

## Generación de células mesenquimales con potencial osteogénico mejorado genéticamente para el tratamiento de enfermedades que cursan con defectos de masa ósea

Generation of human mesenchymal cells with genetically improved osteogenic potential for treatment of bone diseases

Blanca Benito V, Abarrategi López A, García-Castro J, Alfranca González A

Área de Genética Humana, Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER-ISCIH). Majadahonda, Madrid, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

### Resumen

**Objetivo:** Generar células madre mesenquimales humanas (MSCs) modificadas para optimizar su potencial de diferenciación osteogénica, destinadas a su empleo en implantes cerámicos para regeneración ósea.

**Material y método:** Se emplearon ratones inmunodeficientes NOD/SCID (3-6 ratones por condición experimental y ensayo) y se generaron vectores lentivirales basados en la recombinasa Cre, que sobreexpresan el factor regulador del proceso osteogénico Dlx5 (o la proteína fluorescente GFP como control) de forma autolimitada en el tiempo. Estos vectores se utilizaron para transducir hMSCs, y su potencial osteogénico se analizó *in vitro* e *in vivo* en un modelo de formación de hueso heterotópico en ratón.

**Resultados:** Las hMSCs transducidas con los vectores que expresan Dlx5 de forma autolimitada fueron capaces de diferenciarse eficientemente a hueso de forma espontánea, de manera similar a las hMSCs control en presencia del factor osteoinductor BMP-2.

**Conclusión:** Hemos desarrollado un sistema de modificación de hMSCs para aumentar su potencial osteogénico que consiste en un vector lentiviral que expresa el factor osteoinductor Dlx5 de forma autolimitada. Las hMSCs modificadas diferencian a hueso de manera eficiente, tanto *in vitro* como *in vivo*.

### Palabras clave:

Células madre mesenquimales, diferenciación, terapia celular, lentivirus, Dlx5, enfermedades óseas.

### Abstract

**Objective:** This article proposes the generation of modified human mesenchymal stem cells (hMSCs) for optimizing their osteogenic differentiation potential, in order to be employed in ceramic implants for bone regeneration.

**Material and method:** We have generated lentiviral vectors based on Cre recombinase, which lead to overexpression of a regulatory factor of osteogenic process, Dlx5 (or GFP fluorescent protein as a control), in a self-limited fashion. We have transduced hMSCs with these vectors, and we have analyzed their osteogenic potential both *in vitro* and *in vivo* in a model of heterotopic bone formation in mice. For this purpose we have used immunodeficient NOD/SCID mice (3-6 mice per condition and experiment).

**Results:** hMSCs transduced with self-limited Dlx5-expressing vectors efficiently differentiate into bone *in vitro* and *in vivo*, similar to control hMSCs in the presence of osteoinductive factor BMP-2.

**Conclusion:** We have developed a system to modify hMSCs in order to improve their osteogenic potential. This system consists of a lentiviral vector which expresses osteoinductive factor Dlx5 in a self-limited fashion. Modified hMSCs efficiently differentiate into bone, both *in vitro* and *in vivo*.

### Key words:

Mesenchymal stem cells, differentiation, cell therapy, lentivirus, Dlx5, bone diseases.

---

### Correspondencia

A Alfranca González

Área de Genética Humana, Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER-ISCIH).

Crtra. Majadahonda-Pozuelo, Km 2,2. 28220 Majadahonda, Madrid, España.

