



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Medicina 3139.

Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina de Valencia.

Tesis doctoral:

**OSTEOINDUCCIÓN MEDIANTE  
TERAPIA GÉNICA.**

**ALTERNATIVA AL INJERTO  
ÓSEO CONVENCIONAL.**

Santiago Soler Nomdedeu.

Licenciado en Medicina y Cirugía.

Especialista en cirugía plástica y reparadora.

Director de la tesis:

Dr. Severiano Marín Bertolín.

Enero 2022



## Agradecimientos:

*Al Dr. Ernesto Sanz, compañero y amigo, por su ayuda en la realización de todas las experiencias en cultivos celulares y animales estabulados*

*Al Dr. Juan Luis Lequerica (DEP), que me inició en el manejo de los cultivos celulares y en el uso de vectores virales*

*Al Dr. Severiano Marín, como director de la tesis*



# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>1. LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>2. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
3.1 TERAPIA GÉNICA.....	22
3.2 OSTEOINDUCCIÓN.....	24
3.3 TERAPIA GÉNICA APLICADA A LA OSTEOINDUCCIÓN .....	28
3.4 BIOLOGIA DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES .....	32
3.4.1. MORFOLOGIA.....	32
3.4.2. ESTRUCTURA GENOMICA.....	32
3.4.3. UNION DE LOS ADENOVIRUS A LOS RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR (CAR)...	34
3.4.4. REPLICACION COMPETENTE DE ADENOVIRUS.....	35
3.5 TERAPIA GÉNICA APLICADA A LA OSTEOINDUCCIÓN COMO ALTERNATIVA A LOS INJERTOS ÓSEOS. UTILIDAD EN CIRUGÍA PLÁSTICA .....	36
3.5.1. TECNICAS FUNDAMENTALES EN CIRUGÍA PLÁSTICA .....	36
3.5.2. TÉCNICAS DE RECONSTRUCCIÓN EN DEFECTOS ÓSEOS .....	38
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
5.1 OBJETIVO EXPERIENCIA I.....	47
5.2 OBJETIVO EXPERIENCIA II.....	47
5.3 OBJETIVO EXPERIENCIA III.....	47
5.4 OBJETIVO EXPERIENCIA IV.....	48
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
6.1. MATERIALES .....	51
6.1.1. ANIMALES.....	51
6.1.2. LINEAS Y CULTIVOS CELULARES.....	51
6.1.3 ADENOVIRUS .....	55
6.2 METODOS .....	56
6.2.1. EXPERIENCIA I.....	56
6.2.2. EXPERIENCIA II.....	64
6.2.3. EXPERIENCIA III.....	66
6.2.4 EXPERIENCIA IV: .....	67

<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
7.1. RESULTADOS DE EXPERIENCIA I. INFECCION DE FIBROBLASTOS POR EL ADENOVIRUS PORTADOR DEL GEN DE LA BMP-2 A CONCENTRACIONES DE CARGA VIRAL CRECIENTES. ...	73
7.2 RESULTADOS DE EXPERIENCIA II. INFECCION IN VIVO POR PARTICULAS VIRALES EN MÚSCULO. RATA LEWIS. ....	75
7.3. RESULTADOS EXPERIENCIA III: INFECCION IN VITRO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA CON EL ADENOVIRUS AxCAOBMP-2 Y POSTERIOR INYECCIÓN DE LAS CÉLULAS INFECTADAS EN EL MODELO ANIMAL.....	96
7.4 RESULTADOS EXPERIENCIA IV: APLICACIÓN DE TERAPIA GÉNICA EN UN DEFECTO ÓSEO A NIVEL DE LA DIAFISIS DEL FÉMUR EN RATA LEWIS. ....	100
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
8.1. UTILIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA COMO ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE FRACTURAS ÓSEAS DE DIFÍCIL CONSOLIDACIÓN Y DE DEFECTOS ÓSEOS EXTENSOS .....	113
8.2. INCONVENIENTES DE LOS ADENOVIRUS COMO VECTORES VIRALES EN APLICACIÓN CLÍNICA.....	115
8.3. NUEVOS VECTORES EN TERAPIA GÉNICA.....	116
8.4 APLICACIONES CLINICAS DE LA TERAPIA GÉNICA .....	119
8.5 TERAPIA GÉNICA APLICADA A LA CIRUGÍA RECONSTRUCTIVA. INTERÉS EN LAS ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS POR LA TERAPIA GÉNICA .....	122
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>127</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>131</b>

# 1. LISTA DE ABREVIATURAS



# 1. LISTA DE ABREVIATURAS

- ABP: proteína de unión viral.
- ADA: adenosin deaminasa.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- Adenovirus-X-Tet-ON: las células diana infectadas por este virus recombinante expresan la proteína Tet-On 3G y contienen un gen de interés bajo el control del promotor TRE 3 G de tal forma que expresan dicha proteína sólo cuando se cultiva en presencia de doxiciclina. En definitiva, la expresión del gen deseado está regulado por la concentración en el medio de doxiciclina.
- Adv BMP-2: adenovirus portador del gen de la BMP-2.
- Adv BMP-6: adenovirus portador del gen de la BMP-6.
- AP: fosfatasa alcalina.
- AxCAOBMP-2: adenovirus recombinante con el gen de la BMP-2
- AxCaLac-Z: adenovirus recombinante con el gen Lac-Z. Las células infectadas se tiñen positivamente con la tinción x-gal para la beta-galactosidasa.
- ARN: ácido ribonucleico.
- BMP: proteína morfogenética productora de hueso (Bone Morphogenetic Protein)
- CAR: receptores de superficie celular.
- CD4: cúmulo de diferenciación 4 (Cluster of Differentiation 4). Glucoproteína característica de algunos linfocitos T helper o linfocitos T4.
- CD8: Cúmulo de diferenciación 8 (Cluster of Differentiation 8). Glucoproteína característica de algunos linfocitos T o linfocitos citotóxicos y que participa en la adhesión de los linfocitos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad HLA tipo I (human leukocyte antigen).
- CO<sub>2</sub> : dióxido de carbono.
- CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor).
- GFP: proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein).

- HEPES: tampón HEPES.
- HEK 293
- IFG: factor de crecimiento tipo insulina (Insulin-like Growth Factor).
- ITR: Secuencias terminales de repetición invertidas: se trata de unas secuencias cortas en el ADN viral a ambos lados del genoma viral y que constituyen el origen de la replicación viral.
- kDa: kilodalton. Unidad de masa molecular equivalente a 1000 daltons. Un Dalton es la décima parte del átomo de carbono y equivale a  $1,66 \times 10^{-24}$  gr.
- MLP: Promotor tardío mayor. Inicio de los genes tardíos del genoma viral.
- MOI: Multicply Of Infection.
- mRNA: RNA mensajero.
- MSC: cultivo de células musculares.
- NCS: Newborn Calf Serum. Medio de cultivo.
- NIH 3T3: línea celular de fibroblastos de embrión de ratón (mouse embryo fibroblast cell line).
- nm: nanomicras.
- PBS: tampón fosfato salino (Phosphatase Buffered Saline).
- PDGT: factor de crecimiento plaquetar (Platelet- Derived Growth Factor).
- pTP: proteína terminal viral.
- RCA: replicación competente de los adenovirus recombinantes.
- RGD: secuencia específica de arginina-glicina-aspartato en el pentón base de la cápsula vírica que interactúa con las integrinas de la superficie celular.
- rhBMP2: proteína morfogenética ósea tipo 2 recombinante.
- rhBMP4: proteína morfogenética ósea tipo 4 recombinante.
- rhBMP7 u OP1: proteína morfogenética ósea tipo 7 recombinante.
- SoX9: factor proteico que induce hacia la diferenciación condrogénica.
- TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta (Transforming Growth Factor  $\beta$ ).
- VEGF: factor de crecimiento endotelial (Vascular Endotelial Growth Factor).

## 2. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS



## 2. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. EXPERIENCIA I. TEST DE INFECTIVIDAD. Imagen del efecto citopático de los adenovirus en las células empaquetadoras HEK 239. ....	58
Figura 2. EXPERIENCIA I. TEST DE INFECTIVIDAD. Células NIH-3T3 con la tinción X-gal a las 72 h de la infección con los adenovirus AxCaLac-Z.....	59
Figura 3. EXPERIENCIA I. Serie de fibroblastos infectados con el adenovirus AxCaLac-Z. La superior corresponde al grupo 0 (grupo control) y la inferior al grupo infectado con 100 µl del primer stock viral de AxCaLac-Z. ....	62
Figura 4. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. GRUPO CONTROL. Histología de las muestras tomadas del muslo izquierdo (grupo control) en las que se infectan las células musculares sólo por el adenovirus GFP. El corte histológico muestra fibras musculares normales. ....	65
Figura 5. EXPERIENCIA I. Western Blotting a las 48 h. ....	73
Figura 6. EXPERIENCIA I. Western Blotting a los 5 días.....	74
Figura 7. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. GRUPO CONTROL. Histología de tejido muscular infectado con adenovirus GFP. Miocitos de aspecto normal con tinción hematoxilina-eosina. ....	76
Figura 8. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. GRUPO CONTROL. Miocitos de aspecto normal con tinción hematoxilina-eosina.....	76
Figura 9. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Histología del tejido muscular infectado por el adenovirus AxCAOBMP-2 en las muestras de la primera semana post-infección. Junto a los miocitos del tejido muscular se aprecia una proliferación de fibroblastos en el punto de inyección.....	77
Figura 10. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina del tejido muscular del muslo derecho. Muestras tomadas a la semana tras la infección por el adenovirus AxCAOBMP-2. Se observa una gran proliferación de células de aspecto fibroblástico que se intercalan entre las musculares. ....	78
Figura 11. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina del tejido muscular a la semana de la infección por el adenovirus AxCAOBMP-2. Infiltración del tejido muscular por tejido fibroblastos con la aparición de yemas conectivo-vasculares.....	79
Figura 12. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Detalle de un yema conectivo-vascular. Proliferación similar a lo que sucede en un tejido inflamatorio o de granulación .....	79
Figura 13. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina del tejido muscular a la semana de la infección por los adenovirus AxCAOBMP-2. Miocitos infiltrados por células de aspecto fibroblástico y proliferación de yemas vasculares. ....	80
Figura 14. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Detalle del tejido muscular infiltrado por las yemas vasculares del tejido inflamatorio.....	80
Figura 15. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Histología con hematoxilina-eosina del tejido muscular a las dos semanas de la infección con los adenovirus AxCAOBMP-2. Aparición de condrocitos que nos recuerdan un patrón de osificación endocondral. ....	81
Figura 16. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico donde se aprecia la proliferación de condrocitos y las primeras trabéculas óseas siguiendo un patrón de osificación endocondral.....	82

Figura 17. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Proliferación de condrocitos y aparición de trabéculas óseas siguiendo un patrón de osificación endocondral. ....	82
Figura 18. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Agrupaciones de condrocitos que formarán los núcleos de osificación endocondral. ....	83
Figura 19. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Condrocitos y focos de osificación endocondral. Formación de trabéculas óseas. ....	83
Figura 20. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle de la aparición en el tejido conectivo de formaciones de condrocitos que darán lugar a los núcleos de osificación endocondral. ....	84
Figura 21. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle las formaciones de condrocitos origen de los núcleos de osificación endocondral. ....	84
Figura 22. RADIOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica del muslo infectado con AxCAOBMP-2 a las 3 semanas. ....	85
Figura 23. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Histología del muslo infectado con AxCAOBMP-2 a las 3 semanas Se puede distinguir tejido muscular, tejido conectivo y la formación de trabéculas óseas a partir de las agrupaciones de condrocitos.....	86
Figura 24. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Fibras musculares y tejido conectivo con diferenciación de los fibroblastos hacia condrocitos y la aparición de trabéculas óseas a partir de los condrocitos. ....	87
Figura 25. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Formación de trabéculas óseas a partir de los condrocitos.....	87
Figura 26. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico de osificación endocondral. Formaciones de condrocitos que se diferencian hacia tejido óseo. ....	88
Figura 27. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Formaciones de condrocitos en el tejido conectivo que se diferencian hacia tejido óseo y adquieren un patrón trabecular.....	88
Figura 28. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Tejido conectivo con fibroblastos. Condrocitos y su diferenciación hacia osteoblastos formadores de tejido óseo que se dispone en trabéculas. ....	89
Figura 29. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Tejido conectivo con gran cantidad de fibroblastos y algunas células musculares y un núcleo de osificación endocondral. ....	89
Figura 30. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica a las 3 semanas del animal que se sacrificará a las 6 semanas. Osificación en el cuádriceps del muslo infectado con el adenovirus AxCAOBMP-2. ....	90
Figura 31. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica a las 6 semanas del animal . Osificación en el cuádriceps que ya se apreciaba a las 3 semanas. A las 6 semanas hay mayor extensión de la osificación y mayor densidad radiológica en el área de osificación del cuádriceps infectado. ....	91
Figura 32. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Histología de las muestra del muslo derecho del animal sacrificado a las 6 semanas con tinción	

hematoxilina-eosina. Tejido óseo (trabéculas de hueso esponjoso) intercaladas en el tejido muscular.....	92
Figura 33. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Trabéculas óseas y elementos medulares entre las trabéculas del hueso esponjoso.....	93
Figura 34. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico de las trabéculas óseas. Osteocitos en la matriz mineral que ha sido descalcificada para su tinción con hematoxilina-eosina.....	93
Figura 35. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Trabéculas óseas y espacios de médula ósea sin elementos hematopoyéticos.....	94
Figura 36. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Tejido muscular junto a un área de proliferación de condrocitos y un área de tejido óseo esponjoso (osificación endocondral). ....	94
Figura 37. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico de las trabéculas óseas del hueso esponjoso osteoinducido.....	95
Figura 38. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Trabéculas óseas de hueso esponjoso osteoinducido. ....	95
Figura 39. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO DE CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica del muslo derecho a las 4 semanas: cuádriceps inyectado con células previamente infectadas con los adenovirus AxCAOBMP-2. Área de osificación en el tercio distal del cuádriceps. ....	96
Figura 40. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CONTROL Imagen del muslo izquierdo: inyección con células infectadas con el adenovirus GFP. No se evidencia osificación en el punto de inyección en el cuádriceps. ....	97
Figura 41. HISTOLOGIA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CON CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina para las muestras del lado derecho. Cuádriceps con inyección de células infectadas con el adenovirus AxCAOBMP-2. Tejido muscular con áreas de osificación.....	98
Figura 42. HISTOLOGIA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CON CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Detalles histológicos de las áreas de osificación de las muestras tomadas de los muslos derechos correspondientes a los puntos de inyección con las células infectadas por los adenovirus AxCAOBMP-2. Imágenes de trabéculas óseas intercaladas entre células con aspecto de fibroblastos.....	99
Figura 43. HISTOLOGIA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CON CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Imagen de detalle de trabéculas óseas intercaladas células con aspecto de fibroblastos. ....	99
Figura 44. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen radiológica a las 3 semanas del fémur de rata del grupo control: no consolidación del defecto en la diáfisis del fémur. ....	100
Figura 45. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen radiológica a las 3 semanas del fémur de otro animal del grupo control. Fijación con aguja sin evidencia de consolidación en el defecto óseo.....	101
Figura 46. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica también a las 3 semanas pero correspondientes al fémur un animal del grupo que se aplicó el adenovirus AxCAOBMP-2. Se aprecia formación ósea en el defecto de la diáfisis femoral. ....	102
Figura 47. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen también correspondiente a las 3 semanas del fémur de un animal que se trató con el	

adenovirus AxCAOBMP-2. Se evidencia formación de hueso en el defecto diafisario femoral. .....	103
Figura 48. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica a las 3 semanas del fémur de un tercer animal correspondiente al grupo tratado con el adenovirus AxCAOBMP-2. Se evidencia también consolidación en el defecto diafisario.....	104
Figura 49. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica a las 6 semanas de uno de los animales del grupo tratado con el adenovirus AxCAOBMP-2 . Se aprecia consolidación del fémur a pesar de la retirada del KW de fijación.	105
Figura 50. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen de control a las 6 semanas una de las ratas del grupo tratado con el adenovirus AxCAOBMP-2. Se evidencia consolidación del defecto diafisario femoral y osificación del cuádriceps. ....	106
Figura 51. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen a las 6 semanas del mismo animal del grupo tratado con el adenovirus AxCAOBMP-2 en el que se ha retirado la fijación. ....	107
Figura 52. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen a las 6 semanas del fémur de una de las ratas correspondientes al grupo control que no fue tratada con los adenovirus AxCAOBMP-2. No consolidación en el defecto óseo del fémur.....	108
Figura 53. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen a las 6 semanas del fémur de otra de las ratas del grupo control que no fue tratada con los adenovirus AxCAOBMP-2. No consolidación del defecto óseo femoral.....	109
Figura 54. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen a las 6 semanas del fémur de otra de las ratas del grupo control que no fue tratada con los adenovirus AxCAOBMP-2 . No consolidación ósea en el defecto diafisario femoral. ....	110

## **3. INTRODUCCIÓN**



### 3. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo experimental surge como respuesta al reto al que se enfrenta la práctica clínica diaria de la cirugía plástica reparadora, a saber, la resolución de defectos tisulares, simples o complejos. Hasta la fecha, el principio básico para la solución de estas pérdidas de tejidos es la utilización de otros tejidos y su transferencia a una nueva localización anatómica. En este sentido, los principales recursos terapéuticos disponibles son los injertos y los colgajos.

El mejor conocimiento sobre la diferenciación celular y la utilidad de las células indiferenciadas pluripotenciales, capaces de diferenciarse hacia distintos tejidos, junto con la utilización de técnicas de modificación genética celular nos han abierto en los últimos años nuevas opciones terapéuticas en este campo.

Estas nuevas terapias dejarían atrás la solución clásica de transferir un tejido de una localización a otra, para aplicar un nuevo concepto radicalmente distinto. Se trataría de modificar genéticamente una determinada población celular e inducir en esta una determinada diferenciación y que el tejido neoformado sirva para solucionar el déficit tisular.

En concreto, en el presente trabajo experimental se ha recurrido a la modificación genética mediante terapia génica para favorecer la osteoinducción de tejido óseo autólogo y su aplicación para la resolución de defectos óseos como alternativa al tratamiento clásico con injertos y colgajos de hueso.

### 3.1 TERAPIA GÉNICA

La terapia génica se puede definir como la transferencia de material genético ajeno a las células de un individuo, resultando en beneficio para dicho individuo.

El desarrollo de la genética molecular durante los últimos años y, especialmente, toda la información derivada del Proyecto Genoma Humano, ha propiciado que podamos afrontar la modificación directa de las alteraciones genéticas y la utilización de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos.

La terapia génica es una nueva modalidad terapéutica surgida a finales de los años 80, y que puede definirse como la transferencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN) con fines terapéuticos.

Toda estrategia de terapia génica se basa, por tanto, en la transferencia de ácidos nucleicos al interior de un grupo celular, lo que se conoce como transferencia génica. Estas células pueden ser células enfermas cuyo daño se pretende reparar, o bien células normales que se modifican genéticamente para que sean las efectoras de una determinada acción terapéutica, por ejemplo, sintetizar una proteína concreta. Por lo tanto, todo sistema de terapia génica es análogo a un sistema de transporte, en el que hay un agente que es transportado y un vehículo de transporte. En nuestro caso, el agente transportado es un ácido nucleico y el vehículo encargado de llevarlo al interior de las células diana se llama vector. Según el modo de hacer llegar el vector conteniendo el agente terapéutico a las células diana, es ya clásica la distinción entre terapia génica ex vivo y terapia génica in vivo.

En el primer caso, la administración del vector se realiza fuera del cuerpo: se obtiene una biopsia del órgano de interés, se expanden las células mediante cultivo celular y se ponen en contacto con el vector mientras están siendo cultivadas. Esto hace posible seleccionar las células que hayan sido modificadas genéticamente y reintroducirlas en el paciente.

En la administración in vivo, el vector terapéutico se administra directamente al individuo enfermo por cualquiera de las vías habituales, como por ejemplo intramuscular, oral o intravenosa). Se trataría de escoger aquella que nos permita alcanzar la máxima eficacia terapéutica.

En la terapia génica utilizamos vectores para la administración del gen responsable de codificar una determinada proteína en las células diana, de modo que, tras la expresión del gen, se produce la proteína. (1) De este modo, en vez de alterar el fenotipo de la enfermedad mediante el uso de agentes que interactúen con las proteínas, la terapia génica permite la modificación de genes específicos consiguiendo así el tratamiento de la enfermedad.

Los descubrimientos científicos que demuestran que los virus son capaces de transferir material en células infectadas son el principio básico de la terapia génica. Los primeros experimentos de terapia génica se desarrollaron en los años 80 con la transferencia del gen ADA o adenosin deaminasa en las células precursoras de médula ósea de rata para corregir el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada.

Los primeros ensayos clínicos en humanos se realizaron en los años 90 para corregir la misma deficiencia. (2-5)

## 3.2 OSTEOINDUCCIÓN

Lo osteoinducción es la capacidad de inducir la formación de tejido óseo en el seno de un defecto óseo o en un tejido no óseo. (6–8) Hay que distinguirlo de la osteoconducción que es la capacidad de determinados biomateriales, como por ejemplo la hidroxiapatita, que permiten el crecimiento del tejido óseo a su través pero no inducen la transformación de tejido no óseo en tejido óseo.

Los primeros estudios con hueso desmineralizado demostraron la capacidad osteoinductiva del mismo. (9–11) El estudio de la capacidad osteoinductiva del hueso desmineralizado reveló que estaba relacionada con la presencia en el mismo de una serie de proteínas, a saber, las proteínas morfogenéticas productoras de hueso (BMP). Las BMP son factores de crecimiento de la superfamilia TGF- $\beta$ .

Las BMP se descubrieron cuando Urist y sus colaboradores demostraron que al implantar matriz ósea desmineralizada en bolsillos submusculares y subcutáneos de roedores se inducía la formación de hueso ectópico. Este proceso se denominó osteoinducción. (12,13) El análisis del hueso desarrollado en estos bolsillos reveló un proceso similar al desarrollo del hueso embrionario y a la reparación endocondral de las fracturas con la aparición de un molde de cartílago, su sustitución posterior por hueso y la formación de matriz ósea hematopoyética. El aislamiento de las fracciones proteicas responsables de la migración y diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales condujeron al descubrimiento de las BMP.

Hasta la fecha, se han identificado 15 isoformas diferentes de BMP, cuyas isoformas se subdividen en 3 subfamilias en base a la similitud de las secuencias de aminoácidos:

- La familia de las BMP3 (con una identidad de secuencia del 43% al 49%),
- La familia BMP2 y BMP4 (con un 92% de identidad de secuencia)
- La familia BMP5, BMP6, BMP7 y BMP8 (con un 89% de identidad de secuencia).

Por otro lado, la BMP1 es una proteína procolágeno C que no está relacionada con las otras familias de BMP y no tiene propiedades osteoinductivas.

Así pues, aunque se puede osteoinducir la formación de hueso autólogo mediante la utilización de diversos factores de crecimiento, las BMP son los más conocidos. (14) Otros factores de crecimiento han demostrado a nivel experimental su capacidad osteoinductiva como factores de crecimiento de la superfamilia TGF- $\beta$ , factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factores de crecimiento tipo insulina (IGF).

De todos ellos, los de mayor capacidad osteoinductiva son las BMP2, BMP4 y BMP7. Las BMP endógenas están implicadas en los mecanismos moleculares de la reparación de las fracturas que desencadenan la migración de las células mesenquimales, la proliferación y la diferenciación dirigidas a la formación del callo y reparación ósea. (15–23)

Se ha intentado producir en laboratorio estas proteínas para su potencial aplicación clínica. Son las BMP exógenas. Formas recombinantes de BMP2

humana (rhBMP2), BMP4 humana (rhBMP4), BMP7 humana (rhBMP7) también conocida como OP-1. Todas ellas son producidas en el laboratorio mediante la utilización de sistemas de expresión de proteínas recombinantes. (24–32)

Por razones históricas, prácticas y económicas, los sistemas de expresión con *E.coli* han sido los de elección para la expresión de proteínas heterólogas. Pero la expresión en células humanas es la mejor opción para obtener proteínas humanas con las mismas características de las proteínas nativas. Se utiliza un virus recombinante que aporta el gen de la proteína que queremos producir y que infecta las líneas celulares, como por ejemplo líneas celulares humanas tipo 293, para la producción de las proteínas recombinantes y su posterior purificación para su aplicación clínica. (33)

Se han usado un gran número de vehículos o *carriers* para administrar las BMP al sitio donde se pretende que ejerzan su acción osteoinductiva, incluyendo esponjas de colágeno absorbibles, varias mezclas de poli-L-láctico/glicólico, hidroxiapatita, hidrogeles, fosfato tricálcico poroso y carbonato cálcico, entre otros.

Sin embargo la aplicación efectiva de las proteínas BMP exógenas en cirugía reconstructiva de defectos óseos tiene unas limitaciones importantes y no consigue una adecuada respuesta osteoinductiva sobre todo en situaciones clínicas relacionadas con la aplicación en un tejido local con propiedades biológicas poco adecuadas, como vascularización pobre, fibrosis, lechos irradiados o escasez o ausencia de hueso remanente.

Para que estas proteínas sean eficaces e induzcan la formación de hueso autólogo deben llegar a las células que queremos que se diferencien hacia tejido óseo en cantidad suficiente y durante el tiempo necesario. Con la aplicación directa de las proteínas en la zona del defecto óseo esta neoformación tisular no es posible.

### 3.3 TERAPIA GÉNICA APLICADA A LA OSTEOINDUCCIÓN

Mediante la terapia génica, a través de un vector, incorporaríamos a las células diana el gen que induzca la producción de la proteína deseada. Se trataría de que dicha producción se mantenga en el tiempo y alcance una cantidad suficiente para que tenga una capacidad de osteoinducción efectiva.

Existen una gran variedad de vectores con sus ventajas e inconvenientes. Los kits de construcción de estos vectores se producen por distintos laboratorios e incorporan el gen deseado al vector para su posterior uso. Los vectores usados en terapia génica pueden ser no-virales, como liposomas o polímeros, o virales, como adenovirus, lentivirus o retrovirus.

Los vectores virales utilizan la biología natural de un virus para suministrar información genética a las células. Los virus usados son virus recombinantes a los que se les ha incorporado el gen deseado y están modificados de tal forma que tienen una replicación incompetente para interrumpir la propagación del virus. (34,35)

Dependiendo del vector los genes suministrados pueden ser expresados de forma transitoria o de forma estable por la célula. La expresión transitoria se produce cuando el transgen se aporta de forma episomal al núcleo de la célula. Cuando la célula se divide la expresión disminuye rápidamente. Por el contrario la expresión estable se produce en las células por vectores que insertan el transgen en los cromosomas de la célula del huésped.

Los adenovirus son uno de los vectores virales más usados y tienen un gran uso potencial como método rutinario de transfección. Pueden ser producidos a títulos elevados y pueden transducir el gen a una gran variedad de

tipos celulares con alto nivel de efectividad. El desarrollo de adenovirus recombinantes nos permite la infección de muchas líneas celulares diferentes y de tejidos de origen humano y no humano. (36–40)

El mecanismo de entrada del virus en la célula es a través de la unión a receptores de superficie celular (CAR) y  $\alpha$ -integrinas. Los adenovirus recombinantes penetran en las células pero no se replican ya que el gen esencial E1 está ausente para su replicación. Esta infección abortiva puede usarse como sistema de transfección para introducir un gen funcional en las células

Entre las ventajas de usar adenovirus para introducir genes dentro de las células se contarían las siguientes:

- a) Es rápido, simple y no requiere ningún equipo especial
- b) Al contrario de otros métodos es bien tolerado, de hecho la viabilidad postinfección es del 100%. Así pues los adenovirus tienen la capacidad para transferir material genético en las células sin, aparentemente, efectos tóxicos.
- c) La mayoría de los tipos celulares pueden ser infectados.
- d) La expresión genética se puede analizar unas pocas horas después de la infección.
- e) Más de una proteína se puede expresar simultáneamente. Por ejemplo, usando un adenovirus recombinante GFP se facilita la visualización y determinación del número de células infectadas expresando la proteína deseada o para verificar el tejido concreto que ha sido infectado.

Todo ello convierte a los adenovirus en un buen vector para transgenes con aplicaciones osteoinductivas (41–51).

No obstante también tienen sus desventajas. Una de las limitaciones de los adenovirus como vector es su alta inmunogenicidad en las aplicaciones in-vivo. (52–58) La modificación de células ex-vivo puede reducir la inmunogenicidad aunque las proteínas virales del vector pueden expresarse en las células transplantadas y provocar una respuesta inmune significativa. (59–63) Se trata por tanto de estimular la osteoinducción mediante la utilización de una población de células que van a ser modificadas genéticamente previamente ex-vivo y posteriormente trasplantadas para que las células actúen como vehículo para suministrar las proteínas osteoinductivas (BMP).

Respecto al tipo celular que va a ser modificado genéticamente, deberían tener las siguientes características:

- a) Fácil obtención.
- b) Capacidad para expansión ex-vivo.
- c) Capacidad para producir el transgen suministrado por el vector.
- d) Capacidad para incorporarse al tejido nativo del receptor.

Se han usado células osteogénicas genéticamente modificadas como células precursoras de osteoblastos y osteoblastos (64), para su trasplante en el tejido diana donde queremos osteoinducir la formación de hueso autólogo. También se han utilizado, con la misma finalidad, células no-osteogénicas genéticamente modificadas, como fibroblastos y líneas celulares.

Las líneas celulares no tienen utilidad clínica porque el sistema inmune de huésped las elimina. (65) Las células autólogas tienen mayor utilidad clínica, ya que pueden ser reintroducidas en el huésped sin respuesta inmune.

Podemos concluir por tanto que en terapia de regeneración ósea se han usado células modificadas genéticamente de origen osteogénico como células de médula de donantes (66–69) y, dentro de estas, células mesenquimales pluripotenciales. (70–75) Del mismo modo, también se han usado células de origen no osteogénico: fibroblastos (76) y mioblastos (77–81). Estas poblaciones celulares modificadas genéticamente mediante terapia génica se convierten en osteogénicas. Estos tipos celulares de origen no osteoblástico, cuando se modifican genéticamente, adquieren la capacidad de formación ósea tanto ectópica como ortotópica en defectos óseos.

En el presente trabajo experimental se han empleado adenovirus cedidos por los doctores Okubo y Besho del Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Universidad de Kioto en Japón, quienes nos remitieron el adenovirus AxCAOBMP-2, que es el adenovirus recombinante que lleva el gen de la *BMP-2*, y el adenovirus AxCaLacZ para los grupos control.

## 3.4 BIOLOGIA DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES

Los adenovirus se aíslan de distintas especies de aves y mamíferos. Hay más de 40 serotipos conocidos de adenovirus humanos divididos en 6 subgrupos, dependiendo entre otras cosas de su potencial oncogénico en roedores y su semejanza en la secuencia de DNA. Los serotipos 2 y 5 son los más estudiados y, consecuentemente, desarrollados como vectores para terapia génica.

### 3.4.1. MORFOLOGIA

Los adenovirus son virus icosaédricos sin envoltura. Su cápsula se compone de 240 hexones y 12 pentones. Las subunidades pentagonales se encuentran en los 12 vértices del icosaedro mientras los hexones forman las caras de la cápsula. Proyectando desde cada pentón hay una proteína fibrilar terminada con una punta globular conocida como “knob domain”. El diámetro de la cápsula del adenovirus es de 80-90 nm y de, aproximadamente, 140 nm cuando se incluye la proteína fibrilar.

### 3.4.2. ESTRUCTURA GENOMICA

Los adenovirus contienen un DNA lineal, no segmentado y de doble cadena. El tamaño de genoma varía de 30 a 40 kDa. Todos los adenovirus humanos comparten algunas características, por ejemplo, que el genoma es flanqueado a cada lado por secuencias de terminales de repetición invertidos (ITR) que actúan como origen de la replicación. Cada ITR es denominado específicamente como izquierdo o derecho. Localizado cerca del ITR izquierdo se encuentra la señal de encapsulación, requerida para el empaquetado del genoma vírico dentro de la cápsula. El resto del genoma puede ser simplemente dividido en regiones que

se expresan en periodos tempranos y otras que se expresan en periodos tardíos del ciclo de infección.

Así pues, hay regiones de transcripción temprana y tardía. Las regiones de transcripción temprana son E1 (E1a, E1b), E2 (E2a, E2b), E3 y E4. La primera región que se transcribe durante la infección viral es E1a, que produce dos proteínas mayores requeridas para la replicación viral y para la regulación de la transcripción.

