

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“Análisis de Expresión Génica del Proceso Condrogénico en Células Madre Mesenquimales Transducidas con Vectores Adenovirales con los Factores IGF1 y FGF2”

Por

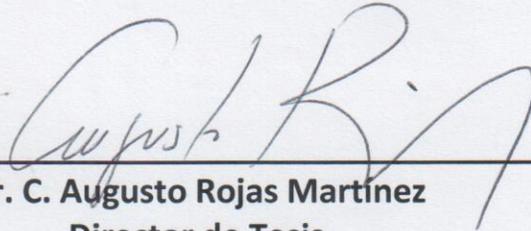
Q.B.P. Manuel González Rodríguez

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

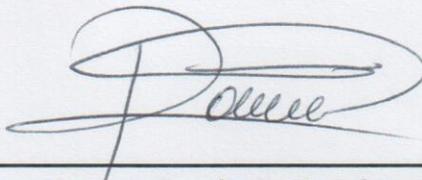
Diciembre, 2012

**Análisis de Expresión Génica del Proceso Condrogénico en Células Madre
Mesenquimales Transducidas con Vectores Adenovirales con los Factores
IGF1 y FGF2**

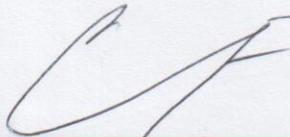
Aprobación de Tesis:



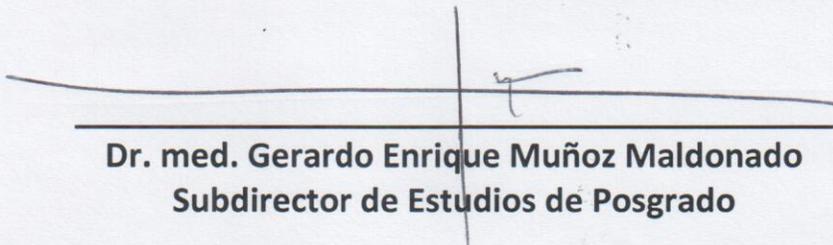
**Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Director de Tesis**



**Dra. C. Rocío Ortiz López
Co-Directora de Tesis**



**Dr. C. Carlos Córdova Fletes
Miembro de Tesis**



**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado**

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en la Facultad de Medicina, y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT, con número de registro: SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT-112606-2009, realizado bajo la supervisión del Dr. Augusto Rojas Martínez como director, la Dra. Rocío Ortiz López como co-director y el Dr. Carlos Córdova Fletes como comisión.

Agradecimientos

A la gloria del Gran Arquitecto del Universo, que con su permanente guía e iluminación me ha ayudado a superar todos los obstáculos que se presentaron durante este trabajo y que con seguridad, me seguirá acompañando en futuros retos.

A mi familia, papá, mamá, hermanos y sobrinas, es gracias al apoyo que cada uno de ustedes me da, a su manera, por el que logrado atravesar cada reto. Son una bendición.

A mi asesor, el Dr. Augusto Rojas Martínez, gracias por la paciencia, el soporte y los conocimientos que durante el proyecto me brindó, además de la confianza en mi capacidad de cumplir con las metas.

A mis todas mis compañeras de generación, con quien he compartido cada paso de este proceso: Yadira y Marcela, ¡gracias por todo! Maribel, Paola, Tanya, Gaby, Liz, Martha, Grecia, les deseo muchísimo éxito en las siguientes etapas de sus vidas, gracias por cada momento compartido en esta etapa que se va.

Al Dr. Iván Marino, por todos los conocimientos y ayuda que me brindó en mi trabajo, has sido un guía invaluable en este trabajo. También, a todos los compañeros del laboratorio de Terapia Génica, Sergio, Gissela, Adelina, Dante, Gloria, ¡¡muchas gracias!!

A todo el personal y maestros del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL. Por compartirme sus experiencias y enseñanzas, y por hacer de este proceso algo más sencillo de realizar.

A las instituciones que apoyaron el proyecto y por ende a la realización de esta tesis, CONACyT SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT-112606-2009.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme el más preciados de los regalos, la educación. Siempre seré orgullosamente UANL.

TABLA DE CONTENIDO

| CONTENIDO | Página |
|---|---------------|
| LISTA DE TABLAS | |
| LISTA DE FIGURAS | |
| ABREVIATURAS | |
| RESUMEN | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Cartílago articular | 1 |
| 1.1.1. Componentes del cartílago articular | 1 |
| 1.1.2. Función del cartílago articular y su matriz | 3 |
| 1.2. Células madre mesenquimales | 4 |
| 1.3. Condrogénesis | 5 |
| 1.3.1. Etapas y señalización intracelular | 7 |
| 1.3.2. Factores de crecimiento | 9 |
| 1.3.3. Matriz extracelular y andamios tridimensionales | 10 |
| 1.3.4. Medio de cultivo | 11 |
| 1.4. Vectores adenovirales | 12 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 3. OBJETIVOS | 13 |
| 4. ESTRATEGIA GENERAL | 14 |
| 5. MATERIAL BIOLÓGICO | 15 |
| 6. MATERIALES Y REACTIVOS | 15 |
| 7. METODOLOGÍA | 17 |
| 7.1. Extracción, cultivo e inmunofenotipificación de CMMA | 17 |
| 7.2. Producción, purificación y titulación viral | 18 |
| 7.3. Ensayo de transducción y co-transducción de IGF1 y FGF2 en CMMA | 19 |
| 7.4. Diferenciación condrogénica en distintas matrices | 21 |
| 7.4.1. Microesferas | 21 |
| 7.4.2. Tissuocol (hidrogel de fibrina) | 22 |
| 7.4.3. Microesferas con medio condrogénico | 22 |

| | |
|--|----|
| 7.5. Análisis de expresión por qPCR de marcadores de diferenciación condrogénica | 23 |
| 7.6. Análisis de expresión por Western blot de IGF1, FGF2, COL2, 1 y 10. | 24 |
| 8. RESULTADOS | 26 |
| 8.1. Inmunofenotipificación de CMMA | 26 |
| 8.2. Titulación de los adenovirus AdIGF1 y AdFGF2 | 27 |
| 8.3. Transducción adenoviral de IGF1, FGF2 y IGF1/FGF2 en CMMA | 27 |
| 8.4. Diferenciación condrogénica en microesferas y tissucol | 30 |
| 8.5. Diferenciación condrogénica optimizada en microesferas | 33 |
| 9. DISCUSIÓN | 36 |
| 10. CONCLUSIONES | 40 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA | 41 |

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla 1 Principales tipos de fibras colágenas en cartílago articular..... | 2 |
| Tabla 2 Selección bibliográfica en el uso de CMM como fuente de condrogénesis..... | 6 |
| Tabla 3 Factores de crecimiento asociados a condrogénesis | 9 |
| Tabla 4 Solución amortiguadora de diálisis para purificación de vectores..... | 19 |
| Tabla 5 Componentes del medio condrogénico..... | 20 |
| Tabla 6 Componentes del buffer de lisis para extracción proteica..... | 21 |
| Tabla 7 Grupos experimentales de la diferenciación condrogénica en distintas matrices..... | 22 |
| Tabla 8 Grupos experimentales de la diferenciación condrogénica en microesferas optimizada..... | 23 |
| Tabla 9 Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de qPCR..... | 24 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1 Esquema del balance entre fibras colágenas y GAGs en la MEC..... | 3 |
| Figura 2 Secuencia de etapas de la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos..... | 9 |
| Figura 3 Estrategia general..... | 14 |
| Figura 4 Micrografías de CMMA humanas a distintos pasajes..... | 26 |
| Figura 5 Gráficos de dispersión de poblaciones celulares inmunofenotipificadas..... | 27 |
| Figura 6 Micrografía de células HEK293 pre y post transducción adenoviral..... | 27 |
| Figura 7 Expresión génica de los factores de crecimiento FGF2 e IGF1 transducidos con vectores adenovirales a CMMA humanas..... | 28 |
| Figura 8 Western blot para la detección de IGF1 y FGF2 en CMMA humanas a distintos días..... | 29 |
| Figura 9 Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación condrogénica en CMMA en microesferas y Tissucol al día 14..... | 31 |
| Figura 10 Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación condrogénica en CMMA en microesferas y Tissucol al día 28..... | 32 |
| Figura 11 Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación de CMMA en microesferas con medio condrogénico al día 3..... | 33 |
| Figura 12 Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación de CMMA en microesferas con medio condrogénico al día 7 y 14..... | 34 |
| Figura 13 Western blots y análisis densitométricos para la detección de COL2, 1 y 10 en microesferas con medio condrogénico..... | 35 |

Abreviaturas

| | |
|--------------------------|---|
| ACAN | Agrecano |
| bFGF | Factor de crecimiento fibroblástico básico |
| BGN | Biglicano |
| BMP | Proteínas morfogénicas de hueso |
| CA | Cartílago articular |
| CMMs | Células madre mesenquimales |
| CMMA | Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo |
| CMMB | Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea |
| COMP | Proteína oligomérica de matriz |
| COL1 | Colágeno tipo 1 |
| COL2 | Colágeno tipo 2 |
| COL10 | Colágeno tipo 10 |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle medium |
| FGF2 | Factor de crecimiento a fibroblastos tipo 2 |
| FMOD | Fibromodulina |
| GAG | Glicosaminoglicanos |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa |
| IGF1 | Factor de crecimiento similar a insulina-1 |
| MEC | Matriz extracelular cartilaginosa |
| MO | Médula ósea |
| MOI | Multiplicidad de infección |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PGLA | Ácido poliglicólico |
| PLLA | Ácido poliláctico |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa |
| SBF | Suero bovino fetal |
| SOX9 | Sex determining region Y-box 9 |
| TA | Tejido adiposo |
| TCID₅₀ | Tissue culture infectious dose 50 |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante beta |

Resumen

INTRODUCCIÓN. El cartílago articular es un tejido que posee pobre capacidad regenerativa. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMMA) son alternativa terapéutica prometedora debido a su capacidad para diferenciarse a distintos linajes celulares, incluidos los condrocitos, y a que se pueden obtener en gran volumen y con facilidad. Las CMMA requieren de tres factores principales para llevar a cabo la condrogénesis: Los factores de crecimiento, interacción con matriz extracelular y nutrientes particulares. En un estudio previo se investigó mediante análisis de expresión la diferenciación condrogénica de CMMA ovinas estimulada con la transducción adenoviral de IGF1, FGF2, TGF- β 1 y Sox9, en microesferas. Se observó que la combinación de IGF1 y FGF2 estimulaba más la expresión de marcadores de condrogénesis. En el presente estudio, se determinó el perfil de expresión génica de CMMA humanas durante un proceso condrogénico estimulado por la transducción adenoviral con IGF1/FGF2, solos y en combinación, en dos distintos tipos de andamiaje: microesferas y fibrina, y así observar si los resultados en células ovinas son comparables con los de células humanas y el efecto del andamiaje en fibrina en los perfiles de expresión de marcadores condrogénicos.

MÉTODOS. Se extrajeron, purificaron, inmunofenotipificaron (panel CD90+, CD105+, CD271+ y CD45-) y expandieron CMMA humanas de 3 donadores. Paralelamente, se produjeron, purificaron y titularon los vectores adenovirales AdFGF2 y AdIGF1. Se realizaron ensayos de transducción de los factores de crecimiento FGF2 e IGF1, solos y en combinación, a una MOI de 100 y se monitoreó su expresión por qPCR y Western blot a los 3, 7 y 14 días. Luego, se cultivaron CMMA en microesferas y en Tissucol y se transdujeron con AdFGF2 e AdIGF1 solos y en combinación y se analizaron marcadores de diferenciación condrogénica a los 14 y 28 días. Con base en dichos perfiles de expresión se optimizó la diferenciación de CMMA a condrocitos en microesferas utilizando medio condrogénico y se evaluó la expresión de marcadores condrogénicos por qPCR y la expresión de COL2, 1 y 10 por Western blot, ambos a los 3, 7 y 14 días.

RESULTADOS. La inmunofenotipificación de CMMA resultó positiva para CD90, CD105 y CD271 y negativa para CD45. Se logró establecer un modelo *in vitro* para el estudio de la expresión génica de CMMA transducidas y en distintos andamios. Se observó sobreexpresión de IGF1 y FGF2 en los ensayos transducidos hasta el día 7 y se detectaron por Western blot al día 14. Se observaron patrones diferentes de expresión génica entre las condrogénesis a partir de CMMA en microesferas y en andamiaje de Tissucol, promoviendo este último la expresión de COL10 e inhibiendo FMOD. En microesferas se consiguió sobreexpresión de COL2 y se logró sobreexpresar COMP, BGN y FMOD, con la expresión temprana de COL1 y Sox9, siendo el ensayo con la combinación de factores el que presentó mayores niveles de expresión, confirmando esta observación a nivel transduccional de COL2, 1 y 10 por Western blot.

CONCLUSIÓN. Este trabajo demuestra que la utilización de Tissucol no es óptima ni útil para la diferenciación de CMMA humanas a cartílago, ya que favorece un perfil de expresión hipertrófico. La combinación de factores IGF1 y FGF2 promovió una mayor expresión de COL2, COMP, BGN, FMOD y Sox9 en microesferas con medio condrogénico, en comparación a la transducción individual de los factores. Los resultados en CMMA ovinas son comparables a los observados en CMMA humanas.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Cartílago articular.

Dependiendo de la composición de la matriz el cartílago en el cuerpo humano puede ser clasificado en elástico, cartílago fibroso, fibro-elástico y cartílago hialino. En las articulaciones sinoviales se encuentra un tipo especial de cartílago hialino, denominado “cartílago articular”, el cual provee de una superficie de baja fricción, con alta resistencia a la compresión y a la abrasión. El cartílago hialino es una estructura anervada, avascular y alinfática, por lo que los condrocitos reciben sus nutrientes a través de la difusión de éstos en la matriz extracelular. El pH de la matriz es neutro, de 7.4, y los cambios en este pueden fácilmente dañar la altamente especializada infraestructura de la matriz.¹

El cartílago se deriva de células mesenquimales, las cuales se agregan para formar un blastema a las 5 semanas de edad gestacional, para posteriormente comenzar a secretar matriz cartilaginosa y las células se tornan en condroblastos. La matriz extracelular que se produce comienza a separar las células gradualmente, y así, las células encapsuladas en esta matriz especializada se convierten en condrocitos. El tejido mesenquimal rodeando el blastema da lugar a la membrana pericondrio.