E-mail: aalfranca@iscih.es

## I Introducción

El tratamiento de los defectos masivos de tejido óseo, secundarios a traumatismos, resección oncológica o malformaciones congénitas, precisa habitualmente de técnicas de reconstrucción tisular basadas en la utilización de factores plaquetarios, trasplantes de aspirados de médula ósea, prótesis sintéticas o injertos óseos autólogos o alogénicos. Dichas aproximaciones terapéuticas son en general poco eficientes, y en el caso de los injertos óseos requieren de intervenciones agresivas o de tratamientos para reducir la inmunogenicidad del injerto, que afectan a su potencial osteogénico [1]. Por este motivo, se está invirtiendo un gran esfuerzo en el desarrollo de tratamientos clínicamente aplicables destinados no solo a la reparación, sino a la regeneración tisular. En el caso del tejido óseo, se está trabajando en dos direcciones fundamentales: a) diseño de biomateriales que posean propiedades osteoconductoras u osteoinductivas adecuadas, así como una integridad estructural y una cinética de degradación óptimas, y b) empleo de estrategias que mejoren la capacidad osteoinductiva de dichos materiales, fundamentalmente mediante la incorporación al implante de factores de crecimiento osteogénicos (por ejemplo, BMP-2, FGF-2), o de células progenitoras con capacidad osteogénica (solas o en combinación con factores de crecimiento), como células madre embrionarias o células madre mesenquimales (MSCs, *mesenchymal stem cells*) [2][3]. El elevado coste económico de estos factores de crecimiento, así como la dificultad para establecer la dosis efectiva de los mismos, han llevado a modificar genéticamente las MSCs para mejorar de forma directa su potencial osteogénico. Así, MSCs modificadas para producir BMP-2 de forma autocrina se diferencian espontáneamente en cultivo, inducen formación de hueso ectópico *in vitro* y aceleran la regeneración ósea en modelos animales [4]. Igualmente, se han generado MSCs con expresión aumentada de mediadores intracelulares implicados en la diferenciación osteogénica, como Runx2 y Osterix, las cuales son capaces de incrementar significativamente la formación de hueso en modelos murinos de defectos óseos en calota [5].

Dado que con este abordaje se persigue una modificación genética estable de las MSCs, se han utilizado mayoritariamente vectores lentivirales. A pesar de que la integración genómica tras la transducción lentiviral es esencial para conseguir la expresión estable del gen de interés, es un arma de doble filo que puede contribuir a una posible transformación oncogénica. Sin embargo, los vectores lentivirales, a diferencia de los gammaretrovirales, se integran preferentemente alejados de los promotores de genes transcrip-

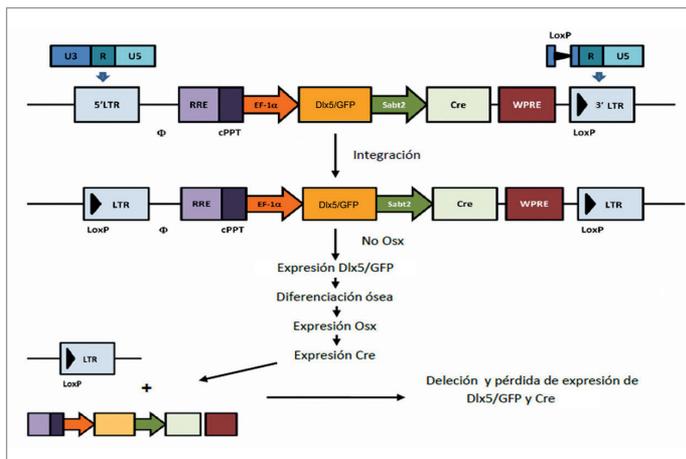
cionalmente activos [6], lo cual disminuye considerablemente la probabilidad de un efecto genotóxico. Asimismo, el diseño de vectores lentivirales inducibles, con una expresión del gen de interés limitada en el tiempo, puede contribuir a mejorar la seguridad del sistema. En este sentido, existen trabajos acerca de la utilización de MSCs que sobreexpresan BMP-2 de forma regulable por doxiciclina [7], pero no existe ningún ejemplo de MSCs modificadas con vectores lentivirales regulados endógenamente.

En este trabajo proponemos la utilización de MSCs con una modificación genética novedosa para optimizar su capacidad formadora de hueso, en combinación con implantes cerámicos desarrollados por miembros del equipo investigador [8-10]. Para ello hemos generado vectores lentivirales que codifican para reguladores maestros de la diferenciación osteogénica, como Dlx5, cuya expresión esté autolimitada de forma endógena. De esta manera, se persigue conseguir implantes para regeneración ósea: a) con un potencial osteogénico aumentado, debido a la sobreexpresión de factores como Dlx5, lo que permite obviar la utilización de factores solubles, con la variabilidad que esto conlleva; b) con un sistema de expresión limitado endógenamente, que se acerca a la regulación fisiológica del proceso de diferenciación y contribuye a mejorar la seguridad del sistema lentiviral; y c) con un coste económico reducido, ya que no se necesitan producir grandes cantidades de factores de crecimiento; asimismo, como es habitual en otras aplicaciones clínicas, se podrían utilizar MSCs alogénicas sin efectos secundarios severos, lo que permitiría estandarizar el proceso, disminuyendo considerablemente los costes de su empleo en clínica.