Al igual que E1a, E1b se une resultando en la producción de dos proteínas mayores necesarias para bloquear el transporte del mRNA del huésped y estimulando el transporte del mRNA viral.

La primera generación de los adenovirus recombinantes se produjo mediante la eliminación del E1a y la gran mayoría de la región E1b, convirtiendo a los virus en defectivos o no replicantes. Mediante la utilización de una línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293) se pueden complementar las regiones de transcripción ausentes y replicar adenovirus recombinantes defectivos hasta títulos altos. Estas células HEK 293 que permiten la replicación de los virus defectivos se denominan células empaquetadoras.

Los adenovirus producidos en HEK 293 pueden infectar otras células pero no pueden replicarse si las células no expresan los genes E1. Sin embargo, se ha demostrado in vitro que hay dos excepciones a esta regla general: la ausencia de E1 puede ser obviada si se usa un título muy elevado de virus o si se aprecia actividad E1-like en una línea celular infectada.

Por otra parte, la región E2a codifica la proteína de unión de 72 kDa ABP, mientras la región E2b codifica la DNA polimerasa y la proteína terminal pTP.

La región E3 no es esencial para el crecimiento de adenovirus en los cultivos tisulares. La mayoría de las proteínas E3 están involucradas en modular la respuesta inmune de las células infectadas.

La región E4 codifica al menos 6 proteínas de las cuales sólo E4 orf6 es esencial para el crecimiento de los virus en los cultivos tisulares.

Después del establecimiento de la replicación del DNA viral, el modelo de transcripción cambia radicalmente desde los genes de transcripción temprana a los genes de transcripción tardía.

Los genes tardíos se transcriben desde el promotor tardío mayor (MLP) y codifica sobre todo las proteínas estructurales del virión. Esto incluye el pentón proteico codificado por la región de transcripción L2, el hexón proteico codificado por el L3 y la proteína fibrilar codificada por el L5. Los RNAs que se requieren para la traslocación de la región tardía de transcripción viral se expresan también tardíamente durante la infección.

#### 3.4.3. UNION DE LOS ADENOVIRUS A LOS RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR (CAR)

La unión y entrada de los adenovirus en las células diana está mediado por dos receptores específicos de superficie celular. Primero el “knob domain”, localizado en el extremo de las fibras de los adenovirus se une a los receptores para coxsakie y adenovirus. Aislada, recientemente, esta proteína transmembrana de 48 kDa actúa como un receptor específico de alta afinidad por coxsakie y adenovirus subgrupo C. El segundo paso constituye la internalización mediante la interacción de una RGD específica (arginina-glicina-aspartato) localizada en el pentón base con las integrina alfa1beta3 o alfa1beta5 de la superficie celular.

Una vez en el interior de la célula, el pentón base media la lisis de la membrana endosomal liberando el contenido del endosoma en el citosol. El virión es desmontado mediante el proceso de internalización y entrada en el núcleo. La transcripción, replicación y empaquetamiento viral tiene lugar íntegramente dentro del núcleo de las células infectadas.

#### 3.4.4. REPLICACION COMPETENTE DE ADENOVIRUS

Un problema a tener en cuenta cuando se trabaja con adenovirus es la posibilidad de que ocurra una replicación competente de los adenovirus (RCA) en una población de adenovirus de replicación defectiva. La RCA puede producirse como resultado de un doble cruce entre secuencias homólogas solapadas presentes en el adenovirus recombinante y el genoma de las células HEK 293.

Este hecho tiene como resultado la pérdida del gen trans y su reemplazamiento por la región E1, así permitiendo la replicación competente del adenovirus sin la necesidad de una línea celular complementaria. Los stocks de adenovirus contienen una cantidad creciente de replications competentes después de un incremento en el número de pases en las células HEK 293. Para evitar la aparición de adenovirus conteniendo regiones E1, es necesario establecer un stock puro de adenovirus recombinantes. Esta estrategia ayuda a reducir el riesgo de RCA.

## 3.5 TERAPIA GÉNICA APLICADA A LA OSTEOINDUCCIÓN COMO ALTERNATIVA A LOS INJERTOS ÓSEOS. UTILIDAD EN CIRUGÍA PLÁSTICA

### 3.5.1. TECNICAS FUNDAMENTALES EN CIRUGÍA PLÁSTICA

La cirugía plástica surge como una especialidad quirúrgica encargada de la reconstrucción de defectos que afectan a diferentes tejidos, y de la modificación de la forma y aspecto de los mismos. (82,83)

Fundamentalmente consiste en la movilización de tejidos con el fin de reparar defectos tisulares o mejorar la forma y función de diferentes áreas. Para ello cuenta con una serie de técnicas básicas.

La transferencia de tejidos se basa siempre en la viabilidad de éstos. Es pues necesario que el tejido transferido resulte vascularizado, bien a partir de la zona receptora, bien llevando su propio aporte vascular. Si el volumen del tejido transferido es suficientemente pequeño, puede tolerar un período de supervivencia avascular por imbibición plasmática hasta que se revasculariza desde el lecho. Estamos ante un injerto. Cuando la vascularización del tejido transferido no depende del lecho receptor sino que se aporta con el propio tejido, estamos ante un colgajo.

Así, un injerto es una pieza de tejido de volumen limitado que colocamos en un lecho bien vascularizado y que esperamos se revascularice a partir del mismo, esto es, que prenda. Un colgajo, por el contrario, es una porción de tejido que lleva su propia vascularización. Si añadimos los implantes de materiales sintéticos biocompatibles, tenemos las tres técnicas básicas en cirugía plástica.

Prácticamente todos los tejidos se pueden transferir como injerto. Debe existir un lecho receptor bien vascularizado y el injerto debe ser poco voluminoso para que todas sus células se puedan nutrir por imbibición, permaneciendo vivas mientras se revasculariza.

Respecto a los colgajos, a grandes rasgos, se pueden clasificar como sigue:

- a) Colgajos no microvasculares: Son aquellos en los que se mantiene intacta su vascularización. Siempre conservan un pedículo vascular por el cual discurren sus vasos nutricios, pero que al mismo tiempo limita su rango de movimiento. Tiene pues un alcance limitado. Pueden ser cutáneos, fasciales, musculares, mucosos, óseos o combinaciones de ellos, según el tejido transferido.
- b) Colgajos libres o microvasculares. En este caso se aíslan los vasos que irrigan el colgajo, se seccionan separándolo así totalmente del organismo y se restablece el flujo en el colgajo mediante microanastomosis entre los vasos del colgajo y vasos receptores en el área a la que se transfiere. Se amplían así inmensamente las posibilidades de reconstrucción, permitiendo transferir cualquier combinación de tejidos con tal que tengan un pedículo vascular anatómicamente constante de suficiente calibre.

Los colgajos libres surgen de la necesidad de no depender de la localización anatómica de cada colgajo clásico y de su limitado rango de movimiento. Requieren como condición imprescindible la aplicación de técnicas de anastomosis microvascular. Así, mediante instrumental quirúrgico de alta precisión y suturas entre los 9/0 (22 micras) y los 11/0 (18 micras) con microagujas del orden de 50-75 micras de calibre, se pueden anastomosar con

seguridad vasos incluso inferiores a 0.5 mm de calibre. Lógicamente esta cirugía requiere el uso de magnificación, sean lupas o microscopio quirúrgico. (84).

Se permite así la transferencia de los llamados colgajos quiméricos (“quimera flaps”) que son combinaciones de diversos tejidos sobre un mismo pedículo vascular. El nombre hace referencia al animal mitológico que posee atributos de diversos animales.

### 3.5.2. TÉCNICAS DE RECONSTRUCCIÓN EN DEFECTOS ÓSEOS

Los injertos óseos autólogos no vascularizados constituyen el método convencional para reconstrucción de pequeños defectos óseos. Para defectos óseos mayores y allí donde el lecho receptor tiene una pobre vascularización la elección es el injerto óseo vascularizado.

Los aloinjertos óseos de cadáver tienen capacidad osteoconductiva pero no poseen propiedades osteoinductivas. Además presentan el inconveniente de su importante grado de reabsorción y la posibilidad de transmisión de enfermedades.

Los implantes de material sintético no son una buena solución biológica y tienen una longevidad limitada.

El injerto óseo autólogo vascularizado es el de primera elección en la reconstrucción de defectos óseos extensos. Se trata de colgajos libres (85). Como inconvenientes de estos injertos óseos vascularizados están por un lado la morbilidad que ocasiona en las zonas donantes y, por otro, el reducido número de las mismas. Esto conlleva unas restricciones anatómicas en cuanto a las dimensiones y morfología de las posibles transferencias óseas vascularizadas.

La osteoinducción utilizando técnicas de terapia génica plantea un concepto distinto para la solución de defectos óseos complejos. Se utiliza la terapia génica para la modificación genética de determinados grupos celulares. Para ello se emplea un vector y unas células diana, las cuales, modificadas genéticamente, producen proteínas BMP que están implicadas en los procesos de la reparación de fracturas y que inducen la transformación de las células hacia células osteogénicas y por tanto a la formación de hueso autólogo. Finalmente este hueso autólogo osteoinducido puede ser útil en la reconstrucción de un defecto óseo como alternativa a la solución clásica que supone la aplicación de injerto óseo de cualquier tipo.

Valgan todas estas consideraciones previas como justificación del siguiente trabajo experimental.



## 4. HIPÓTESIS



## 4. HIPÓTESIS

Mediante la terapia génica es posible crear hueso autólogo, concretamente manipulando genéticamente células endógenas para sintetizar proteínas específicas con capacidad osteoinductiva, y utilizar el hueso autólogo así obtenido en cirugía reconstructiva de defectos óseos.



## **5. OBJETIVOS**



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO EXPERIENCIA I

1. Infectar in vitro fibroblastos obtenidos de rata Lewis (células diana) con el adenovirus AXCAOBMP-2, que es un adenovirus de replicación deficiente y con expresión del gen de la *BMP-2*.
2. Detectar expresión de BMP-2 por las células infectadas con el vector viral mediante la técnica Western-blot.
3. Comprobar la conversión de las células diana hacia osteoblastos mediante la detección de fosfatasa alcalina como marcador de diferenciación celular.

### 5.2 OBJETIVO EXPERIENCIA II

1. Infectar in vivo células musculares de la rata Lewis (células diana) mediante inyección intramuscular de los adenovirus AXCAOBMP-2.
2. Comprobar mediante estudio radiológico e histológico la formación de hueso osteoinducido.

### 5.3 OBJETIVO EXPERIENCIA III

1. Infectar in vitro de células pluripotenciales de médula ósea obtenidas de la rata Lewis (células diana), con el adenovirus AXCAOBMP-2.
2. Transferir in vivo, mediante inyección de las células infectas in vitro en el cuádriceps del animal experimental (rata Lewis).

3. Comprobar mediante estudio radiológico e histológico la formación de hueso osteoinducido.

#### 5.4 OBJETIVO EXPERIENCIA IV

1. Crear un defecto diafisario femoral en la rata Lewis.

2. Infección in vivo del foco de fractura mediante la inyección intramuscular de los adenovirus AXCAOBMP-2.

3. Comprobar radiológicamente la consolidación del defecto óseo.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. MATERIALES

#### 6.1.1. ANIMALES

Se emplearon ratas Lewis de 200-300 gr provenientes de granja. Se estabularon en las instalaciones de la Fundación de Investigación del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Todos los animales recibieron un tratamiento de acuerdo con las directrices de la Unión Europea y la “Guía para el manejo de animales en experimentación” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Los animales estuvieron en ayunas, con acceso libre al agua, la noche anterior a la intervención. Antes de la cirugía sedó a las ratas con una inyección subcutánea de 2-3 ml de xilacina-HCl. El sacrificio se realizó mediante una inyección intracardiaca con una sobredosis de pentobarbital.

#### 6.1.2. LINEAS Y CULTIVOS CELULARES

Se emplearon líneas celulares y cultivos celulares primarios en las instalaciones de la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia.

En concreto las líneas celulares HEK 293 (células de riñón de embriones humanos) y NIH 3T3 (fibroblastos de ratón). En ambos casos se trata de líneas celulares establecidas de laboratorio.

LÍNEAS CELULARES:

- Células HEK 293.

Las células HEK 293 se propagaron en medio de cultivo constituido por Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biomedica SA, Langnau) que contenía 4 g/l de glucosa y 3.7 g/l de bicarbonato sódico y suplementado con 10% de Fetal Bovine Serum (FBS, Biomedica SA, Langnau), 2 mM de L-glutamina, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, anfotericina 2.5 µg/ml y gentamicina 5 µg/ml.

El cultivo se realizó en placas de 10 cm diámetro a 37° C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se cultivaron hasta su confluencia, y después se recolectaron mediante incubación a 37° C con tripsina 0,12% EDTA 0,5 mM (Trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich, Saint Louis) y centrifugación posterior a 300 g durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en medio DMEM sin bicarbonato, conteniendo un 10% de FBS y 25 mM de solución HEPES (Tampón HEPES, Fisher Scientific SL, Madrid).

Se realizó un recuento del número de células vivas utilizando una cámara de Neübauer y el colorante vital azul tripano (Tripan blue, Sigma-Aldrich, Saint Louis). La suspensión celular se conservó en congelación hasta el momento del ensayo.

- Células NIH 3T3.

Las técnicas de cultivo utilizadas con las células de fibroblastos de ratón NIH3T3 fueron las mismas que para las células HEK 293 pero sustituyendo en los medios de cultivo el suero bovino FBS por 10% de Newborn Calf Serum (NCS, Biomedica SA, Langnau).

Por otra parte los cultivos celulares primarios que se obtuvieron a partir de células de rata Lewis.

## CULTIVOS AUTÓLOGOS:

- Fibroblastos autólogos.

Los fibroblastos se obtuvieron a partir de músculos estriados de ratas Lewis. Después del sacrificio de la rata se extrajeron los músculos rectos abdominales, pectorales y cuádriceps mediante técnicas quirúrgicas estándar. Se separaron y desecharon el tejido conjuntivo y grasa y, posteriormente, se troceó el músculo con tijeras hasta que se obtuvieron fragmentos de un tamaño de alrededor de 0,5 mm que se digirieron con colagenasa en PBS a 1000 U/ml (Collagenase, Sigma-Aldrich, Saint Louis) a 37° C durante dos horas con agitación.

El resultado de la digestión se filtró a través de una gasa estéril y se centrifugó a 300 g. El precipitado, conteniendo básicamente miocitos y fibroblastos, se resuspendió en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% FBS, L-glutamina, penicilina G y anfotericina, se vertió en placas de cultivo de 6 cm de diámetro y se pasó a estufas de cultivo a 37° C y CO<sub>2</sub> al 5%.

Aprovechando la diferente capacidad de adherencia entre los fibroblastos y los miocitos provenientes de la digestión del músculo, se realizó un enriquecimiento de fibroblastos del siguiente modo: al cabo de 1 ó 2 días se retiró el medio de cultivo junto a las células suspendidas en él que corresponderían a miocitos, los cuales tienen una capacidad de adherencia en la placa de cultivo menor que los fibroblastos. Las células adheridas a las placas corresponderían, por el contrario, a fibroblastos. Se renovó el medio de cultivo con los componentes ya mencionados. Esta operación se repitió cada dos días hasta el séptimo u octavo día en que se realizó el primer tripsinizado.

Para ello, se añadió tripsina-EDTA y se agitó a temperatura ambiente hasta que las células se separaron del fondo de la placa. La suspensión celular se recogió en medio de cultivo FBS para inhibir la tripsina, se disgregaron los aglomerados de células y se centrifugó a 300 g. Después se lavaron de nuevo las células con el mismo medio de cultivo y se analizó su viabilidad con una cámara de Neübauer utilizando azul tripano. Estas células se sembraron en las mismas condiciones a razón de  $5 \times 10^4$ - $10^6$  células por placa en placas de cultivo de 10 cm de diámetro. Cuando se alcanzó el 80% de confluencia, entre los días 6 y 8, se repitió la tripsinización del mismo modo. El rendimiento medio del cultivo fue de  $1.2 \times 10^6$  células viables por placa. Las células que no se utilizaron inmediatamente se guardaron en nitrógeno líquido utilizando protocolos estándar de congelación celular, hasta su uso posterior.

- Células mesenquimales de médula ósea autólogas.

Se extrajeron muestras de médula ósea a partir de fémures y tibias de rata mediante aspiración. Las muestras aspiradas se vertieron en placas de cultivo con DMEM suplementado con 10% FBS. A las 24 horas, el sobrenadante de la placa con las muestras de médula ósea se pasó a una nueva placa de cultivo, descartando las células adheridas en la primera placa que eran principalmente fibroblastos.

Esta segunda placa se dejó en cultivo a 37° C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 48-72 horas, tras lo cual se descartó el sobrenadante. Las células adheridas a esta segunda placa se tripsinizaron y se transfirieron a una nueva placa de cultivo. El medio de cultivo se cambió aproximadamente cada 7 días. Las células se dejaron crecer hasta su confluencia. Entonces se tripsinizaron de nuevo y se transfirieron a placas de cultivo de 15 cm con el mismo medio para obtener

una mayor cantidad de células. En estas placas confluentes se obtuvieron  $2.5 \times 10^6$  células viables por placa. El recuento de las células viables se realizó utilizando la cámara de Neübauer y el colorante azul tripano.

### 6.1.3 ADENOVIRUS

Utilizamos los adenovirus AxCAOBMP-2 y AxCaLac-Z cedidos a nuestro laboratorio por los doctores Okubo y Bessho del departamento de cirugía maxilofacial de la Universidad de Kioto (Japón). También se utilizó el adenovirus GFP, cedido por laboratorio del CSIC de Valencia.

El manejo de material que contiene los adenovirus a que se refiere este trabajo se realizó en salas de cultivo de seguridad biológica nivel 2.

Para determinar la capacidad infectiva de los adenovirus se utilizó el adenovirus control AxCaLac-Z. Este virus es portador del gen Lac-Z lo que permite detectar las células infectadas por el adenovirus y que expresan dicho gen transferido, mediante la tinción habitual para la beta-galactosidasa (X-gal).

Para la titulación de las cargas virales utilizamos el parámetro conocido como multiplicity of infection (MOI). Se trata de un valor relativo que hace referencia a la relación de cargas virales por célula. El MOI 10 es la mínima cantidad viral que se produce el efecto citopático (10 partículas virales por célula).

En la experiencia I se describirá el método de cálculo del MOI mediante el test de infectividad.

## 6.2 METODOS

### 6.2.1. EXPERIENCIA I

#### **Infección in vitro de fibroblastos por los adenovirus AxCAOBMP-2 y AxCaLac-Z a concentraciones de carga viral crecientes (0, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 µl)**

Como paso previo se obtuvieron fibroblastos a partir de músculos estriados de ratas Lewis y se cultivaron según lo ya descrito en el apartado de materiales referente a cultivos celulares de fibroblastos autólogos.

Adicionalmente se llevó a cabo un test de infectividad de los adenovirus. Para llevarlo a cabo utilizamos como adenovirus control el AxCaLac-Z portador del gen Lac-Z que permite determinar fácilmente las células infectadas por el adenovirus y que expresan dicho gen transferido mediante la tinción habitual para la beta-galactosidasa (X-gal).

Partimos de cultivos celulares de células de estirpe HEK 293 y células NIH 3T3. Ambas son líneas celulares de uso habitual en cultivos celulares.

Las células HEK 293 al ser infectadas por los adenovirus AxCaLac-Z permiten su replicación con el consiguiente efecto citopático y la muerte de las células infectadas y liberación de las cargas virales replicadas.

Las células NIH 3T3 pueden ser infectadas por los adenovirus pero no permiten que estos se repliquen ni sufran efecto citopático. Esto es debido a que los adenovirus utilizados en nuestras experiencias son adenovirus defectivos, tanto el adenovirus con el gen Lac-Z o AxCaLac-Z como el adenovirus con el gen de la BMP-2 o AxCAOBMP-2. Estos adenovirus tienen capacidad para infectar células diana y transferir al genoma de la célula el gen del que son portadores

pero no tienen capacidad para replicarse en ellas. A diferencia de las líneas celulares que sí permiten su replicación y que llamamos células empaquetadoras, como es el caso de las HEK 293.

Para preparar el primer stock viral de los adenovirus AxCAOBMP-2 y AxCaLac-Z, se descongelaron las cargas virales recibidas y se procedió a la infección de 5.000.000 de células empaquetadoras HEK 293 en 10 ml de medio de cultivo con carga viral desconocida.

A las 72 horas se produjo el primer ciclo lítico de todas las células infectadas. Diez mililitros de medio con las células lisadas por la acción viral se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación. Se dividieron los 10ml iniciales en muestras de 1ml respectivamente que se congelaron de nuevo para su conservación.

Para la titulación de las cargas virales a utilizar durante el presente estudio se utilizó el parámetro conocido como MOI. Se trata de un valor relativo que hace referencia a la relación de cargas virales por célula.

Se calculó el MOI partiendo de las cargas virales obtenidas y aliquoteadas tras la primera replicación o primer stock viral del adenovirus AxCaLac-Z. Los mismos valores se extrapolaron para el adenovirus AxCAOBMP-2.

Se infectaron con adenovirus AxCaLac-Z células NIH 3T3 y células HEK 293 simultáneamente en placas de 6 cm de diámetro con 1.000.000 de células cada una. Se utilizaron adenovirus AxCaLac-Z del primer stock viral en las siguientes cantidades:

- 0µl (grupo control), 2, 5, 10, 25, 50 y 100µl de HEK 293.
- 0µl (grupo control), 2, 5, 10, 25, 50 y 100µl de NIH 3T3.

En general, para que la infección sea óptima conviene que se realice con el mínimo medio posible en la placa que contiene 1.000.000 de células. Una hora después se añade medio de cultivo suficiente.

A las 72 horas se comprobó en las células HEK 293 con que cantidad se había producido un efecto citopático completo. La mínima cantidad en la que se produce el efecto citopático es el MOI 10, es decir, 10 partículas virales por célula. En el presente experimento esto se produjo en los 10 µl del primer stock viral por millón de células (figura 1).

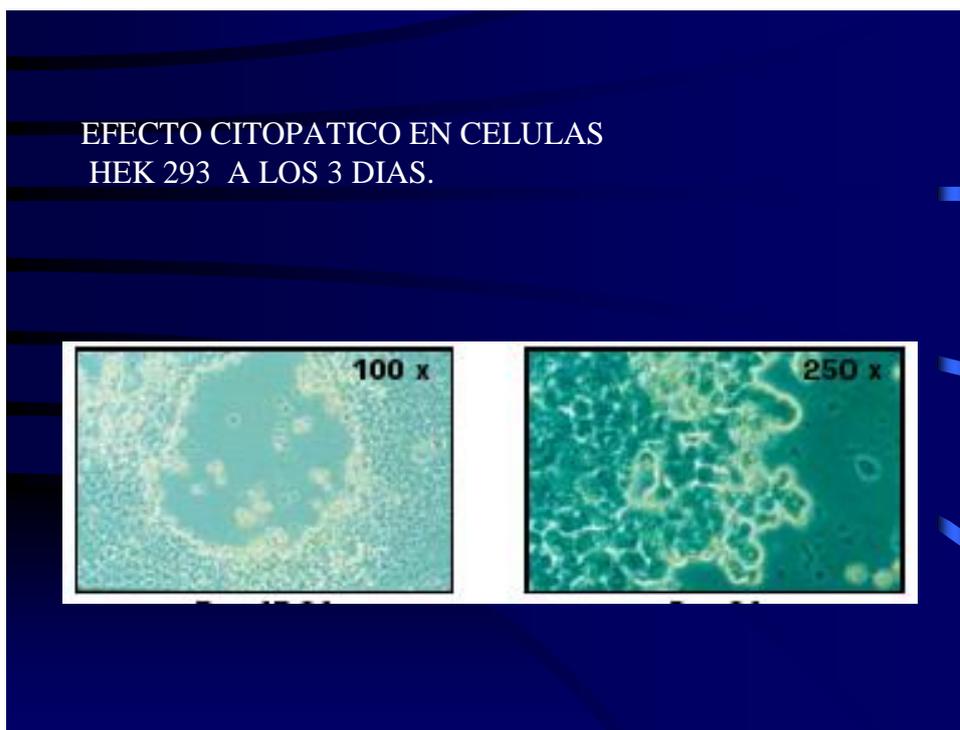


Figura 1. EXPERIENCIA I. TEST DE INFECTIVIDAD. Imagen del efecto citopático de los adenovirus en las células empaquetadoras HEK 239.

Esto nos permitió extrapolar el MOI al que se produce la infección de las células NIH 3T3, que correspondería igualmente con 10  $\mu$ l por millón de células (MOI 10).

A las 72h de la infección se procedió a la tinción de las células NIH 3T3 infectadas a MOI crecientes con el kit de tinción x-gal, previamente se fijaron las células con glutaraldehído 0.25% y se lavaron 3 veces con PBS. Se pudo demostrar mayor tasa de células teñidas a MOI de infección más elevados (figura 2).

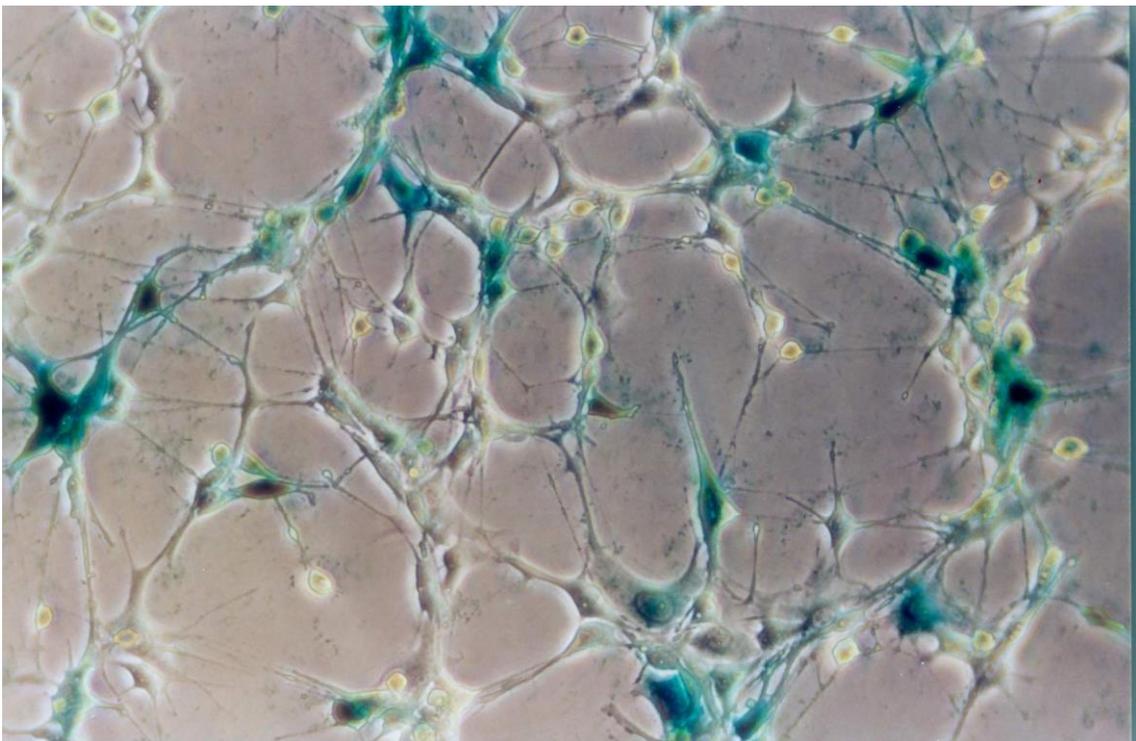


Figura 2. EXPERIENCIA I. TEST DE INFECTIVIDAD. Células NIH-3T3 con la tinción X-gal a las 72 h de la infección con los adenovirus AxCaLac-Z

Tras obtener los cultivos de fibroblastos y determinar la infectividad de los adenovirus se llevó a cabo la experiencia I propiamente dicha, es decir, la infección in vitro de los fibroblastos por los adenovirus AxCAOBMP-2 y AxCaLac-Z a concentraciones de carga viral crecientes (0, 2, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ l)

Se prepararon placas de cultivo de 6 cm de diámetro con fibroblastos cultivados obtenidos de músculo de rata Lewis según ha sido descrito. Cada placa con medio contenía 250.000 células, contadas con el método del azul tripán. Se dispusieron 4 series con 7 placas cada una. Así pues, en cada serie teníamos 7 placas con 250.000 células para ser infectadas a MOI crecientes.

Dado el mayor tamaño celular de los fibroblastos con respecto a las células NIH 3T3 y las HEK 293, las infecciones se realizan en poblaciones de cultivos celulares de 250.000 en vez de 1.000.000. Las concentraciones de cargas virales del primer stock viral se diluyeron por tanto 1:4 para que mantener la misma correspondencia de MOI que cuando se realizó el test de infectividad en células NIH-3T3. Una serie fue infectada con el adenovirus AxCaLac-Z y las 3 series restante con el adenovirus AxCAOBMP-2 con cargas virales obtenidas del primer stock viral.

Así pues, la primera serie se infectó con AxCaLac-Z a las concentraciones 0  $\mu$ l (grupo control), 2, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ l en 7 placas con 250.000 fibroblastos. El MOI 10 correspondió de nuevo a los 10  $\mu$ l.

Las otras 3 series de 7 placas cada una se infectaron con AxCAOBMP-2 a las siguientes concentraciones 0  $\mu$ l (grupo control), 2, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ l. El MOI 10 correspondió otra vez a 10  $\mu$ l.

Adicionalmente, se estableció una serie más de células HEK-293 con 1.000.000 de células que fueron infectadas por concentraciones crecientes de AxCAOBMP-2 pero sin diluir 1: 4. Estableciéndose que el MOI 10 corresponde a la concentración mínima en la que se produce efecto citopático a las 48 horas. Esta concentración se correspondió de nuevo con los 10  $\mu$ l.

A las 48 h se realizó también el test de infectividad en la serie infectada con el adenovirus AxCaLac-Z mediante la tinción con X-gal de los fibroblastos, que demostró tinciones crecientes a mayor concentración de virus en la infección (figura 3).

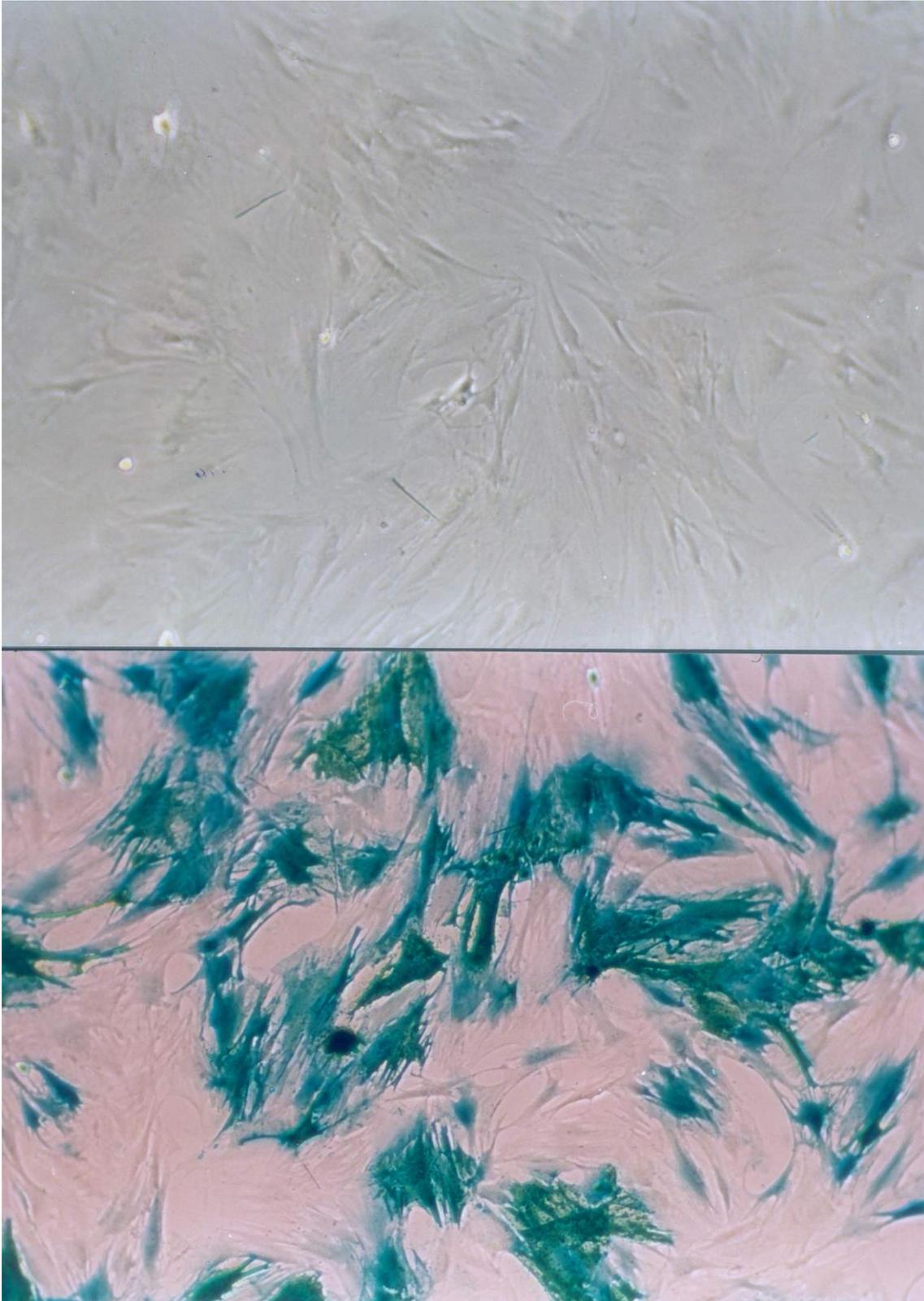


Figura 3. EXPERIENCIA I. Serie de fibroblastos infectados con el adenovirus AxCaLac-Z. La superior corresponde al grupo 0 (grupo control) y la inferior al grupo infectado con 100 µl del primer stock viral de AxCaLac-Z.

