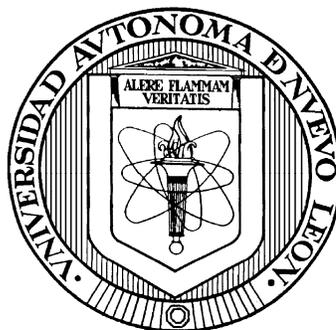


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA OSTEOGÉNESIS INDUCIDA *IN VITRO* EN CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE POR  
COMBINACIONES DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO 2, 7 Y  
9 EN UN MODELO OVINO**

**POR**

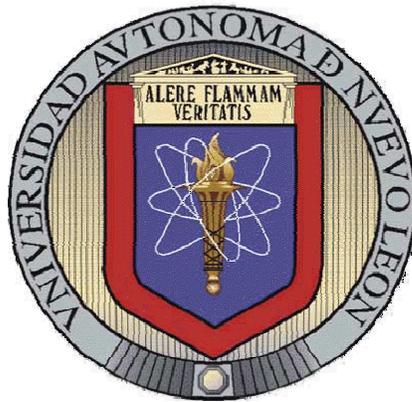
**Q.B. GISSELA BORREGO SOTO**

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

**Enero 2010**

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA OSTEOGÉNESIS INDUCIDA *IN VITRO* EN CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE POR  
COMBINACIONES DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO 2, 7 Y  
9 EN UN MODELO OVINO**

**POR**

**Q.B. GISSELA BORREGO SOTO**

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

**Enero 2010**

**EVALUACIÓN DE LA OSTEOGÉNESIS INDUCIDA *IN VITRO* EN CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE POR  
COMBINACIONES DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO 2,  
7 Y 9 EN UN MODELO OVINO**

Aprobación de tesis:

---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Director de Tesis

---

**DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Co- Director de Tesis

---

**DR. GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS**  
Co-Director de Tesis

---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Director de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la Co-Dirección de la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez y el Dr. Gerardo Raymundo Padilla Rivas.

Vo.Bo.

---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**

Director de Tesis

## **AGRADECIMIENTOS**

# TABLA DE CONTENIDO

---

<b>RESUMEN</b>	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>LISTA DE TABLAS</b>	vii
<b>LISA DE ABREVIATURAS</b>	viii

<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Antecedentes	2
1.1.2. Prevalencia de desórdenes óseos	2
1.1.3. Osteogénesis y marcadores óseos	4
1.1.4. Células Madre Mesenquimales (CMMs)	6
1.1.5. Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs)	10
1.1.5.1. Señalización	14
1.1.5.2. BMPs en ensayos clínicos y pre-clínicos	14
1.1.6. Terapia Génica para la regeneración de tejido	16
1.2. Justificación	18
<b>II. OBJETIVOS</b>	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos particulares	19
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
3.1. Material biológico	20
3.1.1. Bacterias competentes y células de tejido adiposo y medula ósea.	20
3.1.2. Plásmidos	20
3.1.3. Vectores virales	20

3.2.	Materiales y reactivos	20
3.3.	Estrategia general	23
3.4.	Extracción de CMM de <i>Ovis aries</i>	24
3.4.1.	Extracción de CMM a partir de médula ósea	24
3.4.2.	Extracción de CMM a partir de tejido adiposo	24
3.5.	Fenotipificación de CMM	25
3.6.	Generación de vectores virales	25
3.6.1.	Construcción del plásmido pShuttle-BMP9	25
3.6.2.	Construcción del genoma adenoviral pAd-BMP9	28
3.6.3.	Secuenciación parcial de pAd-BMP9	28
3.6.4.	Producción de vectores adenovirales	28
3.6.5.	Purificación de vectores	29
3.6.6.	Titulación en placa de adenovirus con células HEK 293 (TCID <sub>50</sub> )	29
3.6.7.	Determinación óptica de partículas virales	30
3.7.	Ensayos de transducción y co-transducción con vectores adenovirales AdBMP2, AdBMP7 y AdBMP9	31
3.8.	Ensayos de expresión de los marcadores osteogénicos osteocalcina y osteopontina por PCR tiempo real, cuantificación relativa.	31
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	33
4.1.	Extracción y cultivo de CMM a partir de Tejido adiposo y medula ósea	33
4.2.	Fenotipificación por Citometría de Flujo de CMM de tejido adiposo y medula ósea	34
4.3.	Generación de vectores virales	36
4.4.	Ensayos de expresión de osteocalcina y osteopontina	41

<b>V. DISCUSIÓN</b>	50
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	54
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	55

**RESUMEN**  
**Q.B. Gissela Borrego Soto**

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.**

Fecha de graduación: Enero 2010

Área de estudio: Terapia Génica

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología**

**Molecular e Ingeniería Genética.**

Número de Páginas: 65

**Título del Estudio: “EVALUACIÓN DE LA OSTEOGÉNESIS INDUCIDA *IN VITRO* EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE POR COMBINACIONES DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO 2, 7 Y 9 EN UN MODELO OVINO”.**

**Antecedentes:** Los ensayos preclínicos en mamíferos grandes para regeneración articular representan un gran reto. Las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs) estimulan la osteogénesis a partir de células madre mesenquimales (CMM), siendo las BMP2, BMP4, BMP7 y BMP9 las de mayor potencial. Se ha reportado que las BMPs incrementan su actividad en sus formas heterodiméricas.

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue inducir osteogénesis a través de CMMs, transducidas por combinaciones de vectores adenovirales, portadores de los genes BMP2, 7 y 9 y evaluar su potencial osteogénico *in vitro*.

**Materiales y Métodos:** Se aislaron CMM a partir de *Ovis aries* y fueron fenotipificadas por citometría de flujo. Por otro lado, se generaron vectores adenovirales portadores de BMP2, BMP7 y BMP9. Posteriormente se realizaron ensayos de transducción y análisis de transducción de blancos moleculares involucrados en osteogénesis con AdBMP2 y las combinaciones AdBMP2/AdBMP7 y AdBMP2/AdBMP9.

**Resultados:** La fenotipificación correspondió a CMMs (93.91% CD105, 14.22% CD90, 20.15% CD271 y CD45-). Se observó expresión incrementada para los genes osteocalcina y osteopontina. La transducción con la combinación AdBMP2/AdBMP9 mostró mayor expresión de marcadores en comparación con AdBMP2 y la combinación AdBMP2/AdBMP7 durante la diferenciación de CMM de *Ovis aries*.

**Contribuciones y conclusiones:** Los ensayos con la combinación de AdBMP2/AdBMP9 mostró mayor expresión de marcadores osteogénicos. No obstante, es necesario realizar estudios de toxicidad para evaluar la posible muerte celular observada. Con estos resultados es posible generar un implante para ser probado en un mamífero grande.

DIRECTOR DE TESIS

---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**

CO-DIRECTOR DE TESIS

CO-DIRECTOR DE TESIS

---

**DRA. HERMINIA GUAPALUPE  
MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

---

**DR. GERARDO RAYMUNDO <sup>iv</sup>  
PADILLA RIVAS**

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 1. Casos de Odontología, traumatología y ortopedia en México en los 2000-2006.	3
Figura 2. CMM y su potencial de diferenciación.	8
Figura 3. Las CMM pueden diferenciarse hacia células osteoprogenitoras.	9
Figura 4. Vía de señalización de BMPs.	14
Figura 5. Esquema del genoma de un vector AdBMP2 prototipo.	16
Figura 6. Estrategia general	23
Figura 7. Esquema de la construcción de AdBMP9.	27
Figura 8. Fotografías de CMM en cultivo.	33
Figura 9. Citometría de flujo de CMM obtenidas de tejido adiposo.	34
Figura 10. Citometría de flujo de CMM obtenidas de médula ósea.	35
Figura 11. PCR de BMP9.	36
Figura 12. Generación del plásmido Ad-BMP9.	37
Figura 13. Análisis de la secuencia de BMP9 en GeneBank.	38
Figura 14. Efecto citopático en células HEK 293 ocasionada por adenovirus.	39
Figura 15. PCR para la confirmación de la presencia del transgen de BMP9 en el esqueleto adenoviral.	40
Figura 16. Gráfica de niveles de expresión de Osteocalcina y Osteopontina por concentración.	42
Figura 17. Curvas de amplificación de los genes GAPDH, Osteocalcina y Osteopontina con Syber Green a diferentes concentraciones de cDNA.	43
Figura 18. Curvas de disociación para los genes GAPDH, Osteocalcina y Osteopontina.	43

Figura 19. Determinación de nivel de expresión del gen osteopontina por PCR tiempo real.	45
Figura 20. Ensayos de expresión del gen osteopontina.	46
Figura 21. Determinación de nivel de expresión del gen osteopontina por PCR Tiempo real.	47
Figura 22. Ensayos de expresión del gen osteocalcina.	49

## LISTA DE TABLAS

---

<b>TABLAS</b>	<b>PÁGINA</b>
Tabla 1. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen BMP9	26
Tabla 2. Diluciones utilizadas para la cuantificación de partículas virales por densidad óptica.	30
Tabla 3. Iniciadores utilizados para PCR en tiempo real.	32
Tabla 4. Resultado de la titulación de partículas adenovirales por el método de titulación en placa y por densidad óptica.	40
Tabla 5. Niveles de expresión por concentración	42
Tabla 6. Muestra las condiciones utilizadas para las reacciones de PCR en tiempo real.	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

Ad	Adenovirus
BMP	Proteínas morfogenéticas de hueso
BSP	Sialoproteína
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
COX-2	Inhibidores de la ciclooxigenasa 2
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de tipo fibroblastoide
CME	Células madre embrionarias
CMM	Células madre mesenquimales
CMV	Citomegalovirus
Dil	Dilución
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
ERK	Proteína quinasa reguladora de señales extracelulares
FDA	Administración de alimentos y drogas
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
h	Horas
HOX	Genes homeóticos
KDa	Kilodaltones
µg	Microgramos
MAPK	Proteína quinasa activadora de mitógenos
mL	Mililitros

MOI	Múltiplos de infección
ng	nanogramos
p38	Proteína celular 38
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFU	Unidades formadoras de placas de lisis
PV	Partículas virales
rhBMP	Proteínas morfogenéticas de hueso recombinantes humanas
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
Runx2	Factor de transcripción asociado con diferenciación a osteoblastos.
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
VLB	Amortiguador de lisis viral

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Debido al incremento de los desórdenes musculoesqueléticos y al aumento de personas de edad avanzada, durante las últimas décadas se han desarrollado algunos instrumentos quirúrgicos internos y externos para el tratamiento de las fracturas con el fin de hacer más efectivo el tratamiento y disminuir el tiempo de consolidación ósea (Kim, 2009). Se han identificado diversos desórdenes del sistema esquelético que también requieren de tratamientos más eficientes para tratarlos, entre los que destacan: la osteogénesis imperfecta, las displasias óseas, la microsomía hemifacial y los síndromes de Pierre Robin, Goldenhar y Nager. Por todo esto, son necesarias nuevas y eficientes estrategias para acelerar la curación de fracturas así como también de regeneración ósea, en cirugía plástica y reconstrucción (Verrotti. *et al*, 2007; Vinay. *et al*, 2007).

El desarrollo del esqueleto humano y la reparación de una fractura requieren de la coordinación de múltiples eventos como la migración, la diferenciación, la activación de varios tipos celulares y estímulos hormonales. La osteogénesis, o regeneración ósea, puede ser inducida bioquímica y molecularmente a través de factores que favorezcan la diferenciación de células osteoprogenitoras (Luo, *et al*, 2005).

Las Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMPs) son factores de crecimiento multifuncionales que desde su descubrimiento se identificó su potencial osteoinductivo y han sido probados en varios ensayos en animales. Principalmente las BMP2, BMP4, BMP7 y BMP9 se ha observado que son capaces de inducir la diferenciación de Células Madre Mesenquimales (CMMs) a células osteogénicas capaces de producir hueso (Panetta, *et al*, 2009). Estas proteínas forman dímeros para activarse y se han identificado formas homodiméricas y heterodiméricas, siendo estas últimas las de mayor actividad al aumentar a más de 20 veces su potencial osteogénico, en comparación con las formas homodiméricas. Debido a que estas proteínas recombinantes tienen un tiempo de vida media muy corto y al alto costo de su producción, la terapia génica es una nueva y eficiente alternativa para aumentar la osteogénesis por medio de la expresión continua

de factores de crecimiento para inducir la diferenciación de CMMs a osteoblastos y facilitar así la producción de matriz ósea (Granjeiro, *et al*, 2005; Khosla. *et al*, 2008).

### **1.1. Antecedentes**

El hueso es una de las sustancias más duras del cuerpo, es un tejido dinámico que cambia de forma constantemente en relación con las fuerzas que éste soporta. Las lesiones aplicadas al hueso dan lugar a su resorción, en tanto que la tensión que se aplica sobre él tiene como efecto el desarrollo de nuevo hueso. Las funciones de este tejido son esenciales para la vida del ser humano y animales, ya que es el marco estructural principal para el apoyo y protección de los órganos del cuerpo, incluidos el cerebro, la médula espinal y estructuras dentro de la cavidad torácica. También funcionan como palancas para los músculos que se insertan en ellos y multiplican así la fuerza de los músculos para lograr el movimiento (Garther, *et al*, 2007).

La ortopedia estudia a la estructura y función del sistema esquelético, en términos generales, huesos y articulaciones. En general, las fracturas en individuos sanos se restablecen rápidamente, sin embargo este proceso regenerativo tiene un impacto significativo en pacientes enfermos. Los desórdenes ortopédicos, aunque rara vez son causa de muerte, son las principales causas de morbilidad, dolor y discapacidad, e imponen una enorme carga socio-económica a la comunidad. La prevalencia de estos desórdenes se incrementa con la edad del individuo y estilos de vida como la obesidad y pérdida de actividad física (Woolf y Pflieger, 2003).

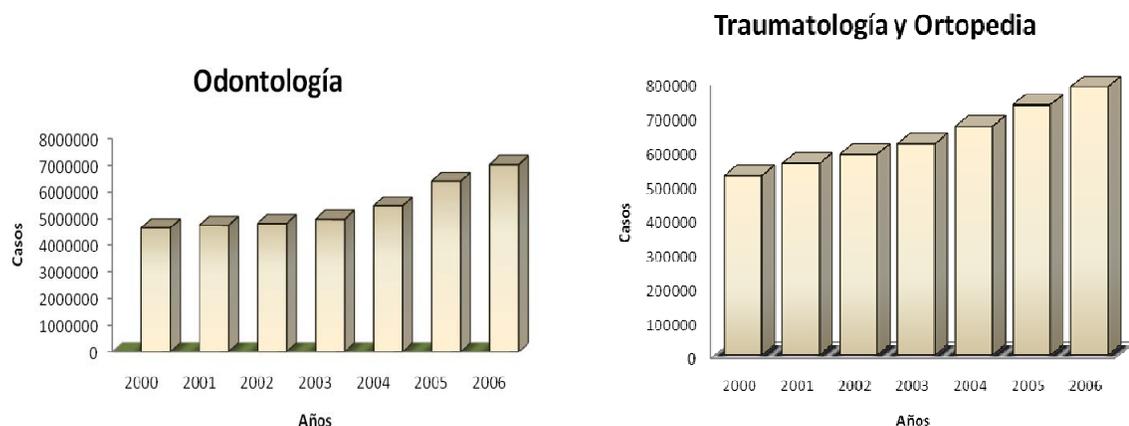
#### **1.1.2. Prevalencia de desórdenes óseos.**

En la actualidad, aproximadamente 30% de adultos americanos son afectados por dolor de articulaciones, limitaciones en movimientos, osteoartritis, osteoporosis y dolor de espalda así como también fracturas de no unión, fusión espinal y pérdida de segmentos óseos. La organización de las Naciones Unidas y la World Health Organization (WHO) ha declarado la década de 2000-2010 como “El Decenio de los Huesos y Articulaciones” con el propósito de dar importancia a los desórdenes músculo esqueléticos, ya que en los

últimos años se ha incrementado el impacto en la salud de estos desordenes así como en la calidad de vida, debido cuando menos al aumento en la longevidad (Haidar, *et al*, 2009).

Se estima que en 1990, 1.66 millones de fracturas de cadera ocurrieron en todo el mundo: cerca de 1.19 millones en mujeres y 463000 en hombres. Los índices de fracturas varían en diferentes países y los más altos índices se han visto en Norte América y Europa. La incidencia de fracturas en África y Asia es baja, pero las predicciones sugieren que podrían incrementarse marcadamente en un futuro (Woolf y Pflieger, 2003).

Particularmente, dentro de los principales servicios prestados en México, según la Secretaria de Salud en los años 2000 a 2006 se encuentran los tratamientos traumatológicos, ortopédicos y odontológicos, como se muestra en la figura 1, en la cual es evidente el aumento anual de pacientes solicitando este tipo de servicios que podrían ser beneficiados con el suministro de implantes osteogénicos (<http://portal.salud.gob.mx/>).



**Figura 1. Casos de Odontología, traumatología y ortopedia en México en los 2000-2006.** Según la Secretaria de Salud los casos aumentan anualmente (<http://portal.salud.gob.mx/>).

Aproximadamente 5 al 10% de todas las fracturas son asociadas a problemas de cicatrización, resultando en una morbilidad significativa del paciente, por el estrés fisiológico y costo económico a la sociedad, en pacientes con factores de riesgo preexistentes, esto se incrementa en un 30%. Estas complicaciones son difíciles para cirugías ortopédicas así como son difíciles de tratar y frecuentemente requieren largo tiempo de tratamiento. Las técnicas para tratar estos defectos como injertos de hueso, autoinjertos, etc. pueden llevar a otras complicaciones como pérdida excesiva de sangre, riesgo de fractura, riesgo de infección y dolor. Por lo tanto es necesario desarrollar estrategias que aumenten la regeneración de hueso (Evans *et al*, 2008; Haidar, *et al*, 2009).

