

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Mediche, Cliniche e
Sperimentali

INDIRIZZO: Fisiopatologia Clinica

CICLO XXIII

TITOLO TESI

TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI IN UN
MODELLO ANIMALE DI DANNO OSSEO DA
GLUCOCORTICOIDI

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Elena Ossi

Supervisore: Ch.mo Prof. Giuseppe Realdi

Dottoranda: Dott.ssa Elisa Boldrin

INDICE

LEGENDA pag. 1

RIASSUNTO pag. 5

ABSTRACT pag. 9

INTRODUZIONE pag.13

- L'osso
- Fisiologia dello scheletro
- L'osteoporosi secondaria da glucocorticoidi
- Terapia cellulare ed ingegneria tissutale per la rigenerazione dell'osso
- Le calvarial cells

SCOPO DELLA TESI pag. 29

MATERIALI E METODI pag. 31

- Colture cellulari
- Colorazione citochimica per la fosfatasi alcalina su colture cellulari
- Colorazione citochimica per i depositi di calcio (Alizarin Red) su colture cellulari
- Colorazione citochimica per i depositi di fosfato (Von Kossa) su colture cellulari
- Real time PCR su cellule

- Modello sperimentale di danno osseo da glucocorticoidi
- Real time PCR su campioni di tessuto
- Analisi istomorfometrica e di microarchitettura ossea
- Immunoistochimica
- Analisi statistica

RISULTATI **pag. 39**

DISCUSSIONE **pag. 41**

FIGURE, TABELLE E GRAFICI **pag. 45**

BIBLIOGRAFIA **pag. 51**

LEGENDA

ACTB: actin-beta (beta-actina)

ALP: alkaline phosphatase (fosfatasi alcalina).

AML3: Acute Myeloid Leukemia 3

ANOVA: Analysis of variance

AP-1: Activator Protein 1

BGJ Fitton-jackson's modification: Biggers, Gwatkin and Judah medium
Fitton-jackson's modification

BMD: Bone Mineral Density (densità minerale ossea)

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BMU: Basic Multicellular Unit

BSP: bone sialoprotein (sialoproteina ossea)

BV/TV: Bone Volume/Tissue Volume (volume osseo/volume del tessuto
osseo)

C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein

Cbfa1: Core-binding transcription factor 1

COLIA1: collagen type I α 1 (collagene di tipo I)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: acido etilendiamminotetraacetico

ES/BS: Eroded Surface/Bone Surface (Superficie erosa/superficie ossea)

FBB: fast blue base

FBS: Fetal Bovine Serum (siero bovino fetale)

FCS: Fetal Calf Serum (siero bovino fetale)

GFP: Green Fluorescent Protein

IGF-I: Insulin-like Growth factor I

IGF-II: Insulin-like Growth factor II

MCP-1: Monocyte Chemoattractant protein 1

MEM: Minimal Essential Medium

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

Nd.N/TV: Number of Nodes/Tissue Volume (numero di nodi/volume del tessuto osseo)

Nd/Tm: Nodes/Termini (nodi/termini)

NFATc1: Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1

NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

O.Th: Osteoid Thickness (spessore dell'osteoid)

OC: osteocalcina

OI: osteogenesi imperfetta

ON: osteonectina

OPG: osteoprotegerina

OPN: osteopontina

OS/BS: Osteoid Surface/Bone Surface (superficie dell'osteoid/superficie ossea)

Osx: osterix

OV/BV: Osteoid Volume/Bone Volume (volume dell'osteoid/volume osseo)

PEBP2 α A: α A type of the α subunit of the polyomavirus enhancer binding protein2

PPAR γ 2: peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoform 2

PTH: Parathyroid hormone (paratormone)

RANK: receptor activator of nuclear factor KB

RANKL: receptor activator of nuclear factor KB ligand

Real time PCR: Real time Polymerase Chain Reaction

Runx2: Runt Related transcription factor 2

SAMP6: senescence-accelerated strain 6 (senescenza accelerata, linea 6)

SCID: severe combined immunodeficiency (immunodeficienza severa combinata)

Sox5: SRY (sex determining region Y)-box 5

Sox6: SRY (sex determining region Y)-box 6

Sox9: SRY (sex determining region Y)-box 9

SP7: osterix

SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein (osteonectina)

Tb.N: Trabecular Number (numero di trabecole)

Tb.Sp: Trabecular Separation (separazione trabecolare)

Tb.Th: Trabecular Thickness (spessore trabecolare)

TGF- β : Transforming growth factor beta

α -MEM: Minimal Essential Medium alpha modification

RIASSUNTO

L'osso è un tessuto connettivo specializzato costituito da cellule e matrice extracellulare mineralizzata. Le cellule principali sono gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti. Gli osteoblasti depongono la matrice ossea, mentre gli osteoclasti sono i responsabili del suo riassorbimento.

La fisiologia dell'osso è quindi il risultato di un delicato equilibrio tra deposizione di matrice ossea e suo riassorbimento.

Quando l'azione catabolica degli osteoclasti è maggiore rispetto a quella anabolica degli osteoblasti si produce una progressiva fragilità ossea che porta ad un quadro clinico osteoporotico.

L'osteoporosi primaria colpisce soprattutto la popolazione femminile dopo la menopausa. Molte patologie come il diabete mellito, l'iperparatiroidismo ed il trattamento a lungo termine con glucocorticoidi causano l'osteoporosi secondaria. L'osteoporosi indotta da glucocorticoidi è la più comune causa di osteoporosi secondaria.

Il trattamento con glucocorticoidi è un noto procedimento di induzione dell'osteoporosi in modelli animali e può dunque rappresentare un primo esempio di modello "traslazionale" potenzialmente applicabile in clinica per indurre un ripopolamento dell'osso con cellule staminali mesenchimali o precursori osteogenici.

Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto valutare nel modello animale se sia possibile ripopolare l'osso danneggiato con preosteoblasti.

I crani di topi neonati transgenici (GFP) sono stati prelevati e messi in coltura per ottenere preosteoblasti. Nelle colture in vitro è stata valutata l'espressione del gene Runx2 con la tecnica di Real time PCR, mentre la

capacità osteogenica è stata analizzata con colorazioni citochimiche per la fosfatasi alcalina e per la deposizione di matrice ossea mineralizzata (Alizarin Red e Von Kossa). Per la realizzazione del modello in vivo topi C57BL/6 maschi di 3 mesi sono stati divisi in 3 gruppi [gruppo I (n=4): topi non trattati con farmaco e non infusi con cellule; gruppo II (n=4): topi trattati con farmaco non infusi con cellule; gruppo III (n=4): topi trattati con farmaco ed infusi con cellule]. Il farmaco (metilprednisolone) è stato somministrato per un mese alla dose di 75 mg/Kg/settimana.

Negli animali appartenenti al gruppo III sono state infuse, attraverso iniezione nella vena della coda, 5×10^5 preosteoblasti GFP precedentemente espansi in vitro. I topi sono stati sacrificati, le tibie ed i femori sono stati prelevati e processati per l'analisi istomorfometrica e della microarchitettura ossea e per l'immunoistochimica. In questi tessuti, l'espressione genica di Runx2, osteonectina (SPARC) e fosfatasi alcalina (ALP) è stata valutata tramite Real time PCR.

In vitro i preosteoblasti producono fosfatasi alcalina durante i primi giorni di coltura in medium non differenziante, mentre il livello decresce in condizioni differenzianti, cioè in medium contenente acido ascorbico e β -glicerofosfato. I preosteoblasti mantenuti in medium di differenziamento per 30 giorni sono positivi alle colorazioni Alizarin Red e Von Kossa, quindi sono in grado di produrre matrice ossea mineralizzata, caratteristica degli osteoblasti funzionali e maturi. L'espressione del gene Runx2 aumenta durante il differenziamento, si ha un aumento del 50% nelle cellule differenziate per 30 giorni rispetto alle cellule non differenziate ($p < 0.05$).

L'inoculazione dei preosteoblasti nei topi del gruppo III ha evidenziato un aumento dei parametri statici di neoformazione ossea relativi all'osteoidi (O.Th, OS/BS, OV/BV) ed un aumento del numero di osteoblasti attivi, cioè

in corso di deposizione di osteoide, rispetto al gruppo II. Tra questi due gruppi non si sono osservate, invece, variazioni significative in termini di volume osseo (BV/TV), spessore trabecolare (Tb.Th) numero delle trabecole (Tb.N) e separazione fra esse (Tb.Sp).

Non sono state rilevate, inoltre, differenze dei parametri di microarchitettura (Nd.N/TV, Nd/Tm). Risultati simili sono emersi dalla valutazione dei parametri indiretti di microarchitettura (Marrow Star Volume e Fractal Dimension).

L'espressione genica ha dimostrato che nel gruppo II si ha una riduzione dell'espressione dei geni osteogenici rispetto al gruppo I (ALP: -50%, $p < 0.01$; Runx2: -56.75%, $p < 0.01$; SPARC: -44.5%, $p < 0.05$).

Nel gruppo III si è avuto un recupero dell'espressione dei geni osteogenici (ALP: +40%, $p < 0.05$; Runx2: +66.28%, $p < 0.001$; SPARC: +55%, $p < 0.01$) rispetto al gruppo II. I campioni di tessuto per l'immunoistochimica devono essere processati.

Nel nostro modello sperimentale di osteoporosi indotta da glucocorticoidi nel topo, abbiamo sacrificato gli animali solo una settimana dopo l'infusione delle cellule; questi dati preliminari dimostrano che il nostro modello induce l'engraftment dei preosteoblasti nell'osso danneggiato.

Tuttavia è richiesto un tempo di osservazione più lungo, di almeno 1-2 mesi per valutare se le cellule trapiantate siano in grado, non solo di integrarsi nel tessuto dell'ospite, ma anche di proliferare in vivo e di differenziare in osteoblasti maturi e funzionali.

ABSTRACT

Bone, a specialized connective tissue, consists of cells and mineralized extracellular matrix. The main cell types of bone tissue are: the osteoblasts, the osteocytes and the osteoclasts. Osteoblasts produce extracellular matrix, osteoclasts are responsible of its resorption, hence bone physiology is a delicate balance between synthesis of new bone and resorption of the old one. Osteoporosis is a disease in which catabolic activity of osteoclasts overtakes anabolic activity of osteoblasts leading to increased bone resorption and progressive bone fragility.

Primary osteoporosis is a common disease among post-menopausal female population. Pathologies as diabetes mellitus, hyperparathyroidism and long-term treatment with glucocorticoids cause secondary osteoporosis. Glucocorticoid-induced osteoporosis is the most common type of secondary osteoporosis.

Glucocorticoid treatment is a well known method to induce osteoporosis in animal models, hence it could be an example of “translational model” in which injured bone could be repopulated by stem cells or progenitors in clinical trials.

The aim of this thesis is to investigate whether preosteoblasts could repopulate injured bone in an animal model treated with glucocorticoids. Preosteoblasts have been isolated from newborn calvariae of GFP mice.

In these cells, expression of the osteogenic marker Runx2 has been assessed by Real time PCR, while osteogenic potential has been analysed by cytochemistry assays to detect alkaline phosphatase and mineralized bone nodules (Alizarin Red and Von Kossa staining).

To realize the in vivo model, C57BL/6 three months aged mice have been divided into three groups [group I (n=4): mice not treated with drug and not infused with cells, group II (n=4): mice treated with drug and not infused with cells, group III (n=4): mice treated with drug and infused with cells]. Drug (methylprednisolone) has been administered for one month with a dose of 75 mg/Kg/week. In mice of group III, 5×10^5 GFP preosteoblasts, previously expanded in vitro, have been infused with injection into the tail vein. Mice have been sacrificed, tibial and femoral bones have been harvested, processed and analysed by histomorphometry and immunohistochemistry. Expression of Runx2, osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase (ALP) in these tissues has been detected with Real time PCR.