Las 3 series infectadas a MOI crecientes con el adenovirus AxCAOBMP-2 se utilizaron con distintos objetivos. La primera serie se utilizó a las 48h para extracción de proteínas. Estas proteínas sirvieron para realizar un Western-Blot de las mismas utilizando anticuerpos anti-BMP2 y anti-tubulina (control).

El Western-Blot positivo demostraría que los fibroblastos infectados por el adenovirus con el gen de la BMP-2 tienen capacidad para producir dicha proteína. Además, demostraría que a concentraciones mayores de infección el estudio de las proteínas revelaría mayor cantidad de proteína BMP-2.

La segunda de las series se utilizó para realizar la tinción específica de fosfatasa alcalina (AP) a las 72h (AP Staining Kit, System Biosciences SBI, Palo Alto, CA). La fosfatasa alcalina es una enzima hidrolasa responsable de la defosforilación de moléculas como las proteínas y los nucleótidos en condiciones alcalinas y es un marcador de células indiferencias pluripotenciales ("*stem cells*") y de células óseas (osteoblastos y osteocitos). Los fibroblastos y miocitos maduros son fosfatasa alcalina negativos.

La producción de la proteína BMP-2 por los fibroblastos, y dado que dicha proteína induce la transformación celular hacia células de estirpe ósea (osteoblastos), hace pensar que las células infectadas además de producir la BMP-2 pueden ser transformadas por su acción. Si dichas células son positivas a la tinción quedaría demostrada su capacidad de transformarse hacia osteoblastos o células pluripotenciales indiferenciadas susceptibles de diferenciarse hacia células osteogénicas por acción de la BMP2.

El AP Staining Kit es un set de tinción para cultivos celulares en placas o pocillos. Utiliza una solución conteniendo un sustrato y un tinte para la lectura de actividad enzimática fosfatasa alcalina. Este set de tinción tiñe las células AP positivas de

azul o rojo. En nuestra experiencia se usó este último, que tiñe de rojo las células con actividad fosfatasa alcalina positiva, tanto en fibroblastos infectados con el adenovirus AxCAOBMP2, como en un grupo control de fibroblastos no infectados.

La tercera y última serie se utilizó para una nueva extracción de proteínas a los 5 días y realización del Western-Blot.

### 6.2.2. EXPERIENCIA II

#### **Infección in vivo por partículas virales en músculo de rata Lewis**

Para esta experiencia se utilizaron 4 ratas Lewis macho adultas. Los animales se inmunosuprimieron con ciclofosfamida por vía intraperitoneal a dosis de 150 mg/kg 24 horas antes de la infección.

La infección in vivo se realizó inyectando partículas virales del primer stock viral de los adenovirus AxCAOBMP-2 y el adenovirus GFP de control.

La inyección se realizó en el cuádriceps del muslo de los animales. Los adenovirus GFP en el muslo izquierdo de las ratas y los adenovirus AxCAOBMP-2 en coinfección con el adenovirus GFP en el muslo derecho. Se inyectaron 0,5 ml del primer stock viral de los adenovirus GFP en cada muslo izquierdo. La coinfección de los adenovirus GFP con los adenovirus AxCAOBMP-2 se hizo con 1 ml respectivamente de cada tipo de virus obtenidos del primer stock viral y se inyectó 0,5 ml de la mezcla de ambos en cada muslo derecho.

A la semana se sacrificó el primer animal. Se extrajeron muestras de la musculatura en la zona correspondiente a los puntos de inyección en cada muslo. Se obtuvieron muestras para congelación del muslo izquierdo para

estudio con el microscopio de fluorescencia y muestras para tinción con hematoxilina-eosina del muslo derecho, estas últimas se fijaron con formaldehído. A la segunda semana se sacrificó el segundo animal. Se obtuvieron muestras de ambos muslos. Del muslo izquierdo muestras para cortes por congelación y estudio con el microscopio de fluorescencia. También se tiñeron con hematoxilina-eosina las muestras del lado izquierdo como grupo control (figura 4).

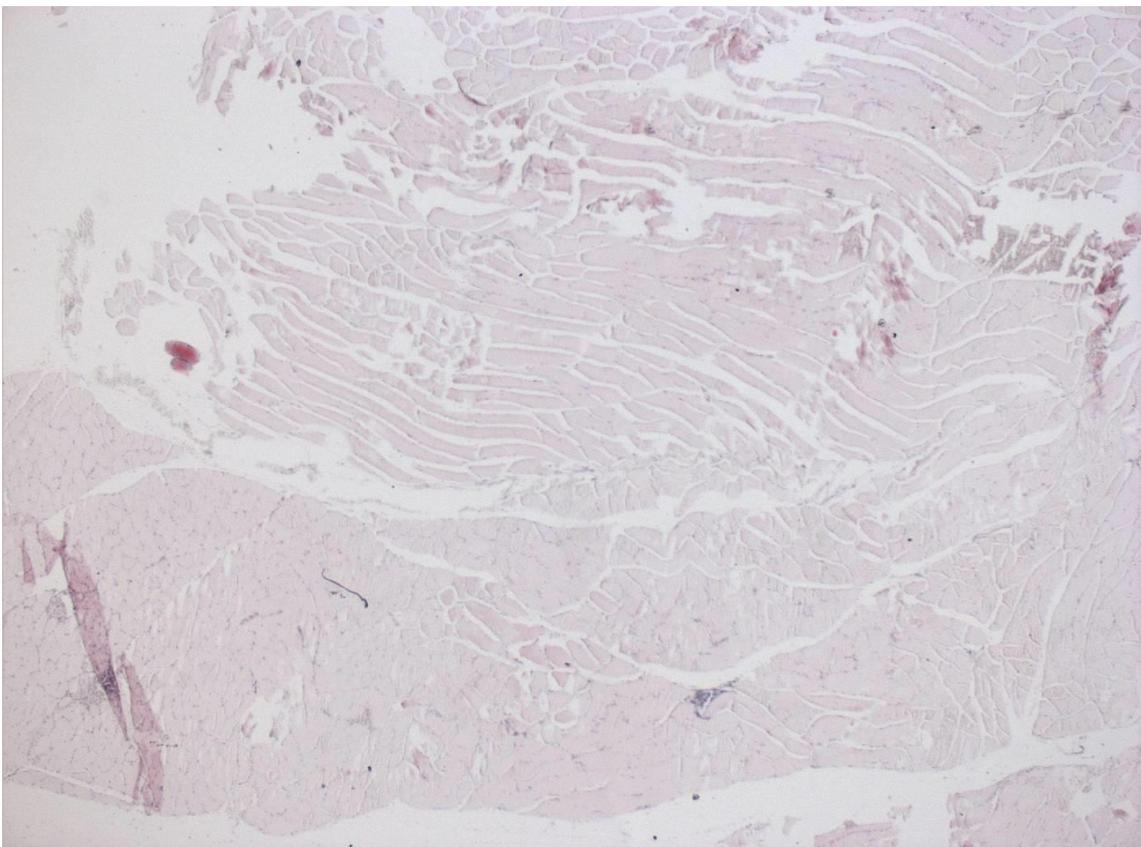


Figura 4. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. GRUPO CONTROL. Histología de las muestras tomadas del muslo izquierdo (grupo control) en las que se infectan las células musculares sólo por el adenovirus GFP. El corte histológico muestra fibras musculares normales.

Del muslo derecho se obtuvieron también muestras para fijación con formaldehído y tinción con hematoxilina-eosina.

A los dos animales restantes se les inyectó a las dos semanas una segunda dosis intraperitoneal de ciclofosfamida por la misma vía y a la misma dosis que la primera vez.

El tercer animal se sacrificó a las 3 semanas realizándose previamente control radiológico de ambos muslos. Se obtuvieron muestras de ambos muslos. Del muslo izquierdo para congelación y estudio de fluorescencia. Del muslo derecho para fijación con formaldehído y fijación con hematoxilina-eosina.

El cuarto animal se sacrificó a las seis semanas realizándose también controles radiológicos previos. Se obtuvieron también muestras de ambos muslos. Del muslo izquierdo para congelación y estudio con el microscopio de fluorescencia. Del muslo derecho para tinción con hematoxilina-eosina.

### 6.2.3. EXPERIENCIA III

#### **Infección in vitro de células mesenquimales de médula ósea con el adenovirus AxCAOBMP-2 y posterior inyección de las células infectadas en el modelo animal (rata Lewis)**

Tras obtener células mesenquimales de médula ósea mediante el procedimiento descrito previamente, se procedió a la infección in vitro de las mismas con el adenovirus AxCAOBMP-2 y el adenovirus-GFP. Para ello, se infectaron 8 placas con 2 millones de células con 200 µl de stock viral, lo que equivale a una concentración relativa de MOI-100: 4 placas con 2 millones de células respectivamente con el adenovirus AxCAOBMP-2 y las otras 4 placas con 2 millones de células con el adenovirus-GFP.

A las 48h de la infección se cambió el medio de cultivo suspendiendo las células en medio de cultivo sin FBS para su inyección en el modelo animal y, finalmente,

se inyectaron las células infectadas en los cuádriceps de los muslos de 4 ratas Lewis adultas. En las 24 horas previas a la inyección se inmunosuprimieron los animales mediante la técnica anteriormente descrita consistente en una inyección intraperitoneal de ciclofosfamida.

En cada uno de los animales se inyectaron 2 millones de células centrifugadas y suspendidas en 0.5 ml de medio en muslo derecho y la misma cantidad en muslo izquierdo. En el muslo izquierdo se inyectaron las células infectadas con el adenovirus-GFP y en el muslo derecho se inyectaron las células infectadas con el adenovirus AxCAOBMP-2.

Los animales se sacrificaron a la cuarta semana realizándose radiografías previamente. Del muslo izquierdo se obtuvieron muestras para congelación y observación con el microscopio de fluorescencia. Del muslo derecho se obtuvieron muestras para tinción con hematoxilina-eosina.

#### 6.2.4 EXPERIENCIA IV:

##### **Aplicación de terapia génica en un defecto óseo a nivel de la diáfisis del fémur en rata Lewis**

Para esta experiencia se utilizaron 6 ratas Lewis adultas, que fueron intervenidas quirúrgicamente para crearles un defecto óseo a nivel de la diáfisis del fémur.

Los animales se intervinieron bajo anestesia general utilizando una dilución de 3ml de diazepam, 1ml de ketamina y 1ml de atropina. Estos 5 ml se diluyeron en suero fisiológico hasta alcanzar un volumen de 10ml. Cada animal, de entre 200 y 300 gr de peso, recibió una inyección intraperitoneal de 3 cc antes de proceder a la cirugía.

Los procedimientos se realizaron en el quirófano de experimental anexo al estabulario. Se rasuraron los muslos de los animales y aplicó como antiséptico povidona yodada. Se utilizó material quirúrgico esterilizado y guantes quirúrgicos estériles. No se administró antibioticoterapia.

Con una sierra quirúrgica, se creó un defecto óseo de 3-4 mm en la diáfisis del fémur. A continuación se interpuso en el defecto óseo de un colgajo muscular de vasto lateral con pedículo superior con la finalidad de evitar el colapso de los extremos óseos, manteniendo así el defecto creado. De esta forma se evitaría la consolidación espontánea. Finalmente, se procedió a la fijación ósea endomedular con una aguja de Kirschner de 1mm.

Las cirugías en los 6 animales se realizaron en distintos días. Una vez intervenidas todas las ratas Lewis que se utilizaron para esta experiencia y recuperadas de la cirugía se les dividió aleatoriamente en dos grupos de 3 animales: el grupo experimental y el grupo control.

En el grupo experimental, los animales fueron infectados con cargas virales del adenovirus AxCAOBMP-2. En las 24 horas previas a la intervención, este grupo de animales fue inmunosuprimido con ciclofosfamida, mediante una inyección intraperitoneal de 45 mg de ciclofosfamida, calculada para un peso medio de la rata Lewis adultas de 200 a 300 gramos. La infección con las cargas virales se realizó mediante inyección percutánea de 0,5 cc del primer stock viral en el colgajo muscular de vasto lateral interpuesto en el defecto óseo. Los tres animales de este grupo se infectaron el mismo día.

Por su parte, los 3 animales del grupo control no fueron inmunosuprimidos ni infectados.

A las 3 y a las 6 semanas de la infección se realizaron controles radiológicos de todos los animales. Para la realización de los controles radiológicos se precisó anestésiar a los animales utilizando la dilución previamente descrita de ketamina, diazepam y atropina.

Todas las ratas Lewis que se utilizaron en las 3 experiencias con animales (experiencias II, III y IV) permanecieron siempre en el estabulario acondicionado para estas experiencias y aislados del resto de los animales del laboratorio en una estancia independiente.



## **7. RESULTADOS**



## 7. RESULTADOS

### 7.1. RESULTADOS DE EXPERIENCIA I. INFECCION DE FIBROBLASTOS POR EL ADENOVIRUS PORTADOR DEL GEN BMP-2.

El grupo control se infectó con el adenovirus portador del gen de la beta-galactosidasa también a dosis crecientes permitiendo comprobar la infección de los fibroblastos por los adenovirus al realizar la tinción específica (X-gal). Se obtuvieron mayores porcentajes de tinción a mayor carga viral y por tanto a mayor tasa de infección (test de infectividad).

La primera serie de fibroblastos infectados por el adenovirus AxCAOBMP-2 se utilizó para extracción de proteínas a las 48 horas y realización de Western-Blot. Para ello se utilizaron anticuerpos anti-BMP-2 y anti-tubulina. El resultado del Western-Blot fue positivo demostrando la producción de BMP-2 por los fibroblastos y además con mayor intensidad a mayor carga viral (figura 5).

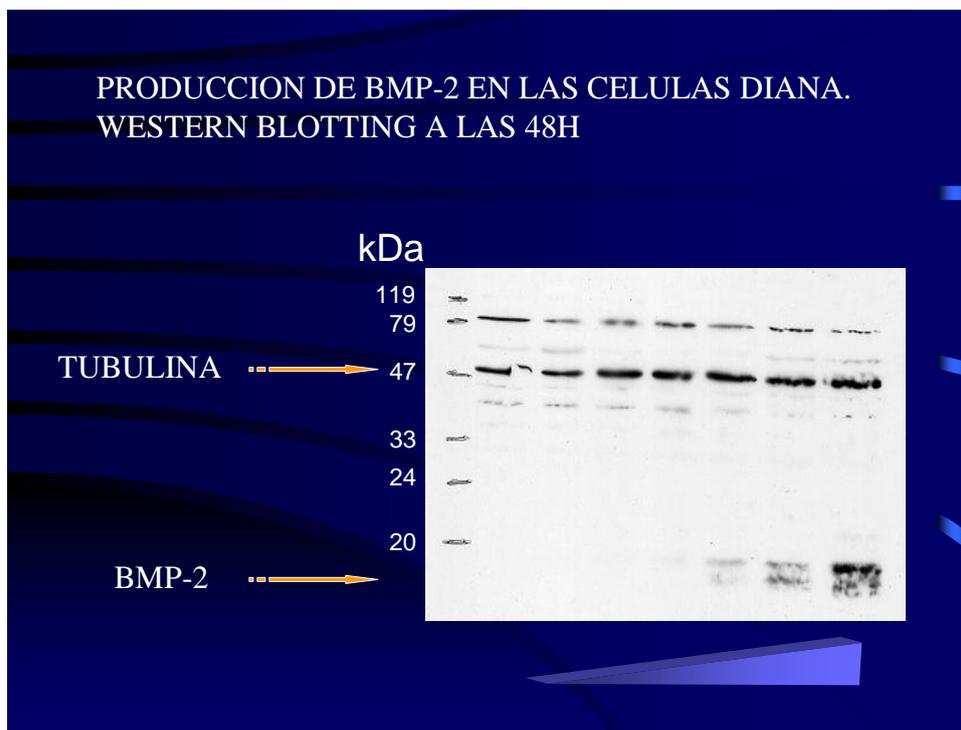


Figura 5. EXPERIENCIA I. Western Blotting a las 48 h.

La segunda serie de fibroblastos se utilizó a las 72 horas para la tinción específica de fosfatasa alcalina. Los fibroblastos infectados se tiñeron positivamente de color rojo indicando su transformación en células fosfatasa alcalina positiva: células pluripotenciales con diferenciación hacia osteoblastos. El grupo control correspondiente a fibroblastos no infectados no se tiñó con la tinción específica para fosfatasa alcalina.

La tercera serie de fibroblastos se utilizó a los 5 días para nueva extracción de proteínas y realización de Western Blot. El resultado fue de nuevo positivo demostrando la existencia BMP-2. Además mayor cantidad de BMP-2 en los fibroblastos con exposición a mayor infección por partículas virales (figura 6).

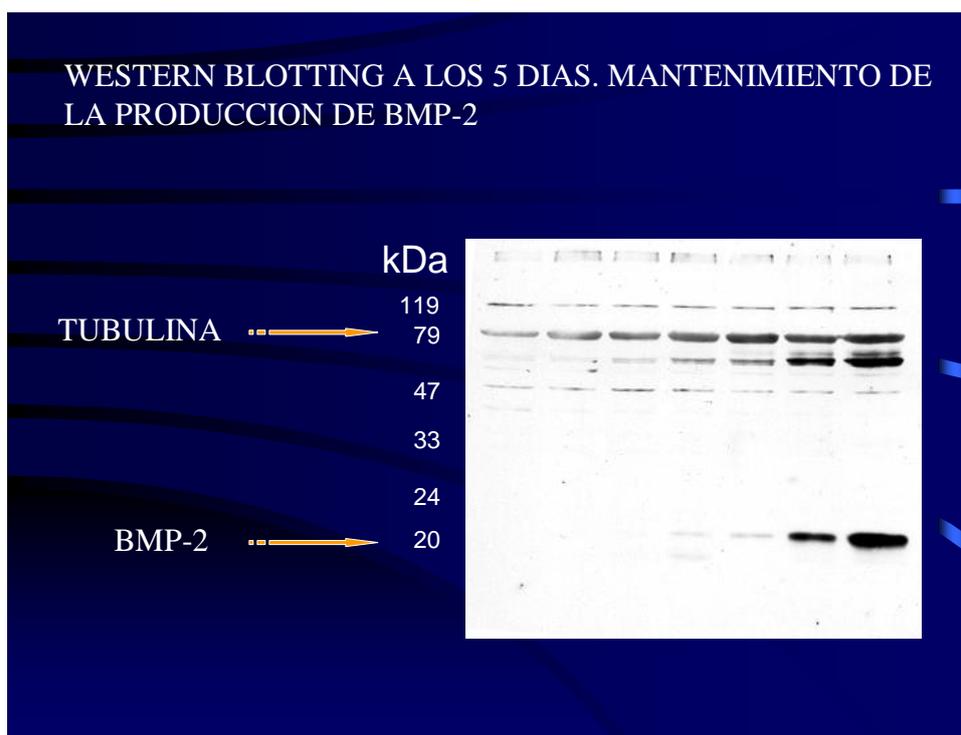


Figura 6. EXPERIENICA I. Western Blotting a los 5 días.

## 7.2 RESULTADOS DE EXPERIENCIA II. INFECCION IN VIVO POR PARTICULAS VIRALES EN MÚSCULO. RATA LEWIS.

Las muestras musculares correspondientes a los puntos de inyección de las partículas virales del animal sacrificado a la primera semana se procesaron de la siguiente manera.

Las muestras del lado izquierdo infectadas por el adenovirus GFP y obtenidas para congelación se examinaron al microscopio de fluorescencia. Las muestras fueron positivas observándose células musculares marcadas por fluorescencia. Las células musculares por lo tanto son células diana apropiadas para uso de un adenovirus como vector. El adenovirus GFP induce la producción de la proteína verde en la célula infectada.

También se tomaron muestras para tinción con hematoxilina-eosina del lado izquierdo (figuras 7-8).

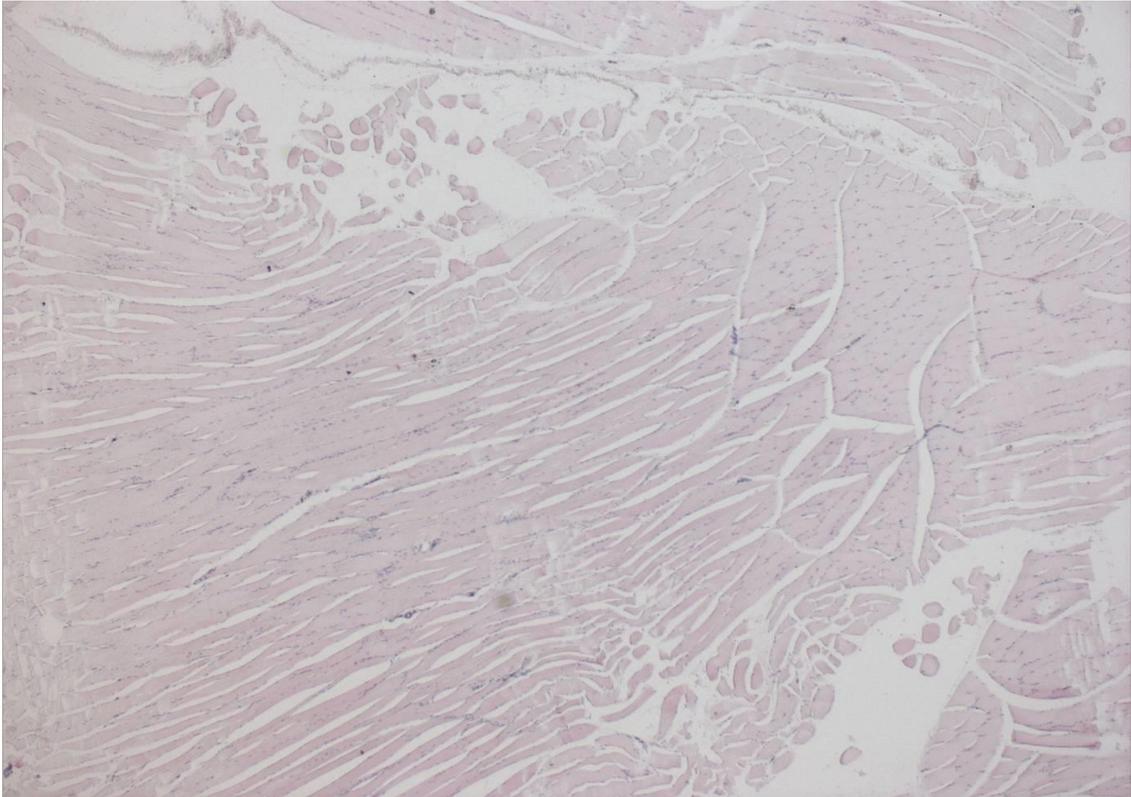


Figura 7. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. GRUPO CONTROL. Histología de tejido muscular infectado con adenovirus GFP. Miocitos de aspecto normal con tinción hematoxilina-eosina.

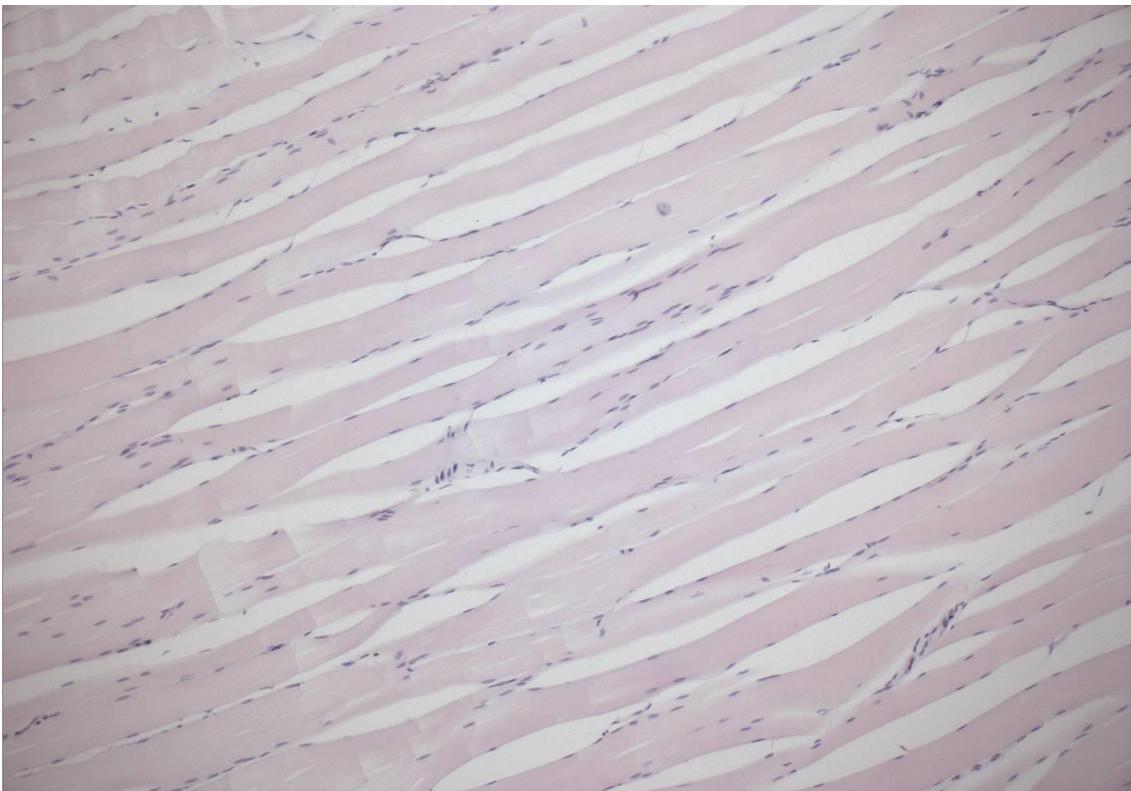


Figura 8. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. GRUPO CONTROL. Miocitos de aspecto normal con tinción hematoxilina-eosina

Las muestras del lado derecho correspondientes al punto de inyección por partículas virales AxCAOBMP-2 se fijaron con formaldehído y se tiñeron con hematoxilina-eosina. En el punto de inyección se observan células musculares junto a gran cantidad de células mesenquimales (células fibroblasto-like) por transformación de las células musculares o por proliferación de las células mesenquimales del tejido muscular (figuras 9 a 14).

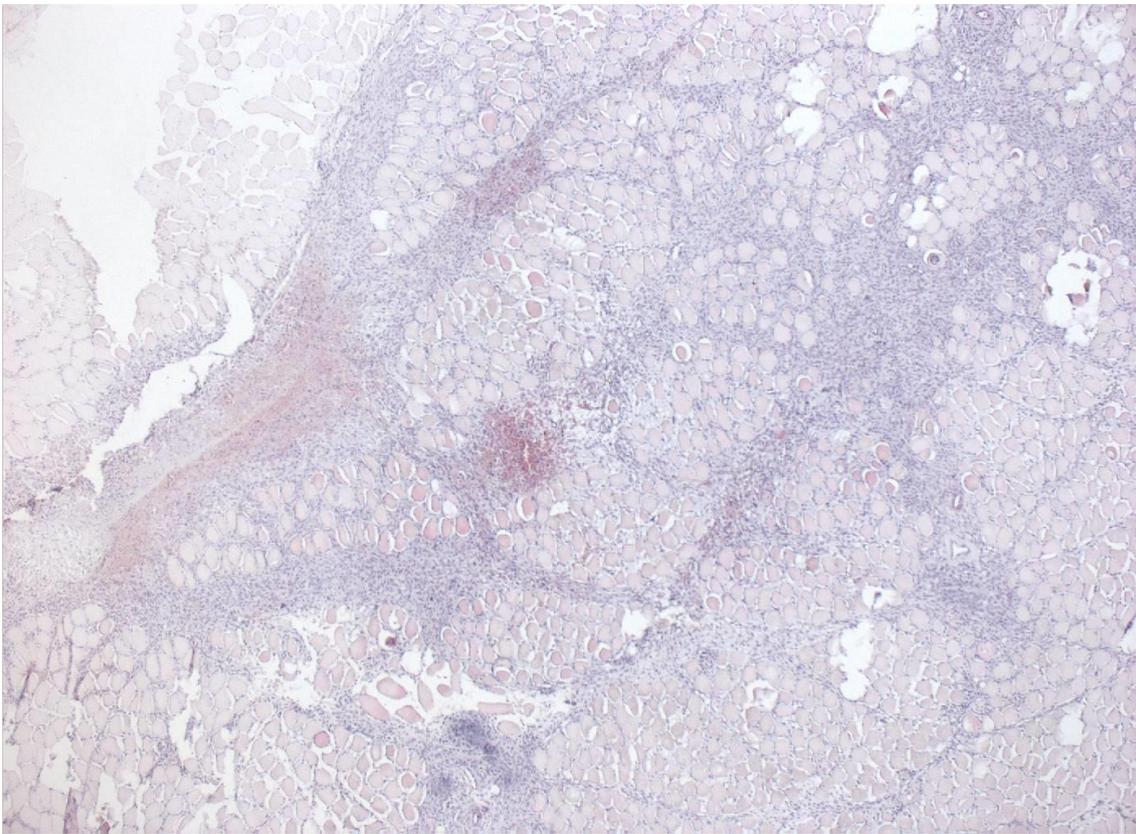


Figura 9. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Histología del tejido muscular infectado por el adenovirus AxCAOBMP-2 en las muestras de la primera semana post-infección. Junto a los miocitos del tejido muscular se aprecia una proliferación de fibroblastos en el punto de inyección.

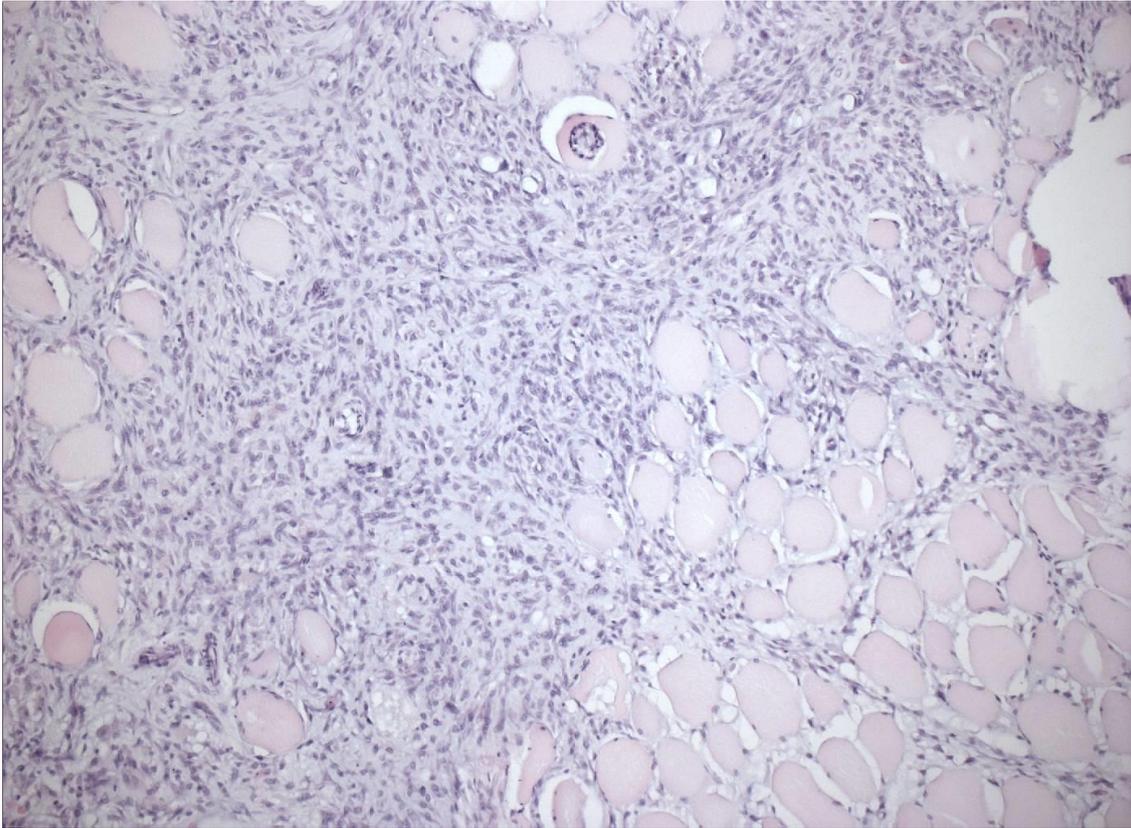


Figura 10. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina del tejido muscular del muslo derecho. Muestras tomadas a la semana tras la infección por el adenovirus AxCAOBMP-2. Se observa una gran proliferación de células de aspecto fibroblástico que se intercalan entre las musculares.