### **1.1.3. Osteogénesis y marcadores óseos**

La formación de hueso es un proceso mediante el cual se establece nuevo material óseo como osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y se puede presentar de dos formas diferentes: osificación intramembranosa y osificación endocondral. La regeneración de hueso seguida de una fractura, se lleva a cabo a través de la osificación endocondral y es un proceso que recapitula ciertos aspectos del desarrollo del esqueleto que involucran factores de crecimiento, células y matriz extracelular. La reparación es usualmente distribuida en 4 etapas: inflamación, formación de callo blando, formación de callo duro y remodelación de hueso (Luo., *et al*, 2005; Horton y Degnin, 2009)

Una fractura comienza con la pérdida de la integridad del tejido blando, interrupción de la función vascular y la distorsión de la arquitectura del hueso, liberando citocinas o factores de crecimiento que son quimiotácticos de las CMM y otros tipos celulares. Al tercer día después de la fractura, las CMM comienzan a adherirse al sitio lesionado, alcanzan una máxima proliferación y forman una matriz de cartílago, o callo blando. Las regiones cartilaginosas progresivamente crecen y emergen para producir un centro fibroso entre los fragmentos fracturados y las férulas de la fractura. Al final de esta etapa los condrocitos se hipertrofian y comienza la mineralización de la matriz cartilaginosa dando lugar a la formación del callo duro. A esta etapa también se le llama formación de hueso primario y es caracterizado por altos niveles de actividad del osteoblasto y

formación de matriz de hueso mineralizado. Posteriormente la angiogénesis comienza entre los días 10 y 11 después de la fractura. La formación de vasculatura es crítica para la formación de callo duro con incremento de la tensión del oxígeno en el área que es necesaria para la diferenciación a osteoblastos. La etapa final comprende la remodelación de hueso hacia el hueso cortical y/o travecular, esto involucra convertir el callo duro en hueso laminar y el hueso cortical es eventualmente restaurado, después el sitio llega a convertirse en un sitio hematopoyético. El proceso de remodelación está acoplado con el proceso de resorción seguida por la formación de hueso laminar (Guo., *et al*, 2006; Kanczeler y Oreffo., 2008; Schindeler., *et al*, 2008).

La cantidad de masa ósea depende del balance entre la formación de hueso nuevo y la resorción, es decir del ritmo del recambio óseo. Se han empleado una variedad de marcadores bioquímicos para evaluar la osteogénesis, entre los que se encuentran la fosfatasa alcalina, osteocalcina, colágena tipo I, sialoproteína (BSP), osteopontina y osteonectina.

- La enzima fosfatasa alcalina es una enzima hidrolasa, responsable de eliminar grupos fosfatos liberando los fosfatos inorgánicos necesarios para la mineralización. Esta enzima no es específica de formación ósea. Aunque se encuentra en cantidades altas en huesos, también está presente en el hígado, la placenta, los intestinos y el riñón. Es uno de los marcadores de formación ósea que se expresan tempranamente (Cons. *et al*, 2003; Fernández, *et al*, 2005)
- La osteocalcina es una proteína característica del hueso, es la proteína no colágena más abundante en la masa ósea y es reguladora de la homeostasis del calcio. Es producida por el osteoblasto, después de su síntesis la mayor parte se incorpora en la matriz extracelular del hueso sin embargo una fracción es liberada a la circulación donde puede ser medida (Cons. *et al*, 2003; Fernández, *et al*, 2005; Wang. *et al*. 2009).

- La colágena tipo I es el componente más abundante de la matriz ósea. Durante la síntesis de la colágena se liberan fragmentos de péptido amino y carboxiterminales de una molécula precursora (pro-colágena) y son liberados a la circulación. Sin embargo, no se han establecido correlaciones entre fragmentos de procolágena y formación ósea (Cons. *et al*, 2003; Fernández, *et al*, 2005; Wang. *et al*. 2009).
- La BSP es sintetizada por los osteoblastos y se deposita en el nuevo tejido osteoide y se ha sugerido que está involucrada en la regulación de la remodelación ósea (Cons. *et al*, 2003; Fernández, *et al*, 2005).
- La osteonectina es sintetizada por los osteoblastos, pero también se encuentra en el tejido conectivo. Tiene gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células (Cons. *et al*, 2003; Fernández, *et al*, 2005).
- La osteopontina se fija a la hidroxiapatita y a las células y participa durante la resorción osteoclástica, posiblemente vía mediación de la fijación de los osteoclastos a la superficie de la fase mineral (Cons. *et al*, 2003; Fernández, *et al*, 2005).

Realizando mediciones de producción de estas proteínas se puede evaluar la formación ósea así como la resorción y podemos predecir el funcionamiento homeostático.

#### **1.1.4. Células Madre Mesenquimales (CMM)**

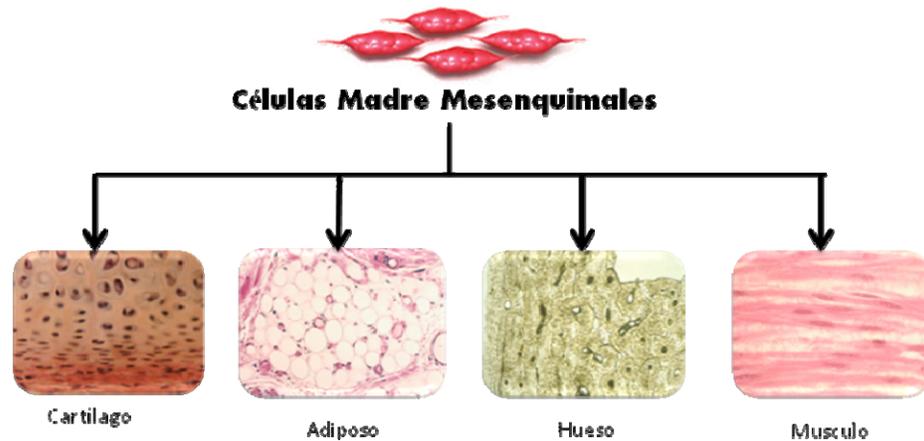
Las células madre son definidas como células inmaduras capaces de autorenovarse y diferenciarse en algunos tipos de células y tejidos especiales. Estas células son clasificadas generalmente en Células Madre Embrionarias (CME) y Células Madre Mesenquimales (CMM) o adultas. Las CME se derivan de la masa celular interna del

embrión en estadio de blastocisto (7-14 días), y bajo condiciones específicas de cultivo son capaces de generar todos los diferentes tipos celulares del cuerpo, por ello son consideradas pluripotentes. (Handschel. *et al*, 2008). De estas se derivan las CMM, las cuales son multipotenciales, y están presentes en varios tejidos como médula ósea, cerebro, hueso, tejido adiposo, cordón umbilical, sangre y líquido sinovial (Chuliáa, *et al*, 2009). Éstas fueron reportadas por primera vez por Friednestein y colaboradores, quienes cultivaron células madre a partir de médula ósea y observaron que poseen morfología de fibroblastos, que se adhieren a frascos de cultivo de plástico y tienen potencial de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células de músculo liso *in vitro* según los estímulos externos o del medio en el que sean cultivadas (Figura 2). A este tipo de células se les denominó CMM (Phinney, *et al*, 2007; Kulterer. *et al*, 2007).

Las CMM son actualmente consideradas como materia prima útil para diversos propósitos clínicos, además de que son multipotenciales, son fáciles de aislar y cultivar *in vitro* y su manera de obtención no representa un problema ético como en el caso de las CME (Chuliáa y Nodab, 2009).

Estudios clonales de las CMM han mostrado que la población de células que se adhiere al plástico es muy heterogénea y contiene precursores con diferentes capacidades de diferenciación hacia diferentes tipos celulares (Phinney, *et al*, 2007). Por lo tanto es necesaria la identificación de estas células por estrategias más sensibles como lo es la fenotipificación por citometría de flujo. El fenotipo exacto de las CMM no está todavía bien definido, sin embargo se han identificado algunos marcadores de superficie que caracterizan a las CMM como Stro-1+, CD105+, CD73+, CD29+, CD166+, CD106+, CD44+, HLA-ABC+, CD90+ y al mismo tiempo CD45-, CD34-, CD14-, HLA-DR- (Tocci y Forte. 2003). En un estudio realizado por Jarocha y colaboradores se comparó la eficiencia de expansión y de diferenciación de CMM empleando estrategias de selección positiva usando anticuerpos anti-CD105 y anti-CD271 y se demostró que las células positivas a estos marcadores crean cuatro o cinco veces más Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (CFU-F), en comparación con la población de

células negativa para estos marcadores, por lo cual, los cultivos que inician en células, CD105+ y CD271+ proliferan y llegan a confluencia más rápido que aquellas CD105- y CD271- (Jarocha, *et al*, 2008).

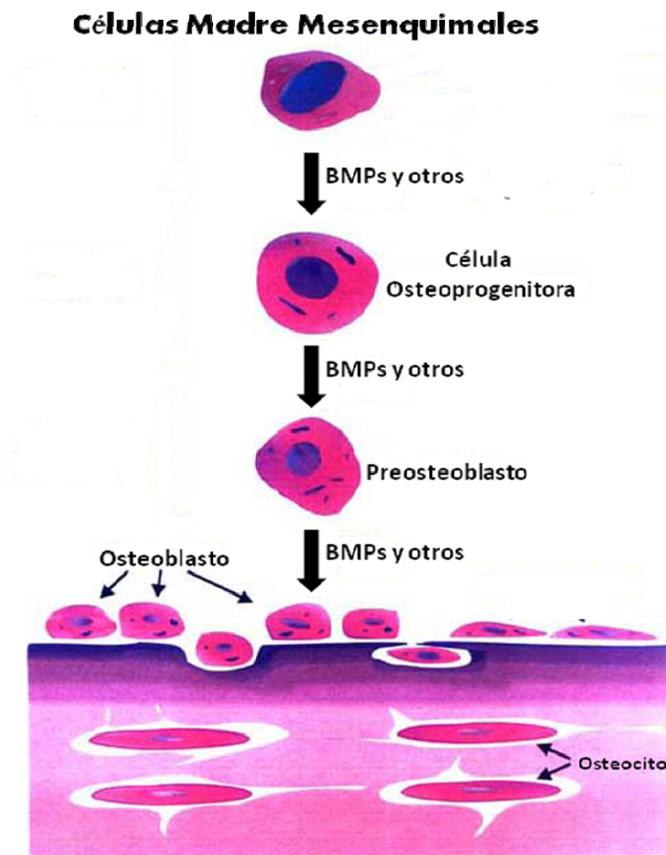


**Figura 2. CMM y su potencial de diferenciación.** Las CMM pueden *diferenciarse in vitro* hacia diversos tipos celulares.

Las CMM fueron inicialmente aisladas a partir de medula ósea. Sin embargo, recientemente se han aislado CMM provenientes de tejido adiposo con características similares a las de medula ósea (Kerns, *et al*, 2006). Además de que la obtención de tejido adiposo es menos invasivo, éste representa una fuente más abundante de células madre, obteniendo aproximadamente  $5 \times 10^3$  células a partir de 1 g de tejido adiposo, lo cual es 500 veces más que el número de células obtenidas a partir de 1 g de medula ósea. Así mismo, las células obtenidas a partir de tejido adiposo cumplen con algunos criterios sugeridos para aplicaciones de la medicina regenerativa como: 1) cantidad abundante de células, 2) capacidad para ser cultivadas y expandidas, 3) capacidad para diferenciarse a múltiples linajes de una manera regulable y reproducible y 4) capacidad para ser trasplantadas segura y efectivamente de manera autóloga o alogénica (Mizuno, 2009).

Por otro lado, desde el descubrimiento de BMPs, muchos investigadores han demostrado que inducen mitosis y diferenciación de CMM en células osteogénicas capaces de

producir hueso (Figura 3) (Peng. *et al*, 2004; Aparecido, *et al*, 2005; Modder y Khosla, 2008; Siddappa. *et al*, 2008).



**Figura 3. Las CMM pueden diferenciarse hacia células osteoprogenitoras.** Las CMM pueden diferenciarse hacia osteoblastos, por medio de estímulos paracrinos como las BMPs y otros factores, y son capaces de producir matriz ósea (Luo. *et al*, 2005).

Las CMM pueden ser diferenciadas a osteoblastos por medio de tratamientos con el glucocorticoide sintético dexametasona que estimula la proliferación celular y contribuye a la diferenciación a linaje óseo. Fosfato orgánico como el  $\beta$ -glicerol-fosfato también contribuye a la osteogénesis, ayudando a la mineralización y modulando la actividad de los osteoblastos mediante la expresión de osteopontina. Otros suplementos como el ácido ascórbico están involucrados en incrementar la actividad de fosfatasa

alcalina y promover la producción de osteocalcina. Además los miembros de la familia de las BMPs son usados para inducir osteogénesis (Tuan. *et al*, 2001; Prockop. *et al*, 2008).

Actualmente las CMM son utilizadas en una variedad de modelos animales y ya se han reportado efectos terapéuticos después de inyección directa de CMM en el sitio dañado. En humanos se han inyectado las CMM intracoronariamente en corazones isquémicos y se ha logrado la mejora de las propiedades mecánicas. También en osteogénesis imperfecta en niños se observó una mejora prometedora con una reducción en la frecuencia de fracturas y mejora en la velocidad de crecimiento (Guillot. *et al*, 2007; Woong. *et al*, 2008; Jang. *et al*, 2008).

#### **1.1.5. Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs)**

Las BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) son un grupo de proteínas llamadas así por sus propiedades osteoinductivas y que además desarrollan importantes papeles en la organogénesis en una variedad de tejidos. La actividad de las BMPs fue primeramente identificada en 1960 por Marshall Urist. Sin embargo, no fue hasta 1980 cuando fueron purificadas y clonadas y se identificaron como proteínas responsables para la inducción de osteogénesis. Desde su descubrimiento muchos investigadores han demostrado que las BMPs inducen diferenciación de CMM y CME en células osteogénicas capaces de producir hueso. El estudio de diferentes BMPs ha revelado que su patrón de expresión y funciones biológicas no se restringen al desarrollo de hueso. Otras funciones han sido identificadas, tales como proliferación y diferenciación, apoptosis y morfogénesis de varios órganos, incluyendo el esqueleto (Gautschi, *et al*, 2007).

Las BMPs son glicoproteínas de bajo peso molecular (15-30kDa) y son parte de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ya que tienen una similitud de 40 a 50% a TGF- $\beta$ . Consisten en dímeros conectados por medio de enlaces disulfuro, siendo esta dimerización un pre-requisito para la inducción de osteogénesis. Las BMPs son activas tanto en su forma de homodímeros como de heterodímeros. Se ha

demostrado que la actividad de las BMPs aumenta más de 20 veces cuando actúan de forma heterodimérica, en comparación con las formas homodiméricas (Gautschi, *et al*, 2007).

Más de 20 BMPs han sido identificadas y divididas en subfamilias de acuerdo a su similitud en su secuencia de aminoácidos. Como todos los miembros de la familia de TGF- $\beta$ , las BMPs son sintetizadas como proteínas precursoras. La proteína precursora contiene una secuencia líder hidrofóbica con propiedades importantes, la porción madura de la proteína es localizada en el carboxilo terminal de la molécula precursora. Todas las BMPs contienen siete residuos del aminoácido cisteína en su porción carboxilo terminal, en posiciones idénticas a aquellas presentes en todos los miembros de la familia de TGF- $\beta$  (Haidar, *et al*, 2009).

Como todos los factores de crecimiento, las BMPs actúan a muy bajas concentraciones en los tejidos, existiendo en ellos en nanogramos o microgramos. Por lo tanto, para aislar suficiente cantidad de microgramos de BMPs se necesitan kilogramos de matriz ósea desmineralizada. Las preparaciones deben ser iniciadas con un mínimo de 100kg de lavado de hueso cortical libre de medula ósea, obteniendo de éste aproximadamente 57mg de un consorcio de BMPs por kilogramo de hueso fresco. Después las BMPs pueden ser identificadas por su secuencia de aminoácidos y aisladas por distintos métodos. Estos métodos generalmente son extremadamente laboriosos y se obtiene muy poca cantidad de proteína. Por lo tanto, la obtención de tan pequeñas cantidades de BMPs ha incitado la aplicación de técnicas de biología molecular para clonar y expresar estas proteínas (Luo, *et al*, 2005; Haidar, *et al*, 2009).

Por otro lado, los mecanismos inmunes activados después de la implantación de BMPs no están bien entendidos debido a controversias en la literatura. Al parecer una simple aplicación de BMPs alogénicas desata una moderada respuesta inmune a través de la producción de inmunoglobulinas G, pero no decrece sus actividades osteoinductivas. Por otro lado, una sola dosis de BMPs puede estimular una alta concentración de anti-BMP,

las cuales podrían inhibir el potencial osteoinductivo (Luo, *et al*, 2005; Yew. *et al*, 2005).

#### **1.1.5.1. Señalización**

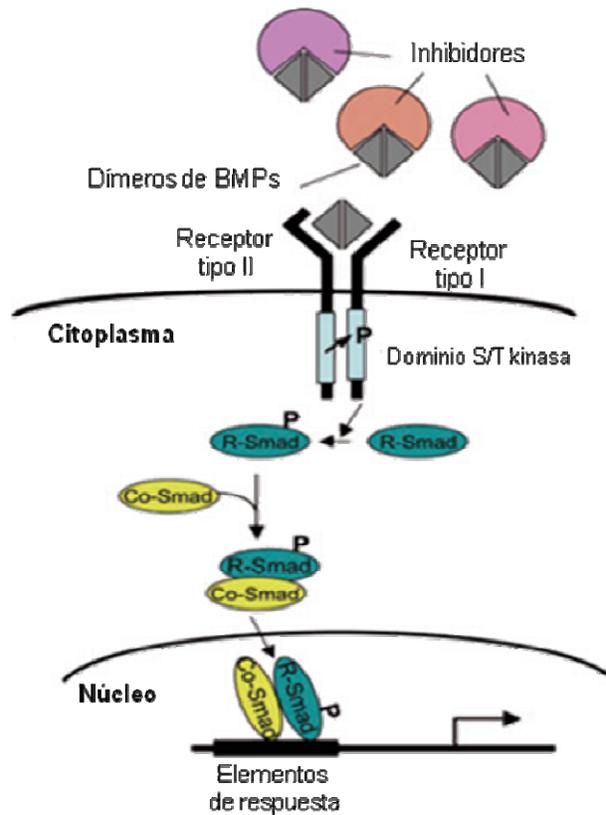
La actividad de las proteínas BMPs está mediada por tetrámeros de receptores serina/treonina kinasa y consisten en dos receptores tipo I y dos receptores tipo II. Se han identificado tres receptores tipo I [BMPR1A (ALK-3), BMPR1B (ALK-6) y ACVR1A (ALK-2)] y tres receptores tipo II (BMPR2, ACVR2A, and ACVR2B). Estos receptores son expresados en varios tejidos y son indispensables para la transducción de señales de las BMPs. La unión del ligando BMP al complejo receptor lleva a la fosforilación de los receptores tipo I y la activación constitutiva de los receptores tipo II. Sin embargo, en algunos estudios se ha demostrado que los ligandos BMPs discriminan entre los receptores tipo I y tipo II (Lavery, *et al*, 2008). Después de la unión al ligando ellos forman un complejo heterodimérico que consiste en dos pares de receptores tipo I y II (Brown. *et al*, 2005; Knockaert, *et al*, 2009).

