
**Generación de células
mesenquimales
humanas con potencial
osteogénico mejorado
genéticamente para su uso
en implantes destinados a
regeneración ósea**

Arantzazu Alfranca González
Javier García-Castro | Ander Abarrategi López
Sergio Martínez Álvarez | Vanessa Blanca Benito

Ayudas a la investigación 2012

Equipo de trabajo:

Investigador Principal:

Arantzazu Alfranca González

Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (Majadahonda)

Equipo Investigador:

Javier García-Castro

Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (Majadahonda)

Ander Abarrategi López

*Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (Majadahonda)
y Cancer UK Research Institute (Londres)*

Sergio Martínez Álvarez

Hospital Universitario Infantil Niño Jesús (Madrid)

Vanessa Blanca Benito

Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (Majadahonda)

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en su totalidad gracias a la financiación recibida de la Fundación Mapfre, en su programa de Ayudas a la Investigación (SA/12/AYU/197).

AUTORES

Dra. Arantzazu Alfranca González

Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid (1992). Médico especialista en Inmunología (Hospital Universitario de La Princesa de Madrid) (1997). Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid (2002).

En la actualidad realiza su labor investigadora en el Área de Genética Humana del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras con un contrato "Miguel Servet". Su interés principal se centra en el estudio de los mecanismos de diferenciación ósea a partir de células madre mesenquimales, tanto fisiológicos como patológicos (fundamentalmente osteosarcoma pediátrico y enfermedades raras que cursan con afectación ósea). Asimismo, posee amplia experiencia en la generación y utilización de vectores lentivirales tanto in vitro como in vivo. Dentro de este interés, y en una vertiente más aplicada, dedica parte de su investigación al desarrollo de sistemas que optimicen la capacidad osteogénica de las células mesenquimales para el tratamiento de complicaciones de dichas patologías, línea en la que se enmarca el presente proyecto.

Publicaciones recientes:

1. Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. Escolano A, Martínez-Martínez S, Alfranca A, Urso K, Izquierdo HM, Delgado M, Martín F, Sabio G, Sancho D, Gómez-DeL Arco P, Redondo JM. *EMBO J*. 2014 Mar 3. [Epub ahead of print]. PMID: 24596247
2. In vivo ectopic implantation model to assess human mesenchymal progenitor cell potential. Abarrategi A, Perez-Tavarez R, Rodriguez-Milla MA, Cubillo I, Muleiro F, Alfranca A, Lopez-Lacomba JL, Garcia-Castro J. *Stem Cell Rev*. 2013 Dec;9(6):833-46.
3. IL10 released by a new inflammation-regulated lentiviral system efficiently attenuates zymosan-induced arthritis. Garaulet G, Alfranca A, Torrente M, Escolano A, López-Fontal R, Hortelano S, Redondo JM, Rodríguez A. *Mol Ther*. 2013 Jan;21(1):119-30.

Datos de contacto:

Área de Genética Humana (IIER)
Instituto de Salud Carlos III
Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2,200
28220 - Majadahonda (Madrid)
T: 918223188
Fax: 918223269
e-mail: aalfranca@isciii.es

Dr. Javier García-Castro

Licenciado en CC Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid (1994). Doctor en CC Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid (2001).

El Dr. Javier García-Castro es desde 2009 investigador titular del ISCIII, y desarrolla su labor como jefe de la Unidad de Biotecnología Celular del Área de Genética Humana del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras. El Dr. García-Castro trabaja desde hace años en proyectos relacionados con células madre mesenquimales, tanto en sus aspectos de biología básica, aplicaciones traslacionales como su relación con el cáncer. En este último sentido, ha realizado importantes contribuciones en el empleo de células madre mesenquimales autólogas como vehículos celulares antitumorales en tumores sólidos metastásicos infantiles. Asimismo, está llevando a cabo estudios sobre los mecanismos de transformación de células mesenquimales, así como su potencial papel como «cancer stem cells» en sarcomas.

Publicaciones recientes:

1. Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. Rubio R, Abarrategi A, Garcia-Castro J, Martinez-Cruzado L, Suarez C, Tornin J, Santos L, Astudillo A, Colmenero I, Mulero F, Rosu-Myles M, Menendez P, Rodriguez R. *Stem Cells*. 2014 Jan 20. doi: 10.1002/stem.1647. [Epub ahead of print]
2. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease. Vicente López Á, Vázquez García MN, Melen GJ, Entrena Martínez A, Cubillo Moreno I, García-Castro J, Orellana MR, González AG. *PLoS One*. 2014 Jan 6;9(1):e84496.
3. In vivo ectopic implantation model to assess human mesenchymal progenitor cell potential. Abarrategi A, Perez-Tavarez R, Rodriguez-Milla MA, Cubillo I, Mulero F, Alfranca A, Lopez-Lacomba JL, García-Castro J. *Stem Cell Rev*. 2013 Dec;9(6):833-46.

Datos de contacto:

Área de Genética Humana (IIER)
Instituto de Salud Carlos III
Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2,200
28220 - Majadahonda (Madrid)
T: 918223288
Fax: 918223269
e-mail: jgcastro@isciii.es

Dr. Ander Abarrategi López

Licenciado en CC Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid (2002). Doctor en CC Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid (2008).

El Dr. Abarrategi ha desarrollado su investigación en el campo de la ingeniería de tejidos, y principalmente en modelos de regeneración de tejido óseo. Ha desarrollado con éxito varios compuestos de implantación y regeneración ósea basados, entre otros, en materiales implantables y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), en diferentes especies animales y modelos de lesión ósea. Asimismo, ha trabajado en el campo de la oncología, estudiando los mecanismos de tumorigénesis de sarcomas y la interacción entre microambiente y fenotipo tumoral.

Publicaciones recientes:

1. Chitosan scaffolds containing calcium phosphate salts and rhBMP-2: in vitro and in vivo testing for bone tissue regeneration. Guzmán R, Nardecchia S, Gutiérrez MC, Ferrer ML, Ramos V, del Monte F, Abarrategi A, López-Lacomba JL. *PLoS One*. 2014 Feb 4;9(2):e87149.
2. Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. Rubio R, Abarrategi A, Garcia-Castro J, Martinez-Cruzado L, Suarez C, Tornin J, Santos L, Astudillo A, Colmenero I, Mulero F, Rosu-Myles M, Menendez P, Rodriguez R. *Stem Cells*. 2014 Jan 20. doi: 10.1002/stem.1647. [Epub ahead of print]
3. In vivo ectopic implantation model to assess human mesenchymal progenitor cell potential. Abarrategi A, Perez-Tavarez R, Rodriguez-Milla MA, Cubillo I, Mulero F, Alfranca A, Lopez-Lacomba JL, García-Castro J. *Stem Cell Rev*. 2013 Dec;9(6):833-46. doi: 10.1007/s12015-013-9464-1.

Datos de contacto:

Área de Genética Humana (IIER)
Instituto de Salud Carlos III
Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2,200
28220 - Majadahonda (Madrid)
T: 918223261
Fax: 918223269
e-mail: ander@isciii.es

Dr. Sergio Martínez Álvarez

Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valladolid (2001). Médico Especialista en Cirugía Ortopédica y Traumatología (Hospital Universitario de La Princesa de Madrid) (2007). Diplomatura en estudios avanzados (DEA) por la Universidad Autónoma de Madrid (2010).

En la actualidad ejerce como Médico Adjunto del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología Infantil en la Unidad de Miembro Superior y Malformaciones Congénitas de los Miembros del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús de Madrid. Su labor investigadora se ha centrado en el desarrollo de modelos para terapia celular enfocada al tratamiento de la enfermedad de Legg-Calvé-Perthes.

Publicaciones Recientes:

1. Experimental induction of Perthes disease in lambs. Martínez-Álvarez S, Epeldegui-Torre T, Manso-Díaz G, Rodríguez-Bertos A, Forriol F. Rev Esp Cir Ortop Traumatol. 2014 March - April;58(2):68-77.
2. Slipped capital femoral epiphysis. Martínez-Álvarez S, Martínez-González C, Miranda Gorozañari C, Abril JC, Epeldegui T. Rev Esp Cir Ortop Traumatol. 2012 Nov-Dec;56(6):506-14.

Datos de Contacto:

Unidad de Miembro Superior y Malformaciones Congénitas de los Miembros. Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología Infantil.

Hospital Universitario Infantil Niño Jesús.

Av de Menéndez Pelayo, 65

28009 Madrid

T: 913667431

e-mail: SERMARAL77@HOTMAIL.COM

Vanessa Blanca Benito

Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citología (1999). I.E.S. San Juan de la Cruz (Pozuelo de Alarcón, Madrid).

Vanessa Blanca ha trabajado en diversos centros de investigación (IIER, CNIC, Centro Investigación Príncipe Felipe, Instituto de Neurociencias, etc) y posee experiencia en extracción y cultivo de células mesenquimales, cultivo de células progenitoras, y diferenciación de células madre embrionarias. Asimismo tiene amplios conocimientos de técnicas histológicas, bioquímica y biología molecular. Ha trabajado con animales de experimentación, y tiene formación complementaria en técnicas de terapia celular.

