

VCH-6
Biotec
A-434
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA PARA
OSTEOGENESIS IMPERFECTA EN CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMÁTICAS UTILIZANDO UNA
RIBOZIMA INDEPENDIENTEMENTE DE LA MUTACIÓN
DEL GEN COL1A1**

Tesis para optar al título profesional de Ingeniero en
Biotecnología Molecular

CAROLINA INGRID ALLERS HERNÁNDEZ

Director de Tesis: Dra. Paulette Conget

Patrocinante: Dra. María Rosa Bono



Santiago-Chile
2003



**“ESTRATEGIA DE TERAPIA GENICA PARA OSTEOGENESIS IMPERFECTA
EN CÉLULAS TRONCALES MESENQUÍMATICAS UTILIZANDO UNA
RIBOZIMA INDEPENDIENTEMENTE DE LA MUTACIÓN DEL GEN COL 1A1”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

CAROLINA INGRID ALLERS HERNÁNDEZ

Directora de Memoria de Título

Dra. Paulette Conget Molina

Handwritten signature of Dra. Paulette Conget Molina in blue ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. José Minguell Uribe
Presidente Comisión

Dr. Yedy Israel Jacard

Handwritten signature of Dr. José Minguell Uribe in blue ink, written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Paulette Conget por su inagotable espíritu docente, y por su preocupación por la persona más que por el alumno.

A mi familia, mi madre por su esfuerzo y a mi hermana por su constante apoyo e incondicionalidad en aquellos momentos.

A Víctor quien de ser un compañero más se convirtió en alguien indispensable en mi vida.

A los integrantes del Programa de Terapias Génicas y Celulares del INTA, en especial al Dr. José Minguell y a la Dra. Cecilia Rojas por todos sus consejos, a Alejandro por alegrar el trabajo, a María José por regalarme un poco de su tiempo.

A la Dra. Sophia Millington-Ward por su excelente acogida y compañía, y a todos los integrantes del Departamento de Genética Ocular de Trinity College.

A la Dra. María Rosa Bono por su ayuda en la corrección del escrito de esta tesis.

Y a todos aquellos que me dejaron algún buen recuerdo...

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
Bases moleculares de la Osteogenesis Imperfecta	2
Bases celulares de la Osteogenesis Imperfecta	5
Alternativas terapéuticas existentes para Osteogenesis Imperfecta	6
Estrategias metodológicas para bloquear selectivamente la expresión de un gen	8
Ribozimas	9
Ribozimas y Osteogenesis Imperfecta	11
Células Troncales Mesenquimáticas	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
MÉTODOS	19

1. Cultivos celulares	19
1.a Obtención y cultivo de células troncales mesenquimáticas humanas	19
1.b Criopreservación de células troncales mesenquimáticas humanas	20
1.c Genotipificación de células troncales mesenquimáticas para el SNP 3210 del gen col1a1	20
2. Recuentos celulares	21
2.a Número de células nucleadas	21
2.b Número de células totales.....	21
2.c Número de células adheridas	22
3. Viabilidad celular	22
4. Diferenciación de células troncales mesenquimáticas humanas	23
4.a Inducción osteogénica	23
4.b Ensayo espectrocolorimétrico para medir actividad fosfatasa alcalina	23
5. Xenotrasplantes	24
5.a Marcación de células troncales mesenquimáticas humanas con CFSE	25
5.b Infusión de células troncales mesenquimáticas humanas en ratones inmunodeficientes	25

5.c Detección de células troncales mesenquimáticas marcadas con CFSE en cortes de tejidos	26
5.d Detección de células troncales mesenquimáticas humanas por PCR en muestras de DNA genómico de tejidos murinos	26
i) Extracción de DNA genómico de tejidos	27
ii) Extracción de DNA genómico de suspensiones celulares	28
iii) Integridad y pureza del DNA	29
iv) Cuantificación de DNA	30
v) PCR para β -globina humana	30
6. Transferencia génica con vectores retrovirales	33
6.a Vectores utilizados	33
6.b Infección de células troncales mesenquimáticas humanas	36
6.c Determinación de la eficiencia de la transferencia génica	36
i) Tinción con X-gal y análisis microscópico	36
ii) Tinción con FDG y análisis por citometría de flujo	37
6.d Selección de células troncales mesenquimáticas transducidas	37
7. Expresión de colágeno I	38
7.a Cuantificación a nivel de mRNA	38
i) Extracción de RNA	38
ii) Cuantificación de RNA	39
iii) RT-PCR de tiempo real para col1a1	39
iv) Curva estándar para col1a1	41

v) RT-PCR de tiempo real para gapdh	43
vi) Curva estándar para gapdh	45
vii) Determinación del número de copias del mRNA col1a1 normalizado por gapdh	45
7.b Cuantificación a nivel de proteína	46
i) Inmunoensayo ligado a enzima tipo sandwich para colágeno I	46
ii) Cuantificación de proteínas totales	47
RESULTADOS	48
I. Trasplantabilidad de células troncales mesenquimáticas humanas	48
1. Efectos secundarios de la infusión intravenosa de células troncales mesenquimáticas humanas	48
2. Análisis de la presencia de células troncales mesenquimáticas humanas en tejidos murinos	48
2.a Consecuencias celulares de la marcación con CFSE	49
2.b Biodistribución de células troncales mesenquimáticas humanas marcadas con CFSE	52
2.c PCR para β -globina humana selectivo y de alta sensibilidad	54
2.d Biodistribución a corto plazo de células troncales mesenquimáticas humanas	56

2.e Biodistribución a largo plazo de células troncales mesenquimáticas humanas	59
II. Transducción de células troncales mesenquimáticas humanas con vectores retrovirales y efectos de la presencia de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1	61
1. Determinación de los protocolos óptimos de transducción y de selección de células troncales mesenquimáticas transducidas ..	61
2. Efectos moleculares de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1	65
2.a Reducción de los niveles de mRNA col1a1	66
2.b Reducción de los niveles de proteína colágeno I	68
3. Consecuencias celulares de la la expresión de Rzpol1a1 movilizada por el vector retroviral RNL-Pol	68
3.a Efectos sobre la proliferación de células troncales mesenquimáticas	68
3.b Efectos sobre la diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimáticas	71
DISCUSIÓN	74
I. Trasplantabilidad de células troncales mesenquimáticas humanas	74
II. Efectos de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1 .	80

I. Trasplantabilidad de células troncales mesenquimáticas humanas	74
II. Efectos de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1 .	80
1. Transducción de células troncales mesenquimáticas con vectores retrovirales	80
2. Efectos moleculares de la presencia de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1	82
3. Consecuencias celulares de la de la expresión de Rzpol1a1 movilizada por el vector retroviral RNL-Pol	85
 CONCLUSIONES	 87
 BIBLIOGRAFÍA	 89

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Síntesis de colágeno I	3
Figura 2: Representación esquemática de los vectores retrovirales LZRNL y RNL-Pol	34
Figura 3: Estructura primaria y secundaria de la ribozima Rzpol1a1	35
Figura 4: Efecto de la marcación con CFSE sobre la proliferación de células troncales mesenquimáticas	50
Figura 5: Efecto de la marcación con CFSE sobre la diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimáticas	51
Figura 6: Detección de células troncales mesenquimáticas humanas marcadas con CFSE en cortes de pulmón murino	53
Figura 7: Análisis de Tm para los productos de PCR del gen β -globina humano	55
Figura 8: Cinética de biodistribución de células troncales mesenquimáticas humanas	58
Figura 9: Niveles de mRNA col1a1 en células troncales mesenquimáticas control y células troncales mesenquimáticas transducidas con el vector retroviral RNL-Pol, 5 y 30 días post-infección	67

Figura 10:	Niveles de colágeno I en células troncales mesenquimáticas control y transducidas con el vector retroviral RNL-Pol, 5 y 30 días post-infección	69
Figura 11:	Efecto de la expresión de Rzpol1a1 sobre la proliferación de células troncales mesenquimáticas	70
Figura 12:	Efecto de la expresión de Rzpol1a1 sobre la diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimáticas	72

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Programa utilizado para las reacciones de PCR de tiempo real para β -globina humano, en el sistema LightCycler	31
Tabla 2: Partidores utilizados en el RT-PCR para col1a1 y para gapdh	40
Tabla 3: Programa utilizado para las reacciones de RT-PCR para col1a1, en el sistema LightCycler	42
Tabla 4: Programa utilizado para las reacciones de RT-PCR para gapdh, en el sistema LightCycler	44
Tabla 5: Biodistribución a largo plazo de Células Troncales Mesenquimáticas humanas	60
Tabla 6: Resumen de los resultados de transducción de MSC humanas con el vector retroviral LZRNL	64

ABREVIATURAS

β -gal	β -galactosidasa
α -MEM	medio mínimo esencial alfa
CFSE	5(y6) carboxifluoresceina diacetato, succinimidil ester
CICP	propéptido carboxilo terminal de colágeno I
CMN	células mononucleadas
CMV	citomegalovirus
ELISA-Sandwich	Inmunoensayo Ligado a Enzima tipo Sandwich
FDG	fluoresceina di- β -D-galactopiranosido
mRNA	RNA mensajero
MSC	células troncales mesenquimáticas
neo	neomicina fosfotransferasa
OI	Osteogenesis Imperfecta
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pfu	unidad formadora de placa
PI	ioduro de propidio
pNF	p-nitrofenol

RSV	virus sarcoma rous
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SFB	suero fetal bovino
SNP	polimorfismo de nucleótido único
TA	temperatura ambiente
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactosido

RESUMEN

La Osteogenesis Imperfecta (OI) corresponde a una enfermedad autosómica dominante negativa, que se manifiesta a nivel sistémico. Es producida por mutaciones en los genes *col1a1* o *col1a2*, que codifican para las cadenas pro- α del colágeno I, principal componente de la matriz extracelular de los huesos. Se ha descrito una extensa lista de mutaciones asociadas con OI, siendo las más comunes cambios de una base que resultan en el reemplazo de una glicina por otro aminoácido, a consecuencia de lo cual adopta una conformación alterada, por lo tanto hay un mal ensamblaje de la fibra de colágeno I y con ello una mineralización ósea defectuosa. Debido a la gran cantidad de mutaciones que pueden generar OI el desarrollo de terapias dirigidas contra cada una de estas mutaciones implicaría costos y tiempos de producción elevadísimos. Como alternativa hemos propuesto utilizar como secuencia blanco un polimorfismo de nucleótido único (SNP) que está ampliamente representado en la población, así al localizarse en el mismo alelo que presenta la mutación, permitiría aumentar el número de pacientes a tratar con una misma herramienta terapéutica, por ejemplo con una ribozima que bloquee la expresión del alelo mutado manteniendo la expresión del alelo normal en los osteoblastos. Se ha descrito que las MSC son capaces de diferenciarse a un gran número de tejidos, como tejido óseo (principal tejido afectado en OI) y se ha demostrado que MSC trasplantadas en animales con OI producen un aumento de colágeno y del contenido mineral en los huesos de los receptores. Así la hipótesis de este trabajo fue: las MSC, dada su capacidad de ser trasplantadas y destinadas al tejido óseo, son el blanco celular ideal para estrategias de terapia génica para OI utilizando una ribozima que no depende de la mutación del gen *col1a1*.

Se evaluó la trasplantabilidad de las MSC humanas. Para ello las células se infundieron intravenosamente en ratones inmunodeficientes adultos en estado estable, y se analizó la presencia de células humanas en los distintos tejidos por PCR para el gen β -globina humano. No se observaron efectos secundarios en los receptores hasta 13 meses post-infusión. Se observó que las MSC infundidas intravenosamente se distribuyen por el organismo y permanecen sólo en la medula ósea y bazo, siendo estos los tejidos blanco de destinación de las MSC, y luego son redestinadas hacia otros tejidos mayoritariamente mesenquimáticos, siendo estos los primeros resultados reportados de biodistribución cinética de MSC.

Luego se evaluó, en MSC heterocigotas (T/C) para el SNP 3210 del gen *col1a1*, los efectos de la presencia de la ribozima cabeza de martillo Rzpol1a1 (dirigida contra el alelo T de este gen) sobre la expresión del gen *col1a1*. Para ello las células se infectaron con el retrovirus recombinante RNL-Pol, vector no replicativo bicistrónico que codifica para la ribozima Rzpol1a1 bajo el control de los promotores LTR y CMV y el gen neo bajo el control del promotor RSV. Los niveles de mRNA *col1a1* se determinaron por RT-PCR cuantitativo y los valores se normalizaron por los niveles de mRNA *gapdh*. A los 5 y 30 días post-infección se observó una reducción del 60% de los niveles de mRNA *col1a1* en las MSC transducidas respecto de MSC control. Por lo tanto la expresión de la ribozima provocó una disminución en los niveles de mRNA *col1a1*, lo cual sería producto del reconocimiento y corte selectivo del mRNA *col1a1* por la ribozima. Los niveles de proteína colágeno I se evaluaron cuantificando el propéptido C-terminal de colágeno I por ELISA-Sandwich, como señal de la producción *de novo* de colágeno I. A los 5 días post-infección se observó una reducción de aproximadamente un 95% en la cantidad de colágeno I producido *de novo* en las MSC transducidas. Sin embargo, a los 30 días post-infección no se observaron diferencias en la cantidad de esta proteína. Para explicar este último resultado se propone un mecanismo compensatorio que aumente la traducción del mRNA *col1a1* ó *col1a2*, por lo tanto el colágeno I sintetizado por las MSC transducidas podría corresponder a una mezcla de heterotrímico u homotrímico. Cabe destacar que ni la transferencia génica, ni la expresión de la ribozima tuvieron efecto sobre el potencial de diferenciación al linaje osteogénico ni de proliferación. Por lo tanto el colágeno I sintetizado por las MSC transducidas es fisiológicamente normal.

En conjunto los resultados presentados en esta tesis muestran que las MSC son el blanco celular adecuado para terapia génica para OI, dada su capacidad de ser trasplantadas y destinadas al tejido óseo. Por otro lado al ser transducidas con un vector retroviral que codifica para Rzpol1a1, se disminuyen los niveles de mRNA *col1a1* sin cambiar los niveles de colágeno I. Proponemos que la infusión de MSC modificadas *ex vivo* parece ser una alternativa óptima de terapia génica para OI. Siendo este el principal aporte de esta tesis.

ABSTRACT

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a negative autosomal dominantly inherited disease that is present at systemic level. It is produced by mutations in the genes *col1a1* or *col1a2*, that codifies the pro- α chains of the collagen I, main component of the extracellular matrix of the bone. An extensive list of mutations associated with OI has been described being the most common changes of single base, that changes a glycine by other amino acid, as result of which it adopts an altered conformation, that implies a wrong assembly of the fiber of collagen I and a defective mineralization of the bones. Due to the enormous amount of mutations related to OI the generation of therapies directed against each one of these mutations would imply costs and time of production highest. Since alternative we have proposed to use as target sequence a single nucleotide polymorphism (SNP) that is widely present in the population, thus when is located in the mutated allele would allow to increase the number of patients to treat with the same therapeutic tool, for example with a ribozyme that it blocks the expression of mutated allele maintaining the expression of normal allele in osteoblasts. It has been described that MSC are able to differentiate to a several cell types, like osteoblasts (main affected cells in OI) and it has been demonstrated that MSC transplanted into animals with OI produce an increase of the collagen and mineral content in the receptor bones. Thus, the hypothesis of this work was: MSC, due to their capacity to be transplanted and destined to the bone tissue, are the ideal cellular target to strategies of gene therapy for OI using a ribozyme does not depends of the *col1a1* mutation.

It was evaluated the transplantability of human MSC. For this the cells were infused intravenously in adult immunodeficient stable state mice, and the presence of human cells in different tissues was analysed by PCR for β -globin human gene. Indirect effects in the host were not observed up to 13 months after infusion. It was observed that the MSC infused intravenously are distributed by the organism and remain only in the bone marrow and spleen, homing target tissues of MSC, and then they are redestiny to other tissues mainly mesenchymatic, being these the first reported results of the kinetic biodistribution of MSC.

Then, in MSC heterocytotes (T/C) for the SNP 3210 of the *col1a1* gene, the effects of the hammerhead ribozyme Rzpol1a1 (directed to the T allele of this gene) on the expression of the *col1a1* gene was evaluated. For it the cells were infected with the recombinant retrovirus RNL-Pol, no replicative vector bicistronic that codify to the ribozyme Rzpol1a1 under the control of the LTR and CMV promoters and the neo gene under the control of the RSV promoter. The mRNA *col1a1* levels were determined by quantitative RT-PCR and the values were normalised by the levels of *gapdh* mRNA. Five as 30 days post-infection, a reduction of 60% in the levels of mRNA *col1a1* was observed in transduced MSC respect to the control. Therefore, the ribozyme expression causes a downregulation of the mRNA *col1a1* levels, due to the recognition and following cut of mRNA *col1a1* by Rzpol1a1. The levels of collagen I protein were evaluated quantifying the C-terminal propeptide of collagen I by ELISA-Sandwich, as signal of the *de novo* production of collagen I protein. Five days post-infection it was observed a 95% of reduction in the amount of collagen I produced *de novo* in transduced MSC. Nevertheless, 30 days post-infection no differences were observed in the collagen I production. To explain this last result we propose a compensatory mechanism that increase the translation of mRNA *col1a1* or *col1a2*, therefore the collagen I could be a mixture of heterotrimers and homotrimers. Important is that neither the genetic transfer nor the ribozyme expression had effect on the proliferation nor in the osteogenic differentiation potential, so the collagen I synthesised by transduced MSC is physiologically normal.

Altogether the results presented in this thesis show that MSC are the suitable cellular target for gene therapy for OI, due to their capacity to be transplanted and destined to the bone tissue. On the other hand to the being transduced with a retrovirus that encode to Rzpol1a1, the levels of mRNA *col1a1* are reduced without changing the collagen I levels. We propose that the infusion of MSC modified *ex vivo* seems to be an optimal alternative for OI. Being this the main contribution of this thesis.

INTRODUCCIÓN

La Osteogénesis Imperfecta (OI) o “enfermedad de huesos quebradizos”, es una enfermedad autosómica dominante negativa que se manifiesta a nivel sistémico. Es producida por mutaciones en los genes col1a1 o col1a2, los cuales codifican las cadenas pro- α que forman la fibra de colágeno tipo I, principal componente de la matriz extracelular de los huesos. En nuestro país su frecuencia aún no ha sido determinada, pero se han reportado valores en Europa de aproximadamente 1 en 20.000 nacidos vivos. (Engelbert R y cols., 1998)

De acuerdo a rasgos clínicos y reportes radiográficos, se han definido 4 tipos de OI (Sillence y col., 1979). La OI tipo I es la forma más leve y la OI tipo II la más grave, pacientes con OI tipo II generalmente mueren antes de 1 año de edad. Dependiendo del tipo de OI los pacientes presentan alta tendencia a fracturarse (tipos I, II, III y IV) en algunos casos las fracturas están presentes al momento del nacimiento (tipo III), su estatura es pequeña (tipos II, III y IV), tienen bajo tono muscular (tipos I y III), escleras azules (tipos I y III), severa deformidad de los huesos (tipos II y III), costillas en forma de barril (tipos III y IV), curvatura espinal (tipos III y IV) y pulmones subdesarrollados (tipo II) (Primorac y col., 2001).

Bases moleculares de la OI.

