánico más importante de la MEC del cartílago articular son los proteoglicanos, específicamente agreganos. Estos se caracterizan por estar formados por una cadena principal de ácido hialurónico a la cual se le unen entre 80 a 200 glicosaminoglicanos (GAGs), fuertemente sulfatados, es decir, que presentan cargas negativas que atraen cationes, en gran medida iones sodio, que por sus capacidades osmóticas permite almacenar grandes cantidades de agua en la MEC. El agua lubrica el tejido, le da flexibilidad y, debido a la presión de turgencia que genera, el cartílago es capaz de resistir grandes fuerzas de compresión. Además, facilita el flujo de nutrientes desde el líquido sinovial y hueso subcondral hacia los condrocitos. De la misma manera, el oxígeno difunde a los condrocitos, en un rango que disminuye hacia el centro del cartílago, permaneciendo estas células en un ambiente de hipoxia (Goldring & Marcu, 2009).

En el tejido cartilaginoso maduro los condrocitos representa el 1-2% del volumen de la MEC (Aigner & Stöve, 2003) y no son capaces de proliferar, limitando la capacidad de regeneración del tejido. Los condrocitos están encargados de mantener

la homeostasis del tejido a través de la síntesis de los componentes de la MEC y la expresión de enzimas involucradas en la degradación de estos como hialuronidasas (Flannery y col., 1998), metaloproteinasas (Shlopov y col., 1997) y agrecanasas (Buttle y col., 1997). El balance entre anabolismo y catabolismo está dado mediante estímulos externos como vitaminas, citoquinas, hormonas, niveles de oxígeno y fuerzas mecánicas (Hering, 1999). El correcto balance entre ambos permite mantener el cartílago articular en óptimas condiciones para su funcionamiento.

1.2 Condrogénesis y osificación endocondral

El proceso de diferenciación condrogénica, denominado condrogénesis, comienza en estadios embrionarios tempranos, dando origen a dos formas de tejido cartilaginoso hialino: transitorio y estable . El primero de estos está presente en etapas embrionarias, actuando como un molde cartilaginoso que será reemplazado por tejido óseo. En este estadio los condrocitos sufren diferenciación terminal (hipertrofia condrocitaria), mediante el proceso de osificación endocondral, permitiendo la mineralización y vascularización del tejido para la formación de huesos. El segundo se encuentra principalmente en articulaciones, en el extremo distal de huesos, y está formado por condrocitos quiescentes que no sufren diferenciación terminal. (Kronenberg, 2003, 2006; Provot & Schipani, 2005).

En la etapa embrionaria, el proceso de condrogénesis se inicia con la migración y condensación de CMMs (Fell, 1925), producto de un aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular como cadherina neural (N-cadherin), molécula de adhesión celular neural (N-CAM) y uniones "gap junctions" (DeLise y col., 2000), aumentando la densidad celular. Estas CMMs no diferenciadas producen una matriz

extracelular rica en fibras de colágeno tipo I (Dessau y col., 1980), hialuronasas (Knudson & Toole, 1985), tenasina (Mackie y col., 1987, 1996 y 1998) y fibronectina (Kulyk y col., 1989a). La MEC junto con las uniones celulares estimulan la expresión del principal factor de transcripción de linaje condrogénico sex-determining region Y-box 9 (Sox9) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Este último está involucrado en todas las etapas del proceso de diferenciación condrogénica, comenzando por la condensación celular, proliferación y diferenciación terminal, estimulando la expresión de genes específicos del fenotipo condrogénico (van der Kraan y col., 2009). A su vez, Sox9 es capaz de interactuar con elementos enhacer de los promotores de los genes de *Col2A1* y *Col11A1* promoviendo su expresión (Lefebvre y col., 1997; Bridgewater y col., 1998; Sekiya y col., 2000). Sox9 además, induce la expresión de los factores de transcripción L-Sox5 y Sox6, que ayudan a promover la expresión de Col II y agrecanos (Lefebvre y col., 2001; Ikeda y col., 2004), comprometiendo las células en un linaje condrogénico (Akiyama y col., 2002).

Otras proteínas de MEC, como tenasina, tromboponsinas y COMP interactúan con moléculas de adhesión celular activando distintas vías de señalización que regulan negativamente el proceso de condensación celular a través de la expresión de quinasas de adhesión focal y paxilina. Este proceso disminuye la presencia de moléculas de adhesión celular finalizando el proceso de condensación y permitiendo el compromiso hacia un linaje condrogénico. Las células pro-condrogénicas comienza a sintetizar moléculas de MEC características de cartílago hialino, como fibras de Col II (Kosher y col., 1986, 1989; Kravis y col., 1985), IX (Swiderski y col., 1992; Kulyk y col., 1991), XI y agrecanos (Hascall y col., 1976; Mallein-Gerin y col., 1988), mientras que la expresión de colágeno tipo I se ve reducida (Ede, 1983). Las células pro-condrogénicas inmersas en esta matriz extracelular adquieren una morfología

redondeada, característica de condrocitos. De esta forma se desarrolla un molde cartilaginoso temporal que dará origen al tejido óseo a través del proceso de osificación endocondral (Olsen y col., 2000). En este último los condrocitos sufren un proceso de diferenciación terminal llamado hipertrofia condrocitaria, el cual está regulado por el factor de transcripción runt-related transcription factor 2 (Runx2). Runx2 estimula la expresión de fibras de Col X (Zheng y col., 2003), FAL (Banerjee y col., 1997), metaloproteinasa 13 (MMP13), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hellingman y col., 2011), entre otros. La expresión de Runx2 y Col X junto con el incremento del tamaño celular son los marcadores de hipertrofia condrocitaria más utilizados en estudios de diferenciación condrogénica. El incremento en el tamaño celular de condrocitos puede llegar a ser hasta 20 veces el tamaño de condrocitos quiescentes (Las Heras y col., 2012), permitiendo el crecimiento longitudinal de huesos.

Las fibras de Col X son características de la MEC de condrocitos hipertróficos. Son importantes en el proceso de osificación endocondral, ya que permiten una organización de la MEC que favorece la mineralización del tejido (Kwan y col., 1991).

Enzimas metaloproteinasas son fundamentales para la remodelación de la MEC. En especial, MMP13 es secretada al medio extracelular, degradando fibras de Col II (Inada y col., 2004) y agrecanos (Fosang y col., 1996), generando la disminución de estos y el aumento de Col X en el tejido.

La mineralización de la MEC es promovida por la enzima FAL, la cual hidroliza pirofosfato, produciendo fosfato inorgánico que reacciona con calcio y un grupo hidroxilo para formar hidroxapatita, que es parte del proceso de mineralización del tejido. Los condrocitos hipertróficos inmersos en esta matriz mineralizada están imposibilitados de recibir nutrientes por difusión, por lo que mueren por apoptosis

celular (Adams & Shapiro, 2002), liberando sustancias que promueve la invasión de células osteoprogenitoras desde el pericondrio (tejido que rodea al cartílago). Estas células comienzan la síntesis de tejido óseo primario sobre la matriz cartilaginosa mineralizada, la cual posteriormente es vascularizada debido a la expresión de VEGF. De esta forma en este cartílago hialino se desarrolla un primer y segundo centro de osificación quedando el cartílago hialino, que inicialmente ocupaba todo el tejido (cartílago transitorio), solo en el extremo de huesos formando el cartílago articular (cartílago estable).

1.3 Vía WNT canónica

La vía WNT es una vía celular ampliamente conservada, involucrada en la embriogénesis, organogénesis y formación de tumores (Miller, 2002). Posee tres posibles cascadas intracelulares por las cuales puede actuar: la vía c-Jun Kinasa N-terminal, WNT/Ca⁺² y la vía WNT canónica o WNT/ β -catenina (Yano y col., 2005). Esta última es la más estudiada en relación al proceso de diferenciación condrogénica.

La vía WNT canónica actúa mediante β -catenina, permitiendo su acumulación o degradación a nivel citoplasmático cuando la vía esta activa (presencia de ligandos WNT) o inactiva (ausencia de ligandos WNT), respectivamente.

Cuando la vía WNT está inactiva, es decir, en ausencia de ligandos WNT, β -catenina es fosforilada por el complejo proteico Axin compuesto por la proteína andamio Axina, el producto del gen supresor de tumor poliposis coli adenomatosa (APC), caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). CK1 y GSK3 fosforilan secuencialmente la región amino terminal de β -catenina, permitiendo el

reconocimiento por β -Trcp, subunidad E3 de ubiquitina ligasa produciendo la ubiquitinación y posterior degradación proteosómica (He y col., 2004).

Por otro lado cuando la vía WNT está activa, un ligando se une al receptor transmembrana Frizzled (Fzd) (Logan & Nusse, 2004) y al co-receptor lipoproteína de baja densidad 5 o 6 (LRP5/6), formando un complejo WNT-Fzd-LRP5/6 que intracelularmente recluta a la proteína andamio Dishevelled (Dvl), produciendo la fosforilación de LRP6, la activación y el reclutamiento del complejo Axina, bloqueando la fosforilación de β -catenina. Esto permite la acumulación citoplasmática de β -catenina, la cual se trasloca al núcleo e interactúa con factor estimulador linfóide (LEF) y al factor de células T (LEF-1/ TCF) activando la transcripción de genes específicos.

Los ligando WNT son una familia de 19 glicoproteínas secretadas, gracias a un dominio rico en cisteínas (Miller, 2002). Estas proteínas son capaces de interactuar con receptores Fzd activando la vía WNT canónica o WNT/ Ca^{2+} (Van Amerongen y col., 2008) (Miller y col., 1999) (Kuhl y col., 2000). Se han asociado a distintas etapas del proceso de diferenciación condrogénica, así como también a enfermedades de cartilago. Algunos ligandos como, WNT3a y WNT5b, promueven la diferenciación condrogénica y retrasan la hipertrofia (Hill y col., 2005), otros como, WNT4 y WNT8 inducen hipertrofia condrocitaria (Day y col., 2005; Hill y col., 2005), mientras que algunos, como WNT5a tienen una acción dual, en etapas tempranas induce la condrogénesis e hipertrofia condrocitaria, pero en etapas tardías inhibe la hipertrofia (Hu y col., 2005). De manera similar la sobreexpresión de WNT11 en CMMs promueve la diferenciación condrogénica y estimula la expresión de Runx2 e IHH (Hens y col., 2005). Además la expresión de WNT16, asociado a la activación de la vía WNT canónica, se ha encontrado presente en etapas tempranas de artrosis (Hill y col., 2006). Así, la acción conjunta de estos ligandos permiten la diferenciación

condrogénica y la mantención de la homeostasis del tejido cartilaginoso, demostrando el rol central de la vía WNT.

El nivel de activación de esta varía durante el proceso de diferenciación condrogénica. Inicialmente la acumulación de β -catenina es alta en células precondrogénicas, permitiendo la condensación celular a través de contactos celulares y su diferenciación. Luego es necesario una disminución de los niveles de β -catenina para el mantenimiento de un perfil condrogénico estable. Finalmente, durante la diferenciación terminal, condrocitos hipertróficos presentan elevados niveles de β -catenina que promueven, por un lado, la expresión de Runx2 (Dong y col., 2006) y por otro, la degradación de Sox9 (Ryu y col., 2002; Blom y col., 2009; Akiyama y col., 2004). Runx2 regula el proceso de osificación endocondral induciendo la expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria como MMP13, Col X, FAL.

Estos cambios hipertróficos también se han observado *in vitro* al activar la expresión de β -catenina en cartílago articular de ratones, observándose un aumento de Col X, desarrollando un fenotipo cartilaginoso similar a lo que se observa en pacientes con artrosis (Zhu y col., 2009).

1.4 Lesiones condrales

Las lesiones en el cartílago articular constituyen una enfermedad muy recurrente en pacientes de edad avanzada y en deportistas. Pueden ser localizadas o generalizadas, debido a sobrecarga en la articulación o cambios degenerativos en el tejido, respectivamente. En ambos casos el cartílago no puede regenerarse por si mismo necesitando un tratamiento temprano para detener la degeneración articular.

En el caso de las lesiones condrales, estas ocurren porque las fuerzas mecánicas a la que se ve expuesta el cartílago es mayor a lo que es capaz de soportar, generando un daño en la superficie articular. Mientras que en las lesiones degenerativas, como artrosis, el daño en el cartílago ocurre porque las células no son capaces de mantener la homeostasis del tejido, es decir, no son capaces de sintetizar MEC en la misma medida que es degradada (Goldring & Marcu, 2009), por lo que el cartílago comienza un proceso degenerativo que es incapaz de remediar por si solo. El daño en el cartílago no es solo a nivel extracelular, sino que los condrocitos también sufren una alteración en el perfil de expresión génica, produciendo un aumento en la expresión de ligandos WNT y la activación de la vía WNT (Dell'Accio y col., 2006), lo que a su vez induce el proceso de diferenciación terminal, por el cual los condrocitos adquirieren un perfil hipertrófico. Estos condrocitos a su vez intentan regenerar la zona dañada produciendo fibrocartílago, que no tiene las mismas propiedades que el cartílago hialino.

1.5 Terapias quirúrgicas y celulares de lesiones condrales

En la actualidad existen diversos procedimientos quirúrgicos que se aplican al tratamiento de lesiones condrales, siendo la mayoría de estos altamente invasivos. Los tratamientos más comunes para la restauración del cartílago son microfractura, perforación, artroplastia de abrasión, trasplante de auto y aloinjerto osteocondral (Benya & Shaffer, 1982). Las primeras tres técnicas buscan estimular el crecimiento de nuevo cartílago mediante la perforación del hueso subcondral, permitiendo la llegada de células mesenquimáticas capaces de reconstituir el tejido. Sin embargo, estas

técnicas pueden producir tejido fibrocartilaginoso que se deteriora en el tiempo y crecimiento óseo excesivo. Las técnicas de auto o aloinjerto osteocondral buscan reconstituir el tejido dañado mediante el uso del cartílago propio (auto) o de donante (alo), permitiendo reemplazar el tejido dañado por uno sano. Cuando la zona a tratar es muy grande, es necesario realizar varios injertos, los cuales, producto de su forma redondeada, no siempre logran cubrir todo el espacio dañado, generándose vacíos entre el tejido trasplantado y el cartílago articular, que no siempre se logra regenerar en el tiempo. Además es una técnica altamente invasiva e involucra la inherente pérdida de cartílago sano para cubrir la zona dañada.

Es por esto que las terapias celulares han adquirido mayor importancia, específicamente la implantación de condrocitos autólogos (ACI, autologous chondrocytes implantation) ha dado mejores resultados en el tratamiento de defectos condrales de espesor completo. Este procedimiento requiere de dos pasos quirúrgicos, la extracción de cartílago sano, aislación y expansión de condrocitos *in vitro*, y la implantación de estos en la zona afectada. Sin embargo, posee desventajas potenciales que incluyen el riesgo de migración y pérdida de los condrocitos trasplantados hacia el espacio sinovial, además de la desafortunada diferenciación de condrocitos productores de matriz condroide viable a condrocitos hipertróficos predispuestos a sufrir apoptosis, así como el prolongado tiempo de cultivo *in vitro*. Es por esto que ACI evolucionó a MACI (implantación de condrocitos autólogos en matriz) incorporando los condrocitos en membranas o scaffolds para evitar la migración celular y favorecer la producción de MEC. Pese a los resultados óptimos esta técnica sigue presentando dificultades, la inherente pérdida de cartílago sano de la fuente autóloga desde donde se obtienen y la desdiferenciación de estos condrocitos *in vitro* pudiendo disminuir la capacidad de generación de matriz.

1.6 Uso de CMMs para regeneración de cartílago

Las células madres mesenquimáticas (CMMs) son células no hematopoyéticas que, al igual que otros tipos de células madres, poseen la capacidad de autorregeneración y diferenciación celular a linajes mesenquimáticos, como tejido óseo (Jaiswal y col., 1997), condrogénico (Johnstone y col., 1998) y adiposo (Pittenger y col., 1999) y linajes no mesenquimáticos, como neuronas, keratinocitos, hepatocitos y células propias del intestino (Sugaya, 2003; Chapel y col., 2003).