Datos de contacto:

Área de Genética Humana (IIER)

Instituto de Salud Carlos III

Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2,200

28220 - Majadahonda (Madrid)

T: 918223261

e-mail: vblanca@isciii.es

Índice

	Página
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	7
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	9
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	16
BIBLIOGRAFÍA.....	17
ANEXOS.....	18

RESUMEN

Las terapias utilizadas en la actualidad en patologías que cursan con defectos masivos de masa ósea son a menudo poco eficientes, y tienen un impacto económico elevado. Existe por tanto un gran interés en el desarrollo de nuevos modelos de implantes para el tratamiento de las mismas. Se está investigando el uso de nuevos materiales, así como la utilización de componentes añadidos que mejoren la capacidad osteogénica del implante. Debido a su facilidad de obtención, así como a su capacidad de diferenciación ósea, las células madre mesenquimales (MSCs) han sido empleadas con relativo éxito para este fin. El presente proyecto propone la generación de MSCs modificadas para su empleo en implantes cerámicos para regeneración ósea, mediante la utilización de vectores lentivirales que sobreexpresen factores reguladores del proceso osteogénico, de forma autolimitada en el tiempo. Hemos seleccionado el factor Dlx5 para un primer abordaje debido a su acción inductora tanto de Runx2 como de Osterix, factores que participan en etapas sucesivas de la diferenciación ósea. Se ha utilizado un sistema lentiviral basado en la recombinasa Cre, que permite eliminar de forma controlada e irreversible el gen sobreexpresado en las etapas más avanzadas del proceso, contribuyendo a la seguridad del procedimiento. Tras la generación de dichos vectores lentivirales, se ha analizado la capacidad de diferenciación in vitro de las MSCs transducidas con los mismos, encontrándose que dan lugar al depósito de calcio, así como a cambios morfológicos y de citoesqueleto celular compatibles con la diferenciación ósea. Para evaluar el potencial osteogénico de estas MSCs modificadas in vivo, se han incorporado dichas células a implantes cerámicos de colocación subcutánea en ratones, donde se ha podido comprobar que son capaces de formar hueso de forma autónoma, similar al inducido por factores osteogénicos solubles. El diseño de estos implantes permitiría prescindir de la utilización de grandes cantidades de factores solubles, lo cual, junto con posibilidad de emplear células alogénicas y estandarizar el proceso, podría reducir de forma importante el coste económico de este abordaje terapéutico.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

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 su potencial osteogénico. Por otro lado, el impacto económico de este tipo de procedimientos es elevado, estimándose un gasto acumulado en EEUU de 9 mil millones de dólares en 2006, y un gasto anual de 366 millones de euros con un crecimiento anual del 4,4% entre 2008 y 2014 en Europa (1).

La **ingeniería de tejidos** (medicina regenerativa) tiene como objetivo el diseño de tratamientos clínicamente aplicables destinados no sólo a la reparación, sino a la regeneración tisular. En el caso del tejido óseo, se está invirtiendo un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevos materiales implantables, en dos direcciones fundamentales (2):

- a. Diseño de biomateriales (naturales, minerales o polímeros sintéticos), que posean propiedades osteoconductoras (de soporte) u osteoinductivas (promotoras del desarrollo óseo) adecuadas, así como una integridad estructural y una cinética de degradación óptimas.
- b. Empleo de estrategias que mejoren la capacidad osteoinductiva de dichos materiales, fundamentalmente mediante la incorporación al implante de:
 - *Factores de crecimiento osteogénicos* (p.e. BMP-2, FGF-2) (3), si bien puede resultar difícil controlar la concentración local efectiva del factor, así como la estabilidad del mismo.
 - *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). Dichas células suelen incluirse en el implante, aunque se están desarrollando sistemas para redirigir eficientemente las MSCs del paciente de forma sistémica hacia el hueso en formación (4). Recientemente se han comenzado a realizar modificaciones genéticas que promuevan la capacidad de diferenciación ósea de las MSCs, mediante la producción autocrina de factores de crecimiento o la expresión constitutiva de mediadores intracelulares implicados en dicho proceso.

Las **células madre mesenquimales** constituyen un tipo de células madre adultas, que poseen un perfil de marcadores fenotípicos característico (CD45-, CD34-, CD19-, CD14-, CD11b-, CD79-, HLADR-, CD105+, CD90+, CD73+) y la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares de linaje mesodérmico (osteoblastos, adipocitos y condrocitos). Dichas células se localizan fundamentalmente en médula ósea y grasa, aunque también se ha descrito su presencia de forma perivascular, donde comparten características fenotípicas y funcionales con los pericitos (5), así como de forma circulante en sangre periférica (6).

En la médula ósea, las MSCs representan un componente esencial del nicho de las células madre hematopoyéticas, colaborando en el mantenimiento del estado quiescente e indiferenciado de estas células (7). Además de estas funciones, las MSCs poseen propiedades inmunomoduladoras, interfiriendo con la activación de distintos componentes del sistema inmune (8), y se ha propuesto que promueven la generación de nuevos vasos sanguíneos debido a la secreción de factores como SDF-1 y VEGF, así como por su capacidad de diferenciación a progenitores vasculares (9). Por último, se sabe que las MSCs circulantes pueden anidar de forma selectiva en tejidos diana como tumores y focos inflamatorios o isquémicos (10). Estas características funcionales hacen que las MSCs se hayan empleado para el desarrollo de nuevas terapias en varias patologías; de hecho existe un fármaco basado en MSCs alogénicas para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, que ha sido aprobado recientemente en Canadá y EEUU.

Durante la **diferenciación osteogénica**, las MSCs siguen un programa de cambios en la expresión génica, que promueven la formación de precursores comprometidos a linaje osteoblástico, así como los procesos de proliferación y de diferenciación terminal a osteoblasto maduro. Este programa es puesto en marcha por factores de crecimiento con capacidad osteogénica como BMP-2 o PTH. Así, la diferenciación de MSCs a linaje osteoblástico se desencadena tras la expresión selectiva, inducida por BMP-2, del regulador transcripcional Runx2; y en ella participan otros factores de transcripción como Osterix (Sp7), SMADs, TCF/lef, NFATc1, Twist, AP-1, ATF-4, etc. Estos factores modulan la expresión secuencial de genes implicados en proliferación, producción de matriz extracelular (fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, sialoproteína ósea, fibronectina) y mineralización (osteocalcina, osteopontina, colagenasa), y no actúan de forma aislada, sino que interactúan para integrar distintas señales, dando lugar a una regulación muy fina de los cambios de expresión génica durante el proceso (11).

Existe amplio consenso en que Runx2 es el principal regulador del proceso osteogénico, ya que ratones deficientes para este gen muestran una ausencia completa de formación ósea (12), y este factor juega un papel crítico en la expresión de genes específicos de osteoblastos. Por otro lado, algunos autores sostienen que Runx2 activaría fundamentalmente el proceso de diferenciación hasta la formación de un precursor común osteo-condroblástico, y que sería Osterix el que actuaría durante la diferenciación ósea terminal segregando el linaje osteoblástico y el condroblástico (13). Los niveles de ambos factores aumentan en presencia de BMP-2, pero parece que no lo hacen de forma directa, sino a través del factor Dlx5. Dlx5 es diana de BMP-2, y su sobreexpresión es suficiente para incrementar los niveles de Runx2 y Osterix; de la misma manera, el silenciamiento de Dlx5 inhibe la expresión de ambos factores inducida por BMP-2. Por último, la sobreexpresión de Dlx5 in vitro

aumenta los niveles de osteocalcina y lleva a la formación de una matriz mineralizada (14).

Debido a su facilidad de obtención a partir de médula ósea de pacientes y a su potencial osteogénico, las MSCs han sido empleadas con relativo éxito en diversos **modelos de regeneración ósea**, solas o en combinación con factores de crecimiento como BMP-2 (3). Como se ha comentado anteriormente, el elevado coste económico, así como la dificultad para establecer la dosis efectiva del factor de crecimiento utilizado, 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 (15). Igualmente, se han generado MSCs con expresión aumentada de Runx2 y de Osterix, las cuales son capaces de incrementar significativamente la formación de hueso en modelos murinos de defectos óseos en calota (16).

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 transcripcionalmente activos (17), 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 (18), pero no existe ningún ejemplo de MSCs modificadas con vectores lentivirales regulados endógenamente.

OBJETIVOS

Miembros del equipo de investigación han desarrollado previamente con éxito varios compuestos de implantación ósea, utilizando distintos materiales y proteínas morfogenéticas óseas (19-21). El presente proyecto propone la utilización de MSCs con una modificación genética novedosa en combinación con implantes cerámicos, para optimizar la capacidad formadora de hueso de los mismos. Para ello se pretende generar vectores lentivirales que codifiquen 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:

- 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.
- 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.
- 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.

Para llevar a cabo el proyecto, se han abordado los siguientes objetivos concretos:

1. **Generación de los vectores lentivirales**
2. Estudio de la **capacidad de diferenciación ósea in vitro** de las MSCs transducidas con los vectores generados
3. Análisis del **potencial osteogénico in vivo** de los implantes cerámicos en presencia de las MSCs modificadas

MATERIALES Y METODOLOGÍA

1. GENERACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

La construcción de los vectores correspondientes a Dlx5 (gen de interés) y GFP (control negativo) se ha llevado a cabo siguiendo las siguientes fases:

a. Construcción de pWPI-PL (Fig. 1 y 2 del Anexo):

Para construir este plásmido se ha eliminado el casete ECMV-IRES+GFP (fragmento de aprox. 1,4Kb) 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. Dicho casete se ha escindido mediante la digestión del plásmido original con las enzimas PmeI y BstBI. En su lugar se ha clonado un oligo anillado (PL) que contiene, además de las de PmeI y BstBI (extremos), las secuencias diana de BamHI y MluI. Estas últimas no se encuentran en pWPI, y permiten por un lado confirmar el clonaje de PL, y por otro proporcionan nuevas dianas para facilitar el clonaje del resto de los componentes del vector.

b. Construcción de pWPI-PL-DLX5 (Fig. 1 y 3 del Anexo):

Se ha utilizado como plásmido de partida el vector de expresión de Dlx5 cedido por el Dr. Joseph Testa (The Research Institute of Fox Chase Cancer Center, Pennsylvania, EEUU). Para obtener el cDNA de Dlx5, se digirió el plásmido con las enzimas BamHI/XhoI, y se comprobó que liberaban un inserto del tamaño correcto. A continuación se clonó éste en el sitio PmeI de pWPI-PL (previa generación de extremos romos en el inserto mediante Klenow (Promega)). Para comprobar que se había insertado con éxito, y dado que las dianas utilizadas para el clonaje se habían destruido, se empleó una digestión con XhoI, que teóricamente, en presencia del inserto, debía liberar dos bandas de aprox. 1Kb y 400pb respectivamente, y en su ausencia, sólo la de 400pb. Por último, se secuenciaron las colonias positivas para comprobar que la orientación el inserto era la correcta.

c. Construcción de pWPI-PL-GFP (Fig. 1 y 4 del Anexo):

La construcción de este plásmido se ha llevado a cabo de forma similar al pWPI-PL-DLX5, obteniendo el cDNA de GFP a partir del plásmido pHRISIN-CSGW-dlNotI (cedido por el Dr. JA Pintor, CABIMER, Sevilla) mediante digestión con BamHI y NotI, posterior generación de extremos romos con Klenow, y clonaje en el sitio PmeI de pWPI-PL. La confirmación del clonaje y de la orientación del inserto se ha realizado igual que para el pWPI-PL-DLX5.

d. Clonaje del promotor de Satb2 y del cDNA de Cre (Fig. 1 y 5 del Anexo):

El fragmento del promotor de Satb2 utilizado comprende el mínimo fragmento del mismo necesario para la respuesta al factor Osterix (22). Ha sido amplificado mediante PCR a partir de DNA genómico de ratón, añadiéndole unas colas con las secuencias diana para MluI (5') y XhoI (3') para facilitar su clonaje en pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-GFP. En un primer paso se clonó mediante el método "T-A cloning" en el vector pGEMT (Promega) (pGEMT-Satb2), para facilitar su secuenciación y disponer de otras dianas flanqueantes en caso necesario.