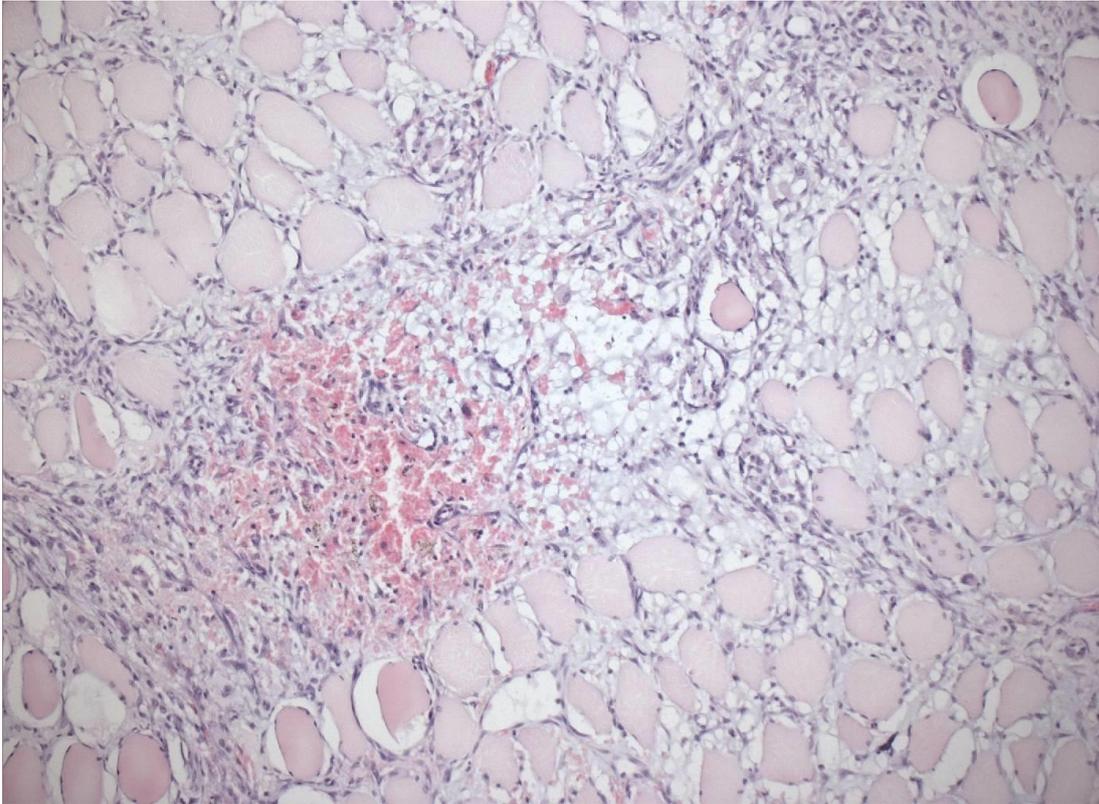


Figura 11. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina del tejido muscular a la semana de la infección por el adenovirus AxCAOBMP-2. Infiltración del tejido muscular por tejido fibroblastos con la aparición de yemas conectivo-vasculares.

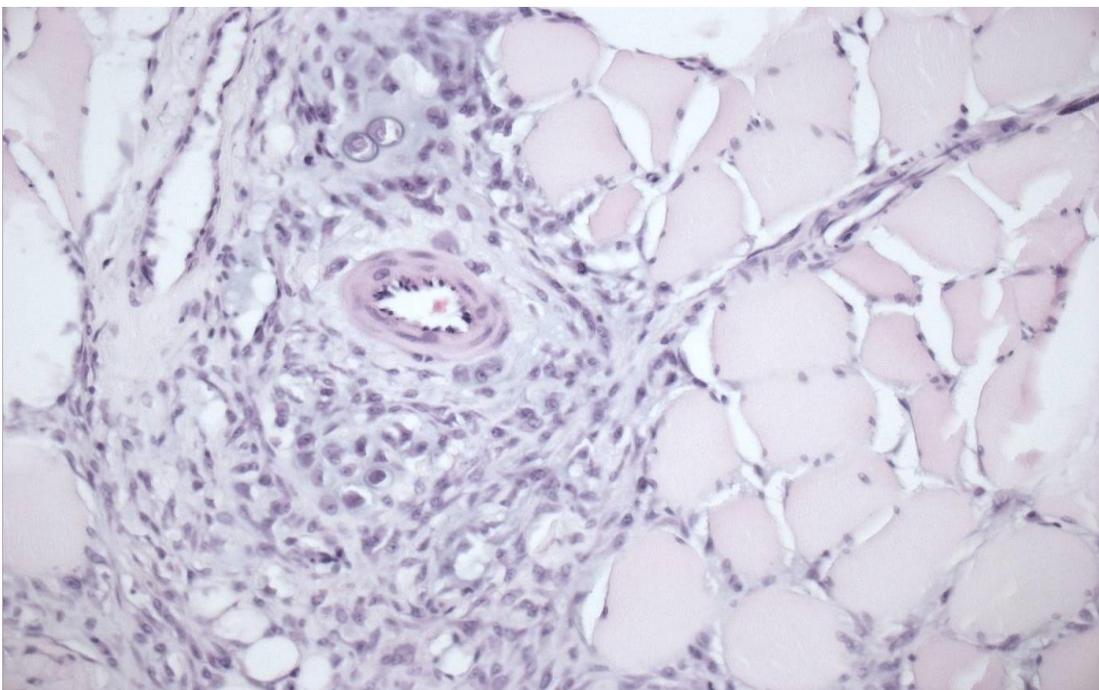


Figura 12. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Detalle de un yema conectivo-vascular. Proliferación similar a lo que sucede en un tejido inflamatorio o de granulación

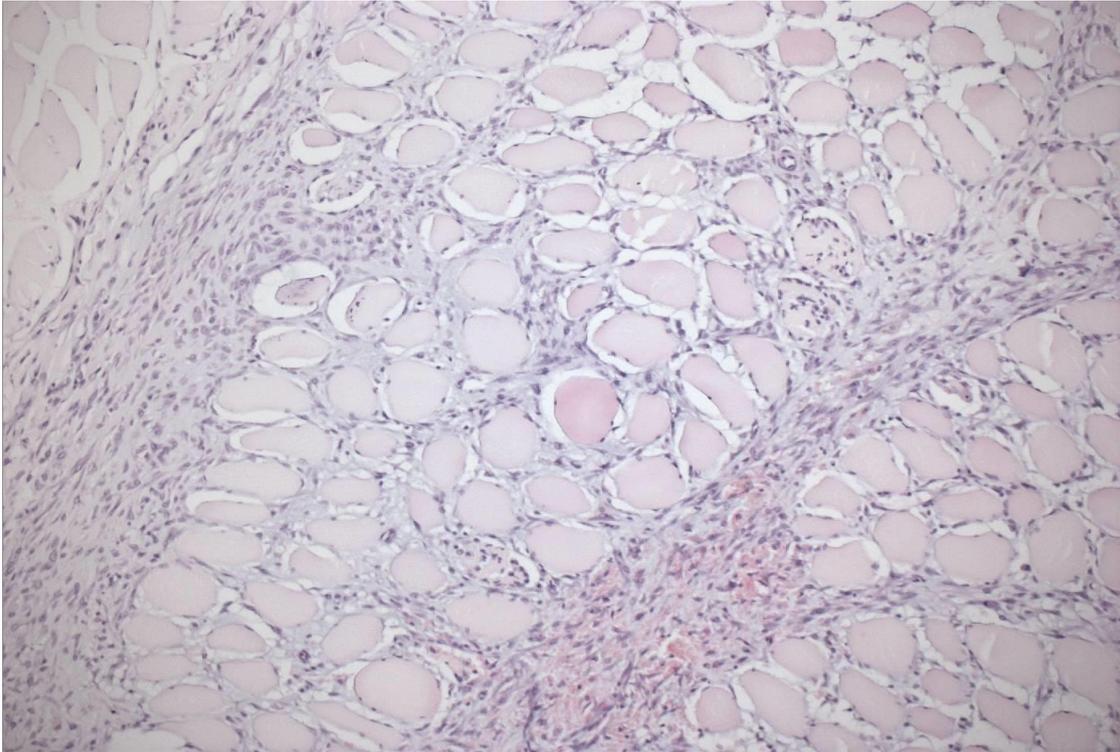


Figura 13. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina del tejido muscular a la semana de la infección por los adenovirus AxCAOBMP-2. Miocitos infiltrados por células de aspecto fibroblástico y proliferación de yemas vasculares.

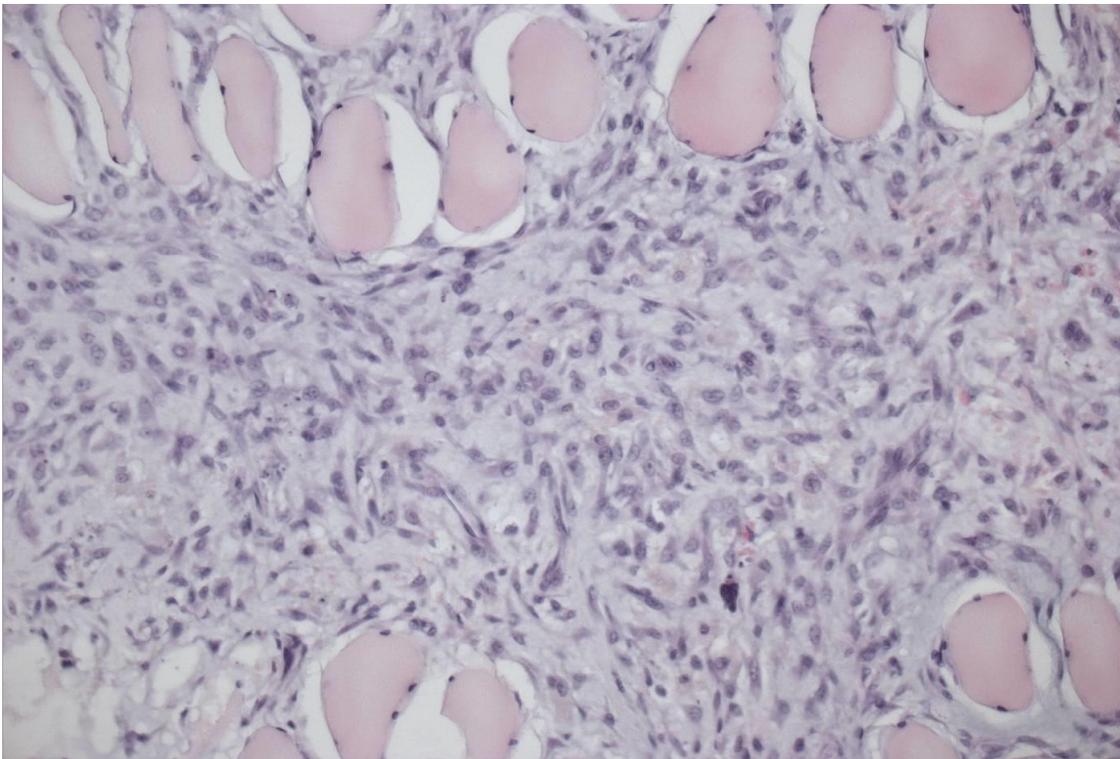


Figura 14. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. PRIMERA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AXCAOBMP-2. Detalle del tejido muscular infiltrado por las yemas vasculares del tejido inflamatorio.

Las muestras obtenidas a las dos semanas se procesaron de la siguiente manera.

Las muestras control del muslo izquierdo correspondiente a la infección por adenovirus GFP se examinaron en el microscopio de fluorescencia.

Las muestras del muslo derecho fijadas con formaldehído se tiñeron con hematoxilina-eosina. El estudio histológico permite ver junto a células musculares proliferación de gran cantidad de células mesenquimales y, junto a ellas, zonas de proliferación de condrocitos y áreas de osificación siguiendo un patrón de osificación endocondral (figuras 15 a 21).

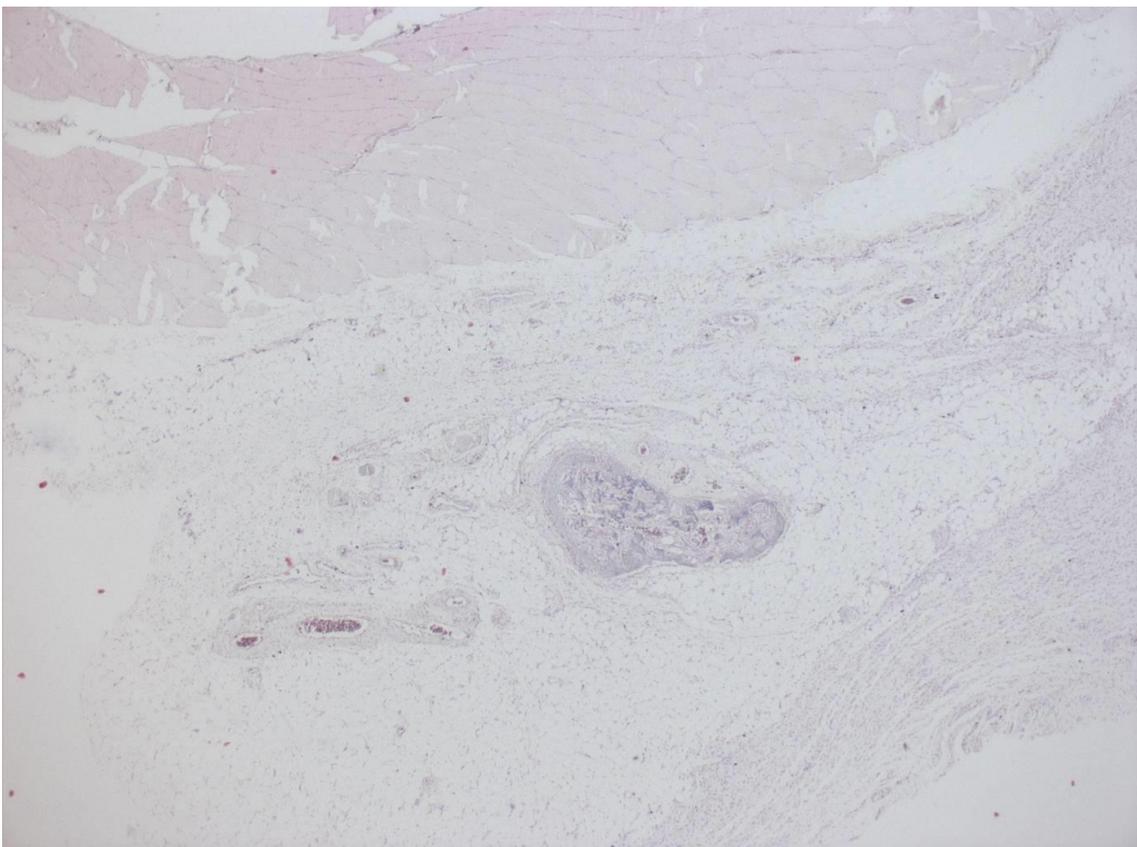


Figura 15. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Histología con hematoxilina-eosina del tejido muscular a las dos semanas de la infección con los adenovirus AxCAOBMP-2. Aparición de condrocitos que nos recuerdan un patrón de osificación endocondral.

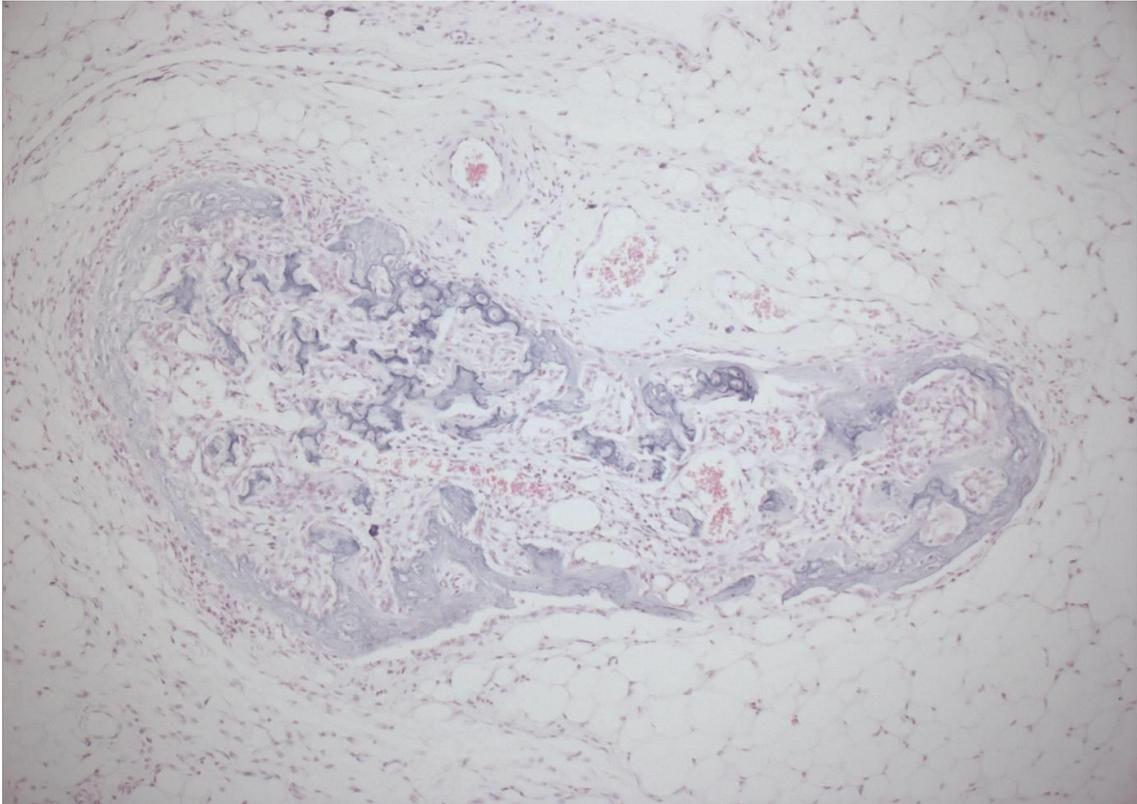


Figura 16. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico donde se aprecia la proliferación de condrocitos y las primeras trabéculas óseas siguiendo un patrón de osificación endocondral.

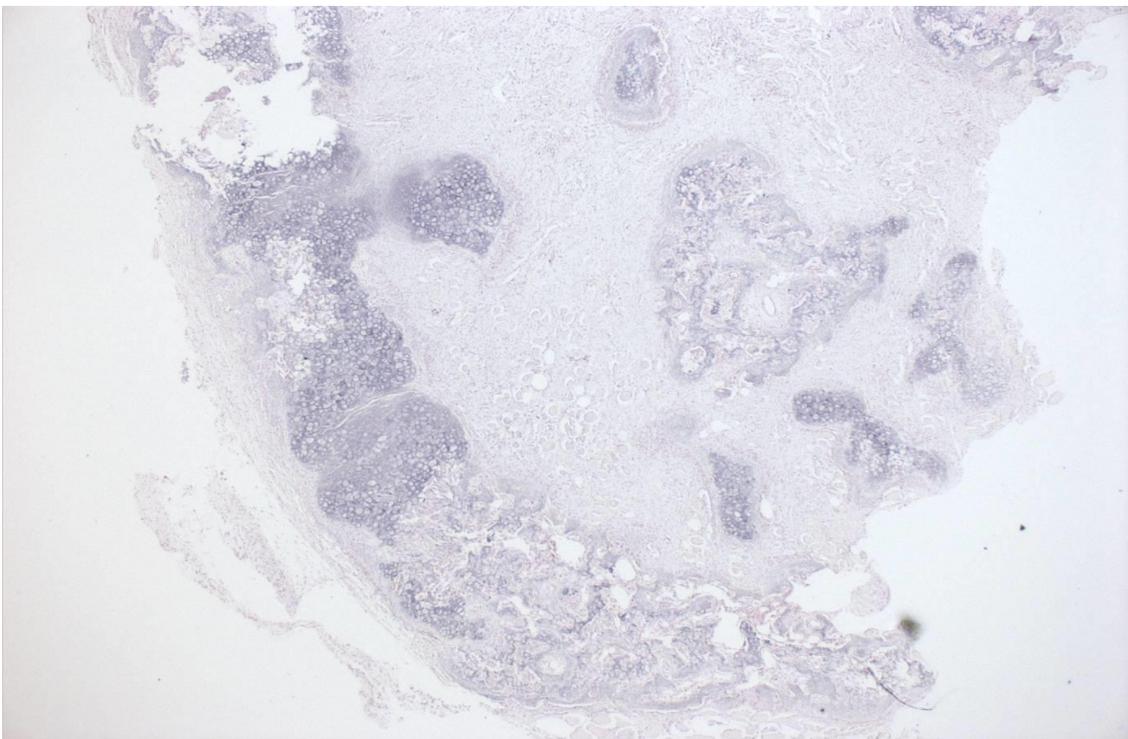


Figura 17. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Proliferación de condrocitos y aparición de trabéculas óseas siguiendo un patrón de osificación endocondral.

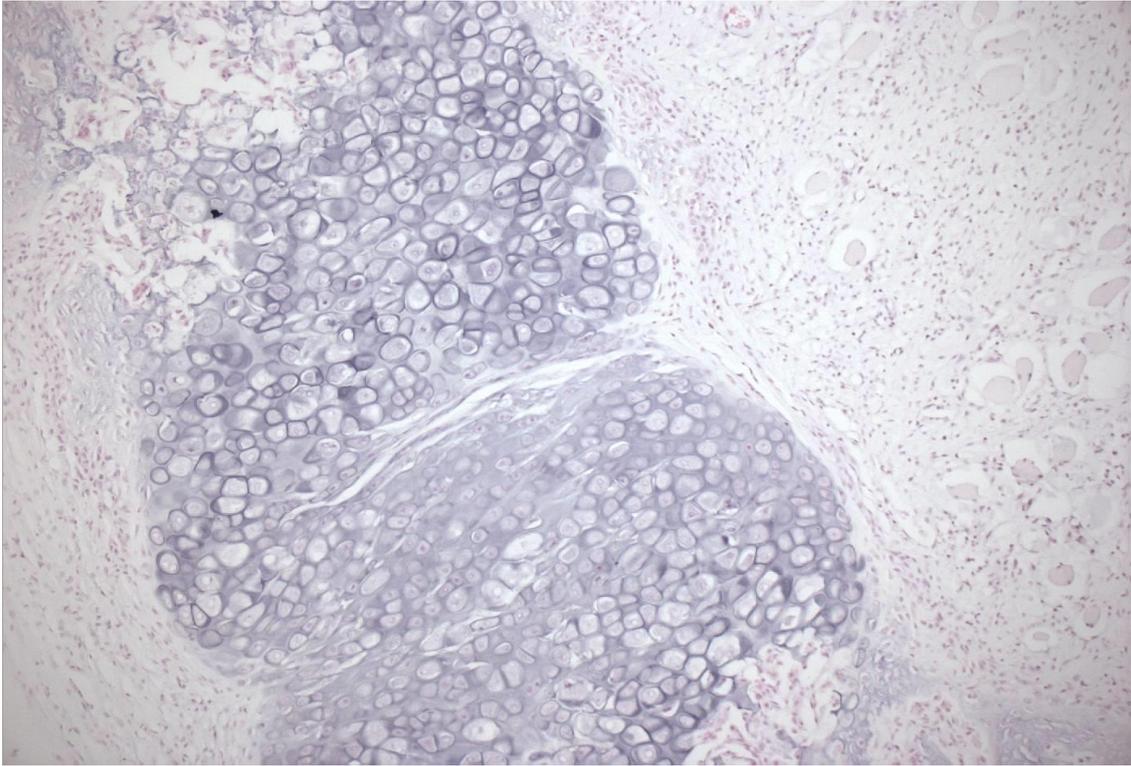


Figura 18. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Agrupaciones de condrocitos que formarán los núcleos de osificación endocondral.

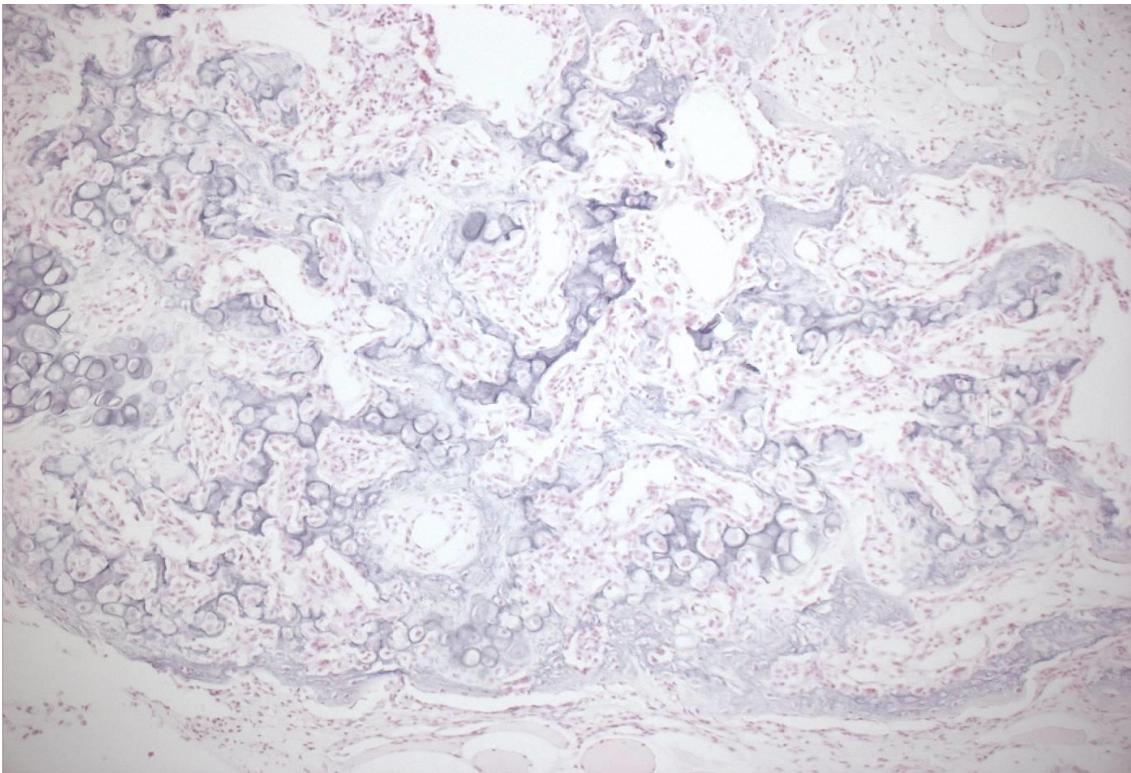


Figura 19. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Condrocitos y focos de osificación endocondral. Formación de trabéculas óseas.

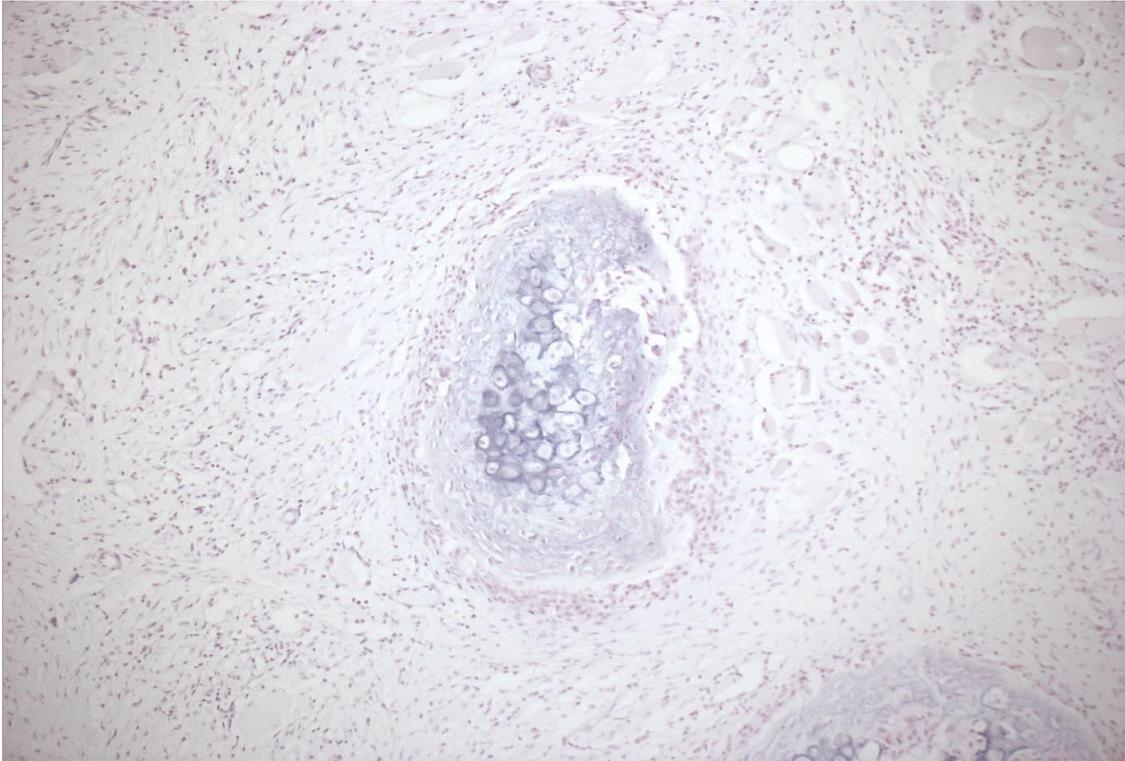


Figura 20. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle de la aparición en el tejido conectivo de formaciones de condrocitos que darán lugar a los núcleos de osificación endocondral.

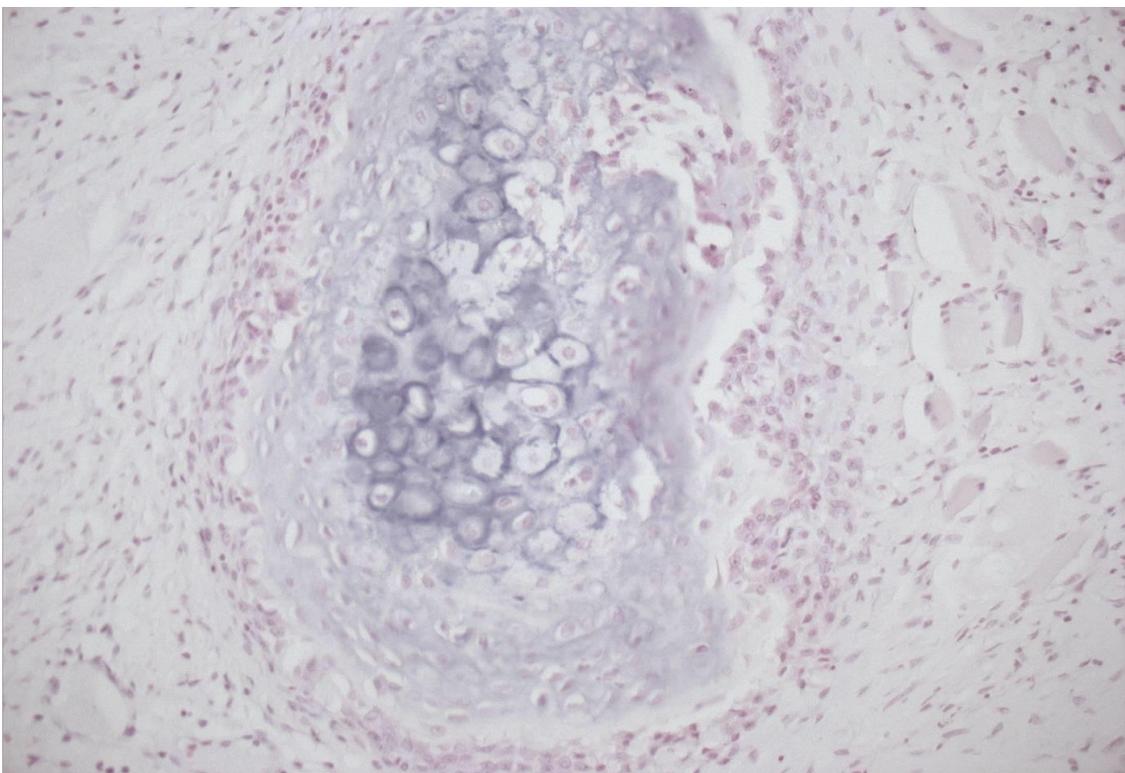


Figura 21. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. SEGUNDA SEMANA. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle las formaciones de condrocitos origen de los núcleos de osificación endocondral.