La unión de BMPs a su receptor activa la formación del complejo heterodimérico de receptores y a los factores de transcripción Smad, donde ellos se unen al receptor tipo I con alta afinidad y reclutan al receptor tipo II con menor afinidad, induciendo una vía de señalización independiente. Después de la inducción del complejo heterodimérico por BMP, el receptor tipo II cinasa fosforila al receptor tipo I y subsecuentemente activa la vía de señalización intracelular por la fosforilación en cascada de proteínas hasta llegar al núcleo celular (Cao y Chen, 2005; Wu. *et al*, 2007; Knockaert, *et al*, 2009).

Las moléculas de señalización Smads juegan un papel central en esta vía y pueden ser divididas en tres subclases distintas: señal de transducción receptor-regulado o R-Smad (Smad1, Smad5 y Smad8), mediador común Smad o Co-Smad (Smad4), y Smad de inhibición o I-Smad (Smad6 y Smad7). El complejo R-Smad-Co-Smad entra al núcleo y recluta otros factores de transcripción, co-activadores y co-receptores que regulan la transcripción de genes blanco por su unión de secuencias específicas en el DNA conocidos como elementos de respuesta a BMPs (figura 4.) (Cao y Chen, 2005).

Las proteínas Smad 1, 5 y 8 interactúan con el receptor tipo I, el cual fosforila de manera independiente a una región de las Smad. Después se libera del receptor y forma un complejo con Smad 4 y luego se translocan al núcleo y participan en la transcripción de genes en conjunto con otros factores. Las Smad 1 y 5 pueden unirse directamente al DNA, sin embargo la afinidad es relativamente baja y necesita la formación del complejo Smad para que la unión sea estable a la secuencia de DNA. Se ha reportado que las Smad 1 y 5 interactúan con el factor de transcripción Runx2 y activan la transcripción de genes blanco como COX-2 y colágeno tipo X en osteoblastos y en condrocitos. Por otro lado, las proteínas homeodominio Hox juegan papeles importantes en el control de la formación del esqueleto en los vertebrados. Se ha demostrado que Smad 1 interactúa directamente con Hoxc8 para activar la transcripción de osteopontina, el cual es un marcador para la diferenciación de osteoblastos y condrocitos. Además de las Smads, las BMPs también activan otras vías de señalización como la familia de moléculas MAPK, incluyendo ERK1/2 y p38 (Watabe. *et al*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado el efecto inhibitorio de BMP3 en la osteogénesis, además BMP3 es la BMP más abundante en hueso desmineralizado y probablemente tiene un papel fundamental como modulador de actividad osteogénica de otras BMPs *in vivo* (Simic y Vukicevic, 2007).



**Figura 4. Vía de señalización de BMPs.** Las BMPs forman dímeros, se unen a su receptor y activan proteínas Smad río abajo, llegan al núcleo y activan elementos de respuesta a BMPs (Kondo, 2007).

#### 1.1.5.2. BMPs en ensayos clínicos y pre-clínicos

Las BMPs han sido utilizadas en varios estudios pre-clínicos y clínicos, utilizándolas como tal, a través de vectores ó sobreexpresadas en células madre. Las BMPs que están disponibles actualmente para aplicaciones clínicas son BMP2 humana recombinante (rhBMP2) y BMP7 humana recombinante (rhBMP7) (Bishop y Einhorn, 2007). La actividad biológica de rhBMP7 fue definida usando una variedad de modelos animales. Estos estudios demostraron que la implantación local de rhBMP7 en combinación con una matriz de colágeno tipo I resultó en la reparación de defectos óseos pequeños en huesos largos, en huesos craneofaciales y la fusión ósea en fusión espinal. Se concluyó

que rhBMP7 implantado con una matriz de colágeno tipo I es un tratamiento efectivo y seguro, con base en esto, la United States Food and Drug Administration (FDA) autorizó la aplicación de rhBMP7 como una alternativa de autoinjertos (White. *et al*, 2007).

También la FDA aceptó el uso de la BMP2 humana recombinante (rhBMP2), y se hicieron ensayos de tipo aleatorio y prospectivo, se probó con 450 pacientes con fractura de tibia con administración de rhBMP2 a diferentes concentraciones y a otros se les aplicó un clavo estático intramedular y se demostró que en aquellos tratados con 1.50mg/kg de rhBMP2 hubo menos casos de infecciones y la curación fue más rápida (Bishop y Einhorn, 2007). Además en el año 2007 Liu y colaboradores probaron en ratas, un implante de rhBMP2 en una matriz de fosfato de calcio el cual fue altamente osteogénico en comparación con la simple administración de rhBMP2 (Liu. *et al*. 2007).

Como ya se mencionó anteriormente, se ha observado que los heterodímeros de BMPs son más efectivos para generar tejido óseo que las formas homodiméricas, por lo tanto el uso de combinaciones de BMPs resulta más eficientes. Se ha probado la combinación de BMP2 y BMP7 utilizando vectores adenovirales para diferenciar CMM hacia osteoblastos y se ha visto que la combinación de BMP2 y BMP7 es más eficiente para inducir la diferenciación osteoblástica que las BMPs 2 y 7 aisladas (Zhu. *et al*, 2004; Li. *et al*, 2005; Knippenberg. *et al*, 2006).

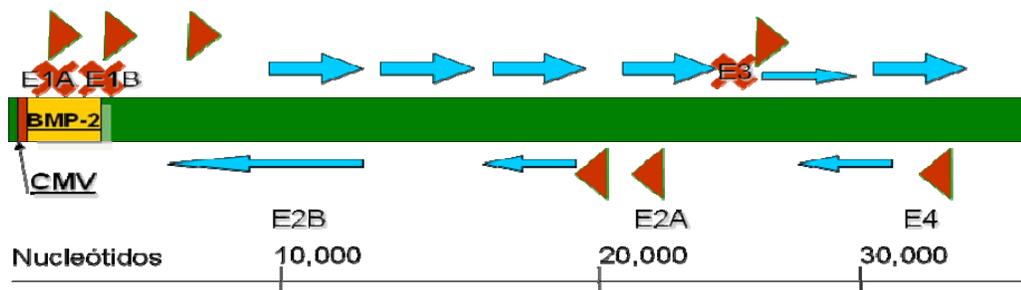
Aparte de BMP2 y BMP7, también se han estudiado otras BMPs y su potencial osteogénico. En el año 2006 se probaron 14 BMPs recombinantes y se observó que BMP2, BMP6, BMP7 y BMP9 pueden inducir formación de hueso de forma heterotópica en ratones y que sobre todo BMP9, es un fuerte estimulador de osteogénesis, sin embargo poco se conoce sobre ésta (Luu *et al*, 2007). Se ha investigado acerca de la vía de señalización de BMP9 y se ha demostrado que la vía Wnt, a través de las interacciones de beta catenina y Runx2, desempeña un papel importante en la inducción de diferenciación osteogénica de CMM por BMP9 (Tang *et al.*, 2008, Sharff *et al.*, 2009). También, Varady y colaboradores demostraron una extensa formación de hueso de manera endocondral en roedores al inyectar un vector adenoviral portador de

BMP9 pero se liberó una fuerte respuesta inmune debido a la presencia del vector (Helm. *et al*, 2000; Varady. *et al*,2001).

### 1.1.6. Terapia génica para la regeneración de tejido

La terapia génica es definida como el tratamiento de una enfermedad con la transferencia de material genético dentro de células. El objetivo es tratar las causas de dichas enfermedades, mientras que otras terapias se enfocan a aliviar solo los síntomas (Breyer B. *et al*, 2001). La terapia génica ha sido una alternativa para las terapias en las que se utilizan proteínas ya que es posible lograr una expresión sostenida de BMPs en los sitios que requieran de regeneración y puede ser superior a la lograda con las proteínas recombinantes (Koh. *et al*, 2008).

La transferencia de genes mediante vectores virales es la aplicación más común de la terapia génica. Los adenovirus humanos tipo 2 y tipo 5 son los más utilizados. Además se han generado adenovirus de replicación deficiente los cuales tienen deleciones parciales de los genes E1A, E1B y E3, necesarios para la replicación viral, éstos resultan ser estables *in vivo* y eficientemente transfieren genes a células en división y células en senescencia, además los adenovirus rara vez están asociados con patologías graves (Glasgow. *Et al*, 2007).



**Figura 5. Esquema de genoma un Ad-BMP-2 prototipo.** Esquema de AdBMP2 publicado por Betz y colaboradores en el año 2005. Se muestran las deleciones en los genes E1A, E1B, espacio en el cual se colocó la secuencia codificante del gen BMP-2 y la secuencia promotora del citomegalovirus (CMV). El E3 también se encuentra deletado para facilitar el empaquetamiento.

Actualmente se ha demostrado que la terapia génica puede ser utilizada para acelerar la regeneración ósea, aumentando la osteoinducción con factores de crecimiento induciendo la diferenciación a osteoblastos y facilitando la producción de matriz ósea.

Aunque los vectores adenovirales son prometedores para la regeneración de hueso y para el tratamiento de otras enfermedades, éstos frecuentemente producen una fuerte respuesta inmune al ser introducidos en mamíferos. En estudios anteriores se han probado vectores adenovirales portadores de BMPs en ratas y ratones y se han obtenido buenos resultados. Sin embargo al introducir éstos mismos en mamíferos mayores despiertan una fuerte respuesta inmunológica que logra inhibir la formación de hueso, aunque se logra una alta producción de BMPs (Varady. *et al*, 2001; Egermann. *et al*, 2006). Por otro lado, las CMM pueden ser extraídas, cultivadas y diferenciadas *ex vivo* hacia osteoblastos usando vectores adenovirales portadores de BMPs, y posteriormente usadas en el sitio de la lesión, minimizando así la respuesta inmune provocada por el vector (Partridge. *et al*, 2002; Cervantes Kardash. *et al*, 2007).

En el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular ya se han realizado estudios de osteogénesis inducida, en un modelo canino de distracción ósea, con un implante de 3 componentes que consiste en CMM transducidas con el vector adenoviral portador de BMP2 y éstas a su vez embebidas en un andamio de matriz ósea desmineralizada. Al cabo de seis u ocho semanas de introducido el implante se observó una completa consolidación ósea con aspecto y dureza normal, además sin generar respuesta inflamatoria ni efectos hepatotóxicos (Cervantes Kardash. *et al*, 2007).

## **1.2. Justificación**

Debido al alto impacto que tienen las afecciones que requieren regeneración ósea y el tiempo prolongado de este proceso (que aumenta con la edad del individuo), es importante implementar nuevas terapias que hagan posible disminuir el tiempo de este proceso, sin afectar la calidad del hueso neoformado. Las BMPs han mostrado tener un papel esencial en la diferenciación de CMM hacia el linaje óseo.

Las combinaciones de terapia génica y celular son una alternativa para aumentar la osteoinducción por medio de la expresión de factores de crecimiento e inducir diferenciación osteoblástica para incrementar la velocidad de la consolidación ósea.

## CAPÍTULO II.

### OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo general

Inducir osteogénesis a través de células madre mesenquimales, transducidas por combinaciones de vectores adenovirales portadores de los genes BMP2, 7 y 9 y evaluar su potencial osteogénico *in vitro*.

#### 2.2. Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar CMM de *Ovis aries*.
2. Generar vectores adenovirales recombinantes con los transgenes BMP2, 7 y 9.
3. Evaluar las combinaciones de las proteínas BMP2, BMP7 y BMP9 que tengan mayor potencial osteogénico *in vitro*.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

##### 3.1.1. Bacterias competentes y células de tejido adiposo y médula ósea

Se utilizaron bacterias XL-Blue (Stratagene, La Jolla CA) calcio-competentes y las bacterias BJ5183 (Stratagene). Se utilizó la línea celular HEK293 (de riñón embrionario humano, ATCC CRL-1579<sup>TM</sup>, Manassas VA) y células mononucleares de origen ovino provenientes de tejido adiposo y de médula ósea.

##### 3.1.2. Plásmidos

Se utilizó el plásmido pCR4-TOPO (OPEN BIOSYSTEMS, Rockford IL) el cual contiene la secuencia del gen de la proteína BMP9 humana, el plásmido pCR-TOPO 2.1, AdEasy-1 y pShuttle con la inserción del promotor de citomegalovirus (CMV) para la construcción de vectores adenovirales.

##### 3.1.3. Vectores virales

Para los estudios de transducción se utilizó el vector AdBMP2, el cual fue proveído por el Dr. Christopher Evans del Molecular Orthopedics Harvard Medical School de Boston, Massachusetts. Este es un adenovirus tipo 5 que contiene delección en los genes E1 y E3 llevando el promotor de CMV y el transgen de la proteína BMP2 humana. De la misma manera se utilizó el vector adenoviral portador de BMP7 (Ad-BMP7) el cual fue construido por el M.C. Daniel Cervantes García en el laboratorio de Terapia Génica

#### 3.2. Materiales y reactivos

Para el aislamiento de células madre se utilizó heparina como anticoagulante, Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), pastillas para preparar PBS 1X (Amresco, Solon OH). Para cultivo de células madre y para cultivo de células HEK293

se utilizó medio de cultivo Advanced Dubecco's Modified Eagle (Invitrogen, Carlsbad CA), suero fetal bovino (Invitrogen), Tripsina 0.25% (Invitrogen), gentamicina (Gibco, Carlsbad CA), penicilina/estreptomicina (Gibco), L-Glutamina (Gibco), Lipofectamina<sup>TM</sup> 2000. Entre los materiales utilizados para cultivo celular se emplearon jeringas de 10mL estériles desechables, tubos de 15mL y 50mL (Corning, Costar City NY), pipetas serológicas desechables de 5mL, 10mL y 50mL (Corning), botellas de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>, 150cm<sup>2</sup> (Corning) y cajas petri de 100mm (J.VWR<sup>TM</sup>. Edmonton, Canadá)

Para la construcción de vectores adenovirales se empleó para PCR la enzima MasterAmp<sup>TM</sup> Taq DNA polimerasa (Epicentre Biotechnologies, Madison WI), la enzima T4 DNA Ligasa (Promega, Madison WI), estuche QIAEX II Gel Extracción, también se usaron diferentes enzimas de restricción de las casas comerciales Promega y New England Biolabs (Ipswich, RU). Se usó: *KpnI*, *HindIII*, *PstI*, *BstZ17I*, *PmeI*, *PacI*.

Para la extracción de DNA plasmídico se usó acetato de potasio (Sigma-Aldrich), Cloroformo (Sigma-Aldrich), etanol (Sigma-Aldrich), isopropanol (Sigma-Aldrich), dodecil sulfato de sodio (Sigma-Aldrich), fosfato dibásico de sodio (Sigma-Aldrich), Tris-HCl (Amresco), EDTA (Amresco), hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), ácido acético (Amresco), estuche PureYield<sup>TM</sup> plasmid Midiprep System (Promega). Para cultivo de bacterias se utilizó extracto de levadura (Amresco), triptona de caseína (Amresco), agar bacteriológico (Amresco).

Para la purificación de vectores adenovirales se usó cloruro de cesio (GibcoBRL, Grand Island NY), tubos de polialómero (Beckman, Palo Alto CA), Slide-A-Lyzer 10K (Pierce, Rockford IL) , glicerina (Research organics, Cleveland OH), tris (Amresco), cloruro de sodio (Invitrogen), cloruro de magnesio (Invitrogen).

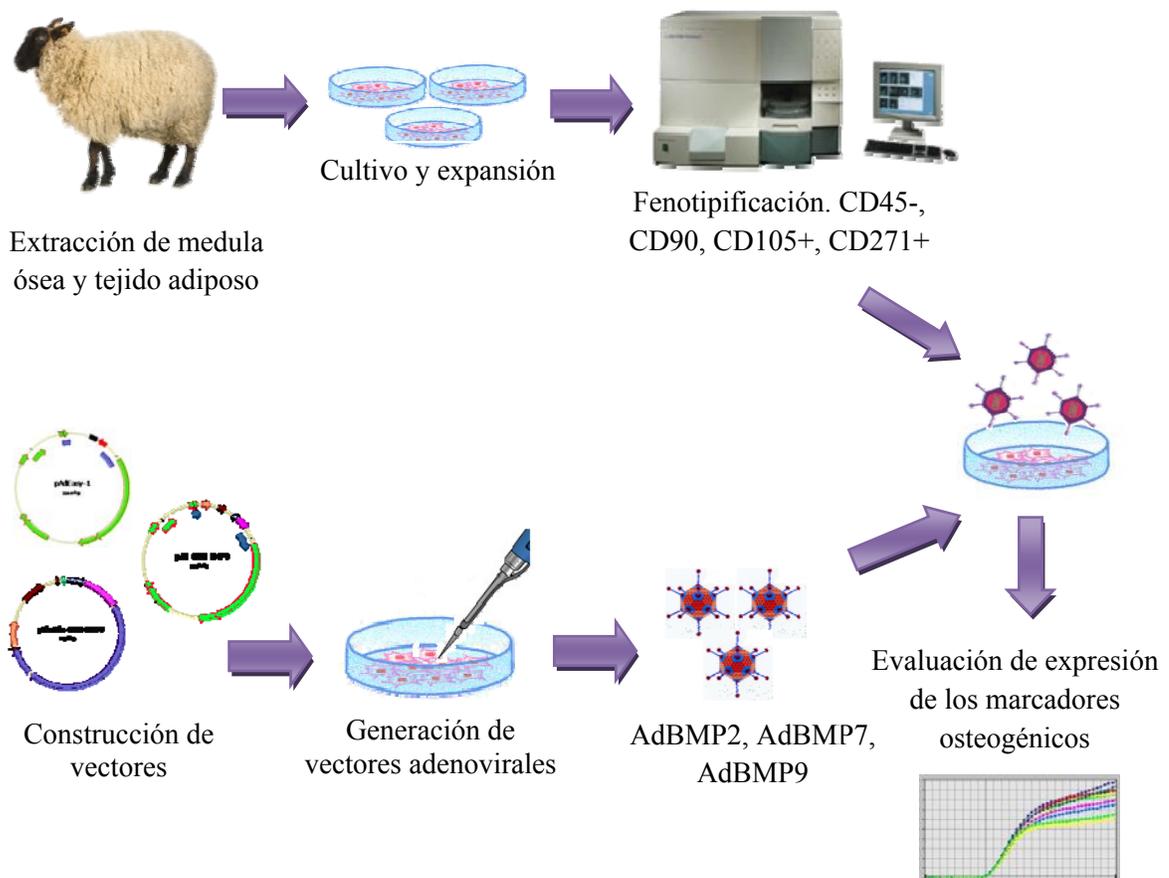
Las extracciones de RNA fueron realizadas con el reactivo TRIZOL (Invitrogen), y la síntesis de cDNA se realizó con el estuche SSIII Firs-Strand Super Mix (Invitrogen).