## I Material y método

### Generación de vectores lentivirales

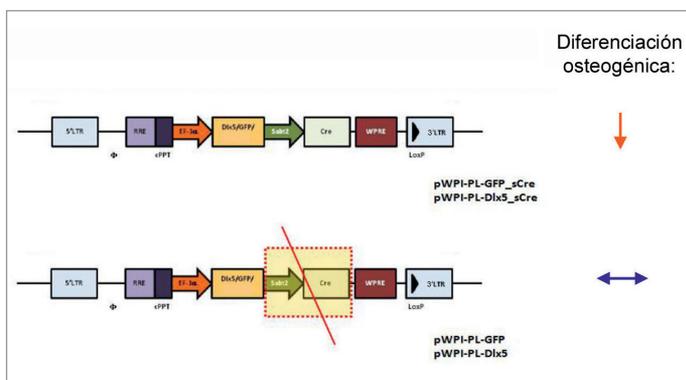
La construcción de los vectores correspondientes a Dlx5 (gen de interés) y GFP (control negativo) se realizó en varias fases (Figura 1). En primer lugar, se eliminó el casete ECMV-IRES+GFP del plásmido pWPI (Addgene), con objeto de poder clonar posteriormente los cDNAs de Dlx5 y GFP, seguidos del promotor de *Satb2* y el cDNA de *Cre*. Luego se introdujo en la construcción el cDNA de Dlx5, obtenido mediante amplificación por PCR utilizando como plásmido de partida el vector de expresión de Dlx5 cedido por el Dr. Joseph Testa (The Research Institute of Fox Chase Cancer Center, Pensilvania, EE UU) (pWPI-PL-DLX5). A continuación, se introdujo el cDNA de la proteína fluorescente GFP a partir del plásmido pHRSIN-CSGW-dlNotI (cedido por el Dr. JA Pintor, CABIMER, Sevilla) (pWPI-PL-GFP)



**Fig. 1.** Diseño de los vectores lentivirales empleados en el estudio y estrategia de expresión autolimitada del transgén.

y, por último, en los plásmidos pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-GFP se introdujo un fragmento del promotor de Satb2, amplificado mediante PCR a partir de DNA genómico de ratón, seguido del cDNA de Cre, obtenido por PCR partiendo de un plásmido previamente generado en el laboratorio (pHRSIN-Cre). De esa manera se obtuvieron los plásmidos pWPI-PL-DLX5-SCre y pWPI-PL-GFP-SCre. Las enzimas de restricción se adquirieron en New England Biolabs, y los oligonucleótidos empleados en las PCRs son de Sigma.

Para los distintos ensayos se emplearon los vectores lentivirales de pWPI-PL-GFP, pWPI-PL-GFP-SCre, pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-DLX5-SCre (Figura 2). Las partículas virales se produjeron mediante técnicas estándar de transfección con fosfato cálcico de células HEK-293T, de cada uno de estos vectores junto con los plásmidos Helper 8.9 y VSVg (Addgene). Después de 48 horas, los sobrenadantes



**Fig. 2.** Vectores lentivirales empleados en el estudio y comportamiento esperado de su expresión en condiciones de diferenciación osteogénica.

de estas células, que contenían las partículas virales, se recogieron y se ultracentrifugaron a 4° C (2h a 26.000 rpm) [11].

### Estudio de la capacidad de diferenciación ósea *in vitro* de las MSCs transducidas con los vectores generados

Se utilizaron MSCs primarias humanas obtenidas a partir de médula ósea, también en el caso de los ensayos *in vivo* (Lonza), que se cultivaron en condiciones estándar, con medio DMEM (Lonza) más 10% FBS (Hyclone). Para infectar dichas células, se sembraron en condiciones de subconfluencia y se añadieron los virus (MOI 5) en presencia de polibreno (Sigma) 8 µg/ml durante 16 horas.

Las células transducidas con el virus control GFP o los virus codificantes para Dlx5 se cultivaron durante dos semanas en medio de diferenciación ósea, medio IMDM suplementado con dexametasona 0,1 µM, βglicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 0,2 mM. Para analizar el grado de diferenciación *in vitro* se tiñó el cultivo con rojo de alizarina y se visualizó en un microscopio de contraste de fases.