El tercer animal se sacrificó a las 3 semanas realizándose previamente control radiológico de ambos muslos. El muslo izquierdo con apariencia radiológica normal y el muslo derecho con imagen radiológica de densidad ósea en el recto anterior del cuádriceps del animal coincidiendo con el área de infección de las partículas virales AxCAOBMP-2 (figura 22).



Figura 22. RADIOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica del muslo infectado con AxCAOBMP-2 a las 3 semanas.

La muestra del lado derecho fijada con formaldehído se tiñó con hematoxilina-eosina y se procesó para descalcificación de la muestra. El examen histológico permitió ver áreas musculares, áreas de osificación endocondral y áreas de tejido óseo correspondiente a trabéculas de hueso esponjoso (figuras 23 a 29).

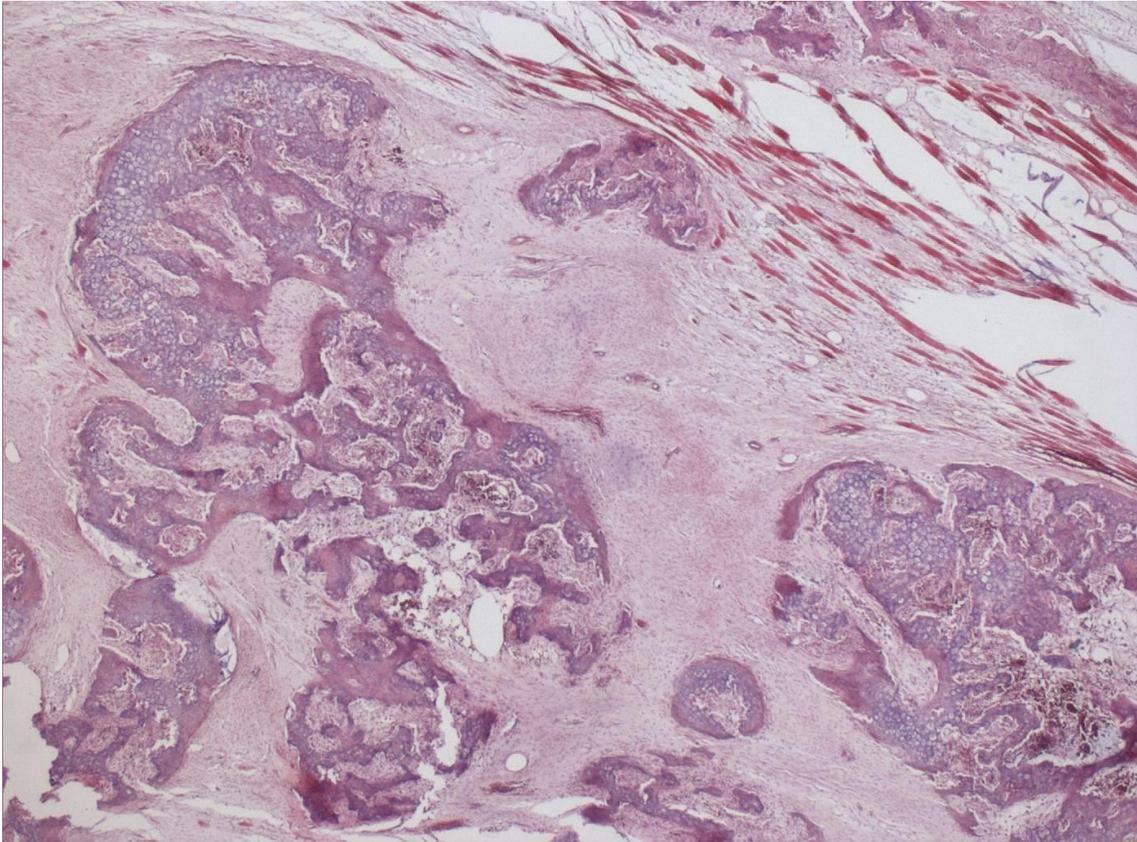


Figura 23. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Histología del muslo infectado con AxCAOBMP-2 a las 3 semanas Se puede distinguir tejido muscular, tejido conectivo y la formación de trabéculas óseas a partir de las agrupaciones de condrocitos.

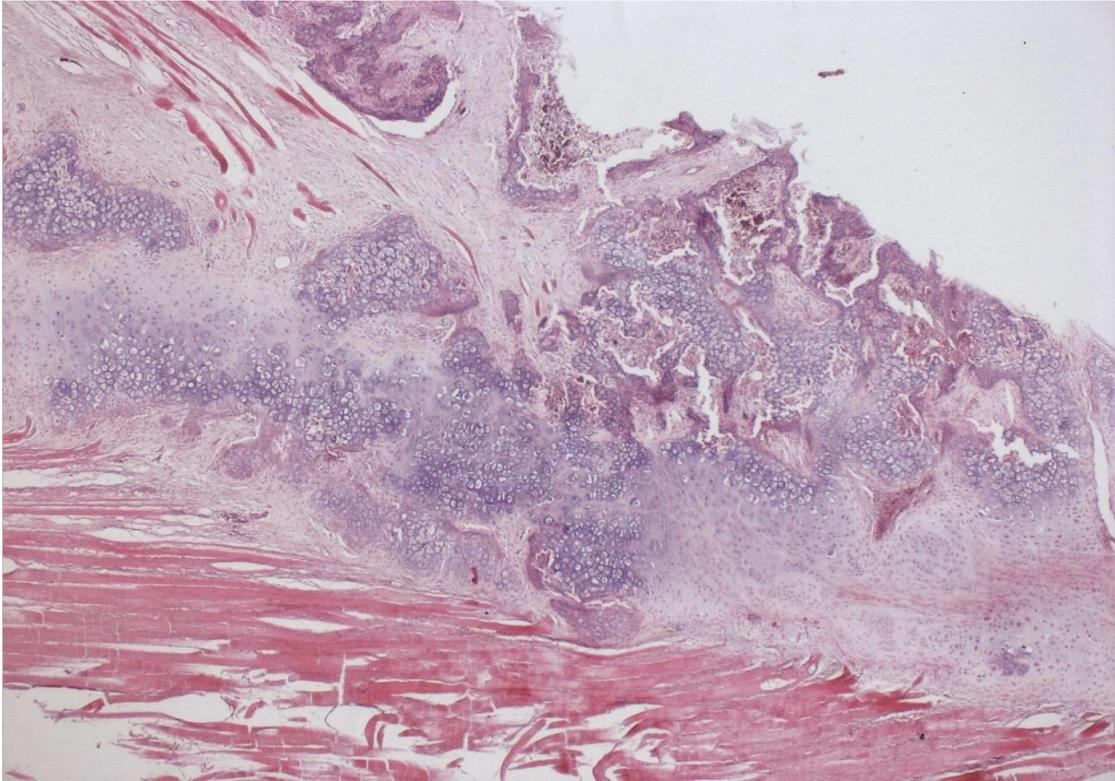


Figura 24. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Fibras musculares y tejido conectivo con diferenciación de los fibroblastos hacia condrocitos y la aparición de trabéculas óseas a partir de los condrocitos.

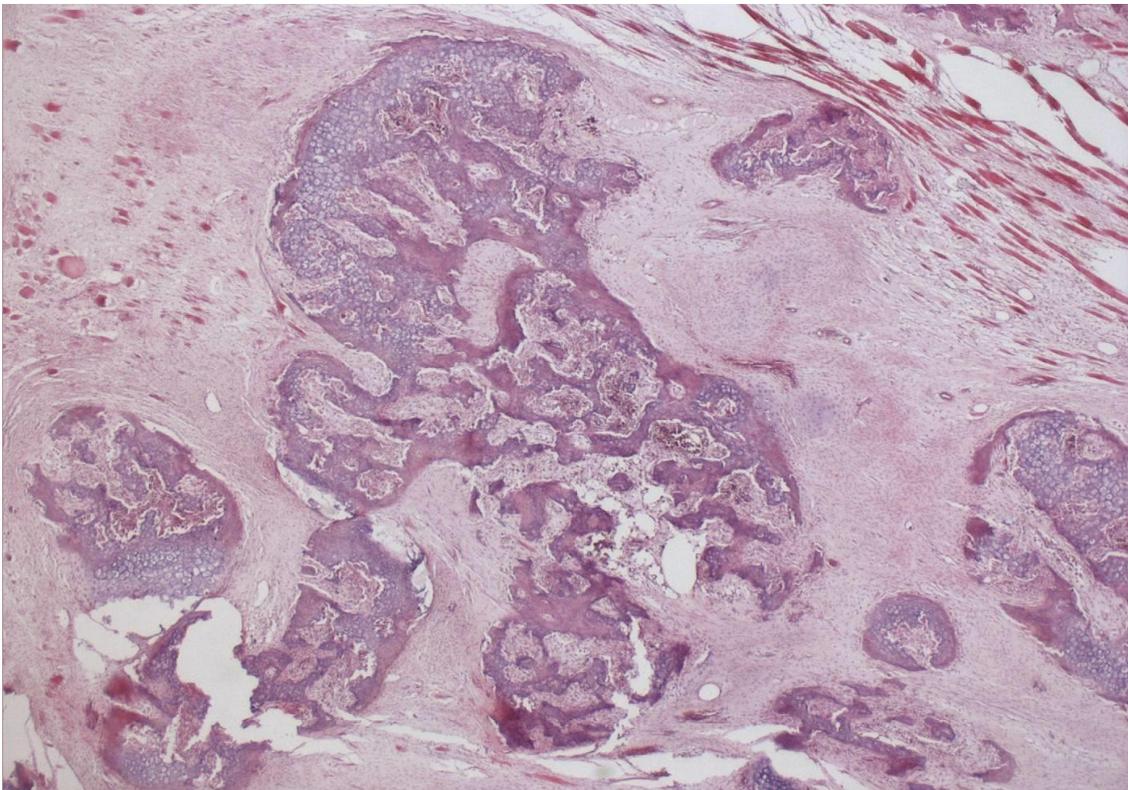


Figura 25. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Formación de trabéculas óseas a partir de los condrocitos.

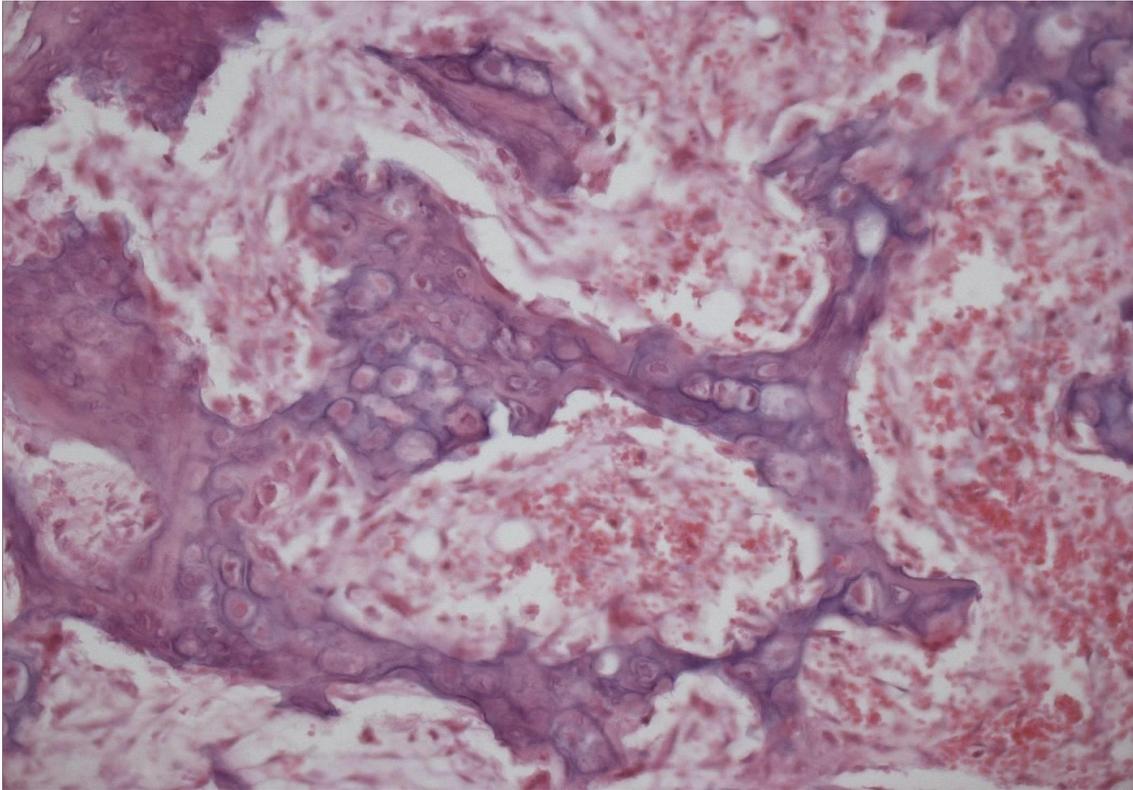


Figura 26. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico de osificación endocondral. Formaciones de condrocitos que se diferencian hacia tejido óseo.

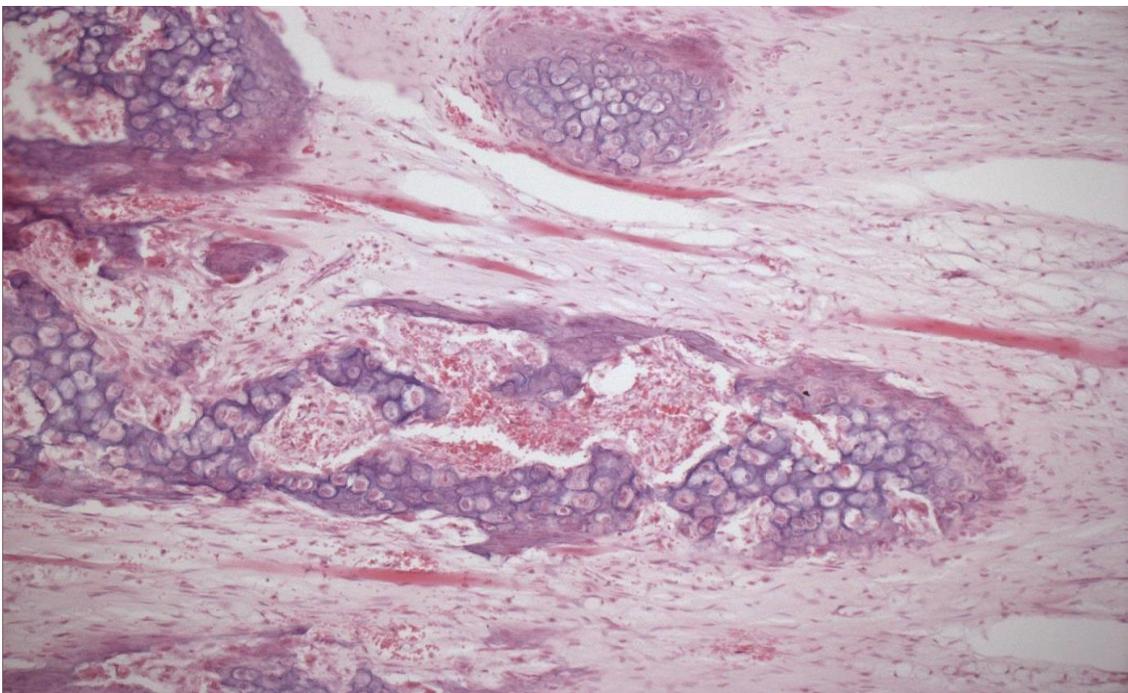


Figura 27. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Formaciones de condrocitos en el tejido conectivo que se diferencian hacia tejido óseo y adquieren un patrón trabecular.

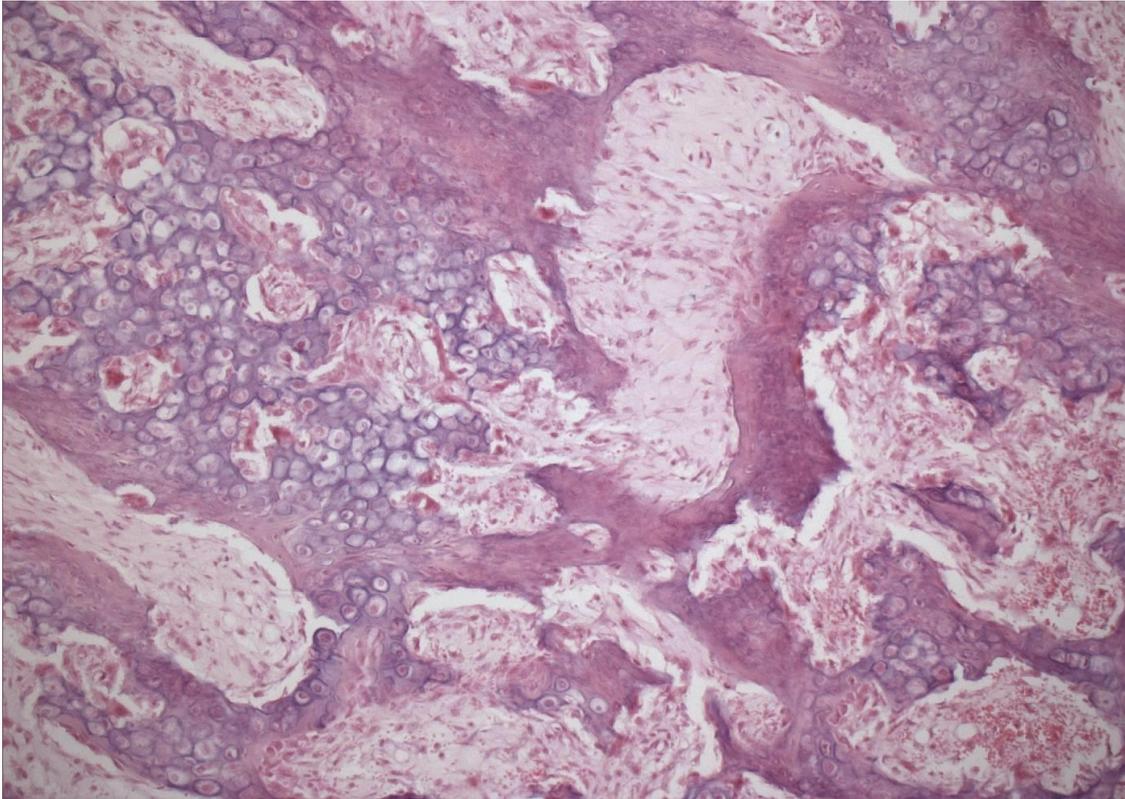


Figura 28. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Tejido conectivo con fibroblastos. Condrocitos y su diferenciación hacia osteoblastos formadores de tejido óseo que se dispone en trabéculas.

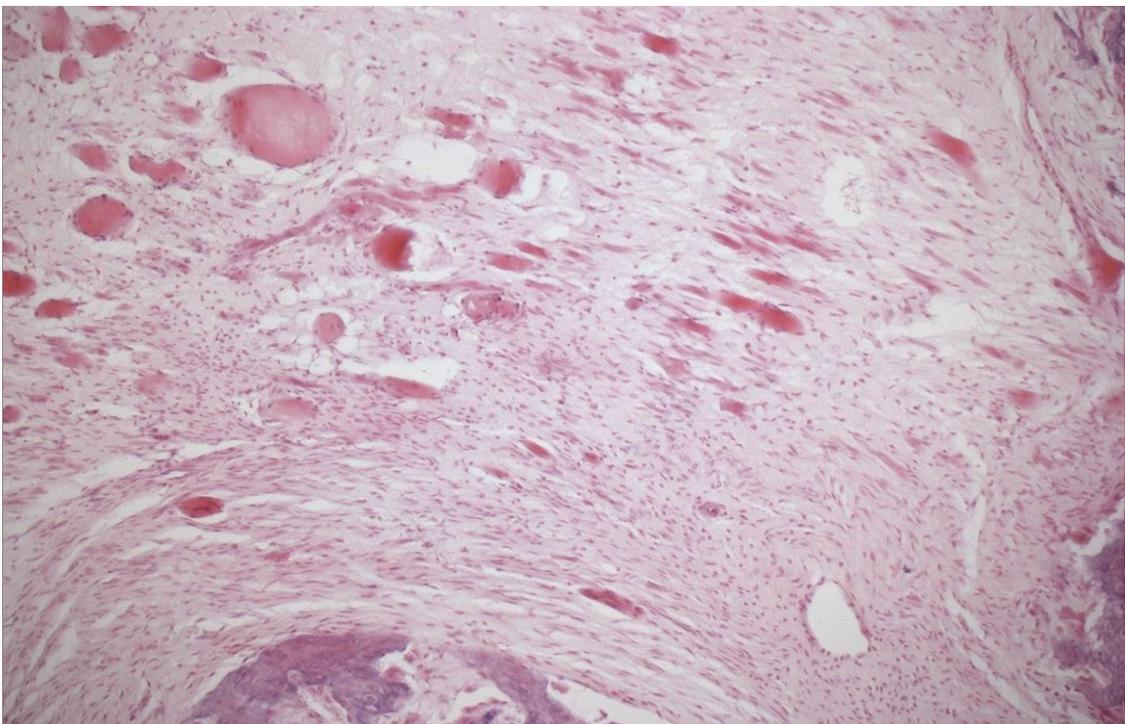


Figura 29. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Tejido conectivo con gran cantidad de fibroblastos y algunas células musculares y un núcleo de osificación endocondral.

El cuarto animal se sacrificó a las seis semanas realizándose también previamente controles radiológicos. El muslo izquierdo con imagen radiológica normal y el muslo derecho con imagen radiológica de osificación en recto anterior del cuádriceps (figuras 30-31).



Figura 30. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA II. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCBOBMP-2. Imagen radiológica a las 3 semanas del animal que se sacrificará a las 6 semanas. Osificación en el cuádriceps del muslo infectado con el adenovirus AxCBOBMP-2.



Figura 31. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica a las 6 semanas del animal . Osificación en el cuádriceps que ya se apreciaba a las 3 semanas. A las 6 semanas hay mayor extensión de la osificación y mayor densidad radiológica en el área de osificación del cuádriceps infectado.

La muestra del muslo derecho fijada con formaldehído se trató para su descalcificación y posterior tinción con hematoxilina-eosina. La histología de la muestra permite ver tejido óseo caracterizado por trabéculas de hueso esponjoso con espacios de médula ósea entre los mismos. No se aprecian elementos hematopoyéticos en los espacios medulares (figuras 32 a 38).

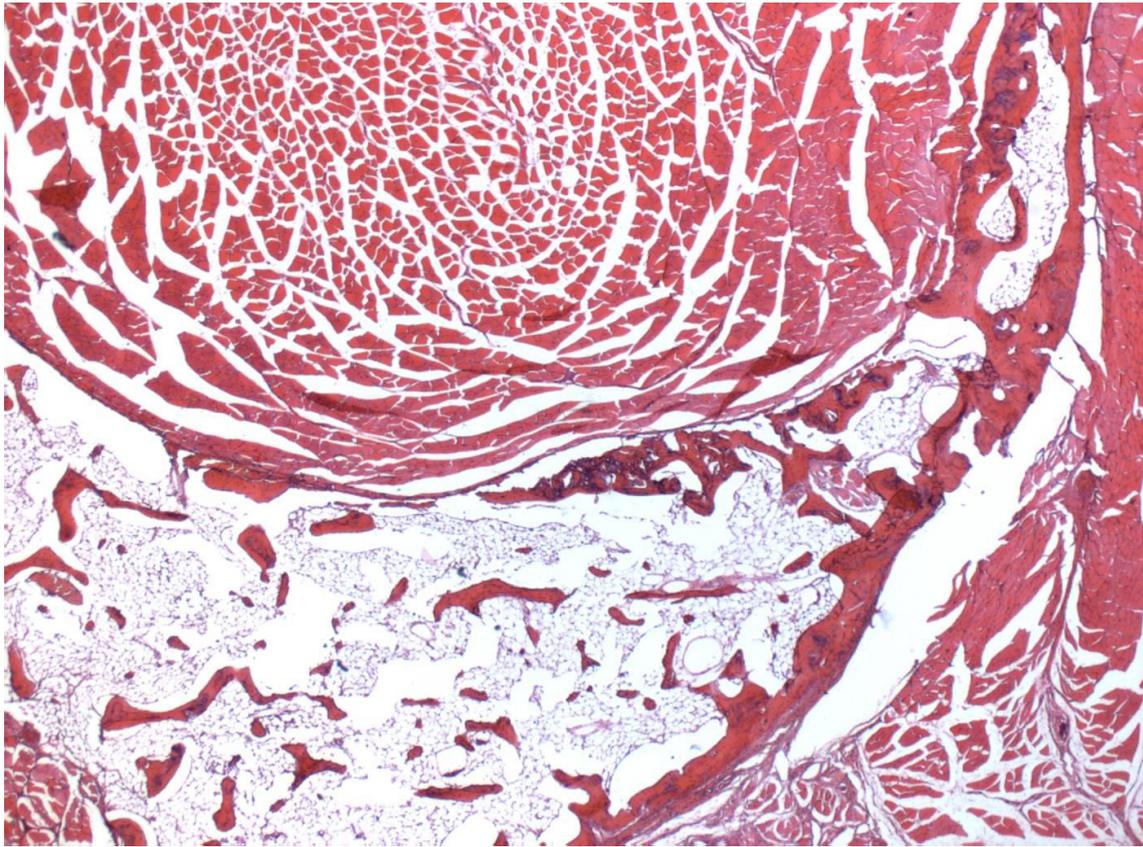


Figura 32. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Histología de la muestra del muslo derecho del animal sacrificado a las 6 semanas con tinción hematoxilina-eosina. Tejido óseo (trabéculas de hueso esponjoso) intercaladas en el tejido muscular.

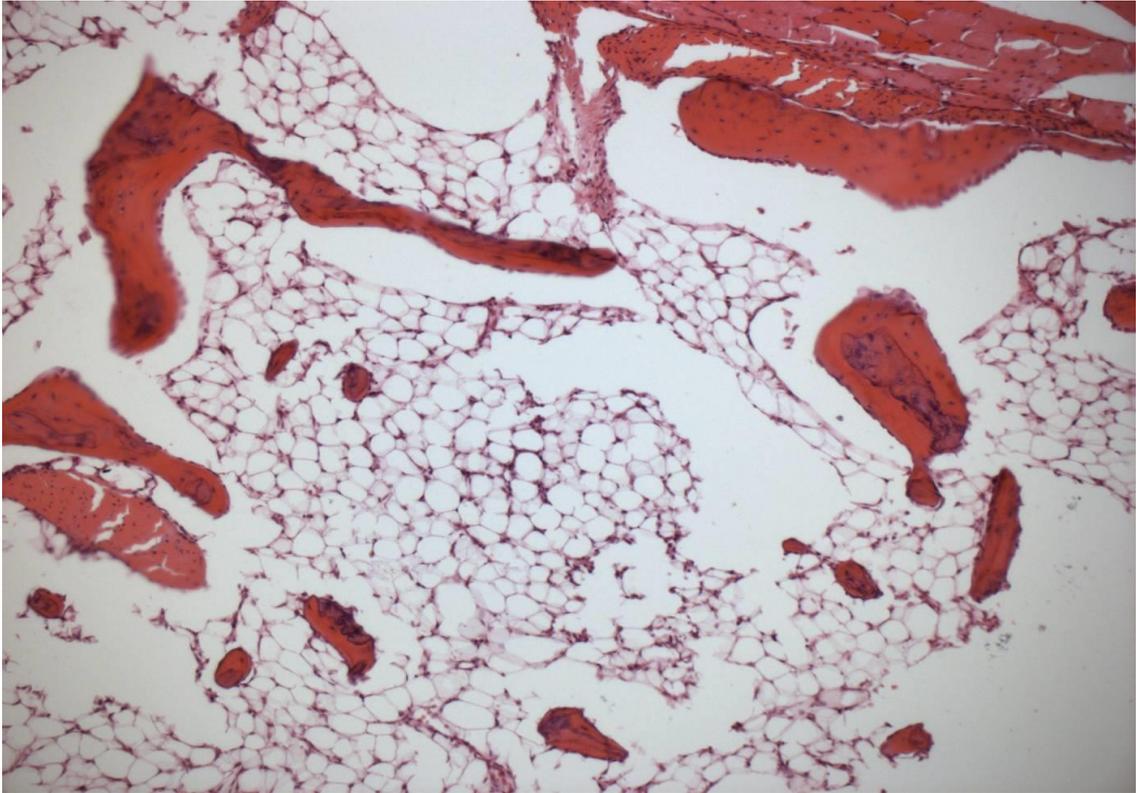


Figura 33. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Trabéculas óseas y elementos medulares entre las trabéculas del hueso esponjoso.

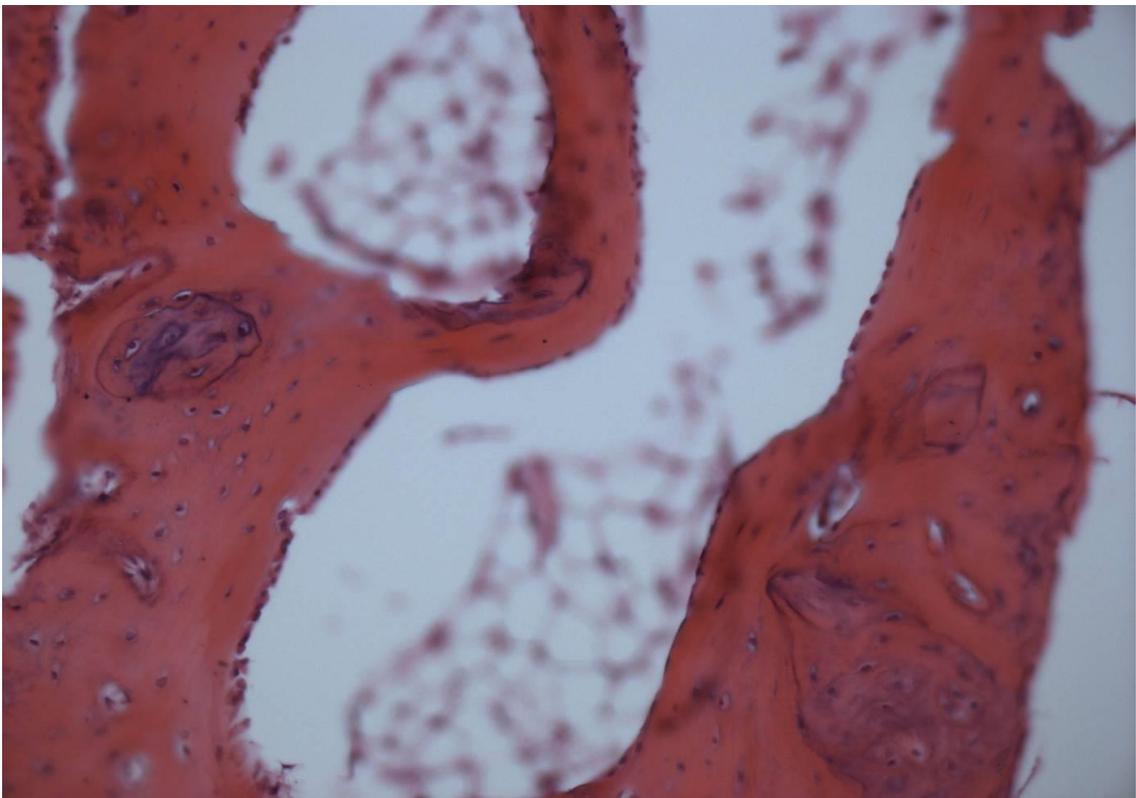


Figura 34. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico de las trabéculas óseas. Osteocitos en la matriz mineral que ha sido descalcificada para su tinción con hematoxilina-eosina.