De acuerdo a la Sociedad Internacional de terapias Celulares estas células deben poseer los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, y no presentar CD34, CD45, CD14, CD79 y HLA-DR, así como también ser adherentes al plástico, poseer una morfología fibroblástica y la capacidad de diferenciación a osteocitos, condrocitos y adipocitos (Dominici y col., 2006).

El uso de estas células para terapias regenerativas de cartílago presentan varias ventajas, ya que se encuentran en una variedad de tejidos adultos, los más estudiados son médula ósea (Castro-Malaspina y col., 1980) y tejido adiposo (Tuli y col., 2003; Zuk y col., 2001), pero además hay otras fuentes como membrana sinovial (De Bari y col., 2001), pulpa dental (Jo y col., 2007), músculo esquelético (Bakopoulou y col., 2011; Bosch y col., 2000), tejido menstrual (Meng y col., 2007; Patel y col., 2008), e incluso tejido cartilaginoso articular humano (William y col., 2010). Además poseen la capacidad de diferenciarse a tejido condrogénico, evidenciado por la expresión de Sox9, col II, agreganos *in vitro* e *in vivo* (Studer y col., 2012; Hall & Miyake, 2000; Mrugala y col., 2009). Estas variadas fuentes de obtención, su capacidad de diferenciación condrogénica, y el no necesitar tejido cartilaginoso sano

del paciente, hace de las CMMs una promisorio alternativa frente a las limitadas capacidades de regeneración que presenta el cartílago articular.

El principal desafío para poder utilizar CMMs para terapia celular es lograr un fenotipo condrocitario estable, sin el proceso de diferenciación terminal hipertrófico, como ocurre en el cartílago articular sano. Sin embargo, variados estudios demuestran que el proceso de diferenciación condrogénica *in vitro* induce tempranamente la expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria (Pelttari y col., 2006). Es decir, las células siguen el proceso de osificación endocondral, involucrado en la formación de hueso, en vez de permanecer estables en su fenotipo condrogénico, como ocurre en condrocitos del cartílago articular sano. Lo mismo ocurre *in vivo*, donde condrocitos hipertróficos pueden dar origen a osificación del tejido y muerte de las células por apoptosis (Mueller & Tuan, 2008).

1.7 Inhibición de cambios hipertróficos

Distintas estrategias se han desarrollado para lograr un fenotipo condrocitario estable. Para esto se han usado cultivos tridimensionales que favorecen el proceso de diferenciación condrogénica, ya sea matrices de colágeno, hidrogeles, micromasas o pellets celulares con condrocitos articulares, CMMs o co-cultivos de ambos en distintas proporciones. La finalidad de hacer co-cultivos con condrocitos articulares es lograr por una parte que los condrocitos ayuden a guiar el proceso de diferenciación inhibiendo los cambios hipertróficos, o por el contrario que CMMs ayuden a condrocitos a no perder su fenotipo condrocitario estable durante el cultivo *in vitro*.

A pesar de los resultados, en algunos casos promisorios, el desarrollo de co-cultivos de CMMs con condrocitos articulares no impide la inducción de cambios

hipertróficos y además requiere una fuente de tejido cartilaginoso sano, es decir, realizar una segunda intervención quirúrgica al paciente generando un nuevo daño en el tejido cartilaginoso que se quiere tratar. Es por esto que el uso exclusivo de CMMs continua siendo una mejor alternativa para el desarrollo de terapias regenerativas de cartílago, siendo la inhibición de cambios hipertróficos la principal tarea para poder optimizar este procedimiento.

Estudios *in vitro* de pellets de CMMs han demostrado una presencia temprana (día 7) de marcadores de hipertrofia condrocitaria (Col X, MMP13), incluso antes que la expresión de marcadores de cartílago hialino (Col II al día 14). Estos pellets al ser implantados subcutáneamente en ratones SCID siguen el proceso de diferenciación terminal evidenciado por la expresión de Col X, mineralización de la MEC y vascularización del tejido (Peltari y col., 2006).

De acuerdo a una serie de resultados obtenidos en el proceso de diferenciación condrogénica *in vitro*, se logrado determinar que el medio inductor es clave para lograr un fenotipo condrocitario estable. En este contexto, el principal factor de crecimiento utilizado para la diferenciación condrogénica *in vitro* es TGF- β .

Existen tres isoformas de TGF- β , de las cuales las más usadas para la diferenciación condrogénica son TGF- β 1 y 3, sin mayores diferencias en la inducción. Sin embargo, hay mayor actividad de ALP en CMMs tratadas con TGF- β 3 que con TGF- β 1 (Mueller & Zeliner, 2010), por lo que TGF- β 1 es una mejor opción. Además el uso de dexametasona parece ser no fundamental en el proceso de diferenciación condrogénica cuando TGF- β 1 está presente, ya que en presencia o ausencia de este las células se diferencian hacia condrocitos. Sin embargo, también hay evidencia de expresión de Col X y FAL en los pellets (Johnstone y col., 1998).



Si bien estos factores logran inducir la expresión de marcadores de cartilago hialino, no logran inhibir la expresión de marcadores hipertróficos, por lo que el medio es insuficiente para lograr un perfil condrogénico estable, promoviendo un proceso de diferenciación similar a la osificación endocondral.

Existen tres inhibidores naturales de la vía WNT canónica -Frizzled related protein (FRZB), GREMLIN1 (Grem1) y Dickkopf-1 (DKK-1). Estos están naturalmente sobreexpresados en el cartilago articular y están ausentes en el cartilago de la placa de crecimiento, teniendo directa relación con el nivel de activación de la vía WNT en cada uno. Es decir, en el cartilago articular, donde hay presencia de inhibidores WNT, hay niveles balanceados de β -catenina, mientras que en condrocitos de la placa de crecimiento no hay evidencia de antagonistas presentando elevados niveles de β -catenina (Leijten y col., 2012).

Estos antagonistas inhiben la vía WNT de manera directa (FRZB y DKK-1) o indirecta (Grem1), interactuando con los receptores o ligandos WNT, respectivamente. De los tres, DKK-1 es el más estudiado en la inhibición de cambios hipertróficos.

Dickkopf (DKK) son glicoproteínas secretadas que interactúan con los receptores LRP5 o LRP6 (Schwab & Gargett, 2008). Específicamente, la unión de DKK-1 a LRP5/6 disocia a este del receptor Fzd, evitando la formación de un receptor WNT funcional. El descenso de la expresión de la vía WNT desestabiliza a β -catenina e inhibe la regulación transcripcional inducida por el ligando. La inhibición de WNT/ β -catenina disminuye la presencia de β -catenina nuclear disponible para regulación de factores de transcripción, así como también β -catenina citoesquelética necesaria para formar uniones adherentes. Por lo tanto, DKK-1 disminuye los contactos celulares requeridos para la diferenciación celular (Gregory y col., 2003).

No se ha observado la presencia de estos posibles inhibidores naturales de hipertrofia condrocitaria (FZRB, Grem1 y DKK-1), en pellets de CMMs diferenciadas a condrocitos. Por el contrario, muestran un perfil de expresión génica similar al cartilago de la zona de crecimiento del hueso (cartilago hipertrófico) (Leijten y col., 2012).

DKK-1 ha surgido como un promisorio inhibidor de cambios hipertróficos de condrocitos obtenidos a partir de CMMs cultivados *in vitro*, en pellet celular, y además en estudios en modelo animal de artrosis (Oh y col., 2012).

En la actualidad hay solo tres estudios de diferenciación condrogénica que utilicen DKK-1, ya sea para promover la diferenciación condrogénica o para disminuir la presencia de marcadores de hipertrofia en condrocitos obtenidos de CMMs cultivados en pellet celular. El primero de estos fue llevado a cabo el 2010 por Im y col., siendo su finalidad, estudiar si DKK-1 es capaz de estimular la diferenciación condrogénica de forma temprana (6 días de diferenciación). Para lo cual cultivaron pellets de CMMs en un medio inductor a condrogénesis sin TGF- β y con la adición de 100, 200 y 300 ng/ml de DKK-1. De estas dosis, 200 ng/ml permitió una mayor expresión de Col II y GAGs (Im & Quan, 2010). Sin embargo, no se evaluó la presencia y expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria.

Este mismo autor, Im y col., el año 2011 realizó un estudio a largo plazo (21 días) utilizando 2, 10 y 50 nM de DKK-1 en pellets de CMMs cultivados en medio inductor sin TGF- β . De acuerdo al contenido de GAGs se eligió la dosis efectiva más baja para realizar análisis a largo plazo (21 días). Los resultados del tratamiento con 10 nM de DKK-1 fueron una mayor expresión de Col II, una reducción de Col I (característico de CMMs no diferenciadas) sin evidenciarse cambios en la expresión de Sox9 y Col X (Im y col., 2011).

El estudio más reciente, fue llevado a cabo por Leijten y col, el año 2012. En este observaron a largo plazo (5 semanas) que la adición de 200 ng/ml de DKK-1 desde el sétimo día de cultivo en medio inductor en presencia de TGF- β , logra inhibir la mineralización del tejido, junto con la disminución en la expresión de Col X y FAL. Sin embargo, no logra incrementar la expresión de Col II.

Estos estudios son un primer avance para determinar si DKK-1 es capaz de promover la diferenciación condrogénica *in vitro*, junto con la inhibición de los cambios hipertróficos presentes en condrocitos diferenciados de CMMs. Sin embargo, es necesario una caracterización más completa del proceso de diferenciación condrogénica en presencia de DKK-1, junto con determinar la dosis que más favorece en ambas tareas.

Este proceso de diferenciación condrogénica puede ser mejorado, considerando que se ha descrito una presencia prematura de Col X (expresión previa a la de Col II) desde el séptimo de inducción. Por lo que la inhibición de la vía WNT antes del día 7 es necesaria para disminuir o retrasar la expresión génica de este marcador de hipertrofia condrocitaria. Además, es importante considerar que DKK-1 reduce los niveles de β -catenina citoplasmática, reduciendo la posibilidad de participar en contactos celulares, fundamental en la diferenciación condrogénica. Por lo tanto una inhibición adecuada de la vía WNT es adicionar DKK-1 al medio inductor en un día intermedio entre el primer y séptimo día de diferenciación condrogénica para favorecer los contactos celulares y lograr reducir la temprana expresión de Col X.

De acuerdo a estos antecedentes se determinó inhibir la vía WNT con dos dosis de DKK-1, una considerada baja (50 ng/ml) y otra alta (200 ng/ml), desde el tercer día de inducción condrogénica, para lograr encaminar cuál es la mejor dosis de DKK-1 que promueva la diferenciación condrogénica y que reduzca la presencia de marcadores de

hipertrofia condrocitaria presente en condrocitos obtenidos a partir de CMMs cultivadas en pellet. De esta manera poder acercarse a un perfil condrogénico estable (sin presencia de diferenciación terminal de condrocitos) para el desarrollo de terapias regenerativas de cartilago hialino de rodilla.

1.8 Hipótesis

La inhibición temprana de la vía WNT canónica con DKK-1 en células madres mesenquimáticas humanas, disminuye la expresión de marcadores de hipertrofia durante la diferenciación condrogénica.

1.9 Objetivo general

Determinar la dosis adecuada de DKK-1 capaz de inhibir los cambios hipertróficos en condrocitos obtenidos en cultivo *in vitro* a partir de CMMs.

2.0 Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de dos dosis de DKK-1 en la viabilidad celular de CMMs inducidas a condrocitos.
2. Evaluar si la dosis de DKK-1 estudiadas logran inhibir la vía WNT canónica.
3. Evaluar la disminución de la presencia de marcadores de hipertrofia condrocitaria en condrocitos derivados de CMMs tratados con dos dosis de DKK-1.
4. Estudiar la presencia de marcadores de condrocitos quiescentes en condrocitos obtenidos en cultivo *in vitro* a partir de CMMs tratadas con dos dosis de DKK-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Material Plástico y Vidrio

- Placas de Cultivo Celular de 225 cm² de Poliestireno (#159934, Nunc).
- Placas de Cultivo Celular de 6 pozos de Poliestireno (#350346, Corning).
- Placas de Cultivo Celular de 96 pozos fondo redondo de Poliestireno (#163320, Nunc).
- Placas de Cultivo Celular de 96 pozos fondo plano de Poliestireno (#3595, Corning).

2.1.2 Materiales utilizados para Cultivo Celular

- Medio de Cultivo Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X (#12491 Gibco®).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (#SH30910.03, Hyclone®).
- Penicilina, Estreptomina y Anfotericina B (#03-033-1B, Biological Industries).
- Tampón Fosfato Salino (PBS) (#SH30028.03, Hyclone®).
- Tripsina-EDTA x10 (#03-051-5B, Biological Industries).
- Azul de Tripán (#15250-061, Gibco®).
- TGF-β1 (#PHG9214, Gibco®).
- Ácido ascórbico 2 fosfato (#000010 A8960-5G, Sigma Aldrich).
- ITS premix (#000010 I1884-1VL, Sigma Aldrich).
- Proteína humana recombinante DKK-1(#RD.5439-DK-010, R&D System).

2.1.3 Materiales utilizados para Histología

- Hematoxilina de Mayer (#MHS1-100 ML, Sigma-Aldrich®).
- Kit para actividad de Fosfatasa Alcalina (#85L3R-1KT, Sigma-Aldrich).
- Formaldehído 37% (#1.04003.2500, Merck).
- Glicerina (#4049, Merck).
- Porta objetos de vidrio (#0303-2104, Citoplus ®).
- Cubre-objetos de vidrio de 12mm (#01 115 20, Marienfield).

2.1.4 Ensayo viabilidad celular

- Kit de viabilidad celular XTT (#20-300-1000, Biological Industries).

2.1.5 Cultivos Celulares

- Línea Celular de Osteosarcoma Humano, Saos-2.

2.1.6 Materiales utilizados para Western Blot

- Inhibidor de Proteasas Cocktail (#04693116001, Roche).
- Inhibidor de Fosfatasa Cocktail (#04906845001, Roche).
- Kit cuantificación de proteínas BCA (#23225, Pierce).
- Membrana de PDVF (#88518, Thermo-Scientific).
- Sustrato SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (#34095, Pierce).

2.1.7 Anticuerpos

- Anti-Colágeno tipo II (Col II) (AB761) de Biosonda.
- Anti-Colágeno tipo X (Col X) (AB58632) de Biosonda.
- Anti β -catenina (9562S) de Cell Signaling.

- Anti actina (c-11) de Santa Cruz Biotechnologies.
- Anti-Rabbit IgG-HRP (#sc-2004) de Santa Cruz Biotechnologies.
- Anti-Goat IgG-HRP (#sc-2020) de Santa Cruz Biotechnologies.
- Anti Rabbit polímero HRP (K400211) de Dako.

2.2 Metodología

2.2.1 Extracción y expansión de CMMs

La extracción, aislamiento y caracterización de CMMs fue llevado a cabo por el Laboratorio de Regeneración Celular de Clínica las Condes, de acuerdo a protocolos establecidos. Se obtuvieron aspirados de médula ósea de cresta iliaca de tres pacientes sanos, previo consentimiento informado y autorización del Comité de Ética de CLC. Células mononucleares fueron aisladas mediante un gradiente de densidad con Ficoll y fueron cultivadas en medio de expansión (ME) (advanced DMEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomycin y 0,25 ug/mL de anfotericina B) a 37°C y 5% CO₂. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas. CMMs fueron seleccionadas mediante adherencia al plástico y fueron caracterizadas por citometría de flujo, utilizando los marcadores de superficie celular CD34⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺. Las CMMs fueron expandidas y congeladas en 90% SFB y 10% DMSO.