Las células transducidas con los diferentes vectores lentivirales se fijaron en paraformaldehído 4% y teñido posteriormente con Texas Red-X phalloidin (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y DAPI (invitrogen), dilución 1:500, durante cinco minutos. Las células así marcadas se visualizaron en un microscopio confocal SP5 (Leica).

### Análisis del potencial osteogénico *in vivo* de los implantes cerámicos en presencia de las MSCs modificadas

La formación de los implantes cerámicos se realizó según el protocolo descrito previamente [10], incluyendo las MSCs transducidas con los distintos vectores. En todos los casos, los implantes fueron extraídos mediante técnicas de imagen (microCT) y análisis histológico. Se incluyeron implantes que combinan BMP-2 con células transducidas con el vector control GFP, para poder evaluar adecuadamente la capacidad osteogénica de las MSCs modificadas frente al factor. La densidad mineral de las muestras se cuantificó mediante el programa GEHC Microview.

Para su análisis histológico, los implantes cerámicos se fijaron en formalina y posteriormente se decalcificaron mediante Osteosoft (Merck Millipore) durante 48 horas, siendo procesados más adelante para su inclusión en parafina. En todos los casos se realizó una tinción estándar con hematoxilina-eosina. En algunos casos, además, se efectuó inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-vimentina humana (Abcam).

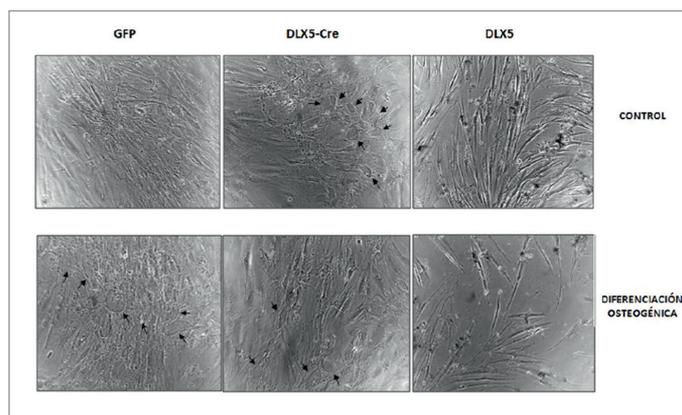
El análisis estadístico de los datos se realizó mediante Anova, seguido del test de Dunnet para comparaciones múltiples. Se consideró significación estadística cuando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Se construyeron vectores lentivirales que codificaron para Dlx5 y para GFP (virus control); teniendo como base un vector lentiviral auto-inactivador (SIN, *self-inactivating*), que tenía delecionada la secuencia *enhancer/promotora* del U3 viral situado en el LTR 3'. Para dirigir la expresión del transgén, se utilizó el promotor eucariota de EF-1 $\alpha$  para conseguir niveles de expresión similares a los endógenos, así como evitar la metilación *in vivo* del promotor, frecuente en los promotores virales. Para obtener un sistema de expresión controlada, se generó un vector dual que, además de Dlx5 (o GFP) expresado bajo el control del promotor de EF-1 $\alpha$ , codificaba para la recombinasa Cre dirigida por el fragmento mínimo del promotor de *Sab2*, que incluía los elementos de respuesta a Osterix [12]. Por otro lado, el vector de partida contenía una secuencia LoxP (diana de Cre) en la región U3 3'. Con la integración del genoma viral, y debido al mecanismo de transcripción reversa, esta región U3 3' modificada se copió a ambos lados del DNA del provirus, que quedó flanqueado por secuencias LoxP [13]. Así, en ausencia de Osterix, Dlx5 era sintetizada y ponía en marcha el mecanismo de diferenciación osteogénica. Conforme avanzaba el proceso, el aumento de niveles de Osterix activaba la expresión de Cre, dando como resultado la deleción del DNA del provirus (que incluía tanto Dlx5 como Cre, evitando también la posible toxicidad derivada de la sobreexpresión mantenida de la recombinasa) (Figura 1).

Durante el proceso de construcción de los vectores lentivirales, se generaron dos construcciones adicionales que carecían de la recombinasa Cre y que, por tanto, expresaban Dlx5 y GFP de forma constitutiva, no regulable por la diferenciación ósea (pWPI-PL-GFP y pWPI-PL-DLX5). Durante el estudio, estas construcciones fueron empleadas como controles de expresión y funcionales de sus contrapartidas de expresión autolimitada (Figura 2).