1.1.1 Componentes del cartílago articular.

El cartílago articular consta de los siguientes componentes:^{2, 3}

Agua: Forma entre un 65% a un 80% del cartílago articular, permitiendo la deformación dependiente del peso de éste. Además de que proporciona lubricación y un medio de difusión para los nutrientes. La cantidad de esta es controlada por la concentración de proteoglicanos.

Colágeno: Forma entre 10 a un 20% del peso húmedo del cartílago articular. El colágeno 2 es el principal componente (90-95%) del marco microfibrilar y proporciona fuerza tensora al cartílago articular (Tabla 1).

| Tipo de colágeno | Locación morfológica | Función |
|------------------|---|--|
| COL2 | Componente principal de las microfibrillas (90-95%). | Fuerza tensora. |
| COL6 | Matriz pericelular. | Ayuda a los condrocitos a unirse a la matriz. |
| COL9 | Unido en cruz a la superficie de las microfibrillas | Propiedades tensoras y conexiones inter-fibrilares. |
| COL10 | Relacionado a células hipertróficas en cartílago calcificado. | Soporte estructural y auxiliar en mineralización del cartílago |
| COL11 | Dentro o sobre microfibrillas. | Punto de nucleación para la formación de fibrillas. |

Tabla 1. Se enlistan los principales tipos de fibras colágenas que se pueden encontrar en el cartílago articular.¹

Proteoglicanos: Estas proteínas polisacáridas forman del 10 al 20% del peso húmedo del cartílago articular y proveen de fuerza compresiva. Hay dos tipos de proteoglicanos: proteoglicanos monoméricos agregantes largos o agreganos (90% de la masa total de la matriz) y proteoglicanos pequeños (10% o menos de la masa total de la matriz) como la fibromodulina y el biglicano, el primero relacionado con la organización y estabilización de colágeno tipo 2 (COL2) y el segundo, concentrado en la matriz pericelular que interactúa con colágeno tipo 6 (COL6). Estos son producidos dentro del condrocito y secretados a la matriz. Las subunidades de los proteoglicanos son los glicosaminoglicanos (GAGs), como el condroitín sulfato.⁴ Los proteoglicanos mantienen el balance electrolítico y de fluidos, como se observa en la Figura 1.

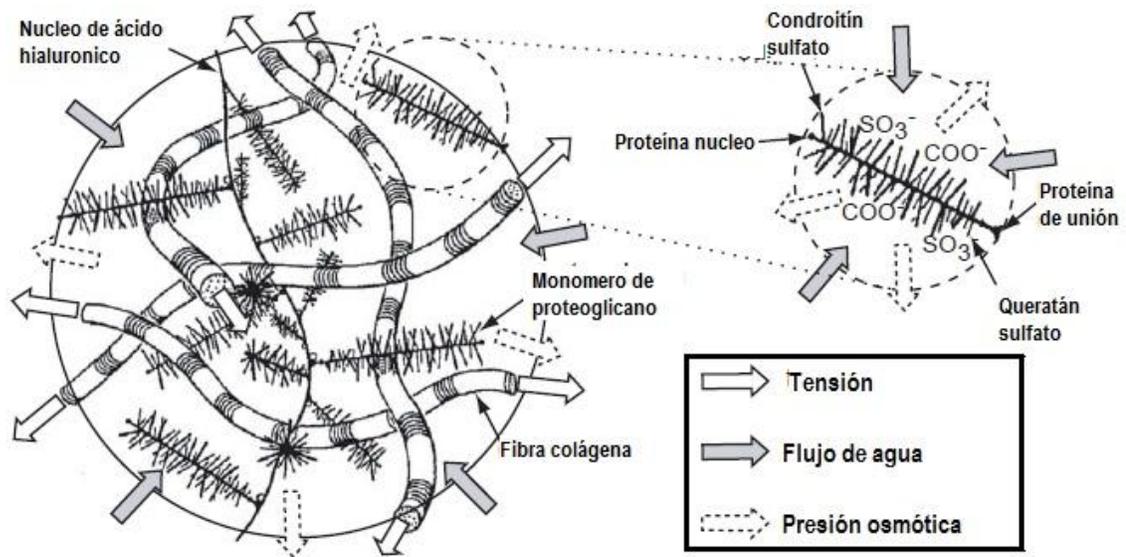


Figura 1. Esquema del balance que mantienen las fibras colágenas y los proteoglicanos en la matriz extracelular del cartílago (MEC).³

Condrocitos: Células altamente especializadas, formando de 1 al 5% del volumen, disperso dentro de la matriz. Estas células sintetizan todos los componentes de la matriz y regulan su metabolismo. Carecen de contacto célula-célula, sintetizan COL2, agreganos y proteínas no colágenas, reciben nutrientes por difusión, sobreviven en hipoxia dependiendo de metabolismo anaerobio, entre otras características.

1.1.2 Funciones del Cartílago Articular y su Matriz.

Dentro de las principales funciones del cartílago, se pueden enumerar las siguientes:^{1, 2, 3}

1. Proveer de una superficie deslizante de baja fricción.
2. Absorber fuerza de choque.
3. Minimizar presión pico en el hueso subcondral.

Además, podemos enumerar funciones de la matriz extracelular del cartílago hialino (MEC), la cual se compone del agua, los proteoglicanos y las fibras colágenas, siendo las siguientes:

1. Protege a los condrocitos de la carga mecánica, ayudando a mantener su fenotipo.
2. Es un almacén de citosinas y factores de crecimiento requeridos por los condrocitos.
3. Determina el tipo, concentración y velocidad de la difusión de los nutrientes a los condrocitos.
4. Actúa como transductor de señales a las células.

El constante proceso de remodelación de la MEC mantiene estas funciones, al estimular o inhibir la síntesis de los componentes de ésta. Sin embargo, este delicado equilibrio puede ser roto debido a varios factores como la edad, la obesidad, las actividades físicas ocupacionales, entre otras. Esto deriva comúnmente el deterioro de la composición de la MEC y de sus capacidades mecánicas.^{3, 5} Debido a que el CA está compuesto por células altamente especializadas, la complejidad de la organización tisular y la disposición de nutrientes solo por difusión, ocasionan que el tejido tenga poca capacidad regenerativa, siendo poco probable que un desequilibrio en la MEC como el mencionado pueda ser revertido, generando lesiones articulares en profesionales del deporte o enfermedades crónico degenerativas en personas de la tercera edad.

1.2 Células madre mesenquimales

Una célula madre, por definición, es aquella caracterizada por su habilidad de auto-renovación y de diferenciarse a distintos linajes celulares.⁶ En este concepto se incluyen las células madre embrionarias (CME), células madre pluripotentes inducidas (CMPi) y las células madre adultas (cuyo principal representante son las células madre mesenquimales, CMM). Aunque el potencial terapéutico de los primeros dos tipos es enorme, debido a su auto-reproducibilidad y pluripotencia, su uso se enfrenta a una serie de limitaciones éticas. Por otra parte, las CMM son por naturaleza,

inmunocompatibles y no enfrentan problemas éticos.⁷ El descubrimiento de las CMM es acreditado a Alexander Friendenstein en 1970, el cual describió unas células adherentes derivadas de la medula ósea capaz de auto-mantenerse, auto-renovarse y capaz de sostener hematopoyesis. En las décadas siguientes, el descubrimiento del potencial de estas células para diferenciarse a múltiples líneas celulares ha promovido su uso clínico relevante en la medicina regenerativa.^{8,9} Las CMM además se caracterizan por la expresión de marcadores de superficie específicos, como CD29, CD44, CD46, CD73, CD90, CD105, CD271 y MSCA-1 y por la no expresión de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34 y CD45.^{10,11}

Las CMM derivadas de medula ósea (CMMB) se asocian más con fines terapéuticos en el contexto ortopédico, ya que tienen una capacidad probada de diferenciación a hueso y cartílago.^{12,13} Sin embargo, trabajos recientes han publicado nuevas fuentes de CMM, como tejido adiposo¹⁴, sinovia¹⁵, músculo esquelético¹⁶, dientes deciduos¹⁷, dermis¹⁸, entre otros.¹⁹ Esto ha abierto las puertas a una discusión sobre la fuente ideal de CMM. Las CMM derivadas de tejido adiposo (CMMA) poseen la ventaja de existir relativamente en grandes cantidades en el tejido adiposo, en comparación a medula ósea (hasta 100 veces más²⁰), y de que éste sea de fácil obtención, en liposucciones por ejemplo, en donde el tejido adiposo (100 mL hasta 3 L) es descartado.^{7,14} Aunado a esto, las CMMA han mostrado capacidad de diferenciarse en múltiples líneas mesenquimales⁸ y en condrocitos, mostrando niveles de expresión de componentes de la MEC cercanos a los normales.^{21,22}

1.3 Condrogénesis

Condrogénesis es el proceso que resulta en la formación de intermediarios del cartílago y conlleva a la osificación endocondral durante el desarrollo esquelético. Es un proceso importante para la creación de condrocitos durante la etapa embrionaria y en la reparación esquelético-tisular a lo largo de la vida. Como se mencionó anteriormente,

inicia con la diferenciación de células mesenquimales. El proceso conlleva el reclutamiento y migración, proliferación y condensación de las células, lo cual se regula por interacciones entre células mesenquimales – epiteliales.²³ La regulación de las etapas de la diferenciación condrogénica depende de diversos factores, principalmente: factores de crecimiento, MEC y nutrientes particulares a disposición.

| Autores | Células utilizadas | Factores de crecimiento | Matriz extracelular | Medio de cultivo |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|---|---|
| Hwang <i>et al.</i> (2011) ²⁴ | CMMA (humano) Condrocitos (Oveja) | TGF- β 1 | PLLA/PLCL* | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |
| Yoo <i>et al.</i> (2011) ¹³ | CMMB (humano) | TGF- β 3 | Microesferas | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |
| Diekman <i>et al.</i> (2010) ²¹ | CMMA (humano) CMMB (humano) | TGF- β 3, BMP6 | Alginato y Matriz derivada de cartílago | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |
| Ronziere <i>et al.</i> (2010) ²⁵ | CMMA (humano) CMMB (humano) | TGF- β 3, BMP2, FGF2 | Microesferas | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |
| Huang <i>et al.</i> (2010) ²⁶ | CMMB (cabra) | TGF- β 3 | Agarosa tipo VII | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |
| Chen <i>et al.</i> (2010) ²⁷ | CMMA (humano) | bFGF, IGF1, IL-1Ra | Microesferas | DMEM más interleucina-1 β |
| Khan <i>et al.</i> (2010) ²⁸ | CMMB (humano) | IGF1, TGF- β 3 | Alginato | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |
| Noël <i>et al.</i> (2008) ²⁹ | CMMA (humano) CMMB (humano) | BMP2 | Microesferas | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |
| Mehlhorn <i>et al.</i> (2007) ³⁰ | CMMA (humano) | TGF- β 1, BMP2 | Alginato | Condrogénico (Dexametasona, ITS**, ácido ascórbico) |

Tabla 2. CMM como fuente de condrogénesis: selección bibliográfica de trabajos recientes en una variedad de modelos experimentales. *Poli-l-ácido láctico/Poli (láctico-co- ϵ -caprolactona); **Complejo insulina, transferrina y selenito.

1.3.1 Etapas y señalización intracelular

La agregación de células mesenquimales condroprogenitoras en condensados precartilaginosos representa uno de los estadios más tempranos de la condrogénesis. Con base en esto, el cultivo en microesferas se emplea como modelo en diferenciación condrogénica *in vitro* (Tabla 2). Este proceso es dependiente de señalizaciones iniciadas por interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular neoformada, interacciones asociadas con el incremento de la adhesión celular, cambios en el citoesqueleto, entre otros. A nivel de señalización, en ésta etapa temprana el factor de transcripción Sox9 es un marcador expresado que es necesario para la expresión de colágenas cartilaginosas en etapas más avanzadas.³¹ En esta etapa la matriz extracelular temprana es rica en COL1, ácido hialurónico y COL2 con el exón 2 que codifica al propéptido propio de colágenas no cartilaginosas. También existe la presencia de moléculas asociadas a la adhesión celular como N-CAM, regulada por fibronectina, que a su vez es estimulada por la producción de TGF- β .

La interacción célula-matriz se asocia con la transición de células condroprogenitoras a un condrocito maduro. Proteínas como la proteína oligomérica de matriz (COMP) interaccionan con las moléculas de adhesión celular para iniciar vías de señalización intracelular que conducen el cambio. Actualmente se cree que una serie de vías de señalización que actúan en secuencia dirigen la maduración de células condroprogenitoras, de las cuales se pueden mencionar tres vías consideradas axiales en el proceso: la de del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la de proteínas morfogénicas de hueso (BMP) y la vía de Wnt. Ésta última, se encuentra en la señalización más temprana del proceso condrogénico, induciendo la vía de señalización de FGF, que a su vez mantiene la expresión de algunos genes de la vía Wnt, actuando en conjunto para dirigir el proceso de maduración de células condroprogenitoras. La vía de señalización BMP interviene en la etapa de maduración, aunque sus señales se asocian principalmente en la regulación de estadios tardíos de la condrogénesis, diferenciando a un fenotipo hipertrófico,³² aunque existen algunas proteínas de ésta vía relacionadas con etapas muy tempranas y proliferativas.³³ La etapa de células

condroprogenitoras maduras se caracteriza por la deposición de COL2, 9, y 11, además de agrecano (ACAN) en la matriz extracelular. En ésta etapa se pueden encontrar moléculas asociadas a la fibrillogénesis de colágeno, como la fibromodulina (FMOD) que se une principalmente a COL1³⁴ y biglicano (BGN), que interactúa preferentemente con COL2.³⁵

Una vez que el fenotipo condrocítico está establecido, la proliferación celular está determinada por un balance entre las vías de señalización de BMP y FGF. La vía FGF se relaciona con la modulación hacia estadios condrocíticos, y por lo tanto, no proliferativos; mientras que algunas señales establecidas por la vía BMP se han relacionado a mantener las células en estado proliferativo, como se mencionó anteriormente. Éste equilibrio es importante en el cartílago hialino pues asegura una fuente continua de condrocitos conforme los ya maduros pierden actividad a través de los años³⁶.