2.2.2 Ensayo de viabilidad celular

Se sembraron 4.000 CMMs por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y se cultivaron por 24 horas en ME a 37°C y 5% CO₂, para favorecer la adhesión de las

células a la placa de cultivo. Luego las células fueron lavadas en PBS y cultivadas en un medio inductor a condrogénesis (MIC) (advanced DMEM, 1%ITS, 37,5 ug/mL ácido ascórbico, 10 ng/ml de TGF- β 1, 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomina, 0.25 ug/ml de anfotericina B) por siete días. El medio MIC fue cambiado cada dos días y a partir del día 3 se agregó la proteína humana recombinante DKK-1 en dos dosis: una baja de 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) o una alta de 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) y se añadió nuevamente en cada cambio de medio. El grupo control fue cultivado en medio MIC sin DKK-1 (Control). Cada uno de los experimentos fueron realizados en triplicado. Luego de los siete días de cultivo, se analizó la viabilidad celular, siguiendo el protocolo del kit de viabilidad celular XTT. El promedio de viabilidad celular del grupo control se consideró como 100%, con respecto a este se calculó el porcentaje de viabilidad en cada caso. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía y un segundo análisis de Tukey.

2.2.3 Diferenciación condrogénica en pellet

CMMs fueron cultivadas en ME a 37°C y 5% de CO₂. Una vez llegadas a confluencia del 80% fueron desprendidas con 0,05% de tripsina- 0,02%EDTA. Se sembraron 2.5 x10⁵ células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se centrifugaron a 2.500 rpm (SelectSpin Plate Centrifuge, Select BioProducts) por 5 min para inducir la formación del pellet. Estos pellets fueron cultivados por 21 días en MIC. El medio fue cambiado los primeros tres días y posteriormente día por medio con cuidado de no remover los pellets. Como control de diferenciación se utilizaron pellets cultivados en ME. Luego de 21 días las células fueron procesadas para ensayos de actividad de fosfatasa alcalina (FAL), histoquímica e inmunohistoquímica.

2.2.4 Inhibición de la vía WNT canónica

La inhibición de la vía WNT canónica se realizó en el sistema de diferenciación en pellets de CMMs, con 2 concentraciones de proteína humana recombinante DKK-1: una dosis baja de 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y una dosis alta de 200 ng/mL (DKK-1²⁰⁰). Cada una de estas dosis se agregó al medio MIC desde el día 3 del proceso de diferenciación condrogénica y se añadió nuevamente en cada cambio de medio. Como grupo control se realizó el cultivo de los pellets de CMMs en medio MIC sin DKK-1 (Control). Se evaluó la inhibición de cambios hipertróficos a los días 1, 7, 14 y 21, mediante FAL, histoquímica e inmunohistoquímica.

2.2.5 Tinción de fosfatasa alcalina (FAL)

Un Kit semi-cuantitativo fue usado para determinar la actividad enzimática de FAL. Los pellets celulares fueron cortados en frío por criostato, en el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Chile, obteniéndose secciones de 5 μ m que luego fueron, secadas a temperatura ambiente por 30 min, fijadas en acetona pura a 4°C por 15 min y teñidas con Fast Violet B + Naphthol AS-MX solución alcalina fosfatasa por 30 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Se realizó una contra-tinción con Hematoxilina Mayer (MHS1 Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente por 1 min. Como control positivo se utilizó una línea celular de osteosarcoma (Saos-2), facilitada por el Laboratorio del Dr. Mario Galindo (ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile). Como control negativo de la actividad enzimática, algunas secciones de los pellets fueron sumergidos por 5 min en agua hirviendo con el fin de inactivar la enzima por denaturación térmica. Los cortes fueron montados en glicerina y luego observadas y fotografiadas en un microscopía de luz.

2.2.6 Procesamiento para análisis histológico e inmunohistoquímica

Los análisis histológicos e inmunohistoquímicos fueron llevados a cabo en el departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Chile. Para ello, pellets fueron fijados en 10% de formalina a pH neutro por 24 horas. Se realizaron cortes histológicos en parafina para evaluar morfología/tamaño celular, presencia de GAGs y fibras de Col II, X y β -catenina, por tinción de rutina de Hematoxilina & Eosina (H&E), tinción histoquímica azul de Toluidina e inmunohistoquímica (detalles más adelante), respectivamente.

2.2.7 Detección de Glicosaminoglicanos (GAGs)

Cortes de pellets fueron teñidos con azul de toluidina para evaluar la presencia de GAGs en la MEC. Dicha tinción es metacromática (púrpura) en presencia de GAGs y ortocromática (azul) en ausencia. Los cortes fueron montados en Entellan, observados y fotografiados en un microscopio de luz.

2.2.8 Inmunohistoquímica (IHQ)

Se evaluó la expresión de Col II, Col X y β -catenina, mediante IHQ. Cortes histológicos de los días 1, 7, 14 y 21 fueron adheridos en un mismo porta objeto para ser procesados al mismo tiempo. Los cortes fueron incubados por 1 hr a temperatura ambiente con anticuerpo primarios, para Col II (1:50 Merck AB761), Col X (1:375 Biosonda AB58632) y β -catenina (1:100 Cell Signaling 9582S) seguido de un lavado con solución salina. Para mejorar la sensibilidad se usó un anticuerpo secundario poli peroxidasa del rábano (horseradish peroxidase, HRP). El control negativo se realizó de igual manera, pero sin el anticuerpo primario. Se realizó una contra tinción con Hematoxilina para teñir núcleos. Las secciones fueron montadas permanentemente

con Aquatex (Merck) y examinadas y fotografiadas en un microscopía de luz. Como control positivo para Col II, X y β -catenina se utilizó muestra de tejido cartilaginoso sano, cartilago hipertrófico y fibromatosis humana, respectivamente.

2.2.9 Análisis de tamaño celular

Se analizó el tamaño y morfología celular de condrocitos derivados de pellets de CMMs cultivados en medio MIC con y sin DKK-1 al día 21 de diferenciación. Para ello, se realizó la tinción Hematoxilina & Eosina y se fotografió cada condición en el laboratorio de Análisis Digital de Imágenes (SCIÁN), de la Universidad de Chile, quienes a su vez proporcionaron la barra de tamaño representativa de 15 μ m. El análisis del tamaño celular se realizó utilizando el software ImageJ, para lo cual se seteó el número de pixel por μ m (2,867 pixeles/ μ m), utilizando la barra de tamaño. Se midió el tamaño de 100 células de forma aleatoria. El criterio utilizado para definir la población de condrocitos hipertróficos fue a partir del tamaño promedio de condrocitos quiescentes, para esto se midió el tamaño de 100 células de una muestra de tejido cartilaginoso sano (positivos para Col II por IHQ). Además, para validar las mediciones realizadas se midió el tamaño de una muestra de condrocitos hipertróficos (positivos para Col X) de la placa de crecimiento para ser comparados con datos bibliográficos. Como control de diferenciación condrogénica, se midió el tamaño de CMMs cultivadas por 21 días en ME. Los datos obtenidos fueron graficados y analizados mediante ANOVA de una vía y post análisis de Tukey usando el programa Prism.

2.2.10 Western Blot

Para verificar la inhibición de la vía WNT por DKK-1, se cuantificó el nivel de β -catenina en los pellets cultivados en MIC y tratados luego de 1, 7, 14 y 21 días de

cultivo. Cuatro pellet de cada condición fueron guardados a -20°C con el buffer de lisis (Tris HCl pH 6,8 2M, SDS al 10%, glicerol y Urea) suplementado con inhibidor de proteasas y fosfatasas. Una vez obtenidos los pellets en todos los tiempos cada muestra fue sonicada con 3-4 pulsos y centrifugadas a 15.000 rpm a 4°C por 10 min, y se guardó el sobrenadante. Se cuantificó la concentración proteica mediante el kit BCA. Se agregó Buffer de Carga (DTT 1M, inhibidor de proteasa 1X y azul de bromofenol) a cada muestra y se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida al 10% a voltaje constante de 100V durante 1:30 hrs. Posteriormente se realizó la electrotransferencia de proteínas a una membrana de PDVF durante 1:30 hrs a 100V y 4°C . Las membranas de PDVF fueron incubadas con solución Rojo de Ponceau 0,1%, para verificar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Para remover dicha solución se lavó la membrana con PBS 1X 0,1% Tween 20, hasta que no quedase color rojo en las membranas. Se incubaron las membranas con solución de bloqueo (PBS 1X 0,1% Tween 20 7,5% BSA, para β -catenina, y PBS 1X 0,1% Tween 20 2% leche, para actina) por 2hrs a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 1X 0,1% Tween 20 y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (Anti- β -catenina 1:2.000 en PBS 1X 0,1% Tween 20 5% BSA; Anti-actina 1:2.000 en PBS 1X 0,1% Tween 20 2% leche) durante toda la noche a 4°C en agitación. Las membranas fueron aclimatadas por 15 min a temperatura ambiente en agitación y lavadas 3 veces con PBS 1X 0,1% Tween 20. Luego se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes (Anti-Rabbit HRP 1:2000 en PBS 1X 0,1% Tween 20 5% BSA o Anti-Goat HRP 1:2.000 en PBS 1X 0,1% Tween 20 2% leche). Finalmente, se realizó 3 lavados de 10 min cada uno y las membranas fueron incubadas con SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate y fotografiadas a distintos tiempos mediante el equipo FotoDyne.



RESULTADOS

3.1 Viabilidad celular de CMMs tratadas con DKK-1

Con la finalidad de analizar si las dosis de DKK-1 (50 y 200 ng/ml), que se utilizaran en los experimentos de diferenciación condrocítica, afectan la viabilidad celular de CMMs, se realizó un ensayo de viabilidad con las células de los tres pacientes (#3-5). Este ensayo se basa en la capacidad que las células metabólicamente activas tienen para reducir la sal de tetrazolium a un compuesto de formazan que es de color anaranjado. Esta coloración es directamente proporcional al número de células viables metabólicamente activas, pudiendo ser cuantificadas mediante un espectrofotómetro.

Para evaluar el efecto de DKK-1 en CMMs, estas se cultivaron en monocapa por 1 semana en medio de cultivo inductor de condrogénesis (MIC). Ambas dosis de DKK-1 fueron añadidas tempranamente, desde el tercer día de cultivo, de la misma forma que se realizará en el protocolo de diferenciación condrogénica utilizando pellets celulares. Como control de viabilidad celular, se cultivaron CMMs en MIC sin DKK-1.

En la figura 1 no se observa cambios significativos en la viabilidad celular, al comparar CMMs tratadas con ambas dosis de DKK-1 con el grupo control (Figura 1A). Así, el uso de, estas dosis de DKK-1 no provocan cambios en la viabilidad celular y por lo tanto se pueden utilizar experimentalmente en cultivos de CMMs inducidas a condrocitos.

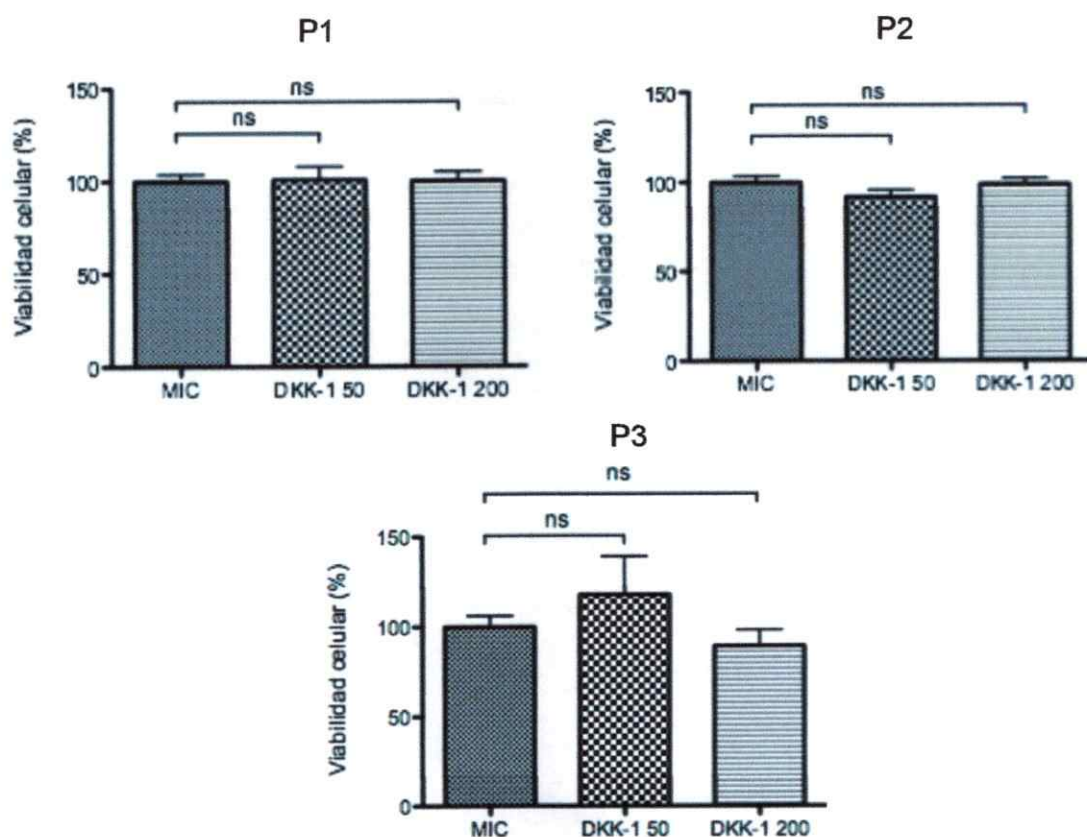


Figura 1: Viabilidad celular de CMMs tratadas con DKK-1. CMMs provenientes de tres pacientes (P1, P2 y P3) fueron cultivadas en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 por siete días. DKK-1 fue agregado desde el tercer día. La viabilidad celular se expresó en %, relativo al grupo control y se analizó la desviación estándar de los resultados. ns: sin cambios significativos. n=3.

3.2 Inhibición de la vía WNT canónica por DKK-1 durante la diferenciación condrogénica de CMMs

La diferenciación condrogénica fue realizada en un cultivo tridimensional (pellet celular) que favorece los contactos celulares necesarios en la inducción condrogénica. $2,5 \times 10^5$ células fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo redondo y luego centrifugadas para formar pellets celulares y promover la condensación celular,

imitando el proceso de condensación de células mesenquimáticas que ocurre durante la diferenciación condrogénica en etapas embrionarias. Los pellets celulares que se lograron obtener son esféricos, compactos, de aspecto vítreo y miden 2 mm aproximadamente (Figura 2).

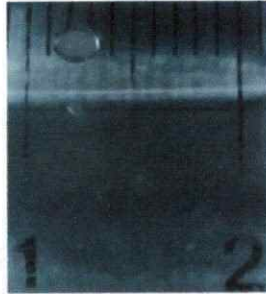


Figura 2: Pellet celular. Fotografía de pellet de CMMs luego de 24 hrs de sembrado de células.

Los pellets de CMMs fueron cultivados en MIC agregando DKK-1 en cada cambio de medio desde el tercer día de inducción, con el fin de inhibir la activación de la vía WNT/ β -catenina y así atenuar de forma temprana la inducción de los cambios hipertróficos en condrocitos. Al respecto, DKK-1 interactúa con los co-receptores LRP5 o LRP6, bloqueando específicamente la unión de estos co-receptores con el receptor Fzd, evitando así la formación de un receptor WNT funcional. Así, primero se procedió a determinar si el tratamiento con DKK-1 es capaz de inhibir la activación de la vía WNT/ β -catenina, evidenciado por una baja en los niveles de β -catenina. Para ello, los pellets fueron cultivados en MIC por 21 días. Al tercer día de cultivo se adicionó DKK-1 en dosis de 50 y 200 ng/ml. Finalmente, los pellets de CMMs fueron aislados a distintos tiempos (1, 7, 14 y 21 días de cultivo) para analizar la presencia, localización subcelular y los niveles de β -catenina, mediante inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot.