La fibra de colágeno I corresponde a una triple hélice formada por dos cadenas COL1A1 y una COL1A2. El proceso de formación de esta triple hélice (Fig. 1) comienza con la síntesis en los ribosomas asociados a la membrana del retículo endoplásmico rugoso, de precursores llamados cadenas pro- α cuyos extremos llamados propéptidos amino (N-) y carboxilo (C-) terminales flanquean la región central (Gly-X-Y)_n (Beck y col., 1996). Estas secuencias repetitivas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales que concluyen en la generación de una región de 5-6 tripletes Gly-X-Hyp consecutivos en el C-terminal, que actúa como sitio de nucleación para ensamblar tres cadenas pro- α mediante la formación de puentes de hidrógeno y así formar una triple hélice conocida como procolágeno. Después de la formación de las moléculas de procolágeno, estas son secretadas al espacio extracelular donde enzimas proteolíticas cortan los propéptidos formando las moléculas de colágeno que se asocian para formar fibrillas de 10 – 300 nm, las que luego se agregan y forman una fibra de colágeno de 0,5 – 3 μ m (Alberts y cols., 2002).

En la OI tipo I mutaciones nulas en los genes col1a1 o col1a2 provocan que uno de los alelos no se exprese, por lo tanto el colágeno I que se sintetiza es normal estructuralmente pero su cantidad está significativamente disminuída. En cambio en OI tipos II, III y IV ambos alelos se expresan, pero deleciones o inserciones o mutaciones de cambios de una base, llevan a la síntesis de una

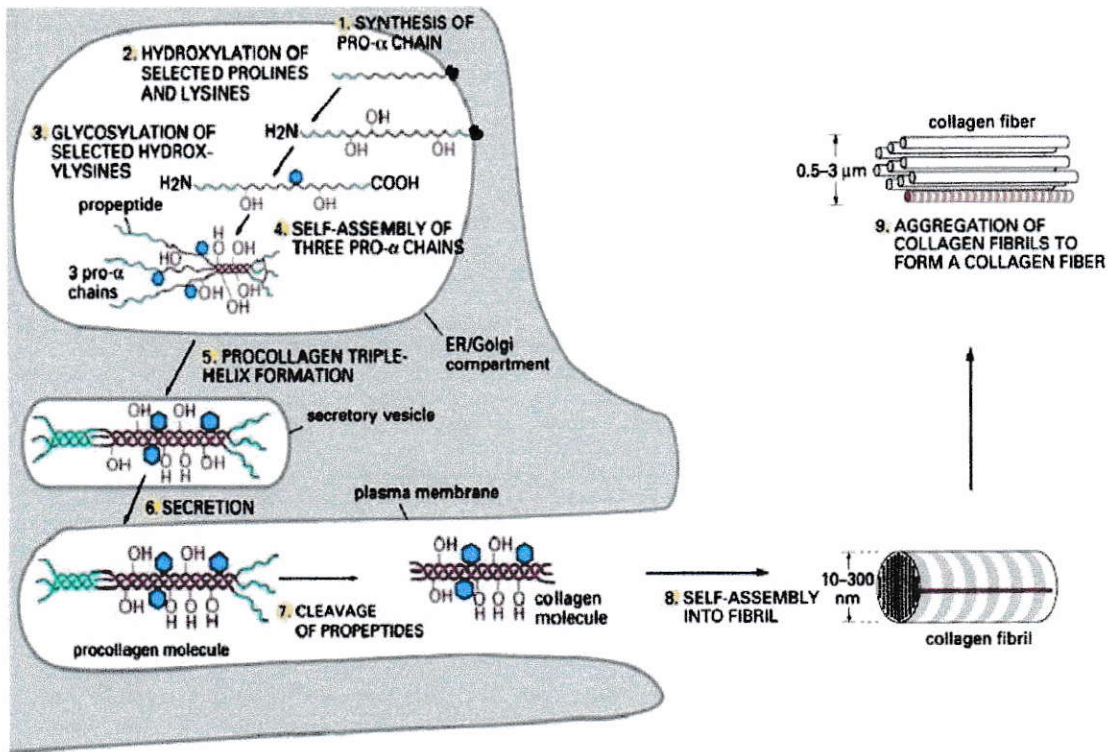


Figura 1. Síntesis de colágeno I. Luego de la síntesis de las cadenas pro- α , estas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales que finalizan en la formación de la triple hélice de procólageno, esta molécula luego es secretada al espacio extracelular donde se cortan los propéptidos generando así la molécula de colágeno. Finalmente moléculas de colágeno se ensamblan para formar fibrillas que a su vez se agregan con más fibrillas para formar una fibra de colágeno. (Alberts y cols., 2002)

proteína alterada, lo cual conlleva un mal ensamblaje de la fibra de colágeno I y con ello una mineralización ósea defectuosa (Baum y cols., 1999). Una extensa lista de mutaciones relacionadas a OI ha sido reportada y se encuentran en bases de datos disponibles gratuitamente (Data Base of Human Type I and Type III Collagen Mutations, 2001).

En el caso de OI tipo II, III y IV, la causa más común es el cambio de una base que resulta en el reemplazo de una glicina por otro aminoácido, siendo los más frecuentes serina, cisteína, arginina y ácido aspártico, esto produce un quiebre en el patrón de secuencia repetitiva (Gly-X-Y)_n (Kuivaniemi y col., 1997). Modificaciones post-traduccionales del colágeno como hidroxilación de prolinas y lisinas sólo ocurren en cadenas no plegadas. Estudios bioquímicos sugieren que sustituciones de glicinas resultan en un plegamiento defectuoso de la triple hélice del colágeno I. Se ha observado un incremento cercano al 60% de hidroxilación de prolinas y lisinas en moléculas de colágeno I de pacientes con OI (Lehmann y col., 1995; Kuivaniemi y col., 1997). Dado que, las mutaciones retrasarían la formación de la triple hélice se extendería el tiempo durante el cual las cadenas pueden ser modificadas enzimáticamente. Estudios de plegamiento confirmaron que el colágeno I de pacientes con OI tiene una velocidad de plegamiento menor que el colágeno I normal sugiriendo que la propagación de la triple hélice desde el sitio de nucleación es retardada en el sitio de la mutación. (Raghunath y col., 1994)

Bases Celulares de OI.

Los osteoblastos, principales células del hueso son las células que sintetizan mayoritariamente colágeno I. El cual es indispensable para el proceso de mineralización durante el cual se forma el osteoide a medida que se deposita hidroxapatita, principalmente de calcio y fósforo sobre la matriz extracelular, donde cerca del 90% corresponde a colágeno I. En el caso de los pacientes con OI, al estar alterada la estructura de la fibra de colágeno I, la formación y organización del osteoide también está alterada, con fibras de colágeno I mal plegadas y distribuidas al azar. (Weill Medical College of Cornell University. Congenital and Hereditary Bone Disorders, Osteogenesis Imperfecta, 2002), lo que conlleva a una mineralización de los huesos defectuosa y menor densidad ósea.

Por su parte, los osteoblastos también se ven afectados frente a la presencia de moléculas de colágeno I alteradas, ya que al ser más prolongado el tiempo de tráfico intracelular, las células mantienen grandes cantidades de moléculas mal plegadas en su interior (Morike y col., 1992), lo que altera la secreción de nuevas fibras de colágeno I y retarda la división celular (National Institutes of Health. Osteoporosis and Bone Diseases~National Resource Center, 2002).

Alternativas terapéuticas existentes para OI.

Por mucho tiempo, el tratamiento de la OI se limitó a medidas paliativas, como reducir al mínimo la actividad física. También, se han utilizado correcciones quirúrgicas de las deformaciones óseas, pero la cirugía resulta riesgosa debido a la fragilidad intrínseca de los huesos de estos pacientes. Otro tratamiento probado, ha sido la administración de calcitonina y calcio oral, con lo cual se observó que la tasa de fracturas anual disminuía, que la capacidad de los pacientes para mantenerse de pie y moverse aumentaba y, mediante reportes radiográficos, se observó que aumentaba la densidad ósea, sin embargo la mayoría de estos efectos se observaron sólo en niños menores de 5 años (Castells y cols., 1979). También se ha utilizado de hormona de crecimiento, sin embargo los resultados no son del todo claros, ya que cuando se administró esta hormona aumentaron tanto la velocidad de crecimiento como la frecuencia de fracturas de los pacientes (Noda y cols., 2002). Previamente se demostró que en niños con OI tipo III y IV, la administración de hormona de crecimiento incrementó significativamente la tasa de intercambio de calcio, con lo cual se aumentó el calcio disponible para la mineralización de los huesos (Vieira y cols., 1999). Sin embargo, en este último caso la mineralización defectuosa de los huesos debido a la presencia de moléculas de colágeno I alteradas no se ve mejorada. Últimamente se ha probado el uso de bifosfonatos, los cuales son potentes inhibidores de la reabsorción ósea ya que inhiben la actividad osteoclástica (Rogers y col., 2000). En un estudio con 28

pacientes con OI que recibieron infusiones intravenosas de bifosfonato por 2 a 9 años, se observó un incremento gradual en la densidad ósea y una disminución en el recambio óseo, lo que coincidió con una considerable disminución del dolor (Åström y col., 2002).

En los tratamientos anteriormente descritos la causa original de la OI permanece inalterada. Además, los fármacos debieran administrarse de por vida, siendo sus efectos a largo plazo desconocidos. Por lo tanto, la administración de ellos no parece ser la alternativa óptima. Otra alternativa terapéutica propuesta para los pacientes con OI ha consistido en el trasplante de células de médula ósea provenientes de donores sanos, los efectos observados fueron atribuidos a la presencia en la médula ósea de células que se alojarían en el hueso y suplirían la acción de las propias células del huésped, es decir, sintetizar colágeno I normal. Cinco niños recibieron trasplantes alogeneicos de donantes sanos histocompatibles y en tres de ellos se observó un aumento en la velocidad media de crecimiento, en el contenido mineral de los huesos y una disminución considerable de la frecuencia de fracturas (Horwits y cols., 1999). A pesar de estos alentadores resultados, esta estrategia presenta desventajas, como por ejemplo la dificultad de encontrar un dador que sea compatible con el huésped y como en todo trasplante alogeneico de médula ósea, existe la probabilidad de desarrollar un tipo de rechazo conocido como reacción injerto contra huésped, por lo que los pacientes deben ser mantenidos

con drogas inmunosupresoras lo cual conlleva un riesgo importante. O alternativamente puede producirse el rechazo del huésped contra el injerto.

Por lo tanto, una alternativa óptima sería corregir el desorden en las propias células del paciente, a través de una terapia génica que permita reparar la mutación o suprimir la expresión del alelo mutado sin que se afecte la expresión del alelo normal.

Estrategias metodológicas para bloquear selectivamente la expresión de un gen.

La expresión de un gen mutado puede bloquearse utilizando oligonucleótidos cuya secuencia sea complementaria al DNA o al RNA mensajero (mRNA) de interés. En el primer caso, la asociación del oligonucleótido a su secuencia complementaria en el DNA forma una triple hélice que impide la interacción con la maquinaria transcripcional, con lo cual no se sintetiza el mRNA mutado. En el segundo caso, producto del apareamiento entre el oligonucleótido y el mRNA de interés se forma un dúplex que no interactúa con la maquinaria traduccional, por lo tanto no se sintetiza la proteína codificada por dicho gen. Como mecanismo alternativo se ha propuesto que la formación del dúplex oligonucleótido-mRNA disminuiría la vida media del mRNA blanco al ser reconocido y degradado este dúplex por la Rnasa H. Otra alternativa es el uso de ribozimas.

Ribozimas.

Las ribozimas son moléculas de RNA que se aparean con secuencias específicas y catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster causando el corte del RNA blanco. Existen varios tipos de ribozimas:

- a) las de autoescisión, a las que corresponden los intrones del grupo I y grupo II; su tamaño es mayor a 400 nucleótidos. Estas ribozimas generalmente requieren de pequeñas partículas nucleares ribonucleoproteicas y otras proteínas para realizar el corte, el cual es mediado por la formación de un spliceosoma (Maniatis y col., 1987). Su mecanismo de acción es en *cis* y la autoescisión ocurre por 2 reacciones de transesterificación consecutivas, ambas iniciadas por ataques nucleofílicos que finalizan en la generación del transcrito de RNA maduro (Cech y col., 1981)
- b) RNasa P es una endoribonucleasa, su tamaño es de aproximadamente 300 nucleótidos. El mecanismo de acción de esta ribozima es en *trans* y corta sustratos precursores de tRNA en sitios específicos generando un terminal 5' fosfato y un terminal 3' hidroxilo (Darr y col., 1992)
- c) RNAs de autofragmentación corresponden a pequeñas ribozimas de menos de 150 nucleótidos, su mecanismo de acción es en *trans* y la reacción de corte es en ausencia de proteínas, el ataque nucleofílico del oxígeno 2' al fosfato adyacente produce un fosfato 2' 3'cíclico y un terminal 5' hidroxilo (Sigurdsson y cols., 1995). Dentro de este grupo se

encuentran las ribozimas del virus delta de la hepatitis tipo V, ribozimas de horquilla, y ribozimas cabeza de martillo, siendo estas últimas las más pequeñas de aproximadamente 30 nucleótidos y las más utilizadas debido a su tamaño y a la facilidad para ser sintetizadas químicamente.

Estructuralmente las ribozimas cabeza de martillo presentan un centro catalítico flanqueado por dos brazos antisentido que se aparean con una secuencia blanco y forman dos hélices. La secuencia de estos brazos no posee bases conservadas, lo que le confiere un amplio rango de posibles secuencias blanco con las cuales aparearse. El sitio de corte corresponde a secuencias específicas NUH (N, cualquier nucleótido; U, uracilo; H cualquier nucleótido excepto guanina) localizados en el mRNA blanco, la ribozima reconoce las secuencias a ambos lados del sitio NUH por apareamiento de los brazos antisentido y el centro catalítico entonces corta el sitio 3' del triplete NUH generando un fosfato 2'3' cíclico y un terminal 5' OH.

Dentro de las alternativas para administrar una ribozima se encuentra la liberación exógena donde oligonucleótidos pre-sintetizados con actividad de ribozimas pueden ser liberados directamente dentro de células en cultivo, para esto se ha probado principalmente el uso de liposomas neutros o catiónicos (Gu y col., 1997, Duzgunes y col., 1999), polímeros biodegradables (Fell y col.,1997), endocitosis mediada por receptor (Hudson y col., 1999), o en animales mediante inyección intravenosa de la ribozima (Lyngstadaas y col., 1995). Sin embargo, la acción de una ribozima administrada por estas vías está

limitada por su vida media y su efecto biológico se observa sólo hasta que permanece en la célula en una cantidad adecuada.

Otra alternativa de administración de ribozimas es mediante liberación endógena, la cual depende de la presencia del gen codificante para la ribozima en la célula. Para esto la secuencia correspondiente es clonada en un vector de expresión y movilizada a la célula blanco, y la ribozima es sintetizada al transcribirse dicho transgen. Se han probado diversos vectores de expresión para movilizar genes codificantes para ribozimas como el uso de vectores plasmidiales (Dawson y col., 2000), vectores adenovirales (Hu y cols., 2002), y retrovirales (Li y col., 1996).

Ribozimas y OI.

Se ha demostrado en fibroblastos de piel de un paciente con OI que ribozimas cabeza de martillo dirigidas contra una mutación específica en el gen col1a2, producen una disminución en la expresión de colágeno tipo I al degradar el mRNA blanco (Dawson y cols., 2000). En este caso la ribozima utilizada reconocía selectivamente la secuencia que corresponde a la mutación asociada con la OI. Sin embargo, sólo cerca del 25% de todas las mutaciones en el gen del colágeno I generan un sitio de corte por ribozimas (Grassi y col., 1996), por lo tanto el uso terapéutico de ribozimas dirigidas contra mutaciones específicas estaría restringido a un pequeño grupo de los pacientes. Además, ya que son variadas las mutaciones que producen la OI una terapia de este tipo

implicaría el diseño y construcción de una ribozima para cada paciente, lo que aumentaría el costo y tiempo de producción disminuyendo su aplicabilidad terapéutica. Para ampliar el espectro de pacientes que podrían ser tratados con una misma ribozima se debiera utilizar como blanco secuencias en el mRNA que no correspondan a mutaciones particulares, sino que sean secuencias que están ampliamente representadas en la población. Un posible candidato son los sitios polimórficos, en particular los polimorfismos de nucleótido único (SNP) donde la diferencia en la secuencia nucleotídica corresponde al cambio de un solo nucleótido, por lo tanto el número de variantes es bastante pequeño, lo que permite aumentar el espectro de pacientes a tratar con la misma terapia.

Dicho blanco tendría utilidad terapéutica sólo si se encuentra en el mismo alelo que posee la mutación relacionada con OI, por lo tanto en este trabajo se propone bloquear la expresión del alelo mutado utilizando una ribozima cabeza de martillo dirigida contra un alelo del SNP 3210 del gen *col1a1* y mantener la expresión del alelo normal. Este polimorfismo se encuentra en la región 3' no traducida del gen *col1a1*, en una zona abierta de la estructura del mRNA *col1a1*, en la posición 3210. Sólo existen 2 variantes T (en adelante alelo T) y C (en adelante alelo C) (GenBank nº de acceso K01228), y sólo en el mRNA sintetizado a partir del alelo T se crea un sitio de corte CUC, mientras el mRNA sintetizado a partir del alelo C tiene una secuencia CGC en esta posición, la cual no es sitio de corte por ribozimas cabeza de martillo.

Se ha reportado que sobre el 40% de la población caucásica en Estados Unidos y Europa es heterocigota (C/T) para el SNP 3210 del gen col1a1 (Willing y cols., 1992; Millington-Ward y cols., 1999), por lo tanto como mínimo el 20% de los pacientes con OI asociada al gen col1a1 se encontrarían dentro del espectro de pacientes a tratar con la misma ribozima ya que la mutación se encontraría en el alelo blanco (alelo T).

Previamente, en estudios *in vitro* se demostró que la ribozima cabeza de martillo Rzpol1a1 dirigida contra el SNP 3210 del gen col1a1 reconoce el sitio blanco (alelo T) y lo corta específicamente dejando intacto el control (alelo C) (Millington-Ward y cols., 1999). Por lo tanto, en aquellos casos donde el SNP 3210 del gen col1a1 se encuentre en el mismo alelo que la mutación (independientemente de cuál sea esta), utilizando la ribozima Rzpol1a1 sería posible bloquear la expresión del alelo mutado manteniendo la expresión del alelo normal y con ello se estaría revirtiendo el fenotipo.

Para que esta estrategia tenga un valor terapéutico, debe probarse su efectividad y selectividad en las células responsables del fenotipo patológico. Ya que la OI es una enfermedad que se presenta a nivel de todos los huesos, el blanco celular ideal es una célula que después de ser manipulada *ex vivo* pueda ser reinfundida en el organismo, y se destine a los huesos supliendo en ellos la función de los osteoblastos patológicos, y por lo tanto candidato celular obvio corresponde a las células troncales mesenquimáticas.



Células Troncales Mesenquimáticas.

De la médula ósea de los individuos adultos, es posible aislar una población de células conocidas como células troncales mesenquimáticas (MSC). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que estas células se diferencian a células del hueso, cartílago, tendón, músculo esquelético y cardíaco, grasa, estroma hematopoyético, células endoteliales, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Beresford y col., 1992; Galmiche y col., 1993; Pereira y col., 1995; Wakitani y col., 1995; Kuznetsov y col., 1997; Pittenger y col., 1999; Dennis y col., 1999; Awad y col., 1999; Kopen y col., 1999; Reyes y Verfaillie, 1999).