La etapa tardía de la diferenciación condrogénica, propiamente denominada osificación endocondral, implica la diferenciación de los condrocitos a un fenotipo hipertrófico, la calcificación de la matriz extracelular, invasión vascular del tejido y la osificación. Los condrocitos hipertróficos comienzan a expresar COL10 y el factor Runx2 comienza a expresarse en condrocitos justo antes de adquirir el fenotipo hipertrófico e induce la expresión de, entre otras moléculas, la metaloproteinasa de matriz 13 (MMP-13), encargada de eliminar fibras colágenas y dar paso a la osificación. El fenotipo hipertrófico de los condrocitos no se observa en cartílago articular sano.

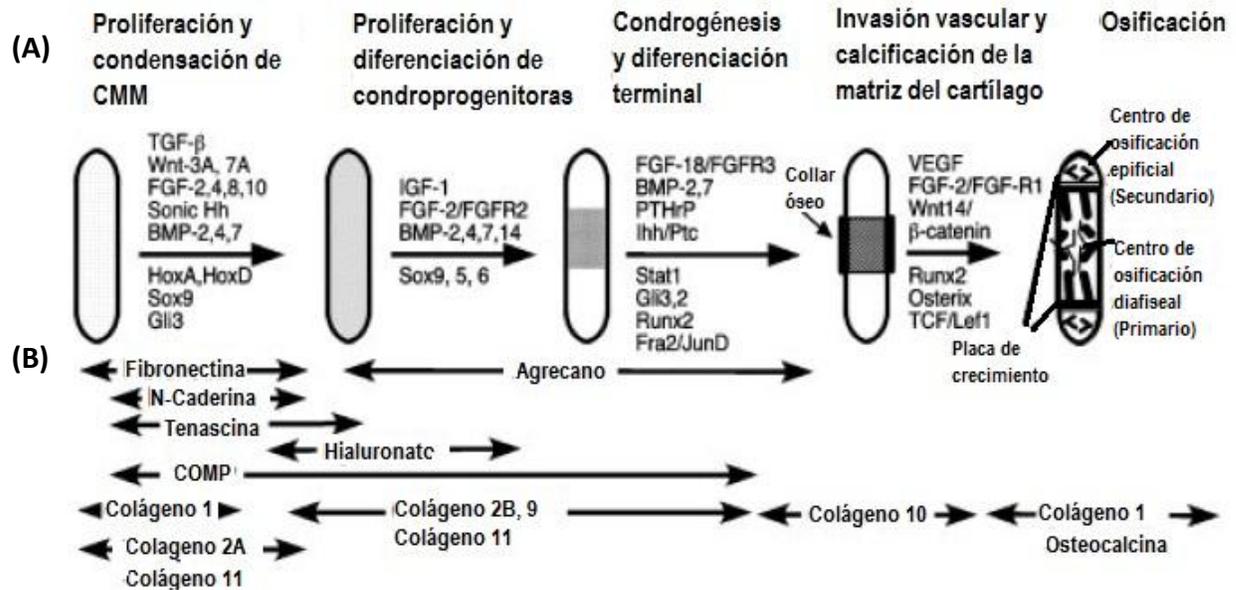


Figura 2. Secuencia de etapas de la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos.²³ (A) Esquema de las etapas y los factores de crecimiento asociados a cada transición en la parte superior de la flecha y los factores de transcripción activados por debajo de la flecha. (B) Se indican las proteínas de la MEC que se expresan en las diferentes etapas.

1.3.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento llevan a cabo el papel más importante en la regulación del proceso condrogénico. Representan un grupo de polipéptidos biológicamente activos producidos en el cuerpo que pueden estimular la proliferación y diferenciación celular.³⁷ En el contexto de ingeniería de tejidos en la Tabla 2 se muestran algunos estudios donde utilizan factores de crecimiento relacionados con la etapa de temprana de células condroprogenitoras y condrocitos proliferativos, algunos de los cuales se observan en la Figura 2. Entre los más importantes están los pertenecientes a la superfamilia TGF- β , como los distintos tipos de BMP, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) y miembros de la familia FGF, principalmente el tipo 2 (FGF2). Sus principales efectos en la diferenciación de CMM se enlistan en la Tabla 3.

| Factor de crecimiento | Efectos en las CMM |
|-----------------------|---|
| TGF- β 1 | <i>Incrementa la proliferación y la producción de MEC cartilaginosa, disminuye la expresión de COL1.</i> |
| IGF1 | <i>Incrementa la proliferación y la producción de MEC cartilaginosa, efecto aditivo a TGF-β1 y otros factores.</i> |
| FGF2 | <i>Incrementa la proliferación, incrementa la producción de proteoglicanos</i> |
| BMP2 | <i>Incrementa la producción de MEC cartilaginosa</i> |

Tabla 3. Lista de factores de crecimiento selectos y sus efectos en la diferenciación condrogénica de CMM.

Los efectos de los factores de crecimiento suelen ser aditivos y existen estudios en la literatura que indican que la combinación de estos usualmente promueve una mayor expresión de marcadores condrogénicos relacionados con etapas de condroprogenitoras o condrocitos maduros, como COL2, ACAN y COMP. Un trabajo reciente evaluó el efecto de diversos factores de crecimiento y uno de transcripción (IGF1, TGF- β 1, FGF2 y Sox9), solos y en combinación, en la diferenciación condrogénica de CMMA ovinas mediante análisis de distintos marcadores del proceso por PCR cuantitativa y técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas. En este se observó que la combinación de factores tenía mejores resultados y que de estas, IGF1 y FGF2 en conjunto mostraron mayores efectos en la estimulación a las CMMA en la expresión de marcadores condrogénicos, como COL2, y baja expresión de COL10.³⁸

1.3.3 Matriz extracelular y andamios tridimensionales

La matriz extracelular juega también un rol principal en la regulación del proceso condrogénico, como se mencionó anteriormente (Ver sección 1.3.1). Las interacciones célula-matriz son importantes activadoras y reguladoras de distintas vías de señalización promotoras del proceso condrogénico. Además, en el contexto de la ingeniería de tejidos, el uso de andamios tridimensionales biocompatibles en la diferenciaciones condrogénicas de CMM *in vitro* tiene la adicional ventaja de proveer

de un vehículo de transferencia celular para el tratamiento de lesiones articulares.³⁹ Tradicionalmente la literatura en un proceso condrogénico las CMME se aglomeran para formar microesferas y conforme avanza el proceso, éstas comienzan a producir MEC. Sin embargo, el uso de andamios adecuados ha probado promover el proceso. En la Tabla 2 se muestran una variedad de andamios que han sido evaluados para tal fin, como: perlas de alginato, agarosa, quitosan, PLLC/PLCL, hialuronato y derivados de colágeno. Uno de los andamios prometedores son los derivados de fibrina,^{40,41} como el Tissucol®, hidrogel de fibrina comercial que polimeriza por el mismo mecanismo responsable de la cascada de coagulación sanguínea. El Tissucol® es usado actualmente en intervenciones quirúrgicas como adhesivo, por lo que su biocompatibilidad está probada.

1.3.4 Medio de cultivo

Uno de los retos más importantes a los que se enfrenta la diferenciación condrogénica *in vitro*, en el contexto de la ingeniería de tejidos, es la disponibilidad de nutrientes adecuados que promuevan el proceso. Como se observa en la Tabla 2, en la literatura se ha establecido componentes clave y concentraciones, que ayudan a obtener diferenciaciones más similares al cartílago normal. La dexametasona es un glucocorticoide exógeno usado ampliamente en el ámbito clínico. Se conoce que los glucocorticoides regulan el crecimiento lineal y están implicados en la regulación de la función del cartílago.⁴² El complejo insulina-transferrito-selenito es utilizado para enriquecer el medio y promover fenotipos condrogénicos⁴³, la insulina promueve la captación de glucosa y aminoácidos del medio y promueve la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. El transferrito sirve de acarreador de hierro y ayuda a reducir niveles tóxicos de radicales libres. El selenito es un co-factor útil para la glutatión peroxidasa, por lo que se usa como agente antioxidante. Se conoce desde hace varios años que el ácido ascórbico juega un papel vital en el crecimiento y reparación del tejido conectivo, específicamente, en la biosíntesis de colágeno y la estabilización de las fibras colágenas⁴⁴. Estos componentes, en conjunto con otros componentes como L-prolina,

ácido linoleico, además de altas concentraciones de glucosa, constituyen un medio de cultivo promotor de condrogénesis de CMM *in vitro*.

1.4 Vectores adenovirales

En el contexto de la ingeniería de tejidos, la transferencia de genes para inducir la sobreexpresión de estos y obtener el efecto biológico deseado es una estrategia ampliamente usada.⁴⁵ El uso de vectores virales para la transducción de genes presenta la ventaja, ante métodos no virales como los liposomas, de lograr una mayor eficiencia en la transferencia génica a un mayor número de células. Específicamente, los vectores adenovirales se distinguen de otros sistemas como los retrovirales o los adenoasociados, por una mayor eficiencia de transducción a una variedad amplia de células, tanto en división, como en células quiescentes, y son capaces de lograr promover altos niveles de expresión de los genes transducidos en cortos periodos de tiempo.⁴⁶ Estas características los hacen ideales para ciertas aplicaciones en donde la expresión transitoria y marcada de ciertos genes promueve el proceso en determinadas etapas, como sucede en la condrogénesis. El uso de vectores adenovirales para transducir factores de crecimiento y de transcripción en diferenciación condrogénica *in vitro* de CMM está ampliamente reportado en la literatura.^{27,47,48} Garza-Veloz, utilizó la transferencia genes codificantes los factores de crecimiento y transcripción evaluados en su trabajo mediada por vectores adenovirales, solos o en combinación (Ver sección 1.3.2). En su trabajo, evaluó la eficiencia de transducción y la citotoxicidad en CMMA ovinas, obteniendo como resultado que incluso con la transducción de 100 partículas virales por célula, era efectiva para la condrogénesis y no se presentaban efectos citotóxicos en las CMMA ovinas.³⁸

Capítulos 2. Justificación

Recientes análisis moleculares e histológicos *in vitro*, han demostrado que la co-expresión de IGF1 y FGF2 es óptima para la generación de cartílago a partir de CMM derivadas de tejido adiposo ovino. En este trabajo se analizaron los perfiles de expresión génica para blancos transcripcionales de los factores mencionados, en CMM humanas derivadas de tejido adiposo, en dos tipos de matrices (microesferas y fibrina), con el objeto de replicar resultados encontrados en especie ovina y analizar el proceso de diferenciación en una matriz comercial que se utilizaría potencialmente en ensayos clínicos.

Capítulo 3. Objetivos

Objetivo general

Determinar el perfil de expresión génica de CMMs humanas derivadas de tejido adiposo durante un proceso condrogénico estimulado por la transducción adenoviral con IGF1/FGF2 en dos distintos tipos de andamiaje: microesferas y fibrina.

Objetivos particulares

1. Determinar la expresión de factores de crecimiento IGF1 y FGF2 transducidos en CMMA a nivel transcripcional y traduccional.
2. Analizar la expresión de marcadores de diferenciación condrogénica en dos distintos tipos de cultivo (8 marcadores seleccionados) por qPCR.
3. Analizar la expresión de colágenas (COL2, 1 y 10) y marcadores de diferenciación, durante el proceso condrogénico en la condición de cultivo seleccionada (microesferas o células en Tissucol®).