Para obtener el cDNA de la recombinasa Cre, se partió de un plásmido previamente generado en el laboratorio (pHRISIN-Cre), y se amplificó dicho cDNA mediante PCR, añadiéndole asimismo colas con las secuencias diana para XhoI (5') y MluI (3'). Igual que en el caso de Satb2, se realizó un clonaje intermedio en pGEMT (pGEMT-Cre).

e. Construcción de pWPI-PL-DLX5-SCre y pWPI-PL-GFP-SCre (Fig. 1 y 6 del Anexo):

Ambos plásmidos se han construido de manera similar, partiendo, respectivamente, de pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-GFP. Para ello se digirieron pGEMT-Satb2 y pGEMT-Cre con MluI/XhoI, de forma que liberasen sus respectivos insertos. A continuación se hizo una triple reacción

de ligación con pWPI-PL-DLX5 (o pWPI-PL-GFP) digerido con MluI, junto con Satb2 y Cre. Se confirmó el clonaje mediante digestión con MluI. La secuencia de Cre posee un sitio de restricción para BamHI más cercano a extremo 5' que al 3', circunstancia que se aprovechó para analizar la orientación del inserto. Así, al digerir la construcción con BamHI (que se introdujo inicialmente también en la secuencia del plásmido al generar el pWPI-PL), en caso de estar orientado correctamente, se liberaba un fragmento de unos 530pb, y en caso contrario de unos 750pb.

Las enzimas de restricción se han adquirido a New England Biolabs, y los oligonucleótidos empleados en las PCRs son de Sigma.

Para los distintos ensayos se han empleado vectores lentivirales de pWPI-PL-GFP, pWPI-PL-GFP-SCre, pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-DLX5-SCre (Fig. 2). Las partículas virales se han producido 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 48h, los sobrenadantes de estas células, que contienen las partículas virales, se recogen y se ultracentrifugan a 4°C (2h a 26.000 rpm) (23). El título viral se estima mediante PCR cuantitativa, con oligonucleótidos que amplifican específicamente un cDNA presente en la cápside viral. En el caso de los vectores que expresan GFP, tanto el título infectivo como la eficiencia de infección se han calculado en función del porcentaje de células que expresan GFP en citometría de flujo.

2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN ÓSEA IN VITRO DE LAS MSCS TRANSDUCIDAS CON LOS VECTORES GENERADOS.

a. Cultivos celulares y transducción lentiviral:

Se han utilizado MSCs primarias humanas obtenidas a partir de médula ósea (también en el caso de los ensayos in vivo; Lonza), que se han cultivado en condiciones estándar, con medio DMEM (Lonza) más 10%FBS (Hyclone). Para infectar dichas células, se siembran en condiciones de subconfluencia y se añaden los virus (MOI 5) en presencia de polibreno (Sigma) 8mg/ml durante 16h. La eficiencia de infección en el caso de Dlx5 se ha estimado mediante citometría de flujo, en función del porcentaje de células positivas en MSCs infectadas en paralelo con el lentivirus control GFP.

b. Análisis de los niveles y cinética de expresión del transgén:

Para estudiar los niveles de expresión del transgén, se ha realizado una primera aproximación analizando, mediante citometría de flujo, la expresión de GFP a distintos tiempos en MSCs infectadas con pWPI-PL-GFP o pWPI-PL-GFP-SCre sin tratar o cultivadas en condiciones de

diferenciación osteogénica (ver más abajo). Después se ha analizado mediante western blot (anticuerpo anti-Dlx5 adquirido a Sta. Cruz) las variaciones en la expresión de Dlx5 a tiempos seleccionados, en MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5 o pWPI-PL-DLX5-SCre y sometidas a los mismos tratamientos que en el caso del virus GFP.

c. Estudio de la capacidad osteogénica de las MSCs transducidas in vitro:

Las células transducidas con el virus control GFP o los virus codificantes para Dlx5 se cultivan durante dos semanas en medio de diferenciación ósea: medio IMDM suplementado con dexametasona 0.1µM, βglicerofosfato 10mM, y ácido ascórbico 0.2mM. Para analizar el grado de diferenciación in vitro se tiñe el cultivo con Alizarin red y se visualiza en un microscopio de contraste de fases.

d. Análisis del citoesqueleto de actina:

Las células transducidas con los diferentes vectores lentivirales se han fijado 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 5min. Las células así marcadas fueron visualizadas en un microscopio confocal SP5 (Leica).

3. ANÁLISIS DEL POTENCIAL OSTEOGÉNICO IN VIVO DE LOS IMPLANTES CERÁMICOS EN PRESENCIA DE LAS MSCS MODIFICADAS.

a. Formación de implantes cerámicos:

Las MSCs transducidas con los distintos vectores (aprox. 10^6 células) se colocan en tubos de 50ml con 0.1g de gránulos de cerámica bifásica (MBCP, Biomaterial) y son cultivadas en esas condiciones durante dos días. Entonces se añadirán 100ml de DMEM completo junto con trombina (Sigma) disuelta en 0.22mM CaCl₂, y fibrinógeno (Sigma), incubándose durante dos horas en condiciones estándar de cultivo celular. La mezcla se inocula subcutáneamente en ratones inmunodeficientes NOD/SCID. Los animales se sacrifican 15 días después de la inoculación, o en caso de que presenten signos de enfermedad (lordosis, alopecia, apnea, etc). En todos los casos, los implantes se extraen para su estudio mediante técnicas de imagen (microCT) y análisis histológico. Se han incluido además implantes que combinen BMP-2 con células transducidas con el vector control GFP, para poder evaluar adecuadamente la capacidad osteogénica de las MSCs modificadas frente al factor (21).

b. Para su **análisis histológico**, los implantes cerámicos se fijan en formalina y posteriormente se decalcifican mediante su tratamiento con Osteosoft (Merck Millipore) durante 48h, siendo procesados posteriormente para su inclusión en parafina. En todos los casos se ha realizado

una tinción estándar con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y Alcian Blue. En algunos casos, además, se ha llevado a cabo inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-vimentina humana (Abcam).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos ha sido llevado a cabo mediante ANOVA, seguido del test de Dunnet para comparaciones múltiples. Se considera que existe significación estadística cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

Se han construido vectores lentivirales que codifican para Dlx5 y para GFP (virus control, que permite monitorizar la eficiencia de infección y la eficacia del sistema de delección del gen diana). Se ha empleado como base un vector lentiviral auto-inactivador, (SIN, self-inactivating), que tiene delecionada la secuencia enhancer/promotora del U3 viral situado en el LTR 3'. Para dirigir la expresión del transgén, se ha utilizado el promotor eucariota de EF-1 α , que permite obtener unos 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 ha generado un vector dual que, además de Dlx5 (o GFP) expresando bajo el control del promotor de EF-1 α , codifica para la recombinasa Cre dirigida por el fragmento mínimo del promotor de Sabt2 que contiene los elementos de respuesta a Osterix (22). Por otro lado, el vector de partida contiene 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 copia a ambos lados del DNA del provirus, que de esta manera queda flanqueado por secuencias LoxP (24). Así, en ausencia de Osterix, Dlx5 es sintetizada y pone en marcha el mecanismo de diferenciación osteogénica. Conforme avanza el proceso, el aumento de niveles de Osterix activaría la expresión de Cre, dando como resultado la delección del DNA del provirus (que incluye tanto Dlx5 como Cre, evitando también de esta manera la posible toxicidad derivada de la sobreexpresión mantenida de la recombinasa) (Fig. 1).

Durante el proceso de construcción de los vectores lentivirales, se generaron dos construcciones adicionales que carecen de la recombinasa Cre, y que por tanto expresan Dlx5 y GFP de forma constitutiva, no regulable por la diferenciación ósea (pWPI-PL-GFP y pWPI-PL-DLX5, ver "Materiales y Metodología"). Durante el estudio, estas construcciones serán empleadas como controles de expresión y funcionales de sus contrapartidas de expresión autolimitada (Fig. 2).

2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES Y CINÉTICA DE EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN

Para comprobar que el clonaje de los vectores lentivirales de Dlx5 en sus dos versiones (sin y con Cre) se había realizado correctamente, se transfectaron células HEK 293T con dichos plásmidos lentivirales, en paralelo con el pWPI-PL-GFP como control. Se analizó la expresión de Dlx5 en estas células mediante western blot (Fig. 3), y se pudo comprobar que en ambos casos Dlx5 se expresaba de forma adecuada y en cantidades equivalentes.

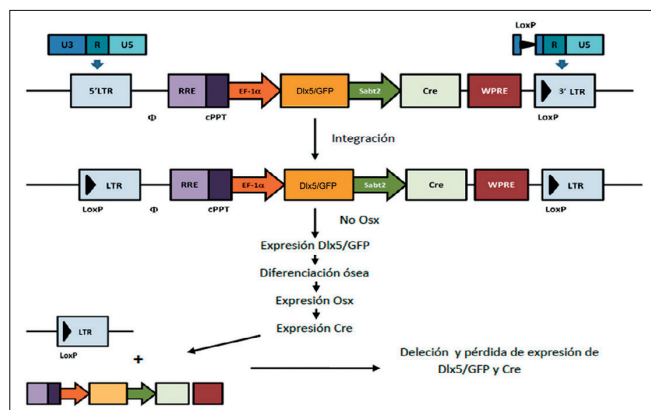


Figura 1. Diseño de los vectores lentivirales empleado en el estudio y estrategia de expresión autolimitada del transgén.