In vitro preosteoblasts produce alkaline phosphatase during early time in culture with normal medium, while the level decreases in differentiating conditions with medium containing ascorbic acid and β -glycerophosphate. Preosteoblasts maintained in differentiation medium for 30 days are positive to Alizarin and Von Kossa staining, hence they are able to produce mineralized extracellular matrix that is a feature of functional mature osteoblasts. Runx2 expression increases during differentiating conditions; in cells maintained in differentiation medium for 30 days there is an increase of 50% compared to cells maintained in normal medium ($p < 0.05$).

In mice of group III an increased level of parameters concerning osteoid has been detected (O.Th, OS/BS, OV/BV) and an increased number of active osteoblasts (during synthetic activity) has been observed compared to group II. Between these two groups, significant variations of bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N) and trabecular separation (Tb.Sp) have not been detected.

Microarchitecture parameters (Nd.N/TV, Nd/Tm) have not been affected. Similar results have been obtained from indirect microarchitecture parameters as Marrow Star Volume and Fractal Dimension.

Real time PCR analysis revealed a reduction in osteogenic gene expression in group II compared to group I (ALP: -50%, $p < 0.01$; Runx2: -56.75%, $p < 0.01$; SPARC: -44.5%, $p < 0.05$).

In group III there is a recovery of expression of osteogenic markers (ALP: +40%, $p < 0.05$; Runx2: +66.28%, $p < 0.001$; SPARC: +55%; $p < 0.01$) compared to group II.

Immunohistochemistry is under investigation.

In our glucocorticoid-induced osteoporosis model we sacrificed mice only one week after infusion of cells, this preparatory investigation shows that our model induces the engraftment of preosteoblasts in injured bone. However, a longer time, at least of 1-2 months, is needed to investigate if preosteoblasts are able not only to graft onto host tissue, but also to proliferate in vivo and to differentiate in full mature and functional osteoblasts.

INTRODUZIONE

L'OSSO:

L'osso è un tessuto connettivo specializzato con funzione di protezione e sostegno, formato da matrice extracellulare mineralizzata e cellule.

La matrice extracellulare è costituita da cristalli di calcio-idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ed in quantità minore da carbonato di calcio e altri minerali. Oltre alla componente inorganica la matrice extracellulare è composta da una parte organica costituita da fibre di cui l'80-90% sono costituite da collagene, mentre la restante parte è costituita da proteine non collageniche come osteonectina, osteopontina, sialoproteina ossea, fosfatasi alcalina ed osteocalcina (Clarke et al., 2008).

Le proteine non collageniche comprendono i proteoglicani, le proteine glicosilate, le proteine γ -carbossilate. La glicoproteina osteonectina si pensa abbia un ruolo fondamentale nel determinare l'inizio della mineralizzazione della matrice ossea (Termine JD et al., 1981). L'osteopontina è una sialoproteina che si ritiene possa avere la funzione biologica di consentire l'adesione delle cellule alla matrice ossea e nel controllare il riassorbimento osseo (Sodek et al., 2000). La sialoproteina ossea (BSP) è una proteina probabilmente coinvolta nella formazione dei cristalli di idrossiapatite della matrice (Hunter et al., 1994). La fosfatasi alcalina, la proteina glicosilata più abbondante presente nella matrice ossea, partecipa anch'essa alla mineralizzazione della matrice, anche se il suo ruolo preciso non è stato ancora chiarito (Whyte et al., 1994). L'osteocalcina (OC), la più abbondante tra le proteine non collageniche, è una proteina γ -carbossilata che probabilmente ha la funzione di modulare la morfologia dei cristalli di

idrossiapatite (Hoang Q et al., 2003).

Le cellule che compongono l'osso sono gli osteoblasti, gli osteociti, gli osteoclasti, le lining cells e gli osteoprogenitori. Gli osteoblasti producono la matrice extracellulare, gli osteociti discendono dagli osteoblasti che, in seguito alla deposizione della matrice extracellulare rimangono intrappolati all'interno di lacune. Gli osteoblasti che esaurita l'attività di formazione ossea rimangono a ridosso della superficie ossea sono le cosiddette cellule di rivestimento dell'osso (bone lining cells) a cui si attribuisce un ruolo nella mediazione degli scambi tra i vasi sanguigni e gli osteociti.

Gli osteoclasti sono l'unico tipo cellulare non autoctono del tessuto osseo, essi infatti originano dai preosteoclasti presenti nel midollo osseo appartenenti alla linea differenziativa dei monociti (Boyle et al., 2003).

Gli osteoclasti degradano la matrice ossea e sono quindi responsabili del riassorbimento osseo.

La popolazione di osteoblasti è mantenuta dalle cellule staminali mesenchimali (MSCs), infatti da esse hanno origine gli osteoprogenitori dai quali discendono i preosteoblasti, dai quali a loro volta derivano gli osteoblasti maturi (Long et al., 2001). Questa divisione è utile per categorizzare e descrivere le caratteristiche delle varie sottopopolazioni dei vari livelli di maturazione, tuttavia, è più corretto pensare ad esse come ad un continuum di precursori cellulari tra i quali non esistono precisi confini (Long et al., 2001). Il commitment delle MSCs in senso osteogenico è regolato dal pathway Wnt/ β -catenina (Logan et al., 2004) che stimola l'espressione di Runx2 (Runt-related transcription factor 2), uno dei geni più precoci del differenziamento osteogenico (Gaur et al., 2005).

Runx2, noto anche come Cbfa1 (Core-binding transcription factor 1), PEBP2 α A e AML3, ha un ruolo chiave nella regolazione del differenziamento

osteogenico. In modelli murini la sua espressione inizia già durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale (E9.5) nella notocorda e, più tardi, nei condrociti (Otto et al., 1997). Al giorno embrionale E13.5 Runx2 è espresso nel pericondrio/periostio, successivamente nei condrociti ipertrofici e negli osteoblasti di tutte le ossa, sia quelle derivate dall'ossificazione endocondrale (Inada et al., 1999), sia quelle derivate dall'ossificazione intramembranosa (Ducy et al., 1997). Modelli murini knock-out per Runx2 presentano mancanza sia di ossificazione membranosa sia di ossificazione endocondrale, mentre negli eterozigoti si osserva un deficit simile alla patologia umana denominata displasia cleidocraniale (Otto et al., 1997; Komori et al., 1997), caratterizzata da difetti nello sviluppo delle clavicole, del cranio e da altre displasie ossee (Mundlos et al., 1997).

Runx2 inibisce la completa maturazione dei preosteoblasti in osteoblasti, mantenendo questi ultimi ad uno stadio immaturo (Komori et al., 2006). Proprio per questa ragione, topi transgenici in cui Runx2 è overespresso sviluppano osteopenia e sono soggetti a fratture multiple (Liu et al., 2001; Geoffroy et al., 2002). In questi topi l'osso corticale è sottile e poroso e sebbene il numero di osteoblasti sia maggiore rispetto al wild-type, la funzione di produzione e mineralizzazione della matrice è compromessa, il numero di osteoblasti che esprimono marker tardivi del differenziamento osteogenico come l'osteocalcina è ridotto, mentre aumenta il numero di osteoblasti esprimenti osteopontina. Runx2 impedisce inoltre il differenziamento delle MSCs in adipociti, inibendo i fattori di trascrizione PPAR γ 2 e C/EBP ed il differenziamento in condrociti, inibendo Sox5, Sox6, Sox9 (Gaur et al., 2005).

Un altro gene fondamentale per il differenziamento osteoblastico è Osterix (Osx o SP7), un fattore di trascrizione contenente il motivo zinc-finger

(Nakashima et al., 2002). *Osx* è un gene più tardivo di *Runx2*, infatti la sua espressione in modelli murini non inizia prima del giorno di sviluppo embrionale E13. *Osx* è espresso prima nei condrociti in differenziamento, nel pericondrio circostante e nella zona di condensazione mesenchimale delle future ossa membranose al giorno E13.5 nell'embrione. Al giorno E15.5 e nei giorni successivi *Osx* è espresso nelle cellule delle trabecole ossee e delle clavicole. Nei topi knock-out per *Osx* l'espressione del gene che codifica per il collagene di tipo 1 (*COL1A1*) nelle ossa membranose ed endocondrali è ridotta, mentre osteonectina (*ON*), osteopontina (*OPN*), sialoproteina ossea (*BSP*) ed osteocalcina (*OC*) non sono espresse.

Nei topi knock-out per *Osx* sia l'ossificazione endocondrale che quella intramembranosa falliscono, proprio come nei topi knock-out per *Runx2*.

Inoltre, nei topi knock-out per *Osx*, l'espressione di *Runx2* non è compromessa, mentre nei topi knock-out per *Runx2* non si ha espressione di *Osx*. Da queste osservazioni si deduce che *Osx* è fondamentale per il differenziamento lungo il lineage osteogenico, che *Runx2* e *Osx* appartengono allo stesso pathway e che *Osx* agisce a valle di *Runx2* (Nakashima et al., 2002).

Altri importanti geni coinvolti nel commitment osteogenico sono quelli che codificano per il collagene di tipo I (*COL1A1*), per l'osteopontina (*OPN*), per la sialoproteina ossea (*BSP*) e per l'osteocalcina (*OC*).

All'interno della sequenza dei geni che codificano per queste proteine sono stati identificati siti di legame al DNA per *Runx2*. Inoltre *Runx2* induce l'espressione di questi geni in vitro (Komori et al., 2005).

FISIOLOGIA DELLO SCHELETRO:

L'osso è un tessuto dinamico grazie alla continua rimozione di porzioni di matrice seguita dall'apposizione di matrice neosintetizzata.

Questo procedimento è dovuto all'azione catabolica degli osteoclasti che degradano la matrice esistente e all'azione anabolica degli osteoblasti che sintetizzano la matrice nuova.

Durante la crescita l'attività degli osteoclasti e quella degli osteoblasti non sono strettamente accoppiate, infatti, il nuovo osso viene depositato in sedi diverse rispetto all'osso degradato. Questo meccanismo, chiamato modellamento, permette alle ossa di crescere e cambiare forma in risposta ai cambiamenti fisiologici e ai carichi meccanici cui sono sottoposte (Feish, 2000). Nell'adulto, invece, avviene il rimodellamento, processo in cui l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti è accoppiata nello spazio e nel tempo, perciò l'osso neosintetizzato prodotto dagli osteoblasti viene depositato nella sede in cui l'osso è stato degradato. Queste attività anaboliche e cataboliche avvengono all'interno di unità discrete di tessuto osseo chiamate BMU (Basic Multicellular Unit) (Dempster, 2002).

Il rimodellamento consente di rinnovare l'osso, prevenendo l'accumulo di microdanni. Si riconoscono tre fasi nel rimodellamento osseo.

Nella prima fase i monociti, ovvero i precursori degli osteoclasti, vengono attratti nel sito di riassorbimento da diverse chemochine.

MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) è una chemochina prodotta dagli osteoblasti che si pensa attragga i monociti (Graves et al., 1999; Li et al., 2007). Fondamentale per il differenziamento dei monociti in osteoclasti è l'interazione tra il recettore RANK presente sulla superficie dei monociti ed il suo ligando RANKL esposto sulla membrana cellulare degli osteoblasti. Dall'interazione si scatena l'attivazione a cascata di diversi fattori di

trascrizione tra cui NF- κ B, AP-1 e NFATc1, i quali stimolano l'espressione dei geni del differenziamento osteoclastico. Gli osteoblasti esprimono anche un falso recettore chiamato OPG (osteoprotegerina) che inibisce RANK mascherando l'azione di RANKL (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998). Gli osteoclasti degradando l'osso provocano il rilascio dalla matrice ossea di fattori di crescita come TGF- β (Transforming Growth Factor β), BMP (Bone Morphogenetic Protein) e IGF-II (Insulin-like Growth Factor II). Questi fattori attirano le MSCs nel sito di riassorbimento stimolandole a differenziare in osteoblasti che sintetizzano nuova matrice ossea (Pfeilschifter et al., 1987; Wozney et al., 1988). Mentre l'attività di sintesi di nuovo osso sta iniziando, gli osteoclasti subiscono apoptosi (Wakeyama et al., 2007; Nakamura et al., 2007). Anche gli elevati livelli di calcio extracellulare rilasciati durante il riassorbimento inducono l'apoptosi degli osteoclasti (Zaidi et al., 1989). Terminata la fase di neosintesi gli osteoblasti entrano in quiescenza. La sclerostina è una proteina secreta dagli osteociti che si pensa abbia un ruolo nell'induzione della quiescenza degli osteoblasti (Van Bezooijen et al., 2004).