Capítulo 4: Estrategia General

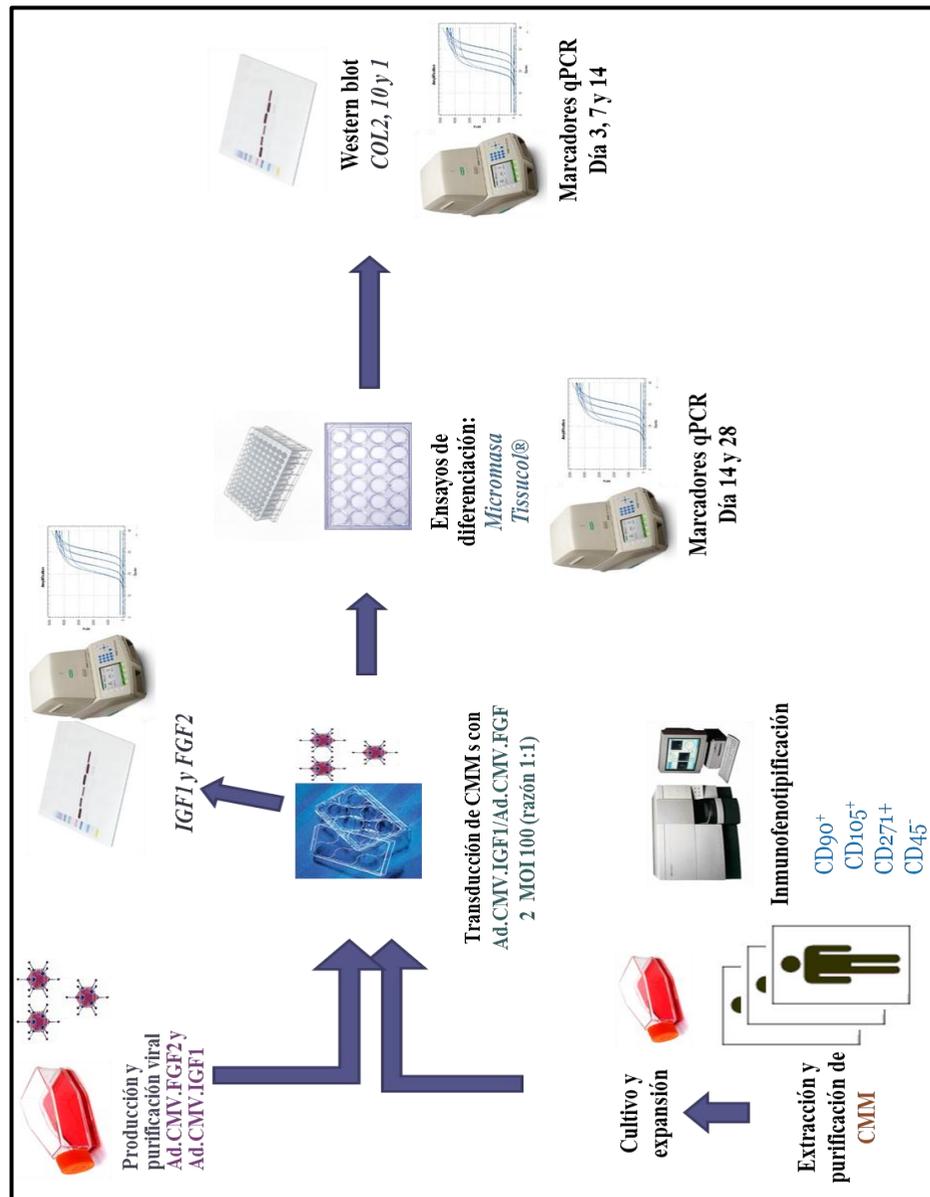


Figura 3. Estrategia general: se partió de la extracción, purificación, inmunofenotipificación (panel CD90+, CD105+, CD271+ y CD45-) y expansión de CMM humanas obtenidas por lipoaspiración de tres donadores. Paralelamente, se produjeron, purificaron y titularon los vectores adenovirales AdFGF2 y AdIGF1 construidos por Garza-Veloz. Se realizaron ensayos de transducción para determinar sobreexpresión de los factores transducidos por qPCR y Western blot. Posteriormente se comparó la diferenciación condrogénica de CMM transducidas con los vectores AdFGF2, AdIGF1 y combinados, en microesferas y en Tissucol® mediante el análisis de marcadores condrogénicos por qPCR a los 14 y 28 días del proceso. Se seleccionó la estrategia que mostró mejores resultados y se optimizó con la adición de medio condrogénico para evaluar el proceso por qPCR de los marcadores condrogénicos y la expresión COL2, 1 y 10 por Western blot, a los días 3, 7 y 14 del proceso.

Capítulo 5. Material Biológico

Líneas celulares.

Se utilizó la línea celular HEK293 (derivada de riñón embrionario humano, ATCC CRL-1579TM. Manassas, VA), para la producción viral y células mononucleares de origen humano, provenientes de tejido adiposo, para los ensayos de diferenciación.

Vectores adenovirales

Para la diferenciación condrogénica se utilizaron los vectores adenovirales AdFGF-2 y AdIGF-1, existentes en el laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Medicina, UANL. Los vectores portan los genes codificantes para el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (AdFGF-2) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (AdIGF-1), ambos regulados por el promotor de la región inmediata temprana de Citomegalovirus (CMV).

Capítulo 6. Materiales y reactivos

Para el aislamiento de células madre se utilizaron pastillas para preparar PBS 1X (Amresco. Solon OH). Para cultivo de células madre y células HEK293 se utilizó medio de cultivo Advanced Dubecco's Modified Eagle (Invitrogen. Carlsbad, CA), suero fetal bovino (Invitrogen), Tripsina 0.25% (Invitrogen), gentamicina (Gibco. Carlsbad, CA), penicilina/estreptomina (Gibco), L-Glutamina (Gibco). Entre los materiales utilizados para cultivo celular se encuentran jeringas de 10 mL estériles desechables, tubos de 15 mL y 50 mL (Corning. Costar City, NY), pipetas serológicas desechables de 5 mL, 10 mL y 50 mL (Corning), botellas de cultivo celular de 25 cm², 75 cm², 150 cm² (Corning), placas

de cultivo con fondo plano de 96 y 6 pozos (Corning) y cajas Petri de 100 mm (J.VWR™. Edmonton, Canadá).

Para la purificación de vectores adenovirales se usó cloruro de cesio (GibcoBRL. Grand Island, NY), tubos de polialómero (Beckman. Palo Alto, CA), Slide-A-Lyzer 10K (Pierce. Rockford, IL), glicerina (Research Organics. Cleveland, OH), tris (Amresco), cloruro de sodio (Invitrogen), cloruro de magnesio (Invitrogen). Las extracciones de RNA fueron realizadas con TRIzol Reagent LS (Invitrogen) y con el RNeasy Mini Kit (Qiagen. Valencia, CA), mientras que la síntesis de cDNA se realizó con el estuche SSIII First-Strand Super Mix for qPCR (Invitrogen). Para las reacciones de PCR tiempo real se empleó el estuche SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix (Invitrogen).

Entre otros reactivos utilizados se encuentran: hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), ácido bórico (Amresco), EDTA disodio dihidratado (Amresco), agarosa (Amresco), cloruro de calcio (Amresco), Tris-HCl (Promega) y fenol (Sigma-Aldrich). Otros materiales utilizados fueron tubos para microcentrifuga de 1.5 y 2 mL, criotubos de 1 mL, puntas para micropipeta de 10, 200 y 1000 µL de Corning y Costar (Costar City, NY).

Capítulo 7: Metodología

7.1 Extracción, cultivo e inmunofenotipificación de CMM

A partir de una lipoaspiración a realizar en el Hospital Universitario con la colaboración del Dr. Yanko Castro Govea, se tomaron 10 mL de tejido adiposo y se colocaron en 25 mL de una solución de PBS con antibióticos como penicilina, estreptomina y gentamicina, para transportarse al laboratorio. El tejido adiposo se lavó en 3 ocasiones con PBS y antibióticos y se centrifugó (1500 rpm por 5 min) entre cada lavado para separar las fases inmiscibles. Posteriormente el tejido adiposo se sometió a una digestión con colagenasa 1 (180 U/mL) en agitación y a 37°C por 1 hora. Pasado este tiempo se realizaron lavados con PBS y las células pasaron a cultivarse en medio DMEM Advance con 10% de SFB y antibióticos. El medio de cultivo se cambió cada tercer día para remover células no adherentes y después de una semana se hizo pasaje para la expansión de las células adherentes (al alcanzar 80% de confluencia). Después de dos pasajes en botellas de cultivo de T-75, se congelaron hasta su uso, en crioviales de 1 mL (70% DMEM, 20% SFB y 10% DMSO).

Las CMM derivadas de tejido adiposo se inmunofenotipificaron para sus marcadores de superficie característicos: CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD271⁺. 1×10^6 células del primer pasaje se lavaron con PBS y cosecharon con un scrapper, para ser resuspendidas en 1 mL de PBS. Se tomó una alícuota de células y se incubaron con cada anticuerpo monoclonal en hielo, para lavarse después con PBS adicionado con 0.1% de albúmina de suero bovino. La inmunofenotipificación se realizó en un equipo FACSCalibur y los datos fueron analizados en el programa Cellquest Pro.

7.2 Producción, purificación y titulación viral

Una alícuota (100 μ L) de cada virus (AdFGF-2 y AdIGF-1) fue proporcionada por la M.C. Idalia Garza Veloz. Con cada alícuota se transdujeron 1 botella de cultivo T-75 con células HEK293 con un 80% de confluencia. Se incubaron hasta observar un 80% de efecto citopático, para ser cosechadas y lisadas con 3 ciclos de congelación y descongelación de -70°C y 37°C , respectivamente, y con los lisados se transducirán 3 botellas de T-75 con células HEK293 al 80% de confluencia. Con el lisado de éstas se transducirán 10 botellas de T-75 con células HEK293 y con el lisado de estas se infectarán 10 botellas de T-150. Este lisado se empleará para infectar 20 botellas de T-150, para finalmente transducir con el lisado obtenido, 40 botellas de T-150. De aquí se partirá a la purificación de las partículas adenovirales.

Purificación de vectores

A partir de los lisados obtenidos, se separó el exceso de restos celulares centrifugando a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y con este se procedió a realizar ultracentrifugación a 35,000 g en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio con densidades de 1.4 y 1.2 gr/mL durante 1.5 h a 4°C . Luego, se recuperó la banda correspondiente al paquete adenoviral y se realizará un segundo centrifugado en un gradiente continuo de 1.35 gr/mL de cloruro de cesio bajo las mismas condiciones por 18 h, de aquí se recuperó la banda correspondiente a los adenovirus completos y se dializó en un cassette Slide-A-Lyzer 10K en una solución amortiguadora de diálisis (Tabla 4). Se cambió la solución amortiguadora cada hora por 3 horas, teniendo glicerina al 10% en la última solución de diálisis. Se recuperó el volumen dializado y se hicieron alícuotas de 100 μ L y 50 μ L las cuales fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

| Compuesto | Concentración |
|-------------------|----------------|
| Tris-HCl | 10 mM (pH 7.4) |
| NaCl | 150 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| Sacarosa | 4% |

Tabla 4. Solución amortiguadora de diálisis usada en la purificación de vectores adenovirales.

Titulación en placa de adenovirus con células HEK293 (TCID₅₀)

El método usado fue el TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50). Se sembraron 2,000 células por pozo en placas de 96 pozos por triplicado, se incubaron hasta observar un 40-50 % de confluencia. Después se infectaron 10 pozos con diluciones seriadas de adenovirus de 10⁻¹¹ a 10⁻⁴, además para cada dilución se asignaron dos pozos sin infectar como controles negativos. Después de 10 días se determinó el título adenoviral observando el efecto citopático en los pozos de las diferentes diluciones.

7.3 Ensayo de transducción y co-transducción de IGF1 y FGF2 en CMMA

Se sembraron 500,000 CMMA por pozo en placas de cultivo de 6 pozos y se dejaron incubando toda la noche. Luego se llevaron a cabo transducciones con 100 MOI AdFGF2 y de AdIGF1 por separado, y al co-transducir con AdFGF2 y AdIGF1 se usaron 50 MOI de cada vector. Los vectores fueron resuspendidos en 500 mL de DMEM libre de suero y se dejarán incubando en contacto con las células por 3 h, con controles negativos para cada transducciones. Pasado el tiempo, el medio de cultivo de cada pozo fue aspirado y sustituido por con 2 mL de medio condrogénico, descrito en la Tabla 5.

| Componente | Concentración final |
|--|---------------------|
| Glucosa | 25 mM |
| Insulina-Transferrina-Selenito | 6.25 µg/mL |
| Ácido linoléico | 5.33 µg/mL |
| Albúmina humana sérica | 1.25 mg/mL |
| Dexametasona | 100 nM |
| L-ascórbico-2-fosfato | 50 µg/mL |
| Piruvato de sodio | 2 mM |
| L-prolina | 40 µg/mL |
| Suero fetal bovino | 10% |
| Ampicilina/estreptomicina/anfotericina B | 1% |

Tabla 5. Componentes del medio condrogénico usado en los ensayos de transducción y en la optimización de microesferas. Los componentes son adicionados al DMEM.

A las CMMA iniciales y a los días 3, 7 y 14 de cultivo se determinaron los niveles de expresión de los genes transducidos (IGF1 y FGF2) a nivel transcripcional por qPCR y a nivel traduccional por Western blot, por lo que a los días mencionados se extrajo RNA y proteínas totales. El RNA fue extraído con el reactivo TRIzol LS, siguiendo el protocolo del inserto y fue lavado para asegurar su óptima calidad utilizando columnas del estuche RNeasy Mini, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente, la extracción de proteínas totales se hizo de la siguiente manera: Las células se despegaron de cada pozo utilizando un scraper de cultivo (Corning) y se empastillaron por centrifugación breve. Se lisaron las células con buffer de lisis (Tabla 6), en una relación 1:1 volumen:volumen con la pastilla de células. Se incubó en hielo por 30 minutos y se centrifugó después a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C.

| Compuesto/Concentración | Volumen (μL) |
|--|---------------------------|
| β -Mercaptoetanol | 1 |
| PMSF (0.5M) | 1 |
| Inhibidor de proteasas (Roche) | 40 |
| Solución amortiguadora | 200 |
| Se afora a 1000 μL con Agua miliQ | |

Tabla 6. Componentes del buffer de lisis utilizado para la extracción de proteínas totales a partir de CMMA transducidas y/o en diferenciación condrogénica.

7.4 Diferenciación condrogénica en distintas matrices

Después de las transducciones, las botellas de cada ensayo y de cada control por separado, se lavaron con PBS y cosecharon con tripsina 0.25% para transferirlas a cultivo en micromasa o en Tissucol®. Para estos cultivos se extrajo RNA, como se describió anteriormente, los días 0 (CMMA iniciales), 14 y 28. Los grupos experimentales en ambos casos se muestran en la Tabla 5.

7.4.1 Microesferas

En el caso de cultivo en micromasa, se sembraron las CMMA de cada botella T-25 en pozos de placas de 96 con fondo en cuña (por triplicado), siendo 500,00, para ser centrifugada por 5 minutos a 200 g. El medio se cambió cada tercer día durante 28 días, siendo DMEM 1% SFB para las CMM transducidas con vectores adenovirales y control negativo (CMMs sin transducir), y medio condrogénico comercial para los controles positivos.

7.4.2 Tissucol® (Hidrogel de fibrina)

En el cultivo con Tissucol®, se siguieron las indicaciones del proveedor para formar el polímero de fibrina mezclado con la suspensión de CMM respectivas, para colocar aproximadamente 50 µL de Tissucol® con CMMs, de una botella T-25 tratada previamente, en pozos de placas de 96 pozos con fondo plano.

| Control Negativo (Solo DMEM) | Control Positivo (Medio condrogénico)* | AdFGF2/AdIGF1 | AdFGF2 | AdIGF1 |
|------------------------------|--|---------------|--------------|--------------|
| Tissucol® | Tissucol® | Tissucol® | Tissucol® | Tissucol® |
| Microesferas | Microesferas | Microesferas | Microesferas | Microesferas |

Tabla 7. Grupos experimentales de la diferenciación condrogénica en distintas matrices. *El medio condrogénico utilizado en este ensayo fue comercial (HyClone AdvanceSTEM Chondrogenic Differentiation Medium, Thermo Scientific).