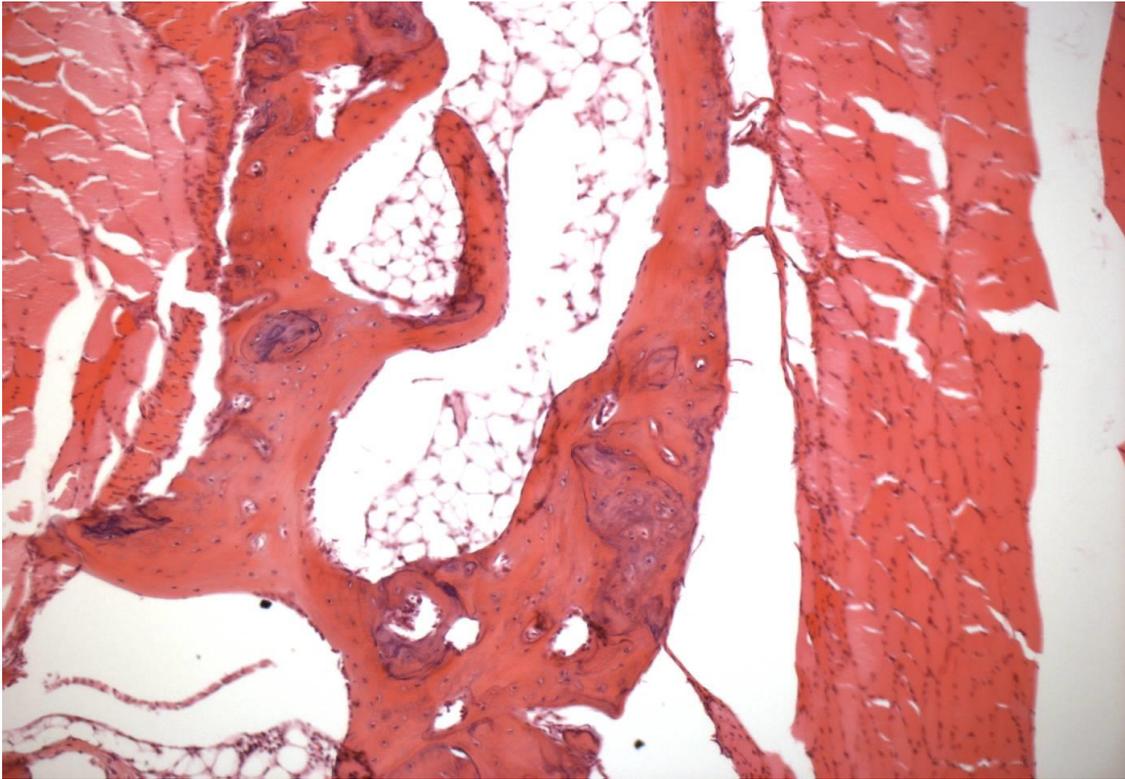


Figura 35. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Trabéculas óseas y espacios de médula ósea sin elementos hematopoyéticos.

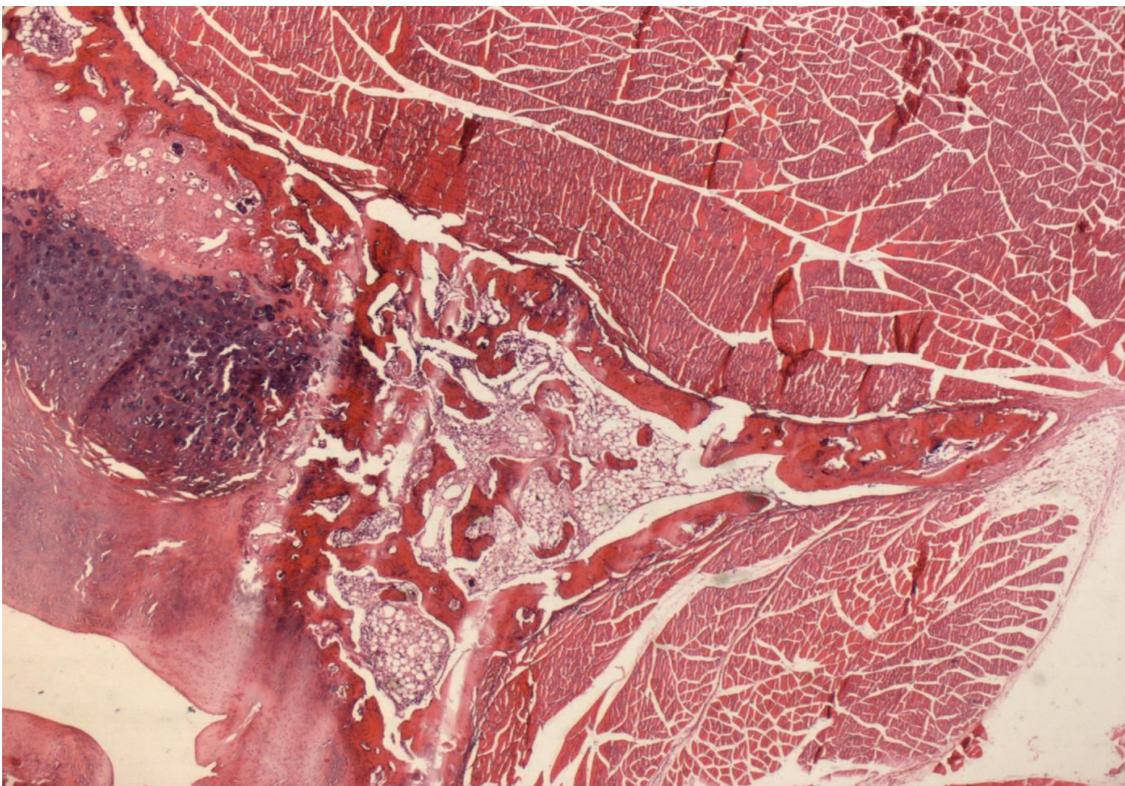


Figura 36. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Tejido muscular junto a un área de proliferación de condrocitos y un área de tejido óseo esponjoso (osificación endocondral).

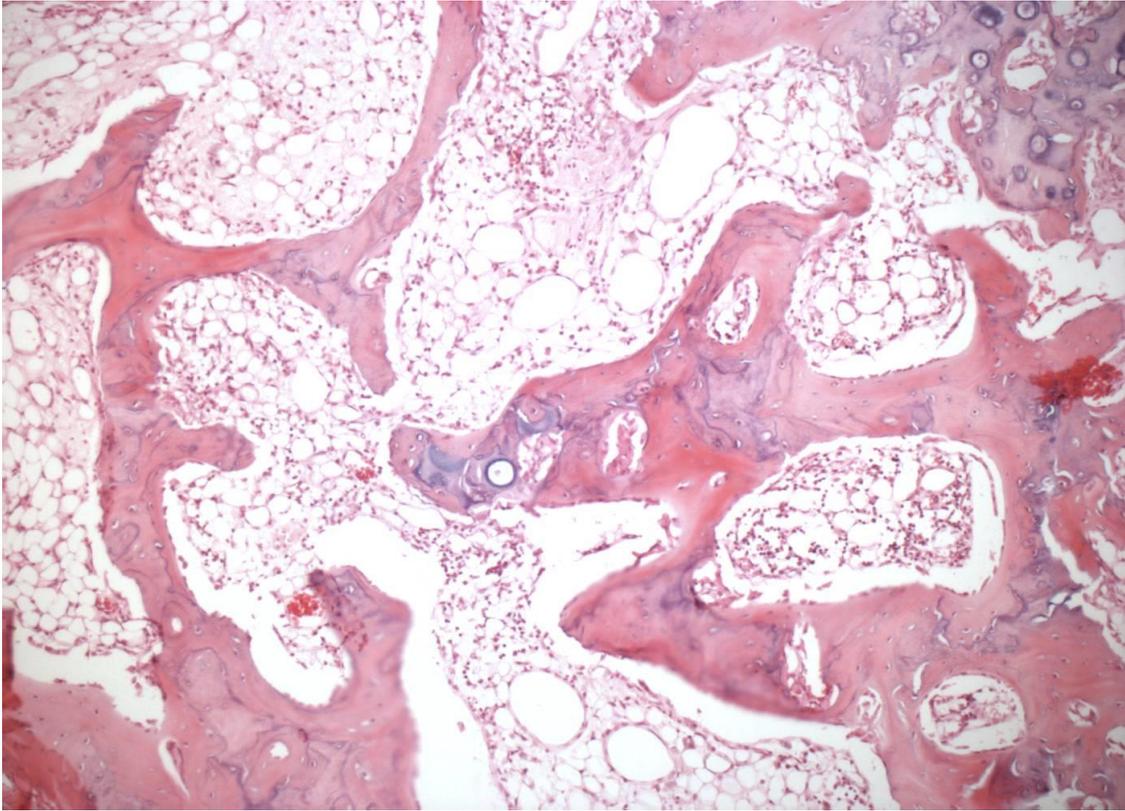


Figura 37. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Detalle histológico de las trabéculas óseas del hueso esponjoso osteoinducido.

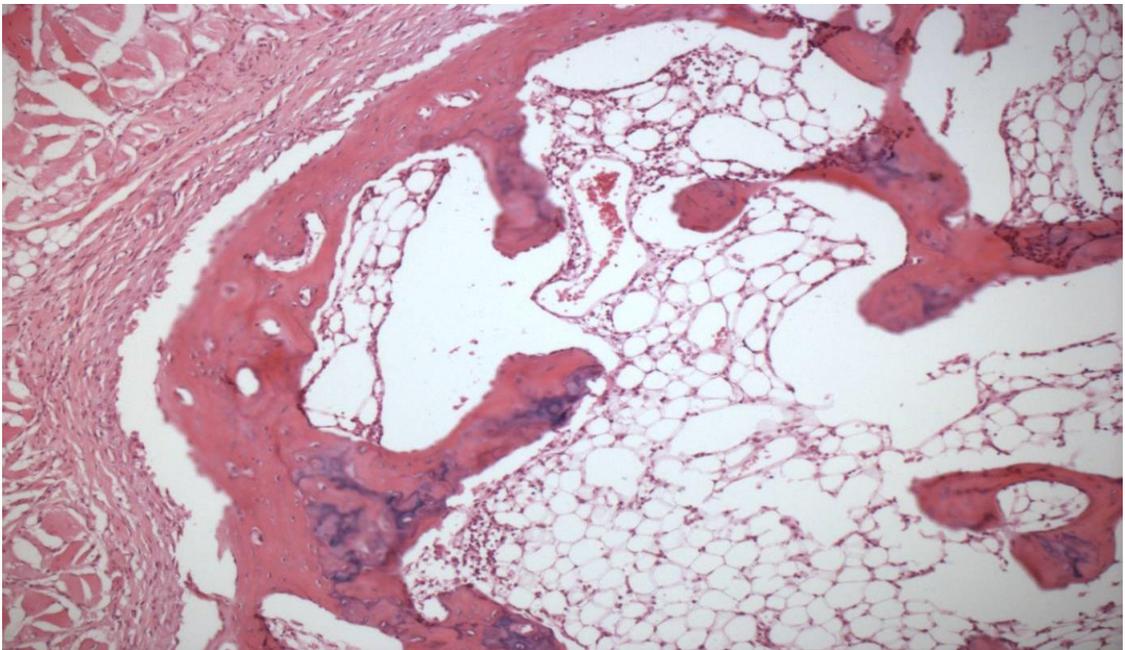


Figura 38. HISTOLOGIA EXPERIENCIA II. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Trabéculas óseas de hueso esponjoso osteoinducido.

### 7.3. RESULTADOS EXPERIENCIA III: INFECCION IN VITRO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA CON EL ADENOVIRUS AxCAOBMP-2 Y POSTERIOR INYECCIÓN DE LAS CÉLULAS INFECTADAS EN EL MODELO ANIMAL.

A las cuatro semanas se realizaron radiografías de ambos muslos. El muslo control sin observarse ningún hallazgo radiológico significativo y el muslo derecho observándose una imagen de densidad ósea a nivel del punto de inyección de las células infectadas con el adenovirus AxCAOBMP-2 en el cuádriceps (figuras 39-40).

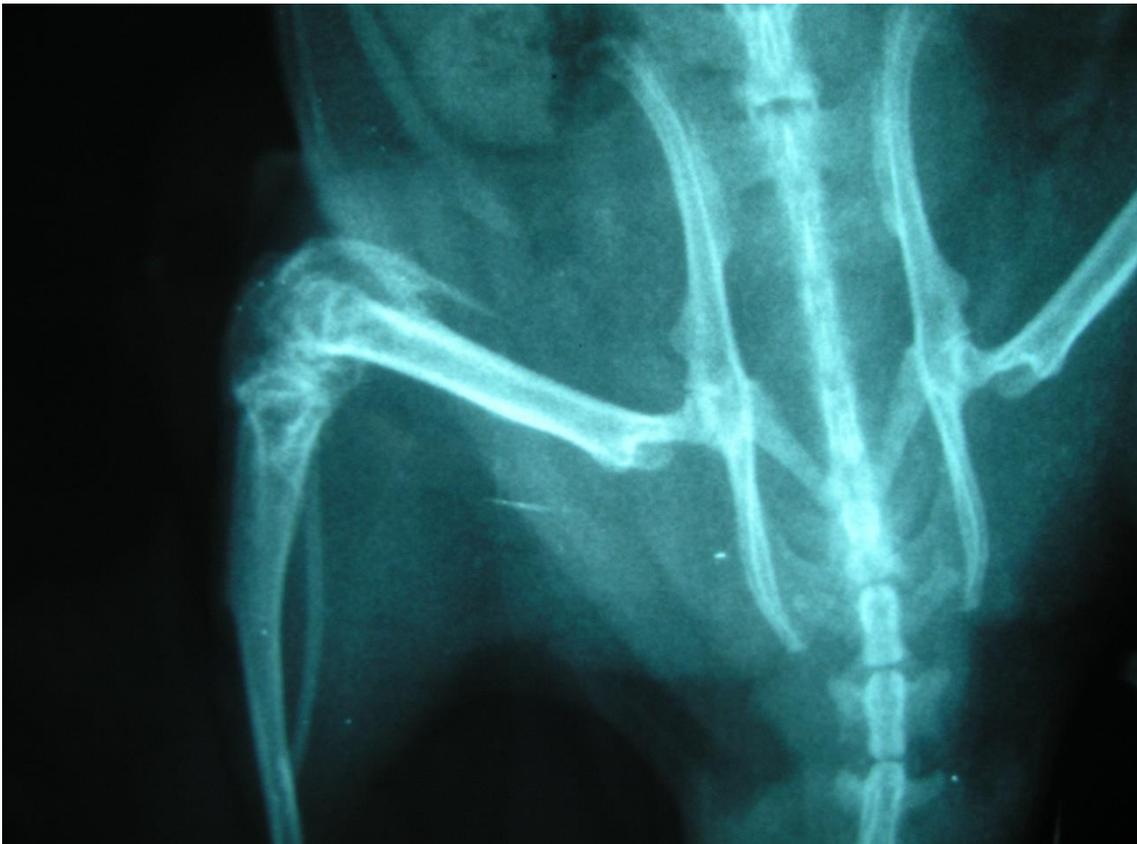


Figura 39. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO DE CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica del muslo derecho a las 4 semanas: cuádriceps inyectado con células previamente infectadas con los adenovirus AxCAOBMP-2. Área de osificación en el tercio distal del cuádriceps.



Figura 40. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CONTROL Imagen del mulso izquierdo: inyección con células infectadas con el adenovirus GFP. No se evidencia osificación en el punto de inyección en el cuádriceps.

Tras los controles radiológicos se sacrificaron los cuatro animales extrayéndose las muestras del lado izquierdo para examen con el microscopio de fluorescencia y las muestras del lado derecho para la tinción con hematoxilina-eosina.

Las muestras del lado izquierdo presentaban fluorescencia positiva en el microscopio de fluorescencia.

Las muestras del lado derecho teñidas con hematoxilina-eosina demostraban que a nivel del punto de inyección muscular existía un área de osificación endocondral junto a trabéculas óseas (figuras 41 a 43).

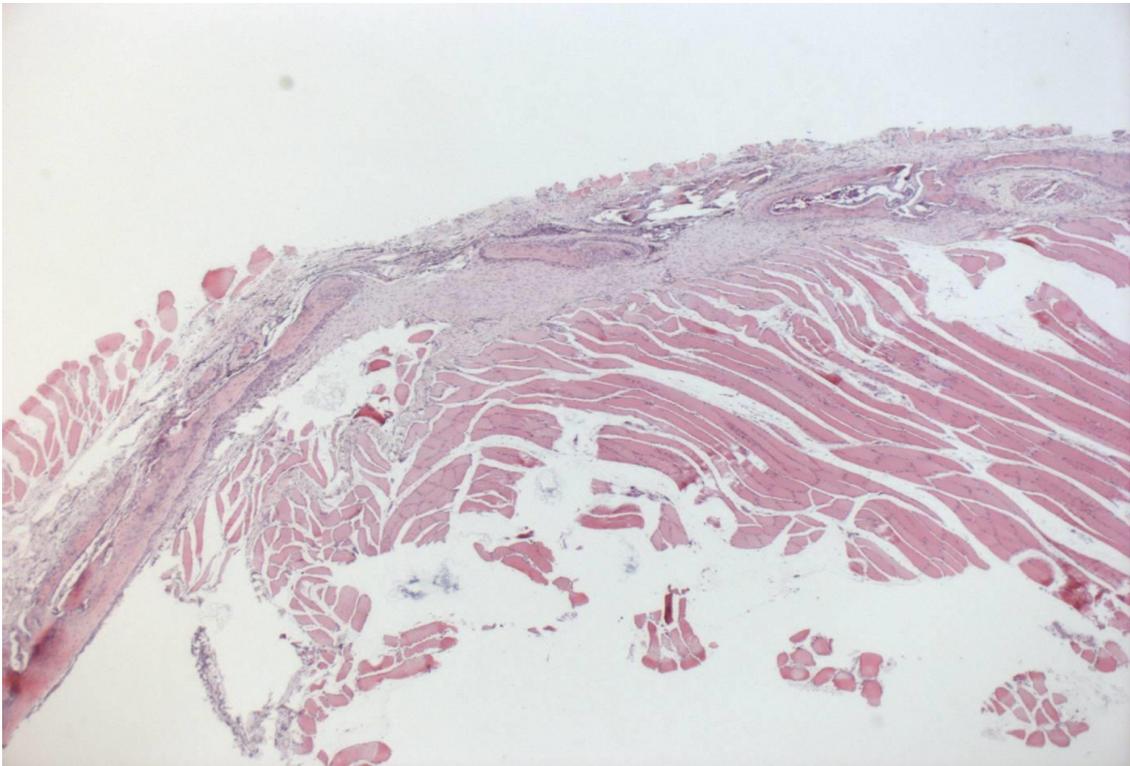


Figura 41. HISTOLOGIA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CON CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Tinción hematoxilina-eosina para las muestras del lado derecho. Cuádriceps con inyección de células infectadas con el adenovirus AxCAOBMP-2. Tejido muscular con áreas de osificación.

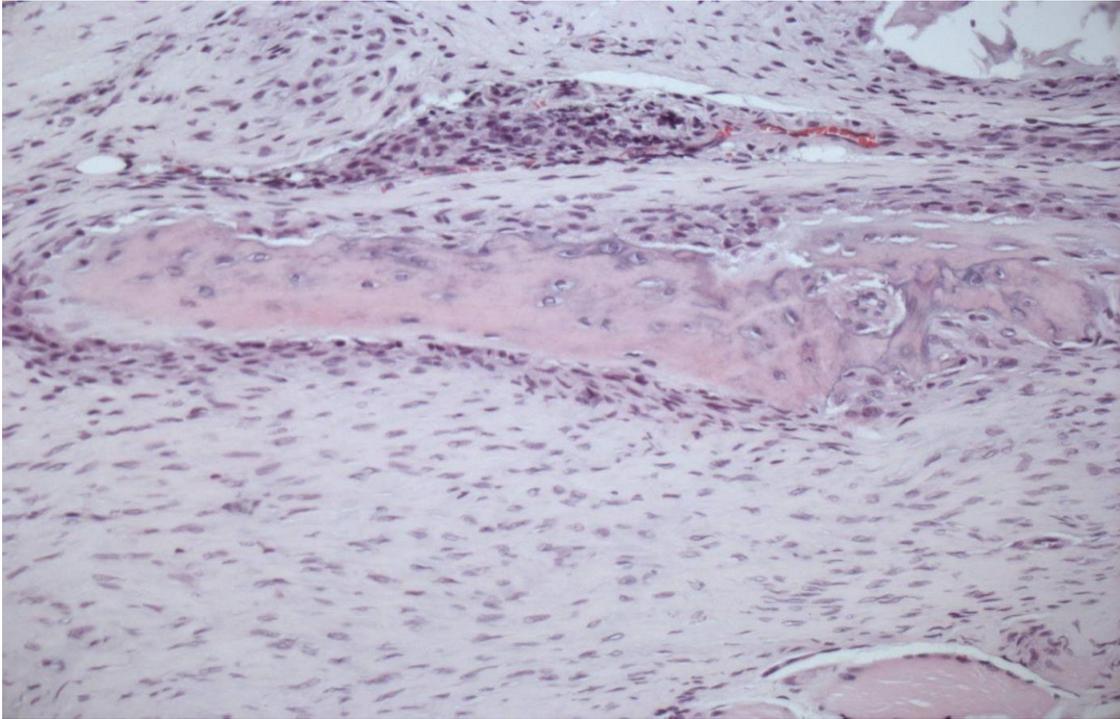


Figura 42. HISTOLOGIA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CON CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Detalles histológicos de las áreas de osificación de las muestras tomadas de los muslos derechos correspondientes a los puntos de inyección con las células infectadas por los adenovirus AxCAOBMP-2. Imágenes de trabéculas óseas intercaladas entre células con aspecto de fibroblastos.

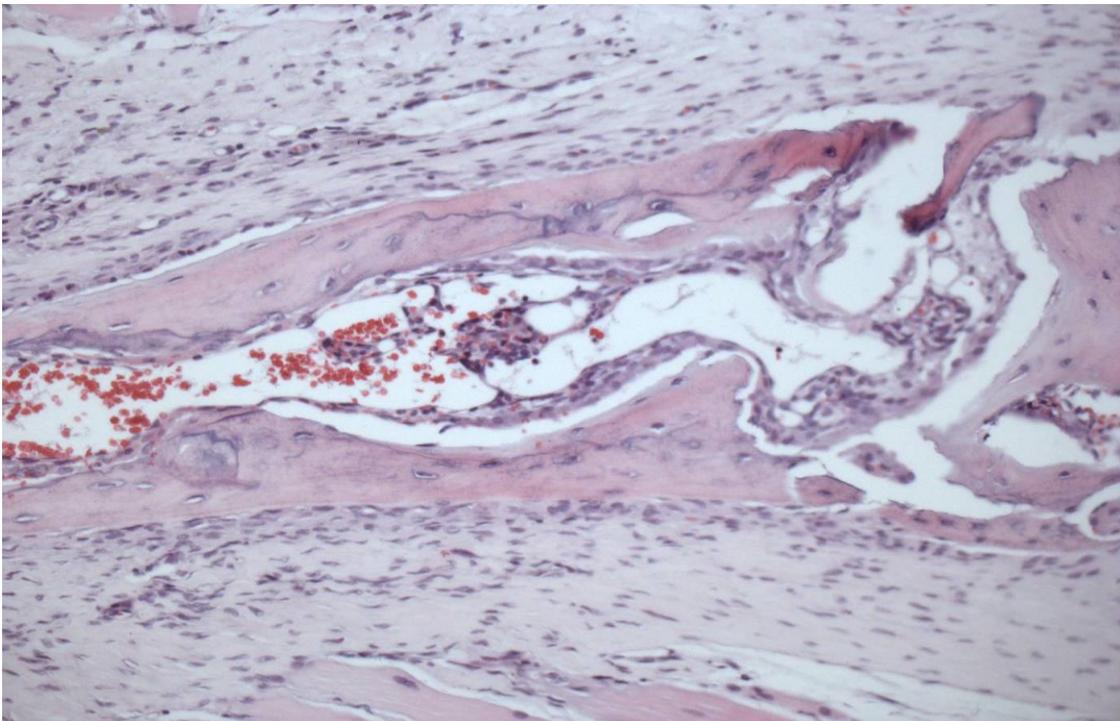


Figura 43. HISTOLOGIA EXPERIENCIA III. 4 SEMANAS. GRUPO CON CELULAS INFECTADAS CON AxCAOBMP-2. Imagen de detalle de trabéculas óseas intercaladas células con aspecto de fibroblastos.

#### 7.4 RESULTADOS EXPERIENCIA IV: APLICACIÓN DE TERAPIA GÉNICA EN UN DEFECTO ÓSEO A NIVEL DE LA DIAFISIS DEL FÉMUR EN RATA LEWIS.

Las 6 ratas intervenidas se distribuyeron en dos grupos. El grupo control (3 ratas) en los que se creaba un defecto óseo crítico en el fémur y no se trataban con el adenovirus y el otro grupo (3 ratas) en las que se creaba un defecto óseo crítico similar pero se realizó una infección in vivo con los adenovirus AxCAOBMP-2.

Los controles radiológicos a las 3 semanas en los fémures del grupo control mostraron los defectos óseos en los fémures de las ratas sin consolidar (figuras 44-45).

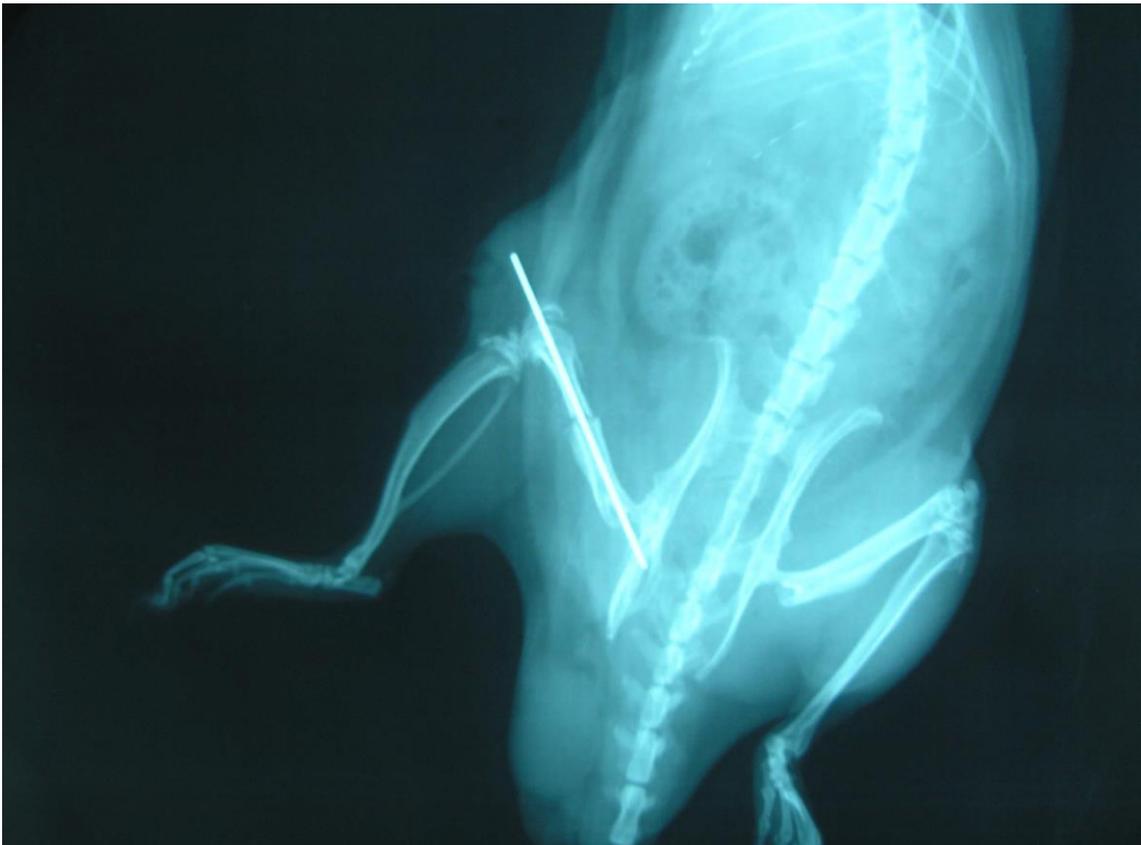


Figura 44. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen radiológica a las 3 semanas del fémur de rata del grupo control: no consolidación del defecto en la diáfisis del fémur.



Figura 45. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen radiológica a las 3 semanas del fémur de otro animal del grupo control. Fijación con aguja sin evidencia de consolidación en el defecto óseo.

Los controles radiológicos a las 3 semanas de las ratas del grupo infectado con los adenovirus AxCAOBMP-2 mostraban neoformación ósea interpuesta en el defecto óseo (figuras 46 a 48).

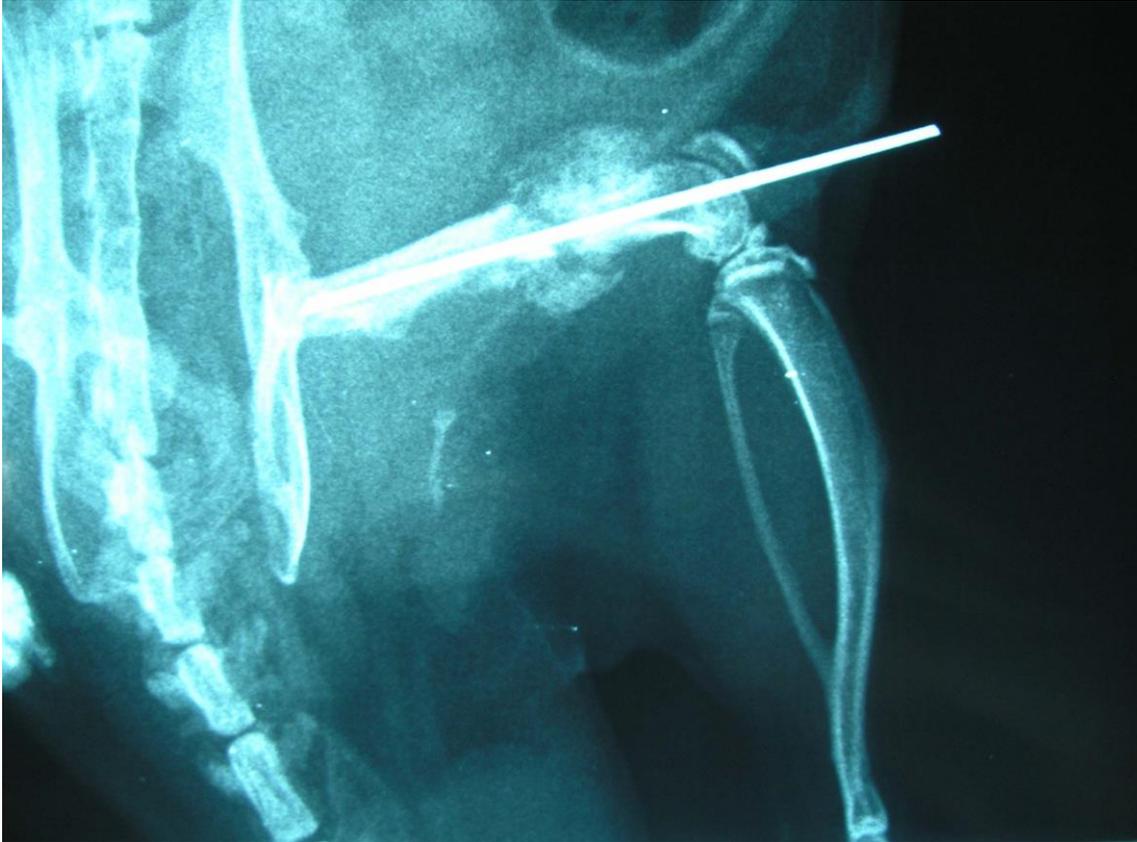


Figura 46. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica también a las 3 semanas pero correspondientes al fémur un animal del grupo que se aplicó el adenovirus AxCAOBMP-2. Se aprecia formación ósea en el defecto de la diáfisis femoral.