Además, las MSC pueden ser expandidas *ex vivo* y transducidas con vectores retrovirales (Allay y cols., 1997) o adenovirales (Conget y col., 2000) sin que se vea afectado su potencial de diferenciación. Por lo tanto, las MSC presentan un gran potencial para ser utilizadas en protocolos de terapias génicas o celulares, tanto para enfermedades que se desarrollan a nivel sistémico como en tejidos específicos.

En el caso particular de la OI se ha demostrado en el sistema murino que infusiones intravenosas de MSC normales en ratones con OI tipo I producen un aumento de colágeno y del contenido mineral en los huesos de los receptores (Pereira y cols., 1998). También se ha demostrado que en niños con OI el trasplante de médula ósea mejora considerablemente su condición patológica (Horwits y cols., 1999). En consecuencia las MSC son el blanco celular ideal

para la estrategia de terapia génica para OI propuesta en esta tesis, ya que podrían ser manipuladas *ex vivo* y luego reinfundidas en el organismo.

HIPÓTESIS

Las MSC, por su capacidad de ser trasplantadas y destinadas al tejido óseo, son el blanco celular ideal para estrategias de terapia génica para Osteogénesis Imperfecta tipos II, III y IV; utilizando la ribozima Rzpol1a1 para disminuir la cantidad de proteína colágeno I mutada, independientemente de la mutación del gen col1a1.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Desarrollar una estrategia de terapia génica para Osteogenesis Imperfecta en MSC heterocigotas para el SNP 3210 del gen col1a1, utilizando la ribozima Rzpol1a1.

Objetivo específico I

1. Estudiar los efectos secundarios de la infusión intravenosa de MSC expandidas *ex vivo*.
2. Evaluar la trasplantabilidad de las MSC en receptores adultos en estado estable.
3. Estudiar la cinética de biodistribución de las MSC infundidas intravenosamente.
4. Identificar los tejidos de destinación de las MSC.

Objetivo específico II

5. Determinar las condiciones óptimas de transducción de las MSC con vectores retrovirales.

6. Evaluar los efectos de la presencia de la ribozima Rzpol1a1 sobre los niveles de mRNA col1a1 en MSC heterocigotas para el SNP 3210 del gen col1a1.
7. Evaluar los efectos de la presencia de la ribozima Rzpol1a1 sobre la cantidad de proteína colágeno I en MSC heterocigotas para el SNP 3210 del gen col1a1.
8. Estudiar los efectos celulares que produce la transducción con el vector retroviral RNL-Pol y la expresión de Rzpol1a1 sobre las MSC.

MÉTODOS

1. Cultivos celulares.

1.a Obtención y cultivo de MSC humanas

Las MSC humanas se aislaron a partir del material sobrante de cosechas de médula ósea obtenidas de individuos sanos, que participaban como donantes en trasplantes alogeneicos. Las células de médula ósea fueron colectadas usando heparina 100 U/ml como anticoagulante y luego se diluyeron 3 veces con medio mínimo esencial alfa (α -MEM). Tres volúmenes de esta suspensión celular se cargaron sobre dos volúmenes de una gradiente continua de Ficoll-Hypaque (densidad 1,077 g/cm³) y se centrifugaron a 500 x g por 30 min. a temperatura ambiente (TA). Desde la interfase de dicha gradiente se extrajeron las células mononucleadas (MNC) que posteriormente se lavaron con α -MEM, centrifugando a 700 x g por 10 min. a TA. Luego, las MNC se resuspendieron en α -MEM + suero fetal bovino (SFB) 20% (v/v) y se sembraron a una densidad de 1×10^6 MNC/cm². Cuando la monocapa de células adherentes establecida se hizo confluyente (día 7), se eliminaron las células no adherentes y las adherentes se tripsinizaron. Para ello, las monocapas se incubaron con tripsina 0,25% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS) (50 μ l/cm²) a 37 °C por 15 min. Luego, la tripsina se inhibió agregando 1 volumen de α -MEM + SFB 10% (v/v) y, se eliminó centrifugando las células a

700 x g por 10 min. a TA. Los subcultivos de MSC se establecieron a partir de estas células, las cuales se resuspendieron en α -MEM + SFB 10% (v/v) y se sembraron a una densidad de 7×10^3 células/cm². Las MSC fueron subcultivadas cada 4 días para evitar que alcanzaran confluencia, para esto se tripsinizaron y se sembraron a una densidad de 7×10^3 células/cm² en α -MEM + SFB 10% (v/v). Los medios de cultivo utilizados incluían el antibiótico sulfato de gentamicina 80 μ g/ml y todos los cultivos celulares se mantuvieron bajo atmósfera húmeda aire/CO₂ 95/5% a 37 °C.

1.b Criopreservación de MSC humanas.

Las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 700 x g por 10 min. y se resuspendieron en SFB frío 90% (v/v) + dimetil sulfoxido 10% (v/v) a una densidad de 1×10^6 células/ml. Luego, se alicuotaron en criotubos y se enfriaron en vapores de nitrógeno líquido por 20 min. en posición 4 de ascensor Taylor-Wharton (velocidad de enfriamiento = - 3,5 °C/min.) y luego por 20 min. en posición 1 (velocidad de enfriamiento = - 8 °C/min). Finalmente se almacenaron sumergidas en nitrógeno líquido a - 196 °C.

1.c Genotipificación de MSC para el SNP 3210 del gen col1a1.

Para determinar si las MSC disponibles en nuestro laboratorio eran heterocigotas u homocigotas para el SNP en la posición 3210 del gen col1a1, se extrajo DNA genómico de 11 muestras, los cuales fueron secuenciados en la

región del gen col1a1 que incluye el SNP, desde la posición 16249 hasta 16620 (GeneBank nº de acceso AF017178) en el Departamento de Genética de Trinity College, Dublin. Se determinó que 4 muestras eran heterocigotas (C/T) y el resto homocigotas (T/T) para el SNP 3210 del gen col1a1. Para evaluar los efectos de la presencia de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1 se utilizó exclusivamente la muestra MSC 10, heterocigota para el SNP 3210 de dicho gen.

2. Recuentos celulares.

2.a Número de células nucleadas.

El número de células nucleadas de médula ósea y bazo se determinó en cámara de Neubauer. Para esto una alícuota representativa de la muestra fue diluída 50 veces con Cristal Violeta 0,05% (p/v) + ácido acético 5% (v/v) y se contaron las células visualizadas en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer bajo microscopio óptico (10 x). La concentración celular se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{concentración celular [células/ml]} = \text{recuento promedio} \times 10^4 \times 50$$

2.b Número de células totales.

El número de células totales se determinó en cámara de Neubauer, para esto las células se tripsinizaron, una alícuota representativa se diluyó 2 veces con Azul Tripán 0,4% (p/v) y se contaron las células visualizadas en 4

cuadrantes de la cámara de Neubauer bajo microscopio óptico (10 x). La concentración celular se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{concentración celular [células/ml]} = \text{recuento promedio} \times 10^4 \times 2$$

2.c Número de células adheridas.

El número de células adheridas a la placa de cultivo se determinó espectrofotométricamente después de teñir las células adheridas. Para ello, se lavaron con PBS (0,25 ml/cm²) y se tiñeron con Cristal Violeta 0,2% (p/v) + etanol 10% (v/v) (0,1 ml/cm²) incubando a TA por 5 min. Luego, las células se lavaron 4 veces con PBS (0,25 ml/cm²) para eliminar el exceso de colorante y el colorante unido a las células se solubilizó con una mezcla de NaH₂PO₄ 0,1 M pH 4,5 + etanol 50% (50:50; 0,1 ml/cm²) a TA por 5 min. Finalmente se determinó la absorbancia a 570 nm en lector de microplaca. El número de células se calculó interpolando los datos en curva estándar A₅₇₀ (0,1 – 0,5) vs. número de células (1 – 6 x 10³), la cual se obtuvo a partir de cultivos paralelos en los cuales se determinó el número de células por recuento en cámara de Neubauer.

3. Viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad (VB) se utilizó el criterio de exclusión del colorante vital Azul Tripán. Las células se tripsinizaron y una alícuota representativa se diluyó 2 veces con Azul Tripán 0,4% (p/v). Se determinó en

cámara de Neubauer el número de células totales y de células muertas, las cuales no excluyen el colorante vital. La VB se calculó usando la siguiente fórmula:

$$VB (\%) = \frac{\text{células totales} - \text{células muertas}}{\text{células totales}} \times 100$$

4. Diferenciación de MSC humanas.

El potencial de diferenciación osteogénico de las MSC se determinó de acuerdo a su capacidad para generar, *in vitro* y con estímulos apropiados, osteoblastos.

4.a Inducción osteogénica.

Las MSC se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/cm² en α -MEM + SFB 10% (v/v). Tres días más tarde, el medio de cultivo se cambió por el medio de estimulación osteogénico que contenía dexametasona 0,1 μ M + β -glicerofosfato 10 mM + ascorbato-2-fosfato 50 μ M; al cuarto día post-estimulación se cambió el medio y al quinto día se evaluó la aparición de osteoblastos, midiendo la actividad de la enzima fosfatasa alcalina.

4.b Ensayo espectrocolorimétrico para medir actividad fosfatasa alcalina.

Las células se lavaron dos veces con Tris-HCl 20mM pH 7,5 + NaCl 150 mM (TBS) (0,15 ml/cm²) y se fijaron con etanol + formaldehído (90:10; 0,15 ml/cm²) incubando a TA por 30 s. Luego se lavaron 3 veces con TBS, se agregó

el sustrato p-nitrofenilfosfato 1mg/ml + tampón bicarbonato 100 mM pH 9,6 + $MgCl_2$ 1 mM (0,15 ml/cm²) y se incubaron a 37 °C por 20 min. La solución anterior se retiró de los pozos y la reacción enzimática se detuvo agregando 0,5 volúmenes de NaOH 3N. Finalmente se determinó la absorbancia a 405 nm en lector de microplaca. La actividad enzimática se expresó en función de la formación del producto p-nitrofenol (pNF), cuya concentración se determinó interpolando los valores de absorbancia en curva estándar A_{405} (0,2 – 1,4) vs. concentración de pNF (3 – 25 pmoles) obtenida a partir de diluciones de concentración conocida de pNF puro. El número de células se determinó tiñendo directamente las células en los pozos con Cristal Violeta (método 2.c). Finalmente, los resultados de la actividad fosfatasa alcalina se expresaron como pmoles de pNF/min./10⁶ células.

5. Xenotrasplantes.

La biodistribución de MSC humanas post-infusión intravenosa se estudió en un modelo xenogénico. Para ello, se infundieron MSC humanas (no transducidas con vectores retrovirales) en ratones inmunodeficientes desnudos (ratones NUDE). La presencia de las MSC se analizó por microscopía de epifluorescencia buscando células teñidas con 5-(y-6)-carboxifluoresceína diacetato, succinimidil ester (5(6)-CFDA, SE ó CFSE) en criosecciones y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) evaluando la presencia del gen β -

globina humana en muestras de DNA genómico obtenidas de los órganos del receptor.

5.a Marcación de MSC humanas con CFSE.

Las células que habían sido sembradas a una densidad de 9×10^3 células/cm² 48 h antes de la marcación, se lavaron dos veces con PBS (90 μ l/cm²) y se incubaron con CFSE 5 μ M (18 μ l/cm²) a TA por 10 min. en oscuridad, agitando la placa de cultivo cada 3 min. Luego, para eliminar el exceso de CFSE se agregó SFB (18 μ l/cm²), se incubó a TA por 1 min. en oscuridad y las células se lavaron dos veces con PBS (90 μ l/cm²). Finalmente, se tripsinizaron y se determinó el porcentaje de células marcadas con CFSE por conteo en cámara de Neubauer (método 2.b) en microscopio de epifluorescencia utilizando el filtro para FITC (470 – 490 nm). En todos los experimentos realizados se obtuvo un 100% de células marcadas.

5.b Infusión de MSC humanas en ratones inmunodeficientes.

Los ratones inmunodeficientes utilizados correspondieron a hembras balb/c desnudas, de tres meses de edad. Para la infusión de las células los animales se mantuvieron a 37 °C por 15 min., luego fueron inmovilizados en una cámara diseñada para tales fines y por la vena de la cola se le inyectaron 300 μ l de suspensión celular. Cada animal recibió 5 – 20 $\times 10^5$ MSC resuspendidas en α -MEM. Antes y después de la infusión, los animales se

mantuvieron en condiciones asépticas en una habitación aislada del resto del bioterio, temperada a 25 °C, con agua y comida *ad libitum*.

5.c Detección de MSC humanas marcadas con CFSE en cortes de tejidos.

Uno, 7 y 30 días post-infusión de 5×10^5 células marcadas con CFSE, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se disectaron la médula ósea, el bazo y los pulmones. Inmediatamente, los tejidos fueron embebidos en O.C.T., congelados en mezcla de hexano/hielo seco y almacenados a - 80 °C. Luego, de cada tejido se hicieron al menos 30 cortes de 8 μm de espesor en criostato, los cuales se almacenaron a - 80 °C por al menos 24 horas. Posteriormente, las criosecciones fueron teñidas con PI 1 $\mu\text{g/ml}$ a TA por 2 min. en oscuridad, luego se lavaron 5 veces con agua destilada y finalmente se montaron en Dabco/Mowiol (1/4). La búsqueda de células marcadas con CFSE se realizó observando los cortes en microscopio de epifluorescencia, utilizando el filtro para FITC (470 – 490 nm). La presencia de MSC humanas en tejido murino se detectó como marcas de color verde (CFSE+) que colocalizan con marcas anaranjadas (PI+).

5.d Detección de MSC humanas por PCR en muestras de DNA genómico de tejidos murinos.

Cero horas a 13 meses post-infusión de 5 – 20 $\times 10^5$ MSC humanas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se disectaron:

- tejidos duros: músculo esquelético, corazón, diente, hueso, cola, oreja.
- tejidos blandos: riñón, hígado, ovarios, bazo, pulmón, cerebro.
- células en suspensión: sangre, médula ósea, bazo.

A partir de ellos se extrajo el DNA genómico utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega.

i) Extracción de DNA genómico de tejidos.

Veinte mg de cada tejido duro se cortaron en pequeños trozos que luego fueron congelados en nitrógeno líquido, pulverizados y homogenizados en 600 μ l de solución de lisis nuclear del kit suplementada con EDTA 100 mM y proteinasa K 0,5 ng/ml. Luego se incubaron a 55 °C por toda la noche. Alternativamente, 20 mg de cada tejido blando se cortaron en pequeños trozos que fueron homogenizados en 600 μ l de solución de lisis nuclear del kit y se incubaron a 65 °C por 30 min.

A ambos tipos de muestras se les agregó RNAsa A 20 μ g/ml y se incubó a 37°C por 30 min. y se dejaron enfriar. Una vez que las muestras alcanzaron la TA se agregaron 0,3 volúmenes de solución de precipitación de proteínas del kit, se mezcló en vortex por 20 s y se incubó en hielo por 5 min. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 15.000 x g por 5 min. a TA. El DNA que se encontraba en el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio que contenía 1 volumen de isopropanol, se invirtió varias veces hasta que se formara un flóculo y se centrifugó a 15.000 x g por 1 min. Finalmente, para precipitar el DNA se

agregó 1 volumen de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 15.000 x g por 1 min., se retiró todo el etanol y las muestras de DNA fueron resuspendidas en 100 μ l de solución de rehidratación (Tris HCl 10 mM pH 7,4 + EDTA 1mM pH 8,0) y se almacenaron a 4 °C.

ii) Extracción de DNA genómico de suspensiones celulares.

A partir de 2 fémures y 2 tibias se obtuvieron las células de médula ósea. Para ello, se cortaron las epífisis y se hizo fluir por el interior de ellos 3 ml de PBS con una jeringa utilizando una aguja de 26 $\frac{1}{2}$ G. Para obtener las células de bazo, éste se perfundió con 3 ml de PBS con una jeringa utilizando una aguja de 23 $\frac{1}{2}$ G. En ambos casos, se determinó el número de células nucleadas (método 2. a), se tomó el volumen correspondiente a 50×10^6 células nucleadas y se agregó la cantidad necesaria de PBS para completar un volumen de 3 ml, en el caso de la sangre el protocolo fue el mismo, pero se trabajó con aproximadamente 300 μ l de muestra. Luego para lisar los eritrocitos cada muestra se mezcló con 3 volúmenes de solución de lisis celular del kit y se incubó a TA por 10 min., invirtiendo el tubo cada 3 min. para lisar los glóbulos rojos. Se centrifugó a 15.000 x g por 10 min. a TA, se eliminó el sobrenadante y el pellet que correspondía a las células nucleadas se resuspendió en las gotas que quedaron en el tubo mezclando por 15 s. Luego se agregó 1 volumen de solución de lisis nuclear del kit y se pipeteó 6 veces para romper las células nucleadas, se agregó RNAsa A 20 μ g/ml y se incubó la mezcla a 37 °C por 15

min. Cuando las muestras alcanzaron la temperatura ambiente se agregó 1 volumen de solución de precipitación de proteínas del kit, se mezcló en vortex por 20 s y se centrifugó por 10 min. a 15.000 x g. Luego se prosiguió como en el protocolo utilizado para la extracción de DNA genómico de tejidos duros y blandos. Finalmente las muestras se resuspendieron en 250 μ l (para DNA de médula ósea y bazo) ó 100 μ l (para DNA de sangre) de solución de rehidratación y se almacenaron a 4 °C.

iii) Integridad y pureza del DNA.

La integridad del DNA genómico se determinó por electroforesis en geles de agarosa 0,8% (p/v) utilizando tampón Tris-acetato 40 mM + EDTA 2 mM, pH 8 que incluía bromuro de etidio 0,5 μ g/ml. La electroforesis se realizó a corriente constante de 60 mA durante 1 h. Se utilizó como estándar de peso molecular el DNA del bacteriófago lambda cortado con la enzima de restricción HindIII. Los geles se visualizaron en transiluminador UV (312 nm) y se fotografiaron con película blanco y negro. Se consideró como DNA íntegro aquellos que presentaban una banda definida en el gel.

La pureza del DNA se estimó determinando simultáneamente la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro Gene Quant. Se consideraron puros aquellos DNAs que presentaron un cociente A_{260}/A_{280} entre 1,7 y 2,1.

iv) Cuantificación de DNA.

La cuantificación de DNA se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro Gene Quant. Para ello, una alícuota de cada muestra se diluyó 10 veces en agua libre de nucleasas y la concentración de DNA total se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{dsDNA [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times 10 \times 50$$

v) PCR de tiempo real para β -globina humana.

La reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 μ l que contenía 200 ng de DNA genómico + mezcla de PCR LightCycler-DNA Master SYBR Green 1 \times (*Taq* DNA polimerasa + tampón de reacción + dATP + dUTP + dCTP + dGTP + SYBR Green I) + MgCl_2 4 mM + partidores sentido 0,5 μ M y antisentido 0,5 μ M. Estos partidores corresponden a los del kit LightCycler – control Kit DNA de Roche, por lo que sus secuencias están protegidos por patentes comerciales. Las concentraciones de enzima, tampón de reacción y dNTPs corresponden a las recomendadas para el kit LightCycler-DNA Master SYBR Green I de Roche.