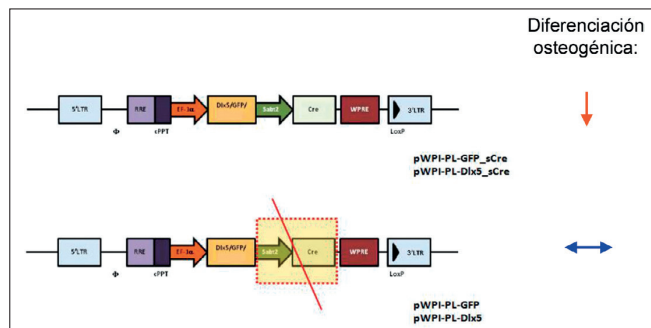


Figura 2. Vectores lentivirales empleados en el estudio y comportamiento esperado de su expresión en condiciones de diferenciación osteogénica.

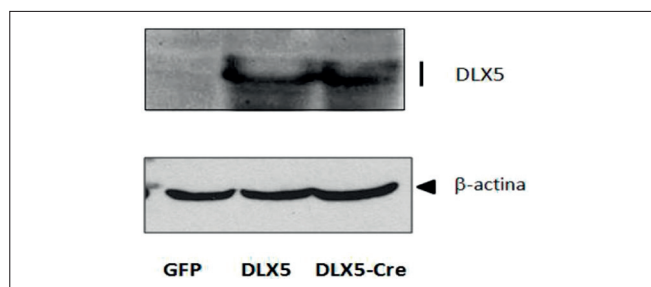


Figura 3. Expresión de Dlx5 en células HEK 293T trasfectadas. Se transfectaron células HEK 293T con los vectores pWPI-PL-GFP (GFP), pWPI-PL-DLX5 (DLX5) y pWPI-PL-DLX5_sCre (DLX5-Cre), y 48 h. después se analizó la expresión de DLX5 mediante western blot. La expresión de β -actina de muestra como control de igualdad de carga.

Para evaluar si el sistema de regulación de la expresión de Cre en respuesta a la diferenciación osteogénica funcionaba correctamente, se infectaron MSCs humanas con pWPI-PL-GFP o pWPI-PL-GFP_sCre en las condiciones previamente seleccionadas (MOI 5, 8µg/ml de poli-breno). Dos días después se comenzó el protocolo de diferenciación in vitro, añadiendo medio de diferenciación osteogénica o control cada dos días y analizando la expresión de GFP a día 2, 6 y 12 tras la infección (días 0, 4 y 10 de diferenciación). Como se muestra en la Fig. 4, la expresión de GFP en las células infectadas con pWPI-PL-GFP se modificaba mínimamente con el tiempo y de forma idéntica en células control o con medio de diferenciación osteogénica. Por el contrario, en aquellas células infectadas con pWPI-PL-GFP_sCre, la expresión de GFP disminuía considerablemente a tiempos largos en células sometidas a diferenciación. Es de señalar que la expresión de GFP ya en condiciones control era menor en pWPI-PL-GFP_sCre que en el caso de pWPI-PL-GFP, lo cual sugería la presencia de un fenómeno de “escape” de la expresión de Cre en condiciones basales.

A continuación se analizó el nivel de expresión de Dlx5 en MSCs infectadas con pWPI-PL-DLX5 o pWPI-PL-DLX5_sCre a distintos tiempos mediante western blot (Fig. 5). En paralelo se infectaron células con pWPI-PL-GFP como control negativo, y para evaluar por citometría la eficiencia de infección, que fue del 90% (Fig. 5A). En células infectadas con pWPI-PL-DLX5, se evidenciaba expresión de Dlx5 ya desde dos días tras la infección, de forma continuada en el tiempo. Por el contrario, y de acuerdo con el posible escape que sugerían los experimentos hechos con GFP, no se detectaba expresión de Dlx5 en el caso de pWPI-PL-DLX5_sCre en ninguno de los tiempos analizados (Fig. 5B).

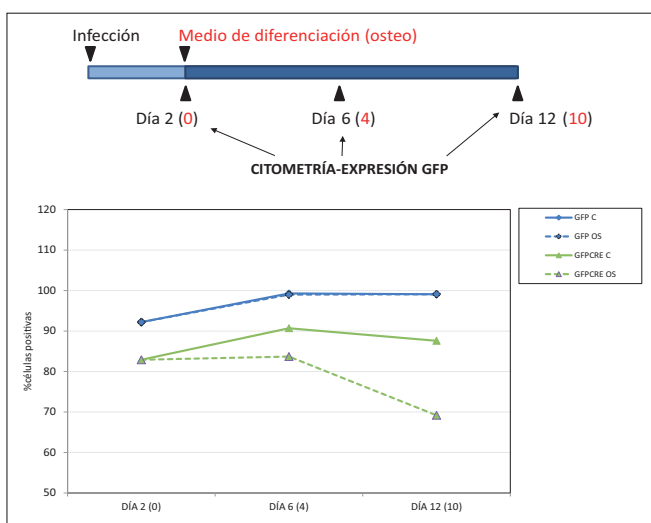


Figura 4. Cinética de expresión de pWPI-PL-GFP y pWPI-PL-GFP_sCre en condiciones de diferenciación ósea. MSCs transducidas con pWPI-PL-GFP (GFP) y pWPI-PL-GFP_sCre (GFP CRE), fueron cultivadas con medio de diferenciación ósea (OS) o control (C), y la expresión de GFP se analizó mediante citometría de flujo. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas para GFP en cada condición experimental.

3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD OSTEOGÉNICA DE LAS MSCS TRANSDUCIDAS IN VITRO

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 (Fig. 6). 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 adoptan 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 per se un proceso 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 ha descrito que la diferenciación osteogénica está acompañada de cambios característicos en el citoesqueleto de actina de las MSCs (25, 26). Durante este proceso, se hacen patentes haces de actina perinucleares que “enmarcan” el cuerpo celular, de conformación poligonal, mostrando abundantes fibras de stress y un aumento de la polimerización de actina. Por este motivo, se llevó a cabo un análisis del citoesqueleto de actina de MSCs transducidas con los diversos virus, mediante

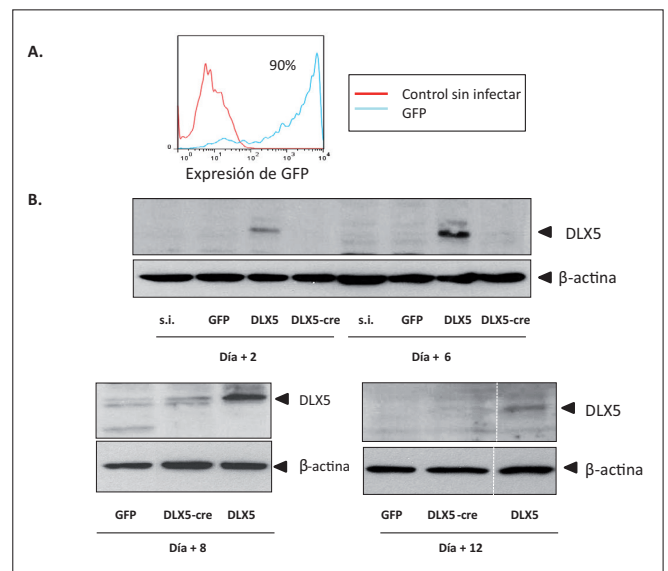


Figura 5. Cinética de expresión de pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-DLX5_sCre. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5_sCre (DLX5-cre) y pWPI-PL-GFP (GFP) como control. El apartado **A** muestra la expresión mediante citometría de flujo de GFP en MSCs transducidas, como estimación de la eficiencia de infección. En el apartado **B** se muestra la expresión mediante western blot de DLX5 a distintos tiempos después de la infección, en células no transducidas (s.i.) o transducidas con los distintos vectores según se indica. Como control de igualdad de carga, se muestra la expresión de β-actina en cada caso.

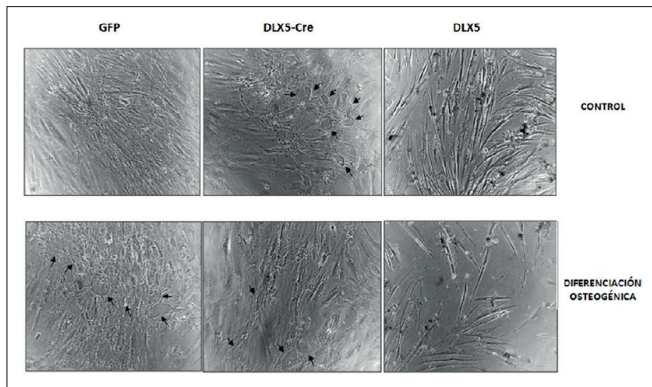


Figura 6. Cambios morfológicos observados en MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-GFP (GFP) como control, y 2 días después se comenzó a cultivarlas en medio de diferenciación osteogénica o control. Cinco días después 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.

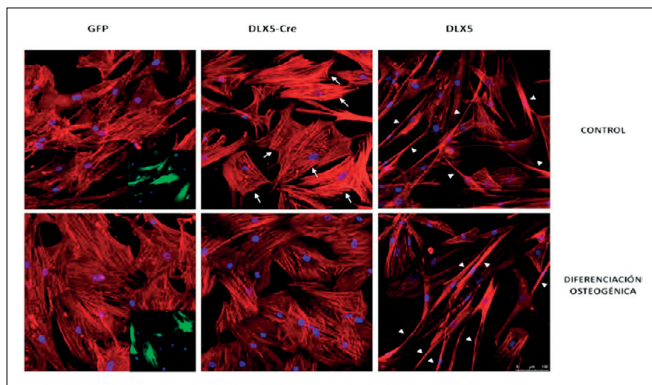


Figura 7. Cambios en el citoesqueleto de actina en MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5_sCre (DLX5-Cre), pWPI-PL-DLX5 (DLX5), y pWPI-PL-GFP (GFP) como control. Dos días después de la transducción se comenzó el proceso de diferenciación con medio osteogénico. Cinco 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.

su tinción con faloidina marcada con Texas Red (Fig. 7). Las células transducidas con pWPI-PL-DLX5_sCre, mostraban cambios en su citoesqueleto idénticos a los descritos para el proceso de diferenciación osteogénica 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 Alizarin Red, que pone de manifiesto la presencia de precipitados de calcio en el cultivo (Fig. 8). Se pudo comprobar que las células infectadas con pWPI-PL-DLX5_sCre presentaban pequeños focos aislados de diferenciación osteogénica, mientras que en las infectadas con pWPI-PL-DLX5 mostraban un grado de diferenciación basal considerablemente mayor.