En paralelo a los análisis de la expresión del transgén, se comenzaron a realizar ensayos de diferenciación *in vitro* en células infectadas con los diversos virus. Tras 4-5 días de infección, se observaron cambios morfológicos evidentes (Figura 3). En el caso de las MSCs infectadas con pWPI-PL-DLX5\_sCre, en condiciones basales se evidenció la aparición de células de aspecto redondeado, con morfología similar a la que adoptaban las células control (infectadas con pWPI-PL-GFP) en presencia de medio de diferenciación. Por el contrario, las MSCs infectadas con pWPI-PL-DLX5 adoptaban una morfología mucho más alargada y de aspecto fibroblastoide. Esto sugería que algunas células infectadas con pWPI-PL-DLX5\_sCre habían iniciado un proceso

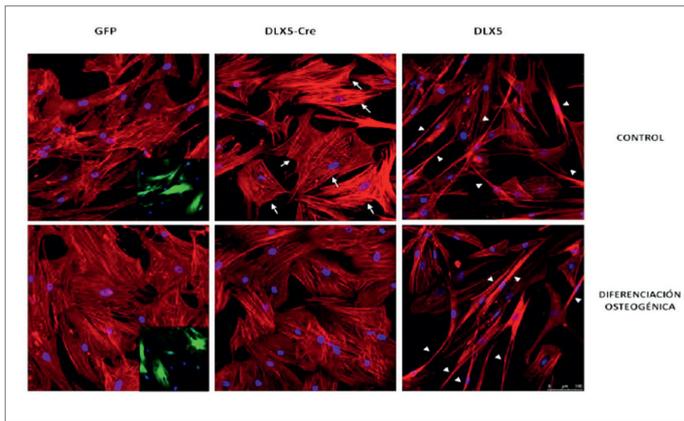


**Fig. 3.** Cambios morfológicos observados en MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-GFP (GFP) como control, y dos días después se comenzó a cultivarlas en medio de diferenciación osteogénica o control. Cinco días después de la transducción (tres días de diferenciación osteogénica) se observaron los cambios morfológicos presentes en las células en cada condición experimental. Las fotografías muestran campos representativos de cada cultivo, y en ellas se puede apreciar la presencia de células de apariencia redondeada en las MSCs transducidas con Dlx5-Cre, similares al cultivo control GFP con medio de diferenciación osteogénica (flechas). También se observa la morfología de aspecto fibroblastoide en las MSCs transducidas con Dlx5.

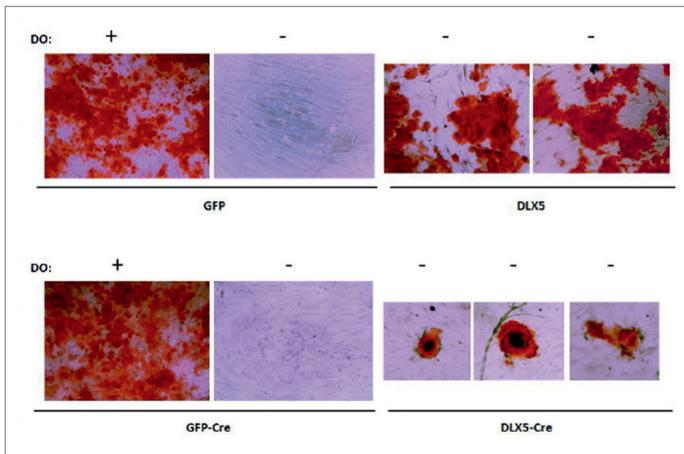
de diferenciación osteogénica controlado, similar al llevado a cabo por las MSCs control en presencia de medio osteogénico, lo cual no ocurría con las infectadas con pWPI-PL-DLX5.

Se llevó a cabo un análisis del citoesqueleto de actina de MSCs transducidas con los diversos virus, mediante su tinción con faloidina marcada con Texas Red (Figura 4). Las células transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre mostraban cambios en su citoesqueleto idénticos a los descritos para el proceso de diferenciación osteogénica [14][15] ya en condiciones basales. Las MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5 presentaban asimismo un aumento en el grado de polimerización de la actina, que en este caso se colocaba en grandes haces paralelos al eje longitudinal de las células, de aspecto fibroblastoide.