La figura 3 muestra el análisis por IHQ, observándose que inicialmente, al día 1, es posible evidenciar la presencia de β -catenina a nivel citoplasmático, preferentemente en la periferia de las células. Posteriormente, al día 7, se observa una disminución considerable de β -catenina periférica, en relación al día 1, siendo localizada en forma homogénea y con una menor intensidad en el citoplasma, tanto en las células control (MIC) como en las células tratadas con DKK-1. Posteriormente, a los días 14 y 21 se evidencia, en los pellets cultivados sin DKK-1, un incremento progresivo tanto en la intensidad de β -catenina citoplasmática como en su localización nuclear. Interesantemente, al día 14 y 21, el tratamiento con DKK-1 redujo la intensidad de β -catenina citoplasmática así como su localización nuclear. Siendo más acentuada esta disminución con la dosis de 200 ng/ml de DKK-1.

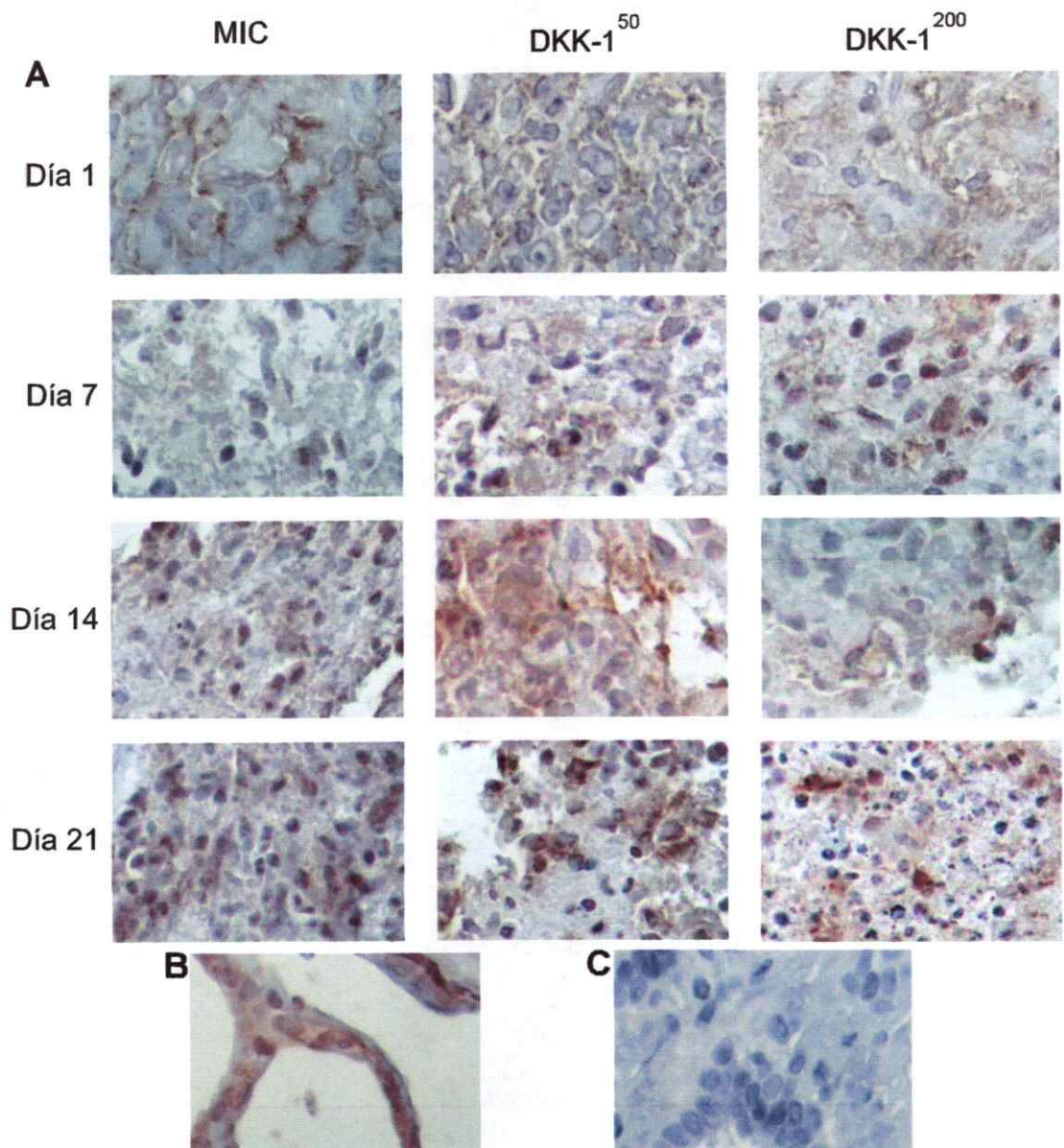


Figura 3: Presencia de β -catenina mediante IHQ. (A) Se evaluó la presencia de β -catenina en pellets de CMMs cultivados en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 a los días 1, 7, 14 y 21 de diferenciación. (B) Control positivo. (C) Control negativo. Imágenes a 400x.

Para corroborar el nivel de activación de la vía WNT canónica, se analizaron los niveles de β -catenina por Western Blot (Figura 4A). Al igual que por IHQ, es posible observar una mayor presencia de β -catenina al día 1, en comparación con el día 7 que

muestra una disminución de los nivel de β -catenina tanto en los pellets celulares cultivados en MIC sin y con DKK-1. Sin embargo, al día 14 y 21 se observó un aumento de los niveles de β -catenina en los pellets cultivados en MIC. Consecuentemente, el tratamiento con la dosis más baja de DKK-1 no disminuyó su presencia, mientras que el con la dosis más alta muestra una disminución en la banda al día 21, observándose una disminución de β -catenina al día 21 con 200 ng/ml de DKK-1 (Figura 4A).

Se cuantificó por densitometría el nivel de β -catenina presente en cada condición con respecto al control de carga actina. Observándose un mayor nivel de β -catenina al día 1, en comparación con los otros días estudiados. Al día 7 se observa una disminución, en promedio, de más de la mitad de la presencia al día 1, sin observarse diferencias significativas entre las condiciones. Al día 14 y 21 es posible observar un aumento progresivo de β -catenina en pellets cultivados en MIC. El tratamiento con DKK-1 disminuye levemente, no alcanza a ser una diferencia significativa, la presencia de β -catenina al día 14 con la dosis más alta, siendo significativo al día 21 (Figura 4B). Es decir, después de 21 días de diferenciación condrogénica, el tratamiento con la dosis más alta de DKK-1 logra disminuir significativamente la presencia de β -catenina en los tres pacientes estudiados.

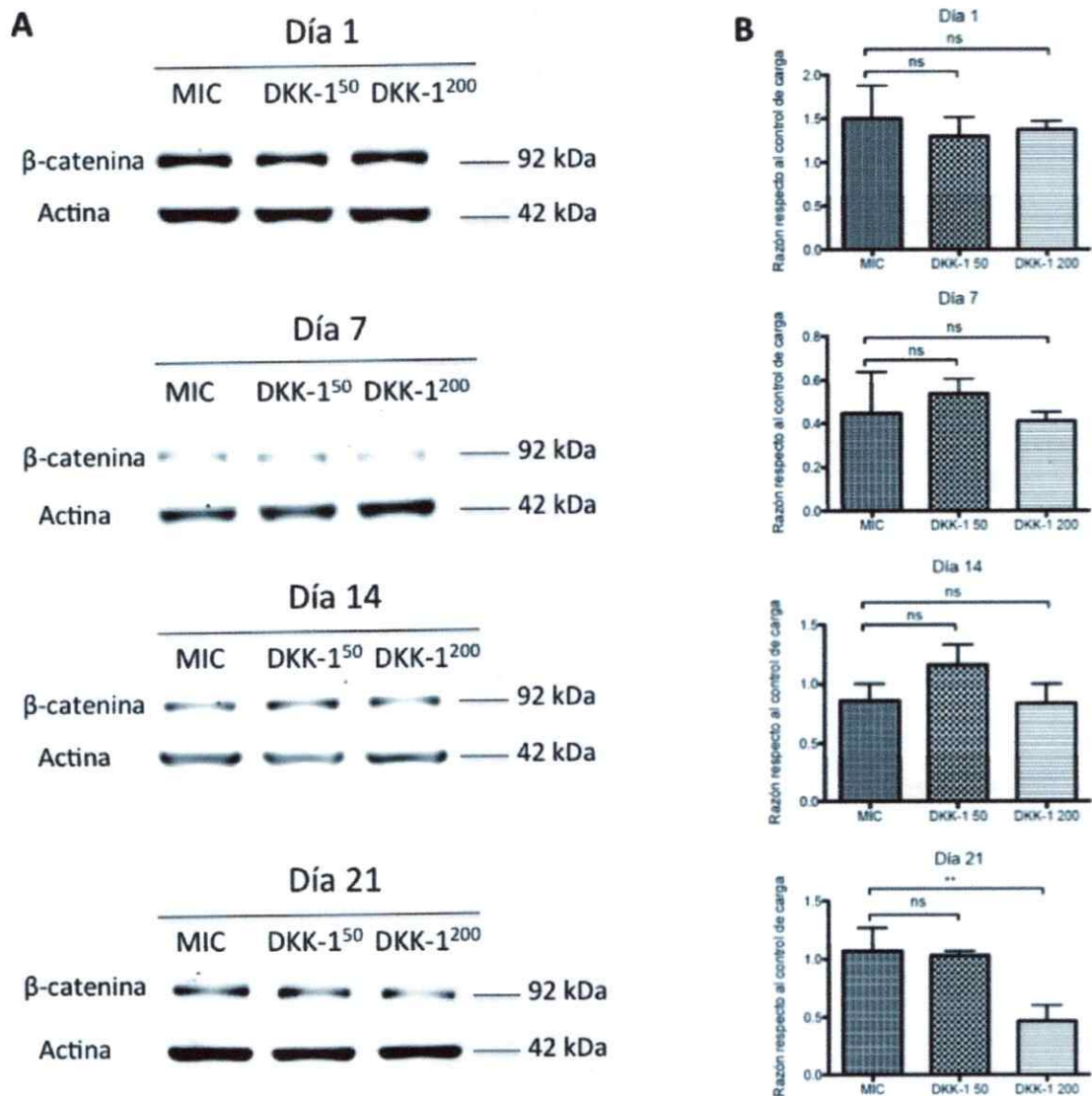


Figura 4: Nivel de activación de la vía WNT canónica por Western Blot y su análisis densitométrico. (A) Se evaluó la presencia de β-catenina en pellets de CMMs cultivados en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 por Western Blot y (B) su posterior análisis densitométrico. Se cuantificó la presencia de β-catenina a los días 1, 7, 14 y 21 de diferenciación, con respecto al control de carga actina, por medio del software ImageJ. Se graficó la desviación estándar de los resultados. ns: sin diferencias significativas; **: p < 0,005.

3.3 Inhibición de cambios hipertróficos durante la diferenciación *in vitro* de condrocitos a partir de CMMs

El uso de células CMMs para la reparación del cartílago articular, requiere de procedimientos de ingeniería de tejidos que permitan una correcta diferenciación condrogénica, sin inducir la hipertrofia de los condrocitos, lo que se puede revelar por la ausencia de marcadores de hipertrofia condrocitaria, presentes durante el proceso de diferenciación condrogénica de CMMs *in vitro*.

Los marcadores más característicos de este fenotipo hipertrófico son la presencia de Col X y FAL en la MEC. Además, el aumento del tamaño celular y la localización nuclear de β -catenina constituyen evidencias de dicho cambio hipertrófico. Por lo que la inhibición de la vía WNT por DKK-1 debiese disminuir la presencia de estos marcadores de hipertrofia.

El cultivo de CMMs en MIC promovió la expresión de Col X desde el día 7 en adelante, con un peak al día 21 de diferenciación. El tratamiento con ambas dosis de DKK-1 logró retrasar la expresión de Col X hasta el día 14 de inducción (Figura 5A). Sin embargo, en comparación al control, solo se observa que hay una leve disminución en la intensidad de Col X en las células tratadas con 200 ng/ml de DKK-1. Al día 21 hay una disminución en la expresión de Col X con ambas dosis de DKK-1, observándose una mayor disminución con la dosis más alta de DKK-1 (Figura 5A). Resultados similares se observan en los tres pacientes.

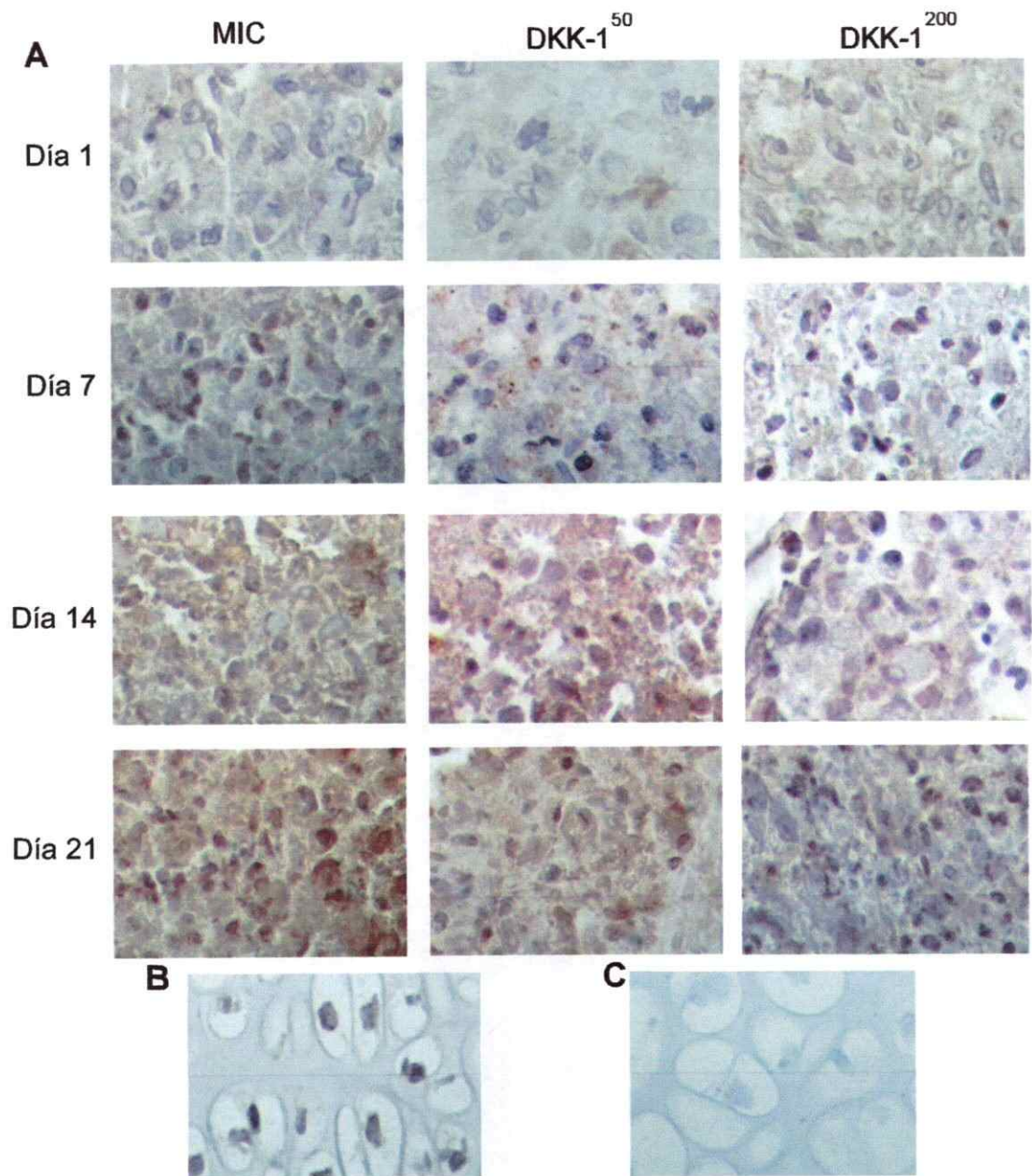


Figura 5: Presencia de Col X mediante IHQ. (A) Se evaluó la presencia de colágeno X en pellets de CMMs cultivados en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 a los días 1, 7, 14 y 21 de diferenciación. (B) Control positivo, tejido cartilaginoso hipertrófico. (C) Control negativo. Imágenes a 400x.