L'OSTEOPOROSI SECONDARIA DA GLUCOCORTICOIDI:

L'osteoporosi è una patologia caratterizzata da perdita di massa ossea e deterioramento strutturale dell'osso, portando ad un incremento del rischio di fratture (Holroyd et al., 2008).

La forma primaria di osteoporosi colpisce principalmente le donne in menopausa, ma esistono anche forme secondarie di osteoporosi che insorgono in conseguenza di patologie come il diabete mellito, l'iperparatiroidismo ed il trattamento a lungo termine con glucocorticoidi.

I glucocorticoidi, farmaci utilizzati nel trattamento di molte patologie tra le

quali quelle epatiche, gastrointestinali, reumatologiche, renali e polmonari e nella prevenzione del rigetto nei trapianti, sono per frequenza la terza causa di osteoporosi dopo quella post-menopausale e quella senile (Lukert et al., 1996) e sono la più frequente causa di osteoporosi secondaria (Saag et al., 1997).

I glucocorticoidi alterano l'equilibrio tra il riassorbimento dovuto all'azione degli osteoclasti e la sintesi di nuovo osso da parte degli osteoblasti.

I glucocorticoidi hanno un'azione diretta sugli osteoblasti inibendo il differenziamento degli osteoprogenitori in osteoblasti (Olney, 2009). Inoltre essi hanno un'azione inibitrice sul rilascio delle gonadotropine che causa ipogonadismo (Gore et al., 2006). I glucocorticoidi inibiscono la produzione di IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) (Delany et al., 2001) ed inducono la resistenza a questo fattore (Prummel et al., 1996; Wajchenberg et al., 1996). La diminuzione di IGF-I, l'induzione della resistenza a IGF-I e la minor produzione di estrogeni derivata dall'ipogonadismo portano ad una diminuzione della proliferazione degli osteoblasti e delle loro funzioni anaboliche. L'azione combinata dei glucocorticoidi con la diminuzione di IGF-1 stimola l'apoptosi degli osteoblasti (Weinstein et al., 1998; Weinstein, 2001). I glucocorticoidi aumentano l'espressione di RANKL e diminuiscono quella di OPG (Olney, 2009). Infine i glucocorticoidi hanno effetto sull'escrezione del calcio (Baxter et al., 2000) ed inibiscono il suo assorbimento promuovendo l'ipocalcemia comportando l'aumento dei livelli di paratormone (Kuroki et al., 2008). L'aumentato livello di paratormone stimola l'attività degli osteoclasti.

Con tutti questi meccanismi i glucocorticoidi aumentano l'attività di riassorbimento osseo a discapito dell'attività di sintesi da parte degli osteoblasti, tuttavia rimane da chiarire come la loro azione in vitro sia

opposta, infatti sono degli induttori della mineralizzazione in colture di osteoprogenitori (Aubin et al., 1999; Purpura et al., 2004).

Questo paradosso suggerisce l'esistenza in vivo di una cellula intermedia che trasmetta l'azione inibitrice dei glucocorticoidi agli osteoblasti.

Nell'uomo durante il trattamento con glucocorticoidi la perdita di massa ossea è rapida durante i primi 6 mesi, con una riduzione media del 5% durante il primo anno (Baxter et al., 2000; Rackoff et al., 1998; Adachi et al., 1997; Cohen et al., 1999). Successivamente la perdita ossea è del 1%-2% all'anno (Baxter et al., 2000). L'osso trabecolare e la parte corticale delle vertebre sono più colpiti rispetto alla regione corticale delle ossa lunghe (Baxter et al., 2000; Reid et al., 2000). Quindi la regione lombare della spina dorsale e la porzione prossimale del femore sono le sedi più colpite dalle fratture (Baxter et al., 2000). L'incidenza delle fratture è stimata essere 1.3-2.6 volte più alta negli individui trattati con glucocorticoidi (Van Staa et al., 2000).

L'osteoporosi, compresa quella indotta da glucocorticoidi, può essere in parte prevenuta da somministrazioni di calcio e vitamina D, in particolare se l'assunzione con la dieta risulta essere inadeguata (Boling et al., 2004). Tuttavia in molti pazienti è richiesto un trattamento farmacologico per contrastare l'insorgenza di osteoporosi. I farmaci più efficaci nel trattamento dell'osteoporosi post-menopausale sono i bisfosfonati, la calcitonina, il raloxifene, il paratormone (PTH) ed il teriparatide, mentre nel trattamento dell'osteoporosi indotta da glucocorticoidi sono efficaci soprattutto i bisfosfonati (Boling et al., 2004).

Il topo è il modello animale ideale per lo studio dell'osteoporosi indotta da glucocorticoidi perché presenta un minor numero di fattori fuorvianti rispetto ad altre specie (Weinstein et al., 1998). In modelli animali come il

coniglio o il cane non si riscontrano cambiamenti significativi della densità ossea e del volume di osso trabecolare, si verificano inoltre perdita di peso e accumulo di grasso a livello epatico (Quarles et al., 1992; Grardel et al., 1994; Kawai et al., 1985). Nelle pecore i cambiamenti istologici assomigliano a quelli dei pazienti trattati con glucocorticoidi ma anche in questo modello i cambiamenti della densità ossea e della massa di osso trabecolare non sono significativi (Deloffre et al., 1995; Chavassieux et al., 1997; Newman et al., 1995). Nei ratti, in seguito al trattamento con glucocorticoidi, avviene una diminuzione dell'attività di formazione ossea (Dalle Carbonare et al., 2007). Tuttavia, in questo modello animale non avviene un significativo aumento del riassorbimento, ciò è probabilmente dovuto al ridotto rimodellamento osseo nei ratti durante tutta la loro vita (Kimmel, 1991; Li XJ et al., 1991). Inoltre, solo nel topo la somministrazione di glucocorticoidi induce una situazione molto simile a quella dei pazienti umani con perdita di osso prevalentemente a livello assiale invece che a livello appedicolare e accompagnata da indici istologici di ridotta attività osteoblastica (Lukert et al., 1996; Fitzpatrick et al., 1994; Reid et al., 1989).

L'induzione del danno nel topo viene ottenuta tramite la somministrazione di glucocorticoidi per un periodo di 30 giorni (Weinstein et al., 1998; Herrmann et al., 2009; Hofbauer et al., 2009; Yao et al., 2008; Plotkin et al., 2008). In seguito al trattamento si verifica una riduzione della BMD a livello globale ed in particolare a livello delle vertebre e del femore (Weinstein et al., 1998; Plotkin et al., 2008; Hofbauer et al., 2009). L'istomorfometria ossea conferma questi risultati riscontrando una diminuzione della formazione ossea ed un aumento del riassorbimento (Hofbauer et al., 2009). Alcuni studi hanno rilevato un aumento dei livelli di calcio nelle urine e una diminuzione dei livelli di osteocalcina nel siero (Hofbauer et al., 2009;

Herrmann et al., 2009), parametri che indicano un aumento del turnover osseo. Alcuni studi, tramite tecniche di biologia molecolare come microarrays e Real Time PCR, hanno riscontrato un aumento dell'espressione dei geni relativi alla proliferazione e maturazione degli osteoclasti ed una diminuzione di quelli relativi alla proliferazione e maturazione degli osteoblasti (Yao et al., 2008).

Le modalità di somministrazione del farmaco sono l'iniezione sottocutanea o intraperitoneale (Herrmann et al., 2009; Man et al., 2002; De Bie et al., 1996), l'impianto di pellet sottocutanei a rilascio lento (Weinstein et al., 1998; Herrmann et al., 2009; Hofbauer et al., 2009; Yao et al., 2008; Plotkin et al., 2008) o l'impianto di pompe micro-osmotiche (Herrmann et al., 2009). La somministrazione per un periodo di 30 giorni corrisponde ad un periodo di 3-4 anni nell'uomo (Weinstein et al., 1998). I dosaggi utilizzati sono maggiori in relazione al peso corporeo di quelli utilizzati nell'uomo ma va considerata la maggiore velocità di clearance metabolica dei glucocorticoidi e di altri composti negli animali di piccola taglia (Stanton et al., 1985; Borchard et al., 1992; Kleiber et al., 1961).

TERAPIA CELLULARE ED INGEGNERIA TISSUTALE PER LA RIGENERAZIONE DELL'OSSO:

L'osso ha la capacità innata di riparare i danni attraverso il rimodellamento, tuttavia in molte patologie ossee, soprattutto in quelle in cui la risorsa di cellule staminali residenti è compromessa, si deve ricorrere a terapie farmacologiche con farmaci che diminuiscono il riassorbimento o stimolano la formazione di osso. Queste terapie migliorano le condizioni cliniche dei pazienti ma non risolvono le cause della patologie ossee.

La terapia cellulare, che si propone di utilizzare cellule staminali od

osteoprogenitori da indirizzare verso il sito di danno osseo, ha la potenzialità di risolvere la causa alla base delle patologie ossee; anche se attualmente l'efficacia è limitata dalla bassa percentuale di ripopolamento da parte delle cellule infuse e dalla sopravvivenza a lungo termine delle cellule trapiantate (Jethva et al., 2009).

Cellule molto utilizzate negli studi preclinici e clinici nel campo della rigenerazione di molti tessuti, tra i quali quello osseo, sono le cellule staminali mesenchimali (MSCs).

Le MSCs furono isolate per la prima volta da Friedenstein che le isolò da midollo osseo e le descrisse come una popolazione di cellule di aspetto fibroblastico che dava origine a colonie in coltura e che aveva potenziale osteogenico (Friedenstein et al., 1968). Successivamente Caplan (Goshima et al., 1991) coniò il termine "cellule staminali mesenchimali" per sottolineare la loro origine. In seguito le MSCs furono isolate da molti altri tessuti come muscolo scheletrico, tessuto adiposo, placenta e cordone ombelicale (Jiang et al., 2002; Pittenbergh et al., 1999).

Le MSCs sono multipotenti in quanto, se sottoposte a determinati stimoli, hanno la capacità di differenziare in vitro in diversi tipi cellulari come cellule ossee, cartilaginee, muscolari, adipose (Erices et al., 2000; Pittenger et al., 1999; Campagnoli et al., 2001; O'Donoghue et al., 2003; Toma et al., 2002; Woodbury et al., 2000; Kopen et al., 1999; Bruder et al., 1997; Krampera et al., 2003; Ferrari et al., 1998; Koc et al., 2000; Horwitz et al., 2002; Di Nicola et al., 2002). Le MSCs sono una popolazione in piccola percentuale (0.001-0.01%) nel midollo osseo (Pittenger et al., 1999). Queste cellule sono presenti in percentuali simili anche nel sangue periferico (Zvaifler et al., 2000) e nel cordone ombelicale (Erices et al., 2000). Nonostante la loro rarità le MSCs sono facilmente isolabili grazie alla loro aderenza su plastica

e possono essere espanse in vitro.

Ciò che rende le MSCs delle ottime candidate per la rigenerazione tissutale oltre alla capacità di autorinnovamento e alla multipotenza è la scarsa immunogenicità, infatti, tra le molecole prodotte dalle MSCs alcune hanno capacità immunosoppressiva (Siegel et al., 2009). Si è dimostrato che il medium condizionato per 24-48 ore dalle MSCs in fase di crescita è in grado di inibire il riconoscimento e la crescita delle cellule T e la loro espansione (Pittenger et al., 1999; Devine et al., 2001; Maitra et al., 2004; Beyth et al., 2005).

Inoltre le MSCs sono in grado di secernere altre molecole che contribuiscono a creare il microambiente della rigenerazione tissutale, stimolando altre cellule a partecipare alla rigenerazione (Caplan et al., 2007).