La programa utilizado para las reacciones de PCR para el gen β -globina humano se muestra en la tabla 1. El tamaño del producto de amplificación esperado fue de 110 pb y su temperatura de denaturación empírica de $85 \pm 0,5$ °C. La señal analizada correspondió a la fluorescencia que emite el SYBR Green al intercalarse en la doble hebra de DNA del amplicón, la cual se detectó

Etapa	Nº Ciclos	Temperatura (° C)	Tiempo (s)	Variación de temperatura (°C/s)	Detección de fluorescencia
Amplificación:	40				
denaturación		95	0	20	no
apareamiento		64	5	20	no
extensión		72	10	20	no
Curva de melting:	1				
denaturación		95	0	20	no
renaturación		65	15	20	no
denaturación		95	0	0,1	sí
Enfriamiento	1	40	30	20	no

Tabla 1. Programa utilizado para las reacciones de PCR de tiempo real para β -globina humano, en el sistema LightCycler.

en el canal F1 (530 nm) durante toda la etapa de denaturación final para construir la curva de melting y verificar que el amplicón generado correspondía al esperado.

En cada experimento se incluyeron los siguientes controles:

- blanco: sin DNA templado
- negativo: 200 ng de DNA de ratón que no recibió MSC
- positivo 1: 3 pg de DNA humano
- positivo 2: 3 pg de DNA humano en 200 ng de DNA de ratón que no recibió MSC.

Al final de cada reacción de PCR se analizó la curva de melting observando la altura del pico de amplificación de cada muestra, y se consideró como señal positiva, es decir, presencia de MSC humanas en tejidos murinos, a la aparición de un pico de amplificación por sobre el control negativo. La sensibilidad de este método fue determinada realizando diluciones seriadas 3 – 30.000 pg de DNA humano en 200 ng de DNA murino. En estas condiciones la sensibilidad fue de 1 célula humana en 70.000 células de ratón para una reacción de PCR. La reproducibilidad de este método para la amplificación del gen β -globina humano a partir de 3 pg de DNA humano fue del 70%.

6. Transferencia génica con vectores retrovirales.

6.a Vectores utilizados

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos vectores retrovirales LZRNL y RNL-Pol, derivados del virus de la leucemia murina. Ambos fueron contruidos en el Centro de Biología Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad de California, Estados Unidos.

El vector retroviral LZRNL se utilizó para establecer el protocolo óptimo de transducción de las MSC. Como se muestra en la Fig. 2.a este vector contiene 2 genes reporteros: el gen lac Z río abajo del promotor LTR y el gen neomicina fosfotransferasa (neo) río debajo del promotor del virus sarcoma Rous (RSV).

El vector RNL-Pol se utilizó para evaluar los efectos de la ribozima Rzpol1a1 sobre la síntesis de colágeno 1a1. Como se muestra en la Fig. 2.b este vector contiene el gen codificante para la ribozima Rzpol1a1 en 2 posiciones, río abajo del promotor LTR y río abajo del promotor de citomegalovirus (CMV), y el gen neo río abajo del promotor RSV. El hecho que el gen codificante para la ribozima se encuentre en 2 posiciones bajo promotores constitutivos diferentes asegura su expresión.

La ribozima Rzpol1a1 presente en el vector retroviral RNL-Pol corresponde a una ribozima de martillo (Fig. 3), la cual está dirigida contra el SNP en la posición 3210 del gen del colágeno 1a1. La acción de esta ribozima

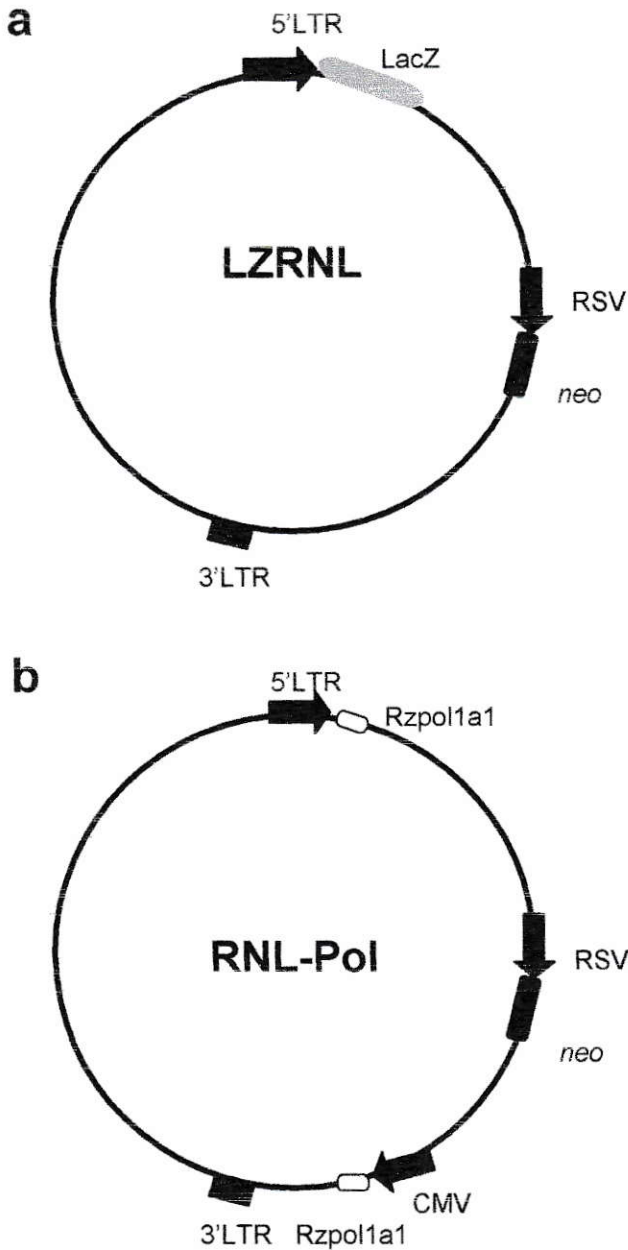


Figura 2. Representación esquemática de los vectores retrovirales LZRNL (a) y RNL-Pol (b). En ambos casos, se destacan los promotores presentes con flechas indicando la dirección de la transcripción, se muestra la ubicación aproximada de los genes reporteros lac Z y neo, y del gen codificante para la ribozima Rzpol1a1.

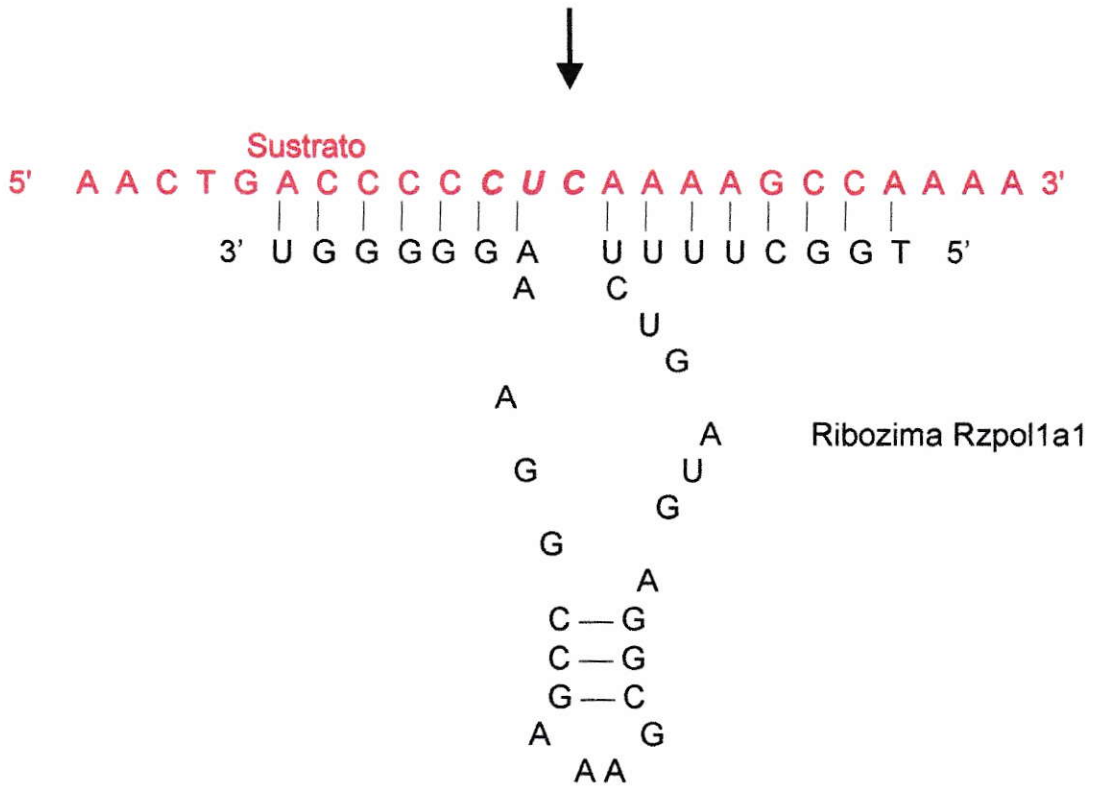


Figura 3. Estructura primaria y secundaria de la ribozima cabeza de martillo Rzpol1a1. En rojo se muestra un fragmento de la secuencia del mRNA blanco col1a1 (alelo T) y en cursiva negra la secuencia reconocida para el corte, la flecha indica el sitio de corte del mRNA col1a1.

está dirigida sólo al alelo T, estudios *in vitro* demuestran que sólo este alelo es cortado (Millington-Ward y cols., 1999).

6.b Infección de MSC humanas.

Las células se sembraron a una densidad de 2×10^3 células/cm² en α -MEM + SFB 20% (v/v). Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por el vector retroviral (LZRNL o RNL-Pol) diluido en α -MEM + SFB 20% (v/v), suplementado con polibreno 20 μ g/ml (80 μ l/cm²). La infección se prolongó por 1 día, manteniendo los cultivos bajo atmósfera húmeda aire/CO₂ 95/5% a 37 °C, para luego agregar más medio de cultivo (0,1 ml/cm²).

6.c Determinación de la eficiencia de la transferencia génica.

La eficiencia de la transferencia génica se evaluó en función del porcentaje de células que una vez infectadas con el retrovirus LZRNL expresaban el transgen lac Z.

i) Tinción con X-gal y análisis microscópico.

Las células adheridas a la placa de cultivo se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con formaldehído 1% (p/v) + glutaraldehído 0,2% (p/v) (0,1 ml/cm²) a TA por 5 min. Después de lavarlas nuevamente 2 veces con PBS, las células se tiñeron con X-gal 0,4 mg/ml + MgCl₂ 2 mM + ferrocianuro de potasio 4 mM + ferricianuro de potasio 4 mM + PBS (0,1 ml/cm²) a 37 °C por 4 h. Una vez

eliminada la tinción, las células se visualizaron bajo microscopio de luz. Las células transducidas corresponden a aquellas que expresan el gen lac Z por lo tanto presentan tinción azul en su citoplasma.

ii) Tinción con FDG y análisis por citometría de flujo.

Las células se tripsinizaron y resuspendieron en PBS a una densidad de 1×10^7 células/ml. Una alícuota de esta suspensión celular (20 μ l) se incubó a 37 °C por 5 min. y luego, se diluyó a la mitad con el reactivo FDG 2 mM precalentado a 37 °C + agua bidestilada. Enseguida las células se incubaron a 37 °C por 1 min., para así producir el shock osmótico que permite la entrada del FDG. Rápidamente, las células se enfriaron a 4 °C agregando 360 μ l de PBS frío + yoduro de propidio (PI) 5 μ g/ml y se analizaron en citómetro de flujo Becton Dickinson. La fluorescencia emitida por la fluoresceína generada a partir del FDG, se detectó en el canal FL-1 y la de PI en FL-3. Se adquirieron al menos 10.000 eventos y se analizaron sólo las células vivas (PI negativas) usando el software Cellquest.

6.d Selección de MSC transducidas.

Para enriquecer los cultivos en células transducidas, a partir del segundo día post-infección el medio de cultivo fue suplementado con el análogo de neomicina G418 400 μ g/ml, el cual se mantuvo durante todo el tiempo de cultivo. Siete días post-infección las células se tripsinizaron y se sembraron a

una densidad de 10^4 células/cm². Posteriormente fueron subcultivadas cada 4 días, bajo las mismas condiciones.

7. Expresión de colágeno I.

La expresión de colágeno I se evaluó a nivel de mRNA por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), y a nivel de proteína en función de la secreción del propéptido carboxilo terminal del colágeno I (CICP) por Inmunoensayo Ligado a Enzima tipo Sandwich (ELISA – Sandwich).

7.a Cuantificación a nivel de mRNA.

i) Extracción de RNA.

Cinco y 30 días post-infección de MSC con el vector retroviral RNL-Pol se extrajo RNA total, en condiciones libres de nucleasas. Para ello, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 700 x g por 10 min. y se resuspendieron en 800 µl de Trizol + 175 µg de glicógeno. Luego de incubar a TA por 5 min. se agregaron 0,4 volúmenes de cloroformo, se agitó enérgicamente por 15 s y se incubó a TA por 3 min. Las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 15 min. a 4 °C. El RNA, que se encontraba en la fase acuosa, fue transferido a un tubo nuevo que contenía 0,6 volúmenes de isopropanol, se incubó a TA por 10 min. y se centrifugó a 12.000 x g por 10 min. a TA. Luego, el precipitado de RNA se lavó con 1,25 volúmenes de etanol 75% (v/v) y se centrifugó a 7.500 x g por 5

min. a TA. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se evaporó el exceso de etanol y el RNA aislado se resuspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a - 80 °C.

ii) Cuantificación de RNA.

La cuantificación de RNA se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro Gene Quant. Para ello, una alícuota de cada muestra se diluyó 45 veces en agua libre de nucleasas y la concentración de RNA total se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ssRNA [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times 45 \times 40$$

iii) RT-PCR de tiempo real para col1a1.

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en el sistema LightCycler en un volumen final de 20 μl que contenía 50 ng de RNA total + QuantiTect RT Mix (mezcla de transcriptasas reversas Omniscript y Sensiscript.) + QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 1x (DNA polimerasa HotStar + tampón QuantiTect SYBR Green RT-PCR + dATP + dUTP + dCTP + dGTP + SYBR Green I + MgCl_2 7,5 mM) + partidador sentido 1 μM y antisentido 1 μM para col1a1 (Tabla 2). Las concentraciones de enzimas, tampón y dNTPs que se utilizaron correspondieron a las recomendadas en el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR de Qiagen.

Gen	partidor sentido	partidor antisentido	Tamaño amplicón (pb)	Tm (°C)
col1a1	5'caggaattcggcttcga3'	5'ggtcagttggggttgcttg3'	125	82 ± 1,0
gapdh	5'cagcctcaagatcatcagca3'	5'catgagtcctccacgatac3'	100	80 ± 0,8

Tabla 2. Partidores utilizados en las reacciones de RT-PCR para col1a1 y para gapdh. En ambos casos se indica la secuencia de partidores utilizados, el tamaño del amplicón generado y su temperatura de denaturación empírica.

En la tabla 3 se muestra el programa utilizado para las reacciones de RT-PCR para col1a1. El producto de amplificación esperado fue de 125 pb y su temperatura de denaturación empírica de $82 \pm 1,0$ °C. La señal analizada correspondió a la fluorescencia que emite el SYBR Green al intercalarse en la doble hebra del DNA del amplicón, la cual se detectó en el canal F1 (530 nm) al final de cada ciclo de amplificación para detectar el aumento de producto en función del aumento de fluorescencia, y durante toda la etapa de denaturación final para construir la curva de melting y verificar que el amplicón generado correspondía al esperado.

iv) Curva estándar para col1a1

Para construir la curva estándar se preparó RNA *in vitro* a partir de un fragmento de 586 pb del gen col1a1 clonado en los sitios de restricción HindIII y XbaI del plasmidio pcDNA3. Esta reacción se realizó en un volumen total de 20 μ l que contenía 1,6 μ g de DNA + tampón de transcripción T7 1x + dNTPs (ATP + CTP + GTP + UTP 7,5 mM de cada uno) + 2 μ l de enzima T7 y se incubó a 37 °C por 3 h. La concentración de enzima utilizada correspondió a la recomendada para el kit RiboMAX Large Scale RNA Production System – T7 de Promega. Para degradar el DNA templado se agregó 1 μ l de DNAsa (40 μ g/ml) y se incubó a 37 °C por 20 min. Luego para inactivarla se incubó a 65 °C por 20 min., el RNA así generado se almacenó a - 80 °C. Su concentración se

Etapa	Nº Ciclos	Temperatura (° C)	Tiempo (s)	Variación de temperatura (°C/s)	Detección de fluorescencia
Transcripción reversa	1	50	1200	20	no
Activación de DNA polimerasa	1	95	900	20	no
Amplificación:	35				
denaturación		94	15	20	no
apareamiento		57	20	20	no
extensión		72	5	20	sí
Curva de melting:	1				
denaturación		95	0	20	no
renaturación		65	10	20	no
denaturación		95	0	0,1	sí
Enfriamiento	1	40	30	20	no

Tabla 3. Programa utilizado para las reacciones de RT-PCR para col1a1, en el sistema LightCycler.

determinó espectrofotométricamente (método 7.a ii) y se calculó la concentración en número de copias/ μ l de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{concentración ssRNA [copias}/\mu\text{l]} = \frac{\text{ss RNA [g}/\mu\text{l]} \times 6 \times 10^{23} \text{ [copias/mol]}}{\text{peso molecular [g/mol]}}$$

Donde, el peso molecular promedio del ssRNA generado es: 199240 (g/mol).

Las curvas estándar para col1a1 generadas se hicieron a partir de diluciones seriadas $10^3 - 10^9$ de RNA stock.

v) RT-PCR de tiempo real para gapdh.

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l que contenían 50 ng de RNA total + QuantiTect RT Mix (mezcla de transcriptasas reversas Omniscript y Sensiscript.) + QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 1x (DNA polimerasa HotStar + Buffer QuantiTect SYBR Green RT-PCR + dATP + dUTP + dCTP + dGTP + SYBR Green I + MgCl_2 2,5 mM) + partidador sentido 0,5 μ M y antisentido 0,5 μ M para gapdh (Tabla 2). Las concentraciones de enzimas, tampón y dNTPS que se utilizaron correspondieron a las recomendadas en el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR de Qiagen.

En la tabla 4 se muestra el programa utilizado para las reacciones de RT-PCR para gapdh. El tamaño del producto de amplificación esperado fue de 100 pb y su temperatura de denaturación empírica de $80 \pm 0,8$ °C. La señal analizada correspondió a la fluorescencia que emite el SYBR Green al

Etapa	Nº Ciclos	Temperatura (° C)	Tiempo (s)	Variación de temperatura (°C/s)	Detección de fluorescencia
Transcripción reversa	1	50	1200	20	no
Activación de DNA polimerasa	1	95	900	20	no
Amplificación:	35				
denaturación		94	15	20	no
apareamiento		57	20	20	no
extensión		72	5	20	sí
Curva de melting:	1				
denaturación		95	0	20	no
renaturación		65	10	20	no
denaturación		95	0	0,1	sí
Enfriamiento	1	40	30	20	no

Tabla 4. Programa utilizado para las reacciones de RT-PCR para gapdh, en el sistema LightCycler.

intercalarse en la doble hebra de DNA del amplicón, la cual se detectó en el canal F1 (530 nm) al final de cada ciclo de amplificación para detectar el aumento de producto en función del aumento de fluorescencia, y durante toda la etapa de denaturación final para construir la curva de melting y verificar que el amplicón generado correspondía al esperado.

vi) Curva estándar para gapdh.

Las curvas estándar para gapdh se construyeron a partir de diluciones seriadas 70 pg a 500 ng de un RNA total stock de MSC.

vii) Determinación del número de copias del mRNA col1a1 normalizado por gapdh.