Por último, para evaluar el potencial osteogénico *in vitro* de las MSCs transducidas con los distintos vectores lentivirales, se cultivaron en medio de diferenciación osteogénica o medio control durante 14 días y se realizó una tinción con rojo de alizarina que puso de manifiesto la presencia de precipitados de calcio en el cultivo (Figura 5). Se comprobó que las células infectadas con pWPI-PL-DLX5\_sCre presentaban pequeños focos aislados de diferenciación osteogénica, mientras que las infectadas con pWPI-PL-DLX5 mos-



**Fig. 4.** Cambios en el citoesqueleto de actina en MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-GFP (GFP) como control. Dos días después de la transducción se comenzó el proceso de diferenciación con medio osteogénico. Cinco días después de la transducción (tres de diferenciación osteogénica), el citoesqueleto de actina de dichas células fue teñido con faloidina-Texas Red. Las fotografías muestran campos representativos de los cultivos, donde se puede apreciar un incremento en la polimerización de actina en MSCs DLX5-Cre, que se dispone en muchos casos de forma perinuclear (flechas), mientras que en las MSCs DLX5 hay un incremento exacerbado de la polimerización de actina, que adopta una disposición en haces paralelos al eje longitudinal de las células (puntas de flecha). En rojo, la tinción de actina; en verde, la expresión de GFP en las células control (insertos); en azul, los núcleos celulares teñidos con DAPI.

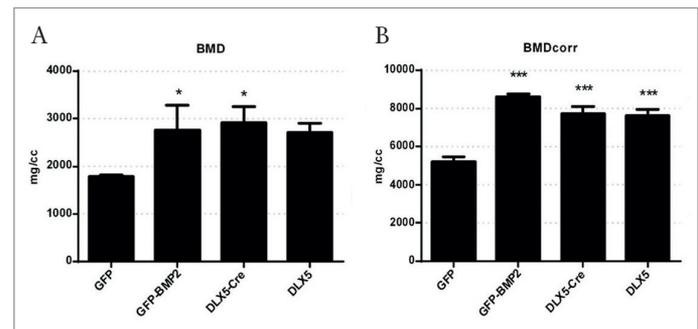


**Fig. 5.** Potencial osteogénico *in vitro* de las MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre), pWPI-PL-GFP (GFP) y pWPI-PL-GFP\_sCre (GFP-Cre). Dos días después de la transducción se comenzó el proceso de diferenciación con medio osteogénico durante 12 días. Las células fueron teñidas entonces con Alizarin Red para poner de manifiesto la presencia de precipitados de calcio. Las fotografías muestran campos representativos de los cultivos, donde se puede apreciar la presencia de depósitos de calcio en condiciones basales tanto en MSCs DLX5 como en MSCs DLX5-Cre.

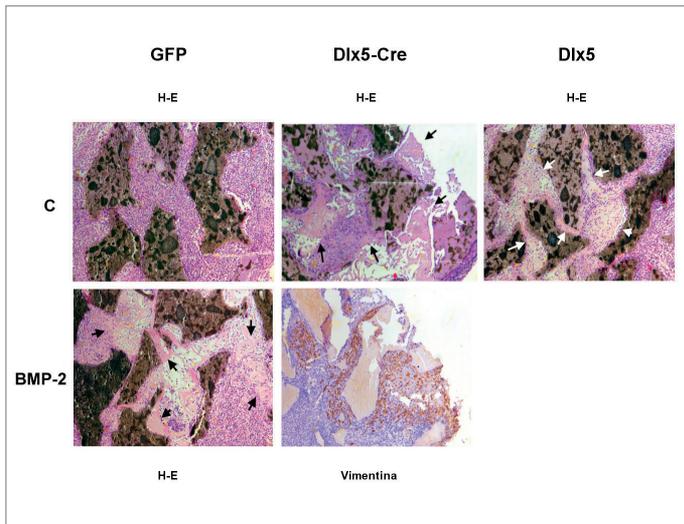
traban un grado de diferenciación basal considerablemente mayor.

Las MSCs humanas transducidas con pWPI-PL-GFP, pWPI-PL-DLX5\_sCre o pWPI-PL-DLX5 fueron incluidas 1-2 días tras la infección en implantes cerámicos que se colocaron subcutáneamente en el flanco de ratones inmunodeficientes NOD/SCID. En el caso del pWPI-PL-GFP se incluyó el factor BMP-2 como control positivo de diferenciación.