Per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto osseo, in alcuni studi MSCs derivate da midollo osseo sono state infuse tramite infusione sistemica in pazienti affetti da osteogenesi imperfecta (OI). Nonostante solo circa l'1% degli osteoblasti fossero derivate dal donatore, i pazienti trattati hanno mostrato un miglioramento delle loro condizioni con un incremento della velocità di crescita (Horwitz et al., 1999; Horwitz et al., 2002).

In un modello murino di OI è stato effettuato un trapianto intrauterino di MSCs fetali umane ottenendo un ripopolamento significativo dell'osso con riduzione delle fratture (Guillot et al., 2008). Un trapianto intrauterino di MSCs fetali è stato effettuato anche nell'uomo, in questo caso un feto con fratture multiple dovute ad OI ha ricevuto un'infusione di MSCs derivate da fegato fetale durante la trentaduesima settimana di gestazione.

Il follow-up postnatale ha dimostrato un incremento della mineralizzazione ossea e un recupero della velocità di crescita a livelli simili a quelli dei

bambini non affetti da OI (Le Blanc et al., 2005).

Approcci di terapia cellulare sono stati applicati in modelli animali di osteoporosi. I topi SAMP6 sono un modello murino di topi con invecchiamento accelerato che subiscono un'inibizione età-dipendente dell'osteoblastogenesi e dell'osteoclastogenesi ed un aumento dell'adipogenesi, mostrando un quadro simile ai pazienti affetti da osteoporosi. Topi SAMP6 irradiati hanno ricevuto un trapianto locale di cellule da midollo osseo mostrando un recupero della densità ossea, una diminuzione del riassorbimento ed un parziale recupero dei meccanismi regolatori del turnover osseo (Ichioka et al., 2002; Takada et al., 2006).

In uno studio effettuato su un modello murino di osteoporosi indotta da glucocorticoidi sono state utilizzate MSCs, ingegnerizzate per migliorare l'homing, ottenendo un recupero della massa ossea ed un parziale recupero dopo 4 settimane dal trapianto (Lien et al., 2009).

Molti gruppi hanno utilizzato le MSCs seminate su scaffold successivamente impiantati nell'osso. Per esempio, in alcuni studi pre-clinici di ingegneria tissutale nei quali sono stati coinvolti roditori, cani ed umani, MSCs derivate dal midollo osseo sono state seminate su scaffold di ceramica porosa (Liebergall et al., 1994; Bruder et al., 1998; Kon et al., 2000) e successivamente impiantati nell'osso per favorire la rigenerazione del tessuto. Altri autori hanno utilizzato MSCs derivate da midollo seminate su scaffold polimerici per la rigenerazione della cartilagine (Solchaga et al., 2005).

Ci sono diversi approcci nell'utilizzo delle MSCs associate agli scaffold negli studi di rigenerazione tissutale. Le MSCs possono essere seminate in vitro sul supporto e, dopo una breve incubazione per favorire la loro adesione, il supporto viene impiantato (Dennis et al., 1992, Dennis et al., 1998; Ohgushi

and Caplan, 1999; Solchaga et al., 2000). Un altro approccio consiste nel seminare le MSCs sul supporto, incubarlo per 7-14 giorni in medium di differenziamento osteogenico per stimolare la maturazione delle cellule verso il lineage osteogenico e successivamente impiantarle (Ohgushi et al., 1993, Ohgushi et al., 2005). Altri autori invece impiantano direttamente il supporto e successivamente le cellule in modo che la colonizzazione del supporto da parte delle cellule avvenga direttamente in vivo (Kirker et al., 2002; Park et al., 2007). Tutte queste tecniche hanno portato alla produzione di osso ben differenziato ed integrato con il tessuto residente (Kadiyala et al., 1997).

LE CALVARIAL CELLS:

Fin dagli inizi dello scorso secolo sono stati fatti dei tentativi di coltura di cellule osteogeniche da espianti di osso (Fell, 1932).

Dopo il lavoro pionieristico di Fell sono seguiti altri lavori in cui si è cercato di ottenere cellule osteogeniche capaci di formare collagene in vitro.

Molti di questi studi sono stati fatti su colture d'organo nelle quali interi frammenti d'osso erano mantenuti in coltura e successivamente analizzati istologicamente e biochimicamente. A questi studi preliminari su colture d'organo ne sono seguiti altri in cui vennero utilizzati vari metodi per isolare cellule con potenziale osteoblastico dall'osso e da altri tessuti.

Fitton-Jackson e colleghi ottennero fibroblasti da embrioni di pollo dimostrandone la capacità osteogenica, mentre Bard e colleghi isolarono cellule ossee da varie fonti, anche se non riuscirono a mantenerle in coltura per lungo tempo ed esse perdevano la capacità di mineralizzare in vitro (Bard et al., 1972).

Negli anni '70 alcuni gruppi riuscirono ad isolare da crani di ratto e di topo

una popolazione di cellule con potenziale osteogenico, che chiamarono "calvarial cells". Binderman e colleghi (1974) isolarono le calvarial cells da embrioni di ratto di 16-20 giorni, ricavandole dai surnatanti di successive digestioni con collagenasi. Lo stesso gruppo ottenne cellule anche dai surnatanti di successive digestioni del periostio. Questi ricercatori evidenziarono che le calvarial cells hanno un aspetto simile a quello dei fibroblasti durante i primi giorni in coltura, per poi acquisire un aspetto cuboidale, tipico delle cellule con potenziale osteogenico. Durante le prime fasi di coltura queste cellule sono in grado di produrre una matrice ricca in collagene che successivamente mineralizza, come evidenziato dalle colorazioni Alizarin Red e Von Kossa e dalle osservazioni al microscopio elettronico (Binderman et al., 1974).

Altri ricercatori ottennero le calvarial cells sia dalla semina delle cellule derivate da digestioni con collagenasi sia dalla messa in coltura dei crani di ratto parzialmente digeriti, osservando che queste cellule sono in grado di migrare dagli espianti verso la superficie della piastra di coltura (Gerber and Gwynn, 2001). Le calvarial cells sono una popolazione eterogenea di cellule che comprende osteoprogenitori, pre-osteoblasti, osteoblasti e fibroblasti, (Wong and Cohn, 1975; Bellows et al., 1986; Bellows and Aubin, 1989; Zohar et al., 1997). Le calvarial cells sono in grado di mineralizzare in vitro. I medium più utilizzati per indurre la mineralizzazione di cellule osteoblast-like isolate da varie specie e distretti anatomici sono il DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Ecarot-Charrier et al., 1983) o il BGJ Fitton-Jackson's modification (Binderman et al., 1974) o il Minimal Essential Medium (MEM) (Bellows et al., 1986), addizionati di 10% FCS o FBS e acido ascorbico (Wada Y. et al., 1998, Ecarot-Charrier et al., 1983). Inoltre per promuovere la mineralizzazione è necessario aggiungere fosfato inorganico

(Chung et al., 1992; Bellows et al., 1992; Marsh et al., 1995) oppure fosfato organico come il β -glicerofosfato (Fell and Robinson, 1934; Nefussi et al., 1985; Zimmerman et al., 1991; Lee et al., 1992; Chung et al., 1992; Bellows et al., 1992; Ecarot-Charrier et al., 1983).

Alcuni ricercatori, sulla base della spiccata capacità osteogenica, selezionarono una linea cellulare clonale (MC3T3-E1) derivata da calvaria di topi neonati (Sudo et al., 1983). Durante il differenziamento in vitro delle MC3T3-E1 si possono distinguere tre fasi (Aronow et al., 1990; Owen et al., 1990; Choi et al., 1996): una fase di proliferazione (fino al 10° giorno), una fase di formazione/maturazione della matrice (10°-16° giorno) e una fase di mineralizzazione (16°-30° giorno). Durante la fase di proliferazione vengono espressi i geni relativi al ciclo cellulare come gli istoni H3 e H4 e la proteina ribosomiale S6, durante la fase di formazione/maturazione della matrice vengono espressi i geni che codificano per il collagene di tipo 1 (COL1A1), per l'osteonectina (ON o SPARC), per la fibronectina e per il TGF- β . Questi geni raggiungono il massimo dell'espressione attorno al 16° giorno di coltura. Durante la fase di mineralizzazione l'osteonectina continua ad essere espressa ed inizia l'espressione dell'osteocalcina (OC) che raggiunge il massimo il 28° giorno. La fase di formazione/maturazione della matrice si caratterizza anche per un aumento dell'attività della fosfatasi alcalina che raggiunge il massimo il 10° giorno per poi decrescere e mantenersi poco sopra i livelli basali, mentre la fase di mineralizzazione si distingue per la comparsa di noduli di mineralizzazione Alizarin Red positivi (Choi et al., 1996). Anche nelle colture primarie di calvarial cells di ratto si distinguono le tre fasi della linea MC3T3-E1 (Lynch et al., 1995, Stein and Lian, 1993; Aronow et al., 1990; Owen et al., 1990), anche se i picchi di espressione massima di alcuni geni non coincidono tra i due sistemi cellulari.

SCOPO DELLA TESI

Le attuali terapie per la cura dell'osteoporosi, compresa quella secondaria, sono basate sulla somministrazione di farmaci anti-riassorbimento o che stimolano la formazione ossea, tuttavia questi approcci non mirano alla risoluzione della causa della patologia.

La terapia cellulare con cellule staminali o progenitori rappresenta una promettente alternativa alle terapie farmacologiche perché si ripropone una vera e propria ricostruzione del tessuto danneggiato che abbia come risultato il ripristino della funzionalità del tessuto.

Questa tesi ha lo scopo di valutare se possano essere utilizzate cellule staminali adulte per il ripopolamento del danno osseo da glucocorticoidi, che è la causa più diffusa di osteoporosi secondaria.

Questo lavoro, in cui è stato utilizzato un modello animale murino, rappresenta uno studio preliminare necessario per valutare la capacità di engraftment delle cellule staminali nel sito di danno osseo.

In futuro si pensa di utilizzare lo stesso modello animale sacrificando gli animali dopo un maggiore tempo dall'infusione delle cellule in modo da poter valutare non solo la capacità di engraftment ma anche quella di proliferare e differenziare in osteoblasti maturi e funzionali.

Inoltre, si prevede di provare ad infondere preosteoblasti differenziati per un certo tempo in coltura, in modo che le cellule infuse abbiano un maggiore commitment osteogenico.

Successivamente, si pensa di utilizzare un modello animale di topi immunodeficienti SCID in cui verranno infuse cellule staminali adulte umane per valutare il loro comportamento in vista di un'applicazione clinica.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari:

Le cellule (calvarial cells) sono state isolate da cranio di topo (calvarial cells) neonato C57JTG-UBC-GFP. I crani sono stati tagliati con bisturi in piccoli frammenti e sottoposti a due digestioni successive a 37°C in medium contenente 10 mg/ml di collagenasi di tipo IV-S estratta da *Clostridium histolyticum* (Sigma aldrich, Milano). I surnatanti delle digestioni sono stati scartati, i crani parzialmente digeriti sono stati messi in coltura in medium completo costituito da α -MEM (Sigma aldrich, Milano) contenente 10% di FBS (Sigma aldrich, Milano) e 1% di antibiotico-antimicotico (Sigma aldrich, Milano) in flask da 75 cm² (4 crani in ogni flask). Il medium è stato cambiato due volte a settimana.

Per le colorazioni citochimiche e le valutazioni molecolari sulle cellule differenziate, è stato addizionato al medium acido ascorbico (Sigma aldrich, Milano) e β -glicerofosfato (Sigma aldrich, Milano).

Colorazione citochimica per la fosfatasi alcalina su colture cellulari:

Le cellule derivate da cranio sono state seminate alla densità di circa 30000 cellule per pozzetto su piastra 24 wells; dopo il raggiungimento della confluenza, le cellule sono state fissate con soluzione fissante contenente formaldeide al 37% (Carlo Erba Reagents, Milano), soluzione citrata (Sigma Aldrich, Milano) e acetone (Carlo Erba Reagents, Milano).