El número de copias del mRNA del gen col1a1 se determinó interpolando en curva estándar log de la concentración de mRNA col1a1 (3 – 9) vs. número de ciclos (5 – 30) obtenida a partir de diluciones seriadas de concentración conocida de RNA sintetizado *in vitro*. Los valores se normalizaron con respecto a la cantidad de mRNA del gen constitutivo gapdh, cuya concentración fue obtenida interpolando los datos en curva estándar log de la concentración de mRNA gapdh (0,5 – 3,5) vs. número de ciclos (15 – 35) obtenida a partir de diluciones seriadas de concentración conocida de RNA total de MSC.

La reproducibilidad de este método fue de un 90%, la cual se determinó realizando cada experimento en duplicado y luego comparando los resultados

Los valores de concentración de CACP se obtuvieron analizando los resultados en una curva estándar de 4 parámetros, de concentración, utilizando el software MetraFIT 1.1. Los resultados fueron normalizados por la cantidad de proteínas totales en las muestras.

ii) Cuantificación de proteínas totales.

Para determinar la concentración de proteínas totales se utilizó el método de Bradford. Para ello, 100 μ l de muestra se mezclaron con 1 ml del reactivo de Bradford, se incubó a TA por 2 min. y luego se determinó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro. La concentración de proteínas totales se calculó interpolando los datos en curva estándar A_{595} (0,01 – 0,14) vs. cantidad de proteína total (1 – 10 μ g) obtenida a partir de diluciones seriadas de concentración conocida de albúmina sérica bovina en α -MEM.

RESULTADOS

I. Trasplantabilidad de MSC humanas.

1. Efectos secundarios de la infusión intravenosa de MSC humanas.

Para evaluar toxicidad, compromiso vital, tumorigenicidad y otros efectos secundarios que podría tener la infusión intravenosa de MSC expandidas *ex vivo*, se evaluaron parámetros macroscópicos como sobrevida, formación de tumores, deformaciones óseas y variaciones en el peso corporal de los receptores. La sobrevida de los animales fue del 100% hasta 13 meses post-infusión, no se observaron alteraciones en ninguno de los parámetros analizados. Además, los animales que recibieron la infusión de MSC envejecieron de manera similar a aquellos que no la recibieron.

Por lo tanto, la manipulación *ex vivo* de las MSC es inofensiva y su infusión no produce efectos tóxicos en el receptor.

2. Análisis de la presencia de MSC humanas en tejidos murinos.

Para estudiar la trasplantabilidad de MSC, inicialmente se utilizó como método de análisis la técnica de inmunohistoquímica indirecta con anticuerpos monoclonales específicos y selectivos para antígenos humanos. Desafortunadamente, todos los anticuerpos secundarios que se probaron presentaron reacción cruzada con el tejido murino. Como se esperaba que la

cantidad de células humanas presentes en los tejidos murinos fuese baja resultaba indispensable amplificar la señal generada, por lo que no era posible realizar inmunohistoquímica directa, para así prescindir de los anticuerpos secundarios. Como método alternativo se decidió marcar las MSC con el fluoróforo CFSE y luego analizar la presencia de ellas en cortes de tejidos, visualizándolos en microscopio de epifluorescencia equipado con filtro para fluoresceína. Este método se pretendía utilizar para visualizar las células humanas en tejidos murinos sólo a tiempos cortos post-infusión, ya que a medida que transcurre el tiempo, si las células proliferan la marca se diluye.

2.a Consecuencias celulares de la marcación con CFSE.

Primero se estudiaron los efectos que podría tener la marcación con CFSE en las MSC, para lo cual se evaluaron los potenciales de proliferación y de diferenciación osteogénica en las células marcadas.

Como se muestra en la Fig. 4 no existen diferencias significativas en la cinética de proliferación de MSC marcadas o no con CFSE, encontrándose en ambos casos un tiempo de duplicación poblacional de 1,3 días.

Por su parte, tanto en las MSC marcadas con CFSE como en las no marcadas la exposición al estímulo osteogénico indujo la expresión de fosfatasa alcalina, sin observarse diferencias significativas entre ellas (Fig. 5).

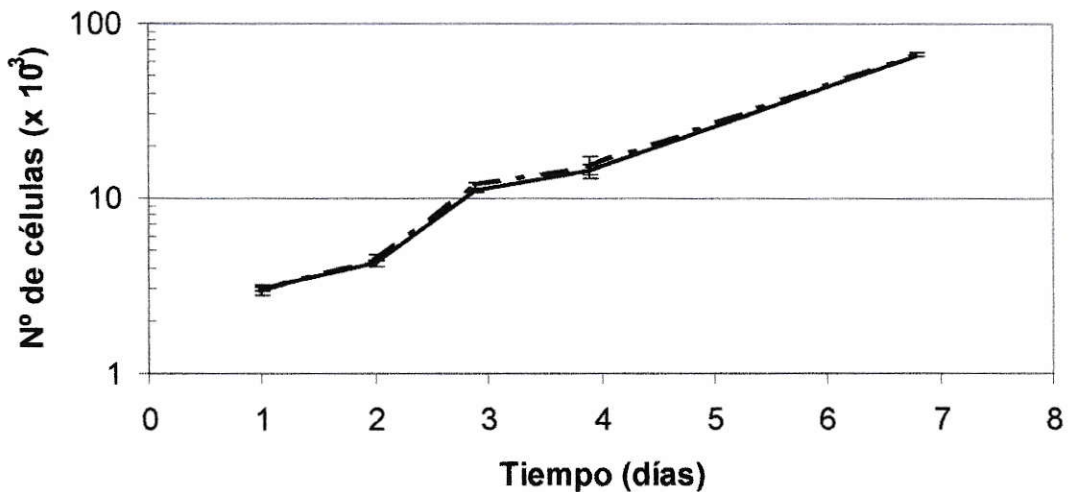


Figura 4. Efecto de la marcación con CFSE sobre la proliferación de MSC. Las MSC sin marcar (línea continua) y marcadas con CFSE (línea discontinua) se sembraron a una densidad de $2,6 \times 10^3$ células/cm² y se cultivaron en α -MEM + SFB 10% (v/v). A distintos tiempos post-siembra se determinó el número de células vivas adheridas por el método de tinción con cristal violeta. Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes y en cada experimento las muestras se analizaron en duplicado.

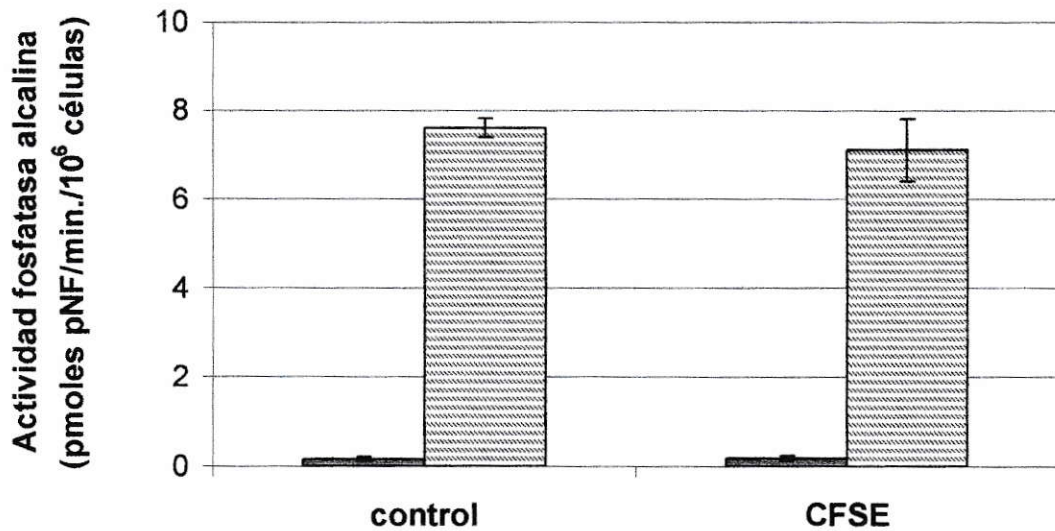


Figura 5. Efecto de la marcación con CFSE sobre la diferenciación osteogénica de MSC. Las MSC sin marcar y marcadas con CFSE se expusieron (barras achuradas) o no (barras grises) al estímulo osteogénico. Al quinto día post-estimulación se evaluó la actividad fosfatasa alcalina espectrocolorimétricamente, la cual se expresó como pmoles pNF/min./10⁶ células.

Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes y en cada experimento las muestras se analizaron en duplicado.

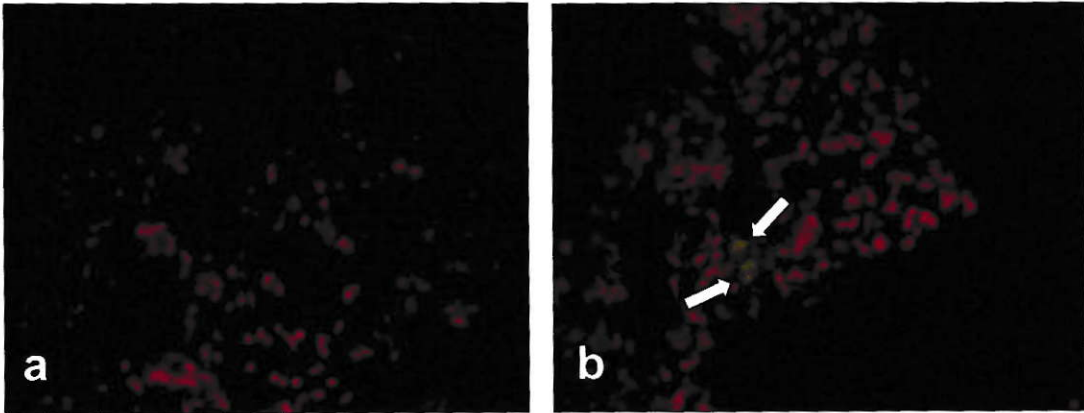


Figura 6. Detección de MSC humanas marcadas con CFSE en pulmón murino. Ratones desnudos recibieron por infusión intravenosa el vehículo de inyección (a) ó $0,5 \times 10^6$ MSC marcadas con CFSE (b). Un día más tarde, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron criosecciones de sus pulmones, que fueron teñidas con PI y montadas en Dabco/Mowiol. Luego se analizaron en microscopio de epifluorescencia con filtro para FITC. Las flechas muestran las MSC marcadas con CFSE que colocalizan con la marca anaranjada del PI. Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos.

detectar hasta 1 en 100.000 células (Mira y col. 2002) y además facilita el análisis simultáneo de un gran universo de muestras.

2.c PCR para β -globina humana selectivo y de alta sensibilidad.

Se establecieron las condiciones óptimas de la PCR que permitieran amplificar selectivamente pequeñas cantidades de DNA humano aún en presencia de grandes cantidades de DNA murino, ya que dada la barrera de especie, junto con los antecedentes de la literatura para trasplante de otras células, la frecuencia de células humanas en tejidos murinos debiera ser muy baja. Se probaron 6 parejas de partidores específicos para distintas secuencias humanas (Alu, β -actina, gapdh, β -globina) pero con todos ellos se observó amplificación inespecífica de DNA murino indistinguible de la amplificación obtenida a partir de DNA humano. Finalmente se optó por utilizar los partidores para el gen de la β -globina humana incluidos en el kit DNA Control, de Roche, ya que después de 40 ciclos de amplificación al utilizar como templado DNA murino sólo se observó una señal marginal en la región de T_m correspondiente al amplicón generado a partir de DNA humano. (Fig. 7). Intentos para disminuir al máximo la señal generada a partir de DNA murino sin comprometer la sensibilidad de la PCR, incluyeron cambios en la temperatura y tiempo de apareamiento, y en la concentración de $MgCl_2$.

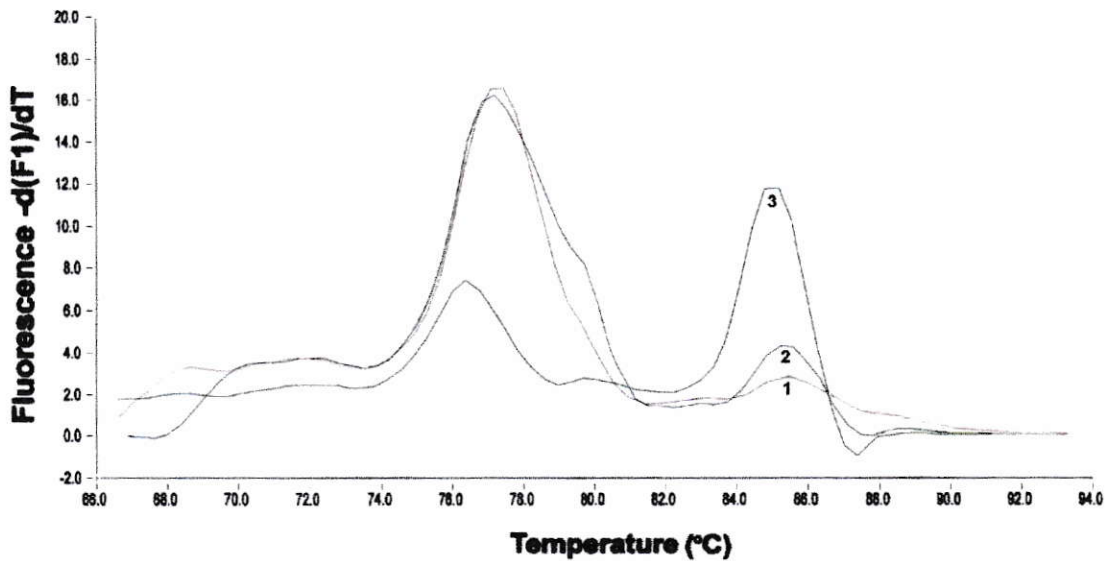


Figura 7. Análisis de T_m para los amplicones del gen β -globina humano. El pico de amplificación con T_m cercano a $78\text{ }^\circ\text{C}$ corresponde a los dímeros de partidores. El pico de amplificación con T_m igual a $85 \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ corresponde al amplificado específico para β -globina humana.

Se muestran curvas representativas de controles y muestra problema. La curva 1 corresponde a 200 ng de DNA genómico murino (control negativo), la curva 2 corresponde a 3 pg de DNA humano en 200 ng de DNA murino (control positivo 2) y la curva 3 corresponde a una muestra problema positiva.

El protocolo original fue modificado aumentando la temperatura y el tiempo de apareamiento a 64 °C y a 5 s, respectivamente y fijando la concentración de MgCl₂ en 4 mM.

La sensibilidad de la PCR para β-globina humana se determinó amplificando cantidades decrecientes de DNA humano (3.000, 300, 30 y 3 pg) en presencia de 200 ng de DNA murino. Se observó que en estas condiciones, seguía siendo posible detectar 3 pg de DNA humano. Puesto que esta cantidad de DNA corresponde a 1 genoma equivalente, la sensibilidad de la PCR para β-globina humana resultó ser de 1 célula humana en 70.000 de ratón. Con una reproducibilidad del 70%.

En adelante, se consideró que en los tejidos analizados había MSC humanas (tejidos positivos) cuando se encontraba una señal de amplificación tal que en el análisis de T_m el pico de amplificación estaba por sobre la señal obtenida para 3 pg de DNA humano en 200 ng de DNA murino (control positivo 2) y cuya temperatura de denaturación era de 85 ± 0,5 °C.

2.d Biodistribución a corto plazo de MSC humanas.

La dinámica de biodistribución de MSC humanas infundidas intravenosamente se analizó por PCR para el gen β-globina humano. Para ello, se extrajo DNA genómico de distintos tejidos murinos (médula ósea, bazo, hueso, diente, cola, oreja, músculo esquelético, corazón, pulmón, hígado, riñón, cerebro, ovarios), disectados 15 min. 3 y 24 h, 1 y 2 semanas post-infusión de

$0,5 - 2 \times 10^6$ MSC humanas. Como se muestra en la Fig. 8 en 14 de 45 tejidos murinos analizados hasta 3 h post-infusión fue posible detectar células humanas. Estos tejidos corresponden a médula ósea, bazo, pulmón, diente, hueso, cola, y músculo esquelético. Sin embargo, a un tiempo mayor post-infusión, 24 h - 1 semana, la distribución de MSC se restringió a 11 de 74 tejidos analizados, siendo estos médula ósea, bazo, y pulmón. Ahora bien, a las 2 semanas post-infusión sólo 4 de 30 tejidos analizados fueron positivos, y correspondían exclusivamente a médula ósea y bazo. Por su parte, fue posible detectar la presencia de DNA humano en células nucleadas de sangre obtenidas hasta 2 semanas post-infusión.

A pesar que no se realizó un análisis cuantitativo, dado que las magnitudes relativas de las señales de fluorescencia obtenidas en los tejidos positivos fueron similares a las de 3 pg de DNA humano en 200 ng de DNA murino, y considerando los rendimientos de las extracciones de DNA genómico de los tejidos analizados, fue posible estimar que menos del 3% del total de MSC infundidas se destinan y permanecen en la médula ósea y el bazo.

Estos resultados sugieren que las MSC infundidas intravenosamente circularían por el organismo concentrándose en los tejidos mesenquimáticos y el pulmón. Sin embargo, en un plazo de 2 semanas post-infusión desaparecerían de ellos, permaneciendo sólo una pequeña fracción de MSC en médula ósea y bazo; ambos tejidos hematopoyéticos en el ratón.

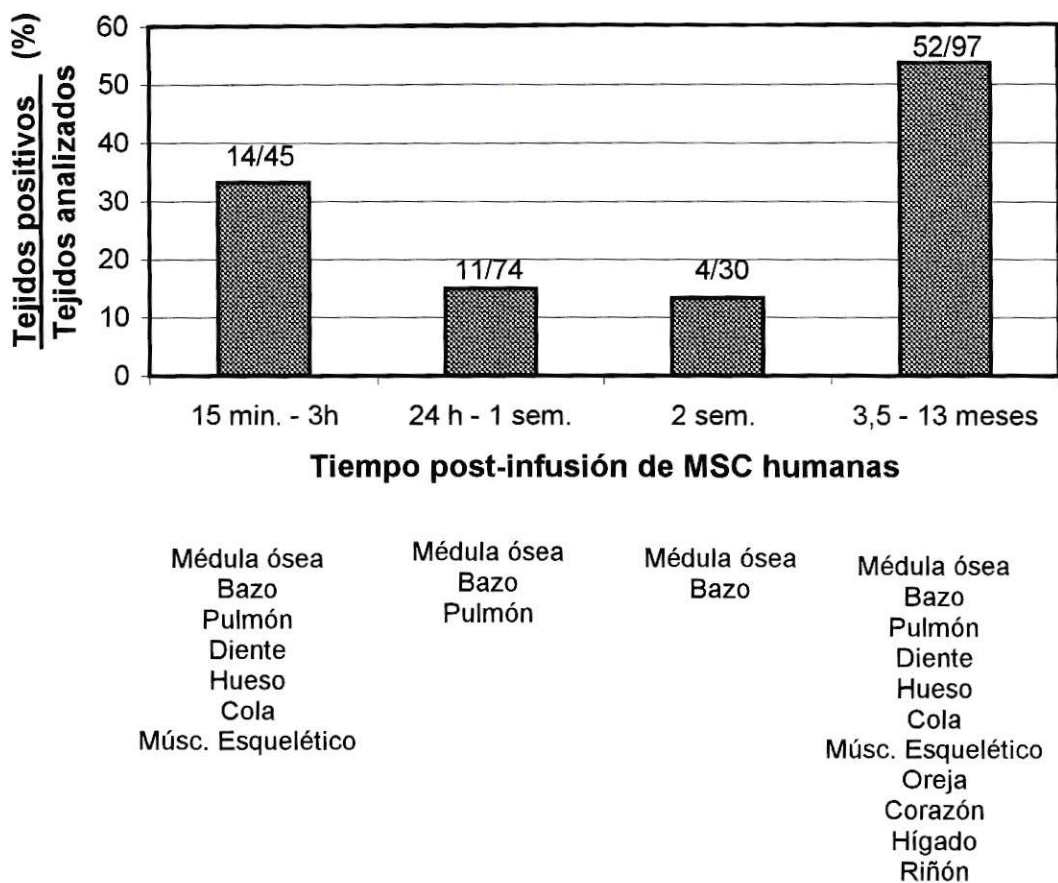


Figura 8. Cinética de biodistribución de MSC humanas. Ratones inmunodeficientes hembras balb/c de 3 meses de edad recibieron $0,5 - 2 \times 10^6$ MSC por vía intravenosa, 15 min. a 13 meses post-infusión los ratones fueron sacrificados, se disectaron sus órganos y se analizó en ellos la presencia de células humanas por PCR para el gen β -globina humano. Los valores corresponden a la cantidad de tejidos positivos expresados como porcentaje respecto del total de tejidos analizados (100%). Los cuocientes sobre las barras indican la razón entre el número de tejidos positivos y el total de tejidos analizados. Para cada tiempo se muestran los tejidos positivos.