Por otro lado, la actividad enzimática del marcador de hipertrofia condrocitaria, fosfatasa alcalina (FAL), fue analizada, en cortes de pellets obtenidos por congelación en un criostato, mediante una reacción colorimétrica. Como control positivo se usó la línea celular de osteosarcoma humano, Saos-2. Esta última posee elevados niveles de expresión de FAL (Rodan, 1987), asociado al fenotipo celular de osteoblastos (Figura 6B). El control negativo se realizó inactivando la enzima por calor, mediante la incubación en agua en ebullición (Figura 6C).

Al analizar la actividad enzimática es posible observar una temprana expresión de FAL en pellets de CMMs inducidos a condrogénesis desde el día 1 al 7, observándose solo una leve disminución en presencia de ambas dosis de DKK-1 al día 14. Sin embargo, al día 21 de diferenciación, el tratamiento con ambas dosis de DKK-1 provoca una marcada disminución de la actividad de FAL, siendo más acentuado este efecto con la dosis de 200 ng/ml (observado en los tres pacientes) y de forma similar a lo observado en el control negativo (Figura 6C).

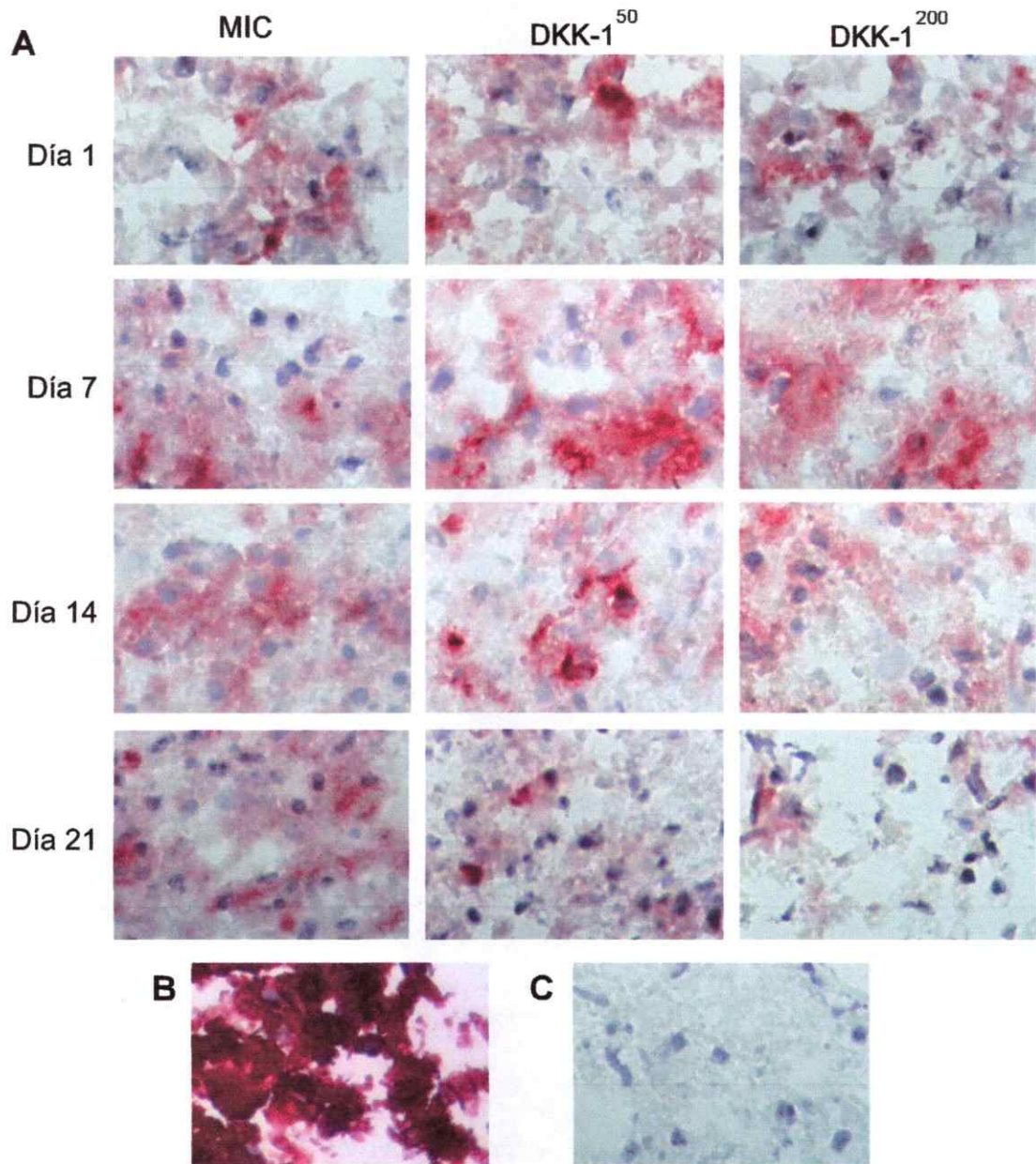


Figura 6: Actividad enzimática de FAL. (A) La actividad enzimática de fosfatasa alcalina fue analizada mediante cortes por congelación de pellets de CMMs cultivados en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 a los días 1, 7, 14 y 21 de diferenciación. (B) Se utilizó como control positivo la línea celular Saos-2 y (C) como control negativo, cortes de pellets inactivados por calor. Imágenes a 400x.

A continuación, se analizó la morfología de CMMs cultivados en MIC con y sin de DKK-1, luego de 21 días de diferenciación, ya que en este día se observan los mayores cambios en la expresión de marcadores de condrocitos hipertróficos. Para este fin, cortes de pellets celulares fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. En pellets de CMMs cultivadas por 21 días en MIC es posible observar la presencia de condrocitos de mayor tamaño (Figura 7A), con una morfología similar a condrocitos hipertróficos (Figura 7B), mientras que en los pellets celulares tratados con la dosis más alta de DKK-1 (200 ng/ml) se observa un tamaño y morfología más similar a condrocitos quiescentes (CQ) e incluso a CMMs cultivadas en pellets celulares por 21 días en un medio que no induce diferenciación condrocítica (medio de expansión: ME) (Figura 7A-B).

Para evaluar estas diferencias en el tamaño celular, observado en pellets cultivados por 21 días en MIC sin y con DKK-1, se procedió a determinar el tamaño de 100 células, en cada una de las condiciones de cultivo. En los tres pacientes es posible observar que CMMs cultivadas en MIC poseen un tamaño celular promedio (9,4 μm) significativamente mayor que aquellos tratados con 50 ng/ml (8 μm) y 200 ng/ml (7,3 μm) de DKK-1. Estos datos indican que efectivamente, los condrocitos diferenciados a partir de CMMs a los 21 días han comenzado un proceso de hipertrofia celular y que el tratamiento con ambas dosis de DKK-1, principalmente la dosis de 200 ng/ml, produce una atenuación de este proceso hipertrófico (Figura 7C).

Con el fin de determinar el porcentaje de condrocitos que han comenzado el proceso hipertrófico, luego de 21 días de inducción de la diferenciación condrocítica en MIC, se procedió primero a calcular el tamaño promedio de los condrocitos quiescentes

en una muestra de tejido cartilaginoso sano (positivo para Col II por IHQ). El tamaño medido promedio de los condrocitos quiescentes fue de 8,4 μm . Consecuentemente, el tamaño promedio que alcanzan CMMs cultivadas en pellet celulares por 21 días en ME, en el que efectivamente no hay procesos de hipertrofia celular asociados, se calculó en 8,4 μm , lo que es coincidente con el tamaño promedio de condrocitos quiescentes (Figuras 7D). Interesantemente, el cálculo del tamaño promedio de los condrocitos obtenidos del cultivo de los pellets celulares, luego de 21 días en MIC, señala un valor de 9,4 μm mostrando una diferencia significativa respecto al tamaño de condrocitos quiescentes, lo que indica el inicio de un proceso hipertrófico asociado a la obtención de condrocitos, luego del cultivo de pellets de CMMs en medio MIC por 21 días.

De esta forma estimamos que condrocitos obtenidos *in vitro* con un tamaño sobre el promedio de un condrocito quiescente o de CMMs cultivadas *in vitro* en ME por 21 días, corresponderían a condrocitos que han iniciado un proceso hipertrófico (Figura 7D). En base a este criterio se pudo establecer que un 70,3% de los condrocitos obtenidos en MIC han comenzado el proceso de hipertrofia celular y que el tratamiento con DKK-1 en dosis de 50 ng/ml y 200 ng/ml fue capaz de reducir esta población de células a un 45,6% y 30% respectivamente (Figura 7E).

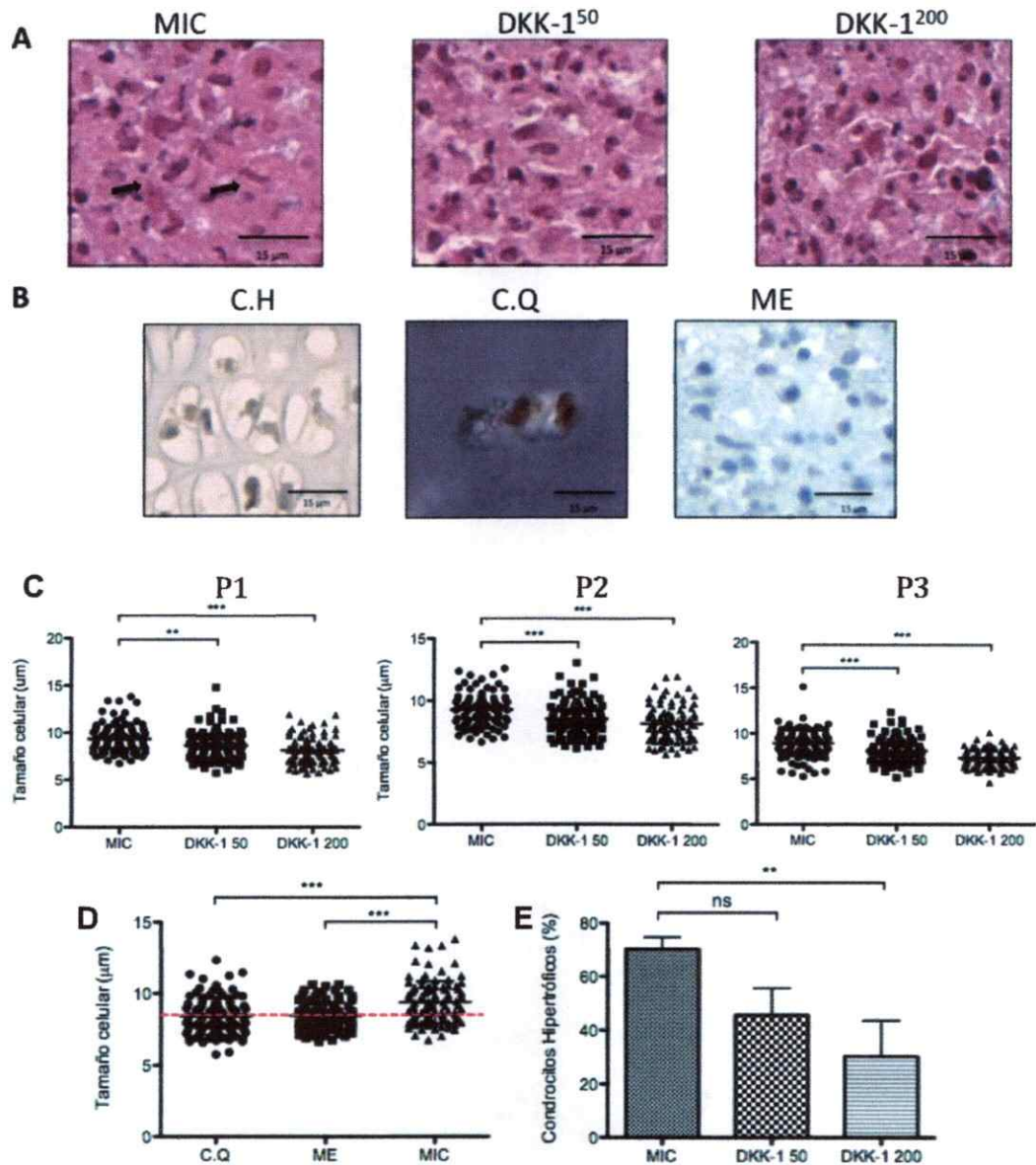


Figura 7: Análisis de morfología y tamaño celular. (A) Se analizó la morfología celular en pellets de CMMs cultivados en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 luego de 21 días de diferenciación y (B) se comparó con la morfología de condrocitos hipertróficos (C.H), quiescentes (C.Q) y CMMs cultivadas en ME por 21 días. (C) Se midió y graficó el tamaño celular de los 3 pacientes (P1, P2 y P3) mediante el software ImageJ, (D) Se definió el tamaño para diferenciar a condrocitos hipertróficos de quiescentes (línea punteada roja) y (E) se graficó el porcentaje de condrocitos hipertróficos. Flechas indican morfología tipo hipertrófica, con mayor tamaño celular. Imágenes a 400x. Se graficó la desviación estándar de los resultados. ns: sin diferencia significativa; **: p < 0,01; ***: p < 0,0001.

3.4 Inducción de la expresión de marcadores de cartilago hialino

Una correcta diferenciación condrocítica no solo debe excluir el proceso de hipertrofia celular, sino que además requiere la expresión de marcadores típicos de cartilago hialino sano. Para analizar si las dosis de DKK-1 utilizadas son capaces no solo de atenuar el proceso de hipertrofia condrocitaria, sino que además, promover la diferenciación de condrocitos quiescentes propios de cartilago hialino articular, se analizó la presencia de los componentes extracelulares más abundantes del cartilago hialino sano, Col II y GAGs (secretados por condrocitos quiescentes), en los pellets celulares, mediante IHQ y tinción de azul de Toluidina, respectivamente.

En la figura 8 se observa que luego de 21 días de cultivo, el tratamiento temprano con 200 ng/ml de DKK-1 promueve en mayor medida la expresión de fibras de Col II, en relación al grupo control no tratado (MIC) (Figura 8A). Resultados similares se observaron en los tres pacientes. Como control positivo, se incluyó el análisis de una muestra de cartilago hialino en la que se observa la expresión de Col II (Figura 8 C).

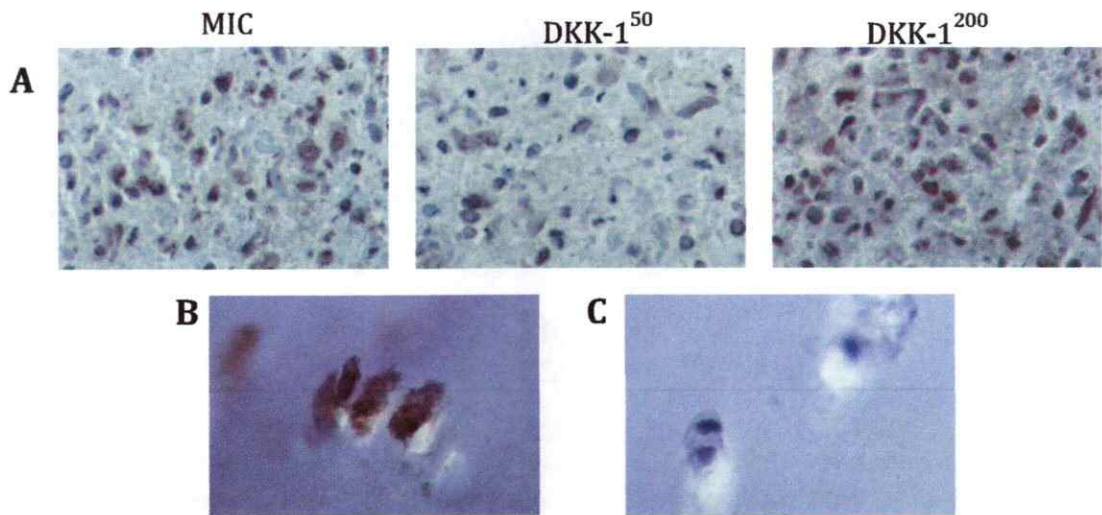


Figura 8: Presencia de Col II al día 21 por IHQ. (A) Se evaluó la presencia de colágeno II en pellets de CMMs cultivados en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 luego de 21 días de diferenciación. (B) Control positivo, cartílago hialino sano. (C) Control negativo. Imágenes a 400x.