Para las reacciones de tiempo real se empleó el estuche SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix (Invitrogen).

Entre otros reactivos utilizados se encuentran: hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), ácido bórico (Amresco), EDTA disodio dihidratado (Amresco), agarosa (Amresco), cloruro de calcio (Amresco), Tris-HCl (Promega), fenol (Sigma-Aldrich). También se utilizaron otros materiales de Corning y Costar (Costar City NY) tubos para microcentrifuga de 1.5 mL, 2 mL y criotubos de 1 mL, puntas para micropipeta de 20 µL, 200 µL y 1000 µL.

### 3.3. Estrategia general

La figura 6 muestra la estrategia que se siguió para evaluar el potencial osteogénico de los vectores adenovirales portadores de BMPs en CMM de origen ovino.



**Figura 6. Estrategia general que se siguió para el aislamiento y caracterización de células madre, generación de vectores adenovirales y evaluación del potencial osteogénico de CMM modificadas por vectores adenovirales portadores de BMPs.**

### **3.4. Extracción y cultivo de CMM de *Ovis aries***

La extracción de CMM fue realizada a partir de dos fuentes diferentes, de médula ósea y de tejido adiposo.

#### **3.4.1. Extracción de CMM a partir de médula ósea**

Se realizó extracción de médula ósea a partir de húmero de *Ovis aries* usando heparina como anticoagulante. La médula extraída se depositó en un tubo de 50 mL y se transportó al laboratorio. Se realizó dilución de la médula en relación 1:5 con PBS y se separaron las células mononucleares en un gradiente de densidad usando Hystopaque en tubos de 15 mL, se centrifugaron a 12,500 rpm a 4°C durante 4min. Se retiró la sección correspondiente a las células mononucleares y éstas fueron lavadas con PBS en dos ocasiones. Las células obtenidas fueron cultivadas en medio DMEM Advance con 10% de SFB y antibióticos como penicilina, estreptomycin, anfotericina B y gentamicina. Se realizó cambio de medio al tercer día una vez adheridas al plástico y se dejaron crecer durante 2 semanas. Al cabo de este tiempo se realizaron pasajes en frascos de cultivo T-75 para su expansión. Las células fueron congeladas en medio de congelación a -80°C hasta su uso.

#### **3.4.2. Extracción de CMM a partir de tejido adiposo**

Se realizó extracción de grasa subcutánea de *Ovis aries* y se colocó en un tubo de 50mL en una solución de PBS 1X con antibióticos como penicilina, estreptomycin y gentamicina y se transportó al laboratorio en hielo. La grasa fue triturada con bisturí y se realizaron lavados con PBS 1X y antibióticos. Los trozos de grasa fueron digeridos con colagenasa I en agitación y a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo se realizaron lavados con PBS 1X, y las células fueron cultivadas en medio DMEM Advance con 10% de SFB y antibióticos como penicilina, estreptomycin, anfotericina B y gentamicina. Se realizó cambio de medio al tercer día y al cabo de una semana se hicieron pasajes para su expansión. De la misma manera que las células de médula ósea, éstas fueron congeladas hasta su uso.

### 3.5. Fenotipificación de CMM.

Las CMM de médula ósea y de grasa fueron fenotipificadas para sus marcadores de superficie característicos como CD45-, CD90+, CD105+ y CD271+.  $1 \times 10^6$  células de primer pasaje fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 1mL de PBS. Se tomó una alícuota de células y fueron incubadas con cada anticuerpo monoclonal en hielo y después fueron lavadas con PBS adicionado con 0.1% de albúmina de suero bovino. La fenotipificación se realizó en un equipo FACSCalibur y los datos fueron analizados en el programa Cellquest Pro. Es importante mencionar que los anticuerpos utilizados en este estudio son dirigidos contra epítopes humanos.

### 3.6. Generación de vectores adenovirales

El laboratorio de terapia génica, contaba con el vector adenoviral portador del transgen BMP2 (Ad-BMP2) donado por el Dr. Christopher Evans del Molecular Orthopedics Harvard Medical School de Boston, Massachusetts y descrito anteriormente (Betz *et al.*, 2006), además este vector fue secuenciado por el Dr. Víctor Hugo Cervantes Kardasch en su tesis doctoral en el año 2007. Asimismo, se contaba con el vector adenoviral portador de BMP7 (Ad-BMP7) el cual fue construido por el M.C. Daniel Cervantes García. Por lo tanto en este trabajo, se construyó el adenovirus portador del transgen BMP9 (Ad-BMP9) y se realizó la producción, purificación y titulación de los vectores Ad-BMP9, Ad-BMP2 y Ad-BMP7.

#### 3.6.1. Construcción del plásmido pShuttle-BMP9

El cDNAs de la BMP9 fué obtenido de un plásmido de la casa comercial OPENBIOSYSTEMS. Se amplificó el fragmento del plásmido correspondiente a BMP9 con los siguientes iniciadores con sitios de restricción de *KpnI* y *HindIII*:

Forward BMP9fwf : CTCTGGGTGATTGCGGGT

Reverse BMP9rev : CATGTGGAGAAGCTTTGG

Y bajo las siguientes condiciones:

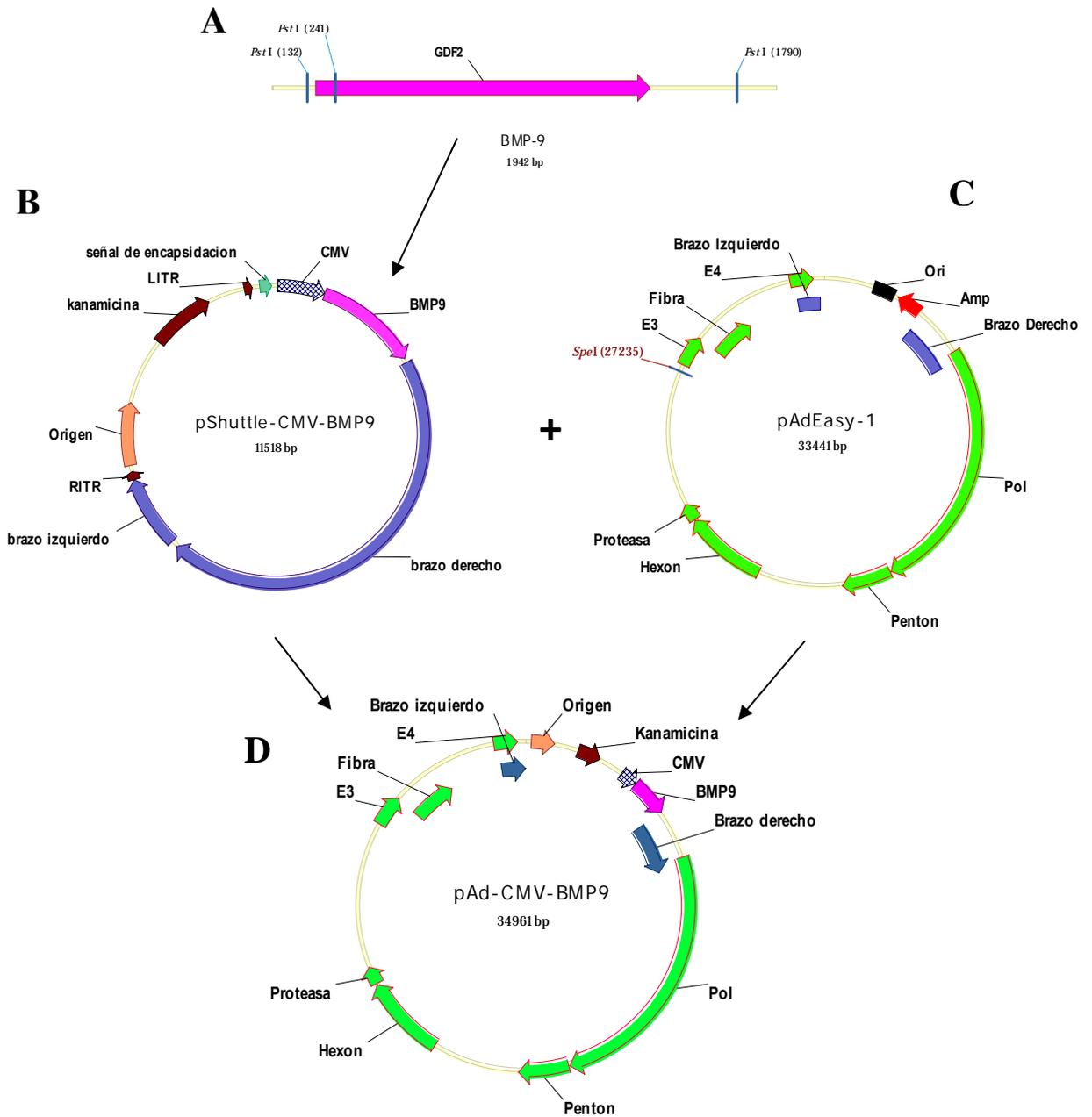
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	2 min
2	95	30 seg
3	55	1 min
4	72	1.5 min
5	Ir a paso 2, 35 veces	
6	72	4 min

**Tabla 1. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen BMP9**

Se observó el amplicón en un gel de agarosa y de ahí se realizó la ligación en el vector pCR-TOPO 2.1 y transformaron bacterias XL-Blue. De aquí se extrajo el DNA plasmídico, el fragmento de BMP fue liberado por una reacción de restricción con las enzimas *KpnI* y *HindIII*, luego las digestiones fueron observadas en un gel de agarosa al 2% y la banda de peso de 1370 pb correspondiente a BMP9 fue purificada con el estuche QIAEX II Gel extraction.

Por otro lado, se llevó a cabo una reacción de restricción del plásmido pShuttle con las enzimas *KpnI* y *HindIII*, enseguida el plásmido digerido fue precipitado y se ligó con el fragmento de BMP en proporción 1:4 de fragmento y plásmido, respectivamente. Se clonó en bacterias XL-Blue, posteriormente se realizó extracción de DNA plasmídico y se le realizaron reacciones de restricción con la enzima *PstI* para su caracterización y verificación de la inserción del fragmento de BMP.

En la figura 7 se muestra un esquema de los plásmidos y los pasos que se siguieron para la construcción del vector adenoviral portador de BMP9.



**Figura 7. Esquema de la construcción de AdBMP9.** (A) Plásmido portador de BMP9, el cual fue amplificado con iniciadores específicos y cortado con enzimas de restricción para su liberación, (B) vector pShuttle con el inserto del gen BMP9, (C) vector pAdEasy el cual contiene el resto del genoma adenoviral el cual fué recombinado con pShuttle-BMP9, (D) resultado de la recombinación de pShuttle-BMP9 y pAdEasy dando como resultado el esqueleto de genoma adenoviral pAdBMP9.

### 3.6.2. Construcción del genoma adenoviral pAd-BMP9

El vector pShuttle-BMP9 fue digerido con la enzima *Bst*Z17I, pShuttle solo tiene un sitio de restricción para esta enzima, por lo tanto el plásmido solo fue linearizado, y después fue precipitado. Se realizó una co-transformación en bacterias BJ5183 competentes con pShuttle-BMP y pAdEasy en las cuales se logró la recombinación en sus regiones homólogas logando así la construcción del esqueleto adenoviral con el transgen de BMP9.

### 3.6.3. Secuenciación parcial

Este plásmido fue utilizado para secuenciar parcialmente el gen de la BMP9 con los iniciadores antes mencionados. La amplificación del gen se llevó a cabo con la enzima MasterAmp™ Taq DNA polimerasa (Epicentre Biotechnologies) y luego se realizó la reacción de secuenciación con el estuche de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing y se precipitaron los productos de PCR de la siguiente manera:

1. Se añadió 5µL de EDTA a una concentración de 125 mM) y 60 µL de etanol al 95%.
2. Se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se centrifugó a 4000rpm a 4°C por 30 minutos.
3. Se removió el etanol y se adicionaron 60 µL de etanol al 70%.
4. Se centrifugaron a 4000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
5. Se eliminó el etanol y se dejó secar 10 minutos a 50°C.
6. Se resuspendió en 15 µL de formamida y se sometieron a 95°C por 5 minutos.

Una vez resuspendidos los productos, se analizaron en el equipo ABI PRISM Analyzer de Applied Biosystem.

### 3.6.4. Producción de vectores adenovirales

El plásmido pAd-BMP9 se utilizó para transfectar las células HEK 293. La transfección se realizó con Lipofectamina 2000 en cajas de 6 pozos con 700,000 células por pozo, la transfección fue realizada siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se

dejaron incubando hasta que se observó efecto citopático en estas células. Éstas fueron cosechadas y lisadas con ciclos de congelación y descongelación de  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$  respectivamente y con los lisados se infectaron células HEK 293 en 3 cajas de cultivo T-25. Luego de observar el efecto citopático se infectaron 5 cajas de cultivo T-75 y al obtener el lisado se infectaron 5 cajas de cultivo T-150. El lisado se empleó para infectar 25 cajas T-150 y, una vez observado el efecto citopático, las células fueron cosechadas y lisadas. De aquí se partió para la purificación de partículas adenovirales.

### **3.6.5. Purificación de vectores**

A partir de los lisados obtenidos, se separó el exceso de restos celulares centrifugando a 12,000 rpm durante 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y con éste se procedió a realizar ultracentrifugación a  $35,000 \times g$  en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio con densidades de 1.4 g/mL y 1.2 g/mL durante 1.5 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego se recuperó la banda correspondiente al paquete de adenovirus y se realizó un segundo centrifugado a en un gradiente de 1.35 g/mL de cloruro de cesio bajo las mismas condiciones. De aquí se recuperó la banda correspondiente a los adenovirus completos y se dializaron en un Slide-A-Lyzer 10K (Pierce, Rockford Illinois USA) en una solución amortiguadora de diálisis. Se dializó durante 3 horas realizando 3 cambios de amortiguador, se recuperó el volumen de dializado y se hicieron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$  las cuales fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.6.6. Titulación en placa de adenovirus con células HEK 293 (TCID<sub>50</sub>)**

Se sembraron 2,000 células por pozo en placas de 96 pozos por triplicado, se incubaron hasta observar un 40-50% de confluencia. Después se infectaron 10 pozos con las siguientes diluciones de adenovirus:  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ , además para cada dilución se asignaron dos pozos sin infectar como controles negativos. Al cabo de 10 días se determinó el título adenoviral observando el efecto citopático en los pozos de las diferentes diluciones.

### 3.6.5. Determinación óptica de partículas virales

Con este método se cuantificaron las partículas de DNA en solución por lo tanto se cuantifican las partículas infecciosas como las no infecciosas. Se descongeló un vial del adenovirus purificado y se prepararon diluciones 1:2 y 1:5 en un amortiguador de lisis viral (VLB) el cual contenía 0.1% de SDS, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4 1mM EDTA y se prepararon las siguientes soluciones:

Amortiguador de lisis ( $\mu\text{L}$ )	Virus ( $\mu\text{L}$ )	Dilución
52	52	1:2 (Dilución #1)
168	42	1:5 (Dilución #2)

**Tabla 2. Diluciones utilizadas para la cuantificación de partículas virales por densidad óptica.**

Se incubaron las muestras por 10 minutos a 56°C en movimiento. Luego se preparó 1mL de solución blanco la cual consiste en (VLB) mezclado con el amortiguador de diálisis en lugar del volumen de adenovirus. Se determinó la densidad óptica (DO) a 260nm de la siguiente manera:

- La dilución 1 se diluyó 1:5 y se le llamó dilución #3.
- La dilución 2 es diluida 1:5 y 1:10 y se les llamó dilución #4 y #5 respectivamente.
- Se tomó la  $DO_{260\text{nm}}$  de las siguientes diluciones: Dilución #5 (dos veces), dilución #4 y #3. El resultado final fue el resultado de la media de las 4 mediciones.

De la misma manera se realizó la producción, purificación y titulación de los vectores AdBMP2 y AdBMP7 que ya existían en el laboratorio de Terapia Génica utilizados en ensayos posteriores.

### **3.7. Ensayos de transducción y co-transducción con vectores adenovirales AdBMP2, AdBMP7 y AdBMP9**

Se sembraron 200,000 CMM por pozo CMM en placas de 6 pozos y se dejaron incubando durante toda la noche. Luego se llevaron a cabo transducciones con 100 MOI AdBMP2, y en el caso de las co-transducciones AdBMP2/9 y AdBMP2/7 fue con 50 MOI cada uno. Los adenovirus fueron resuspendidos en 1 mL y se dejaron incubando en contacto con las células durante 3 h. Para estos ensayos se tomaron en cuenta diferentes controles: células estimuladas con medio osteogénico (medio DMEM Advanced suplementado con 10% de SFB, 50  $\mu$ M de ácido ascórbico, 10 mM de  $\beta$ -glicerol-fosfato y 100 nM de dexametasona), células transducidas con 100MOI de Ad-Luciferasa y un control más de células sin estímulo. Después de las transducciones, se realizaron extracciones de RNA a los tiempos 0, 4, 8 y 16 días con Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

### **3.8. Ensayos de expresión de los marcadores osteogénicos osteocalcina y osteopontina por PCR tiempo real, cuantificación relativa.**

Después de realizados los ensayos de transducción y extracciones de RNA a los 0, 4, 8 y 16 días, se cuantificó el RNA y se procedió a realizar la síntesis de cDNA. El cDNA fue sintetizado con el estuche SSIII First-Strand Super Mix (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este procedimiento está descrito para utilizar desde 1pg hasta 5  $\mu$ g de RNA total.