7.4.3 Microesferas con medio condrogénico

Una vez comparadas las matrices de diferenciación condrogénica, se seleccionó la más adecuada (microesferas) con base en los resultados de qPCR (ver sección 8.4), y se procedió a optimizarla. Se repitió el cultivo adicionando medio condrogénico descrito en la sección 7.3. Se sembraron 500,000 CMMA por pozo en placas de 6 pozos y se transdujeron con los AdFGF2 y AdIGF1 a 100 MOI y en combinación a 50 MOI cada uno, dejando células sin transducción como controles. Células sin medio condrogénico también fueron mantenidas como control negativo. Se extrajo RNA a CMMA iniciales y a los días 3, 7 y 14, como se describió anteriormente. De igual manera se extrajeron proteínas totales a los días 3, 7 y 14 con el mismo protocolo descrito en la sección 7.3. En la Tabla 8 se muestran los grupos experimentales manejados en esta diferenciación.

| Control sin tratamiento (Solo DMEM) | Control Positivo (Medio condrogénico solamente) | AdFGF2/AdIGF1 | AdFGF2 | AdIGF1 |
|-------------------------------------|---|---------------|--------------|--------------|
| Microesferas | Microesferas | Microesferas | Microesferas | Microesferas |

Tabla 8. Grupos experimentales de la diferenciación condrogénica en microesferas adicionada con medio condrogénico.

7.5 Análisis de expresión por qPCR de marcadores de diferenciación condrogénica

En cada matriz se evaluó la expresión relativa por qPCR de los marcadores de diferenciación condrogénica siguientes: colágena 2 (COL2A1), colágena 1 (COL1), colágena 10 (COL10A1), agrecano (ACAN), biglicano (BGN), fibromodulina (FMOD), proteína oligomérica de matriz condrogénica (COMP) y el factor de transcripción Sox9 (SOX9). Adicionalmente se determinaron los niveles de expresión de FGF2 e IGF1 en los ensayos de transducción. Los cebadores utilizados se diseñaron primero en la página Primer-BLAST, del NCBI y se revisó su secuencia con el programa bioinformático Oligo versión 6, la secuencia de éstos se muestra en la Tabla 9. Se partió de RNA total extraído de los a los distintos tiempos, se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop) y se realizó una RT-PCR con el estuche SSIII First-Strand Super Mix for qPCR(Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante, partiendo de 1000 µg de RNA total. Este procedimiento está descrito para utilizar desde 1 pg hasta 5 µg de RNA total.

En seguida se realizó una mezcla representativa de todos los cDNAs obtenidos, tanto de muestras problema como de controles, para la estandarización de la PCR en tiempo real. La química que se usó en la reacción fue SYBER Green, con el estuche iQ™ SYBR® Green SuperMix (Bio-Rad) utilizando 50 ng de cDNA. La cuantificación se hizo relativa, utilizando el endógeno GAPDH como gen normalizador. Se utilizó el equipo CFX96™ System (Bio-Rad) para desarrollar la reacción.

| Gen | Cebador 1 (5'-3') | Cebador 2 (5'-3') |
|-----------------|------------------------|-----------------------|
| COL2 | CGTGCTCCTGCCGTTTCGCT | CCGGACATCCTGGCCCTGACA |
| COL1 | ACGCATGAGCGGACGCTAACCC | CCTTCCTCTTGCCGTGCGT |
| COL10 | CAGGCATAAAAAGGCCCACTA | AGGACTTCCGTAGCCTGGTT |
| ACAN | TCCCTGGGCAGCCGCATTTG | GCCGGCGTCACACTGCTCAT |
| COMP | AGGACAACCTGCGTGACTGTG | GTGTCCTTTTGGTCGTCGTT |
| FMOD | CAAGTACCTGCCCTTCGTTT | CTGCCACCTTATCACTGGT |
| BGN | AAGCTTCGGGCGCTGACACC | CGGAGCACTGAACCACCCGC |
| SOX9 | GCGCCCCCACTTTTGCTCTT | TACCGCGGCGAGCACTTAGG |
| IGF1 | CATGTCCTCCTCGCATCTCT | ATACCCTGTGGGCTTGTTGA |
| FGF2 | AGAAGAGCGACCCTCACATC | ACTGCCAGTTCGTTTCAGT |
| GAPDH | GAGTCAACGGATTTGGTCGT | TGGAAGATGGTGATGGGATT |
| B-actina | GCGAGCACAGAGCCTCGCCTTT | GCACATGCCGGAGCCGTTGTC |

Tabla 9. Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de qPCR para la cuantificación relativa de cada gen.

7.6 Análisis de expresión por Western Blot de IGF1, FGF2, COL2, 1 y 10

A partir de las proteínas totales extraídas en los distintos tiempos de cada experimento, se tomaron 50 μ l en buffer Laemmli y se incubaron por 5 minutos a 95°C. Posteriormente fueron cargadas en SDS-PAGE al 12% para detección de colágenas y en SDS-PAGE al 20% para la detección de IGF1 y FGF2. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron en tanque a una membrana de PVDF. Éstas se bloquearon con leche sin grasa al 5% en buffer TBST. β -actina fue usada como control utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-humano (dilución 1:3000) (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA) y un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:5000) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Se usaron los anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-humano COL2, COL1, COL10, IGF1 y

FGF2 (Abcam. Cambridge, RU) fueron usados para sus respectivos blancos (dilución 1:1000). La detección de los anticuerpos unidos se realizó con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG cojugado con peroxidasa de rábano (1:5000) (Abcam). El análisis densitométrico se realizó para la expresión de COL2, COL1 y COL10 utilizando el software Phoretix ID (TotalLab Ltd).

Capítulo 8: Resultados

8.1 Inmunofenotipificación de CMMA

Se obtuvieron lipoaspiraciones de tres donadores (hombres, entre 20 y 30 años de edad), aproximadamente 20 mL de cada donador. Se extrajeron aproximadamente 4×10^6 células adherentes por cada donación. Se realizó una mezcla de las células extraídas, se separó una alícuota de 1×10^6 células para inmunofenotipificar y el resto se expandió *in vitro* por 3 pasajes, dejando que en cada pasaje se alcanzara un 80% de confluencia, lo que ocurría aproximadamente cada 7 días. En la Figura 4 se muestran micrografías de las células en el pasaje 0 y al pasaje 3 a un 90% de confluencia.

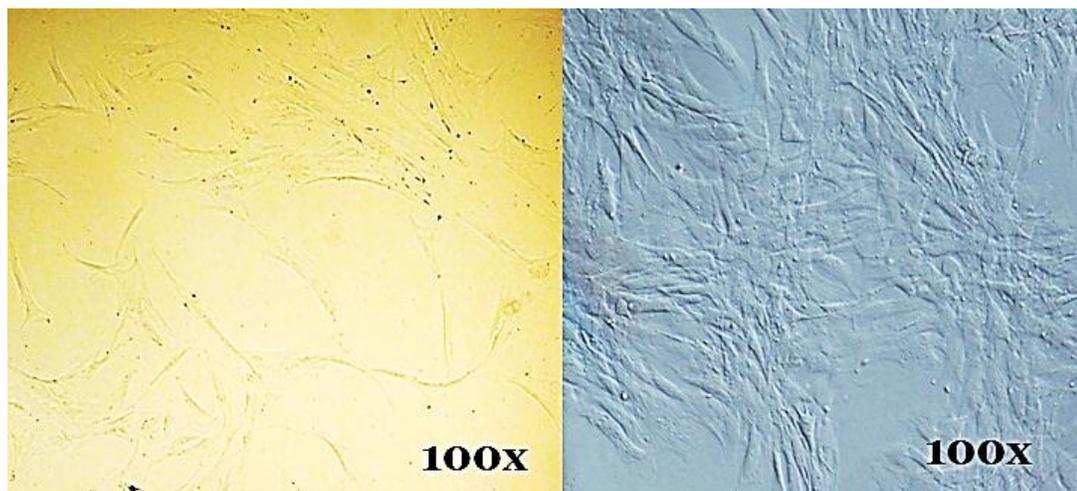


Figura 4. Micrografías de CMMA humanas a un aumento de 100x a los días: (A) pasaje 0 y (B) pasaje 3 de expansión *in vitro*.

La inmunofenotipificación mostró los siguientes resultados con el panel de marcadores de superficie seleccionados: CD90 positivo para el 77.7% de la población, CD105 positivo para el 59.31% de la población, CD271 positivo para el 24.21% de la población

y CD45 negativo en toda la población. En la Figura 5 se muestran los diagramas de dispersión arrojados por el software utilizado en el citómetro FACScalibur.

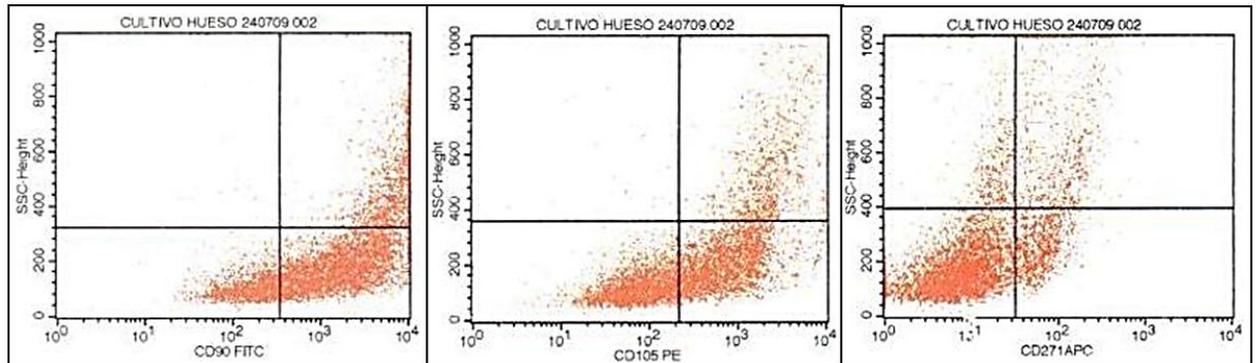


Figura 5. Gráficos de dispersión de poblaciones celulares con cada marcador, proporcionados por el software Cellquest Pro. (A) Gráfico para las células expresando CD90, (B) gráfico para las células expresando CD105 y (C) gráfico para las células expresando CD271.

8.2 Titulación de los adenovirus AdIGF1 y AdFGF2

La producción adenoviral realizada en células HEK293 se realizó hasta la infección final de 40 botellas T-150 de cultivo en un 80% de confluencia. Se obtuvo un título viral por el método de TCID₅₀, de 2.2×10^9 para el AdFGF2 pfu/mL y de 7.94×10^9 pfu/mL para el AdIGF1. En la Figura 6 se muestran micrografías de las células HEK293 antes de cada infección y el momento en el cual eran cosechadas al observar el efecto citopático característico.

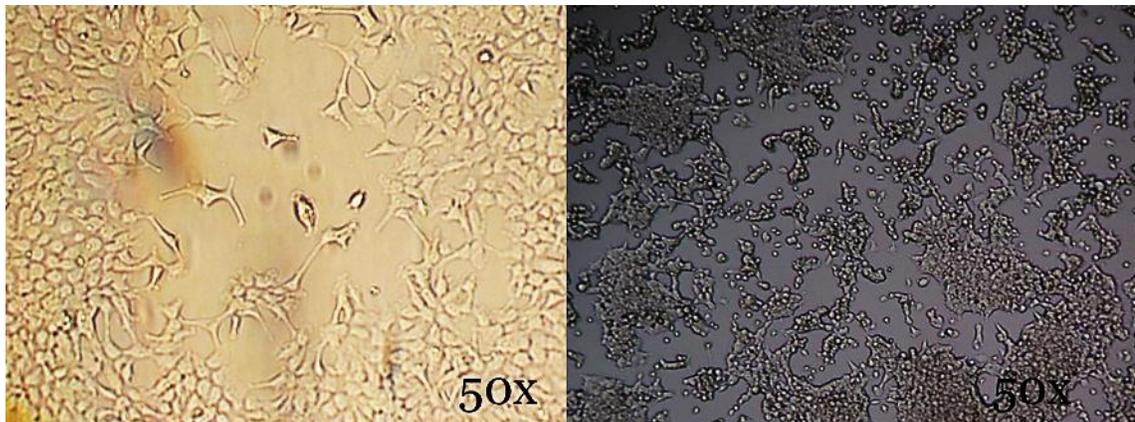


Figura 6. Micrografía de las células HEK293 a 50x. (A) Antes de la infección adenoviral, (B) Efecto citopático característico al momento de cosechar el cultivo.

8.3 Transducción adenoviral de IGF1, FGF2 y IGF1/FGF2 en CMMA

En la Figura 7 se muestran gráficas de barras con los niveles de expresión génica relativa de los factores de crecimiento FGF2 e IGF1 analizados por PCR en tiempo real. Se detectó una sobreexpresión de los factores transducidos hasta el día 7, detectando en el día 14 solo una sobreexpresión de FGF2 en el ensayo donde se transdujeron las CMMA con el AdFGF2 solo.