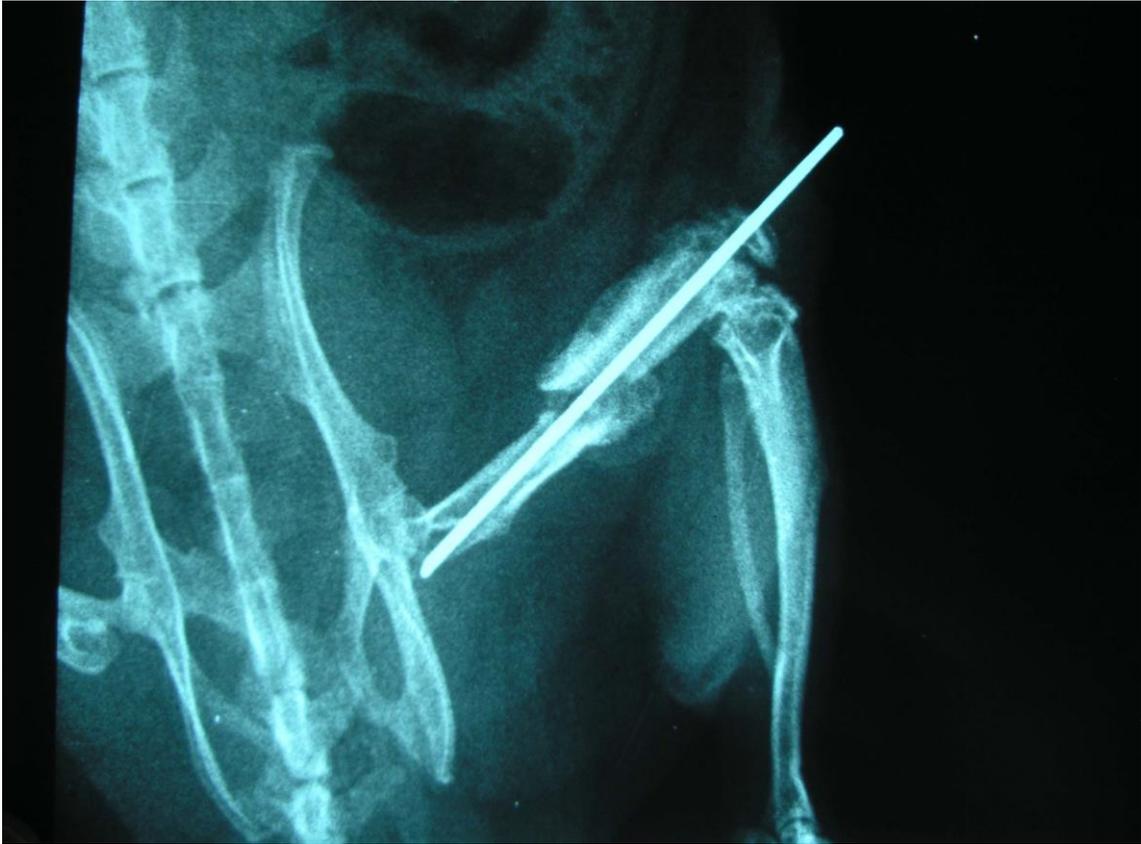


Figura 47. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON A<sub>x</sub>CAOBMP-2. Imagen también correspondiente a las 3 semanas del fémur de un animal que se trató con el adenovirus A<sub>x</sub>CAOBMP-2. Se evidencia formación de hueso en el defecto diafisario femoral.



Figura 48. RADIOLOGÍA EXPERIENCIA IV. 3 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica a las 3 semanas del fémur de un tercer animal correspondiente al grupo tratado con el adenovirus AxC AO B MP-2. Se evidencia también consolidación en el defecto diafisario.

Los controles radiológicos a las 6 semanas en el grupo de las ratas infectadas con el adenovirus AxCAOBMP-2 mostraban signos de consolidación en los defectos diafisarios del fémur incluso retirando la inmovilización con la aguja intramedular (figuras 49 a 51).



Figura 49. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen radiológica a las 6 semanas de uno de los animales del grupo tratado con el adenovirus AxCAOBMP-2 . Se aprecia consolidación del fémur a pesar de la retirada del KW de fijación.



Figura 50. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen de control a las 6 semanas una de las ratas del grupo tratado con el adenovirus AxCAOBMP-2. Se evidencia consolidación del defecto diafisario femoral y osificación del cuádriceps.

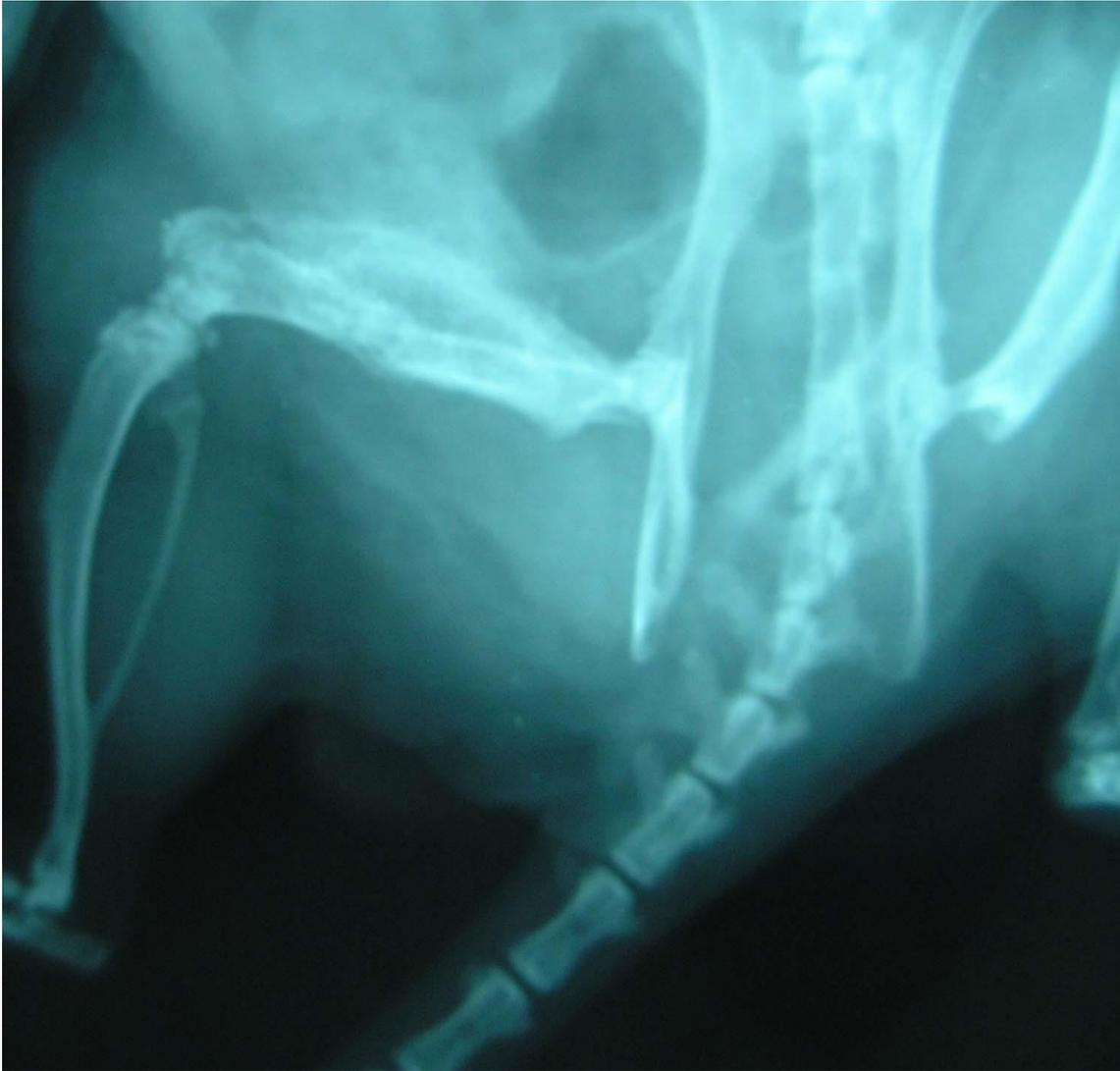


Figura 51. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO INFECTADO CON AxCAOBMP-2. Imagen a las 6 semanas del mismo animal del grupo tratado con el adenovirus AxCAOBMP-2 en el que se ha retirado la fijación.



Figura 52. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen a las 6 semanas del fémur de una de las ratas correspondientes al grupo control que no fue tratada con los adenovirus AxCAOBMP-2. No consolidación en el defecto óseo del fémur.



Figura 53. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen a las 6 semanas del fémur de otra de las ratas del grupo control que no fue tratada con los adenovirus AxCAOBMP-2. No consolidación del defecto óseo femoral.

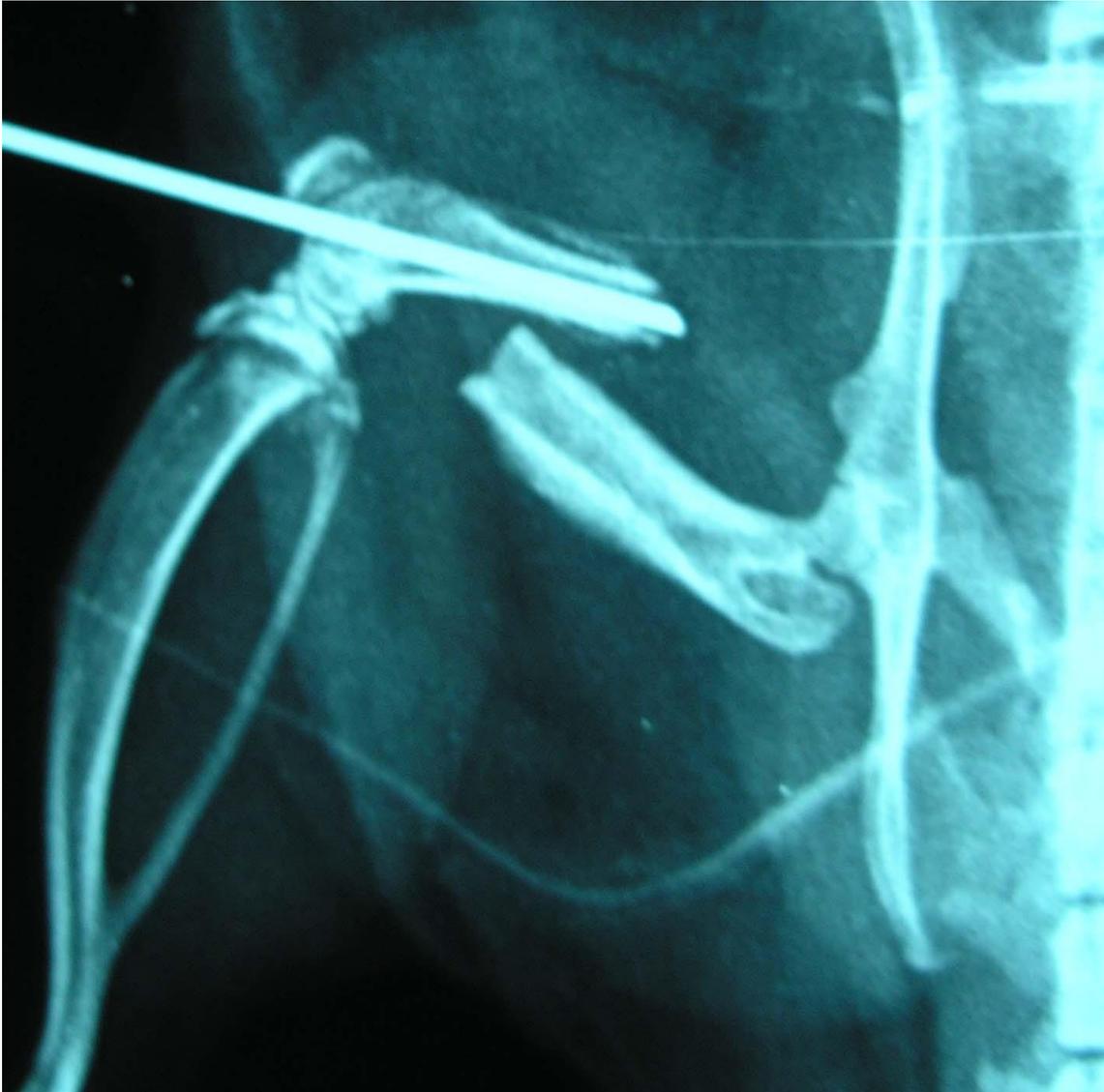


Figura 54. RADIOLOGIA EXPERIENCIA IV. 6 SEMANAS. GRUPO CONTROL. Imagen a las 6 semanas del fémur de otra de las ratas del grupo control que no fue tratada con los adenovirus AxCAOBMP-2 . No consolidación ósea en el defecto diafisario femoral.

En definitiva los animales del grupo control no tuvieron consolidación ósea como demostraron los controles radiológicos a las 3 y a las 6 semanas (figuras 52 a 54).

Los animales del grupo tratado con los adenovirus AxCAOBMP-2, aplicado in vivo sobre el defecto creado en la diáfisis de los fémures, si tuvieron consolidación ósea como se evidencian en los controles radiológicos a los 3 y 6 semanas.

## 8. DISCUSIÓN



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. UTILIDAD DE LA TERAPIA GÉNICA COMO ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE FRACTURAS ÓSEAS DE DIFÍCIL CONSOLIDACIÓN Y DE DEFECTOS ÓSEOS EXTENSOS

Los resultados de las cuatro experiencias sugieren que la terapia génica podría ser una alternativa para usar en clínica para inducir la formación de tejido óseo en casos con defectos óseos extensos donde el injerto óseo convencional no es efectivo. En estos casos se necesitan en la actualidad injertos óseos vascularizados que nos plantean dos problemas: la limitación de las zonas donantes a usar para este tipo de colgajos microvasculares y las secuelas en dichas zonas donantes.

En la actualidad se han utilizado ya en clínica las BMP recombinantes para el tratamiento de defectos óseos y problemas de consolidación ósea. El uso de las BMP en clínica tiene una limitación importante. Si bien las BMP recombinantes tienen una capacidad osteoinductiva más que probada, la aplicación clínica de las mismas tiene una limitación temporal en su acción. Su permanencia en el punto de aplicación es muy breve, lo que limita el efecto osteoinductor.

Con la terapia génica se produce la incorporación del gen productor de la BMP en un determinado tipo celular, las células diana, que desarrollan la capacidad para producir y secretar este tipo de proteínas morfogenéticas (BMP) en el punto de aplicación y, por tanto, desarrollando la capacidad osteoinductiva en dicho punto de forma mantenida en el tiempo, con el consiguiente incremento en la efectividad.

Durante el desarrollo de las experiencias de este trabajo se ha podido comprobar que mediante la utilización de un adenovirus como vector es posible incorporar el gen de la BMP-2 a distintos tipos celulares y valorar la osteoinducción ósea derivada del efecto de la BMP-2.

- Experiencia I. Infección in vitro y transformación de los fibroblastos hacia células precursoras de tejido óseo.
- Experiencia II. Infección in vivo de tejido muscular por los adenovirus, producción de BMP-2 y osteoinducción en el punto de inyección de la carga viral.
- Experiencia III. Infección in vitro de células de médula ósea pluripotenciales, trasplante de las células productoras de BMP a un animal vivo inmunosuprimido y comprobación de la capacidad osteoinductiva en el tejido receptor.
- Experiencia IV. Creación de un defecto crítico óseo en el fémur de la rata, interposición de un colgajo muscular, infección in vivo del tejido muscular, osteoinducción y valoración de la consolidación del defecto óseo.

En definitiva es posible utilizar técnicas de terapia génica como alternativa al tratamiento de fracturas óseas de difícil consolidación y de defectos óseos extensos.

## 8.2. INCONVENIENTES DE LOS ADENOVIRUS COMO VECTORES VIRALES EN APLICACIÓN CLÍNICA

En este trabajo se ha usado como vector del gen de la BMP-2 un adenovirus. El uso de adenovirus en clínica tiene dos inconvenientes principales que imposibilitan, de momento, su utilización. Por una parte la necesidad de inmunosuprimir al receptor para que el sistema inmunitario no actúe contra las células infectadas por el adenovirus y anule el efecto deseado que es la producción de BMP-2 por estas células. Por otra parte, aunque estos adenovirus son virus defectivos que no se replican en las células diana y sólo se replican en las células empaquetadoras, existe el peligro potencial de que puedan en un momento dado replicarse.

La terapia génica deberá mejorar su seguridad de aplicación en clínica para poder mejorar sus expectativas de uso. En un futuro breve posiblemente se encuentren nuevos vectores virales y no-virales para uso en clínica que permitan incorporar un determinado gen a las células diana sin peligros potenciales para el individuo receptor.

Así pues, parece que el futuro está en el desarrollo de vectores no-virales que imiten la acción de estos incorporando los genes terapéuticos a las células diana o, por otra parte, en mejorar las condiciones de los vectores virales. Además de los adenovirus se están utilizando como vectores virales, lentivirus, virus adenoasociados, herpesvirus, poxvirus y alfavirus. Dentro de los adenovirus se está intentando disminuir la respuesta inmune que estos desencadenan utilizando los denominados adenovirus vacíos con menor inmunogenicidad.

### 8.3. NUEVOS VECTORES EN TERAPIA GÉNICA

Los vectores no-virales representan un intento de imitar las funciones de los virus como vehículos de transferencia génica mediante sistemas sintéticos, de forma que en principio son vectores mucho más seguros desde el punto de vista de su peligrosidad biológica y su patogenicidad. La principal limitación de este tipo de vectores es que su eficacia in vivo es mucho menor que la de los vectores virales. Esto se debe a la inestabilidad propia de los sistemas sintéticos complejos y a las diferentes barreras que han de superar:

- Los complejos entre el ácido nucleico y los demás componentes de estos sistemas han de ser estables tras su administración y no desintegrarse antes de alcanzar las células. La concentración efectiva en las células diana suele ser baja por lo que es importante que lleven en su superficie algún tipo de ligando para receptores específicos de las células a las que los queremos enviar.
- Habitualmente, estos complejos entran en las células por endocitosis, de manera que quedan expuestos al ataque de enzimas lisosomales. Para evitar esto, se intenta incluir en estos vectores algún tipo de molécula que altere el pH del endosoma y consiga romperlo antes de su fusión con los lisosomas y liberar así el complejo intacto al citoplasma. Estas moléculas suelen ser péptidos o proteínas virales que cumplen esta misma función en algunos tipos de virus. Una vez en el citoplasma, estos complejos han de ser lo suficientemente estables como para llegar hasta el núcleo, pues si el ácido nucleico se libera muy pronto será degradado por nucleasas citoplasmáticas. Pero si son demasiado estables, el ácido nucleico no conseguirá liberarse y

por tanto no podrá entrar en el núcleo de la célula. Este compromiso entre protección y liberación es quizás uno de los retos más importantes que tienen que superar los vectores no virales para aumentar su eficacia actual.

- En cierta medida, la inclusión en estos complejos de alguna molécula capaz de dirigirlos al núcleo celular serviría para acelerar su tránsito citoplasmático. Por tanto, otro componente habitual en los vectores no virales son las moléculas con señales de localización nuclear que además permitan la entrada del ácido nucleico a través del complejo del poro nuclear, pues de lo contrario sólo serán capaces de ser efectivos en células que estén en mitosis.

La tarea de construir un vector no-viral ideal equivale a intentar reconstruir en el laboratorio lo que los virus consiguen de manera natural. Este es uno de los campos de investigación más activos, sobre todo por parte de empresas farmacéuticas y de biotecnología, y es previsible que los próximos años vean avances significativos en este terreno.

Actualmente, los vectores no-virales más utilizados son los siguientes:

- a) Inyección directa (métodos físicos): lógicamente, lo más sencillo es inyectar directamente el ácido nucleico, o ADN desnudo, en el órgano de interés. Aunque poco eficaz, este procedimiento sólo funciona de forma razonable en ciertas aplicaciones y en algunos órganos. Por ejemplo, el músculo esquelético es uno de los órganos que más eficazmente incorporan un plásmido inyectado, alcanzando niveles de expresión suficientes para a proteínas virales, tumorales... En ocasiones se utiliza la inyección de ADN formulado con diversos polímeros, sobre todo poli-vinil- pirrolidona, que lo protegen de la acción de las nucleasas y prolongan su vida media tras la

administración. También se utiliza el ADN encapsulado en microesferas de polímeros biodegradables, por ejemplo, copolímeros de ácido láctico y glicólico, que pueden inyectarse en un órgano y proporcionar liberación sostenida del ácido nucleico terapéutico durante un periodo de tiempo más o menos prolongado (86–88).

Otra variedad es la transferencia génica balística, pistola génica o “gene gun” (89), en la que el ácido nucleico terapéutico se adhiere sobre la superficie de unas bolas microscópicas de oro u otro metal inerte, que son disparadas a presión sobre el órgano diana. Es una vía de administración utilizada en la piel para inmunización génica o, a veces, sobre otros órganos. Estas bolas no tienen un gran poder de penetración, que es raramente superior a unos pocos milímetros. Otra alternativa es el uso de microagujas. (90).

b) Complejos formados por el ácido nucleico terapéutico y otros componentes (métodos químicos): son los sistemas más complicados de elaborar y optimizar, pero los más eficaces. El principio que subyace a todos los sistemas de este tipo es la complejación del ADN, que es una molécula grande con alto número de cargas negativas, con polímeros de naturaleza catiónica, es decir, con cargas positivas, de manera que la neutralización de cargas da lugar a complejos más o menos estables, de pequeño tamaño, en los que el ADN está protegido de la acción de nucleasas. Suelen distinguirse entre lipoplexos (ADN complejado con lípidos catiónicos) y poliplexos (ADN complejado por policationes, habitualmente poli-lisina o poli-etilén-amina). Sobre la estructura básica de un lipoplexo o un poliplexo pueden añadirse otro tipo de moléculas que actúen como estabilizadores, ligandos para receptores específicos, moléculas desestabilizadoras del endosoma, señales

de localización nuclear... Por ejemplo, se ha utilizado poli-etilén-glicol para aumentar la estabilidad de lipoplexos en el torrente sanguíneo y evitar la inactivación por el suero. Asimismo ha sido muy utilizada la unión de poli-lisina a transferrina o a orosomucoide, para conseguir la unión específica a receptores hepáticos. Otra estrategia utilizada con bastante éxito ha sido la formación de lipoplexos que además incluyen partículas del virus hemaglutinante del Japón, o virus Sendai, inactivados, lo que proporciona una entrada en las células muy eficaz y un buen escape endosomal. (91–94).

En resumen, la clave para el éxito y una mayor aplicación de la terapia génica no reside en los genes terapéuticos, que son numerosos y con grandes posibilidades sino en encontrar estrategias no-tóxicas y eficientes para transferir los genes terapéuticos a las células diana. Estas estrategias usan un vector que facilita el paso del gen terapéutico a través de la membrana celular. Son los vectores virales o los vectores no-virales. Estos últimos actúan mediante métodos químicos que imitan la acción de los vectores virales o mediante métodos físicos que utilizan varias modalidades de fuerzas físicas para crear poros transitorios en la membrana celular que permiten la entrada de los genes terapéuticos en las células. Son ejemplos la electroporesis, los “gene-gun”, los ultrasonidos...

## 8.4 APLICACIONES CLINICAS DE LA TERAPIA GÉNICA

El primer paciente en ser tratado mediante terapia génica lo fue en 1989. Se trataba de un paciente que sufría inmunodeficiencia combinada severa por déficit de la enzima adenosin-deaminasa. Desde entonces el número de ensayos

clínicos llevados a cabo en todo el mundo ha aumentado rápidamente, de manera que en la actualidad son numerosos los protocolos en ensayos clínicos de terapia génica (95,96).

Las estrategias utilizadas para uso de la terapia génica en clínica son muy variadas.

En la terapia génica del cáncer, la estrategia más utilizada es, sin duda, la utilización de los llamados genes suicidas. Se trata de transferir a las células tumorales un gen que codifique una proteína capaz de activar un pro-fármaco inactivo a su forma activa. Por tanto si somos capaces de transferir el gen a las células tumorales la activación del pro-fármaco a su forma activa provocará el efecto citotóxico en el tumor deseado.

Otra estrategia en terapia génica del cáncer se basa en la suplementación de las células malignas con genes supresores tumorales. Se ha utilizado también la transferencia al tumor de genes que inhiben la angiogénesis para eliminar el tumor por falta de aporte vascular. Por último, una de las estrategias que han tenido más éxito es la inmunopotenciación, es decir, favorecer la puesta en marcha de una respuesta inmune frente a las células tumorales. (97–100)

Por otra parte, en la terapia génica de enfermedades hereditarias, aprovechando que la mayoría de las enfermedades metabólicas son debidas a mutaciones inactivantes en genes que codifican proteínas con actividad biológica (un enzima, un factor de coagulación, una hormona...), estas pueden abordarse mediante una estrategia de suplementación génica que restaure los niveles de proteína deficiente. Por ejemplo, ha tenido especial resonancia el éxito alcanzado con la transferencia mediada por virus adenoasociados del gen del

factor IX de la coagulación al músculo esquelético para producir niveles plasmáticos de este factor que puedan corregir los defectos en la coagulación que sufren animales hemofílicos. (101,102)

Por último, también encontramos ejemplos de inmunización frente a enfermedades infecciosas mediante transferencia génica, con el fin de que las células sinteticen péptidos inmunogénicos y estimulen al sistema inmune hasta eliminar el agente patógeno. Se están ensayando inmunizaciones génicas frente a virus, como los virus de la hepatitis B y C o el virus de la gripe, u otros agentes, como el parásito de la malaria. Es bastante eficaz la inyección directa de un plásmido en músculo o la transferencia intradérmica mediante pistola génica. En general, la eficacia de estos tratamientos reside en la capacidad de producir localmente una proteína que sea liberada y capturada por macrófagos y otras células presentadoras de antígenos, que procesan esas proteínas a pequeños péptidos y los presentan con moléculas de clase II del sistema mayor de histocompatibilidad para estimular las células CD4+ (linfocitos T helper). Además, si las células transfectadas expresan moléculas de clase I del sistema mayor de histocompatibilidad también podrán presentar los péptidos recién sintetizados y estimular células CD8+ (linfocitos T citotóxicos). (103,104)

Tras más de 30 años de investigación, la terapia génica está comenzando a demostrar su utilidad clínica en humanos.

## 8.5 TERAPIA GÉNICA APLICADA A LA CIRUGÍA RECONSTRUCTIVA. INTERÉS EN LAS ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS POR LA TERAPIA GÉNICA

En el presente trabajo hemos aplicado esta nueva arma terapéutica, la terapia génica, a la cirugía reconstructiva.

No cabe duda que la terapia génica tendrá su utilización en los próximos años en la regeneración tisular mediante la estimulación por transfección de aquellos genes responsables de la producción de las proteínas que, a su vez, estimulen a las células pluripotenciales a diferenciarse hacia un determinado tipo celular. En el este trabajo hemos buscado la diferenciación hacia tejido óseo u osteoinducción para su utilización en reconstrucciones óseas complejas.

En lo que respecta a su utilización en el tratamiento de defectos óseos y fracturas óseas de difícil consolidación, en el momento en que las técnicas de terapia génica avancen hacia vectores seguros y eficaces se podrá incorporar a las células diana del paciente el gen de la BMP-2 u otra de las proteínas morfogenéticas (BMP) implicadas en los procesos de reparación de las fracturas y con propiedades osteoinductoras demostradas. Por ejemplo, la utilización de otros vectores virales como los virus adenoasociados (105), vectores no virales de tipo liposomas (106) o la asociación con biomateriales como silicatos, hidroxiapatita... (107–109)

Repasando las publicaciones de los últimos años, es patente que existen múltiples trabajos experimentales en los que, utilizando los adenovirus con el gen de la BMP-2, se ha buscado su aplicación a la formación y regeneración ósea. Los artículos aparecen en publicaciones tanto específicas de terapia

génica como de especialidades quirúrgicas que se interesan por la regeneración ósea, a saber, cirugía plástica y reparadora, cirugía oral y maxilofacial, ortopedia y traumatología, cirugía craneofacial o neurocirugía.

Algunas de las aportaciones que se pueden extraer de los trabajos publicados en los últimos años sobre el uso de adenovirus en la osteoinducción son las siguientes.

La aplicación directa de adenovirus como vectores de la BMP-2 en defectos óseos es menos eficaz que la infección en cultivos celulares y la posterior aplicación de las células infectadas al defecto óseo. Se han utilizado en los distintos trabajos experimentales cultivos celulares de fibroblastos dérmicos, células pluripotenciales mesenquimales de músculo o de médula ósea. Incluso se han utilizado en células derivadas de osteosarcoma, donde los adenovirus BMP2 inducen una mayor proliferación y agresividad del osteosarcoma. (110)

Por otra parte, la utilización de cultivos celulares con adenovirus BMP-2 con microesferas de gel induce la osificación heterotópica en músculos o en defectos fibulares. (111,112)

La utilización de adenovirus BMP-2 en células de pulpa dental induce diferenciación odontogénica (113) y la utilización de adenovirus BMP-2 en células de músculo en defectos peridentales mejora la cementogénesis y la regeneración peridental. (114) Sin embargo la utilización de células pluripotenciales o “stem cells” de ligamento peridental humano con adenovirus BMP-2 no mejora la formación ósea. (115)

La utilización de vectores BMP-2 estimula no sólo la osteogénesis sino también la regeneración del cartílago articular. (116) El empleo de células progenitoras

de cartílago responden bien a la acción combinada de adenovirus BMP2 y la estimulación mecánica. (117) Además, el factor condrogénico Sox9 potencia la diferenciación condrogénica de la BMP-2 e inhibe la diferenciación osteogénica. (118)

Los trabajos experimentales se desarrollan sobre todo en ratas. Hay pocos artículos en mamíferos superiores, como ovinos o equinos y con resultados peores. (119) Por ejemplo el uso de células mesenquimales de oveja con adenovirus BMP2 en defectos óseos en rata no presenta un resultado positivo. (120) En otro estudio, la administración diferida de adenovirus BMP-2 a los 5-10 días de la creación del defecto óseo en un modelo en rata mejora la capacidad osteogénica. (121)

La utilización de adenovirus BMP-9, en vez de adenovirus BMP-2, también produce diferenciación ósea y formación de hueso.(122)

La utilización de adenovirus que coexpresan BMP2 y VEGF165 (123) permite ver la interacción entre ambos factores. Se ha publicado tanto que la VEGF inhibe la expresión de la BMP-2 (124) como que potencia la osteogénesis.(125)

Hay trabajos que asocian células infectadas con adenovirus BMP-2 con biomateriales como la nano-hidroxiapatita en defectos óseos. (126,127)

Finalmente se ha aplicado los sistemas de expresión Tet-On para doxiciclina en combinación con los adenovirus BMP-2. La coinfección de las misma células diana con adenovirus BMP-2 y adenovirus-X Tet-On de forma que la expresión de BMP-2 puede ser regulada mediante concentraciones variables de doxiciclina.(128)

Las publicaciones sobre el uso de adenovirus capaces de transfectar el gen de la BMP-2 y su uso en defectos óseos no sólo aparecen en revistas de terapia génica sino en revistas de ortopedia y traumatología, neurocirugía, cirugía de raquis, cirugía craneofacial, cirugía oral y maxilofacial, cirugía plástica y reparadora... Todo ello nos parece indicar que las especialidades quirúrgicas despiertan también su interés en las nuevas terapias génicas.

En las publicaciones de cirugía ortopédica y traumatología aplican la terapia génica a defectos óseos variados, por ejemplo defectos femorales (129) empleando modelos animales distintos, como ratas y ratones (130), conejos (131) e incluso un modelo equino. (132) Se utilizan células madre mesenquimales de médula ósea (133,134) pero también de tejido graso(135). Estas células se transfectan con adenovirus BMP2, pero también hay publicaciones con el uso de lentivirus (136–138) o virus adenoasociados (139) como vectores virales. Se utiliza la inyección directa (140) de las células transfectadas en el punto de defecto óseo pero también se emplean vectores de polímeros o colágeno. (141,142)

También hay trabajos en que se aplican a defectos osteocartilaginosos para evaluar la acción de adenovirus BMP2 y adenovirus BMP6 en la regeneración cartilaginosa (143) y también hay trabajos que lo aplican a la regeneración ósea alrededor de implantes de materiales sintéticos. (144)

En las publicaciones de cirugía de raquis se aplica la terapia génica a la fusión espinal en modelos animales como ratas, ratones o cerdos, empleando células mesenquimales transfectadas con adenovirus BMP2. También hay trabajos en los que se aplica a la regeneración discal empleando células del annulus fibrosus y del nucleous pulposus.(145–150)

En publicaciones en neurocirugía se aplica la terapia génica a defectos bicorticales de cráneo. Más concretamente, hay un estudio en cerdo con células de pluripotenciales de médula ósea con adenovirus BMP2 en carrier de biopolímero. (151)

Hay también publicaciones en cirugía craneofacial con aplicaciones de terapia génica con células mesenquimales con adenovirus BMP2 en la regeneración de hueso alveolar en mandíbulas o en distracción mandibular. (152–154)

Las publicaciones en cirugía oral y maxilofacial son estudios en modelos animales, como ratas y conejos, en las que se aplica la terapia génica a defectos mandibulares, defectos craneales o en distracción mandibular. (155–159)

Por último, las publicaciones en cirugía plástica y reparadora emplean células madre pluripotenciales extraídas de tejido adiposo humano transfectadas con adenovirus BMP2 y su aplicación en distracción mandibular, defectos óseos o en osteoinducción en puntos de osificación heterotópica, en modelos animales como ratas, ratones o cerdos. (160–163)

Todo ello nos hace pensar que la terapia génica va a ser un arma terapéutica más a incorporar al tratamiento de defectos tisulares complejos y las especialidades quirúrgicas muestran su interés por esta nueva estrategia terapéutica y de gran potencial en el futuro.