Después se cuantificaron los cDNAs en un espectrofotómetro (ND-1000) teniendo como blanco una solución preparado de la misma manera como se sintetizó el cDNA pero sin el RNA, y de esta manera se obtuvo una solución que contenía todos los reactivos de reacción de retrotranscripción pero sin el cDNA sintetizado.

Se realizó una mezcla representativa de todos los cDNAs obtenidos, tanto de muestras problema como de controles, para la estandarización de la PCR en tiempo real. La reacción se realizó con el estuche SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix (Invitrogen)

utilizando 100 ng de cDNA empleando los iniciadores del gen endógeno seleccionado (GAPDH), lo cual mostró muy buena eficiencia, por lo tanto se decidió trabajar las muestras con 50 ng de cDNA. La PCR en tiempo real fue desarrollada en un equipo OneStep Real Time PCR System 48W (Applied Biosystems Inc).

Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

<b>Iniciadores</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Amplicón</b>
<b>GAPDH</b>	Sentido: CTGCCGCCTGGAGAAACC  Anti-sentido: GTGAGTGTCGCTGTTGAAGTC	136 pb
<b>Osteocalcina</b>	Sentido: GCAGCGAGGTGGTG  Anti-sentido: CTCCTGGAAGCCGATGTG	148 pb
<b>Osteopontina</b>	Sentido: CCAATGAAAGCCCTGAGC  Anti-sentido: CAGGGGTTTCAGCATCGT	95 pb

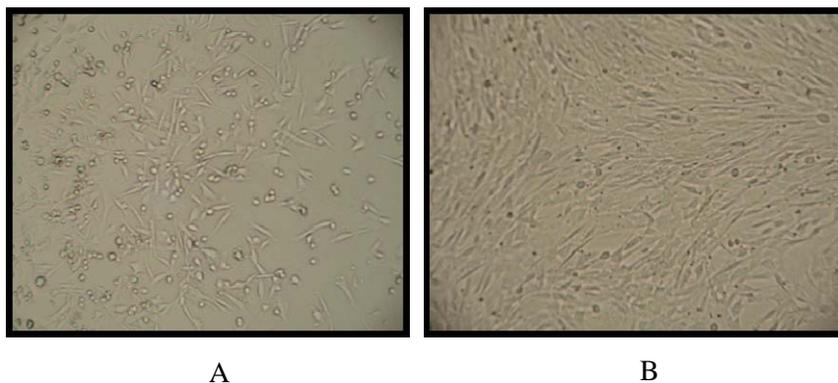
**Tabla 3. Iniciadores utilizados para PCR en tiempo real.**

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1. Extracción y cultivo de CMM a partir de tejido adiposo y médula ósea

Se llevó a cabo el procedimiento de extracción de médula ósea de húmero de *Ovis aries* utilizando heparina como anticoagulante. Luego se separaron células mononucleares siguiendo el procedimiento mencionado en la metodología. Las células obtenidas se cultivaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y al cabo de 5 días se observó la formación de CFU-F (figura 8 (A)) y después fueron levantadas con tripsina para su expansión. La fenotipificación por citometría de flujo se llevó a cabo con 1X10<sup>6</sup> células de primer pasaje y las células restantes se utilizaron para su expansión. En este segundo pasaje las células ya no mostraron la formación de CFU-F, sin embargo mostraron orientaciones particulares como se muestra en la imagen (figura 8.B).



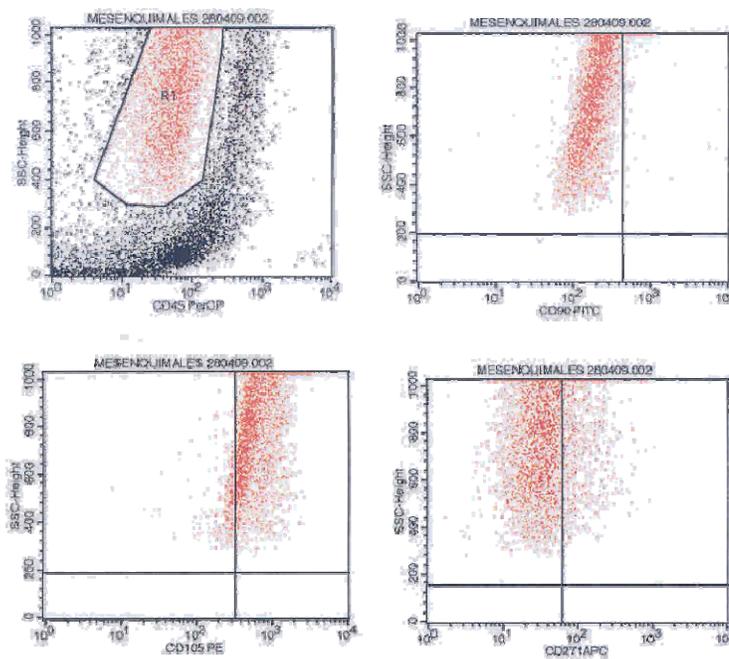
**Figura 8. Fotografías de CMM en cultivo.** (A) CMM formando CFU-Fs a baja confluencia, (B) CMM al 95% de confluencia con orientaciones características.

Las células obtenidas a partir de médula ósea y de tejido adiposo mostraron las mismas características morfológicas antes mencionadas, con la única diferencia en la velocidad de división ya que llegaron a confluencia más rápidamente las CMM de tejido adiposo en comparación con las células de médula ósea.

**4.2. Fenotipificación por Citometría de Flujo de CMM de tejido adiposo y médula ósea**

La caracterización de CMM se realizó por medio de la identificación de los marcadores de superficie CD90+, CD271+, CD105+, y CD45- que se encuentran presentes en las CMM de acuerdo al protocolo seguido por el Servicio de Hematología del Centro Universitario contra el Cáncer. Los resultados fueron los siguientes:

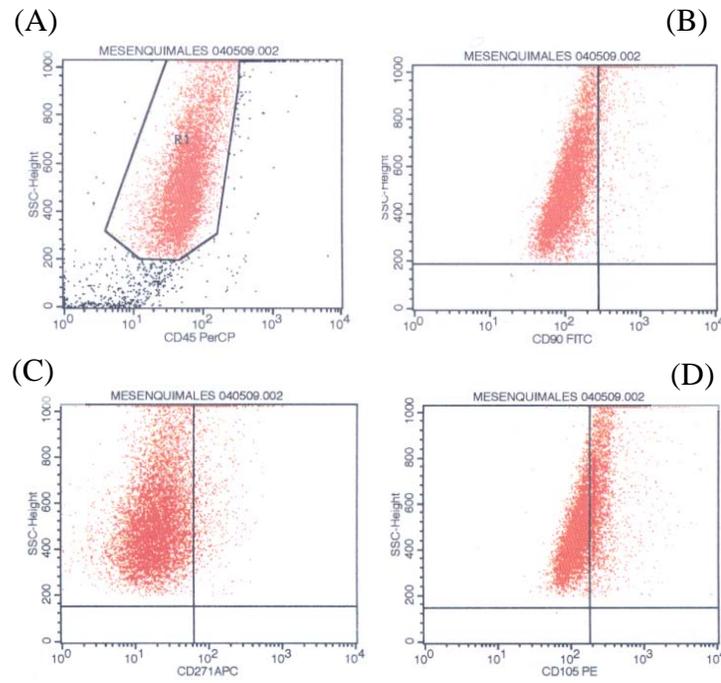
Células de Tejido adiposo:



CD	Población de células
CD45	Negativo
CD90	14.22% Positivo
CD271	20.15% Positivo
CD105	93.91% Positivo

**Figura 9. Citometría de flujo de CMM obtenidas de tejido adiposo.** (A) Marcador de superficie CD45, (B) marcador de superficie CD90, marcador de superficie CD 271 y marcador de superficie CD105.

Células de Médula ósea



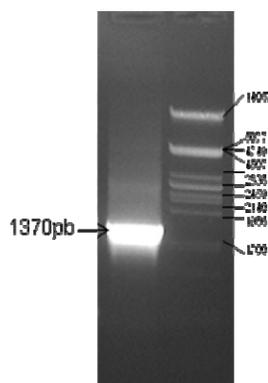
CD	Población de células
CD45	Negativo
CD90	9.49% Positivo
CD271	6.94% Positivo
CD105	35.54% Positivo

**Figura 10. Citometría de flujo de CMM obtenidas de médula ósea.** (A) Marcador de superficie CD45, (B) marcador de superficie CD90, marcador de superficie CD271 y marcador de superficie CD105.

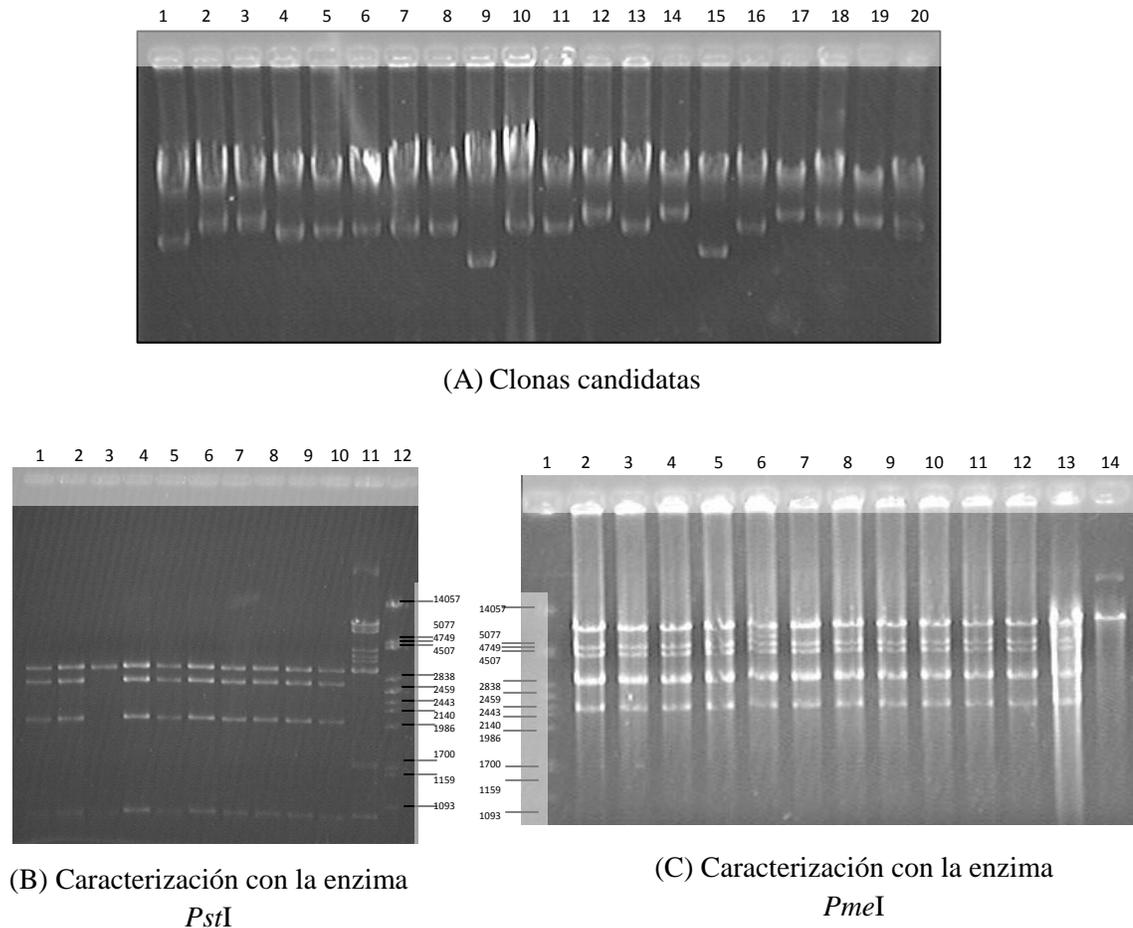
Como se puede observar en las figuras 4 y 5, las células de tejido adiposo mostraron más altos porcentajes de los marcadores de superficie que caracterizan a las CMM, en particular el marcador CD105+ con un 93.91%. Sin embargo las células de médula ósea presentaron menores porcentajes de células con los marcadores probados. Por esta razón, en este estudio se decidió realizar los ensayos de transducción con las células provenientes de tejido adiposo, además por su gran capacidad de proliferación y fácil obtención.

### 4.3. Generación de vectores adenovirales

El gen de la BMP9 fue obtenido de un plásmido de la casa comercial OPENBIOSYSTEMS, de ahí se realizó PCR con iniciadores con sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *HindIII* el cual amplificó un fragmento de 1,370 pb (figura 11). El fragmento amplificado luego fue clonado en el vector pCR-TOPO 2.1 con el cual se transformaron bacterias calcio-competentes y después de su crecimiento se realizó extracción de DNA plasmídico. Por otro lado, el plásmido pShuttle fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII*, así como también el plásmido pCR-TOPO 2.1-BMP9. Después se llevó a cabo la reacción de ligación del fragmento liberado de BMP9 con el vector pShuttle para obtener el vector pShuttle-BMP9. Para confirmar la presencia del gen BMP9 en pShuttle se seleccionaron clonas, se les extrajo el DNA plasmídico y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% para observar el retraso de migración de las que lograron ligar el fragmento de BMP9 (figura 12.A).



**Figura 11. PCR de BMP9.** PCR del plásmido comercial con el cDNA de BMP9 mostrando un amplicón de 1,370 pb.

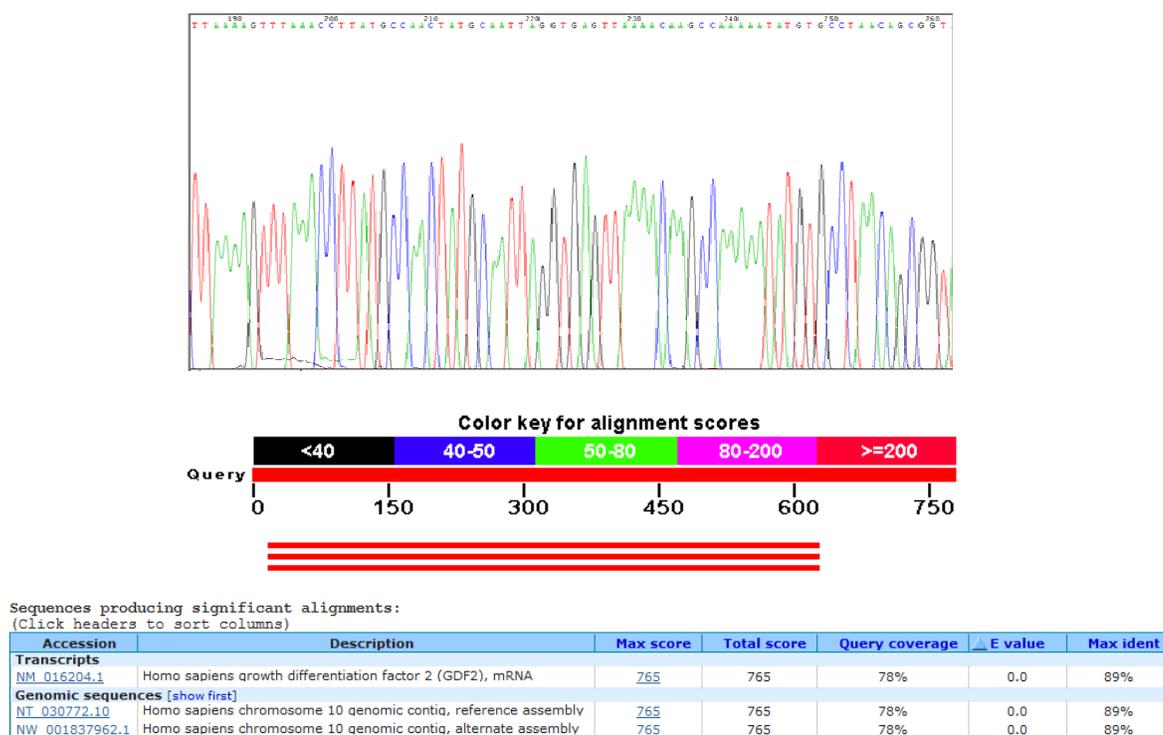


**Figura 12. Generación del plásmido Ad-BMP9.** (A) se seleccionaron clonas con retraso de migración en un gel de agarosa, (B) caracterización del plásmido pShuttle-BMP9 por restricción con la enzima *PstI*, en el carril número 11 se encuentra el vector pShuttle sin el inserto de BMP como control, (C) Caracterización del plásmido pAdBMP9, en el carril numero 13 se encuentra el plásmido pAdEasy y en el carril número 14 el plásmido pShuttle-BMP9 como controles.

Una vez seleccionadas las clonas con retraso de migración, se les realizó la caracterización con la enzima de restricción *PstI* para asegurar la inserción del fragmento de BMP9 de acuerdo con su patrón de restricción (figura 12.B). Una vez obtenido el plásmido pShuttle-BMP9 se procedió a la construcción del genoma adenoviral. Para esto se transformaron bacterias BJ5183 competentes con el plásmido pAdEasy, el cual tiene resistencia a ampicilina, y se seleccionaron clonas de acuerdo a su resistencia. Estas mismas fueron transformadas con el vector pShuttle-BMP9

linearizado, el cual tiene resistencia a kanamicina, con la enzima *BstZ17I* y se llevó a cabo la recombinación en sus regiones homólogas y cambiando la resistencia a ampicilina y con esta característica se seleccionaron clonas. Las clonas seleccionadas fueron caracterizadas por reacción de restricción con la enzima *PmeI* (figura 12.C), logrando así la construcción del esqueleto adenoviral con el transgen de BMP9.

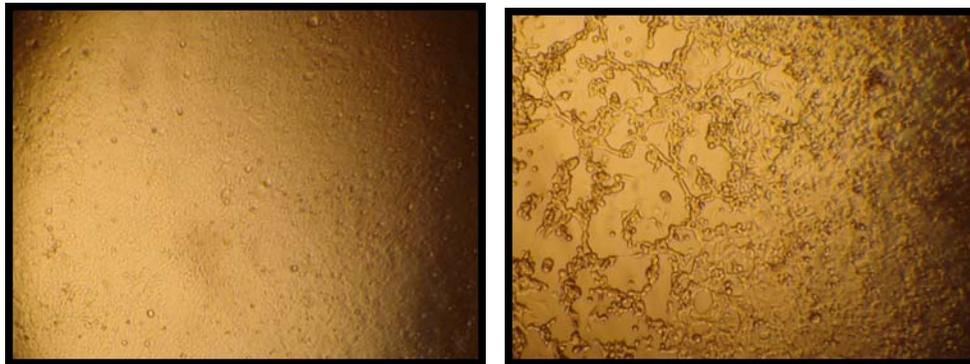
Una vez obtenido el pAd-BMP9 se procedió a secuenciar una parte del nuevo genoma híbrido con el estuche de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing y se precipitó el producto como se mencionó en la metodología. Al analizar la secuencia en GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) se pudo observar que el fragmento secuenciado corresponde al gen de la proteína BMP9 con un 89% de identidad (figura 13).