4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD OSTEOGÉNICA DE LAS MSCS TRANSDUCIDAS IN VIVO

A continuación se procedió a estudiar el potencial osteogénico in vivo de las células transducidas con los diversos vectores lentivirales. Dada su elevada dependencia del microambiente, el potencial de diferenciación de las MSCs puede variar cuando se analiza in vivo (21), de manera que los ensayos con implantes cerámicos subcutáneos en ratón eran fundamentales para evaluar de

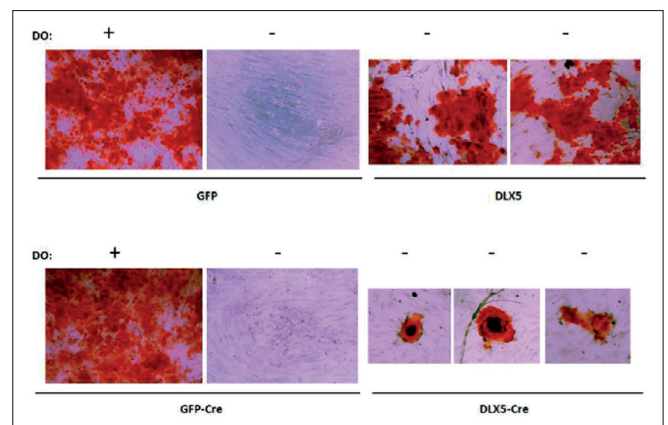


Figura 8. Potencial osteogénico in vitro de las MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5_sCre (DLX5-Cre), pWPI-PLDLX5 (DLX5), pWPI-PL-GFP (GFP) y pWPI-PL-GFP (GFP-Cre). Dos días después de la transducción se comenzó el proceso de diferenciación con medio osteogénico (DO) 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.

forma adecuada la validez del sistema. 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 pudo observar que existía un incremento significativo en la misma frente al control en aquéllos que llevaban MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5_sCre, de una magnitud similar a la obtenida en los implantes que llevaban BMP-2 (Fig. 9A). También se obtuvo un aumento de BMD en los implantes de MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5, si bien en este caso no era significativo estadísticamente. Para evitar que variaciones en la cantidad de cerámica de partida pudieran artefactuar la medida, se normalizaron los valores de BMD frente al porcentaje de hueso presente en cada implante, obteniéndose un resultado similar, si bien ahora el incremento obtenido con pWPI-PL-DLX5 alcanzó significación estadística (Fig. 9B).

Seguidamente se llevó a cabo el análisis histológico de estos implantes, al igual que de los procedentes de un segundo experimento (Figs. 10-12). En ambos casos, la tinción con hematoxilina-eosina puso de manifiesto en los implantes GFP+BMP-2, Dlx5_sCre y Dlx5 la presencia de áreas similares de escasa celularidad con tinción homogénea para eosina, sugerentes de osteoide. Estas áreas resultaron ser positivas para colágeno tipo I en la tinción con tricrómico de Masson, lo cual apoyaba esta hipótesis. Es de resaltar que, según la tinción con

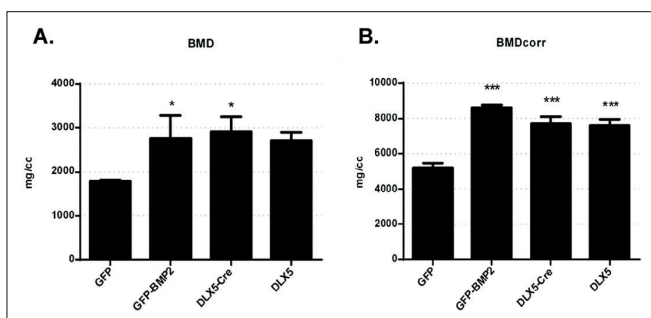


Figura 9. Cuantificación de la densidad mineral de los implantes subcutáneos con MSCs transducidas. Se transdujeron MSCs con pWPI-PL-GFP (GFP), pWPI-PL-OLX5_sCre (OLX5-Cre) y pWPI-PL-OLX5 (OLX5), y fueron incluidas en implantes cerámicos, que se colocaron subcutáneamente en ratones NOO/SCIO. En parte 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 (BMO) se cuantificó con μ CT. La gráfica en **A** muestra la media \pm SO de BMO en los distintos implantes ($n=3$). En **B** se representa la media \pm SO de BMO corregida con el porcentaje de hueso en cada implante ($n=3$). *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$.

anti-vimentina, en el caso de Dlx5_sCre y Dlx5 la presencia de zonas de osteoide se circunscribía a aquéllas donde se encontraban células de origen humano, es decir, la formación de hueso se limitaba a las áreas donde se encontraban las MSCs transducidas. Por último, en los implantes con Dlx5_sCre y Dlx5, pero no en los implantes GFP+BMP-2, la tinción con Alcian Blue era positiva también en dichas áreas, indicando la presencia de cartilago y sugiriendo un posible proceso de osificación endocondral.

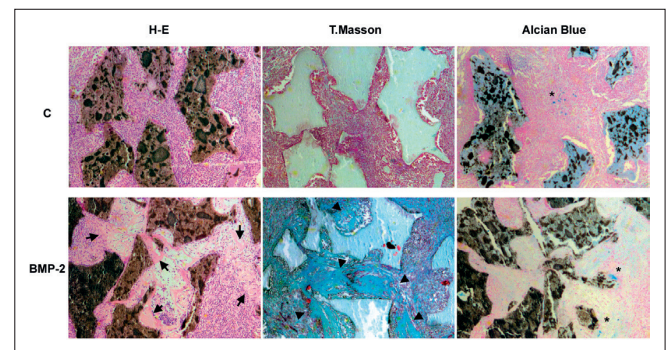


Figura 10. Análisis histológico de los implantes con MSCs GFP. Los implantes que contenían MSCs transducidas con pWPI-PL-GFP, control (C) o con BMP-2, fueron extraídos tras 14 días, procesados y teñidos con hematoxilina-eosina (H-E), tricrómico de Masson (T.Masson) y Alcian Blue. En los implantes con BMP-2 se aprecian zonas positivas para eosina sugerentes de osteoide (flechas), que se tiñen para colágeno tipo 1 con Masson (puntas de flecha); asimismo se detectan pequeñas zonas positivas para Alcian Blue (asteriscos).

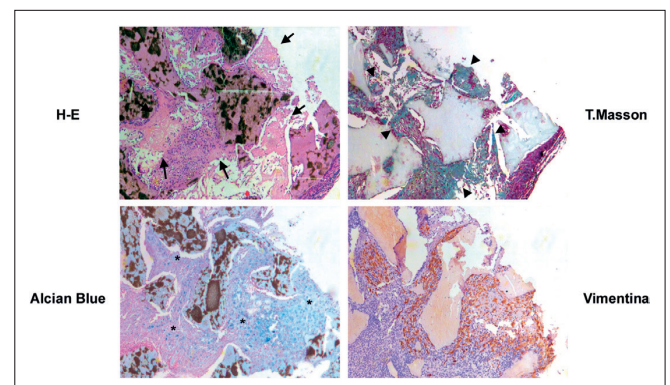


Figura 11. Análisis histológico de los implantes con MSCs DLX5-Cre. Los implantes que contenían MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5_sCre fueron procesados y teñidos con hematoxilina-eosina (HE), tricrómico de Masson (T. Masson), Alcian Blue y anticuerpo anti-vimentina humana. Las fotos muestran campos representativos de los implantes, donde se aprecian zonas positivas para eosina sugerentes de osteoide (flechas), que se tiñen para colágeno tipo 1 con Masson (puntas de flecha); asimismo se detectan grandes áreas positivas para Alcian Blue (asteriscos), solapadas con las positivas para Masson. La tinción con anti-vimentina muestra la presencia en estas zonas de las MSCs incluidas en los implantes.

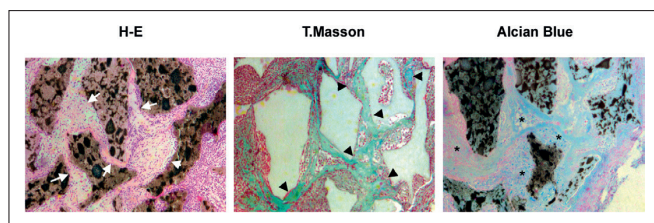


Figura 12. Análisis histológico de los implantes con MSCs DLX5. Los implantes que contenían MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5 fueron procesados y teñidos con hematoxilina-eosina (H-E), tricrómico de Masson (T. Masson), y Alcian Blue. Las fotos muestran campos representativos de los implantes, donde se aprecian zonas positivas para eosina sugerentes de osteoide (flechas), que se tiñen para colágeno tipo 1 con Masson (puntas de flecha); asimismo se detectan grandes áreas positivas para Alcian Blue (asteriscos), solapadas con las positivas para Masson.

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.

Tras la generación de los vectores lentivirales, se llevó a cabo una primera aproximación, analizando por citometría los cambios de expresión de GFP en MSCs transducidas con pWPI-PL-GFP y pWPI-PL-GFP_sCre, en presencia de condiciones de diferenciación ósea. Los datos obtenidos indicaban que la expresión de GFP en el caso de MSCs infectadas con pWPI-PL-GFP_sCre estaba regulada por el proceso de diferenciación ósea, si bien sugerían que había cierta expresión basal de Cre ("escape") independiente de esta regulación, que podía afectar a los niveles de expresión del transgén en condiciones control (Fig. 4). Esta idea venía apoyada por unos experimentos realizados en paralelo, donde se coinfectaron MSCs con pWPI-PL-GFP y un vector lentiviral que expresa Cre de forma independiente (pHRSIN Cre), en los que el resultado fue similar. El hecho de que Dlx5 se expresara al mismo nivel en células HEK 293T transfectadas con pWPI-PL-DLX5 o pWPI-PL-DLX5_sCre (Fig. 3), donde el provirus no se ha integrado, va en la misma línea, ya que en este caso no se habría producido la duplicación del LTR 3', y no tendría lugar la delección del casete aún en presencia de Cre activa. Para comprobar este extremo, será necesario el análisis de la expresión de Dlx5 en MSCs transducidas a tiempos más tempranos tras la infección, así como el estudio de la presencia del provirus en el DNA genómico de dichas células mediante PCR.