Por lo tanto, las MSC extraídas de la médula ósea y expandidas *ex vivo*, una vez infundidas intravenosamente en un organismo en estado estable volverían a alojarse exclusivamente en los tejidos hematopoyéticos.

2.e Biodistribución a largo plazo de MSC humanas.

Sorprendentemente, después de la disminución durante las 2 primeras semanas la variedad de tejidos positivos observados, a partir de los 3,5 meses se encontraron con mayor frecuencia tejidos positivos, siendo 52 tejidos positivos de 97 analizados (Fig. 8), los cuales correspondieron a tejidos hematopoyéticos pero también mesenquimáticos y no mesenquimáticos.

Como se muestra en la Tabla 5, en este periodo los tejidos que fueron positivos la mayor cantidad de veces fueron los hematopoyéticos, es decir, en todas las médulas óseas y bazos analizados siempre fue posible encontrar células humanas en ellos. Por su parte, al analizar los tejidos mesenquimáticos más de la mitad de los tejidos analizados fueron positivos y entre ellos cabe destacar el hueso, encontrándose MSC humanas en 6 de 7 muestras analizadas, lo cual es una ventaja para la terapia propuesta, ya que en la OI este tejido corresponde al principal tejido afectado. También se observó presencia de MSC en tejidos no mesenquimáticos como pulmón, hígado, y riñón, sin embargo la frecuencia con que estos tejidos fueron positivos fue menor (3/7 – 1/6). Finalmente en tejidos como ovario y cerebro nunca se detectaron MSC humanas.

Tejido analizado	Tejidos positivos/tejidos analizados
Médula ósea	7/7
Bazo	8/8
Hueso	6/7
Cola	7/9
Diente	2/4
Oreja	3/6
Músc. Esquelético	4/9
Corazón	4/9
Pulmón	3/7
Hígado	3/7
Riñón	1/6
Ovario	0/6
Cerebro	0/7

Tabla 5. Biodistribución a largo plazo de MSC humanas. Ratones hembras balb/c de 3 meses de edad recibieron $0,5 - 2 \times 10^6$ MSC por vía intravenosa, 3,5 a 13 meses post-infusión los ratones fueron sacrificados, se disectaron sus órganos y se analizó en ellos la presencia de células humanas por PCR para el gen β -globina humano los valores corresponden a la cantidad de tejidos positivos respecto del total de muestras analizadas.

Por lo tanto, a largo plazo las MSC son redestinadas desde la médula ósea y el bazo hacia tejidos mesenquimáticos como no mesenquimáticos.

Dado que el tejido óseo fue frecuentemente positivo, se sugiere que las MSC podrían ser utilizadas en protocolos de terapia génica para enfermedades óseas, como OI. Sin embargo, es necesario evaluar la posibilidad de transducirlas con vectores retrovirales que expresen genes que permitan revertir el fenotipo patológico.

II. Transducción de MSC humanas con vectores retrovirales y efectos de la presencia de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1.

1. Determinación de los protocolos óptimos de transducción y de selección de MSC transducidas

Las condiciones óptimas de transducción son aquellas que permiten obtener el mayor porcentaje de células que expresan el transgen movilizado por el vector sin afectar el fenotipo. Para determinar dichas condiciones en MSC humanas, se utilizó el vector retroviral LZRNL, que codifica para los transgenes reporteros lac Z y neo, y se ensayaron distintas condiciones de infección. Alternativamente se evaluaron las siguientes variables: multiplicidad de infección (moi) (1, 2, 5, 10 y 20 unidad formadora de placa/célula (pfu/cél.)), concentración de polibreno (0, 8, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$), concentración de SFB (10 y 20% v/v), infección de células adheridas o en

placa/célula (pfu/cél.)), concentración de polibreno (0, 8, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$), concentración de SFB (10 y 20% v/v), infección de células adheridas o en suspensión, número de ciclos de infección (1, 2, y 3). La eficiencia de la transferencia génica se evaluó mediante tinción *in situ* con X-gal y luego los resultados se confirmaron mediante tinción con FDG y análisis de las células por citometría de flujo.

Con relación a la moi al visualizar la cantidad de células azules (que expresan el transgen lac Z), se observó que el porcentaje de células transducidas aumentaba al aumentar la moi, alcanzándose un máximo a moi 5 pfu/cél. A valores superiores la morfología celular cambiaba drásticamente observándose además muerte celular masiva.

Al evaluar el efecto de la concentración de polibreno se observó que con 20 $\mu\text{g/ml}$ se alcanzaba el mayor porcentaje de MSC transducidas y que a mayores concentraciones este porcentaje no cambiaba.

Por lo tanto se prosiguió evaluando las demás variables manteniendo la moi y la concentración de polibreno fijas, a 5 pfu/cél. y 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Cuando se estudió el efecto del SFB se encontró que el porcentaje de células transducidas era mayor cuando las MSC se sembraban y luego se infectaban en presencia de SFB 20% (v/v). Al infectar las MSC adheridas, con lo cual se aumenta la superficie de contacto de la célula, el porcentaje de MSC transducidas era cercano al máximo obtenido.

Con relación al número de ciclos de infección, se ha reportado que son necesarios 4 ciclos de infección para transducir eficientemente MSC humanas con un vector retroviral que codifica para el gen reportero neomicina fosfotransferasa (Li y col., 1995). Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis muestran que no hay un aumento significativo del porcentaje de células transducidas al repetir la infección.

En conjunto los resultados anteriores muestran que el protocolo óptimo de transducción de MSC con vectores retrovirales consistía en infectar por un único ciclo las células adheridas y cultivadas en α -MEM + SFB 20% (v/v), a una moi 5 pfu/cél., en presencia de polibreno 20 μ g/ml, por 24 h. Protocolo con el cual se obtuvo aproximadamente un 10% de MSC transducidas (Tabla 6).

Dos días post-infección con el vector retroviral LZRNL las células se expusieron al análogo de neomicina G418 a 2 concentraciones (200 y 400 μ g/ml). Tres días más tarde, se observó que en presencia de 200 μ g/ml una pequeña parte de la población celular moría, en cambio con 400 μ g/ml se producía una muerte celular masiva y el remanente de células que permanecía adheridas correspondía a células vivas que seguían proliferando y que eran resistentes a G418; este resultado se confirmó al exponer en las mismas condiciones células que no estuvieron en presencia del virus, en tal caso la muerte celular fue total. Desde el cuarto día post-infección, y a pesar de la presencia de G418, en adelante no se observó muerte celular, lo que confirmó que las células expresaban el transgen de resistencia, por lo tanto en un tiempo

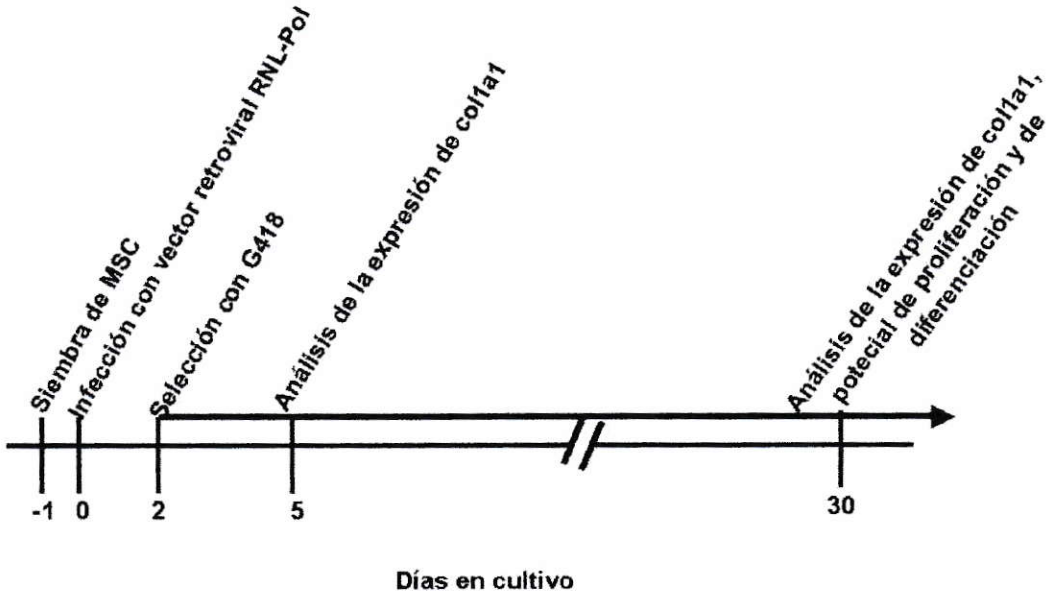
Condición	Nº de ciclos de infección	VB (%)	Células que expresan el transgen (% de células β -gal+)
MSC adheridas α -MEM + SFB 10% (v/v)	sin infectar	80	1,6
	1 día	79	7,4
	1 y 3 días	73	8
MSC no adheridas α -MEM + SFB 10% (v/v)	sin infectar	82	1,5
	1 día	67	4,3
	1 y 3 días	62	9,6
MSC adheridas α -MEM + SFB 20% (v/v)	sin infectar	87	1,7
	1 día	88	9,8
	1 y 3 días	72	7,2
MSC no adheridas α -MEM + SFB 20% (v/v)	sin infectar	75	1,5
	1 día	67	6,8
	1 y 3 días	70	5

Tabla 6. Resumen de los resultados de transducción de MSC humanas con el vector retroviral LZRNL. Para determinar las condiciones óptimas de transducción, se evaluó la concentración de SFB, el número y frecuencia de ciclos de infección, infectando células adheridas o en suspensión, a moi 5 pfu/cél. en presencia de 20 μ g/ml de polibreno. La eficiencia de la transferencia génica se evaluó mediante tinción *in situ* con X-gal y los resultados se confirmaron mediante tinción con FDG y análisis de las células por citometría de flujo.

aproximado de 3 días era posible seleccionar la población de MSC transducidas. Estas células proliferaron y se mantuvieron en cultivo en presencia de G418 por aproximadamente 6 meses. Además, las MSC transducidas se criopreservaron en las mismas condiciones utilizadas para las MSC sin infectar, manteniéndose la expresión de los transgenes post-criopreservación.

2. Efectos moleculares de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1.

Sobre la base de los resultados anteriores, el protocolo que se utilizó para evaluar los efectos moleculares de la presencia de la ribozima Rzpol1a1 movilizada por el vector retroviral RNL-Pol sobre el gen col1a1 en MSC fue hecho según el siguiente esquema:



La acción de Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1, en MSC heterocigotas (C/T) para el SNP 3210 de dicho gen, se evaluó a nivel de mRNA cuantificando el mRNA col1a1 por RT-PCR cuantitativo, y los valores se normalizaron por la cantidad de mRNA gapdh. Además, a nivel de proteína se cuantificó el propéptido C-terminal C1CP en el medio de cultivo por ELISA-Sandwich, como señal de la producción *de novo* de la proteína COL1A1. En ambos casos se compararon los valores obtenidos para MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol vs. las mismas células sin infectar (control).

2.a Reducción de los niveles de mRNA col1a1.

A los 5 días post-infección, se observó que en MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol la cantidad de mRNA col1a1 correspondía a un $43 \pm 6\%$ de la cantidad de mRNA col1a1 de MSC control (Fig. 9.a). Esta diferencia se mantuvo 30 días post-infección, ya que la cantidad de mRNA col1a1 en MSC transducidas correspondía al $38 \pm 13\%$ con respecto de las MSC control (Fig. 9.b). Además se cuantificaron los niveles de mRNA col1a2 y se observó que estos no variaron en MSC transducidas respecto de MSC control (datos no mostrados), lo cual prueba la selectividad de Rzpol1a1 sobre el mRNA col1a1.

Por lo tanto, la expresión de la ribozima Rzpol1a1 en las MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol provoca una disminución en los niveles de mRNA col1a1, lo cual sería producto del reconocimiento y siguiente corte del mRNA col1a1 por la ribozima Rzpol1a1.

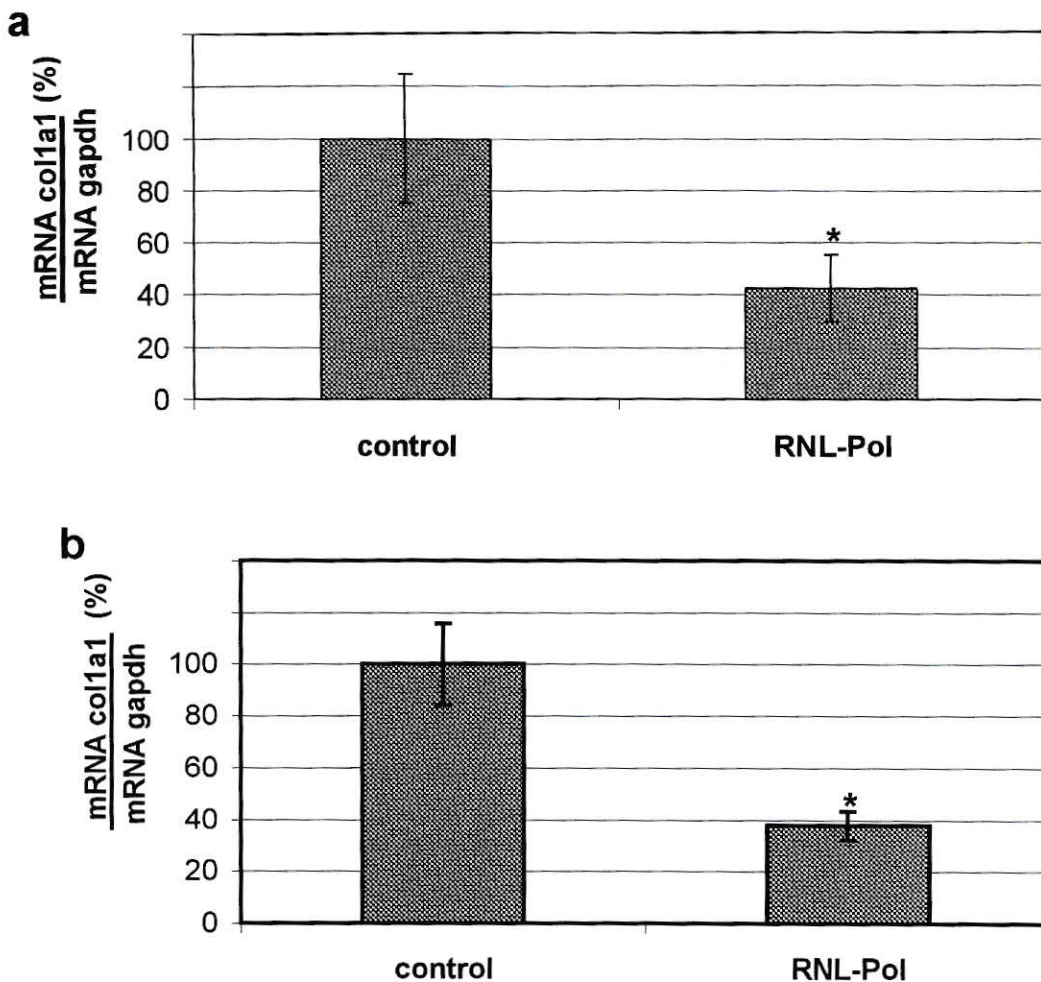


Figura 9. Niveles de mRNA col1a1 en MSC control y MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol, 5 días (a) y 30 (b) días post-infección. Los valores corresponden a la cantidad de mRNA col1a1 normalizada por la cantidad de mRNA gapdh, obtenidos por RT-PCR y expresados como porcentajes respecto del control (100%).

Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes, las muestras se analizaron por triplicado y en cada experimento la viabilidad celular fue del 100%.

* Datos estadísticamente significativos, $p < 0.05$.

2.b Reducción de los niveles de proteína colágeno I.

A los 5 días post-infección, se observó que la cantidad de colágeno I producido *de novo* en las MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol correspondía al $5 \pm 2\%$ de las MSC control (Fig. 10.a). Sin embargo, a los 30 días post-infección no se observaron diferencias significativas en la concentración de colágeno I en MSC transducidas respecto del control (Fig. 10.b).

Por lo tanto, se observa una drástica reducción en la síntesis *de novo* de colágeno I en las MSC infectadas con el retrovirus RNL-Pol por un tiempo discreto post-infección (5 días). Sin embargo, posteriormente dicha reducción es revertida, restableciéndose los valores de colágeno I.

3. Consecuencias celulares de la expresión de Rzpol1a1 movilizada por el vector retroviral RNL-Pol.

Para determinar si el proceso de transducción con el vector retroviral RNL-Pol y la expresión de Rzpol1a1 tenía algún efecto adverso en las MSC, se evaluaron los potenciales de proliferación y de diferenciación osteogénico de MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol a los 30 días post-infección y se compararon con los de MSC no transducidas (control).

3.a Efectos sobre la proliferación de MSC.

Como se muestra en la Fig. 11, las MSC control y las MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol presentan cinéticas de proliferación similares.