**Figura 13. Análisis de la secuencia de BMP9 en GeneBank, la cual resultó con un 89% de homología según la secuencia reportada.**

Luego se realizó una reacción de restricción para linearizar el plásmido con la enzima *PacI*, después este plásmido fue purificado para realizar la transfección de células HEK-

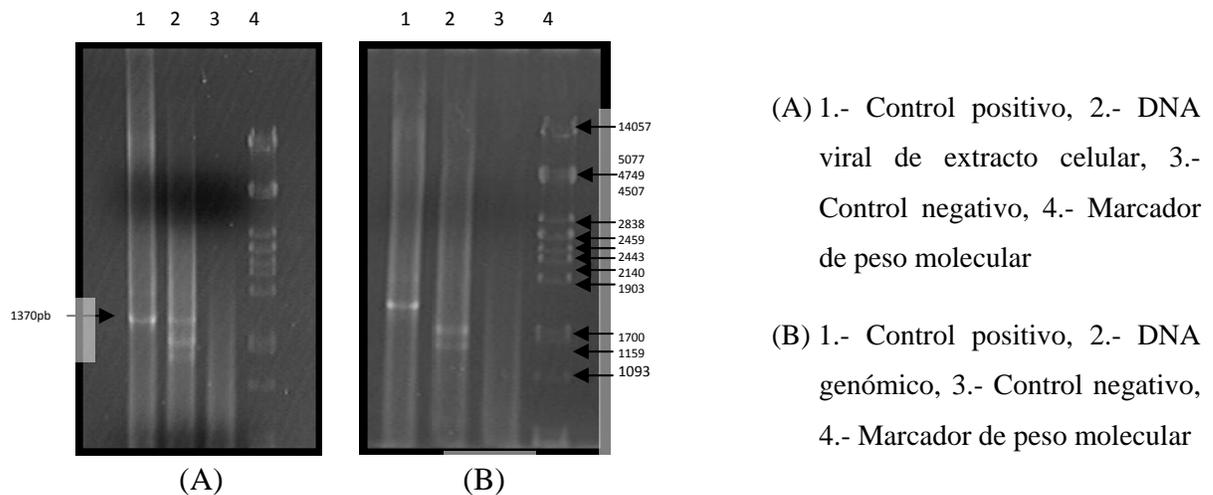
293 utilizando Lipofectamina™ 2000. Después de la transfección las células fueron incubadas y al cabo de dos semanas de incubación se logró observar efecto citopático en las células transfectadas en comparación con el control de células sin transfectar.



**Figura 14. Efecto citopático en células HEK 293 ocasionada por adenovirus.**

Luego de observar el efecto citopático (figura 14), se cosecharon estas células y fueron lisadas por 3 ciclos de congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  y descongelación a  $37^{\circ}\text{C}$ , se centrifugaron para eliminar los restos celulares. Con este extracto se realizó extracción de DNA viral y se utilizó para realizar PCR para verificar la presencia del genoma híbrido. Sin embargo al realizar la PCR se observaron dos bandas debajo de la banda correspondiente a la amplificación de BMP9 (figura 15.A), por lo tanto se procedió a realizar de nuevo la PCR pero esta vez solo con DNA genómico y se pudo observar que las bandas seguían apareciendo, por lo cual se llegó a la conclusión que eran correspondientes a sitios inespecíficos en el DNA genómico (figura 15.B).

Una vez confirmada la presencia del Ad-BMP9 por PCR, con estos extractos se realizó una nueva infección de células HEK-293 en cajas de cultivo T-25. Luego de observar el efecto citopático se realizó el mismo procedimiento y se infectaron esta vez 5 cajas T-25 y después 10 cajas T-75 hasta llegar a infectar 25 cajas T-175. Las células de estas 25 cajas T-175 fueron centrifugadas y lisadas para realizar la purificación del vector adenoviral.



**Figura 15. PCR para la confirmación de la presencia del transgen de BMP9 en el esqueleto adenoviral.** (A) PCR para verificar la presencia del transgen utilizando DNA viral. (B) PCR con DNA genómico para identificar el origen de bandas inespecíficas.

La purificación fue realizada utilizando centrifugación con gradientes de cloruro de cesio y diálisis para eliminar las sales. Después, se procedió a la titulación del virus por medio de Unidades Formadoras de Placas líticas (PFU) y a la cuantificación por Densidad Óptica (DO).

De la misma manera se realizó la producción purificación y titulación de los vectores Ad-BMP2 y Ad-BMP7. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4.

Adenovirus	PFU/mL	PV/mL
AdBMP2	$1 \times 10^{11}$	
AdBMP7	$9.7 \times 10^7$	$5.8 \times 10^{12}$
AdBMP9	$2.18 \times 10^9$	$6.95 \times 10^{11}$

**Tabla 4. Resultado de la titulación de partículas adenovirales por el método de titulación en placa y por densidad óptica.**

#### **4.4. Ensayos de expresión de osteocalcina y osteopontina**

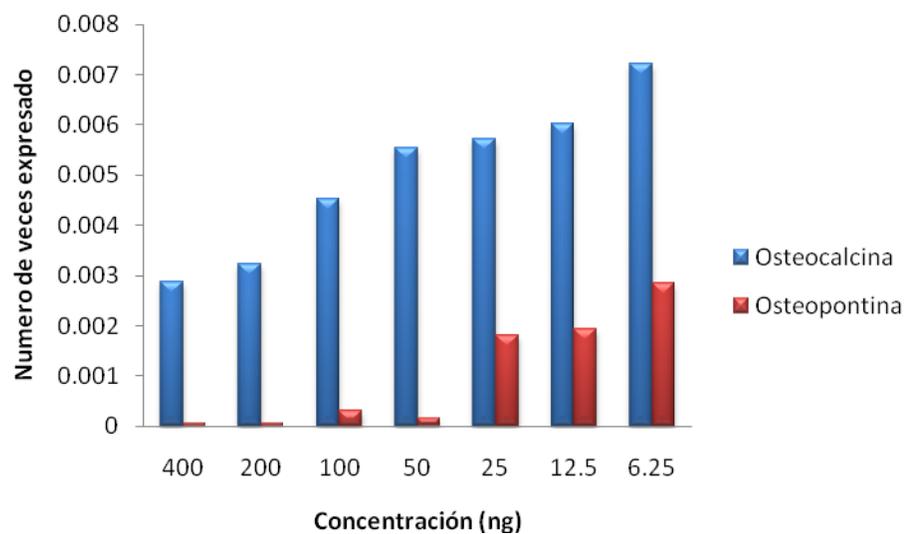
Las CMM que fueron aisladas y caracterizadas se utilizaron para realizar los ensayos de transducción y de expresión de los marcadores osteogénicos osteocalcina y osteopontina. Se sembraron CMM en platos de cultivo de 6 pozos y al cabo de 24 h, fueron transducidas con 100 MOI del vector adenoviral AdBMP2. También se realizaron co-transducciones de la siguiente manera: AdBMP2/AdBMP9, AdBMP2/AdBMP7. En estos casos las células fueron transducidas con 50 MOI de cada vector adenoviral. Se incubaron durante 0, 4, 8 y 16 días y al cabo de estos tiempos se realizó extracción de RNA y síntesis de cDNA por medio de PCR transcriptasa reversa con los cuales se realizaron reacciones de PCR en tiempo real.

Se realizó PCR de punto final para verificar el funcionamiento de los iniciadores para los genes GAPDH, osteocalcina y osteopontina, y así establecer la temperatura de alineación ideal la cual fue de 60°C para los 3 genes.

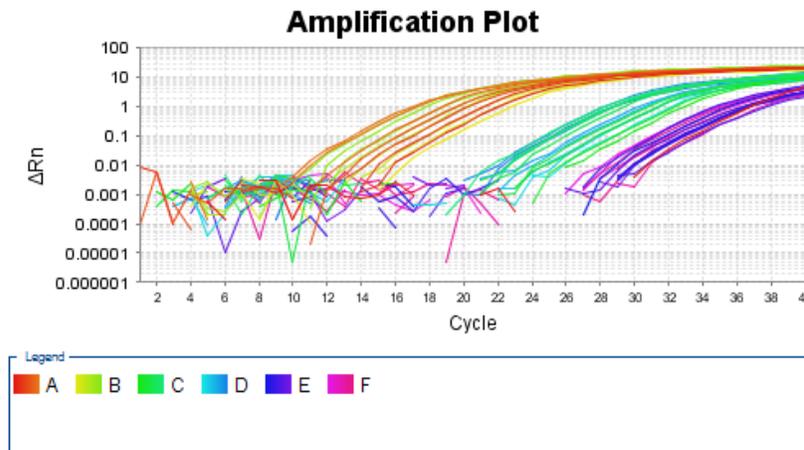
Para la selección de la concentración de cDNA se evaluó la expresión de los genes de GAPDH, osteocalcina y osteopontina con una mezcla de los cDNAs correspondientes a los diferentes tratamientos. Se prepararon diluciones quedando en: 400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.125 ng y 1.56 ng (tabla 5). Cada una de las concentraciones se realizó por duplicado. Se puede observar que los niveles de expresión se mantienen constantes y por lo tanto se decidió trabajar con 50ng de cDNA (figura 16). Además, se determinó la eficiencia y especificidad de acuerdo a las curvas de amplificaciones, las cuales mostraron ser homogéneas en la etapa lineal para cada uno de los genes y a las curvas de disociación mostrando un solo pico a una Temperatura media de fusión, lo cual indica la formación de un solo amplicón (figura 17 y 18).

**Tabla 5. Niveles de expresión por concentración de osteocalcina y osteopontina medidas por PCR en tiempo real.**

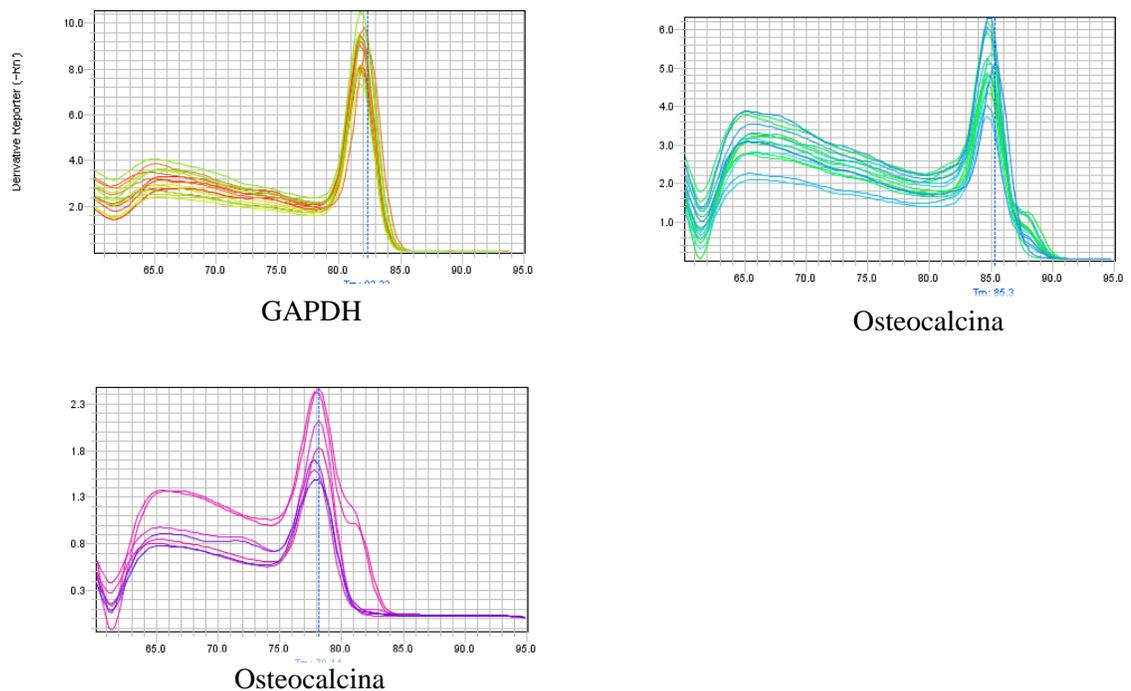
Concentración	Osteocalcina	Osteopontina
400 ng	0.00287218	6.49366 x 10 <sup>-5</sup>
200 ng	0.00322125	6.23764 x 10 <sup>-5</sup>
100 ng	0.00452181	0.000317168
50 ng	0.0055493	0.000153804
25 ng	0.00573024	0.001818657
12.5 ng	0.00601479	0.001931121
6.25 ng	0.00721873	0.002850092



**Figura 16. Gráfica de niveles de expresión de Osteocalcina y Osteopontina por concentración**



**Figura 17.** Curvas de amplificación de los genes GAPDH, Osteocalcina y Osteopontina con Syber Green a diferentes concentraciones de cDNA. Se puede observar que para cada gen la etapa lineal se mantiene constante.



**Figura 18.** Curvas de disociación para los genes GAPDH, Osteocalcina y Osteopontina. En la curva se muestra un solo pico de las muestras para cada gen, indicando la especificidad de los iniciadores.

Las condiciones utilizadas para la PCR en tiempo real se muestran en la tabla 6.

	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
<b>Etapa de calentamiento</b>	<b>1</b>	95	10 min
<b>Ciclo</b>	<b>2</b>	95	15 seg
	<b>3</b>	60	1 min
<b>Etapa de curva de disociación</b>	<b>4</b>	Ir a paso 2, 40 veces	
	<b>5</b>	95	15 seg
	<b>6</b>	60	1 min
	<b>7</b>	95	15 seg

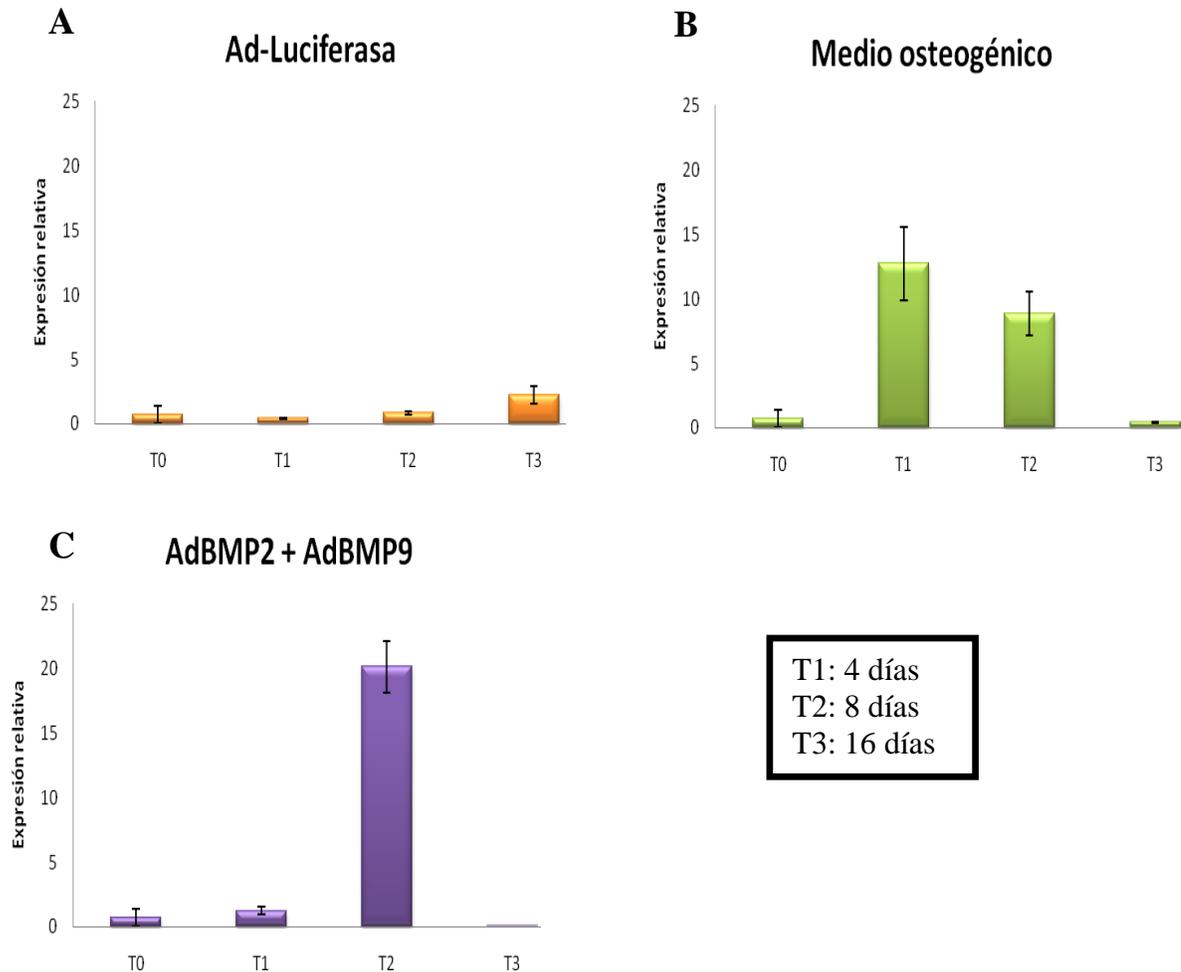
**Tabla 6. Muestra las condiciones utilizadas para las reacciones de PCR en tiempo real.**

Una vez optimizada la PCR se evaluaron los niveles de expresión de los genes osteocalcina y osteopontina en los distintos tratamientos y tiempos de exposición los cuales fueron: CMM transducidas con AdBMPs, CMM transducidas con AdLuciferasa, CMM sin transducir y CMM estimuladas con medio osteogénico, a los 0, 4, 8 y 16 días. Para la interpretación de los resultados, los valores obtenidos de las células sin transducir, es decir el control negativo, se restaron a los valores de los grupos experimentales.

Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y los niveles de expresión fueron calculados por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = (\text{promedio de } Ct \text{ muestra}) - (\text{promedio de } Ct \text{ endógeno})$ , y  $\Delta\Delta Ct = (\text{promedio de } \Delta Ct \text{ muestra}) - \Delta Ct \text{ negativo}$ .