Successivamente le cellule sono state incubate con soluzione colorante alcalina costituita da soluzione alcalina FBB (Sigma Aldrich, Milano), soluzione di nitrito di sodio (Sigma Aldrich, Milano) e soluzione alcalina di

naftol AS-BI (Sigma Aldrich, Milano). Come colorazione di contrasto è stato utilizzato rosso neutro (Sigma Aldrich, Milano).

Colorazione citochimica per depositi di calcio (Alizarin Red) su colture cellulari:

Per la valutazione della capacità di mineralizzazione della matrice le cellule sono state seminate alla densità di circa 10^5 cellule per pozzetto su piastra 6 wells, al 70% di confluenza il medium completo è stato sostituito con medium di differenziamento. Dopo 30 giorni le cellule sono state fissate con 10% di formaldeide e successivamente incubate con una soluzione di Alizarin red S 2% a pH 4.2 (Sigma Aldrich, Milano).

Le cellule sono state osservate al microscopio ottico per individuare i nuclei di mineralizzazione costituiti da precipitati di calcio-fosfato, riconoscibili come noduli rossi.

Colorazione citochimica per depositi di fosfato (Von Kossa) su colture cellulari:

Per la valutazione della capacità di mineralizzazione della matrice oltre all'Alizarin Red è stata effettuata una colorazione Von Kossa.

Le cellule sono state seminate su vetrino coprioggetto (VWM International, Milano) alla densità di 15.000 cellule/cm², al 70% di confluenza il medium è stato sostituito con medium di differenziamento. Dopo 30 giorni le cellule sono state fissate con una soluzione al 4% di formaldeide (Carlo Erba Reagents, Milano) a pH 6.9. Le cellule fissate sono state incubate con una soluzione contenente 5% di nitrato d'argento (Sigma aldrich, Milano) e successivamente con una soluzione di formaldeide e bicarbonato di sodio (Na₂CO₃) (Sigma aldrich, Milano). Successivamente le cellule sono state

incubate con una soluzione colorante contenente 1 parte di soluzione al 10% di $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ (Sigma aldrich, Milano) e 9 parti di una soluzione al 10% di tiosolfato di sodio (MERK, Milano). I vetrini coprioggetto sono stati sottoposti a disidratazione in una serie di soluzioni con percentuale crescente di etanolo (Carlo Erba Reagents, Milano) e montati con balsamo del Canada (Carlo Erba Reagents, Milano). Le cellule sono state osservate al microscopio ottico per individuare i nuclei di mineralizzazione costituiti da precipitati di calcio-fosfato, riconoscibili come noduli marrone scuro-neri.

Real time PCR su cellule:

L'analisi di Real time PCR è stata condotta su cellule non differenziate, su cellule differenziate per 19 giorni e su cellule differenziate per 30 giorni.

Le cellule sono state staccate dalla piastra di coltura dopo trattamento con soluzione 0.25% tripsina-EDTA (Sigma aldrich, Milano), il pellet di cellule ottenuto dopo centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti è stato congelato a $-80^{\circ}C$. L'RNA è stato estratto con RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milano) con trattamento con DNasi I (RNase free DNase Set, Qiagen, Milano).

L'RNA è stato stoccato a $-80^{\circ}C$. La quantità e la purezza dell'RNA sono state analizzate misurando l'assorbanza a 260 nm e 280 nm con spettrofotometro (BioPhotometer Eppendorf, Italia). Sono stati considerati puri i campioni con un rapporto 260/280 tra 1.8-2.0. L'integrità dell'RNA è stata analizzata con Bioanalyser (Bioanalyser 2100 Agilent, Italia).

L'RNA è stato retrotrascritto (Gene Amp PCR system 2004, Perkin Elmer, Monza) in cDNA con (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Applied Biosystems, Milano). Il cDNA è stato stoccato a $-20^{\circ}C$.

Per l'analisi di Real time PCR è stata utilizzata la tecnica di quantizzazione

relativa con metodo $\Delta\Delta C_t$. Lo strumento utilizzato per effettuare gli esperimenti di Real time PCR è StepONE™ (Applied Biosystems, Milano).

La PCR è stata realizzata in un volume totale di 20 μ l contenenti 10 μ l di TaqMan Gene Expression Master Mix (2X, Applied Biosystems, Milano), 1 μ l di TaqMan Gene Expression Assay [TaqMan Assays-on-Demand Gene Expression Products 20X (RUNX2: Mm00501584_m1); Applied Biosystems, Milano] o 1 μ l di TaqMan Endogenous Control [TaqMan Pre-developed Assay Reagents 20X (beta-actina: mouse ACTB); Applied Biosystems, Milano] e 9 μ l di cDNA alla concentrazione totale di 20 ng. Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. Ogni campione è stato analizzato in triplo, e per normalizzare l'espressione è stato utilizzato come controllo endogeno il gene housekeeping beta-actina (ACTB).

Come campione calibratore di riferimento è stato utilizzato un campione proveniente da cellule non differenziate. Ogni esperimento è stato realizzato in triplo.

Modello sperimentale di danno osseo da glucocorticoidi:

Topi maschi C57BL/6 di 3 mesi di vita del peso di circa 25g sono stati divisi in 3 gruppi sperimentali:

1. Gruppo I (n=4): topi non trattati con farmaco e non infusi con cellule;
2. Gruppo II (n=4): topi trattati con farmaco non infusi con cellule;
3. Gruppo III (n=4): topi trattati con farmaco ed infusi con cellule.

I topi trattati con farmaco hanno ricevuto tramite iniezione sottocutanea una dose di glucocorticoide (Urbason solubile: 20 mg/ml metilprednisolone emisuccinato, Sanofi Aventis, Milano) di 75 mg/kg alla settimana per un mese. I topi non trattati con farmaco hanno ricevuto soluzione fisiologica.

I topi appartenenti al gruppo III hanno ricevuto l'infusione di 5×10^5 "calvarial cells" derivate dai crani di topi neonati GFP attraverso la vena della coda, dopo una settimana dalla sospensione del trattamento con farmaco. Dopo una settimana dall'infusione delle cellule i topi sono stati sacrificati con dislocazione cervicale. Una parte delle tibie e dei femori è stata raccolta, posta in RNA later overnight (Qiagen, Milano) e stoccata a -80°C per la successiva estrazione dell'RNA ed analisi di Real time PCR.

Una parte è stata posta in etanolo 70% per la successiva inclusione in metilmetacrilato ed analisi istomorfometrica. Una parte è stata inclusa in OCT (Gentaur, Milano), congelata in azoto liquido e stoccata a -80°C per l'analisi immunohistochimica.

Real time PCR su campioni di tessuto:

Dai campioni di tibia e femore stoccati a -80°C è stato estratto l'RNA che è stato analizzato per la purezza, l'integrità e retrotrascritto. Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per l'analisi di Real time PCR come precedentemente descritto. TaqMan Gene Expression Assay [TaqMan Assays-on-Demand Gene Expression Products 20X (RUNX2: Mm00501584_m1; SPARC: Mm00486332; ALP: Mm01187117_m1); Applied Biosystems, Milano]. TaqMan Endogenous Control [TaqMan Pre-developed Assay Reagents 20X (beta-actina: mouse ACTB, Applied Biosystems, Milano)]. Ogni campione è stato analizzato in triplo, per normalizzare l'espressione è stato utilizzato come controllo endogeno il gene housekeeping beta-actina. Come campioni calibratori di riferimento sono stati utilizzati i campioni derivati dai topi appartenenti al gruppo I. Ogni esperimento è stato realizzato in triplo.

Analisi Istomorfometrica e di microarchitettura ossea:

I femori e le tibie stoccati in etanolo 70% sono stati trasferiti successivamente in etanolo assoluto (Carlo Erba Reagents reagents, Milano), in toluene (Carlo Erba Reagents, Milano), in metil-metacrilato (Merk, Milano), in metil-metacrilato contenente 1% di benzoile perossido (Merk, Milano) ed infine in metil-metacrilato contenente 2% di benzoile perossido ottenendo la completa inclusione dei campioni in metil-metacrilato. Sono state fatte delle sezioni dei campioni al microtomo e queste sono state sottoposte a colorazione tricromica di Goldner che prevede incubazioni successive con i seguenti coloranti: ematossilina di Weigert ottenuta miscelando ematossilina (Carlo Erba Reagents, Milano) e cloruro di ferro (Carlo Erba Reagents, Milano), fucsina acida/ponceau S (Carlo Erba Reagents, Milano), arancio G (Carlo Erba Reagents, Milano) e verde luce (Carlo Erba Reagents, Milano). Dopo disidratazione in etanolo assoluto i vetrini sono stati montati con Entellan (Merk, Milano).

I tessuti calcificati risultano essere colorati in verde, gli osteoidi e le cellule in rosso. I vetrini così ottenuti sono stati analizzati per i parametri di istomorfometria e microarchitettura ossea. Le misurazioni sono state effettuate con un microscopio ad epifluorescenza (Leica DMR, Leica Microsystems, Germany) connesso ad una CCD camera (Sony DXC 390P; Sony, Japan) ed un computer dotato di software per analisi istomorfometriche (Bone 3.1, Explora Nova, La Rochelle, France).

Sono stati valutati i seguenti parametri: (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, O.Th, OS/BS, OV/BV, Osteoblast Surface/Bone Surface, Osteoclast Surface/Bone Surface, ES/BS, Nd.N/TV, Nd/Tm).

Immunoistochimica:

I campioni per l'immunoistochimica non sono stati ancora analizzati.

Analisi statistica:

I risultati sono stati espressi come media \pm DS, la significatività è stata valutata con test ANOVA considerando significativi valori di p inferiori a 0.05. Le differenze tra i gruppi con $p < 0.05$ sono state testate con Bonferroni *Post-hoc* test. Le analisi statistiche sono state effettuate con il pacchetto SAS (GLM procedure; SAS Institute 2004).

RISULTATI

Le calvarial cells, derivate da cranio di topi neonati, presentano una morfologia di tipo fibroblastico durante i primi giorni di coltura (fig. 1A), successivamente, alla confluenza, le cellule acquisiscono una morfologia cuboidale tipica dei preosteoblasti (fig. 1B).

Durante i primi giorni di coltura si osserva una rilevante attività della fosfatasi alcalina come dimostrato dalla colorazione istochimica che evidenzia i siti di attività dell'enzima colorando le cellule di colore blu-viola (fig. 2A). L'attività dell'enzima decresce con il differenziamento (fig. 2B).

Le colture di calvarial cells sottoposte allo stimolo di differenziamento per 30 giorni sono positive alla colorazione Alizarin Red per i depositi di calcio, come evidenziato dalla presenza di nuclei di colore rosso nella matrice (fig. 3A). Inoltre le colture sono positive anche alla colorazione Von Kossa per i depositi di fosfato, come dimostrato dalla presenza di nuclei di colore marrone-nero (fig. 3B).

L'espressione del gene Runx2 aumenta durante il differenziamento, in particolare è significativo l'aumento nelle cellule differenziate per 30 giorni rispetto alle cellule non differenziate (+50%, $p < 0.05$) (grafico 1).

L'inoculazione di preosteoblasti nei topi del gruppo III ha evidenziato un aumento dei parametri relativi all'osteoidi rispetto al gruppo II, con incremento dello spessore (O.Th), superficie (OS/BS) e volume (OV/BV) (tabella 1). Inoltre, si è osservato un aumento del numero di osteoblasti attivi, cioè in corso di deposizione di osteoidi, nelle sezioni esaminate.

Non si sono osservate, invece, variazioni significative in termini di volume osseo (BV/TV), spessore trabecolare (Tb.Th) numero delle trabecole (Tb.N) e separazione fra esse (Tb.Sp) (tabella 1).

Non sono state rilevate, inoltre, differenze in termini di microarchitettura, espresso come numero di nodi (Nd.N/TV) e rapporto tra nodi e termini (Nd/Tm). Risultati simili sono emersi dalla valutazione dei parametri indiretti di microarchitettura (Marrow Star Volume e Fractal Dimension).