En un primer experimento, previamente a su procesamiento histológico, se analizó la densidad ósea (BMD) de los implantes mediante microCT, y se observó un incremento significativo en la misma frente al control en aquellos que llevaban MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre, de una magnitud similar a la obtenida en los implantes que llevaban BMP-2 (Figura 6A). También se obtuvo un aumento de BMD en los implantes de MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5, si bien en este caso no fue significativo estadísticamente. Para evitar que variaciones en la cantidad de cerámica de partida pudieran alterar la medición, se normalizaron los valores de BMD frente al porcentaje de hueso presente en cada implante, obteniéndose un resultado similar, si bien el incremento obtenido con pWPI-PL-DLX5 alcanzó significación estadística (Figura 6B). La tinción con hematoxilina-eosina de estos implantes, así como de los procedentes de un segundo experimento (Figura 7), puso de manifiesto en los implantes GFP+BMP-2, Dlx5\_sCre y Dlx5 áreas similares de escasa celularidad con tinción homogénea para eosina, su-



**Fig. 6.** Cuantificación de la densidad mineral de los implantes subcutáneos con MSCs transducidas. Se transdujeron las MSCs con pWPI-PL-GFP (GFP), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-DLX5 (DLX5), y fueron incluidas en implantes cerámicos, que se colocaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. En parte de los implantes GFP se añadió BMP-2 (GFP-BMP2) como control positivo de diferenciación. Tras 12 días, los implantes se extrajeron y la densidad mineral de los mismos (BMD) se cuantificó con  $\mu$ CT. La gráfica A muestra la media  $\pm$ SD de BMD en los distintos implantes (n=3). En B se representa la media  $\pm$ SD de BMD corregida con el porcentaje de hueso en cada implante (n=3). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



**Fig. 7.** Análisis histológico de los implantes con MSCs transducidas. Los implantes que contenían MSCs transducidas con pWPI-PL-GFP (GFP), control (C) o con BMP-2, pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-DLX5 (DLX5) fueron extraídos tras 14 días, procesados y teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Las fotos muestran campos representativos de los implantes, donde se aprecian zonas positivas para eosina sugerentes de osteoide (flechas). En el caso de los implantes con MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre), se llevó a cabo una tinción con un anticuerpo anti-vimentina humana, que muestra la presencia en dichas zonas de las MSCs incluidas en los implantes.

gerentes de osteoide. Es de resaltar que, según la tinción con anti-vimentina, en el caso de Dlx5\_sCre y Dlx5 la presencia de zonas de osteoide se circunscribía a aquellas donde se encontraban células de origen humano, es decir, la formación de hueso se limitaba a las áreas donde se encontraban las MSCs transducidas.

## I Discusión

En el presente proyecto se planteó la modificación de células mesenquimales para incrementar su potencial osteogénico, mediante un sistema de expresión autolimitado destinado a regeneración ósea que contribuyera a mejorar la seguridad del proceso y permitiera la estandarización del mismo. El hecho de que *in vitro* se observen evidencias de una diferenciación osteogénica parcial en condiciones basales en MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre sugiere que existe una expresión transitoria del transgén capaz de poner en marcha el proceso de diferenciación en una subpoblación de las células transducidas más o menos abundante en función del experimento. Se ha descrito que no es necesario mantener en el tiempo el estímulo iniciador del proceso de diferenciación ósea para el desarrollo adecuado del mismo, lo cual apoyaría esta posibilidad [7]. Por

otro lado, la sobreexpresión mantenida de Dlx5 en las células transducidas con pWPI-PL-DLX5 da lugar a una parada en la proliferación celular (no se muestra), un aumento exacerbado de la polimerización de actina y un incremento considerable del grado de diferenciación osteogénica en condiciones basales. Al igual que nosotros, otros grupos han descrito que la sobreexpresión continuada de Dlx5 puede dar lugar a una inhibición en la proliferación de las MSCs [16], si bien este efecto se acompaña de un déficit en la capacidad osteogénica, extremo que nosotros no hemos podido confirmar.

Como se ha comentado, el proceso de diferenciación osteogénica es altamente dependiente del microambiente [10], de manera que la formación neta de tejido óseo viene determinada por la interacción de diversos tipos celulares, factores solubles y componentes de matriz. A pesar de que el grado de diferenciación ósea de las MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre *in vitro* es inferior al alcanzado por los controles con medio de diferenciación y pWPI-PL-DLX5, son claramente equivalentes en los implantes subcutáneos (tanto a nivel de BMD como histológico). Esto sugiere que la expresión controlada en el tiempo de Dlx5 puede poner en marcha mecanismos adicionales *in vivo* que dan como resultado una formación eficiente de hueso. Así, se ha descrito por ejemplo que en ratones deficientes en Dlx5 hay un aumento de actividad osteoclástica con osteopenia [17], lo que sugiere que podría haber un efecto a ese nivel.