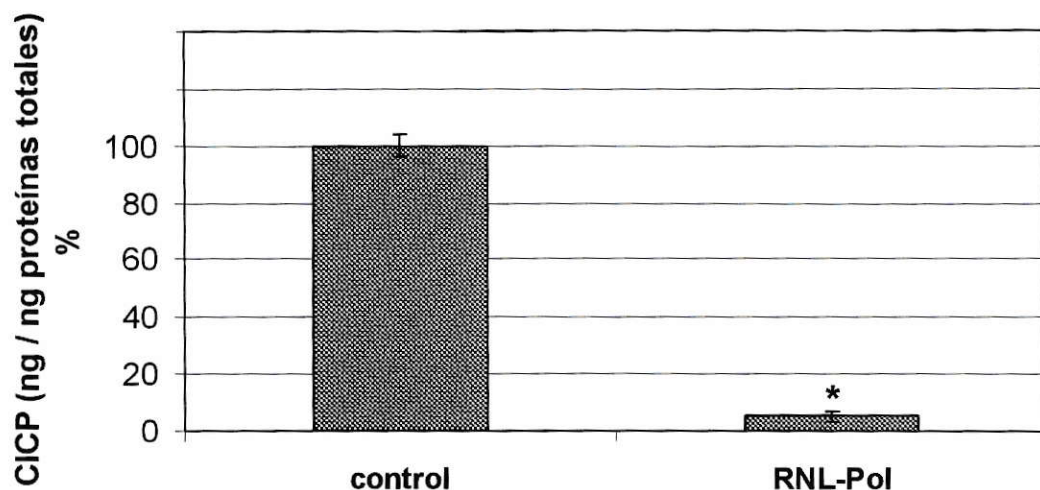
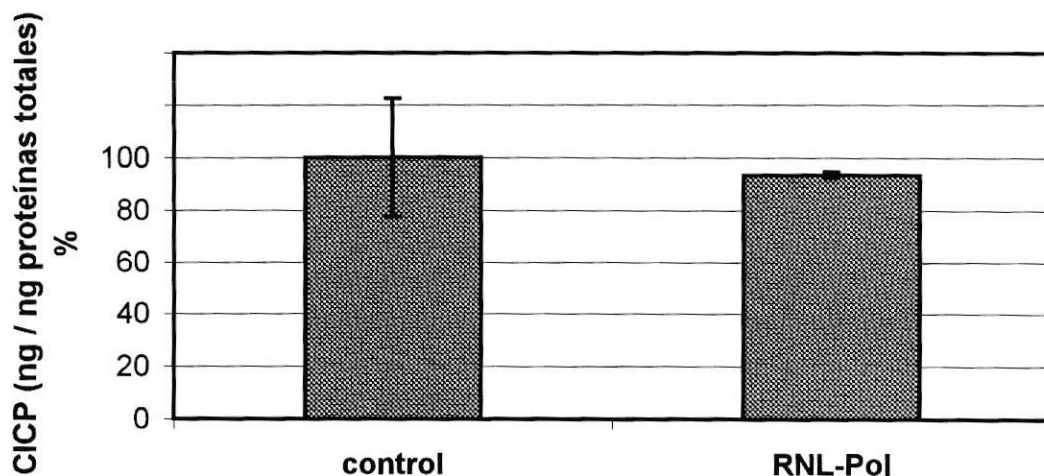
a**b**

Figura 10. Niveles de colágeno I en MSC control y MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol, 5 días (a) y 30 (b) días post-infección. La síntesis *de novo* de colágeno I se evaluó en función de la secreción de CICP, el cual se cuantificó por ELISA-Sandwich. Los valores fueron normalizados por la cantidad de proteína total y luego expresados como porcentajes respecto del control (100%).

Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Las muestras se analizaron por triplicado y en cada experimento la viabilidad celular fue del 100%.

* Datos estadísticamente significativos, $p < 0.05$.

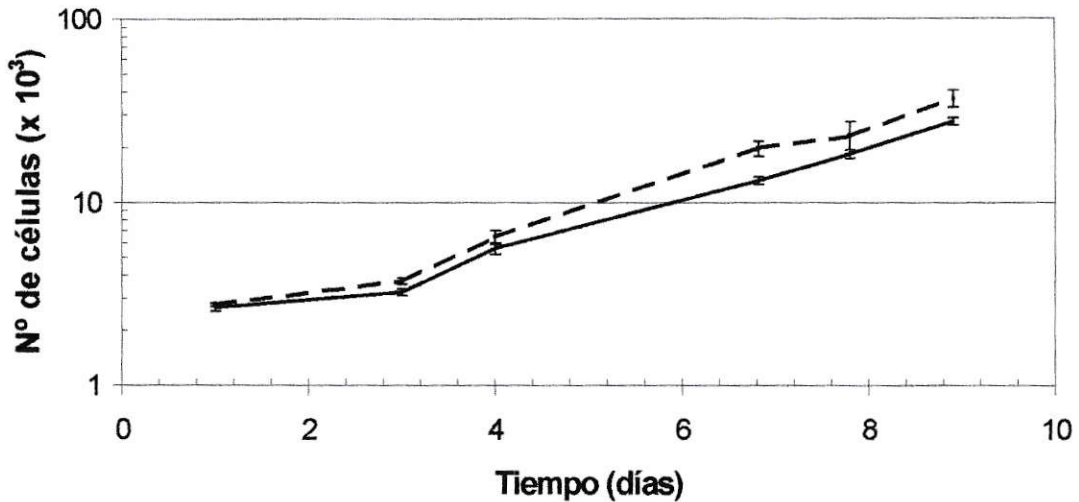


Figura 11. Efecto de la expresión del Rzpol1a1 sobre la proliferación de MSC. Las MSC control (línea continua) y transducidas con el vector retroviral RNL-Pol (línea cortada) se sembraron a una densidad de $2,6 \times 10^3$ células/cm² y se cultivaron en α -MEM + SFB 10% (v/v). A distintos tiempos post-siembra se determinó el número de células vivas adheridas por el método de tinción con cristal violeta.

Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. En cada experimento las muestras se analizaron en cuadruplicado.

Además, al comparar los tiempos de duplicación poblacional no se observaron diferencias significativas. (1,8 y 1,6 días para MSC control y MSC transducidas, respectivamente).

Por su parte, tanto las MSC control, como las MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol presentaron inhibición de la proliferación por contacto (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la transducción con el vector retroviral RNL-Pol no convierte a las MSC en células tumorigénicas, lo cual fue apoyado por experimentos en ratones inmunodeficientes que recibieron intravenosamente MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol; luego de 8 meses post-infusión no presentaron formación de tumores y los animales envejecieron de manera similar a aquellos que no recibieron MSC. En conjunto estos resultados muestran que ni la transducción, ni la expresión de Rzpol1a1 transforma a las MSC en células tumorigénicas.

3.b Efectos sobre la diferenciación osteogénica de MSC.

Se observó que al igual que las MSC control, las MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol son capaces de responder al estímulo de diferenciación osteogénico, induciendo la expresión de la enzima fosfatasa alcalina (Fig. 12).

Por lo tanto, el potencial de diferenciación de las MSC al linaje osteogénico no se pierde al transducirlas con el vector retroviral RNL-Pol ni con la expresión de Rzpol1a1.

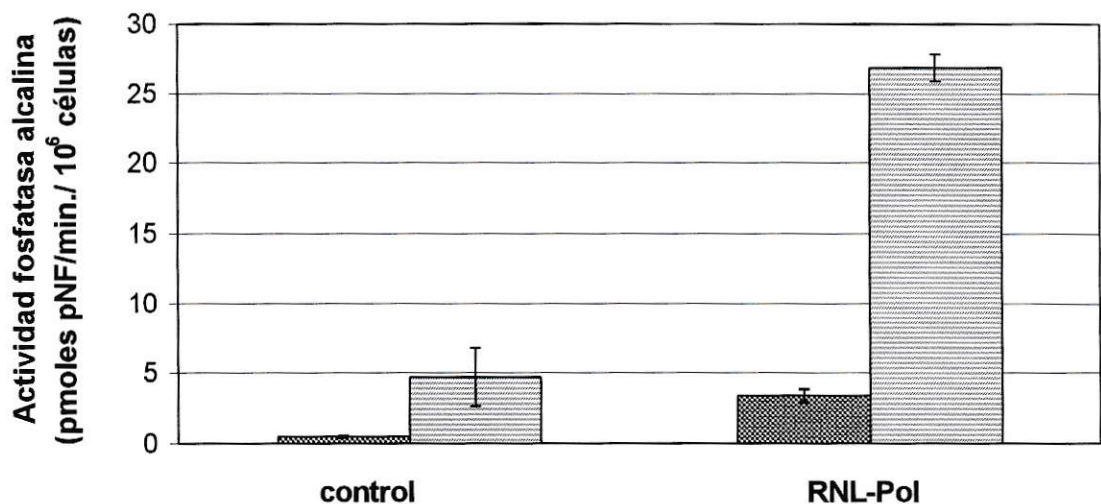


Figura 12. Efecto de la expresión de Rzpol1a1 sobre la diferenciación osteogénica de MSC. Las MSC control y transducidas con el vector retroviral RNL-Pol se expusieron (barras achuradas) o no (barras grises) al estímulo osteogénico. Al quinto día post-estimulación, se evaluó la actividad fosfatasa alcalina espectrocolorimétricamente, la cual se expresó como pmoles pNF/min./10⁶ células.

Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes y en cada experimento las muestras se analizaron en duplicado.

Como era de esperar, en ausencia de estímulo osteogénico las MSC control no expresaron la enzima fosfatasa alcalina. Sin embargo, en las condiciones basales las MSC transducidas con el vector retroviral expresaban levemente esta enzima.

Además, los niveles a los que se induce la enzima fosfatasa alcalina son muy superiores en MSC transducidas comparadas con los de MSC control (27 vs. 5), lo que sugiere compromiso al linaje osteogénico.

DISCUSIÓN

I. Trasplantabilidad de MSC humanas.

Nuestros resultados de xenotrasplantes indican que las MSC humanas expandidas *ex vivo* e infundidas por vía intravenosa permanecen en el organismo por al menos 13 meses post-infusión, sin provocar efectos secundarios en el receptor como formación de tumores, deformaciones óseas o cambios en el peso corporal. Estos resultados concuerdan con el hecho de que hasta la fecha no se han reportado datos que sugieran que la expansión *ex vivo* convierta a las MSC en células tumorigénicas o que su infusión intravenosa comprometa la vida del receptor. Por lo tanto la expansión *ex vivo* de las MSC, su infusión intravenosa y su eliminación no es tóxica para el receptor y no provoca efectos secundarios.

Nuestros estudios de biodistribución a corto plazo, es decir, hasta 3 h post-infusión, muestran que las MSC se destinan inicialmente a médula ósea, bazo, pulmón, diente, hueso, cola y músculo esquelético y no a otros tejidos analizados como corazón, hígado, riñón, ovario y cerebro. La presencia de las MSC en estos tejidos, excepto pulmón, correspondería a una destinación preferencial hacia estos tejidos a corto plazo. Se puede descartar que la presencia de células humanas en estos tejidos se debe a las MSC en sangre

periférica, ya que en tejidos de alta irrigación, como hígado o corazón, no se encontraron.

En relación a la retención temprana en el pulmón de las MSC infundidas intravenosamente, esta ha sido observada previamente por nosotros y por otros grupos (Pereira y cols., 1995, Gao y col., 2001). Imágenes de nuestro laboratorio en γ -cámara de ratones que recibieron MSC marcadas con Tc99 mostraron a las 3 h post-infusión una gran cantidad de células marcadas en el pulmón (Allers y cols., 2003). Es lógico pensar que esta retención se debe a que el diámetro de las MSC es mayor que el de los capilares pulmonares (20 – 25 vs. 10 – 15 μm). Por lo tanto, la presencia de ellas en este órgano es sólo transitoria y no corresponde a un sitio de destinación a corto plazo.

Se ha reportado que los cultivos de MSC expandidas *ex vivo* corresponden a una población heterogénea que presenta células con distinto grado de compromiso (Muraglia y cols., 2000). Entonces la destinación a corto plazo podría estar relacionado con el grado de compromiso de las células, sólo aquellas que presentan mayor grado de compromiso serían retenidas en el tejido con el cual están comprometidas, en cambio aquellas células no comprometidas o con un compromiso muy temprano se dirigirían hacia la médula ósea y bazo, lugar donde fisiológicamente se encuentran las MSC.

Destacable es que los únicos tejidos en que las MSC se destinan a corto plazo y permanecen son médula ósea y bazo. Lo cual podría estar dado por las características del microambiente del tejido al cual llegan las células, es decir, la

sobrevivencia de las MSC luego de la infusión dependería de su encuentro con un microambiente favorable.

También fue posible detectar MSC en muestras de sangre periférica. El hecho que las MSC circulen en la sangre periférica aún no está claro. En el modelo murino las MSC circularían y migrarían hacia los tejidos hematopoyéticos (Piersma y col., 1983). En humanos, sólo se han detectado células con características de MSC en recolecciones de sangre periférica obtenida después de la movilización de precursores hematopoyéticos con factores de crecimiento, pero no en sangre de individuos normales (Fernández y col., 1997). Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados por otros investigadores (Ojeda-Uribe y cols., 1993; Lazarus y cols., 1997). Ya que el método utilizado detecta sólo DNA humano en presencia de DNA murino y dado que las muestras de sangre se obtuvieron a tiempos cortos post-infusión de las MSC, la señal positiva en estas muestras podría corresponder a macrófagos que circulan con DNA humano fagocitado.

Por lo tanto, luego de ser infundidas las MSC se dirigen hacia tejidos hematopoyéticos y mesenquimáticos para luego permanecer sólo en médula ósea y bazo, tejidos hematopoyéticos en el ratón.

Del total de las MSC infundidas sólo una pequeña proporción, aproximadamente 3%, se alojó en los tejidos hematopoyéticos del ratón y el resto murió, esto podría deberse a la diferencia de especie (humano-ratón) entre las células infundidas y el receptor. Sin embargo, en el trabajo de Pereira

en 1995 a pesar que el trasplante fue en la misma especie y el huésped se encontraba en condiciones de demanda, el porcentaje de células presentes en los tejidos hematopoyéticos no superó al valor mostrado en esta tesis. Por lo tanto, las células que se destinan tempranamente a los tejidos hematopoyéticos podrían corresponder a una población particular dentro de la población total de MSC. Esto concuerda con el trabajo de Beauchamp en 1999, donde se muestra que luego de la infusión la mayor parte de la población celular muere, y se sugiere que el pequeño porcentaje de células que sobreviven corresponden a una población particular que presenta características de células troncales que poseen capacidad de autorenovación y diferenciación.

Los estudios de biodistribución a largo plazo muestran que la presencia de MSC humanas no se restringía sólo a tejidos hematopoyéticos, sino también era posible encontrarlas en tejidos mesenquimáticos y no mesenquimáticos, excepto cerebro y ovario donde en nunca se encontraron.

Dentro de los tejidos mesenquimáticos positivos el más frecuente fue el hueso, lo cual es una ventaja para la terapia propuesta ya que en la OI el tejido óseo corresponde al tejido principalmente dañado a nivel sistémico, por lo tanto el uso de las MSC en terapia para OI parece ser el blanco celular adecuado.

En los tejidos no mesenquimáticos como pulmón, hígado y riñón, las MSC podrían formar parte del estroma de estos, sin embargo recientemente se ha reportado que *in vivo* las MSC se pueden diferenciar a células renales o a hepatocitos luego de ser infundidas en ratones con daño renal o hepático

(Petersen y cols., 1999, Ito y cols., 2001). En consecuencia, la población de MSC que se aloja en los tejidos hematopoyéticos y que luego se es redestinada hacia otros tejidos posee la capacidad de generar otros tipos celulares no mesenquimáticos, prueba de la plasticidad de estas células.

Por lo tanto, las MSC son destinadas a los tejidos hematopoyéticos y luego son redestinadas hacia otros tejidos. La redestinación de las MSC conllevaría la expansión de las MSC que se destinaron a los tejidos hematopoyéticos, es decir, al dividirse una MSC una célula hija se mantiene en el tejido de destinación y la otra es redestinada hacia otros tejidos para diferenciarse. Lo anterior se apoya en que la intensidad de la señal de la presencia de MSC en médula ósea y bazo no varió durante todo el tiempo de experimentación.

Las MSC extraídas de la médula ósea y expandidas *ex vivo*, una vez infundidas intravenosamente en un organismo en estado estable volverían a alojarse en los tejidos hematopoyéticos y su redestinación hacia otros tejidos sería provocada por señales de demanda, ya que en este caso los animales analizados eran adultos en estado estable, esta señal correspondería al recambio fisiológico de cada tejido.

Los trabajos de Pereira en 1995, Liechty en 2000, Ito en 2001, y Devine en 2001 muestran la presencia de las MSC en tejidos hematopoyéticos, mesenquimáticos y no mesenquimáticos luego de ser infundidas intravenosamente, sin embargo en todos ellos los animales se encontraban en

estado de demanda en alguno de sus tejidos, ya sea por alguna enfermedad o porque habían sido irradiados o porque se encontraban en etapa de crecimiento. Hasta la fecha no hay trabajos que hayan reportado la destinación de las MSC tanto a corto como largo plazo en individuos adultos en estado estable, por lo tanto los resultados mostrados en esta tesis son los primeros en los que se muestra la presencia y destinación de las MSC humanas en dichos individuos.

Las células humanas encontradas en los tejidos murinos corresponderían a células diferenciadas y no a MSC, ya que se ha descrito que en animales infundidos intravenosamente con MSC humanas, las células encontradas hasta 13 meses post-infusión en los diversos tejidos corresponden a células que se han integrado y presentan características del tejido donde se encuentran (Liechty y cols., 2000). Así como resultados de nuestro laboratorio utilizando la técnica de hibridación *in situ* confirmaron la presencia de células humanas integradas en tejidos murinos (Allers y cols., 2003).

Hasta la fecha todos los trabajos que analizan la presencia de MSC post-infusión se han realizado a tiempos fijos, por lo tanto los resultados de esta tesis corresponden al primer estudio cinético de biodistribución de MSC.

En conjunto los resultados mostrados apoyan fuertemente que las MSC son el blanco celular ideal para protocolos de terapia génica para OI, ya que luego de ser manipuladas *ex vivo* sobreviven a la infusión intravenosa y son redestinadas frecuentemente al tejido óseo, por lo tanto podrían suplir la función

de los osteoblastos patológicos. Estos resultados validan una parte de la hipótesis propuesta y sirven de base para evaluar los efectos de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1 en estas células.

II. Efectos de la presencia de la ribozima rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1.

1. Transducción de MSC con vectores retrovirales.

En las condiciones óptimas de transducción de MSC establecidas en esta tesis se obtuvo como máximo un 10% de células que expresaban los transgenes reporteros.

Las principales etapas limitantes de la transducción con vectores retrovirales corresponden a la entrada del virus a la célula y a la entrada del DNA viral al núcleo para su integración en el genoma (Wang y cols., 1991). A nivel molecular estas etapas están determinadas por la expresión de receptores de superficie en la membrana celular y por la etapa del ciclo celular en que se encuentran las células, respectivamente.

Se observó que el máximo de células transducidas se obtenía en presencia de polibreno 20 $\mu\text{g/ml}$, y que disminuía a concentraciones menores. Esto concuerda con lo reportado, que la etapa de adsorción del virus es mediada por esta molécula, la cual al tener carga neta positiva favorece la eficiencia de infección al disminuir la repulsión electrostática entre la membrana

viral y la membrana celular (ambas con carga neta negativa), favoreciendo así la unión de estas (Toyoshima y col., 1969).

El trabajo de Marx en 1999, muestra que la transducción de las MSC esta limitada por la expresión del receptor viral anfotrófico *Pit-2* (transportador de fosfato), es decir, la eficiencia de transducción estaría limitada también por la expresión de este receptor, por lo tanto la población de MSC transducidas con RNL-Pol correspondería a aquella que expresó el receptor *Pit-2* durante el tiempo de infección.

Para obtener el máximo de células transducidas fue necesario crecer e infectar las MSC en medio con alta concentración de SFB (20% v/v). Estudios de nuestro laboratorio sugieren que la concentración de SFB en el medio de cultivo determina la velocidad de proliferación celular, es decir, a medida que la concentración de SFB aumenta también aumenta el porcentaje de células que están en activa proliferación, por lo tanto aumentaría la cantidad de células que pueden ser transducidas. Análisis del estado de ciclo celular de las MSC muestran que sólo una parte, 10% de la población, se encuentra en fase S/G2/M (Conget y col., 1999). Por lo tanto sólo esa pequeña proporción sería susceptible a ser transducida.

En resumen, las células susceptibles de ser transducidas con el vector retroviral RNL-Pol corresponderían a aquellas que expresan el receptor anfotrófico *Pit-2* y que se encuentran en activa proliferación durante el tiempo de infección, y que corresponden al 10% de la población total de MSC.