Por otro lado, al analizar la presencia de GAGs al día 1, 7, 14 y 21 de cultivo en medio MIC, es posible observar una tinción ortocromática (azul, ausencia de GAGs) al día 1 y 7, similar al grupo control (ME). Mientras que al día 14 se observa que comienza la síntesis de GAGs asociado a la MEC, indicado por una leve tinción metacromática (púrpura, presencia de GAGs), la cual también se observa en los pellets celulares tratados con DKK-1 (Figura 9). Sin embargo, al día 21 es posible observar un aumento en la expresión de GAGs asociada a la MEC, al tratar con ambas dosis de DKK-1 (Figura 9). Este resultado se observó en los tres pacientes.

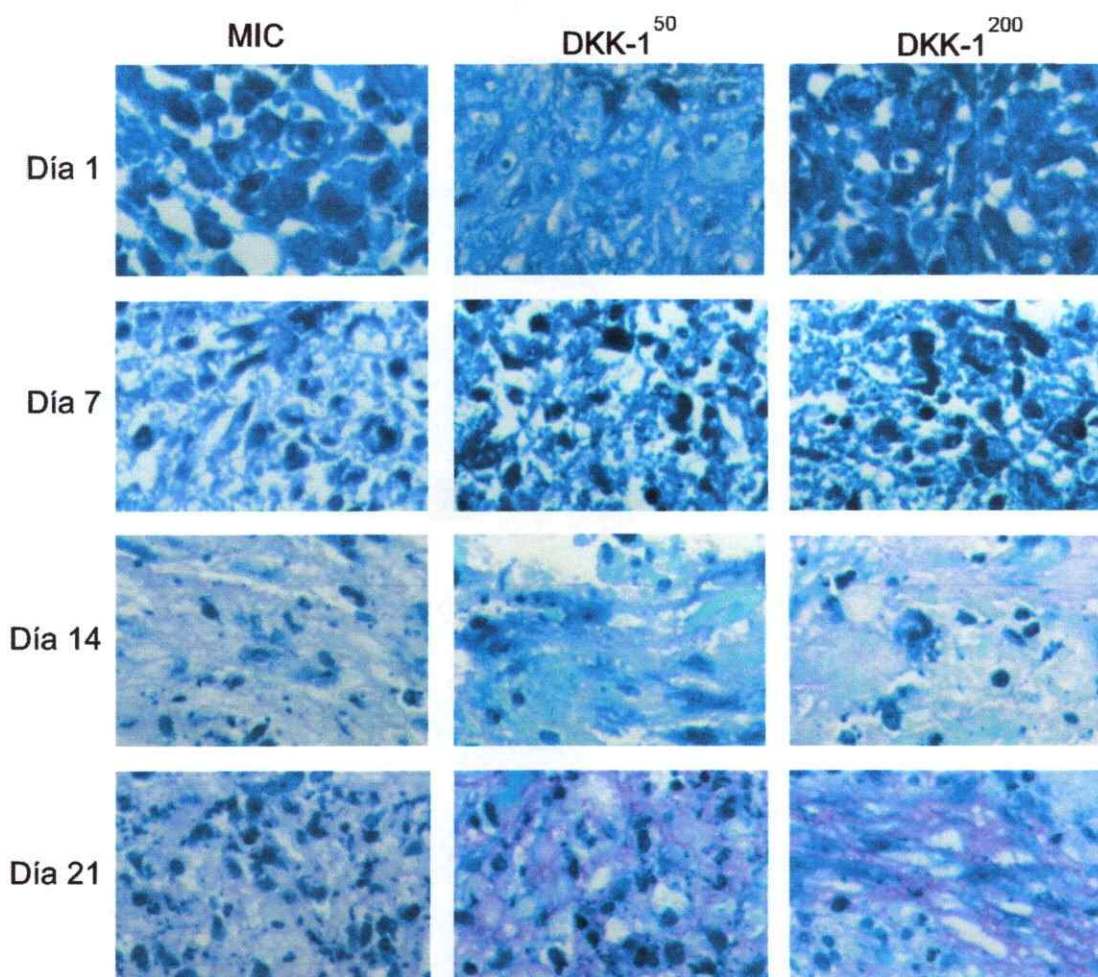


Figura 9: Presencia de GAGs mediante tinción de azul de toluidina. Se evaluó la presencia de glicosaminoglicanos (GAGs) en pellets de CMMs cultivados en medio inductor a condrogénesis sin DKK-1 (MIC), con 50 ng/ml (DKK-1⁵⁰) y 200 ng/ml (DKK-1²⁰⁰) de DKK-1 a los días 1, 7, 14 y 21 de diferenciación. La presencia de GAGs se evidencia por la tinción metacromática (púrpura), mientras que la ausencia por una tinción ortocromática (azul). Imágenes a 400x.

DISCUSIÓN

La finalidad de este estudio es lograr acercarse a un perfil condrogénico más estable por medio de la inhibición de la vía WNT canónica con DKK-1. Para ello, se realizó un tratamiento inhibitorio temprano, en comparación con otros estudios. Se decidió inhibir la vía WNT desde el tercer día de inducción condrogénica, mientras otros estudios lo han hecho desde el séptimo día (Leijten y col., 2012). Este parámetro fue considerado, como se mencionó anteriormente, principalmente por dos factores: 1) estudios demuestran la expresión de Col X luego de 7 días de inducción (Peltari y col., 2006) y 2) la inhibición de la vía WNT disminuye β -catenina citoplasmática, la cual además de trasladarse al núcleo, para permitir la transcripción de genes diana, participa en uniones adherentes. β -catenina interactúa con E-cadherina y, a través de alfa-catenina, con el citoesqueleto de actina, permitiendo los contactos celulares. Por lo tanto, se eligió un día intermedio entre el primer y séptimo día de inducción, para favorecer los contactos celulares y lograr inhibir la expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria.

Se trabajó con CMMs de tres pacientes para descartar que los resultados obtenidos fueran un hecho aislado de la población. El rango etario de los pacientes estudiados fue entre 21 y 28 años, considerándose principal criterio de inclusión una adecuada morfología celular y crecimiento normal de las células. Además, de no poseer enfermedades que puedan comprometer la calidad de sus CMMs de médula ósea, como por ejemplo leucemia, anemia aplásica, linfoma, entre otros. Los tres pacientes fueron sometidos a una extracción de médula ósea de cresta iliaca para tratar lesiones condrales en Clínica las Condes. El excedente de células fue utilizado en este estudio, previo consentimiento informado.

Se utilizó DKK-1 porque es uno de los inhibidores naturales de la vía WNT canónica sobreexpresado en el cartilago hialino de rodilla (Leijten y col., 2012). Su adición al medio de diferenciación busca entregar un contexto lo más similar al tejido cartilaginoso sano.

Se analizó la expresión de marcadores de condrocitos quiescentes y condrocitos hipertróficos por 21 días, tiempo que se considera necesario para la diferenciación condrogénica. Esto permitió estudiar el perfil de expresión de los distintos marcadores durante el proceso de diferenciación.

El pellet de cultivo fue desarrollado con $2,5 \times 10^5$ CMMs de acuerdo a lo establecido como un número óptimo para obtener un pellet homogéneo, esférico y no bi-cóncavo (Bhumiratana y col., 2014). Fue de aspecto vítreo y de un tamaño apropiado para llevar a cabo la diferenciación y los análisis requeridos. Los experimentos con DKK-1 fueron realizados en un medio libre de suero para imitar el ambiente donde los condrocitos residen (Terada y col., 2005). Además se adiciona TGF- β 1, porque se ha demostrado que es capaz de inducir la diferenciación condrogénica en CMMs (Kulyk y col., 1989b; Lafeber y col., 1993; Denker y col., 1995) y permite mantener la homeostasis de condrocitos articulares (Serra y col., 1997). Además se ha reportado que es capaz de inhibir cambios hipertróficos en condrocitos en expansión (Ballock y col., 1993; Tschan y col., 1993; Dieudonne y col., 1994; Bohme y col., 1995). Sin embargo, su presencia también se ha asociado a la inducción de hipertrofia condrocitaria. Esta acción dual de TGF- β se debe a que posee dos posibles cascadas de transducción a través de proteínas Smad (Heldin y col., 1997; Massague, 1998; Datto y col., 1999). Estas últimas median dos tipos de respuestas, tanto estimulantes como inhibitorias sobre la hipertrofia de condrocitos. La ruta de señalización a través de Smad 1/5/8, induce hipertrofia condrocitaria por medio de



cambios epigenéticos (Hellingman y col., 2011). Mientras que la señalización por Smad 2/3 inhibe la hipertrofia condrocitaria y promueve la condrogénesis debido a la estabilización del complejo de transcripción Sox9 (Yang y col., 2001; Furumatsu y col., 2005). Además, también conduce a la inhibición de Runx2 a través de regulaciones epigenéticas (Kang y col., 2005). Aunque TGF- β es claramente crucial en la regulación de hipertrofia de condrocitos, su adición al medio de inducción durante el cultivo de pellet de CMMs no es suficiente para suprimir la aparición de marcadores de hipertrofia condrocitaria, evidenciado en este y otros estudios (Sekiya y col., 2002; Peltari y col., 2006; Mueller & Tuan, 2008).

Se estableció comparar dos dosis de DKK-1 para definir el tratamiento más óptimo en la inhibición de cambios hipertróficos, con el fin de trasladar este tratamiento a pacientes humanos en un futuro. Ambas dosis estudiadas mostraron no afectar la viabilidad celular en ninguno de los tres pacientes. Este aspecto es fundamental, ya que se está inhibiendo una vía celular directamente involucrada con la proliferación celular. Por lo tanto, de manera *in vitro*, son seguras de usar para el proceso de diferenciación condrogénica.

En primera instancia se estudió la expresión y localización de β -catenina durante el proceso de diferenciación condrogénica. Inicialmente, se observó elevados niveles de β -catenina, localizados en la periferia celular, posiblemente favoreciendo los contactos celulares, hecho fundamental para permitir la condensación celular. Posteriormente, al día 7, hay una disminución significativa de β -catenina en todas las condiciones de cultivo. Al día 14 y 21 pellet cultivados en MIC muestran una progresiva acumulación de β -catenina a nivel citoplasmático, evidenciándose su presencia en núcleos. El tratamiento con la dosis más alta de DKK-1 disminuyó significativamente su presencia luego de 21 días de diferenciación condrogénica. Este efecto inhibitorio,

observado al día 21, puede deberse a que el cultivo en pellet celular hace más difícil la difusión de DKK-1 hasta el interior del pellet, necesitando mayor tiempo y una dosis de DKK-1 más alta para lograr inhibir de forma significativa la vía WNT. Sin embargo, pese a que el tratamiento con 50 ng/ml no logró disminuir significativamente el nivel de β -catenina, sí se observó una disminución por IHQ, de la presencia de β -catenina nuclear al día 21. Es posible, que un tratamiento más prolongado con esta dosis pueda inhibir de forma significativa la vía WNT canónica. Por lo tanto, se continuó con el estudio de ambas dosis de DKK-1.

Posteriormente, se estudió si la inhibición de la vía WNT canónica logra disminuir la presencia de marcadores de hipertrofia condrocitaria, observándose que la diferenciación condrogénica de CMMs en MIC, sin tratamiento, indujo una elevada expresión Col X y FAL al día 21. Mientras que el tratamiento con DKK-1 logró retardar la expresión de Col X al día 14 y disminuyó significativamente los niveles de expresión al día 21, principalmente con 200 ng/ml. Otros estudios de expresión génica han mostrado que el tratamiento con 10nM de DKK-1 no disminuye la expresión de Col X (Im y col., 2011), mientras que el tratamiento con 20 ng/ml sí (Leijten y col., 2012). Este resultado no es posible de comparar directamente, pero como en este estudio el tratamiento con 50 ng/ml mostró menor efecto que el con 200 ng/ml en la inhibición de la expresión de Col X, sería posible esperar que la disminución de este marcador sea aun más significativa que la encontrada en dicho estudio.

La actividad enzimática de FAL mostró una temprana presencia luego de 24 hrs de inducción. Resultados similares se han encontrado en CMMs del endometrio (Schwab & Gargett, 2008) y de corazón (Aguar y col., 2011). Esta elevada actividad de FAL se ha descrito como un marcador de células madres embrionarias (CME), asociándola como un indicador de pluripotencialidad. Estos resultados se correlacionan

con otros estudios que demuestran que CMMs de médula ósea poseen elevados niveles de FAL, incluso mayores que CME de ratón, tejido adiposo y CMMs neurales (Štefková y col., 2015).

Durante el proceso de diferenciación condrogénica la actividad enzimática de FAL no disminuyó en los pellets sin tratamiento. Mientras que la adición de ambas dosis de DKK-1 redujeron levemente la actividad enzimática al día 14, y en gran medida al día 21 con 200 ng/ml. En los tres pacientes estudiados el mejor resultados se obtuvo con la dosis más alta de DKK-1. Resultados similares se han obtenido al estudiar la expresión génica de FAL en pellets de CMMs de médula ósea tratados con 20 ng/ml de DKK-1 (Leijten y col., 2012), sin embargo, no son posibles de comparar directamente.

FAL es una enzima presente en la mayoría de los organismos vivientes. En humanos existen cuatro isoformas: intestinal, placentaria, en células germinales y tejido no específicas (TNE). Dentro de esta última hay tres isoformas presente en hueso, hígado y riñón (Moss, 1982). El rol principal de TNE está en la mineralización de tejidos duros, mediante la formación de cristales de hidroxapatita, y el metabolismo del neurotransmisor ácido gamma aminobutírico (GABA). Debido a esta variabilidad de funciones sería adecuado poder evaluar la mineralización del tejido para asociar directamente la actividad enzimática con el proceso de osificación endocondral. Esto es fundamental, ya que para poder trasladar este tratamiento a nivel clínico es necesario que los condrocitos derivados de CMMs no expresen FAL, ya que la mineralización del tejido podría dañar el cartílago adyacente.

Como último marcador de hipertrofia condrocitaria estudiado, se analizó la morfología y tamaño celular de condrocitos derivados de CMMs. Estas células se comportaron de manera heterogénea al ser cultivadas en pellet. Las células más

expuestas, de revestimiento del pellet, permanecieron con una morfología fibroblástica, mientras que las células del interior adquirieron una morfología redondeada en los primeros días. Luego de 21 días de cultivo en MIC, se identificó condrocitos derivados de CMMs de hasta 15 μm , con una morfología similar a la observada en condrocitos hipertróficos. Mientras que el tratamiento con la dosis más alta de DKK-1 disminuyó el rango de tamaño celular observado, llegando a ser en promedio de 7,3 μm , observándose una morfología similar a condrocitos de cartílago hialino sano. Se comparó el tamaño de condrocitos derivados de CMMs con condrocitos quiescentes e hipertróficos, calculados de la misma manera, y se observó que el tamaño máximo de condrocitos quiescentes positivos para Col II fue de 12 μm , mientras que en el caso de condrocitos hipertróficos, fue de 21 μm . Estos resultados, concuerdan con los datos señalados en la literatura, la cual indica que el tamaño celular máximo de condrocitos quiescentes medidos por microscopía electrónica es entre 10-12 μm , mientras que el tamaño de condrocitos hipertróficos puede llegar a ser hasta 10 veces el tamaño de condrocitos quiescentes (Stockwell, 1979).