Los resultados fueron presentados como la media de los triplicados  $\pm$  la desviación estándar y fueron analizados por un análisis de varianza en un modelo lineal univariado, analizando los factores de tiempo y el tratamiento y su relación con la expresión de los genes analizados. Se consideró estadísticamente significativo los valores de  $P < 0.05$ .

Los resultados de los ensayos expresión del gen osteopontina fueron los siguientes:



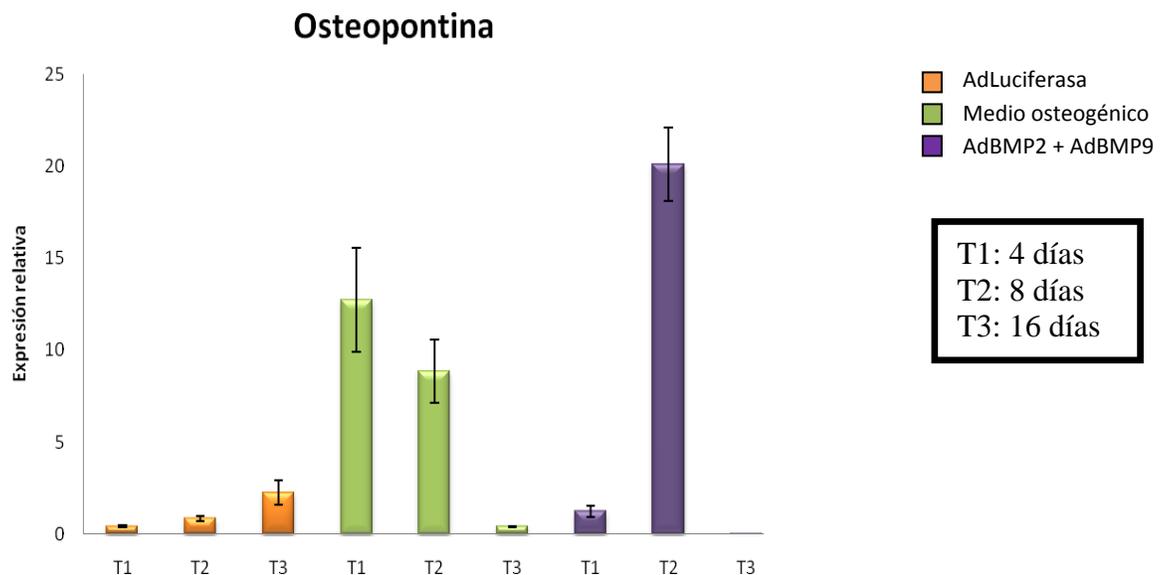
**Figura 19. Determinación de nivel de expresión del gen osteopontina por PCR Tiempo real.** No se presentan las gráficas de los ensayos de inducción con AdBMP2 y AdBMP2/AdBMP7 debido a que no se detectó la expresión de este gen.

En estos ensayos se observó que la expresión de osteopontina disminuye con el tiempo ya que es un marcador de osteogénesis temprano. Las células estimuladas con Ad-Luciferasa, o control negativo, no mostraron sobreexpresión del gen osteocalcina en ninguno de los tiempos (figura 19.A). En cambio, en las células estimuladas con medio

osteogénico se observó que la expresión del gen osteopontina disminuye con el tiempo, y que a los 16 días los regresa a los niveles basales (figura 19.B).

Es importante mencionar que la expresión del gen osteopontina no pudo ser detectada en los ensayos de transducción con AdBMP2 y la combinación AdBMP2/AdBMP7, sin embargo ésta si pudo ser detectada con la combinación de AdBMP2/AdBMP9. En este caso se muestra una sobreexpresión de 20 veces más que en el control negativo a los 8 días (figura 19.C), sin embargo en este ensayo, las células tuvieron un comportamiento diferente que en los casos anteriores. A los 16 días las células transducidas con AdBMP2 y AdBMP9 acidificaron el medio de cultivo desde el día 8 y a los 16 días la monocapa de células se levantó del plato de cultivo, generando problemas para llevar a cabo la extracción de RNA y por esta razón no se pudo evaluar la expresión del gen.

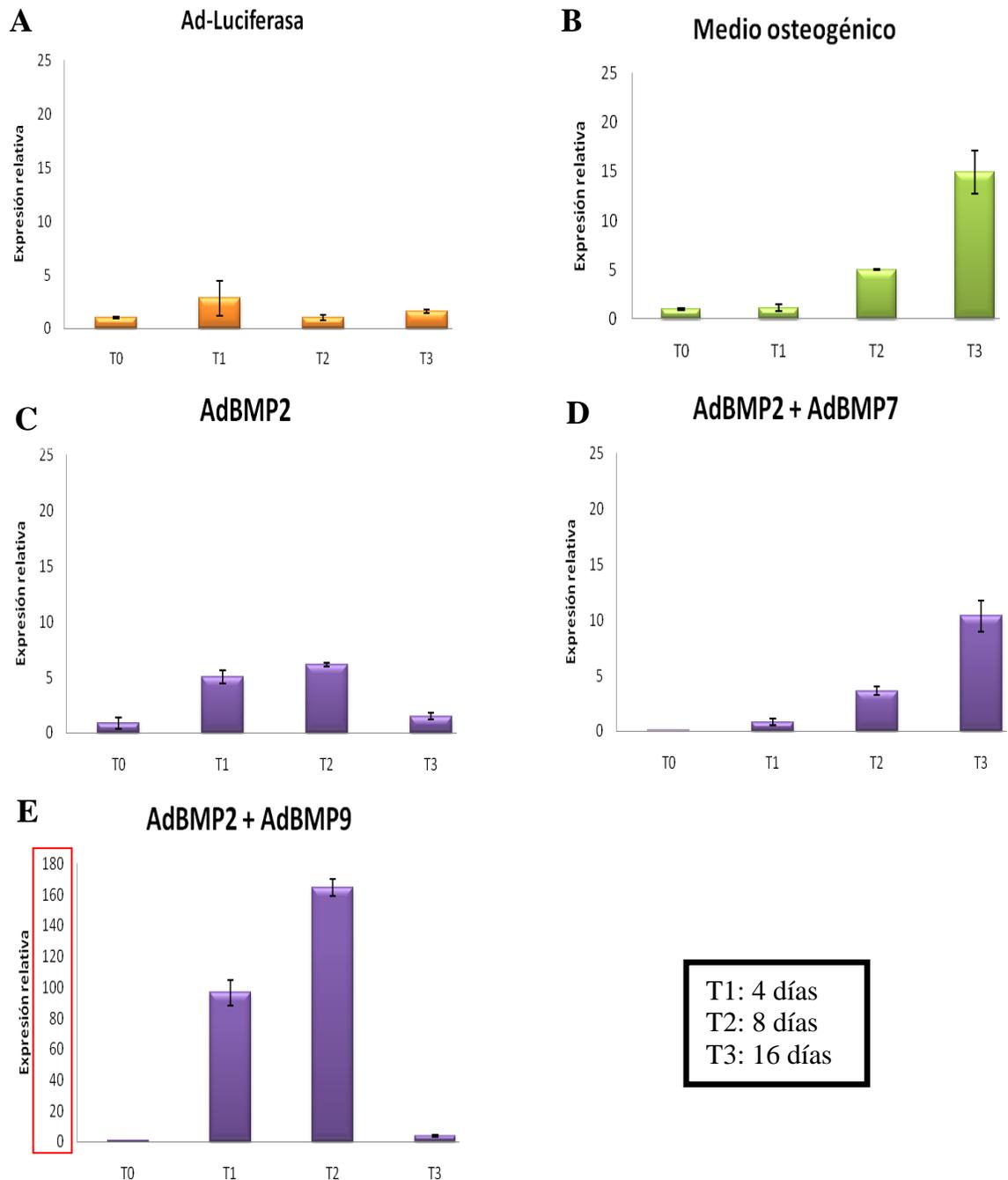
En la figura 20 se puede observar más claramente como las células con la combinación de AdBMP2 y AdBMP9 sobreexpresan más altamente el gen osteopontina.



**Figura 20. Ensayos de expresión del gen osteopontina.** Se muestra en control negativo AdLuciferasa, las células estimuladas con medio osteogénico y células transducidas con

la combinación AdBMP2/AdBMP9, observándose mayor expresión con la combinación de AdBMP2/AdBMP9.

En los ensayos de expresión del gen osteocalcina se observó lo siguiente:



---

**Figura 21. Determinación de nivel de expresión del gen osteopontina por PCR Tiempo real.**

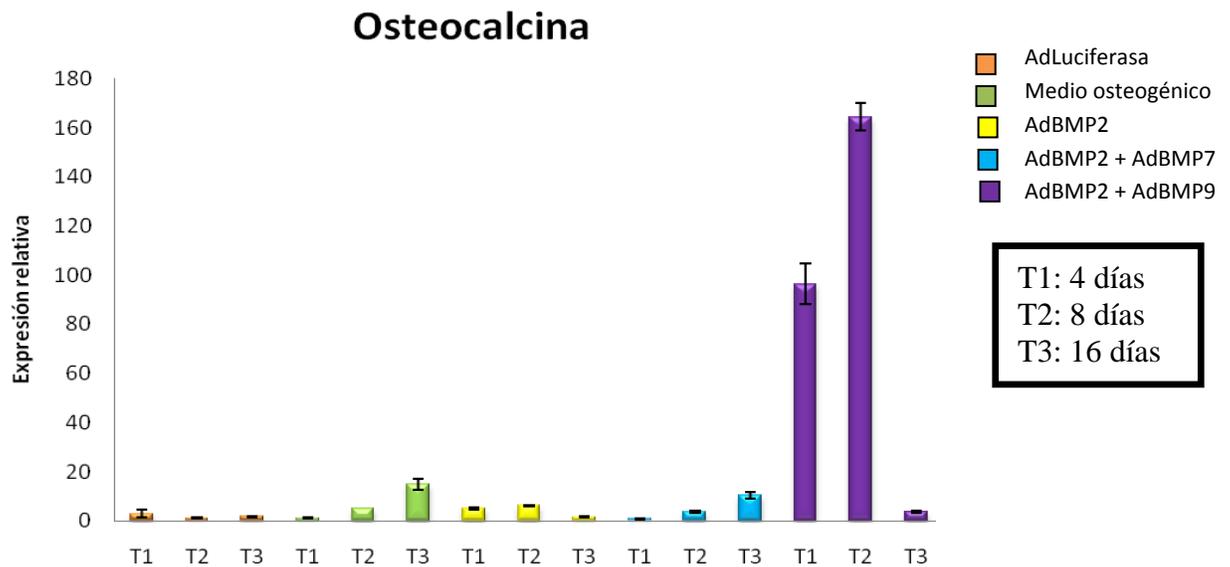
De la misma manera que el gen osteopontina, las células estimuladas con Ad-Luciferasa, o control negativo, no mostraron sobreexpresión del gen osteocalcina en ninguno de los tiempos (figura 21.A). Por el contrario, en las células estimuladas con medio osteogénico se observa que la expresión del gen osteocalcina aumenta al incrementar el tiempo, mostrando una sobreexpresión de 15 veces más que en el control negativo a los 16 días (figura 21. B).

En las células transducidas con AdBMP2 se observó que a los 4 y 8 días hay sobreexpresión de 5 y 6 veces más que en el control negativo, respectivamente, sin embargo ésta baja a niveles basales a los 16 días (figura 21. C). Probablemente el estímulo de las CMM ocasionado por los homodímeros de BMP2 dura solo unos días, y es por esto que a los 16 días la expresión baja a niveles basales. Sin embargo, la expresión provocada por BMP2 es menor que la del medio osteogénico.

En el caso de las células transducidas con AdBMP2 y AdBMP7 mostraron sobreexpresión de 10 veces más a los 16 días con respecto al control negativo (figura 21. D). Sin embargo los resultados con el medio osteogénico estimularon mas la producción de osteopontina

Por otro lado en el caso de las células transducidas con AdBMP2 y AdBMP9, los resultados fueron sorprendentes al observar sobreexpresión a los 4 y 8 días de 100 y 150 veces más que en el control negativo respectivamente (figura 21. F). Sin embargo, como se mencionó anteriormente en las mediciones del gen osteopontina, las células acidificaron el medio de cultivo y la monocapa celular se levantó del plato de cultivo a los 16 días y por lo cual no fue posible detectar la expresión del gen osteocalcina.

En la figura 22 se puede observar más claramente como las células con la combinación de AdBMP2 y AdBMP9 sobreexpresan más altamente el gen osteocalcina.



**Figura 22. Ensayos de expresión del gen osteocalcina.** Se muestra en control negativo AdLuciferasa, las células estimuladas con medio osteogénico y células transducidas con AdBMP2, la combinación AdBMP2/AdBMP7 y AdBMP2/AdBMP9, observándose mayor expresión con la combinación de AdBMP2/AdBMP9.

## CAPÍTULO V.

### DISCUSIÓN

En los últimos años se han hecho esfuerzos por encontrar nuevas y eficientes estrategias para la regeneración de tejido óseo que sean menos dolorosas y que disminuyan el tiempo de este proceso para mejorar la calidad de vida del individuo. La aplicación de técnicas de biología molecular y de ingeniería de tejidos ha contribuido fuertemente en este campo con el empleo de CMM capaces de diferenciarse hacia linaje óseo con la ayuda de factores de crecimiento como las BMPs. Desde el descubrimiento de las BMPs por Marshal Urist, se ha demostrado que son fuertes inductores de la osteogénesis siendo las más osteogénicas la BMP2, BMP7 y BMP9 (Luu *et al*, 2006). Además, se ha observado que la actividad osteogénica de estas proteínas aumenta más de 20 veces cuando estas actúan de forma heterodimérica (Gautschi *et al*, 2007).

En estudios previos se ha demostrado que los adenovirus portadores de BMPs son capaces de inducir la osteogénesis en modelos murinos (Luu *et al*, 2006). Sin embargo en mamíferos mayores la respuesta inmune inhibe el proceso de osificación (Egermann *et al*, 2006). Además, se han realizado ensayos con combinaciones de las proteínas recombinantes humanas BMP2 y BMP7, las cuales fueron aprobadas por la FDA para su uso (Govender *et al.*, 2002). Existen reportes de algunas otras BMPs con alto potencial osteogénico que no han sido probadas en combinación, por lo que en el presente trabajo se evaluó el potencial osteogénico de la combinación de vectores adenovirales portadores de los genes de rhBMP2, rhBMP7 y rhBMP9 en CMM de origen ovino, un mamífero grande.

Las CMM utilizadas en este estudio fueron aisladas a partir de médula ósea y de tejido adiposo de *Ovis aries*. Éstas fueron cultivadas y fenotipificadas por sus antígenos de superficie CD45, CD90, CD105 y CD271. Las células procedentes de tejido adiposo arrojaron mejores resultados que las células de medula ósea, sobre todo en el caso de CD105 y CD271 con 20.15% y 93.91% células positivas, respectivamente. Además el antígeno CD45 resultó negativo en los dos casos, el cual es un antígeno hematopoyético

que al estar presente en cultivos de CMM se ha observado que inhibe la proliferación de las CMM. Jarocha y colaboradores en el año 2008 observaron que los cultivos ricos en células CD105+ y CD271+ proliferan más rápidamente y que además éstas expresan altamente factores de transcripción fundamentales en la diferenciación de CMM a linaje óseo como RUNX2 (Jarocha *et al.*, 2008). También, Jin y colaboradores en el año 2009 demostraron que las células CD105+ tienen gran capacidad de diferenciación hacia diversos linajes, por lo tanto son útiles para este tipo de ensayos (Jin *et al.*, 2009). Por otra parte, entre las ventajas las CMM de tejido adiposo se encuentran las siguientes: tienen la capacidad de proliferar más rápidamente que aquellas obtenidas de médula ósea, se hallan en cantidades abundantes y en sitios anatómicos de fácil obtención. (Chuliá. *et al.*, 2009). Aunado a esto, al observar los resultados de citometría obtenidos, en este estudio se decidió realizar los ensayos posteriores con CMM de tejido adiposo.

Por otro lado, se llevó a cabo la construcción del vector adenoviral AdBMP9 y la producción y purificación de los vectores AdBMP2, AdBMP7 y AdBMP9 obteniendo títulos mayores a  $1 \times 10^7$  PFU/mL y  $1 \times 10^{11}$  PV/mL. Esta diferencia se debe a que en el método de titulación por formación de placas líticas se cuantifican las partículas virales infecciosas. Sin embargo, el método de titulación por partículas virales o densidad óptica, cuantifica las partículas virales funcionales y no funcionales dando como resultado un título más alto.

La evaluación del potencial osteogénico de las BMPs y sus combinaciones, se evaluó por la expresión de marcadores osteogénicos como osteocalcina y osteopontina por PCR en tiempo real y se observó que la estimulación osteogénica de la combinación de AdBMP2 y AdBMP7 es más potente y duradera que la estimulación con AdBMP2 sola, por lo cual posiblemente la formación de heterodímeros es más estable que la formación de homodímeros. La expresión de marcadores osteogénicos fue 10 veces mayor con AdBMP2 en comparación con el control negativo y de 15 veces más con la combinación de AdBMP2 y AdBMP7. Aunque se ha demostrado que los homodímeros de AdBMP2 pueden inducir osteogénesis (Tesis doctoral de Cervantes V.H, 2007), en otros estudios como el realizado por Zhao y colaboradores en el año 2005, se demostró que la combinación de AdBMP2 y AdBMP7 inducen la formación de hueso dos a tres veces

más que AdBMP2 solo. En este trabajo se observó una mayor expresión de marcadores osteogénicos con la combinación de AdBMP2 y AdBMP7 que con AdBMP2 a los 16 días de incubación.

Por otro lado, en los ensayos realizados con la combinación de AdBMP2 y AdBMP9 se observó que los marcadores osteogénicos se expresan de 100 a 150 veces más que el control negativo, lo que nos indica que la formación de heterodímeros de BMP2/BMP9 es aun más potente para inducir la osteogénesis. Aunque se ha demostrado que el receptor de BMP9 es similar al de las otras BMPs (Massague 1996), hay reportes que indican que BMP9 puede unirse con BMP2 y BMP4 (Song *et al.*, 1995). Por lo tanto BMP9 puede actuar de forma sinérgica con otras BMPs osteoinductivas.