2. Efectos moleculares de presencia de la ribozima Rzpol1a1 sobre la expresión del gen col1a1.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que en MSC heterocigotas (C/T) para el SNP 3210 del gen col1a1 transducidas con el vector retroviral RNL-Pol, tanto 5 como 30 días post-infección se observa una disminución de aproximadamente 60% en los niveles de mRNA col1a1 respecto de las MSC sin infectar.

Se ha descrito que la unión de proteínas a secuencias en la región 3' no traducida del mRNA col1a1 estabilizan esta molécula (Stefanovic y cols., 1997), por lo cual con el corte producido por la ribozima Rzpol1a1 en esta región se perderían los sitios de unión a proteínas generando así una molécula más inestable, con lo cual disminuiría su vida media.

El método utilizado para cuantificar el mRNA col1a1 no permitía distinguir los transcritos generados a partir de cada alelo, ya que el cambio de una C por una T o viceversa en un amplicón de 125 pb no modifica la Tm. Sin embargo, previamente se había demostrado que *in vitro* utilizando independientemente, RNAs del alelo T o C, la ribozima Rzpol1a1 reconoce y degrada sólo el mRNA generado a partir del alelo T, dejando intacto el mRNA generado a partir del alelo C (Millington-Ward y cols., 1999). Estos antecedentes, junto con la observación que en el sistema celular la reducción en los niveles de mRNA col1a1 es cercana al 50%, y que los mRNA para otras moléculas (col1a2), no se ven alterados, indican que la disminución en los niveles de mRNA col1a1 se

puede atribuir a que Rzpol1a1 expresada *ex vivo* corta selectivamente el mRNA col1a1 generado por el alelo T, dejando el mRNA generado por el alelo C intacto.

Concordante con la disminución en la cantidad de mRNA, a los 5 días post-infección de las MSC con el vector retroviral RNL-Pol se observó una disminución de aproximadamente un 95% en la cantidad de colágeno I sintetizado *de novo* respecto de las MSC control. Por lo tanto, como era de esperar la disminución de la cantidad de mRNA col1a1 a corto plazo conlleva una disminución de la cantidad de proteína COL1A1 y esta una disminución del colágeno I ensamblado.

Sin embargo, disminuciones a nivel de mRNA a largo plazo no conllevan cambios en la expresión a nivel proteico, ya que a los 30 días post-infección no se observaron diferencias significativas entre la concentración de colágeno I sintetizado *de novo* en MSC transducidas vs. control.

Esta falta aparente de inhibición no puede atribuirse a un cese en la expresión del vector, ya que las células seguían siendo resistentes a G418, el cual se mantuvo en los cultivos durante todo el tiempo de experimentación para evitar la aparición de revertantes. Además el vector RNL-Pol incluye 2 cassettes de expresión para Rzpol1a1 con distintos promotores, ambos constitutivos y fuertes. Por último, como se discutió previamente, la disminución a nivel de mRNA col1a1 se mantuvo independientemente del tiempo y la criopreservación.

En consecuencia, el restablecimiento de los niveles normales de colágeno I a los 30 días post-infección de las MSC con el vector retroviral RNL-Pol podría atribuirse a un mecanismo compensatorio ante la drástica disminución de colágeno I observada inicialmente.

Entonces, a medida que comienza a disminuir la cantidad de mRNA col1a1 en las MSC transducidas y en consecuencia disminuye la concentración de COL1A1 y con ello colágeno I, se activaría algún mecanismo para que a partir de una menor cantidad de mRNA col1a1 se sintetice una mayor cantidad de proteína COL1A1, con lo cual se aseguraría la síntesis y secreción de una cantidad mínima fisiológica de colágeno I.

Hasta la fecha poco se conoce sobre la regulación post-transcripcional de la síntesis de colágeno I, sin embargo se ha demostrado que frente a pequeños cambios a nivel transcripcional mecanismos aún no claros permiten aumentar significativamente la cantidad de colágeno I sintetizado *de novo* (Stefanovic y cols., 1997).

Puesto que el ELISA-Sandwich utilizado en este trabajo no discrimina entre ambos propéptidos C-terminales, podría postularse que el colágeno I sintetizado en las MSC transducidas con RNL-Pol podría ser una mezcla de heterotrímeros (COL1A1)₂COL1A2 y homotrímeros (COL1A2)₃ como lo ha demostrado Alvares y cols. en 1999.

Para los objetivos de la terapia aquí propuesta, el restablecimiento de los niveles de colágeno I en MSC transducidas con el vector retroviral RNL-Pol

respecto de las MSC control es una ventaja ya que en células de pacientes con OI se eliminaría el mRNA col1a1 anómalo, sin embargo, los niveles de colágeno I no se verían afectados.

3. Consecuencias celulares de la expresión de Rzpol1a1 movilizada por el vector retroviral RNL-Pol.

Nuestros resultados demuestran que el potencial de diferenciación osteogénico y de proliferación en las MSC transducidas no se pierde. Dado que la diferenciación osteogénica depende de la expresión de colágeno I, es posible decir que el colágeno I sintetizado por las MSC transducidas corresponde a colágeno fisiológicamente normal. Lo cual es ventajoso si se piensa en aplicar esta estrategia con fines terapéuticos.

En condiciones de cultivo sin estímulo osteogénico sólo las MSC transducidas expresaron la enzima fosfatasa alcalina y frente al estímulo la expresión de esta enzima fue casi 6 veces mayor en las MSC transducidas respecto de MSC control. Estos resultados sugieren que la población de MSC transducidas podría corresponder a células comprometidas tempranamente al linaje osteogénico, seleccionadas en el momento de la infección con el vector retroviral en función de la expresión de un transportador de fosfato (*Pit-2*). El hecho de no haber observado mineralización de las MSC transducidas con RNL-Pol durante casi 6 meses que se mantuvieron en cultivo, indica que el compromiso hacia el linaje osteogénico debería ser un compromiso temprano.

Por lo tanto, la transducción de las MSC con vectores retrovirales conllevaría la selección de progenitores osteogénicos. En el caso de una terapia contra OI, este resultado sería una ventaja ya que la población infundida de MSC transducidas con el vector retroviral se diferenciaría principalmente a osteoblastos, principales células afectadas en la patología estudiada.

En conjunto todos los resultados presentados en esta tesis apoyan fuertemente que una estrategia como la descrita en este trabajo, para tratar pacientes con OI tipo II, III ó IV, en los cuales la mutación se encuentra en el mismo alelo que el SNP 3210 del gen *col1a1*, el protocolo sería el siguiente: extraer médula ósea del paciente, expandir *ex vivo* sus MSC, transducirlas con el vector RNL-Pol que contiene la secuencia codificante para la ribozima Rzpol1a1, e infundirlas intravenosamente al paciente. Nuestras observaciones nos permiten prever que los niveles de colágeno anómalo serían disminuidos manteniéndose los niveles de colágeno normal y luego de ser infundidas las MSC en el paciente serían redestinadas principalmente al tejido óseo.

CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes de esta tesis son:

1. la expansión de las MSC *ex vivo* es inofensiva y su infusión intravenosa no produce efectos secundarios en el receptor.
2. las MSC sobreviven a la infusión intravenosa y permanecen por al menos 13 meses en el receptor.
3. existe una biodistribución de las MSC infundidas intravenosamente en función del tiempo:
 - a corto plazo, las MSC se distribuyen en los tejidos hematopoyéticos y mesenquimáticos, permaneciendo sólo en los tejidos hematopoyéticos
 - a largo plazo, las MSC que permanecen en médula ósea y bazo, pero además son redestinadas mayoritariamente hacia otros tejidos, mesenquimáticos entre los cuales se encuentra el tejido óseo, y en menor frecuencia hacia otros tejidos no mesenquimáticos.

4. el 10% de la población de MSC expandidas *ex vivo* es transducida por vectores retrovirales. Esta población puede seleccionarse eficientemente en función de su resistencia a G418.
5. la expresión de la ribozima Rzpol1a1 provoca una disminución en los niveles de mRNA col1a1, lo cual sería producto del reconocimiento y corte selectivo por Rzpol1a1 del mRNA col1a1 generado por el alelo T.
6. la disminución en los niveles de col1a1 conlleva una disminución drástica en la cantidad de colágeno I sintetizado *de novo* sólo inicialmente y luego, la concentración de colágeno I se restablece a los niveles normales.
7. ni la expresión de Rzpol1a1, ni el evento de transducción con vectores retrovirales tiene efectos sobre los potenciales de proliferación, ni de diferenciación osteogénica de las MSC humanas.
8. aunque en esta tesis no se estudió la trasplantabilidad de MSC transducidas con el vector retroviral que codifica para la ribozima Rzpol1a1, en conjunto todos los resultados sugieren que dado que las MSC al ser trasplantadas son redestinadas finalmente al hueso y que es posible disminuir en ellas los niveles de mRNA col1a1 sin afectar los niveles de colágeno I, parecen ser el blanco celular adecuado para intervenciones de terapia génica para OI.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2001. *Molecular Biology of the Cell*. 4^a ed. Garland Science.
- Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI, Gerson SL. 1997. LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther* 8(12):1417-1427.
- Allers C, Rivera F, Neubauer S, Sierralta W, Minguell J, Conget P. 2003 Dynamics of human bone-marrow derived mesenchymal stem cells transplantation into adult unconditioned mice, via the intravenous route. *Enviado a Cells Tissues Organs*.
- Alvares K, Siddiqui F, Malone J, Veis A. 1999. Assembly of the type 1 procollagen molecule: selectivity of the interactions between the alpha 1(I)- and alpha 2(I)-carboxyl propeptides. *Biochemistry* 38: 5401-5411.
- Åström E, Söderhäll S. 2002. Beneficial effect of long term intravenous biphosphonate treatment of osteogenesis imperfecta. *Arch Dis Child* 86: 356-364.
- Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B and Caplan AI. 1999. Autologous Mesenchymal Stem Cell-Mediated Repair of Tendon Tissue *Eng* 5: 267-277.
- Beauchamp J, Morgan JE, Pagel CN, Patridge T. 1999. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 144: 1113-1122.
- Beck K, Boswell BA, Ridway CC, Bachinger HP. 1996. Triplex helix formation of procollagen type I can occur at the rough endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 271: 21566-21573.
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS Owen ME. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102: 341-351.
- Castells S, Colbert C, Chakrabarti C, Bachtell RS, Kassner EG, Yasumura S. 1979. Therapy of osteogenesis imperfecta with synthetic salmon calcitonin. *J Pediatr* 95(5 Pt 1): 807-811.
- Cech TR, Zaugg AJ, Grabowski PJ. 1981. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27: 487-496.
- Conget PA, Mingell JJ. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67-73.
- Conget PA, Minguell JJ. 2000. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol* 28: 382-390.

- Darr SC, Brown JW, Pace NR. 1992. The varieties of ribonuclease P. *Trends Biol Sci* 17: 178-182.
- Data Base of Human Type I and Type III Collagen Mutations <<http://www.le.ac.uk/genetics/collagen>> [consulta: 18 diciembre 2001]
- Dawson P, Marini JC. 2000. Hammerhead ribozymes selectively suppress mutant type I collagen mRNA in osteogenesis imperfecta fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 28(20): 4013-4020.
- Deak SB, van der Rest M, Prockop DJ. 1985. Altered helical structure of a monotrimer of alpha 1(I) chains synthesized by fibroblasts from a variant of osteogenesis imperfecta. *Coll Relat Res* 5(4): 305-313.
- Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. 1999. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 14: 700-709.
- Devine S, Bartholomew A, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Moseley A, Hoffman R. 2001. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 29: 244-255.
- Duzgunes N, Pretzer E, Simoes S, Slepishkin V, Konopka K, Flasher D, de Lima MC. 1999. Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus-infected cells. *Mol Membr Biol* 16(1): 111-118.
- Engelbert RH, Puijts HE, Beemer FA, Helders PJ. 1998. Osteogenesis imperfecta in childhood: treatment strategies. *Arch Phys Med Rehabil* 79 (12): 1590-1594
- Fell P, Hudson AJ, Reynolds MA, Usman N, Akhtar S. 1997. Cellular uptake properties of a 2'-amino/2'-O- methyl-modified chimeric hammerhead ribozyme targeted to the epidermal growth factor receptor mRNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7: 319-325.
- Fernández M, Simon V, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. 1997. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 20(4): 265-271.
- Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. 1993. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82: 66-76.
- Gao J, Dennis J, Muzic R, Lundberg M, Caplan A. 2001. The dynamic *in vivo* Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion. *Cells Tissues Organs* 169: 12-20.
- Grassi G, Marini JC. 1996. Ribozymes: structure, function, and potential therapy for dominant genetic disorders. *Ann Med* 28(6): 499-510.
- Gu JL, Nadler J, Rossi J. 1997. Use of hammerhead ribozyme with cationic liposomes to reduce leukocyte type 12-lipoxygenase expression in vascular smooth muscle. *Mol Cell Biochem* 172: 47-57.

- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard PJ, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5: 309-313.
- Hu WY, Fukuda N, Kotani M, Kanmatsuse K. 2002. Adenovirus-mediated transfer of ribozyme targeting platelet-derived growth factor A-chain mRNA inhibits growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 39(6):858-65.
- Huang S, Stupack D, Mathias P, Wang Y, Nemerow G. 1997. Growth arrest of Epstein-Barr virus immortalized lymphocytes by adenovirus-delivered ribozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8156-8161.
- Hudson AJ, Norman N, Ackroyd J, Akhtar S. 1999. Cellular delivery of hammerhead ribozymes conjugated to transferrin receptor antibody. *Int J Pharm* 182: 49-58.
- Ito T, Suzike A, Okabe M, Imai E, Hori M. 2001. Application of Bone Marrow-Derived Stem Cells in Experimental Nephrology. *Exp Nephrol* 9: 444-450.
- Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. 2001. Bone Marrow Is a Reservoir of Repopulating Mesangial Cells during Glomerular Remodeling. *J Am Soc Nephrol* 12: 2625-2635.
- Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop D. 1997. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III and IX), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 9: 300-315.
- Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. 1997. Factors required for bone marrow fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 97: 561-570.
- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Caplan AI. 1997. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother* 6(5): 447-455.
- Lehmann HW, Rimek D, Bodo M, Brenner RE, Vetter U, Worsdorfer O, Karbowski A, Muller PK. 1995. Hydroxylation of collagen type I: evidence that both lysyl and prolyl residues are overhydroxylated in osteogenesis imperfecta. *Eur J Clin Invest* 25(5): 306-310.
- Li KJ, Dilber MS, Abedi MR, Björkstrand B, Smith CIE, Garoff H, Gahrton G, Xanthopoulos KG. 1995. Retroviral-mediated gene transfer into human bone marrow stromal cells: Studies of efficiency and *in vivo* survival in SCID mice. *Eur J Haematol* 55: 302-306.
- Li M, Lonial H, Citarella R, Lindh D, Colina L, Kramer R. 1996. Tumor inhibitory activity of anti-ras ribozymes delivered by retroviral gene transfer. *Cancer Gene Ther* 3(4): 221-229.
- Liechty K, MacKenzie T, Shaaban A, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak D, Flake A. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6(11): 1282-1286.
- Lyngstadaas SP, Risnes S, Sproat BS, Thrane PS, Prydz HP. 1995. A Synthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel *in vivo*. *EMBO* 14: 5224-5229.

- Maniatis T, Reed R. 1987. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* 325: 673-678.
- Marx J, Allay J, Persons D, Noorer S, Hargrove P, Kelly P, Vanin E, Horwitz E. 1999. High-Efficiency Transduction and Long-Term Gene Expression with a Murine Stem Cell Retroviral Vector Encoding the Green Fluorescent Protein in Human Stromal Cells. *Hum Gene Ther* 10: 1163-1173.
- McBride DJ, Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. 1991. Self-assembly into fibrils of a homotrimer of type I collagen. *Matrix* 12(4): 256-263.
- Millington-Ward S, O'neill B, Kiang AS, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ. 1999. A mutation-independent therapeutic strategem for osteogenesis imperfecta. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 537-542.
- Morike M, Brenner RE, Bushart GB, Teller WM, Vetter U. 1992. Collagen metabolism in cultured osteoblasts from osteogenesis imperfecta patients. *Biochem J* 286: 73-77.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. 2000. Clonal Mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113: 1161-1166.
- National Institutes of Health. Osteoporosis and Bone Diseases~National Resource Center <<http://www.osteoporosis.gov>> [consulta: 4 abril 2002]
- Noda H, Onishi H, Sitoh K, Nakajima H. 2002. Growth hormone therapy may increase fracture risk in a pubertal patient with osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15(2): 217-218.
- Ojeda-Urbe M, Brunot A, Lenat A, Legros M. 1993. Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC collections. *Acta Haematol* 90(3): 139-143.
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. 1995. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4857-4861.
- Pereira RF, O'hara M, Laptev A, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ. 1998. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1142-1147
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284(5417): 1168-1170.
- Piersma AH, Ploemacher RE, Brockbank GM. 1983. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Haematol* 54: 285-290.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

- Primorac D, Rowe DW, Mottes M, Barišić I, Antičević D, Mirandola S, Gomez M, Kalajzić I, Kušec V, Glorieux F. 2001. Osteogenesis Imperfecta at the Beginning of Bone and Joint Decade. *Croat Med J* 42(4): 393-415.
- Raghunath M, Bruckner P, Steinmann B. 1994. Delayed triple helix formation of mutant collagen from patients with osteogenesis imperfecta. *J Mol Biol* 236: 940-949.
- Reddy JA, Low PS. 1998. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 15(6): 587-627
- Reyes M and Verfaillie CM. 1999. Turning marrow into brain: generation of glial and neuronal cells from bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 94 (S1): 377a.
- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. 2000. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88: 2961-2978.
- Seitz B, Baktanian E, Gordon EM, Anderson WF, LaBree L, McDonnell PJ. 1998. Retroviral vector-mediated gene transfer into keratocytes: in vivo effects of polybrene and protamine sulfate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236(8): 602-612.
- Sigurdsson ST, Eckstein F. 1995. Structure-function relationships of hammerhead ribozymes: From understanding to applications. *Trends Biotech* 13(8): 286-289.
- Sillence DO, Senn A, Danks DM. 1979. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 16: 101-116.
- Stefanovic B, Hellerbrand C, Holcik M, Briendl M, Aliebbhaber S, Brenner DA. 1997. Posttranscriptional regulation of collagen $\alpha(1)$ mRNA in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 17: 5201-5209.
- Toyoshima K, Vogt PK. 1969. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* 38: 414-426.
- Vieira NE, Marini JC, Hopkins E, Abrams SA, Yergey AL. 1999. Effect of growth hormone treatment on calcium kinetics in patients with osteogenesis imperfecta type III and IV. *Bone* 25(4): 501-505.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18: 1417-1426
- Wang H, Paul R, Burgeson RE, Keene DR, Kabat D. 1991. Plasma membrane receptors for ecotropic murine retroviruses require limiting accessory factor. *J Virol* 65:6468-6477.
- Weill Medical College of Cornell University. Congenital and Hereditary Bone Disorders, Osteogenesis Imperfecta (Brittle Bones, Fragilitas Ossium) <http://edcenter.med.cornell.edu/CUMC_PathNotes/Skeletal/Bone_02.html> [consulta: 15 marzo 2002]
- Willing MC, Pruchno CJ, Atkinson M, Byers P. 1992. Osteogenesis Imperfecta Type I is commonly due to a *COL1A1* null allele of type I collagen. *Am J Hum Genet* 51: 508-515.