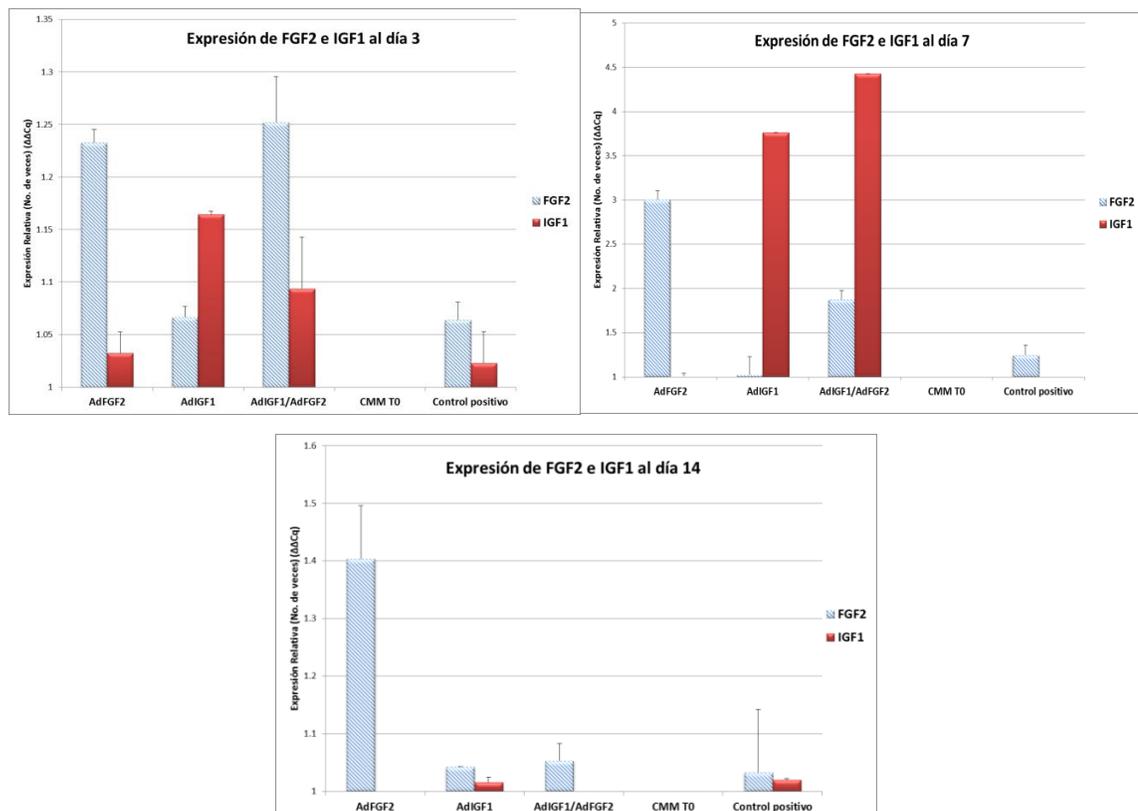


Figura 7. Expresión génica de los factores de crecimiento FGF2 e IGF1 transducidos mediante vectores adenovirales a las CMMA a los días 3, 7 y 14. Cuantificación relativa por PCR en tiempo real, utilizando GAPDH como gen normalizador. Los niveles de expresión mostrados son número de veces relativos al día 0 (CMMA sin transducir).

En la Figura 8 que se encuentra a continuación se muestran la detección de los factores de crecimiento a nivel transduccional con la técnica de Western blot. La señal de la presencia de las proteínas es fuerte a partir el día 7, especialmente en donde se

transdujeron en combinación los factores de crecimiento. El día 14 muestra señal de proteínas en todos los ensayos, excepto el control sin tratamiento.

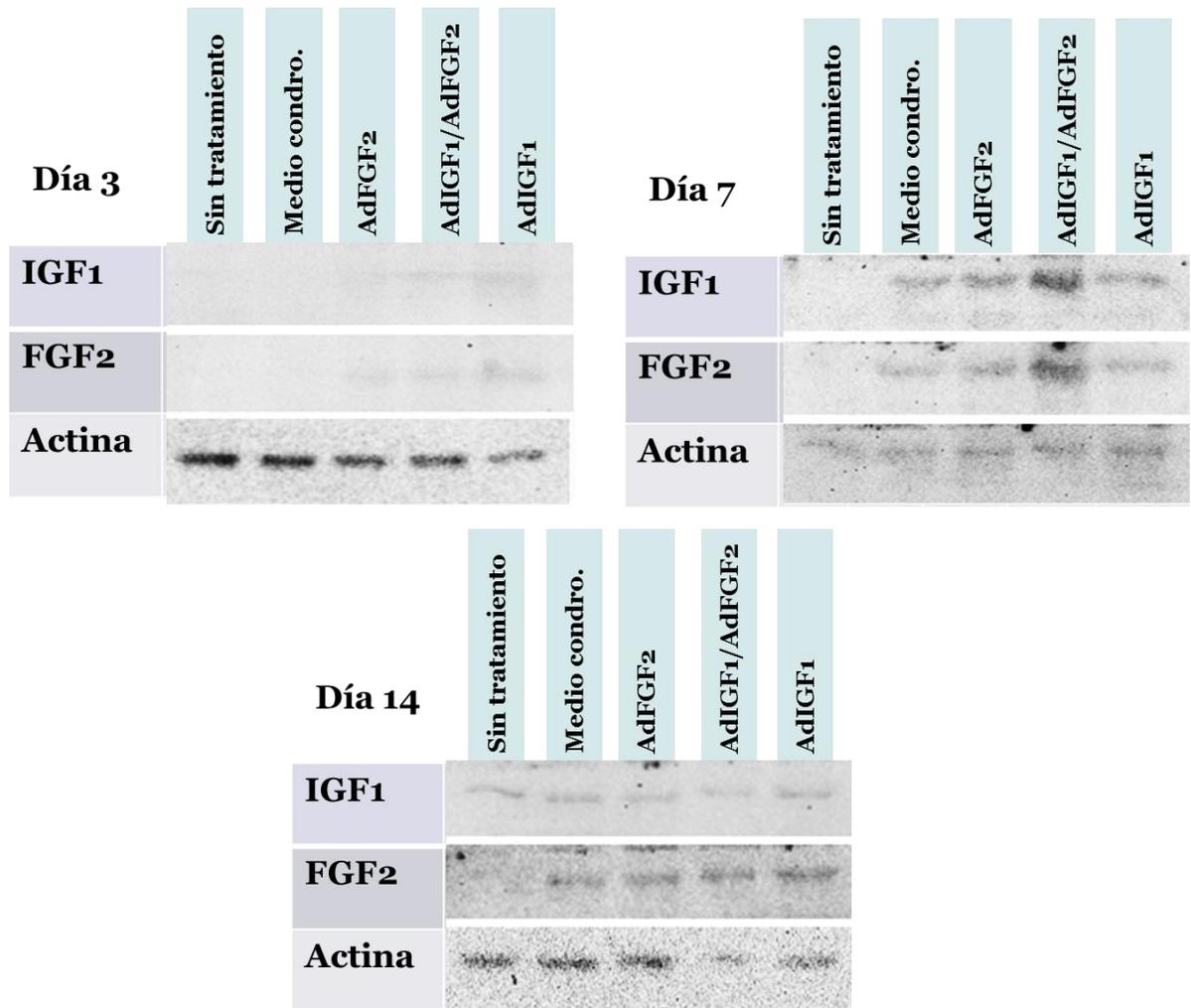


Figura 8. Western blot para la detección de IGF1 y FGF2 a los días 3, 7 y 14. Se utilizó actina como gen endógeno normalizador.

8.4 Diferenciación condrogénica en microesferas y Tissucol®

En las Figuras 9 y 10 se muestran las gráficas de barras con los niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación condrogénica evaluados por PCR en tiempo real utilizando GAPDH como gen normalizador. Al día 14 microesferas muestran baja expresión de genes de la MEC, como ACAN y COMP y una sobreexpresión marcada de FMOD, mientras que CMMA embebidas en Tissucol muestran niveles de expresión más altos de todos los marcadores analizados, incluido COL10 y los genes relacionados a la MEC. Al día 28, los niveles de expresión en microesferas de COL2 y FMOD aumentaron mientras que los niveles del resto de los marcadores se mantuvieron bajos. En Tissucol al día 28 se mantuvieron sobreexpresados los genes relacionados con la MEC, excepto FMOD que incluso se sub-expresó en las CMMA transducidas con AdIGF1. COL10 mantuvo niveles altos de expresión en Tissucol al día 28.

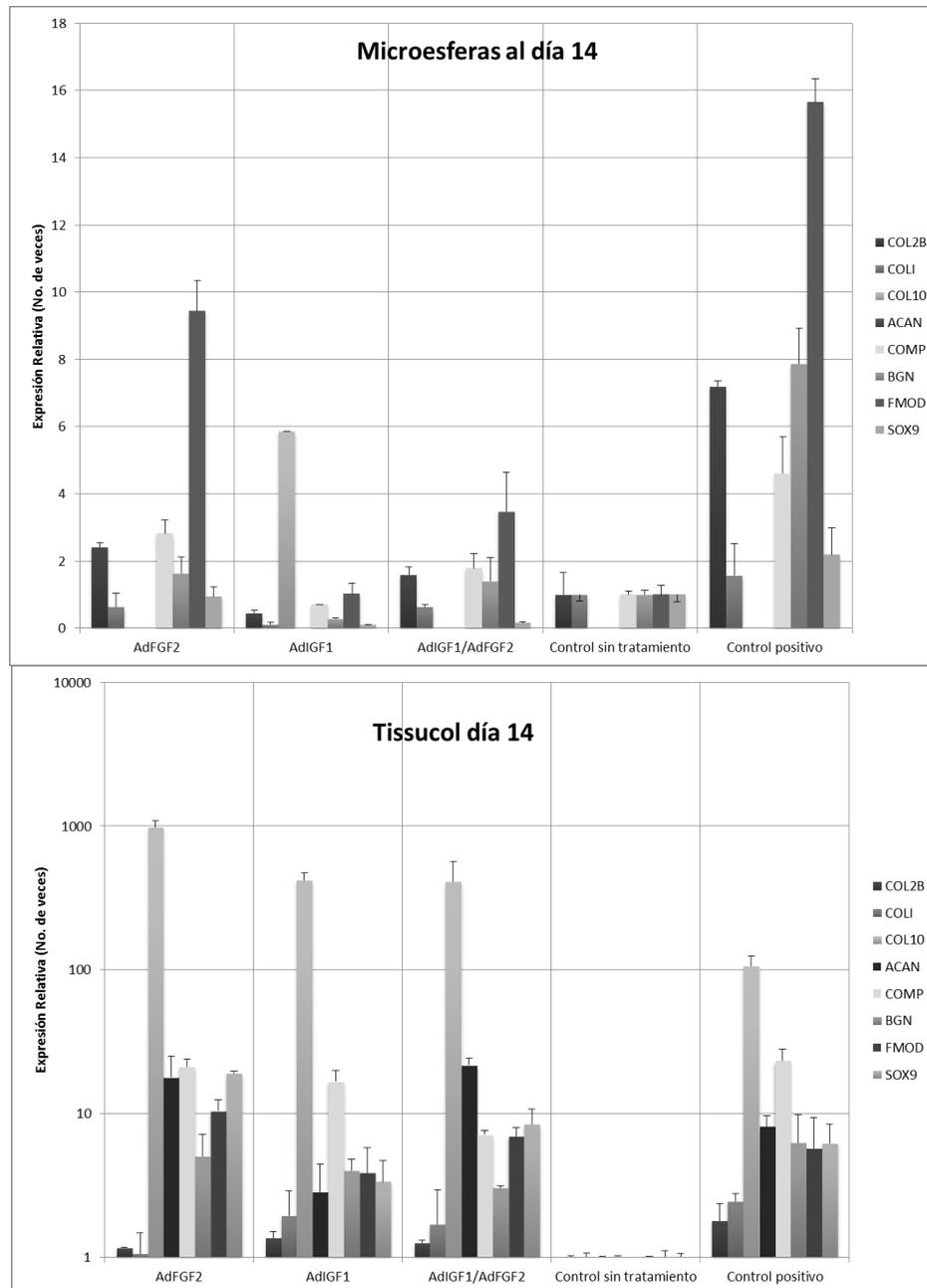


Figura 9. Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación condrogénica relativos al control sin tratamiento, al día 14 de la diferenciación condrogénica en microesferas y Tissucol. Se utilizó GAPDH como gen endógeno normalizador.

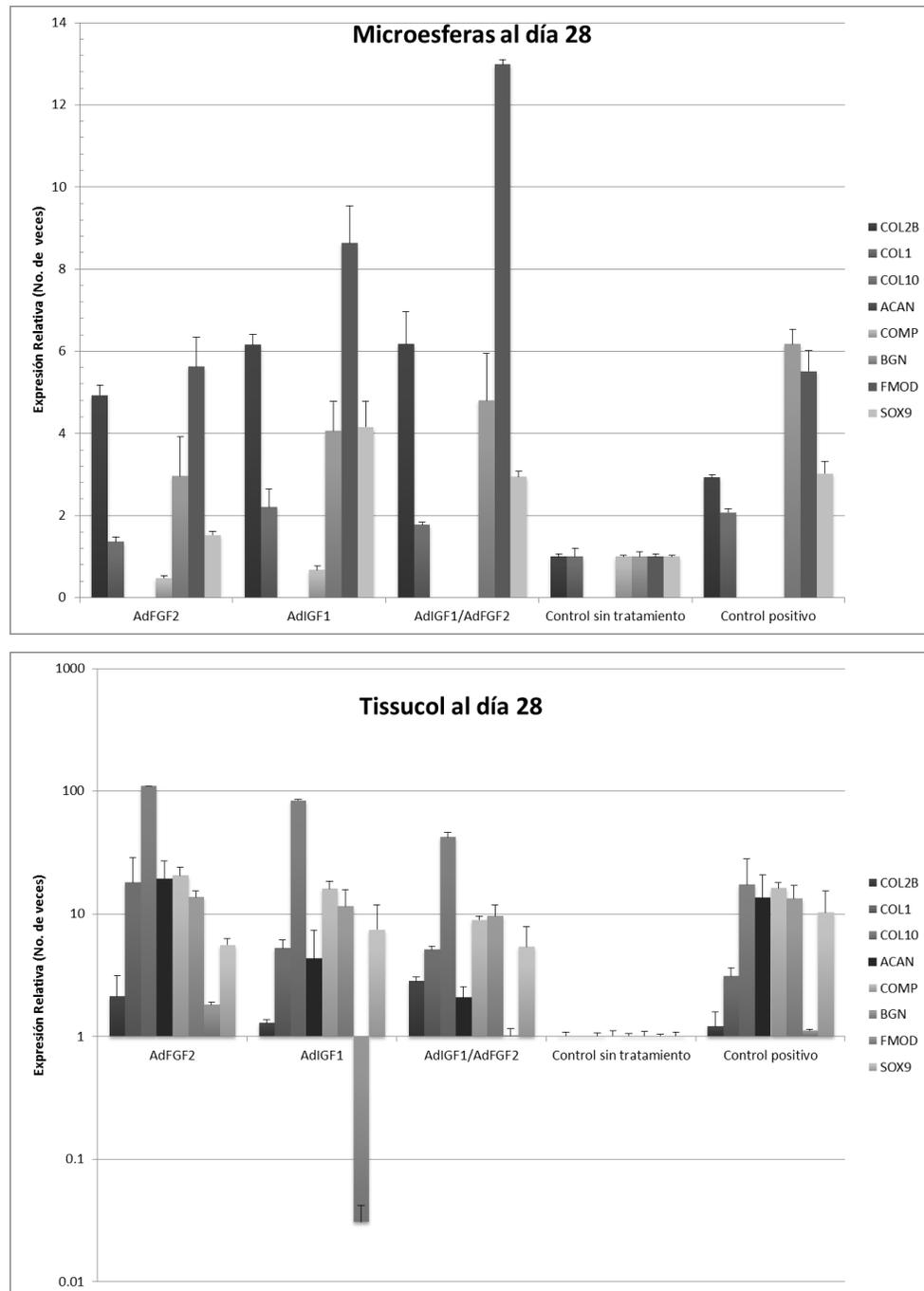


Figura 10. Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación condrogénica relativos al control sin tratamiento, al día 28 de la diferenciación condrogénica en microesferas y Tissucol. Se utilizó GAPDH como gen endógeno normalizador.