A pesar de que las MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre y pWPI-PL-DLX5 parecen dar lugar *in vivo* a tejido óseo de características similares (tanto a nivel cuantitativo como cualitativo), una potencial mayor bioseguridad en primer caso, así como el efecto deletéreo de la sobreexpresión mantenida sobre las MSCs *in vitro* en el segundo, hacen del pWPI-PL-DLX5\_sCre una herramienta de partida ideal para el diseño de nuevas estrategias en el tratamiento de patologías que cursan con defectos óseos.

Aunque los datos con los implantes cerámicos son claros, para confirmar la capacidad osteogénica *in vivo* de las MSCs transducidas deberán ensayarse en modelos preclínicos de enfermedad ósea. Además, se necesitarían estudios sistemáticos para evaluar los posibles riesgos de bioseguridad en su aplicación *in vivo*, aunque es de esperar que sean mínimos, dado que el vector pWPI-PL-DLX5\_sCre induce en MSCs una expresión de Dlx5 a niveles fisiológicos y de forma transitoria, de manera que potencialmente incrementa la seguridad del sistema. Alternativamente, este vector puede servir de base para el diseño de otras estrategias de vehiculización para su aplicación clínica. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. European Markets for Dental Implants, Final Abutments and Computer Guided Surgery 2011. iData Research 2010; 636.
2. Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Pannminerva Med* 2009; 51:25-41.
3. Kang Y-Q, Kim S-W, Khademhosseini A, Yang Y-Z. Creation of bony microenvironment with CaP and cell-derived ECM to enhance human bone-marrow MSC behavior and delivery of BMP-2. *Biomaterials* 2011; 32:6119-30.
4. Egermann M, Baltzer AW, Adamaszek S, Evans C, Robbins P, Schneider E, *et al.* Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther* 2006; 17:507-17.
5. Zhao Z, Zhao M, Xiao G, Franceschi RT. Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 2005; 12:247-53.
6. Mátrai J, Chuah MK, Van den Driessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther* 2010; 18:477-90.
7. Noël D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly I, Bony C, Ponce P, *et al.* Short-term BMP-2 expression is sufficient for *in vivo* osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22:74-85.
8. Abarrategi A, Civantos A, Ramos V, Sanz Casado JV, López-Lacomba JL. Chitosan film as rhBMP2 carrier: delivery properties for bone tissue application. *Biomacromolecules*. 2008; 9:711-8.
9. Abarrategi A, López-Morales Y, Ramos V, Civantos A, López-Durán L, Marco F, *et al.* Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *J Biomed Mat Res, Part-A* 2010; 95A:1132-41.
10. Abarrategi A, Pérez-Tavárez R, Rodríguez-Milla MA, Cubillo I, Mulero F, Alfranca A. *In vivo* ectopic implantation model to assess human mesenchymal progenitor cell potential. *Stem Cell Rev* 2013; 9:833-46.
11. Urso K, Alfranca A, Martínez-Martínez S, Escolano A, Ortega I, Rodríguez A, *et al.* NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis. *Blood* 2011; 118:795-803.
12. Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. Osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) is an upstream regulator of Satb2 during bone formation. *J Biol Chem* 2011; 286:32995-3002.
13. Pfeifer A, Brandon EP, Kootstra N, Gage FH, Verma IM. Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting *in vivo*. *PNAS* 2001; 20:11450-5.
14. Rodríguez JP, González M, Ríos S, Cambiazo V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 2004; 93:721-31.
15. Müller P, Langenbach A, Kaminski A, Rychly J. Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2013; 8:e71283.
16. Muraglia A, Perera M, Verardo S, Liu Y, Cancedda R, Quarto R, *et al.* DLX5 overexpression impairs osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Eur J Cell Biol.* 2008; 10:751-61.
17. Samee N, Geoffroy V, Marty C, Schiltz C, Vieux-Rochas M, Clément-Lacroix P, *et al.* Increased bone resorption and osteopenia in Dlx5 heterozygous mice. *J Cell Biochem* 2009; 107:865-72.

### Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.