La posibilidad de un escape a la regulación en la expresión de Cre, que dé lugar a la eliminación temprana de la expresión de Dlx5 en el caso del pWPI-PL-DLX5_sCre,

puede deberse a causas transcripcionales. Así, la presencia de factores de transcripción activos en condiciones basales, que reconozcan los sitios de respuesta a Osterix en el promotor de *Satb2* (p.e. Sp1) (22), podría dar cuenta de este efecto. Sin embargo, es bastante probable que este problema sea debido a elementos reguladores presentes en el DNA genómico de la célula huésped, adyacentes al sitio de inserción del provirus. Se han descrito elementos en el genoma de diversas especies denominados "aisladores", que se utilizan para solventar esta situación (27), y que podrían ser empleados también en nuestro caso.

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, aun en ausencia de expresión detectable de Dlx5 a los tiempos analizados, 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 (18). 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 (28), 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 (21), 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 osteoclastica con osteopenia (29), lo que sugiere que podría haber un efecto a ese nivel.

A diferencia de lo que ocurre con los implantes GFP+BMP-2, los Dlx5 presentan un mayor grado de diferenciación condrogénica en áreas que se superponen con las de formación de hueso. Esto podría indicar la

existencia de osificación endocondral; de hecho hay varios trabajos que documentan el papel fundamental de Dlx5 en la diferenciación de los condrocitos durante este proceso (30,31).

Aunque 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.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante la realización del presente proyecto, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Se han generado vectores lentivirales que codifican para el factor regulador de la diferenciación osteogénica Dlx5 de forma constitutiva (pWPI-PL-DLX5) y de forma autolimitada durante el proceso de diferenciación (pWPI-PL-DLX5_sCre), así como sus contrapartidas control con la proteína fluorescente GFP.
2. La expresión de estas proteínas en MSCs transducidas es detectable en todos los casos a los tiempos analizados, salvo en el de pWPI-PL-DLX5_sCre, probablemente por expresión de la recombinasa Cre en condiciones basales, aunque la confirmación de esta posibilidad requiere de estudios más exhaustivos a nivel de DNA y proteína. La inclusión en el vector de secuencias aisladoras del DNA genómico de la célula huésped probablemente contribuirá a solventar este aspecto.
3. La expresión transitoria de Dlx5 en MSCs es suficiente para inducir cambios morfológicos y redistribución del citoesqueleto de actina similares a los que ocurren in vitro durante la diferenciación ósea con medio de cultivo específico, y diferentes a los obtenidos con la expresión mantenida del factor. En todos los casos se observa la aparición de depósitos de calcio en el cultivo, si bien en menor cuantía en el caso de pWPI-PL-DLX5_sCre.
4. Las MSCs modificadas con pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-DLX5_sCre forman tejido óseo en implantes subcutáneos con igual eficiencia que MSCs control en presencia del factor osteogénico BMP-2. La existencia de áreas de diferenciación condrogénica que solapan con las de formación de hueso en el caso de Dlx5 (constitutivo o de expresión autolimitada) sugiere un proceso de osificación endocondral. 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.
5. 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. Sin embargo, se necesitarían estudios sistemáticos para evaluar los posibles riesgos de bioseguridad (es de esperar que sean mínimos, teniendo en cuenta estas características, así como el sistema lentiviral empleado). Alternativamente, este vector puede servir de base para el diseño de otras estrategias de vehiculización para su aplicación clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. European Markets for Dental Implants, Final Abutments and Computer Guided Surgery 2011". iData Research; 636 (2010).
2. Panetta N, et al. 2009 *Pannminerva Med.* 51: 25-41.
3. Kang Y, et al. 2011 *Biomaterials* 32(26): 6119-6130.
4. Guan M, et al. 2012 *Nat Med* 18(3):456-62.
5. da Silva Meirelles L, et al. 2008 *Stem cells.* 26: 2287-2299.
6. Kuznetsov SA, et al. 2001 *J.Cell.Biol.* 153: 1133-1140.
7. Uccelli A, et al. 2008 *Nat. Rev. Immunol* 8: 726-736
8. da Silva Meirelles L, et al. 2006 *J.Cell.Sci.* 119: 2204-2213.
9. Annabi B, et al. 2004 *J. Cell Biochem.* 91:1146-1158.
10. Ruster B, et al. 2006 *Blood.* 108: 938-3944.
11. Schinke T, et al. 2008 *Principles of bone biology* 3rd ed. Chapter 5: 109-119.
12. Komori T, et al. 1997 *Cell* 89: 755-764.
13. Nakashima K, et al. 2003 *Trends in Genetics* 19 (8): 458-466.
14. Ryoo H, et al. 2006 *Gene* 366: 51-57.
15. Egermann M, et al. 2006 *Hum Gene Ther* 17:507-517.
16. Zhao Z, et al. 2005 *Mol Ther* 12: 247-253.
17. Mátrai J, et al. 2010 *Mo Ther* 18 (3): 477-490.
18. Noël D, et al, 2004 *Stem Cells* 22:74-85.
19. Abarrategi A, et al. 2008 *Biomacromolecules.* 9;711-718.
20. Abarrategi A, et al. 2010 *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 95A;1132-1141.
21. Abarrategi A, et al.2013. "In vivo ectopic implantation model to assess human mesenchymal progenitor cell potential." *Stem Cell Rev;* 9(6):833-46.
22. Tang W, et al. *J Biol Chem* 2011; 286 (38): 32995-33002.
23. Urso K, et al. *Blood* 2011; 118(3):795-803
24. Pfeifer A, et al. 2001 *PNAS* 98 (20): 11450-11455.
25. 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(4):721-31.
26. Petra Müller, Anne Langenbach, Alexander Kaminski, Joachim Rychly. "Modulating the Actin Cytoskeleton Affects Mechanically Induced Signal Transduction and Differentiation in Mesenchymal Stem Cells". *PLoS One* 2013; 8(7): e71283.
27. David W. Emery. "The Use of Chromatin Insulators to Improve the Expression and Safety of Integrating Gene Transfer Vectors". *Human Gene Therapy* 2011; 22:761-774
28. Muraglia A , et al. "DLX5 overexpression impairs osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells." *Eur J Cell Biol.* 2008 Oct;87(10):751-61.
29. Samee N, et al. "Increased bone resorption and osteopenia in Dlx5 heterozygous mice " *J Cell Biochem.* 2009 Aug 1;107(5):865-72.
30. Ferrari D, et al. "Dlx5 is a positive regulator of chondrocyte differentiation during endochondral ossification ". *Dev Biol.* 2002 Dec 15;252(2):257-70.
31. Bendall AJ, et al. "Dlx5 regulates chondrocyte differentiation at multiple stages." *Int J Dev Biol.* 2003 Jun;47(5):335-44.

ANEXOS

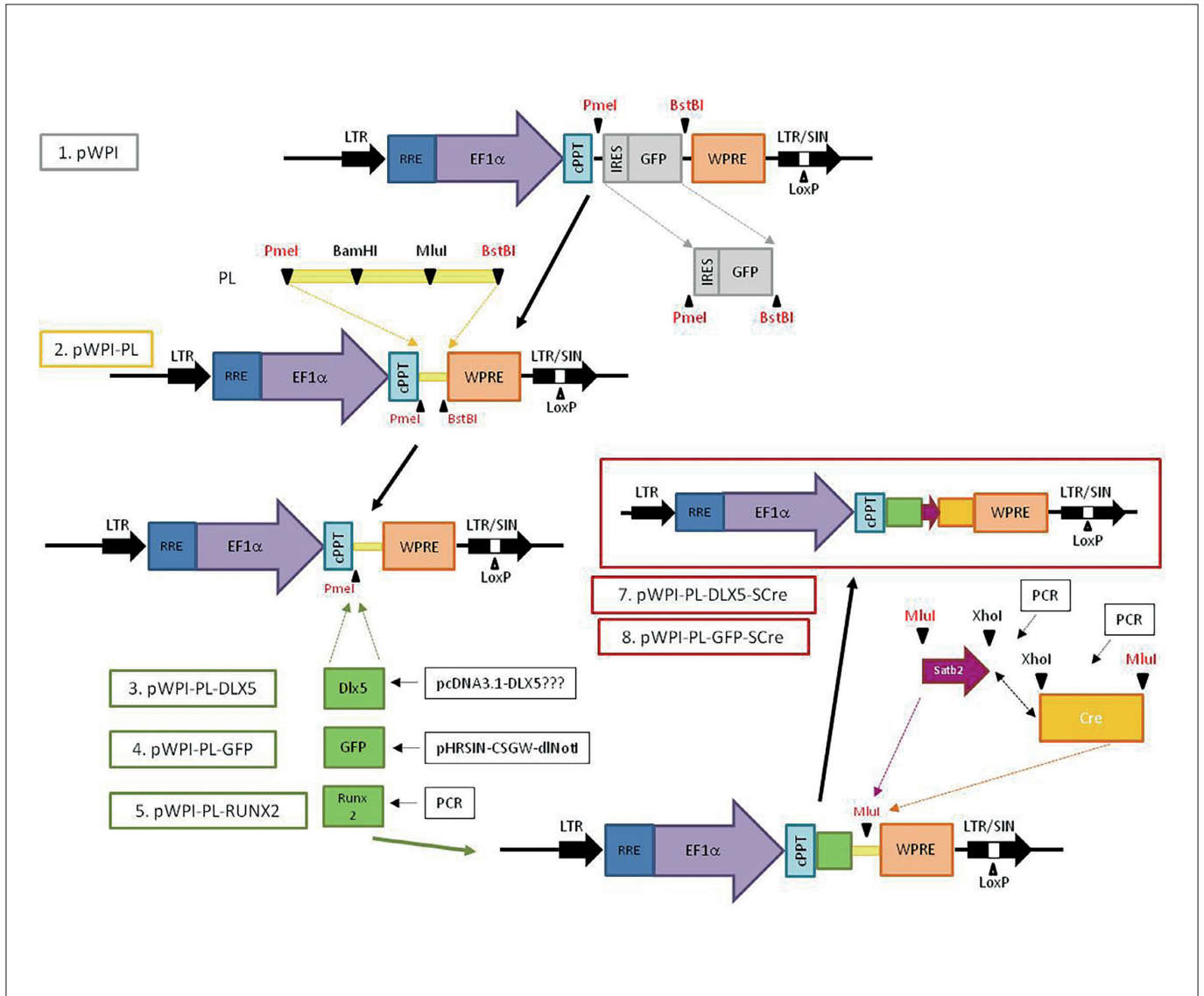


Figura 1. Estrategia de clonaje para los vectores lentivirales empleados en el estudio.