8.5 Diferenciación condrogénica optimizada en microesferas

Se optó por optimizar la diferenciación condrogénica en microesferas utilizando medio condrogénico debido a que en los resultados anteriores no se detectó expresión de COL10 y buena producción de COL2. En las figuras 11 y 12 se muestran los resultados del análisis por PCR tiempo real de los marcadores condrogénicos seleccionados a los días 3, 7 y 14 del proceso condrogénico. La sobreexpresión de COL1 fue detectada al día 3 y la presencia de genes de la MEC también fue detectada. Al día 7 la expresión de COL1 se mantuvo elevada, detectándose COL2 y niveles sobreexpresados de genes de la MEC, particularmente en el ensayo con IGF1 y FGF2 en combinación. Para el día 14 la expresión de COL1 comenzó a ceder mientras que los niveles de COL2 fueron mayores. En la Figura 13 se muestran la detección de COL2, 1 y 10 a nivel transduccional por Western blot a los días 3 y 14 y su respectivo análisis densitométrico. Al día 3 se detectó una señal intensa para COL1 y tenue para COL2. Al día 14 se observa señales intensas para COL1 y 10 y algo más tenue para COL2.

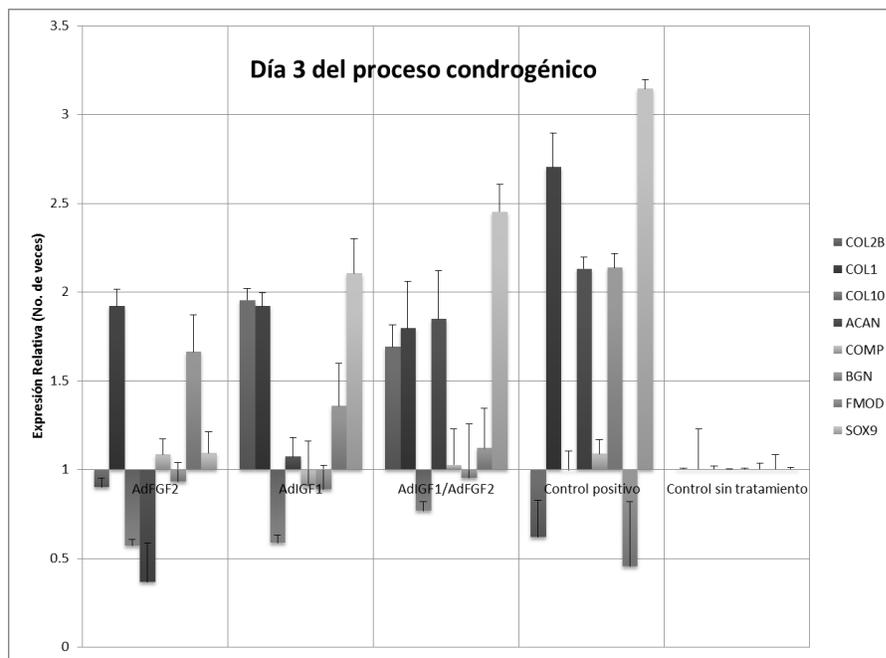


Figura 11. Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación condrogénica relativos al control sin tratamiento, al día 3 de la diferenciación condrogénica de microesferas con medio condrogénico. Se utilizó GAPDH como gen endógeno normalizador.

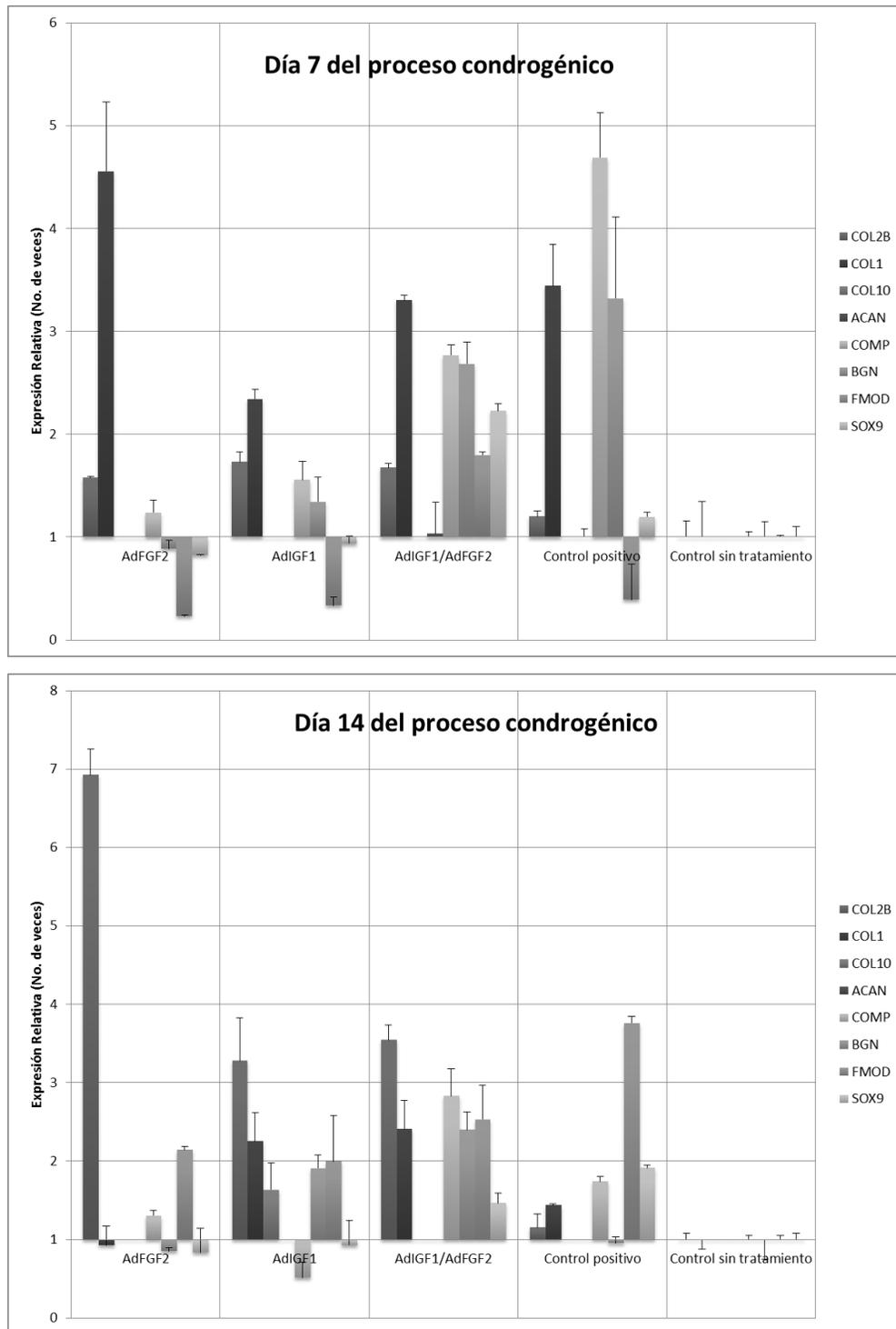


Figura 12. Niveles de expresión génica de los marcadores de diferenciación condrogénica relativos al control sin tratamiento, los días 7 y 14 de la diferenciación condrogénica de microesferas con medio condrogénico. Se utilizó GAPDH como gen endógeno normalizador.

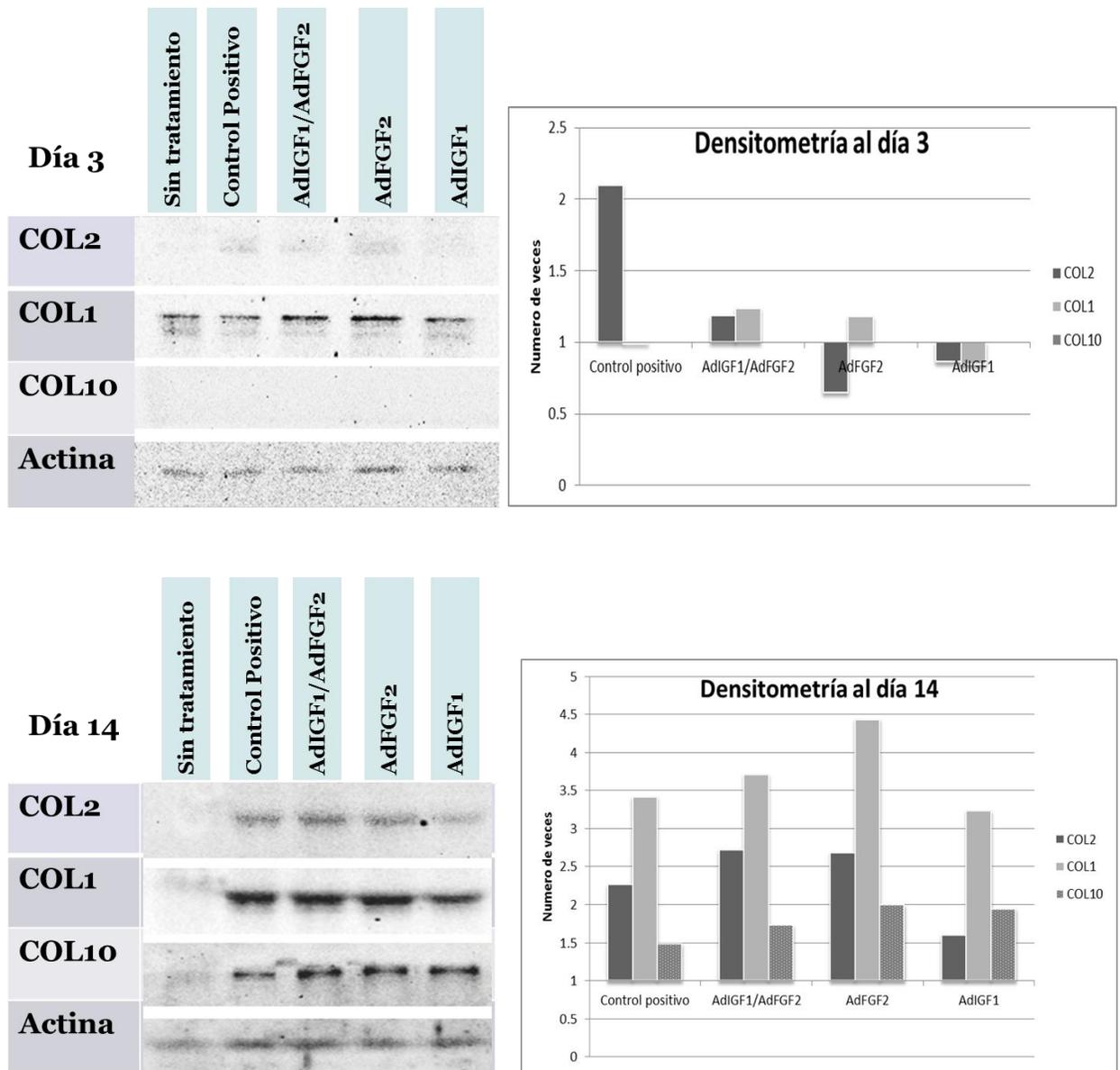


Figura 13. Western blots para la detección de COL2, 1 y 10 a los días 3 y 14 utilizando actina como gen normalizador para los análisis densitométricos respectivos. Los valores mostrados en las gráficas densitométricas son respecto al control sin tratamiento.

Capítulo 9: Discusión

Se logró establecer un modelo *in vitro* para el estudio de la expresión génica en CMMA humanas manipuladas para la diferenciación condrogénica en microesferas y Tissucol. Los análisis de expresión muestran que las células transducidas con la combinación de factores de crecimiento IGF1 y FGF2 sobreexpresan COL2 y genes relacionados a la MEC como COMP, BGN y FMOD tan temprano como al día 7 del proceso, además de sobreexpresar el factor de transcripción Sox9 y COL1 en etapas iniciales (día 3), como ocurre en la condrogénesis normal.²³ Adicionalmente las CMMA transducidas con estos factores presentaban expresión disminuida de COL10 en Tissucol y no detectable a nivel transcripcional en microesferas.

Se observaron patrones diferentes de expresión génica entre las condrogénesis a partir de CMMA humanas en microesferas y en andamiaje Tissucol a nivel transcripcional, observando que Tissucol promovió un perfil de diferenciación condrogénica tardía, propia de condrocitos con fenotipo hipertrófico.