Para determinar el porcentaje de condrocitos hipertróficos presentes en cada condición, se definió el promedio del tamaño de condrocitos quiescentes como el tamaño máximo de estos, siendo un tamaño mayor representativo de condrocitos hipertróficos. Este parámetro permite separar de manera preliminar la población de condrocitos quiescentes de hipertróficos. Sin embargo, un análisis más riguroso, por ejemplo por Inmunofluorescencia, permitiría observar la colocalización de Col II y X, permitiendo discriminar una población condrocitaria positiva para Col II y negativa para Col X a la vez, determinando de manera más precisa el tamaño celular que permite diferenciar a ambas poblaciones.

La cuantificación de condrocitos hipertróficos presentes en pellets cultivados en MIC arrojó que el 70% de las células poseen un mayor tamaño celular, evidenciando el comienzo de un proceso de hipertrofia condrocitaria. El tratamiento con la dosis más baja de DKK-1 logró disminuir esta población al 45,6%, mientras que el tratamiento con 200 ng/ml de DKK-1 logró disminuir significativamente el número de condrocitos hipertróficos a un 30%, es decir, logró atenuar el proceso de hipertrofia condrocitaria en más de la mitad de la población observada.

Este incremento en el tamaño celular de condrocitos quiescentes cuando se diferencian a condrocitos hipertróficos, es un proceso natural presente en la placa de crecimiento de huesos. Este fenómeno, se debe al aumento del volumen celular producido por cambios en la osmolaridad, el cual permite el crecimiento longitudinal de huesos.

Si bien, el mayor tamaño celular es una característica de condrocitos hipertróficos, este parámetro por sí solo no permite definir una población de condrocitos hipertróficos, si no que la presencia en conjunto de los distintos marcadores de hipertrofia condrocitaria, que fueron previamente estudiados. El análisis en conjunto de los marcadores de hipertrofia condrocitaria (presencia de Col X, FAL, β -catenina nuclear y tamaño celular), muestra que luego de 21 días de diferenciación condrogénica en medio inductor, sin DKK-1, todos estos marcadores están fuertemente expresados, permitiendo identificar que efectivamente hay una población de condrocitos hipertróficos presente cuando CMMs son cultivadas por 21 en MIC. Este fenotipo fue atenuado con el tratamiento de 50 ng/ml de DKK-1, el cual, pese a no disminuir significativamente la vía WNT canónica, sí logró disminuir la presencia de Col X y FAL al día 21. Este efecto fue aun más evidente al agregar 200 ng/ml al MIC,

logrando disminuir significativamente todos los marcadores de hipertrofia condrocitaria estudiados.

Por otro lado se estudió si la inhibición de la vía WNT canónica favorece la expresión de marcadores típicos de cartílago hialino. Para esto se evaluó la presencia de las proteínas de MEC más abundantes, Col II y GAGs. En este estudio se observó que el cultivo de pellets de CMMs en MIC indujo la expresión de GAGs y fibras de Col II al día 21. Mientras que el tratamiento con ambas dosis de DKK-1 incrementó la expresión de GAGs en este mismo día y a su vez, la expresión de Col II fue significativamente mayor al adicionar 200 ng/ml de DKK-1 al MIC, en los tres pacientes estudiados.

Por lo tanto, el cultivo de pellets de CMMs en MIC, sin DKK-1, muestra que luego de 24 hrs de inducción condrocitaria, β -catenina se encuentra localizada en la membrana celular, hay elevados niveles de expresión de FAL y no hay evidencia de expresión de Col II, X ni GAGs. Al día 7, hay una disminución en la presencia de β -catenina, la cual comienza a acumularse progresivamente a nivel citoplasmático y en el núcleo al día 14. Además, en dicho día se comienza a observar la expresión de GAGs y Col X. Luego de 21 días de diferenciación condrogénica hay mayor expresión de Col X que Col II, hay expresión de GAGs y FAL. Es decir, las células presentan un perfil mayoritariamente hipertrófico.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la inhibición de la vía WNT canónica, la inhibición de cambios hipertróficos y la estimulación de marcadores de cartílago hialino sano, el tratamiento con 200 ng/ml de DKK-1 mostró mejores resultados en todos estos aspectos luego de 21 días de cultivo. El tratamiento con la dosis más alta de DKK-1 permitió por un lado incrementar la expresión de marcadores de cartílago hialino sano (GAGs y Col II), y por otro lado, disminuir la expresión de marcadores de

hipertrofia condrocitaria al día 21 de diferenciación condrogénica. Retrasó la expresión de Col X al día 14 y disminuyó su expresión y la de FAL al día 21. Además, se disminuyó de un 70% a un 30% el número de condrocitos hipertróficos y las células adquirieron una morfología mayoritariamente similar a condrocitos quiescentes.

Este estudio de diferenciación condrogénica en pellets celular junto con otros estudios han utilizado preferentemente técnicas histoquímicas e IHQ para caracterizar la presencia de los distintos marcadores de diferenciación. Esta caracterización es por lo general acompañada por análisis de expresión génica, para cuantificar dichos marcadores. En este estudio se analizó como primera instancia la presencia de dichos marcadores por medio de técnicas histoquímicas e IHQ, por lo que una futura cuantificación de los niveles de expresión génica será útil para el mayor entendimiento del proceso de diferenciación. A su vez, como los procesos de diferenciación condrogénica y ósea están estrechamente vinculados, es necesaria la caracterización del factor de crecimiento que está regulando el proceso de diferenciación (Sox9 o Runx2), para corroborar el fenotipo de los condrocitos derivados de CMMs.

Si bien existe una clara tendencia en los resultados obtenidos, se observó variabilidad de respuestas en los pacientes estudiados. Esto se puede deber a que sus CMMs poseen distintos potenciales de diferenciación condrogénica. Se ha demostrado que CMMs tienen gran heterogeneidad en la población celular reflejado por la morfología y capacidades de diferenciación (Phinney, 2002). Se han identificado dos poblaciones de CMMs en aislados de médula ósea que difieren en el patrón de expresión, morfología, capacidad clonogénica y de diferenciación (Tremi y col., 2009). Además, la extracción de CMMs de médula ósea puede traer consigo células osteoprogenitoras que favorecen la diferenciación a linaje osteogénico, en vez de

condrogénico. Para esto Diaz- Romero y col. propusieron recientemente dos proteínas, S100A1 y S100B, como marcadores del potencial condrogénico en condrocitos autólogos de cartilago hialino (Diaz-Romero y col., 2014). Estas proteínas también han sido identificadas en estudios de diferenciación condrogénica de CMMs, en presencia de TGF- β , (Giovannini y col., 2010). A pesar de que su rol en el proceso de diferenciación no está claro, su expresión está estrechamente correlacionada con Sox9 en condrocitos humanos primarios (Tew y col., 2007). Esta puede ser una primera aproximación para identificar, aislar y trabajar con la población de CMMs que presenten mayor potencial condrogénico.

Otras consideraciones en el proceso de diferenciación condrogénica *in vitro* está en el cóctel de factores de crecimiento y estímulos físicos que se entregan, ya sea inhibidores de la vía WNT, cultivo en hipoxia o bajo estímulos mecánicos para imitar de mejor manera el proceso de diferenciación que ocurre de manera natural. Por ejemplo, el proceso de diferenciación condrogénica está regulado por múltiples factores que intervienen en distintas etapas durante el proceso de diferenciación, es por esto que el camino para lograr un fenotipo condrocitario estable es aun muy largo cuando se intenta diferenciar CMMs con solo un par de moléculas inductoras. Sería interesante poder estudiar cómo se comportan las CMMs con un cóctel de inhibidores de la vía WNT, como ocurre en condrocitos del cartilago hialino.

Por otro lado, el proceso de diferenciación condrogénica *in vitro* utilizada en este estudio fue pellet celular, ya que intenta imitar el proceso de condensación celular de etapas embrionarias, en cuanto a contactos celulares. Sin embargo, otros factores son necesarios de considerar para mejorar el proceso diferenciación, como por ejemplo, el cultivo de CMMs en hipoxia y estímulos mecánicos, condiciones bajo la cual se encuentran condrocitos en el cartilago articular.

El cultivo en bajas concentraciones de oxígeno estimula la condrogénesis de CMMs mediante la expresión de dos factores de transcripción inducidos por hipoxia, 1 alpha y 2 alpha (HIF-1 α y HIF- 2 α). La expresión de HIF-1 α es necesario durante todo el proceso de diferenciación condrogénica (Provot y col., 2007). En etapas iniciales promueve la inducción de Col II y GAGs (Pfander y col., 2003), al interactuar con el promotor de Sox9 (Robins y col., 2005; Kanichai y col., 2008) y en etapas finales promueve la secreción de VEGF (Schipani y col., 2001), necesario para la supervivencia de condrocitos. El cultivo en hipoxia ha demostrado además, ser capaz de inhibir la expresión de Col X, MMP13 y FAL (Ronziere y col., 2010; Sheehy y col., 2012). Para esto, el cultivo celular de CMMs en biorreactores puede facilitar el cultivo *in vitro* en hipoxia y con estímulos mecánicos (Demoor y col., 2014). Siendo este último es capaz de incrementar la expresión de fibras de Col II y GAGs (Gemmiti & Guldberg, 2006; Tran y col., 2011).

Por último, para la aplicación de terapias regenerativa de cartílago con CMMs es fundamental demostrar la estabilidad fenotípica de estas para evitar cualquier riesgo en el paciente. No solo por la presencia de marcadores de hipertrofia condrocitaria, sino por la posible vascularización del tejido, que por naturaleza es avascular. Idealmente una terapia celular óptima sería con condrocitos completamente diferenciados, sin embargo, aún no existe una terapia de este tipo. El único tratamiento celular aprobado por la FDA (Food and Drugs Administration, EEUU) para tratar lesiones condrales de bajo espesor es Carticel® (Genzyme, Cambridge, MA), basado en la extracción de condrocitos autólogos de cartílago hialino sano de una zona libre de soporte de peso, su posterior expansión *in vitro* e implantación en la zona dañada. El cual, como esta basado en el uso de condrocitos autólogos, tiene las limitaciones antes

mencionadas: requerimiento de dos cirugías, expansión, desdiferenciación de condrocitos y la necesidad de una fuente de cartílago sano.

Estudios clínicos con condrocitos derivados de CMMs usan membranas o geles que dan soporte a las células y evitan su migración. Dentro de las más usadas están Hyalofast® y Chondro Guide®, membranas de fibras de ácido hialurónico y colágeno, respectivamente. Estas matrices celularizadas ya han sido usadas en tratamientos de lesiones condrales en Clínica las Condes, mostrando resultados promisorios. Sin embargo, aún no está claro si este efecto se debe a la membrana en particular, a un efecto paracrino de las células, a la proliferación y regeneración del tejido por parte de CMMs diferenciadas o a un efecto conjunto de varios de estos.

Los resultados de este seminario de título, junto con la posterior caracterización a nivel de expresión génica serán utilizados para evaluar el efecto de la dosis más alta de DKK-1 en condrocitos derivados de CMMs cultivados en membranas. Posteriormente se realizarán estudios en modelo animal para poder trasladarlo a nivel clínico, lo que permitiría posiblemente regenerar el tejido y recuperar la funcionalidad articular. Es decir, mejorar la calidad de vida de muchos pacientes afectados.

CONCLUSIONES

1. El cultivo de CMMs en pellets es un buen modelo de estudio del proceso de diferenciación condrogénica, ya que favorece la uniones celulares.
2. Ambas dosis estudiadas (50 y 200 ng/ml) de DKK-1 no afectan la viabilidad celular, al ser agregadas al medio inductor desde el tercer día de diferenciación.
3. El tratamiento con 200 ng/ml de DKK-1, desde el tercer día de diferenciación condrogénica, logra inhibir de manera significativa la vía WNT canónica luego de 21 días de diferenciación.
4. El medio inductor, basado en TGF- β 1, es capaz de promover la expresión de Col II y GAGs. Pero además, la expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria, Col X, FAL e incremento del tamaño celular luego de 21 días de diferenciación *in vitro*.
5. El tratamiento temprano con ambas dosis de DKK-1, permite retrasar la expresión de Col X una semana.
6. El tratamiento con 200 ng/ml de DKK-1 entregó mejores resultados en la inhibición de cambios hipertróficos y en la estimulación de proteínas de MEC de cartílago hialino sano, obteniéndose una población de células más similares a condrocitos quiescentes.

BIBLIOGRAFIA



Adams, C.S. & Shapiro, I.M. 2002 The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13(6):465-473

Aguiar, A. M., et al. 2011. Alkaline phosphatase-positive cells isolated from human hearts have mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cell Discovery*, 01(03), 71-80.

Aigner, T., Stöve, J. 2003. Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(12): 1569-1593.

Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A., de Crombrughe, B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6, *Genes Dev.* 16(21): 2813-2828.

Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., et al. 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*;18(9): 1072e87

Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Tsiftoglou, A., Garefis, P., Koidis, P., Geurtsen, W. 2011. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*; 56(7): 709-721

Ballock, R.T., Heydemann, A., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B. 1993. TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal

chondrocytes regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev. Biol.* 158:414–429.

Banerjee, C., L.R. McCabe, J. Choi, S.W. Hiebert, J.L. Stein, G.S. Stein, and J.B. Lian. 1997. Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. *J. Cell. Biochem.* 66:1–8.

Benya, P.D. & Shaffer, J.D. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *30(1):215-24.*

Bhumiratana, S., Eton, R. E., Oungouljian, S. R., Wan, L. Q., Ateshian, G. a, & Vunjak-Novakovic, G. 2014. Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by mesenchymal condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19), 6940–5.

Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., et al. 2013. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine, *Nat. Med.* 19(1):35-42

Blom, A.B., Brockbank, S.M., van Lent, P.L., van Beuningen, H.M., Geurts, J., Takahashi, N., van der Kraan, P.M., van de Loo, F.A., Schreurs, B.W., Clements, K., et al. 2009. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: Prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheumatol.* 60(2), 501–512.

Bohme, K., Winterhalter, K.H., Bruckner, P. 1995. Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp. Cell Res.* 216:191–198.

Bosch, P., Musgrave, D.S., Lee, J.Y., et al. 2000. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res.* 18(6):933–944

Bridgewater, L.C., Lefebvre, V., and de Crombrughe, B. 1998. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J. Biol. Chem.* 273: 14998–15006.

Buttle, D.J., Fowles, A., Ilic, M.Z., Handley, C.J. 1997. "Aggrecanase" activity is implicated in tumour necrosis factor alpha mediated cartilage aggrecan breakdown but is not detected by an in vitro assay, *MP, Mol. Pathol.* 50(3):153–159.

Camper, L., Hellman, U., Lundgren-Akerlund, E., 1998. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit $\alpha 10$, a $\beta 1$ -associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 20383–20389

Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G. et al. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 56(2):289–301

Chapel, A., Bertho, J.M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R.G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., Dudoignon, N., et al. 2003. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med;* 5(12): 1028-1038

Chuong, C.M., Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Abbott, U.K., Lee, Y.S., Chen, H.M. 1993. Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation. *Prog Clin Biol Res.* 383B:465–74.

Datto, M.B., Frederick, J.P., Pan, L., Borton, A.J., Zhuang, Y., Wang, X.F. 1999. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19:2495–2504.

Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., Yang, Y. 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*;8(5):739-50.

De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., et al. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44(8):1928–1942,

DeLise, A.M., Fischer, L., Tuan, R.S. 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*;8(5):309-34.

Dell'Accio, F., De Bari, C., El Tawil, N. M. F., Barone, F., Mitsiadis, T. a, O'Dowd, J., & Pitzalis, C. 2006. Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Research & Therapy*, 8(5), R139

Demoor, M. et al. 2014. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction, *Biochim. Biophys. Acta.* 1840(8):2414–40

Denker, A.E., Nicoll, S.B., Tuan, R.S. 1995. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation.* 59:25–34.

Dessau, W., von der Mark, H., von der Mark, K., Fischer, S. 1980. Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol*;57:51–60.

Diaz-Romero, J., Quintin, A., Schoenholzer, E., Pauli, C., Despont, A., Zumstein, M.A., Kohl, S. & Nasic, D. 2014. S100A1 and S100B expression patterns identify differentiation status of human articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 229(8): 1106–1117.