L'espressione genica ha dimostrato che nel gruppo II si ha una riduzione dell'espressione dei geni osteogenici rispetto al gruppo I (ALP: -50%, $p < 0.01$; Runx2: -56.75%, $p < 0.01$; SPARC: -44.5%, $p < 0.05$) (grafici 2, 3, 4).

Nel gruppo di topi del gruppo III si è avuto un recupero dell'espressione dei geni rispetto al gruppo II (ALP: +40%, $p < 0.05$; Runx2: +66.28%, $p < 0.001$; SPARC: +55%, $p < 0.01$) (grafici 2, 3, 4).

I campioni di tessuto per l'immunoistochimica devono essere processati.

DISCUSSIONE

L'osteoporosi sia nelle forme primarie che nelle forme secondarie è attualmente trattata con terapia farmacologica con farmaci che diminuiscono il tasso di riassorbimento osseo o che stimolano la sintesi di nuovo osso. Nel caso dell'osteoporosi secondaria indotta da trattamento a lungo termine con glucocorticoidi i farmaci più utilizzati sono i bisfosfonati. Tuttavia questi farmaci anti-riassorbimento osseo, pur riducendo il rischio di frattura, spesso non riescono a ripristinare la massa ossea e la resistenza dell'osso (Lien et al., 2009). La terapia cellulare potrebbe rappresentare un'alternativa alle terapie convenzionali.

La morfologia delle cellule da noi isolate è in accordo con le osservazioni presenti in letteratura in cui diversi gruppi di ricerca hanno descritto le calvarial cells come cellule aventi un aspetto fibroblastico durante i primi giorni di coltura e che successivamente acquisiscono l'aspetto cuboidale tipico delle cellule con potenziale osteogenico (Binderman et al., 1974, Sudo et al., 1983).

Durante i primi giorni di coltura in medium normale le cellule sono positive alla fosfatasi alcalina, come da noi dimostrato dalla colorazione istochimica specifica per questo enzima, la positività diminuisce in medium differenziante. Questo dato è in accordo con i dati relativi alle calvarial cells presenti in letteratura (Choi et al. 1996; Lynch et al., 1995).

Dai risultati delle colorazioni citochimiche Alizarin Red e Von Kossa da noi effettuate si evidenzia che le calvarial cells, sottoposte allo stimolo di differenziamento verso il lineage osteoblastico per 30 giorni, sono in grado di mineralizzare, ovvero di depositare noduli di calcio-fosfato, caratteristica

tipica degli osteoblasti maturi. In letteratura altri gruppi hanno constatato che le calvarial cells mineralizzano dopo un mese in medium differenziante contenente β -glicerofosfato e acido ascorbico (Wada Y. et al., 1998, Ecarot-Charrier et al., 1983).

Si è riscontrato un aumento dell'espressione di Runx2 nelle cellule sottoposte a differenziamento. Runx2 è un fattore fondamentale per dare inizio al differenziamento osteogenico, tuttavia inibisce la completa maturazione dei preosteoblasti in osteoblasti (Komori et al., 2006).

Da questi dati preliminari sull'espressione genica delle calvarial cells in coltura e dai dati relativi alle colorazioni citochimiche per la fosfatasi alcalina e per i depositi di calcio-fosfato possiamo concludere che le calvarial cells si differenziano acquisendo caratteristiche tipiche degli osteoblasti, tuttavia probabilmente mantengono ancora un certo grado di immaturità. Per verificare il grado di differenziamento delle calvarial cells sottoposte a stimoli osteogenici, i dati di espressione genica andranno integrati in futuro con indagini sull'espressione di altri markers osteogenici più tardivi.

Per quanto riguarda il modello in vivo si è riscontrato un aumento dei parametri relativi all'osteoidi nei topi del gruppo III rispetto ai topi del gruppo II, suggerendo che i preosteoblasti iniettati abbiano raggiunto il sito di danno osseo, l'abbiano ripopolato differenziando in osteoblasti e che questi abbiano cominciato a depositare nuovo osteoidi.

Una spiegazione al fatto di non aver riscontrato significative differenze negli altri parametri di istomorfometria come il volume osseo, lo spessore trabecolare, il numero delle trabecole e dei parametri di microarchitettura ossea, può essere la brevità del periodo trascorso tra l'infusione delle cellule ed il sacrificio degli animali. I preosteoblasti, quindi, hanno

probabilmente avuto il tempo di differenziare in osteoblasti e cominciare a deporre nuovo osteoide ma non hanno avuto il tempo per determinare un consistente aumento del volume osseo, dello spessore e del numero delle trabecole.

La riduzione dei geni Runx2, osteonectina e fosfatasi alcalina nei topi appartenenti al gruppo II rispetto al gruppo I dimostra l'efficacia del trattamento con glucocorticoide nel provocare danno osseo.

Il recupero dell'espressione genica nei topi del gruppo III rispetto ai topi del gruppo II sembra confermare il ripopolamento del tessuto osseo danneggiato da parte delle cellule staminali nei topi infusi con cellule.

Il ripopolamento deve essere confermato dall'analisi immunohistochimica.

In conclusione i risultati di questo studio, condotto in un modello murino, suggeriscono che i preosteoblasti abbiano capacità di engraftment nel sito di danno osseo indotto con somministrazione di glucocorticoidi.

Un simile modello potrebbe teoricamente essere trasferito nella pratica clinica per indurre la colonizzazione del tessuto osseo danneggiato in pazienti che abbiano ricevuto una terapia a lungo termine con glucocorticoidi. Questo modello rappresenta uno studio preliminare che costituisce il punto di partenza per studi successivi che prevedono innanzitutto un maggiore tempo di attesa prima del sacrificio dell'animale in modo da poter valutare la capacità di proliferazione e di differenziamento in osteoblasti maturi e funzionali da parte delle cellule staminali inoculate. Inoltre, in questo studio, sono stati trapiantati preosteoblasti non differenziati, in futuro, si prevede di infondere negli animali preosteoblasti sottoposti per un certo tempo a differenziamento osteogenico per verificare se sia più opportuno utilizzare cellule immature o cellule che abbiano un maggiore commitment osteogenico.

FIGURE, GRAFICI E TABELLE

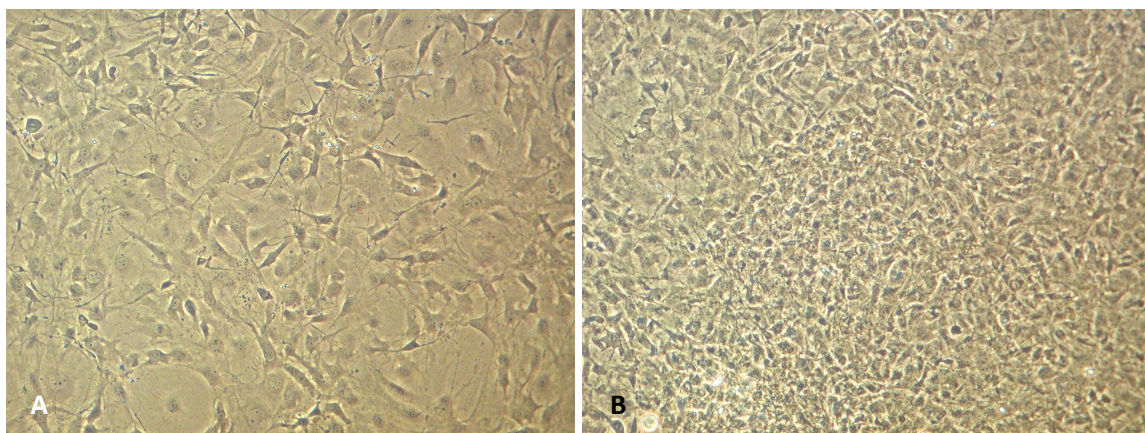


Fig. 1: immagini al microscopio ottico. A) calvarial cells nei primi giorni in coltura (ingrandimento: 20X). B) calvarial cells a confluenza (ingrandimento: 10X).

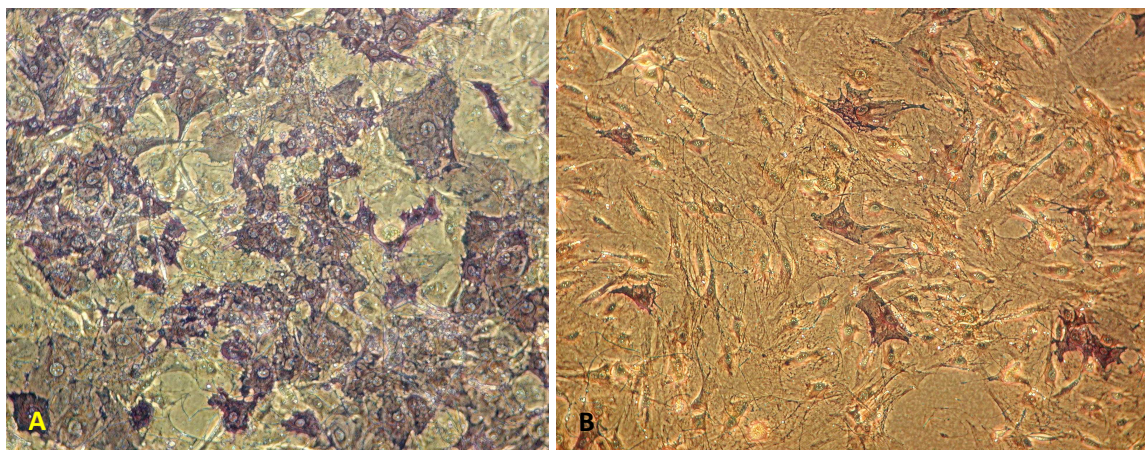


Fig. 2: immagini al microscopio ottico. A) colorazione citochimica per fosfatasi alcalina di calvarial cells nei primi giorni in coltura (ingrandimento: 10X). B) colorazione citochimica per fosfatasi alcalina di calvarial cells in differenziamento (ingrandimento: 10X).

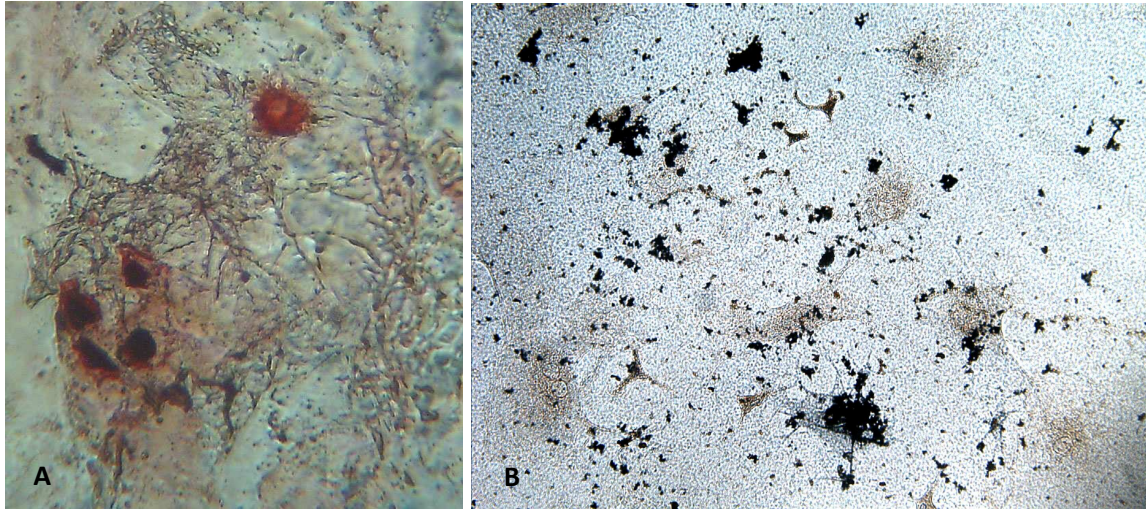


Fig. 3: immagini al microscopio ottico. A) colorazione citochimica Alizarin Red (ingrandimento: 20X). B) colorazione citochimica Von Kossa (ingrandimento: 20X).