La sobreexpresión de genes transducidos es detectada solo hasta el día 7 por qPCR como se observa en los resultados. Este fenómeno puede deberse al hecho de que las CMMA al inicio del proceso condrogénico se encuentran en estado proliferativo, el cual no disminuye hasta bien entrada la diferenciación condrogénica. Conforme las células se dividen, el título viral se diluye y los niveles de expresión detectados disminuyen. Adicionalmente, es bien conocido que los vectores adenovirales inducen una fuerte sobreexpresión por cortos periodos de tiempo. En trabajos previos utilizaron vectores adenovirales portadores de los genes IGF1 e IL-1Ra, observando un efecto terapéutico tan temprano como al día 2 y un declive de la producción de los factores al día 6.⁴⁸ En un estudio similar en el cual utilizaron además un adenovirus portador de bFGF, observaron el mismo declive en la expresión génica para el día 6 del proceso

condrogénico.²⁷ Sin embargo, los factores de crecimiento transducidos fueron detectados por Western blot hasta el día 14 del proceso. Esto podría indicar que el proceso condrogénico ya se encontraba establecido y que la expresión de factores de crecimiento era constante por las CMMA en diferenciación.

Los resultados de expresión por PCR en tiempo real del perfil de Tissucol a los días 14 y 28 respecto a la producción de COL10 se asocian a un patrón hipertrófico y puede estar relacionado con la interacción célula-matriz artificial. En la literatura este fenómeno está ampliamente reportado^{49,50} y se relaciona con estadios previos a la calcificación, no presentes en cartílago hialino normal. La presencia de proteínas usualmente no presentes en MEC, como es la fibrina, tal vez estimule la diferenciación hacia estadios hipertróficos.²³ Adicionalmente, la baja difusión de los nutrientes a las células embebidas en Tissucol pudo promover estadios hipertróficos. Para evitar esto, en un estudio realizado en 2009 se propuso un cultivo dinámico para aumentar la difusión de nutrientes en los andamios tridimensionales. En este trabajo utilizaron células embebidas en un andamio de agarosa para promover una diferenciación cartilaginosa la cual fue más eficiente que los ensayos sin movimiento.⁵¹ Sin embargo los genes asociados a la MEC analizados (ACAN, COMP, BGN y Sox9) se observaron sobreexpresados a nivel transcripcional, probablemente por qué el aislamiento de las CMMA en el hidrogel de fibrina pudo someterlas a cierto grado de hipoxia. Se ha reportado que la hipoxia es un factor importante en la regulación de la expresión de genes de la MEC.⁵² En un estudio realizado en 2010, compararon los efectos de la compresión mecánica (o cultivo dinámico) y la hipoxia en la diferenciación condrogénica de CMM embebidas en agarosa y observaron que las CMM sometidas a hipoxia producían una mayor cantidad de GAGs propios de la MEC y fibras colágenas, concluyendo que la hipoxia es un regulador más potente que el cultivo dinámico de la expresión de genes relacionados con la MEC.⁵³

La diferencia de expresión de FMOD observada entre los dos tipos de cultivo, microesferas y Tissucol puede ser indicio de una mala formación de MEC cartilaginosa ya que se conoce que FMOD interviene en la fibrillogénesis, como se observó en un

estudio donde silenciaron el gen en ratones y observaron que prácticamente todas las fibras colágenas de los ratones presentaban morfología anormal y se encontraban desorganizadas.³⁴ A pesar de que en el Tissucol se observaran niveles elevados de genes de la MEC, la presencia de COL10 y la falta expresión de FMOD indican que este sistema de cultivo, con las condiciones utilizadas, promueve fenotipo hipertrófico con una probable formación aberrante de fibras colágenas. Los altos niveles de expresión de FMOD en microesferas pueden indicarnos la formación de una MEC propia de cartílago normal, con una expresión de COL2 alta al día 28. La falta de otros genes de la MEC, como ACAN y COMP, en microesferas, tanto al día 14 y al 28, pudo deberse a la falta de los nutrientes necesarios.

De esta manera, al utilizar un medio rico en factores que favorecen la formación de matriz extracelular, como el condrogénico, se promovió la sobreexpresión de los componentes proteicos de la MEC al día 14. Esto confirma que los componentes del medio condrogénico son potentes inductores de la condrogénesis, como la dexametasona.^{54,55} La sobreexpresión de COL1 al día 3 de la diferenciación de CMMA en microesferas con medio de cultivo condrogénico confirmada por PCR en tiempo real y por Western blot concuerda con lo reportado en la literatura del desarrollo de la condrogénesis. Otros estudios han confirmado tal observación, demostrándose sobreexpresión de COL1 del día 2 al 21 en CMM embebidas en un andamio con proteínas de la matriz extracelular.²¹ Se observó también la marcada sobreexpresión del factor de transcripción Sox9 al día 3 de diferenciación. El factor Sox9 ha sido identificado como clave en la diferenciación condrogénica y recientemente se le ha relacionado como un agente de regulación positiva para la expresión de COL2 y de regulación negativa para COL10, uniéndose directamente a un región promotora de dichos genes,³¹ por lo que su detección en las etapas iniciales puede ser indicio de un proceso condrogénico normal.

Adicionalmente al efecto positivo del medio condrogénico a la diferenciación de CMMA en microesferas, los marcadores de diferenciación relacionados con la matriz fueron notablemente sobreexpresados en el ensayo con la combinación AdIGF1/AdFGF2,

incluida una sobreexpresión de COL1 y Sox9 en las etapas iniciales mayor a la detectada en los ensayos en los cuales solo se transdujo un solo factor de crecimiento. Esto confirma que la combinación de factores de crecimiento se relaciona con mejores procesos de diferenciación condrogénica.^{27,48,56} Además, esto indica que los resultados obtenidos son comparables a los encontrados en células ovinas por Garza-Veloz.³⁸

Se detectó COL10 por Western blot al día 14, pero no así en qPCR, lo que podría indicar una expresión baja de esta proteína, acumulándose en la MEC neoformada. Análisis de días más avanzados en el proceso podría confirmar esta observación.

Capítulo 10: Conclusión

Este trabajo demuestra que la utilización de Tisssuol para la diferenciación de CMMA a cartílago no es óptima ni útil, pues favorece la expresión de COL10, propia de cartílago hipertrófico y una baja expresión de FMOD. En microesferas se logró sobreexpresar genes de la matriz extracelular (COMP, FMOD, BGN y Sox9), siendo la combinación de factores de crecimiento transducidos (IGF1 y FGF2) la condición que promovió una mayor expresión de estos.

Capítulo 11: Bibliografía

1. Bhosale, A. M. & Richardson, J. B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin* **87**, 77–95 (2008).
2. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* **54**, 465–480 (2005).
3. Knecht, S. Biomechanical assessment of native and tissue engineered articular cartilage. *Dissease ETH 107* (2006).at <<http://en.scientificcommons.org/17787119>>
4. Umlauf, D., Frank, S., Pap, T. & Bertrand, J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**, 4197–211 (2010).
5. Belo, J. N., Berger, M. Y., Reijman, M., Koes, B. W. & Bierma-Zeinstra, S. M. a Prognostic factors of progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review of observational studies. *Arthritis and rheumatism* **57**, 13–26 (2007).
6. Kolf, C. M., Cho, E. & Tuan, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy* **9**, 204 (2007).
7. Mizuno, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School* **76**, 56–66 (2009).
8. Liu, T. M. *et al.* Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 750–60 (2007).
9. Turksen, K. *Adult Stem Cells*. (Humana Press: Totowa, NJ, 2011).doi:10.1007/978-1-61779-002-7
10. Katz, A. J., Tholpady, A., Tholpady, S. S., Shang, H. & Ogle, R. C. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **23**, 412–23 (2005).
11. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–7 (2006).
12. Bernstein, P. *et al.* Expression pattern differences between osteoarthritic chondrocytes and mesenchymal stem cells during chondrogenic differentiation. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **18**, 1596–607 (2010).
13. Yoo, H. J. *et al.* Gene Expression Profile during Chondrogenesis in Human Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells using a cDNA Microarray. *Journal of Korean medical science* **26**, 851–8 (2011).
14. Gimble, J. M., Katz, A. J. & Bunnell, B. a Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* **100**, 1249–60 (2007).

15. Kurth, T. *et al.* Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **15**, 1178–89 (2007).
16. Deasy, B. M., Li, Y. & Huard, J. Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Current opinion in biotechnology* **15**, 419–23 (2004).
17. Miura, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5807–12 (2003).
18. Ferraris, C., Chevalier, G., Favier, B., Jahoda, C. a & Dhouailly, D. Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development (Cambridge, England)* **127**, 5487–95 (2000).
19. Tuan, R., Boland, G. & Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy* **5**, (2003).
20. Fraser, J., Zhu, M., Wulur, I. & Alfonso, Z. Adipose-derived stem cells. *METHODS IN MOLECULAR ...* **449**, 59–67 (2008).
21. Diekman, B. O., Rowland, C. R., Lennon, D. P., Caplan, A. I. & Guilak, F. Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. *Tissue engineering. Part A* **16**, 523–33 (2010).
22. Winter, A. *et al.* Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis and rheumatism* **48**, 418–29 (2003).
23. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry* **97**, 33–44 (2006).
24. Hwang, N. S. *et al.* Chondrogenic priming adipose-mesenchymal stem cells for cartilage tissue regeneration. *Pharmaceutical research* **28**, 1395–405 (2011).
25. Ronzière, M. C., Perrier, E., Mallein-Gerin, F. & Freyria, A.-M. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Bio-medical materials and engineering* **20**, 145–58 (2010).
26. Huang, A. H., Stein, A. & Mauck, R. L. Evaluation of the complex transcriptional topography of mesenchymal stem cell chondrogenesis for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part A* **16**, 2699–2708 (2010).
27. Chen, B., Qin, J., Wang, H., Magdalou, J. & Chen, L. Effects of adenovirus-mediated bFGF, IL-1Ra and IGF-1 gene transfer on human osteoarthritic chondrocytes and osteoarthritis in rabbits. *Experimental and Molecular Medicine* **42**, 684 (2010).
28. Khan, W. S., Adesida, A. B., Tew, S. R., Lowe, E. T. & Hardingham, T. E. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells express the pericyte marker 3G5 in culture and show enhanced chondrogenesis in hypoxic conditions. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **28**, 834–40 (2010).

29. Noël, D. *et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Experimental cell research* **314**, 1575–84 (2008).
30. Mehlhorn, a T. *et al.* Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell proliferation* **40**, 809–23 (2007).
31. Leung, V. Y. L. *et al.* SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS genetics* **7**, e1002356 (2011).
32. Snelling, S. J. B., Hulley, P. a & Loughlin, J. BMP5 activates multiple signaling pathways and promotes chondrogenic differentiation in the ATDC5 growth plate model. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **28**, 268–79 (2010).
33. Keller, B. *et al.* Interaction of TGFβ and BMP signaling pathways during chondrogenesis. *PLoS one* **6**, e16421 (2011).
34. Svensson, L. *et al.* Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9636–47 (1999).
35. Corsi, a *et al.* Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **17**, 1180–9 (2002).
36. Freyria, A.-M. & Mallein-Gerin, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* **43**, 259–65 (2012).
37. Danišovič, L., Varga, I. & Polák, S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue & cell* **44**, 69–73 (2012).
38. Garza Veloz, I. Desarrollo de un implante de CMM modificadas genéticamente para reemplazo de cartílago. (2012).
39. Zhao, L. Chondrogenic differentiation of stem cells in human umbilical cord stroma with PGA and PLLA scaffolds. *Journal of Biomedical Science and Engineering* **03**, 1041–1049 (2010).
40. Munirah, S., Samsudin, O. C., Aminuddin, B. S. & Ruszymah, B. H. I. Expansion of human articular chondrocytes and formation of tissue-engineered cartilage: a step towards exploring a potential use of matrix-induced cell therapy. *Tissue & cell* **42**, 282–92 (2010).
41. Mauth, C. *et al.* Cell-seeded polyurethane-fibrin structures--a possible system for intervertebral disc regeneration. *European cells & materials* **18**, 27–38; discussion 38–9 (2009).
42. James, C. G., Ulici, V., Tuckermann, J., Underhill, T. M. & Beier, F. Expression profiling of Dexamethasone-treated primary chondrocytes identifies targets of glucocorticoid signalling in endochondral bone development. *BMC genomics* **8**, 205 (2007).

43. Chua, K. H., Aminuddin, B. S., Fuzina, N. H. & Ruszymah, B. H. I. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *European cells & materials* **9**, 58–67; discussion 67 (2005).
44. Murad, S., Tajima, S. & Johnson, G. Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic acid and its analogs. *Journal of investigative ...* **81**, 158–162 (1983).
45. Madry, H. & Cucchiaroni, M. Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair. *Croatian Medical Journal* **52**, 245–261 (2011).
46. St George, J. a Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene therapy* **10**, 1135–41 (2003).
47. Kirton, J. P., Crofts, N. J., George, S. J., Brennan, K. & Canfield, A. E. Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circulation research* **101**, 581–9 (2007).
48. Nixon, a J. *et al.* Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy. *Gene therapy* **12**, 177–86 (2005).
49. Galle, J. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Repair: State of the Art and Methods to monitor Cell Growth, Differentiation and Cartilage Regeneration. *Current Medicinal Chemistry* **17**, 2274–2291 (2010).
50. Pelttari, K. *et al.* 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**, 3254–66 (2006).
51. Huang, A. H., Stein, A., Tuan, R. S. & Mauck, R. L. Transient exposure to transforming growth factor beta 3 improves the mechanical properties of mesenchymal stem cell-laden cartilage constructs in a density-dependent manner. *Tissue engineering. Part A* **15**, 3461–72 (2009).
52. Myllyharju, J. & Schipani, E. Extracellular matrix genes as hypoxia-inducible targets. *Cell and tissue research* **339**, 19–29 (2010).
53. Meyer, E. G., Buckley, C. T., Thorpe, S. D. & Kelly, D. J. Low oxygen tension is a more potent promoter of chondrogenic differentiation than dynamic compression. *Journal of biomechanics* **43**, 2516–23 (2010).
54. James, C. & Ulici, V. Expression profiling of Dexamethasone-treated primary chondrocytes identifies targets of glucocorticoid signalling in endochondral bone development. *BMC ...* **27**, 1–27 (2007).
55. Owen, H. C., Ahmed, S. F. & Farquharson, C. Chondrocyte p21(WAF1/CIP1) expression is increased by dexamethasone but does not contribute to dexamethasone-induced growth retardation in vivo. *Calcified tissue international* **85**, 326–34 (2009).
56. Haupt, J. L. *et al.* Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **23**, 118–26 (2005).