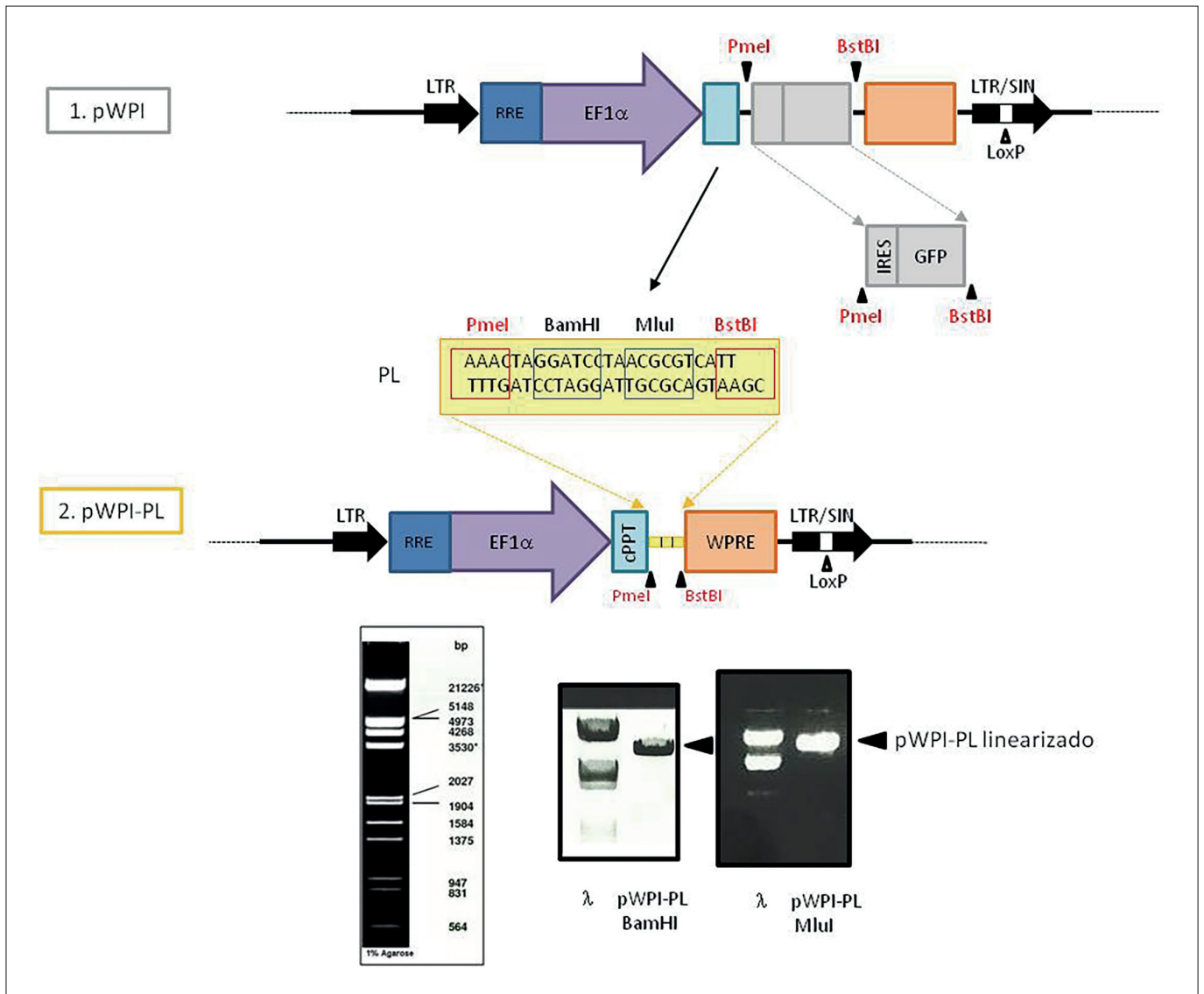


Figura 2. Construcción de pWPI-PL.

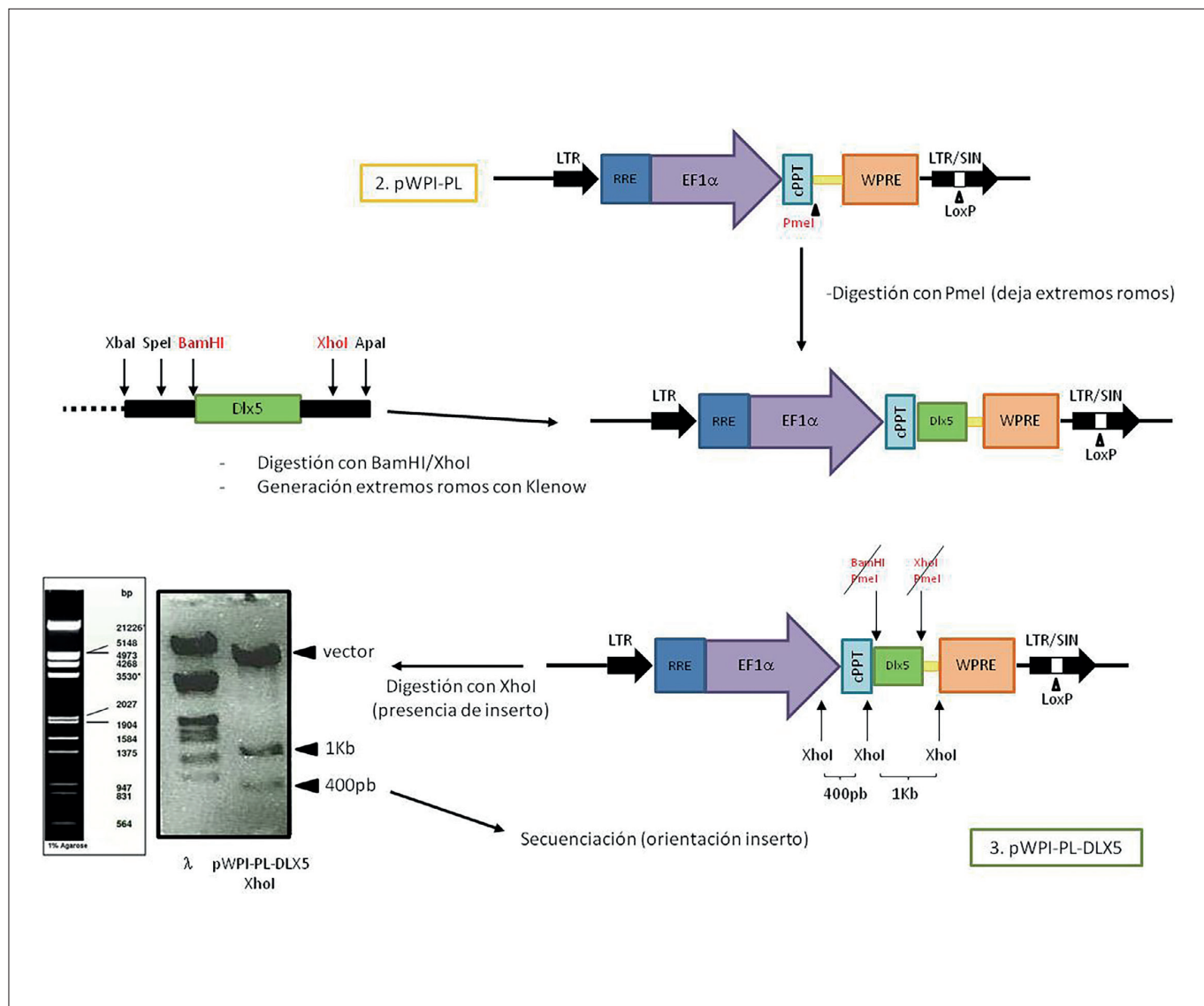


Figura 3. Construcción de pWPI-PL-DLX5.