En el año 2007 se evaluó el potencial osteogénico de 14 BMPs utilizando adenovirus portadores de BMPs en una inyección intramuscular en un modelo murino y se observó que BMP9 tiene mayor actividad osteogénica que otras BMPs (Luu. *et al*, 2007), lo cual coincide con los resultados en este trabajo. También, Varady y colaboradores en el año 2001 realizaron un estudio en un modelo murino en donde inyectaron de manera intraósea un adenovirus portador de BMP9 y demostraron que BMP9 induce la formación de hueso de tipo endocondral, sin embargo éste despierta una fuerte respuesta inflamatoria, lo que hace que el uso de este vector no sea apropiado para ensayos en humanos (Varady *et al.*, 2001). Con el fin de minimizar la respuesta inmunológica, en este trabajo se modificaron las CMM con los adenovirus portadores de BMPs y serán incluidas en un implante que se evaluará en un modelo ovino

A pesar de que se obtuvieron mejores resultados con la combinación de AdBMP2/AdBMP9, a los 16 días de incubación se observó que la monocapa de células se levantó del plato de cultivo y la acidificación del medio de cultivo a partir del día 8, esto indica que las células tuvieron un mayor metabolismo o proliferación ocasionando un efecto citotóxico que se deberá estudiar más detalladamente. Aunque desde otro punto de vista, esto puede ser una respuesta de maduración celular o diferenciación osteogénica ya que, al aumentar el nivel de diferenciación, las CMM pierden la capacidad de unión al plástico, pasando de osteoblastos a osteocitos. Es importante mencionar también que a los 16 días no fue posible la extracción de RNA debido a que

no se logró disgregar la monocapa celular que se desprendió posiblemente debido a la cantidad de matriz ósea secretada por los osteoblastos y por lo cual no se logró detectar los marcadores osteogénicos osteocalcina y osteopontina. Es importante realizar estudios de toxicidad de la combinación AdBMP2/AdBMP9 para así poder explicar el efecto observado en este trabajo y poder llevarlo a ensayos preclínicos.

## CAPÍTULO VI.

### CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que las CMM de tejido adiposo poseen capacidad de diferenciación hacia osteoblastos y que además estos secretan proteínas de la matriz ósea como osteocalcina y osteopontina al ser estimuladas con adenovirus portadores de BMP2, BMP7 y BMP9. Usando AdBMP2 y las combinaciones AdBMP2/AdBMP7 y AdBMP2/AdBMP9 se observó que los heterodímeros formados por BMP2/BMP7 y BMP2/BMP9 son más estables que las formas homodiméricas de BMP2.

Sin embargo, la combinación de AdBMP2/AdBMP9 mostró ser de 100 a 150 veces más eficiente para lograr la diferenciación hacia osteoblastos y formación de matriz ósea. No obstante, es necesario realizar estudios de toxicidad para evaluar la posible muerte celular observada al cabo de 16 días.

Las CMM de tejido adiposo estimuladas con la combinación AdBMP2/AdBMP9 pueden ser utilizadas en un implante para lograr la regeneración de tejido óseo en ensayos preclínicos.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Aparecido D.S., Oliveira C.D., Seizas M.T., Faloppa F. The role of morphogenetic protein on bone tissue repair. 2005. *Acta Ortop Bras.* 13(4).
2. Betz O.B., Betz V.M., Nazarian A., Pilapil C.G., Varhas M. S., Bouxsein M.L., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A., Evans C.H. 2006. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 88,355–365.
3. Bishop G.B., y Einhorn T.A. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. 2007. *International Orthopaedics.* 31(6): 721–727.
4. Breyer B., Jiang W, Cheng H., Ronjon P., He T.C. Adenoviral Vector-Mediated GeneTransfer for Human Gene Therapy. 2001. *Current Gene Therapy.* 1(2):149-62.
5. Brown M.A., Zhao Q., Baker K.A., Naik C., Chen C., Pukac L., Singh M., Tsareva T., Parice Y., Mahoney A., Roschke V., Sanyal I., Choe S. Crystal Structure of BMP-9 and Functional Interactions with Pro-region and Receptors. 2005. *The journal of Biological Chemistry.* 280(26):25111-8.
6. Cao X., Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. 2005. *Gene.* 357 1 – 8
7. Cervantes Kardasch V.H., Castro Govea Y., Ortiz López R., Álvarez Lozano E., Padilla Rivas G., SilvaPlatas C.I., Vázquez Juárez J.L., Cervantes García D., Hernández Rodríguez M.A., Romero Díaz V., Morales de los Santos J.A., Martínez Rodríguez H., Pérez Unzueta A., Rojas-Martínez A. Mesenchymal Stem Cells

- Transduced *Ex Vivo* with hBMP-2 Improve Bone Regeneration in a Canine Model of Mandible Distraction Surgery. 2007. Tesis Doctoral.
8. Chuliáa F. Z., Nodab M. "Opening" The Mesenchymal Stem Cell Tool Box. 2009. European Journal of Dentistry. 3(3):240-9.
  9. Cons F. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. 2003. Revista metabolismo óseo mineral. Vol. 1. Num. 3.
  10. Egermann M., Baltzer A.W., Adamaszek S., Evans C., Robbins P., Schinerider E., Lill C.A. Direct Adenoviral Transfer of Bone Morphogenetic Protein-2 cDNA Enhances Fracture Healing in Osteoporotic Sheep. 2006. Human Gene Therapy. 17:507–517.
  11. Fernández I., Alobera M.A., Del canto M., Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. 2005. Histología y fisiología del tejido óseo. 11:E47-51.
  12. Garther L.P., Hiatt J.L. Texto Atlas de Histología. 2007. Editorial McGrawHill. Tercera Edición.
  13. Gautschi O.P., Frey S.P., Zellweger R. Bone Morphogenetic Proteins in clinical applications. 2007. ANZ J. Surg. 77: 626–631.
  14. Glasgow J.N., Everts M., Curiel D.T. Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. 2007. Cancer Gene Ther. Author manuscript. 4(3):337-46.

15. Granjeiro J.M., Oliveira R.C., Bustos Valenzuela J.C., Sogayar M.C., Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. 2005. Brazilian Journal of Medical Biological Research. 38:1463-1473.
16. Guillot P.V., Cui W., Fisk N.M., Pola D.J. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. 2007. Cellular and Molecular Medicine. 11(5):935-44.
17. Evans C.H., Ghivizzani S.C., Robbins P.D. Orthopedic Gene Therapy in 2008. 2008. Molecular Therapy. Vol 17. 2, 231-244.
18. Guo X., Zheng G., Kulbatski I., Yuan Q., Yang S., Shao Z., Wang H., Xiao B., Pan Z., Tang S. Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seed on porous  $\beta$ -TCP ceramic scaffolds. 2006. Biomedical materials. 1(3):93-9.
19. Govender S., Csimma C., Genant H.K., Valentin-Opran A., Amit Y., Arbel R., Aro H., Atar D., Bishay M., Borner M.G., Chiron P., Choong P., Cinats J., Courtenay B., Feibel R., Geulette B., Gravel C., Hass N., Raschke M., Hammacher E., Van D., Hardy P., Holt M., Josten C., Ketterl R.L., Lindeque B., Lob G., Mathevon H., Mccoy G., Marsh D., Miller R., Munting E., Oevre S., Nordsletten L., Patel A., Pohl A., Rennie W., Reynders P., Rommens P.M., Rondia J., Rossouw W.C., Daneel P.J., Ruff S., Ruter A., Santavirta S., Schildhauer T.A., Gekle C., Schnettler R., Segal D., Seiler H., Snowdowne R.B., Stapert J., Taglang G., Verdonk R., Vogels L., Weckbach A., Wentzensen A., Wisniewski T. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. 2002. J. Bone Joint Surg Am. 84-A(12):2123-34.

20. Haidar Z.S., Hamdy R.C., Tabrizian M. Delivery recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. 2009. *Biotechnol Lett.* 31(12):1825-35.
21. Handschel J., Berr K, Depprich R, Kübler N.R., Naujoks C., Wiesmann H.P., Ommerborn M.A., Meyer U. Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. 2008. *Head and face medicine.* 10;4:10.
22. Helm G.A., Alden T.D., Beres E.J., Hudson S.B., Das S., Engh J.A., Pitman D.D., Kerns K.M., Kallmes D.F. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. 2000. *J Neurosurg (Spine 2).* 191-6.
23. Hiroshi Mizuno. Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and regeneration: Ten Years of Research and a Literature Review. 2009. *J Nippon Med Sch.* 76(2):56-66.
24. Horton W.A. y Degnin C.R. FGFs in endochondral skeletal Development. 2009. *Cell Press.* 20(7):341-8.
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
26. <http://www.portal.salud.gob.mx/>
27. Ishikawa H., Kitoh H., Sugiura F., Ishiguro N. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. 2007. *Acta Orthopaedica.* 78(2):285-92.

- 
28. Jang B.J., Byeon Y.E., Lim J.H., Ryu H.H., Kim W.H., Koyama Y., Kikuchi M., Kang K.S., Kweon O.K. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. 2008. *Journal of Veterinary Science*. 9(4):387-93.
29. Jarocha D., Lukasiewicz E., Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. 2008. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 46(3):307-14.
30. Jin H.J., Park S.K., Oh W., Yang Y.S., Kim S.W., Choi S.J. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. 2009. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 17;381(4):676-81.
31. Kanczeler J.M. y Oreffo R.O.C. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. 2008. *European Cells and Materials*. 2;15:100-14.
32. Kerns S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. 2006. *Stem Cells*. 24(5):1294-301.
33. Kim S.J., Shin Y. W., Yang K. H., Kim S.B., Yoo M. J., Han S.K., Im S.A., Won Y.D., Sung Y.B., Jeon T.S., Chang C.H., Jang J.D., Lee S.B., Kim H.J., Lee S.Y. 2009. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron™) injection to treat fractures. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 12;10:20.
34. Khosla S., Westendorf J.J., Oursler M.J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. 2008. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(2):421-8.

35. Knippenberg M., Helder M.N., Doulabi Z.B., Wuisman P.I., Klein-Nulend J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. 2006. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 14;342(3):902-8.
36. Knockaert M., Sapkota G., Alarco C., Massague J., Brivanlou A.H. Unique players in the BMP pathway: Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. 2009. *Cell Biology*. 8;103(32):11940-5.
37. Koh J.T., Zhao Z., Wang Z., Lewis I.S., Krebsbach P.H., Franceschi R.T. Combinatorial Gene Therapy with BMP2/7 Enhances Cranial Bone Regeneration. 2008. *J Dent Res*. Author manuscript. 87(9):845-9.
38. Kondo M. Bone morphogenetic proteins in the early development of zebrafish. 2007. *The FEBS Journal*. 224; 2960-2967.
39. Kulterer B., Friedl G., Jandrositz A., Sanchez-Cabo F., Prokesch A., Paar C., Scheideler M., Windhager R., Preisegger K.H., Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. 2007. *BMC Genomics*. 12;8:70.
40. Lavery K., Swain P., Falb D., Alaoui-Ismaili M.H. BMP-2/4 and BMP-6/7 Differentially Utilize Cell Surface Receptors to Induce Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. 2008. *The Journal of Biological Chemistry*. 25;283(30):20948-58.

- 
41. Li J.Z., Li H., Sasaki T., Holman D., Beres B., Dumont R.J., Pittman D.D., Hankins G.R., Helm G.A. Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. 2005. *Gene Therapy*. 10(20):1735-43.
  42. Liu Y., Huse R.O., Groot K., D. Buser y Hunziker E.B. Delivery Mode and Efficacy of BMP-2 in Association with Implants. 2007. *Biomaterials and Bioengineering*. 86(1):84-9.
  43. Luo J., Sun M.H., Kang Q., Peng Y., Jiang W, Luu H. H., Luo Q., Park J.Y., Li Y., Haydon R.C., He T.C. Gene Therapy for Bone Regeneration. 2005. *Current Gene Therapy*. 5(2):167-79.
  44. Luu H.H., Song W.X., Luo X., Manning D., Luo J., Deng Z.L., Sharff K.A., Montag A.G., Haydon R.C., He T.C. Distinct Roles of Bone Morphogenetic Proteins in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. 2007. *Journal of Orthopaedic research*. 25(5):665-77.
  45. Massague J. TGF beta signaling: Receptors, transducers, and Mad proteins. 1996. *Cell*. 28;85(7):947-50.
  46. Modder U.I. y Khosla S. Skeletal Stem/Osteoprogenitor Cells: Current Concepts, Alternate Hypotheses, and Relationship to the Bone Remodeling Compartment. 2008. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1;103(2):393-400.
  47. Panetta N.J., Gupta D.M., Quarto N., Longaker M. T. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. 2009. *Panminerva Med*. 51(1):25-41.
  48. Partridge K., Yang X., Clarke N.M.P., Okubo Y., Bessho K., Sebald W., Howdle S.M., Shakesheff K.M., Oreffo R.O.C. Adenoviral BMP-2 Gene Transfer in

- Mesenchymal Stem Cells: *In Vitro* and *in Vivo* Bone Formation on Biodegradable Polymer Scaffolds. 2002. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 22;292(1):144-52.
49. Peng Y., Kang Q., Luo Q., Jiang W., Si W., Liu B.A., Luu H.H., Park J.K., Li X., Luo J., Montag A.G., Haydon R.C., He T.C. Inhibitor of DNA Binding/Differentiation Helix-Loop-Helix Proteins Mediate Bone Morphogenetic Protein-induced Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. 2004. *Journal of Biological Chemistry*. 30;279(31):32941-9.
50. Phinney D.G., Prockop D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: the State of Transdifferentiation and Modes of tissue Repair-Current. 2007. *Stem Cells*. 25(11):2896-902.
51. Prockop D.J., Phinney D.G., Bunnell B.A. *Methods in Molecular Biology*. 2008. *Methods in Molecular Biology*.
52. Schindeler A., McDonald M.M., Bokko P., Little D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. 2008. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19(5):459-66.
53. Sharff K.A., Song W.X., Luo X., Tang N., Luo J., Chen J., Bi Y., He B.C., Huang J., Li X., Jiang W., Zhu G.H., Su Y., He Y., Shen J., Wang Y., Chen L., Zuo G.W., Liu B., Pan X., Reid R.R., Luu H.H., Haydon R.C., He T.C. Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. 2009. *Journal of Biological Chemistry*. 2;284(1):649-59.

54. Siddappa R., Martens A., Doorn J., Leusink A., Olivo C., Licht R. Rijn L.V., Gaspar C., Fodde R., Janssen F., Blitterswijk C.V., Boer J. cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. 2008. PNAS. 20;105(20):7281-6.
55. Simic P. y Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins: from developmental signals to tissue regeneration. 2007. EMBO. 8(4):327-31.
56. Song J.J., Celeste A.J., Kong F.M., Jirtle R.L., Rosen, V., Thies, R.S. Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. 1995. Endocrinology. 136(10):4293-7.
57. Suttapreyasri S., Koontongkaew S., Phongdara A., Leggat U. Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. 2006. Int. J. Oral Maxillofac. 35(5):444-52.
58. Tang N., Song W.X, Luo J., Luo X., Chen J., Sharff K.A., Bi Y., He B.C., Huang J.Y., Zhu G.H., Su Y.X., Jiang W., Tang M., He Y., Wang Y., Chen L., Zuo G.W., Shen J., Pan X., Reid R.R., Luu H.H., Haydon R.C., He T.C. BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signaling. 2008. Journal of Cellular and Molecular Medicine. Vol 3.
59. Tocci A. y Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. 2003. The Hematology Journal. 4(2):92-6.
60. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. 2001. Arthritis Research and Therapy. 5(1):32-45.

61. Varady P., Li, J.Z., Cunningham M., Beres E.J., Das S., Engh J., Alden T.D., Pittman D.D., Kerns K.M., Kallmes D.F., Helm G.A. Morphologic Analysis of BMP-9 Gene Therapy-Induced Osteogenesis. 2001. *Human Gene Therapy*. 10;12(6):697-710.
62. Verrotti C., Benassi G., Piantelli G., Magnani C., Giordano G., Gramellini D. Acrofacial dysostosis syndromes: a relevant prenatal dilemma. A case report and brief literature review. 2007. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 20(6):487-90.
63. Vinay C., Sudhakara R.R., Uloopi K.S., Maduri V., Chandra S.R. Craniofacial in Goldenhar syndrome. 2007. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent*. 27(2):121-4.
64. Wang J.J., Ye F., Cheng L.J., Shi Y.J., Bao J., Sun H.Q., Wang W., Zhang P., Bu H. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells promoted by overexpression of connective tissue growth factor. 2009. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*. 10(5):355-67.
65. Watabe T., Miyazono K. Roles of TGF- $\beta$  family signaling in stem cell renewal and differentiation. 2009. *Cell Research*. 19(1):103-15.
66. White A.P., Vaccaro A.R., Hall J.A., Whang P.G., Friel B.C., McKee M.D. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. 2007. *International Orthopaedics*. 31(6):735-41.
67. Woolf A.D y Pflieger B. Burden of major musculoskeletal conditions. 2003. *Bulletin of the World Health Organization*. 81(9):646-56.

68. Woong K.S., Lee J.S., Park M.S., Park J.H., Kim B.S. Enhancement of In Vivo Bone Regeneration Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells. 2008. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(5):975-82.
69. Wu X., Shi W., Cao X. Multiplicity of BMP Signaling in Skeletal Development. 2007. *New York Academy of Sciences*. 1116:29-49.
70. Xu Cao y Di Chen. The BMP signaling and in vivo bone formation. 2005. *Gene*. 29;357(1):1-8.
71. Yew K.H., Hembree M., Prasad K., Preuett B., McFall C., Benjes C., Crowley A., Sharp S., Tulachan S., Mehta S., Tei E., Gittes G. Cross-talk between Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor-  $\beta$  Signaling Is Essential for Exendin-4-induced Insulin-positive Differentiation of AR42J Cells. 2005. *The Journal of Biological Chemistry*. 32209-17.
72. Zhao M., Zhao Z., Koh J.T., Jin T., Franceschi R.T. Combinatorial gene therapy for bone regeneration: cooperative interactions between adenovirus vectors expressing bone morphogenetic proteins 2, 4, and 7. 2005. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1;95(1):1-16
73. Zhu W., Rawlins BA, Boachie-Adjei O, Myers ER, Arimizu J, Choi E, Lieberman JR, Crystal RG, Hidaka C. Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. 2004. *Journal of Bone and Mineral Research*. 19(12):2021-32.