Dieudonne, S.C., Semeins, C.M., Goei, S.W., Vukicevic, S., Nulend, J.K., Sampath, T.K., Helder, M., Burger, E.H. 1994. Opposite effects of osteogenic protein

and transforming growth factor beta on chondrogenesis in cultured long bone rudiments. *J. Bone Miner. Res.* 9:771–780.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8 (4): 315-317.

Dong, Y-F., Soung, D.Y., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., Drissi, H. 2006. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 208: 77-86.

Ede, D. 1983. Cellular condensations and chondrogenesis In: Hall BK, Ed. *Cartilage: Development, Differentiation, and Growth.* New York: Academic Press, pp. 143–185

Fell, HB. 1925. The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J Morphol*;40(3):417–51.

Flannery, C.R., Little, C.B., Hughes, C.E., Caterson, B. 1998. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251(3): 824–829.

Fortier, L.A., Barker, J.U., Strauss, E.J., McCarrel, T.M., Cole, B.J. 2011. The role of growth factors in cartilage repair, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469(10):2706-15.

Fosang, A.J., Last, K., Knäuper, V., Murphy, G., Neame, P.J. 1996. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *Febs Letters* 380(1-2): 17-20.

Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y., Asahara, H. 2005. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J Biol Chem* 280: 8343-8350.

Gemmitti, C.V. & Guldberg, R.E. 2006. Fluid flow increases type II collagen deposition and tensile mechanical properties in bioreactor-grown tissue-engineered cartilage, *Tissue Eng.* 12(3):469-79.

Ghadially, F. N. 1978. Fine structure of the joint. In: Sokoloff L, editor. *The joints and synovial fluid.* New York: Academic Press; pp. 105–76.

Giovannini, S., Diaz-Romero, J., Aigner, T., Heini, P., Mainil-Varlet, P., Nestic, D. 2010. Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. *Eur Cell Mater* 20:245– 259.

Goldring, M.B. & Marcu, K.B. 2009. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*;11(3):224.

Gregory, C.A., Singh, H., Perry, A.S., Prockop, D.J. 2003. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem.* 278(30):28067-78.

Hall, B.K. & Miyake, T. 2000. All for one and one for all: Condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* 22(2):138-47.

Hascall, V.C., Oegema, T.R., Brown, M. 1976. Isolation and characterization of proteoglycans from chick limb bud chondrocytes grown in vitro. *J Biol Chem*; 251(11):3511–9.

He, X., Semenov, M., Tamai, K., Zeng, X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development (Cambridge, England)*;131(8):1663–1677.

Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390:465–471.

Hellingman, C., Blaney, Davidson, E., Koevoet, W., Vitters, E., van den Berg, W., van Osch, G., van der Kraan, P. 2011. Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: Inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng Part A* 17: 1157-67.

Hens, J.R., Wilson, K.M., Dann, P., Chen, X., Horowitz, M.C., Wysolmerski, J.J. 2005. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res*;20(7):1103-13.

Hering T.M. 1999. Regulation of chondrocyte gene expression, *Front. Biosci.* 4: D743–D761.

Hill, T.P., Spater, D., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Hartmann, C. 2005. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*;8(5):727-38.

Hill, T.P., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Hartmann, C. 2006. Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning. *Development*;133(7):1219-29.

Hu, H., Hilton, M.J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D.M., Long, F. 2005. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*;132(1):49-60.

Huang, B.L., Brugger, S.M., Lyons, K.M. 2010. Stage-specific control of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in chondrocytes by Sox9 and beta-catenin. *J Biol Chem*; 285(36):27702e12.

Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., et al., 2004. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage, *Arthritis Rheum.* 50(11): 3561–3573.

Im, G. Il., Lee, J. M., & Kim, H. J. 2011. Wnt inhibitors enhance chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in a long-term pellet culture. *Biotechnology Letters*, 33(5), 1061–1068.

Im, G.-I., & Quan, Z. 2010. The effects of Wnt inhibitors on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part A*, 16(7), 2405–2413.

Inada, M., Wang, Y.M., Byrne, M.H., Rahman, M.U., Miyaura, C., Lopez-Otin, C., Krane, S.M. 2004. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth and in endochondral plate cartilage ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49):17192-7

Ishida, O., Tanaka, Y., Morimoto, I., Takigawa, M., & Eto, S. 1997. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 12(10), 1657–63.

Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell Biochem* 64: 295-312.

Jo, Y.Y., Lee, H.J., Kook, S.Y., Choung, H.W., Park, J.Y., Chung, J.H., Choung Y.H., Kim, E.S., Yang, H.C., Choung, P.H. 2007. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*.13(4):767.

Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo, J.U., 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 238(1): 265–272

Kang, J.S., Alliston, T., Delston, R., Derynck, R. 2005. Repression of Runx2 function by TGF- β through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J* 24: 2543-2555.

- Kanichai, M., Ferguson, D., Prendergast, P.J., Campbell, V.A. 2008. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *J Cell Physiol* 216(3):708-15
- Knudson, C.B. & Toole, B.P. 1985. Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev Biol* 1985;112(2):308-18.
- Kosher, R.A., Kulyk, W.M., Gay, S.W. 1986. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol*;102(4):1151-6.
- Kosher, R.A., Solursh, M. 1989. Widespread distribution of type II collagen during embryonic chick development. *Dev Biol*;131(2):558-66.
- Kravis, D., Upholt, W.B. 1985. Quantitation of type II pro- collagen mRNA levels during chick limb cartilage differentiation. *Dev Biol*;108(1):164-72.
- Kronenberg, HM. 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 423(6937):332-336
- Kronenberg, HM. 2006. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*;1068 :1-13
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T. 2000. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*;16(7):279-83.
- Kulyk, W.M., Coelho, C.N., Kosher, R.A. 1991. Type IX collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *Matrix*;11(4):282-8.
- Kulyk, W.M., Rodgers, B.J., Greer, K., Kosher, R.A. 1989b. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev. Biol.*135:424-430.
- Kulyk, W.M., Upholt, W.B., Kosher, R.A. 1989a. Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development*;106(3):449-55.

Kwan, A.P., Cummings, C.E., Chapman, J.A., Grant, M.E. 1991. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J Cell Biol.* 114(3):597-604.

Lafeber, F.P., Vander Kraan, P.M., Huber-Bruning, O., Vanden Berg, W.B., Bijlsma, J.W. 1993. Osteoarthritic human cartilage is more sensitive to transforming growth factor beta than is normal cartilage. *Br. J. Rheumatol.* 32:281-286.

Las Heras, F., Gahunia, H.K., Pritzker, K.P. 2012. Articular cartilage development: a molecular perspective. *Orthop Clin North Am.*43(2):155-71.

Lefebvre, V., Behringer, R.R., de Crombrughe, B. 2001. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway, *Osteoarthr. Cartil.* 9 Suppl A:S69-75.

Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V.R., Goodfellow, P.N., and de Crombrughe, B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1(\text{II})$ collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2336-2346.

Leijten, J. C. H., Emons, J., Sticht, C., van Gool, S., Decker, E., Uitterlinden, A., et al. 2012. Gremlin 1, frizzled-related protein, and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis. *Arthritis and Rheumatism*, 64(10), 3302-12.

Logan, C.Y. & Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*;20:781-810.

Mackie, E.J., Murphy, L.I. 1998. The role of tenascin-C and related glycoproteins in early chondrogenesis. *Microsc Res Tech*;43(2):102-10.

Mackie, E.J., Ramsey, S. 1996. Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J Anat*; 188 (Pt 1):157-65.

Mackie, E.J., Thesleff, I., Chiquet-Ehrismann, R. 1987. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol*; 105(6 Pt 1):2569-79.

Mallein-Gerin, F., Kosher, R.A., Upholt, W.B., Tanzer, M.L. 1988. Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by in situ hybridization. *Dev Biol*; 126(2):337–45.

Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* 67:753–791.

Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K.W., et al. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*;5:57.

Miller, J.R. 2002. The Wnts. *Genome Biol*, 3(1):REVIEWS3001

Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., Moon, R.T. 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*;18(55):7860-72.

Mobasheri, A., Carter, S.D., Martin-Vasallo, P., Shakibaei, M. 2002. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int*:26:1- 18.

Moss, D.W. 1982. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinical Chemistry*. 28(10):2007–16.

Mrugala, D., Dossat, N., Ringe, J., Delorme, B., Coffy, A., Bony, C., Charbord, P., Häupl, T., Daires, J.P., Noël, D., et al. 2009. Gene expression profile of multipotent mesenchymal stromal cells: Identification of pathways common to TGFβ3/BMP2-induced chondrogenesis. *Cloning Stem Cells*, 11(1):61-76.

Mueller, M. B., & Zellner, J. 2010. Hypertrophy in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis: Effect of TGF-β₁ Isoforms and Chondrogenic Conditioning, 192(3):158-66.

Mueller, M.B. & Tuan, R.S. 2008. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheumatol.* 58(5):1377-88

Nah, H.D., Rodgers, B.J., Kulyk, W.M., Kream, B.E., Kosher, R.A., Upholt, W.B. 1998. In situ hybridization analysis of the expression of the type II collagen gene in the developing chicken limb bud. *Coll Relat Res.* 8:277-94.

Oh, H., Chun, C.-H., & Chun, J.-S. 2012. Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis and Rheumatism*, 64(8), 2568-78.

Olsen, B.R., Reginato, A.M. y W. Wang. 2000. Bone development. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 16:191-220.

Palmoski, M.J. & Goetinck, P.F. 1972 Synthesis of proteo- chondroitin sulfate by normal, nanomelic, and 5-bromodeoxyuridine-treated chondrocytes in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69:3385-8.

Patel, A.N., Park, E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant*;17(3):303-311.

Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B. G., Aigner, T. Richter, W. 2006. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis and Rheumatism*, 54(10), 3254-66.

Pfander, D., Cramer, T., Schipani, E., Johnson, R.S. 2003. HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes, *J. Cell Sci.* 116(Pt 9):1819-26.

Phinney, D.G. 2002. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl*, 38:7-12.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

Provot, S. & Schipani, E. 2005. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun.* 328(3):658-665.

Provot, S., Zinyk, D., Gunes, Y., Kathri, R., Le, Q., Kronenberg, H.M., et al. 2007. Hif-1alpha regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development, *J. Cell Biol.* 177(3):451-64.

Robins, J.C., Akeno, N., Mukherjee, A., Dalal, R.R., Aronow, B.J., Koopman, P., Clemens, T.L. 2005. Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone* 37(3):313-22.

Ronziere, M.C., Perrier, E., Mallein-Gerin, F., Freyria, A.M. 2010. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 20(3):145-58

Ryu, J.-H., et al., 2002. Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin. *Development*, 129(23), 5541-50.

Sabatini, F., Petecchia, L., Taviani, M., Jodon de Villeroché, V., Rossi, G.A., Brouty-Boyé, D. 2005. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities, *Lab. Invest.* 85 (8) 962-971.

Sah, R.L., Kim, Y.J., Doong, J.Y., Grodzinsky, A.J., Plaas, A.H., Sandy, J.D. 1989. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J Orthop Res.* 7(5):619-36.

Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, M. T., Knight, M., Johnson, R.S. 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival, *Genes Dev.* 15(21):2865-76.

Schwab, K. & Gargett, C. 2008. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*, 22(11):2903-11

Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., and Noda, M. 2000. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J. Biol. Chem.* 275: 10738–10744.

Sekiya, I., Vuoristo, J.T., Larson, B.L., Prockop, D.J. 2002. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4397-4402.

Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E.H., LaBorde, J., Sheehan, D.M., Derynck, R., Moses, H.L 1997. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J. Cell Biol.* 139:541–552.

Shakibaei, M. & Mobasher, A. 2003. Beta1- integrins co-localize with na, k-atpase, epithelial sodium channels (enac) and voltage activated calcium channels (vacc) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes. *Histol Histopathol*;18(2):343-351.

Sheehy, E.J., Buckley, C.T., Kelly, D.J. 2012. Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 417(1):305-10

Shlopov, B.V., Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S., Hasty K.A. 1997. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases, *Arthritis Rheum.* 40(11): 2065–2074.

Sophia, A., Bedi, A., Rodeo, S.A. 2009. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.*1(6):461-8.

Štefková, K., Procházková, J. & Pacherník, Jiří. 2015. Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells International.* 2015: 1-11.

Steinmeyer, J., Ackermann, B., Raiss, R.X. 1987. Intermittent cyclic loading of cartilage explants modulates fibronectin metabolism. *Osteoarthritis Cartilage.* 5(5):331-41.

Stockwell, R. A. 1979. *Biology of Cartilage Cells, Biological Structure and Functions* 7. University of Edinburgh, p26.

Studer, D., Millan, C., Öztürk, E., Maniura-Weber, K., Zenobi-Wong, M. 2012. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur. Cell Mater.* 24, 118–135.

Sugaya, K. 2003. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol;* 228: 1-30

Swiderski, R.E. & Solursh, M. 1992. Differential co-expression of long and short form type IX collagen transcripts during avian limb chondrogenesis in ovo. *Development.* 115:169–79.

Terada, S., Fuchs, J.R., Yoshimoto, H., Fauza, D.O., Vacanti, J.P. 2005. In vitro cartilage regeneration from proliferated adult elastic chondrocytes. *Ann Plast Surg* 55:196–201.

Tew, S.R., Clegg, P.D., Brew, C.J., Redmond, C.M., Hardingham, T.E. 2007. SOX9 transduction of a human chondrocytic cell line identifies novel genes regulated in primary human chondrocytes and in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 9(5):R107.

Tran, S.C., Cooley, A.J. & Elder, S.H. 2011. Effect of a mechanical stimulation bioreactor on tissue engineered, scaffold-free cartilage, *Biotechnol. Bioeng.* 108(6):1421-9

Tremblay, S., Cerabona, F., Zwart, P. De, Kanz, L., & Sobiesiak, M. 2009. Phenotypic Characterization of Distinct Human Bone Marrow – Derived MSC Subsets, 1176:124-34

Tschan, T., Bohme K., Conscience-Egli, M., Zenke, G., Winterhalter, K.H., Bruckner, P. 1993. Autocrine or paracrine transforming growth factor-beta modulates the phenotype of chick embryo sternal chondrocytes in serum-free agarose culture. *J. Biol. Chem.* 268:5156–5161.

Tsonis, P.A. & Walker, E. 1991. Cell populations synthesizing cartilage proteoglycan core protein in the early chick limb bud. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:688–95.

Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Wang, M.L., Alexander, P.G., Haleem- Smith, H., Hozack, W.J., Manner, P.A., Danielson, K.G., Tuan, R.S. 2003. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*; 21(6): 681-693

van Amerongen, R., Mikels, A., Nusse, R. 2008. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal*; 1(35):re9

van der Kraan, P. M., Blaney Davidson, E. N., Blom, A., & van den Berg, W. B. 2009. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis. Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(12), 1539–1545.

Williams, R., Khan, I.M., Richardson, K., Nelson, L., McCarthy, H.E., Analbelsi, T., Singhrao, S.K., Dowthwaite, G.P., Jones, R.E., Baird, D.M., et al. 2010. Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS ONE*, 5(10):e13246

Yang, X., Chen, L., Xu, X.L., Li, C.L., Huang, C.F., Deng, C.X. 2001. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 153: 35-46.

Yano, F., Kugimiya, F., Ohba, S., Ikeda, T., Chikuda, H., Ogasawara, T., Ogata, N., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., et al. 2005. The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333(4), 1300–1308.

Yasuhara, R., Ohta, Y., Yuasa, T., Kondo, N., Hoang, T., Addya, S., Fortina, P., Pacifici, M., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M. 2011. Roles of β -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Lab. Investig.* 91(12), 1739–1752.

Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., & Lee, B. 2003. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *Journal of Cell Biology*, 162(5), 833–842.

Zhu, M., Tang, D., Wu, Q., Hao, S., Chen, M., Xie, C., Rosier, R.N., O'Keefe, R.J., Zuscik, M., Chen, D. 2009. Activation of β -catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult β -catenin conditional activation mice. *J. Bone Miner. Res.* 24(1): 12–21.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7(2):211–228