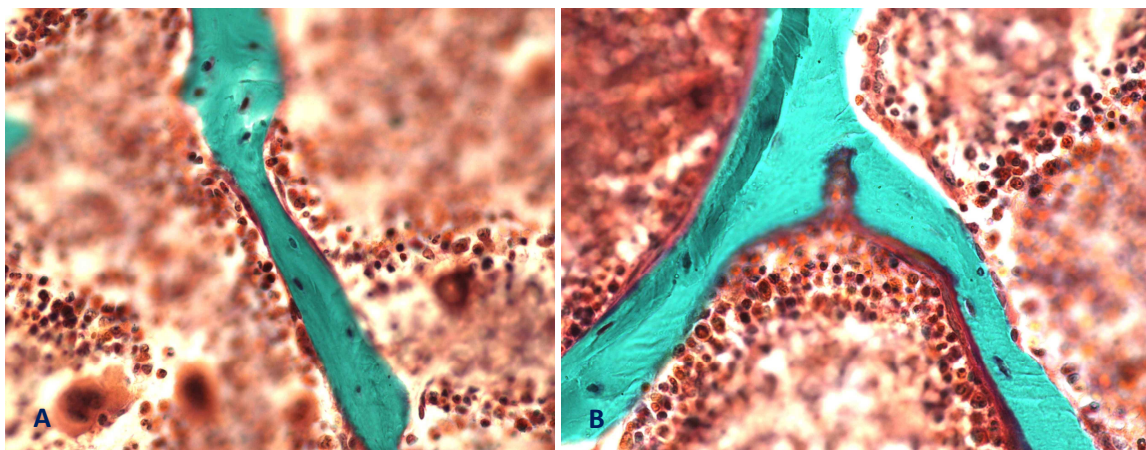


Fig. 4: immagini di sezione istologiche di tibia. Colorazione tricromica di Goldner su sezioni di tessuto osseo. In verde sono visibili le trabecole ossee, in rosso la matrice osteoide e le cellule. Ingrandimento 10X. A) sezione di tessuto osseo di topo appartenente al gruppo II. B) sezione di tessuto osseo da topo appartenente al gruppo III.

Parametri di istomorfometria ossea	Gruppo II	Gruppo III
Bone Volume/Tissue Volume (%)	18.6±1.1	19.2±1.4
Trabecular Thickness (µm)	39.3±1.2	41.1±1.4
Trabecular Number (N/mm)	3.4±0.3	3.6±0.2
Trabecular Separation (µm)	252±4	249±5
Osteoid Thickness (mm)	2.6±0.3	4.3±0.2***
Osteoid Surface/Bone Surface (%)	1.1±0.4	3.4±0.2***
Osteoid Volume/Bone Volume (%)	11±3	21±2***
Osteoblast Surface/Bone Surface (%)	3.3±0.9	5.8±0.5***
Eroded Surface/Bone Surface (%)	2.4±1.2	1.9±0.7
Osteoclast Surface/Bone Surface (%)	1.6±1.5	1.7±1.1

Tabella 1:

Istomorfometria e microarchitettura ossea. Confronto tra topi appartenenti al gruppo II e topi appartenenti al gruppo III.

***: $p < 0.001$

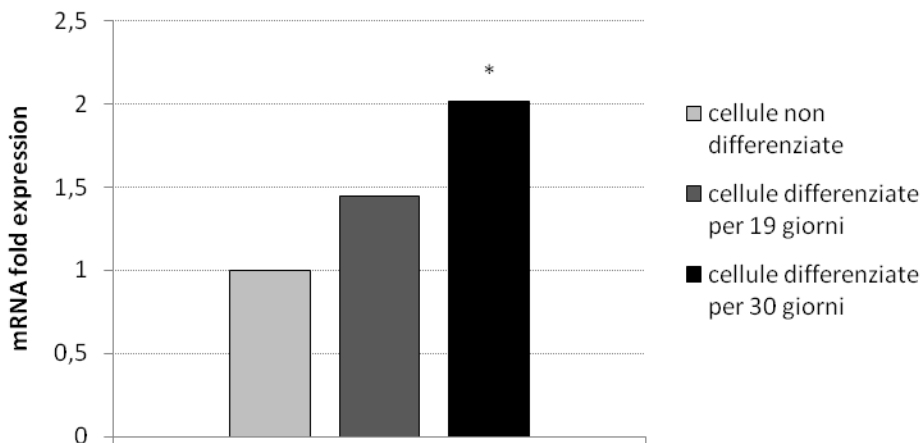


Grafico 1: Espressione genica di Runx2 nelle colture cellulari.

*: $p < 0.05$ cellule differenziate per 30 giorni vs cellule non differenziate.

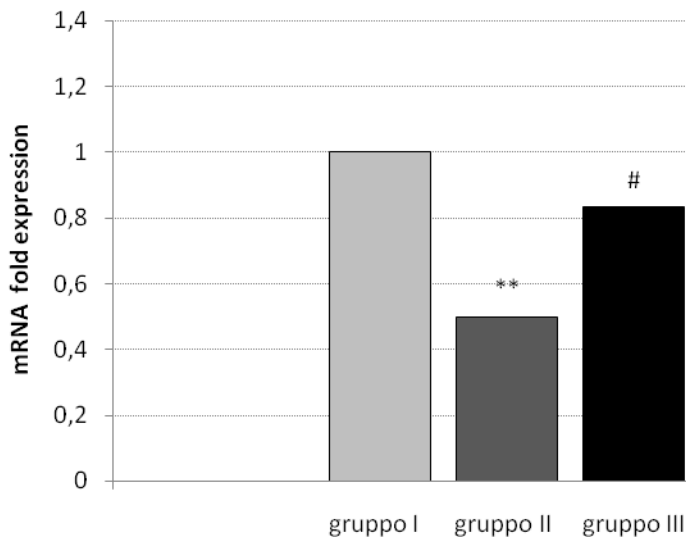


Grafico 2: Espressione genica di ALP (fosfatasi alcalina) nei campioni di tessuto osseo.

** : $p < 0.01$ gruppo II vs gruppo I.

: $p < 0.05$ gruppo III vs gruppo II.

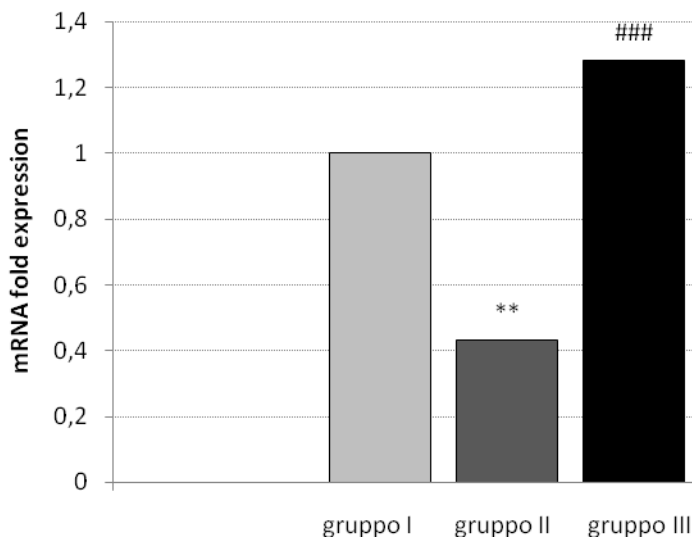


Grafico 3: Espressione genica di Runx2 nei campioni di tessuto osseo.

** : $p < 0.01$ gruppo II vs gruppo I.

: $p < 0.001$ gruppo III vs gruppo II.

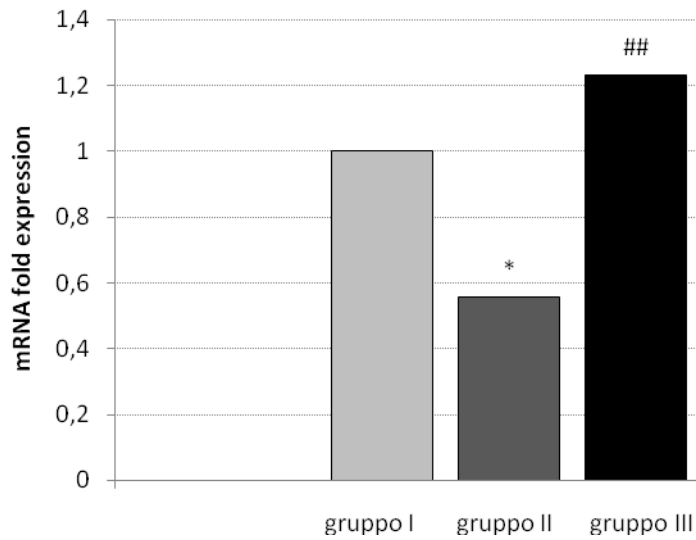


Grafico 4: Espressione genica di SPARC (osteonectina) nei campioni di tessuto osseo.

*: $p < 0.05$ gruppo II vs gruppo I.

##: $p < 0.01$ gruppo III vs gruppo II.

BIBLIOGRAFIA

- Adachi JD, Bensen WG, Bell MJ, Bianchi FA, Cividino AA, Craig GL, Sturtridge WC, Sebaldt RJ, Steele M, Gordon M, Themeles E, Tugwell P, Roberts R, Gent M. Salmon calcitonin nasal spray in the prevention of corticosteroid-induced osteoporosis. *Br J Rheumatol.* 1997 Feb;36(2):255-9.
- Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol.* 1990 May;143(2):213-21.
- Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Mar 1;72(3):396-410.
- Bard DR, Dickens MJ, Smith AU, Zarek JM. Isolation of living cells from mature mammalian bone. *Nature.* 1972 Apr 7;236(5345):314-5.
- Baxter JD. Advances in glucocorticoid therapy. *Adv Intern Med.* 2000;45:317-49.
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.* 1986 Mar;38(3):143-54.
- Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev Biol.* 1989 May;133(1):8-13.
- Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of

- osteoid nodules in vitro. *Bone Miner.* 1992 Apr;17(1):15-29.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):2214-9.
- Binderman I, Duksin D, Harell A, Katzir E, Sachs L. Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. *J Cell Biol.* 1974 May;61(2):427-39.
- Boling EP. Secondary osteoporosis: underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Ther.* 2004 Jan;26(1):1-14.
- Borchard RE, Barnes CD, Eltherington LG. Drug dosage in laboratory animals: a handbook. 1992 CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 514-517.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):337-42.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic et al. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):278-94.
- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. 1998. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998 Jul;80(7):985-96.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001 Oct 15;98(8):2396-402.
- Caplan et al., 2007. Adult Mesenchymal Stem Cells for tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *J Cell Physiol* 2007 Nov;213(2):341-7.
- Chavassieux P, Buffet A, Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ. Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes.

- Bone. 1997 May;20(5):451-5.
- Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, Jo JS, Ryoo HM. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 1996 Jun 15;61(4):609-18.
- Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int.* 1992 Oct;51(4):305-11.
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Nov;3 Suppl 3:S131-9.
- Cohen S, Levy RM, Keller M, Boling E, Emkey RD, Greenwald M, Zizic TM, Wallach S, Sewell KL, Lukert BP, Axelrod DW, Chines AA. Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum.* 1999 Nov;42(11):2309-18.
- Dalle Carbonare L, Bertoldo F, Valenti MT, Zordan S, Sella S, Fassina A, Turco G, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S. Risedronate prevents the loss of microarchitecture in glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *J Endocrinol Invest.* 2007 Oct;30(9):739-46.
- De Bie JJ, Hessel EM, Van Ark I, Van Esch B, Hofman G, Nijkamp FP, Van Oosterhout AJ. Effect of dexamethasone and endogenous corticosterone on airway hyperresponsiveness and eosinophilia in the mouse. *Br J Pharmacol.* 1996 Dec;119(7):1484-90.
- Delany AM, Durant D, Canalis E. Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol.* 2001 Oct;15(10):1781-9.
- Deloffre P, Hans D, Rumelhart C, Mitton D, Tsouderos Y, Meunier PJ. Comparison between bone-density and bone strength in

- glucocorticoid-treated aged ewes. *Bone*. 1995 Oct;17(4 Suppl):409S-414S.
- Dempster DW. Bone remodeling. 2002. In: Coe FL, Favus MJ (eds) Disorders of bone mineral metabolism, 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, 315-343.
- Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: Effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant*. 1992;1(1):23-32.
- Dennis JE, Konstantakos EK, Arm D, Caplan AI. In vivo osteogenesis assay: a rapid method for quantitative analysis. *Biomaterials*. 1998 Aug;19(15):1323-8.
- Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*. 2001 Feb;29(2):244-55.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54.
- Ecarot-Charrier B, Glorieux F H, Van Der Rest M, Pereira G. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol*. 1983 Mar;96(3):639-43.

- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000 Apr;109(1):235-42.
- Feish H. Bone and mineral metabolism. 2000. In *Biphosphonates in bone disease*. Eds Academic Press, San Diego, California, USA, 1-26.
- Fell HB, Robison R. The development of the calcifying mechanism in avian cartilage and osteoid tissue. *Biochem J.* 1934;28(6):2243-53.
- Fell HB. The osteogenic capacity in vitro of periosteum and endosteum isolated from the limb skeleton of fowl embryos and young chicks. *J Anat.* 1932 Jan;66(Pt 2):157-180.11.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.
- Fitzpatrick LA. Glucocorticoid-induced osteoporosis. In *Osteoporosis*. R. Marcus editor. 1994. Blackwell Scientific Publications, Boston, MA. 202-226.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230-47.
- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyanyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 2005 Sep 30;280(39):33132-40. Epub 2005 Jul 25.
- Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol Cell Biol.* 2002 Sep;22(17):6222-33.

- Gerber I, ap Gwynn I. Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro. *Eur Cell Mater.* 2001 Jul 24;2:10-20.
- Gore AC, Attardi B, DeFranco DB. Glucocorticoid repression of the reproductive axis: effects on GnRH and gonadotropin subunit mRNA levels. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Aug 15;256(1-2):40-8.
- Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Jan;(262):298-311.
- Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguiet E, Lavaste F, Hardouin P. Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. *Osteoporos Int.* 1994 Jul;4(4):204-10.
- Graves DT, Jiang Y, Valente AJ. The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts. *Front Biosci.* 1999 Jul 1;4:D571-80.
- Guillot PV, Abass O, Bassett JH, Shefelbine SJ, Bou-Gharios G, Chan J, Kurata H, Williams GR, Polak J, Fisk NM. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood.* 2008 Feb 1; 111(3):1717-25.
- Herrmann M, Henneicke H, Street J, Modzelewski J, Kalak R, Buttgerit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ. The challenge of continuous exogenous glucocorticoid administration in mice. *Steroids.* 2009 Feb;74(2):245-9.
- Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS. Bone recognition mechanism of

- porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*. 2003 Oct 30;425(6961):977-80.
- Hofbauer LC, Zeitz U, Schoppet M, Skalicky M, Schüler C, Stolina M, Kostenuik PJ, Erben RG. Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. *Arthritis Rheum*. 2009 May;60(5):1427-37.
- Holroyd C, Cooper C, Dennison E. Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;22(5):671-85.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogenic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8932-7.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999 Mar;5(3):309-13.
- Hunter GK and Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J*. 1994 August 15; 302(Pt 1): 175–179.
- Ichioka N, Inaba M, Kushida T, Esumi T, Takahara K, Inaba K, Ogawa R, Iida H, Ikehara S. Prevention of senile osteoporosis in samp6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem Cells*. 2002;20(6):542-51.
- Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M,

- Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn*. 1999 Apr;214(4):279-90.
- Jethva R, Otsuru S, Dominici M, Horwitz EM. Cell Therapy for disorders of bone. *Cytotherapy*. 2009;11(1):3-17.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002 Aug;30(8):896-904.
- Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng*. 1997;3:173–185.
- Kawai K, Tamaki A, Hirohata K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am*. 1985 Jun;67(5):755-63.
- Kimmel DB. Quantitative histologic changes in the proximal tibial growth cartilage of aged female rats. *Scanning Microsc* 1991, suppl 1:11-8.
- Kirker KR, Luo Y, Nielson JH, Shelby J, Prestwich GD. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. *Biomaterials*. 2002 Sep;23(17):3661-71.
- Kleiber M. *The fire of life: an introduction to animal energetics*. 1961. John Wiley and Sons, Inc., New York. 177-230.
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(2):307-16.

- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997 May 30;89(5):755-64.
- Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 2006 Dec 1;99(5):1233-9.
- Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem*. 2005 Jun 1;95(3):445-53.
- Kon E; Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerated bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. 2000 Mar 5;49(3):328-37.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10711-6.
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9.
- Kuroki Y, Kaji H, Kawano S, Kanda F, Takai Y, Kajikawa M, Sugimoto T. Short-term effects of glucocorticoid therapy on biochemical markers of bone metabolism in Japanese patients: a prospective study. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(3):271-8.
- Le Blanc K, Götherström C, Ringdén O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E,

- Anneren G, Axelsson O, Nunn J, Ewald U, Nordén-Lindeberg S, Jansson M, Dalton A, Aström E, Westgren M. Fetal mesenchymal stem cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfect. *Transplantation*. 2005 Jun 15;79(11):1607-14.
- Lee KL, Aubin JE, Heersche JN. beta-Glycerophosphate-induced mineralization of osteoid does not alter expression of extracellular matrix components in fetal rat calvarial cell cultures. *J Bone Miner Res*. 1992 Oct;7(10):1211-9.
- Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):33098-106.
- Li XJ, Lee WSS, Ke HZ, Mori S, Akamine T. Age-related changes of cancellous and cortical bone histomorphometry in female Sprague-Dawley rats. *Scanning Microsc* 1991, suppl 1:25-35.
- Liebergall M, Young RG, Ozawa N, Reese JH, Davy DT, Goldberg VM, Caplan AI. The effects of cellular manipulation and TGF-beta in a composite graft. In: Brighton CT, Friedlaender GE, Lane JM, editors. *Bone formation and repair*. 1993 Nov; Tampa, Florida, pp:367-378.
- Lien CY, Chih-Yuan Ho K, Lee OK, Blunn GW, Su Y. 2009. Restoration of bone mass and strength in glucocorticoid-treated mice by systemic transplantation of CXCR4 and Cbfa-1 co-expressing mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*. 2009 May;24(5):837-48.
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia

- with multiple fractures. *J Cell Biol.* 2001 Oct 1;155(1):157-66.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781-810.
- Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2001 May-Jun;27(3):677-90.
- Lukert B. Glucocorticoid-induced osteoporosis. 1996 In *Osteoporosis*. R. Marcus, D. Feldman and J. Kelsey editors. Academic Press, San Diego, CA. 801-820.
- Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res.* 1995 Jan;216(1):35-45.
- Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koç ON. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Mar;33(6):597-604.
- Man MS, Young AH, McAllister-Williams RH. Corticosterone modulation of somatodendritic 5-HT_{1A} receptor function in mice. *J Psychopharmacol.* 2002 Sep;16(3):245-52.
- Marsh ME, Munne AM, Vogel JJ, Cui Y, Franceschi RT. Mineralization of bone-like extracellular matrix in the absence of functional osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1995 Nov;10(11):1635-43.
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor

- CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*. 1997 May 30;89(5):773-9.
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):811-23.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):17-29.
- Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Boulekbache H, Forest N. Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation*. 1985;29(2):160-8.
- Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. 1995 Apr;16(4 Suppl):277S-284S.
- O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, de la Fuente J, Kumar S, Campagnoli C, Bennett PR, Roberts IA, Fisk NM. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod*. 2003 Aug;9(8):497-502.
- Ohgushi H and Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*. 1999;48(6):913-27.
- Ohgushi H, Dohi Y, Tamai S, Tabata S. Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1993 Nov;27(11):1401-7.
- Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, Takakura Y. Tissue engineered ceramic artificial joint-ex vivo

- osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*. 2005 Aug;26(22):4654-61.
- Olney RC. Mechanisms of impaired growth: effect of steroids on bone and cartilage. *Horm Res*. 2009 Nov;72 Suppl 1:30-5.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997 May 30;89(5):765-71.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990 Jun;143(3):420-30.
- Park H, Temenoff JS, Tabata Y, Caplan AI, Mikos AG. Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2007 Jul;28(21):3217-27.
- Pfeilschifter J, Mundy GR. Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Apr;84(7):2024-8.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

- Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J Bone Miner Res.* 2008 Nov;23(11):1712-21.
- Prummel MF, Wiersinga WM, Oosting H., Endert E. The effect of long term prednisone treatment on growth hormone and insulin-like growth factor-1. *J Endocrinol Invest.* 1996 Oct;19(9):620-3.
- Purpura KA, Aubin JE, Zandstra PW. Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent. *Stem Cells.* 2004;22(1):39-50.
- Quarles LD. Prednidolone-induced osteopenia in beagles: variable effects mediated by differential suppression of bone formation. *Am J Physiol.* 1992 Jul;263(1 Pt 1):E136-41.
- Rackoff PJ, Rosen CJ. Pathogenesis and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Drugs Aging.* 1998 Jun;12(6):477-84.
- Reid IR. Pathogenesis and treatment of steroid osteoporosis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1989 Jan;30(1):83-103.
- Saag KG. Low-dose corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: balancing the evidence. *Am J Med.* 1997 Dec 29;103(6A):31S-39S.
- SAS Institute Inc. SAS/STATs 9.1. User's Guide. 2004; SAS Institute Inc.: Cary.
- Siegel G, Schäfer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2009 May 15;87(9 Suppl):S45-9.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted

- protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.
- Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM. Repair of osteochondral defects with hyaluronan and polyester-based scaffolds. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Apr;13(4):297-309.
- Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huibregtse BA, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res*. 2000 Sep;18(5):773-80.
- Stanton B, Giebisch G, Klein-Robbenhaar G, Wade J, DeFronzo RA. Effects of adrenalectomy and chronic adrenal corticosteroid replacement on potassium transport in rat kidney. *J Clin Invest*. 1985 Apr;75(4):1317-26.
- Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*. 1993 Aug;14(4):424-42.
- Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*. 1983 Jan;96(1):191-8.
- Takada K, Inaba M, Ichioka N, Ueba Y, Taira M, Baba S, Mizokami T, Wang X, Hisha H, Iida H, Ikehara S. Treatment of senile osteoporosis in samp6 mice by intrabone marrow injection of allogenic bone marrow cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):399-405.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*.

1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002 Jan 1;105(1):93-8.

Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, Van der Wee-Pals L, De Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, Ten Dijke P, Löwik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*. 2004 Mar 15;199(6):805-14.

Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res*. 2000 Jun;15(6):993-1000.

Wada Y, Kataoka H, Yokose S, Ishizuya T, Miyazono K, Gao Y H, Shibasaki Y, Yamaguchi A. Changes in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells. *Bone*. 1998 May;22(5):479-85.

Wajchenberg BL, Liberman B, Giannella Neto D, Morozimato MY, Semer M, Bracco LO, Salgado LR, Knoepfelmacher M; Borges MH, Pinto AC, Kater CE, Lengyel AM. Growth hormone axis in Cushing's syndrome. *Horm Res*. 1996;45(1-2):99-107.

Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Nakamura K, Tanaka S. Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2007 Oct;22(10):1631-9.

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and

- osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*. 1998 Jul 15;102(2):274-82.
- Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001 Jan;2(1):65-73.
- Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*. 1994 Aug;15(4):439-61.
- Wong GL, Cohn DV. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different: enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Aug;72(8):3167-71.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000 Aug 15;61(4):364-70.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.
- Yao W, Cheng Z, Busse C, Pham A, Nakamura MC, Lane NE. Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis: a longitudinal study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice. *Arthritis Rheum*. 2008 Jun;58(6):1674-86.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998

Mar;139(3):1329-37.

Zaidi M, Datta HK, Patchell A, Moonga B, MacIntyre I. 'Calcium-activated' intracellular calcium elevation: a novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Sep 29;163(3):1461-5.

Zimmermann B, Wachtel HC, Noppe C. Patterns of mineralization in vitro. *Cell Tissue Res*. 1991 Mar;263(3):483-93.

Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Physiol*. 1997 Jan;170(1):88-100.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477-88.