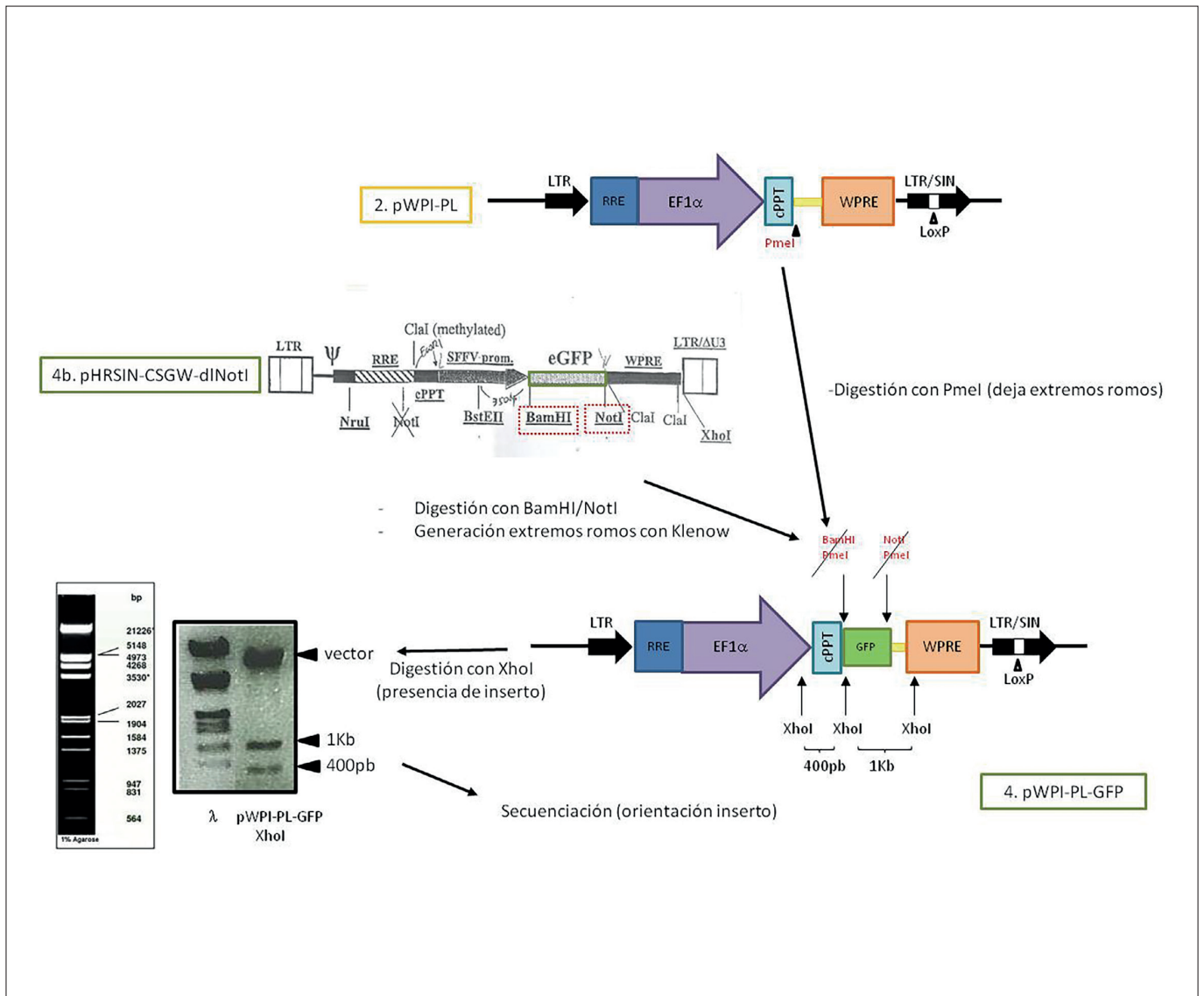


Figura 4. Construcción de pWPI-PL-GFP.

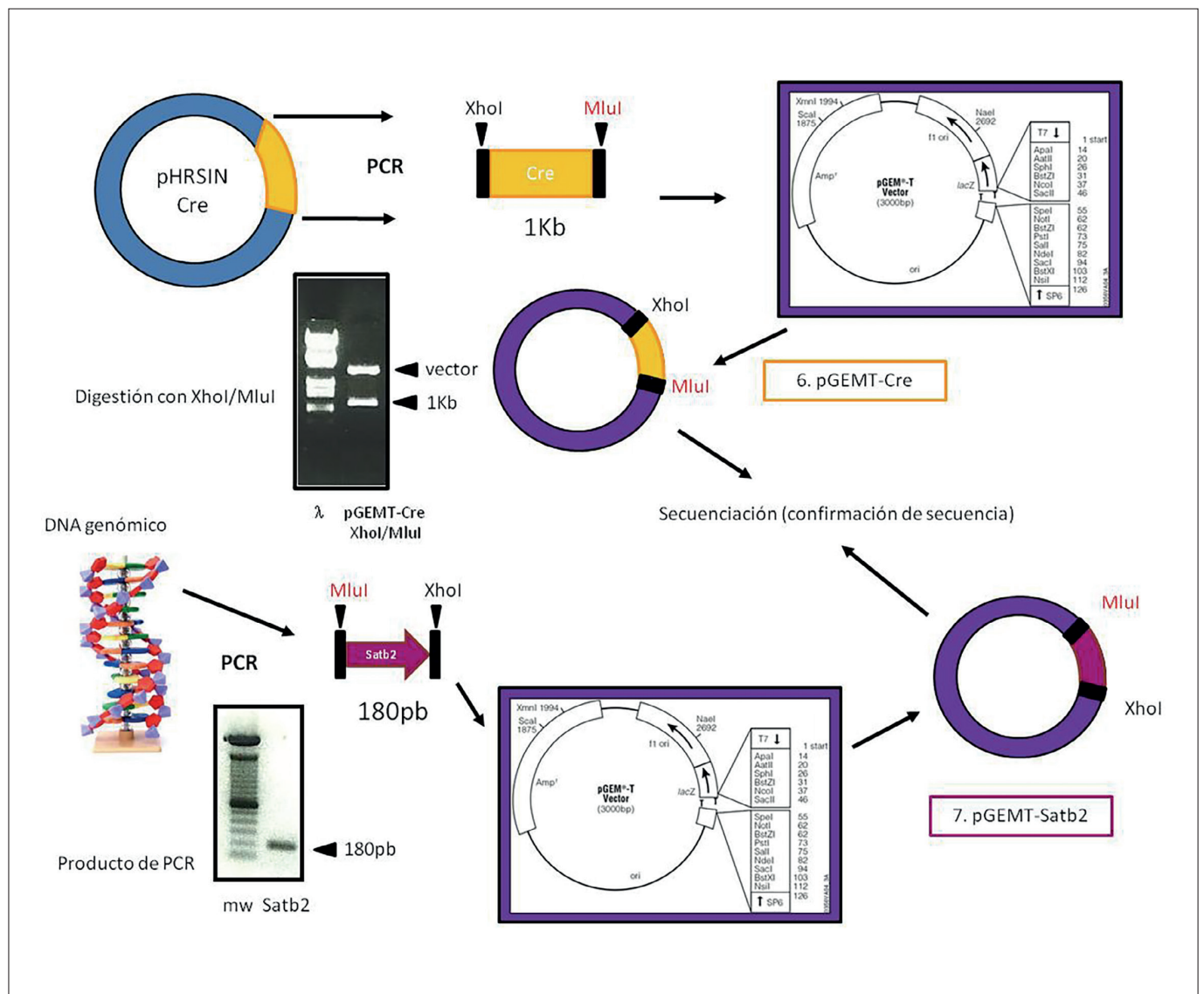


Figura 5. Clonaje del promotor de SATB2 y el cDNA de CRE.

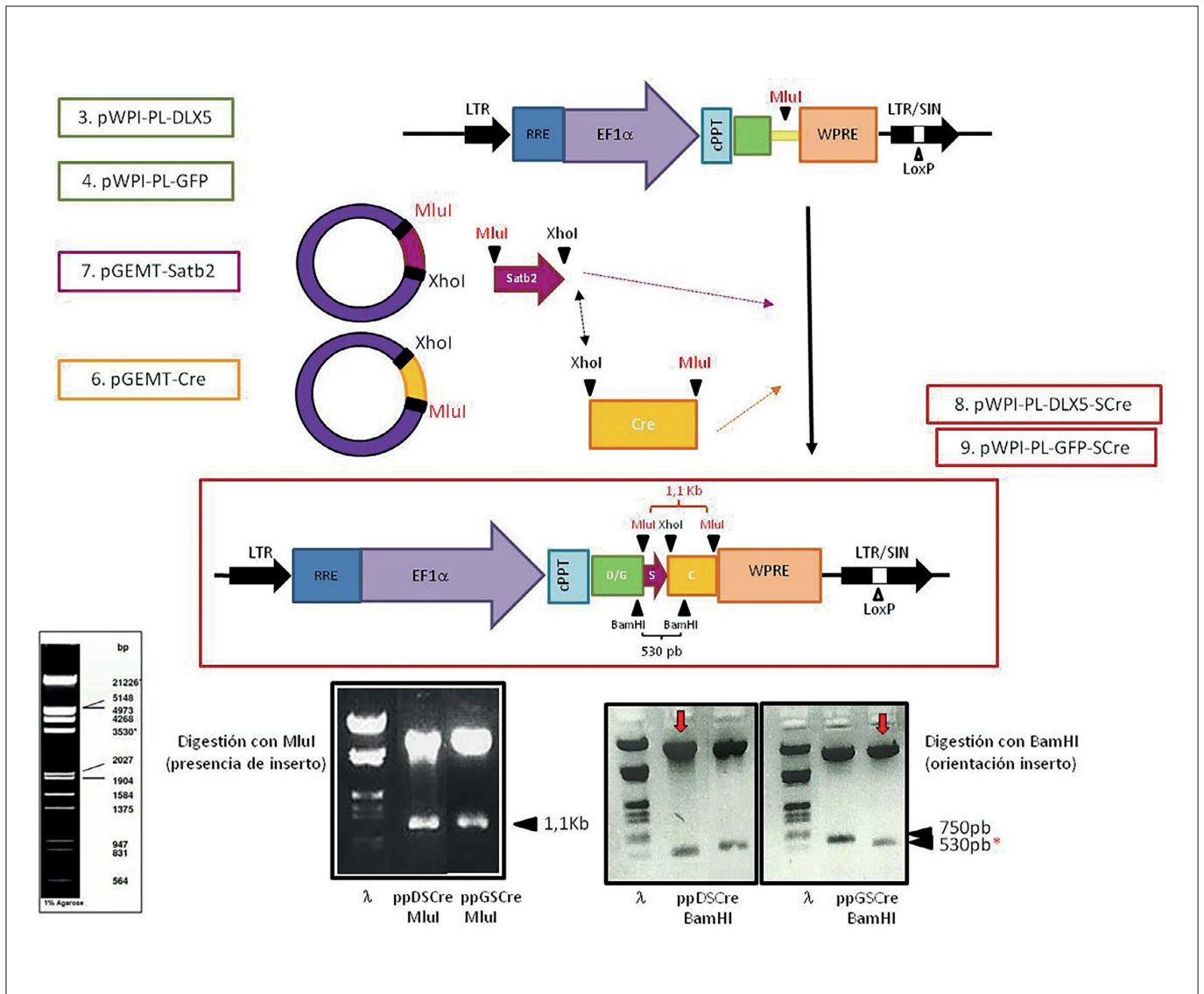


Figura 6. Clonaje de pWPI-PL-Dlx5_{sCre} y pWPI-PL-GFP_{sCre}.