## 9. CONCLUSIONES



## 9. CONCLUSIONES

Los resultados de las 4 experiencias desarrolladas nos han permitido extraer conclusiones particulares de cada experiencia y, finalmente, la conclusión final en respuesta a nuestra hipótesis del trabajo.

1. Conclusión experiencia I: Terapia génica aplicada in vitro. Se ha podido comprobar in vitro en cultivos celulares de fibroblastos que la aplicación de la terapia génica mediante el uso de un adenovirus BMP2 consigue que las células infectadas produzcan la proteína BMP2 y que dichas células sufren una transformación hacia células fosfatasa alcalina positivas, característica esta de las células pluripotenciales o de las células osteogénicas.
2. Conclusión experiencia II: Terapia génica aplicada in vivo. La utilización directa de adenovirus BMP-2 en un modelo animal previa inmunosupresión permite la formación de tejido óseo autólogo y ectópico.
3. Conclusión experiencia III: Terapia génica aplicada in vitro y posterior uso in vivo. La utilización de células modificadas genéticamente que expresan BMP2, mediante la utilización in vitro del adenovirus BMP2 en cultivos celulares, y aplicadas en un modelo animal previa inmunosupresión consigue la osteoinducción y por tanto la producción de tejido óseo ectópico.
4. Conclusión experiencia IV: Terapia génica aplicada en un defecto óseo. La utilización directa de los adenovirus BMP-2 en un defecto crítico diafisario femoral en un modelo animal, también previa inmunosupresión, permite conseguir consolidación en el defecto óseo.

Nuestra conclusión final responde de forma positiva a nuestra hipótesis de trabajo: “es posible crear hueso autólogo a partir de la terapia génica aplicada a la osteoinducción y que el hueso autólogo obtenido se puede utilizar para la reconstrucción de defectos óseos en cirugía plástica”.

## 10. BIBLIOGRAFÍA



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* [Internet]. 1977 Jul;36(1):59–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/886304>
2. Anderson WF. Human gene therapy: scientific and ethical considerations. *Recomb DNA Tech Bull* [Internet]. 1985 Jun;8(2):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3862183>
3. Kohn DB, Kantoff PW, Eglitis MA, McLachlin JR, Moen RC, Karson E, et al. Retroviral-mediated gene transfer into mammalian cells. *Blood Cells* [Internet]. 1987;13(1–2):285–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3311223>
4. Cline MJ. Gene therapy: current status. *Am J Med* [Internet]. 1987 Aug;83(2):291–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3303927>
5. Kantoff PW, Freeman SM, Anderson WF. Prospects for gene therapy for immunodeficiency diseases. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1988;6:581–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3289578>
6. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* [Internet]. 1987 Apr;18(2):207–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3561974>
7. Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, Folkman J, Mulliken JB. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1981 May 2;1(8227):959–62. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6112384>
8. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 1978 May;60-B(2):150–62. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/350882>
  9. Concannon MJ, Boschert MT, Fitzpatrick L, Croll GH, Puckett CL. The use of demineralized bone powder in an onlay graft model. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1995 May;95(6):1085–91. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7732119>
  10. Lasa C, Hollinger J, Drohan W, MacPhee M. Delivery of demineralized bone powder by fibrin sealant. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1995 Nov;96(6):1409–17; discussion 1418. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480241>
  11. Concannon MJ, Boschert MT, Puckett CL. Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long-term study. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1997 Jun;99(7):1983–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180722>
  12. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* [Internet]. 1965 Nov 12;150(3698):893–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5319761>
  13. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* [Internet]. 1983 May 13;220(4598):680–6. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6403986>
  14. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein

- (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* [Internet]. 1982 Jul;196(1):100–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7092346>
15. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* [Internet]. 1995 May;13(3):357–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7602397>
  16. Masuhara K, Nakase T, Suzuki S, Takaoka K, Matsui M, Anderson HC. Use of monoclonal antibody to detect bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Bone* [Internet]. 1995 Jan;16(1):91–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7742091>
  17. Khouri RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1996 Jul;98(1):103–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657761>
  18. Ashby ER, Rudkin GH, Ishida K, Miller TA. Evaluation of a novel osteogenic factor, bone cell stimulating substance, in a rabbit cranial defect model. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1996 Sep;98(3):420–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8700975>
  19. Sciadini MF, Dawson JM, Johnson KD. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* [Internet]. 1997 Nov;15(6):844–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9497809>
  20. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP)

- family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* [Internet]. 1998 Jun;22(6):605–12. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626398>
21. Ripamonti U, Duneas N. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1998 Jan;101(1):227–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427942>
  22. Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 1999 Jul;65(1):83–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10369739>
  23. Toriumi DM, O’Grady K, Horlbeck DM, Desai D, Turek TJ, Wozney J. Mandibular reconstruction using bone morphogenetic protein 2: long-term follow-up in a canine model. *Laryngoscope* [Internet]. 1999 Sep;109(9):1481–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499059>
  24. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res* [Internet]. 1998 Sep;13(9):1483–90. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738522>
  25. Terheyden H, Jepsen S, Rueger DR. Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 1999 Dec;28(6):461–3. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10609751>

26. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, et al. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1999 Dec;81(12):1717–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608383>
27. Cook SD. Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites. *Orthopedics* [Internet]. 1999 Jul;22(7):669–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418861>
28. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* [Internet]. 1991 May;113(3):681–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849907>
29. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1992 Jun;74(5):659–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378056>
30. Ripamonti U, Duneas N, Van Den Heever B, Bosch C, Crooks J. Recombinant transforming growth factor-beta1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res* [Internet]. 1997 Oct;12(10):1584–95. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9333119>

31. Hanisch O, Tatakis DN, Rohrer MD, Wöhrle PS, Wozney JM, Wikesjö UM.  
Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 12(6):785–92. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425759>
32. Cochran DL, Nummikoski P V, Jones AA, Makins SR, Turek TJ, Buser D.  
Radiographic analysis of regenerated bone around endosseous implants in the canine using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 12(6):739–48. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425754>
33. Garnier A, Côté J, Nadeau I, Kamen A, Massie B. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology* [Internet]. 1994;15(1–3):145–55. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765926>
34. Lochmüller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, et al.  
Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* [Internet]. 1994 Dec;5(12):1485–91. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7711141>
35. Zhu J, Grace M, Casale J, Chang AT, Musco ML, Bordens R, et al.  
Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector. *Hum Gene Ther* [Internet]. 1999

- Jan 1;10(1):113–21. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022536>
36. Massie B, Mosser DD, Koutroumanis M, Vitté-Mony I, Lamoureux L, Couture F, et al. New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology* [Internet]. 1998 Nov;28(1–3):53–64. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003407>
37. Nyberg-Hoffman C, Aguilar-Cordova E. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat Med* [Internet]. 1999 Aug;5(8):955–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426323>
38. Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, et al. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* [Internet]. 1993 Feb 12;259(5097):988–90. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382374>
39. Berkner KL. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques* [Internet]. 6(7):616–29. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3078719>
40. Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* [Internet]. 1996 Nov;70(11):7498–509. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892868>
41. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Iizuka T, Miyatake SI. Osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector under transient immunosuppression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2000 Jan

- 7;267(1):382–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623628>
42. Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* [Internet]. 1999 Jun;24(6):541–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375195>
  43. Kang Q, Sun MH, Cheng H, Peng Y, Montag AG, Deyrup AT, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMP using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* [Internet]. 2004 Sep;11(17):1312–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269709>
  44. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Wooley P, Weiss K, Grimm M, et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther* [Internet]. 2000 May;7(9):734–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10822299>
  45. Gonda K, Nakaoka T, Yoshimura K, Otawara-Hamamoto Y, Harrii K. Heterotopic ossification of degenerating rat skeletal muscle induced by adenovirus-mediated transfer of bone morphogenetic protein-2 gene. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2000 Jun;15(6):1056–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10841174>
  46. Uusitalo H, Hiltunen A, Ahonen M, Kähäri VM, Aro H, Vuorio E. Induction of periosteal callus formation by bone morphogenetic protein-2 employing adenovirus-mediated gene delivery. *Matrix Biol* [Internet]. 2001 Apr;20(2):123–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334713>

47. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Kaihara S, Iizuka T, Miyatake S. The time course study of osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector. *Life Sci* [Internet]. 2001 Dec 7;70(3):325–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005265>
48. Olmsted-Davis EA, Gugala Z, Gannon FH, Yotnda P, McAlhany RE, Lindsey RW, et al. Use of a chimeric adenovirus vector enhances BMP2 production and bone formation. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2002 Jul 20;13(11):1337–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162816>
49. Abe N, Lee Y-P, Sato M, Zhang X, Wu J, Mitani K, et al. Enhancement of bone repair with a helper-dependent adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2002 Sep 27;297(3):523–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270126>
50. Kaihara S, Bessho K, Okubo Y, Sonobe J, Komatsu Y, Miura M, et al. Over expression of bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) using an adenoviral vector promote the osteoblastic differentiation in C2C12 cells and augment the bone formation induced by bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in rats. *Life Sci* [Internet]. 2003 Feb 28;72(15):1683–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559390>
51. Li JZ, Li H, Sasaki T, Holman D, Beres B, Dumont RJ, et al. Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther* [Internet]. 2003 Sep;10(20):1735–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939640>
52. Alden TD, Pittman DD, Beres EJ, Hankins GR, Kallmes DF, Wisotsky BM, et al. Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy. *J*

- Neurosurg [Internet]. 1999 Jan;90(1 Suppl):109–14. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413134>
53. Alden TD, Pittman DD, Hankins GR, Beres EJ, Engh JA, Das S, et al. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. Hum Gene Ther [Internet]. 1999 Sep 1;10(13):2245–53. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10498255>
54. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Ghivizzani S, Wooley P, Krauspe R, et al. Potential role of direct adenoviral gene transfer in enhancing fracture repair. Clin Orthop Relat Res [Internet]. 2000 Oct;(379 Suppl):S120-5. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11039760>
55. Kaihara S, Bessho K, Okubo Y, Sonobe J, Kawai M, Iizuka T. Simple and effective osteoinductive gene therapy by local injection of a bone morphogenetic protein-2-expressing recombinant adenoviral vector and FK506 mixture in rats. Gene Ther [Internet]. 2004 Mar;11(5):439–47. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973537>
56. Sonobe J, Okubo Y, Kaihara S, Miyatake S-I, Bessho K. Osteoinduction by bone morphogenetic protein 2-expressing adenoviral vector: application of biomaterial to mask the host immune response. Hum Gene Ther [Internet]. 2004 Jul;15(7):659–68. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242526>
57. Egermann M, Baltzer AW, Adamaszek S, Evans C, Robbins P, Schneider E, et al. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. Hum Gene Ther [Internet]. 2006 May;17(5):507–17. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716108>
58. Hu W-W, Wang Z, Hollister SJ, Krebsbach PH. Localized viral vector delivery to enhance in situ regenerative gene therapy. *Gene Ther* [Internet]. 2007 Jun;14(11):891–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17344901>
  59. Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7. *J Cell Biochem* [Internet]. 2000 Jun 6;78(3):476–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861845>
  60. Lou J, Xu F, Merkel K, Manske P. Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Orthop Res* [Internet]. 1999 Jan;17(1):43–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073646>
  61. Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, Pelinkovic D, Ghivizzani SC, Whalen J, et al. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2000 Sep;(378):290–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987005>
  62. Cheng S-L, Lou J, Wright NM, Lai CF, Avioli L V, Riew KD. In Vitro and In Vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2001 Feb;68(2):87–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27696150>
  63. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Iizuka T, Miyatake SI. In vitro and in vivo studies of a bone morphogenetic protein-2 expressing adenoviral vector. *J Bone*

- Joint Surg Am [Internet]. 2001;83-A Suppl(Pt 2):S99-104. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11314802>
64. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* [Internet]. 1998;76(6):899–910. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392704>
65. Graham FL. Growth of 293 cells in suspension culture. *J Gen Virol* [Internet]. 1987 Mar;68 ( Pt 3):937–40. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3819703>
66. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* [Internet]. 1997 Apr 4;276(5309):71–4. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082988>
67. Chang SC-N, Chuang HL, Chen YR, Chen JK, Chung H-Y, Lu Y-L, et al. Ex vivo gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration. *Gene Ther* [Internet]. 2003 Nov;10(24):2013–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14566360>
68. Blum JS, Barry MA, Mikos AG, Jansen JA. In vivo evaluation of gene therapy vectors in ex vivo-derived marrow stromal cells for bone regeneration in a rat critical-size calvarial defect model. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2003 Dec 10;14(18):1689–701. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670121>
69. Olmsted EA, Blum JS, Rill D, Yotnda P, Gugala Z, Lindsey RW, et al. Adenovirus-mediated BMP2 expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 82(1):11–21. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11400159>
70. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* [Internet]. 11(1–2):120–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738667>
  71. Tsuda H, Wada T, Yamashita T, Hamada H. Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber-mutant adenoviral BMP2 gene. *J Gene Med* [Internet]. 2005 Oct;7(10):1322–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15926193>
  72. Zachos TA, Shields KM, Bertone AL. Gene-mediated osteogenic differentiation of stem cells by bone morphogenetic proteins-2 or -6. *J Orthop Res* [Internet]. 2006 Jun;24(6):1279–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16649180>
  73. Turgeman G, Pittman DD, Müller R, Kurkalli BG, Zhou S, Pelled G, et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med* [Internet]. 3(3):240–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11437329>
  74. Partridge K, Yang X, Clarke NMP, Okubo Y, Bessho K, Sebald W, et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2002 Mar 22;292(1):144–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11890685>
  75. Tsuda H, Wada T, Ito Y, Uchida H, Dehari H, Nakamura K, et al. Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-

- mutant adenoviral vector. *Mol Ther* [Internet]. 2003 Mar;7(3):354–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668131>
76. Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, Furukawa K, Shibata Y, Moriishi T, et al. Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2. *Bone* [Internet]. 2003 May;32(5):502–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753866>
77. Lee JY, Musgrave D, Pelinkovic D, Fukushima K, Cummins J, Usas A, et al. Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2001 Jul;83(7):1032–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451972>
78. Musgrave DS, Pruchnic R, Bosch P, Ziran BH, Whalen J, Huard J. Human skeletal muscle cells in ex vivo gene therapy to deliver bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 2002 Jan;84(1):120–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11837817>
79. Lee JY, Peng H, Usas A, Musgrave D, Cummins J, Pelinkovic D, et al. Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2002 Jul 1;13(10):1201–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133273>
80. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Iizuka T, Miyatake S. Expression of bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector in C2C12 myoblasts induces differentiation into the osteoblast lineage. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Sep 7;262(3):739–43. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471395>

81. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* [Internet]. 1994 Dec;127(6 Pt 1):1755–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7798324>
82. McGregor IA. Fasciocutaneous flaps in intraoral reconstruction. *Clin Plast Surg* [Internet]. 1985 Jul;12(3):453–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3893848>
83. McGregor IA, Watson R. History of the West of Scotland Plastic Surgery Unit: 1940-1986. *Br J Plast Surg* [Internet]. 1998 Jul;51(5):333–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9771357>
84. Acland R. New instruments for microvascular surgery. *Br J Surg* [Internet]. 1972 Mar;59(3):181–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4552307>
85. Hirase Y, Valauri FA, Buncke HJ, Newlin LY. Customized prefabricated neovascularized free flaps. *Microsurgery* [Internet]. 1987;8(4):218–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3323773>
86. Cao L, Zheng ZC, Zhao YC, Jiang ZH, Liu ZG, Chen SD, et al. Gene therapy of Parkinson disease model rat by direct injection of plasmid DNA-lipofectin complex. *Hum Gene Ther* [Internet]. 1995 Nov;6(11):1497–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573622>
87. Sawamura D, Akiyama M, Shimizu H. Direct injection of naked DNA and cytokine transgene expression: implications for keratinocyte gene therapy. *Clin*

- Exp Dermatol [Internet]. 2002 Sep;27(6):480–4. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372091>
88. Alsaggar M, Liu D. Physical methods for gene transfer. Adv Genet [Internet]. 2015;89:1–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620006>
89. Yang C-H, Shen S-C, Lee JC, Wu P-C, Hsueh S-F, Lu C-Y, et al. Seeing the gene therapy: application of gene gun technique to transfect and decolour pigmented rat skin with human agouti signalling protein cDNA. Gene Ther [Internet]. 2004 Jul;11(13):1033–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15164092>
90. Chen W, Li H, Shi D, Liu Z, Yuan W. Microneedles As a Delivery System for Gene Therapy. Front Pharmacol [Internet]. 2016;7:137. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27303298>
91. Kotipatruni RP, Nagaraju GP. Development of plasmid-lipid complexes for direct intratumoral injection. Methods Mol Biol [Internet]. 2014;1139:467–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24619700>
92. Rezaee M, Oskuee RK, Nassirli H, Malaekheh-Nikouei B. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. J Control Release [Internet]. 2016;236:1–14. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27317365>
93. Namvar A, Bolhassani A, Khairkhah N, Motevalli F. Physicochemical properties of polymers: An important system to overcome the cell barriers in gene transfection. Biopolymers [Internet]. 2015 Jul;103(7):363–75. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25761628>

94. Rak M, Ochałek A, Bielecka E, Latasiewicz J, Gawarecka K, Sroka J, et al. Efficient and non-toxic gene delivery by anionic lipoplexes based on polyprenyl ammonium salts and their effects on cell physiology. *J Gene Med* [Internet]. 2016 Nov;18(11–12):331–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27706881>
95. Cicalese MP, Aiuti A. Clinical applications of gene therapy for primary immunodeficiencies. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2015 Apr;26(4):210–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25860576>
96. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of primary T cell immunodeficiencies. *Gene* [Internet]. 2013 Aug 10;525(2):170–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583799>
97. Malekshah OM, Chen X, Nomani A, Sarkar S, Hatefi A. Enzyme/Prodrug Systems for Cancer Gene Therapy. *Curr Pharmacol reports* [Internet]. 2016 Dec;2(6):299–308. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28042530>
98. Karjoo Z, Chen X, Hatefi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016 Apr 1;99(Pt A):113–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26004498>
99. Schepelmann S, Springer CJ. Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Curr Gene Ther* [Internet]. 2006 Dec;6(6):647–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17168697>
100. Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J Cell Physiol* [Internet]. 2001 Apr;187(1):22–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241346>

101. Nienhuis AW, Nathwani AC, Davidoff AM. Gene Therapy for Hemophilia. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2016 Apr;27(4):305–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27021603>
102. High KA, Anguela XM. Adeno-associated viral vectors for the treatment of hemophilia. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2016 Apr 15;25(R1):R36-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26614390>
103. Murakami T, Sunada Y. Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. *Curr Gene Ther* [Internet]. 2011 Dec;11(6):447–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023474>
104. Sakai T, Hisaeda H, Nakano Y, Ishikawa H, Maekawa Y, Ishii K, et al. Gene gun-mediated delivery of an interleukin-12 expression plasmid protects against infections with the intracellular protozoan parasites *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* in mice. *Immunology* [Internet]. 2000 Apr;99(4):615–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792510>
105. Chen Y, Luk KDK, Cheung KMC, Xu R, Lin MC, Lu WW, et al. Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. *Gene Ther* [Internet]. 2003 Aug;10(16):1345–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883531>
106. Park J, Ries J, Gelse K, Kloss F, von der Mark K, Wiltfang J, et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* [Internet]. 2003 Jul;10(13):1089–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808439>
107. Välimäki V-V, Yrjans JJ, Vuorio EI, Aro HT. Molecular biological evaluation of

- bioactive glass microspheres and adjunct bone morphogenetic protein 2 gene transfer in the enhancement of new bone formation. *Tissue Eng* [Internet]. 11(3–4):387–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869418>
108. Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, Evans CH, Robbins PD, Schneider E, et al. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther* [Internet]. 2006 Sep;13(17):1290–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16642029>
109. Zachos T, Diggs A, Weisbrode S, Bartlett J, Bertone A. Mesenchymal stem cell-mediated gene delivery of bone morphogenetic protein-2 in an articular fracture model. *Mol Ther* [Internet]. 2007 Aug;15(8):1543–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519894>
110. Yang X, Wang Y, Liu F, Zeng K, Qian M, Chen G, et al. Increased invasiveness of osteosarcoma mesenchymal stem cells induced by bone-morphogenetic protein-2. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* [Internet]. 2013 Apr;49(4):270–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519562>
111. Olabisi RM, Lazard ZW, Franco CL, Hall MA, Kwon SK, Sevick-Muraca EM, et al. Hydrogel microsphere encapsulation of a cell-based gene therapy system increases cell survival of injected cells, transgene expression, and bone volume in a model of heterotopic ossification. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2010 Dec;16(12):3727–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673027>
112. Lazard ZW, Heggeness MH, Hipp JA, Sonnet C, Fuentes AS, Nystal RP, et al. Cell-based gene therapy for repair of critical size defects in the rat fibula. *J Cell Biochem* [Internet]. 2011 Jun;112(6):1563–71. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21344484>

113. Yang X, van der Kraan PM, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, et al. STRO-1 selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation. *Tissue Eng* [Internet]. 2007 Nov;13(11):2803–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17824831>
114. Chen Y-L, Chen PK-T, Jeng L-B, Huang C-S, Yang L-C, Chung H-Y, et al. Periodontal regeneration using ex vivo autologous stem cells engineered to express the BMP-2 gene: an alternative to alveoloplasty. *Gene Ther* [Internet]. 2008 Nov;15(22):1469–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701911>
115. Yi T, Jun C-M, Kim SJ, Yun J-H. Evaluation of In Vivo Osteogenic Potential of Bone Morphogenetic Protein 2-Overexpressing Human Periodontal Ligament Stem Cells Combined with Biphasic Calcium Phosphate Block Scaffolds in a Critical-Size Bone Defect Model. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2016 Mar;22(5–6):501–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26825430>
116. Neumann AJ, Alini M, Archer CW, Stoddart MJ. Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2013 Jun;19(11–12):1285–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23289669>
117. Neumann AJ, Gardner OFW, Williams R, Alini M, Archer CW, Stoddart MJ. Human Articular Cartilage Progenitor Cells Are Responsive to Mechanical Stimulation and Adenoviral-Mediated Overexpression of Bone-Morphogenetic

- Protein 2. PLoS One [Internet]. 2015;10(8):e0136229. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26292283>
118. Liao J, Hu N, Zhou N, Lin L, Zhao C, Yi S, et al. Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. PLoS One [Internet]. 2014;9(2):e89025. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551211>
119. Ishihara A, Zekas LJ, Weisbrode SE, Bertone AL. Comparative efficacy of dermal fibroblast-mediated and direct adenoviral bone morphogenetic protein-2 gene therapy for bone regeneration in an equine rib model. Gene Ther [Internet]. 2010 Jun;17(6):733–44. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220786>
120. Liu F, Ferreira E, Porter RM, Glatt V, Schinhan M, Shen Z, et al. Rapid and reliable healing of critical size bone defects with genetically modified sheep muscle. Eur Cell Mater [Internet]. 2015 Sep 21;30:118–30; discussion 130-1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388615>
121. Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Egermann M, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, et al. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. Gene Ther [Internet]. 2007 Jul;14(13):1039–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17460719>
122. Xiang L, Liang C, Zhen-Yong K, Liang-Jun Y, Zhong-Liang D. BMP9-induced osteogenic differentiation and bone formation of muscle-derived stem cells. J Biomed Biotechnol [Internet]. 2012;2012:610952. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319244>
123. Zhang C, Liu H-M, Li Q-W, Chen G-W, Liang X, Meng C-Y. Construction of

- recombinant adenovirus vector containing hBMP2 and hVEGF165 genes and its expression in rabbit Bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* [Internet]. 2014 Oct;46(5):311–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132587>
124. Schönmeyr BH, Soares M, Avraham T, Clavin NW, Gewalli F, Mehrara BJ. Vascular endothelial growth factor inhibits bone morphogenetic protein 2 expression in rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2010 Feb;16(2):653–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754224>
125. Han T-Y, Liu X-W, Liang N, Liu Y-E, Zhang Y-B, Zhou D-P, et al. In vitro effects of recombinant adenovirus-mediated bone morphogenetic protein 2/vascular endothelial growth factor 165 on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2017 Feb;45(1):108–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26757978>
126. Müller CW, Hildebrandt K, Gerich T, Krettek C, van Griensven M, Rosado Balmayor E. BMP-2-transduced human bone marrow stem cells enhance neo-bone formation in a rat critical-sized femur defect. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2017;11(4):1122–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783748>
127. Li WC, Wang DP, Li LJ, Zhu WM, Zeng YJ. Adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfection of bone marrow mesenchymal stem cells combined with nano-hydroxyapatite to construct bone graft material in vitro. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2013 Apr;41(2):103–8.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030243>

128. Qian D, Bai B, Yan G, Zhang S, Liu Q, Chen Y, et al. Construction of doxycycline-mediated BMP-2 transgene combining with APA microcapsules for bone repair. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2016;44(1):270–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092431>
129. Liu F, Porter RM, Wells J, Glatt V, Pilapil C, Evans CH. Evaluation of BMP-2 gene-activated muscle grafts for cranial defect repair. *J Orthop Res* [Internet]. 2012 Jul;30(7):1095–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213093>
130. Gamradt SC, Abe N, Bahamonde ME, Lee Y-P, Nelson SD, Lyons KM, et al. Tracking expression of virally mediated BMP-2 in gene therapy for bone repair. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2006 Sep;450:238–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702923>
131. Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, Ghivizzani SC, Evans CH, McIlwraith CW. Evaluation of Ad-BMP-2 for enhancing fracture healing in an infected defect fracture rabbit model. *J Orthop Res* [Internet]. 2004 Jan;22(1):66–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656661>
132. Ishihara A, Shields KM, Litsky AS, Mattoon JS, Weisbrode SE, Bartlett JS, et al. Osteogenic gene regulation and relative acceleration of healing by adenoviral-mediated transfer of human BMP-2 or -6 in equine osteotomy and ostectomy models. *J Orthop Res* [Internet]. 2008 Jun;26(6):764–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18241059>
133. Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, et al. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into

- osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone* [Internet]. 2004 Jun;34(6):993–1003. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193545>
134. Sugiyama O, Orimo H, Suzuki S, Yamashita K, Ito H, Shimada T. Bone formation following transplantation of genetically modified primary bone marrow stromal cells. *J Orthop Res* [Internet]. 2003 Jul;21(4):630–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798062>
135. Drago JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* [Internet]. 2003 Jul;21(4):622–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798061>
136. Virk MS, Conduah A, Park S-H, Liu N, Sugiyama O, Cuomo A, et al. Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model. *Bone* [Internet]. 2008 May;42(5):921–31. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295562>
137. Feeley BT, Conduah AH, Sugiyama O, Krenek L, Chen ISY, Lieberman JR. In vivo molecular imaging of adenoviral versus lentiviral gene therapy in two bone formation models. *J Orthop Res* [Internet]. 2006 Aug;24(8):1709–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16788987>
138. Hsu WK, Sugiyama O, Park SH, Conduah A, Feeley BT, Liu NQ, et al. Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats. *Bone* [Internet]. 2007 Apr;40(4):931–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17236835>

139. Nasu T, Ito H, Tsutsumi R, Kitaori T, Takemoto M, Schwarz EM, et al. Biological activation of bone-related biomaterials by recombinant adeno-associated virus vector. *J Orthop Res* [Internet]. 2009 Sep;27(9):1162–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242999>
140. Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Pilapil CG, Vrahas MS, Bouxsein ML, et al. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006 Feb;88(2):355–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452748>
141. Sonnet C, Simpson CL, Olabisi RM, Sullivan K, Lazard Z, Gugala Z, et al. Rapid healing of femoral defects in rats with low dose sustained BMP2 expression from PEGDA hydrogel microspheres. *J Orthop Res* [Internet]. 2013 Oct;31(10):1597–604. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832813>
142. Gugala Z, Davis AR, Fouletier-Dilling CM, Gannon FH, Lindsey RW, Olmsted-Davis EA. Adenovirus BMP2-induced osteogenesis in combination with collagen carriers. *Biomaterials* [Internet]. 2007 Oct;28(30):4469–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645942>
143. Menendez MI, Clark DJ, Carlton M, Flanigan DC, Jia G, Sammet S, et al. Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2011 Aug;19(8):1066–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683796>
144. Yan M, Dai K, Tang T, Zhu Z, Lou J. Reconstruction of peri-implant bone defects using impacted bone allograft and BMP-2 gene-modified bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* [Internet]. 2010 Apr;93(1):304–13.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19569214>

145. Peterson B, Iglesias R, Zhang J, Wang JC, Lieberman JR. Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2005 Feb 1;30(3):283–9; discussion 289-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682007>
146. Yang I-H, Kim H, Kwon U-H, Lee K-I, Jun J-A, Kim J-H, et al. De novo osteogenesis from human ligamentum flavum by adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfer. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2005 Dec 15;30(24):2749–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371898>
147. Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, Yoon SH, Wei F, Morishita Y, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)* [Internet]. 2008 Apr 15;33(8):863–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404105>
148. Gilbertson L, Ahn S-H, Teng P-N, Studer RK, Niyibizi C, Kang JD. The effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2, recombinant human bone morphogenetic protein-12, and adenoviral bone morphogenetic protein-12 on matrix synthesis in human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells. *Spine J* [Internet]. 8(3):449–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18455111>
149. Miyazaki M, Sugiyama O, Zou J, Yoon SH, Wei F, Morishita Y, et al. Comparison of lentiviral and adenoviral gene therapy for spinal fusion in rats.

- Spine (Phila Pa 1976) [Internet]. 2008 Jun 1;33(13):1410–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18475244>
150. Olabisi RM, Lazard Z, Heggeness MH, Moran KM, Hipp JA, Dewan AK, et al. An injectable method for noninvasive spine fusion. Spine J [Internet]. 2011 Jun;11(6):545–56. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292563>
151. Chang SC-N, Lin T-M, Chung H-Y, Chen PK-T, Lin F-H, Lou J, et al. Large-scale bicortical skull bone regeneration using ex vivo replication-defective adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-2 gene-transferred bone marrow stromal cells and composite biomaterials. Neurosurgery [Internet]. 2009 Dec;65(6 Suppl):75–81; discussion 81-3. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935005>
152. Chung VH-Y, Chen AY-L, Jeng L-B, Kwan C-C, Cheng S-H, Chang SC-N. Engineered autologous bone marrow mesenchymal stem cells: alternative to cleft alveolar bone graft surgery. J Craniofac Surg [Internet]. 2012 Sep;23(5):1558–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22976660>
153. Castro-Govea Y, Cervantes-Kardasch VH, Borrego-Soto G, Martínez-Rodríguez HG, Espinoza-Juarez M, Romero-Díaz V, et al. Human bone morphogenetic protein 2-transduced mesenchymal stem cells improve bone regeneration in a model of mandible distraction surgery. J Craniofac Surg [Internet]. 2012 Mar;23(2):392–6. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421833>
154. Chung VH-Y, Chen AY-L, Kwan C-C, Chen PK-T, Chang SC-N. Mandibular alveolar bony defect repair using bone morphogenetic protein 2-expressing

- autologous mesenchymal stem cells. *J Craniofac Surg* [Internet]. 2011 Mar;22(2):450–4. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21403565>
155. Koh JT, Zhao Z, Wang Z, Lewis IS, Krebsbach PH, Franceschi RT. Combinatorial gene therapy with BMP2/7 enhances cranial bone regeneration. *J Dent Res* [Internet]. 2008 Sep;87(9):845–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719211>
156. Gao Q, Tong W, Luria JS, Wang Z, Nussenbaum B, Krebsbach PH. Effects of bone morphogenetic protein-2 on proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2010 Mar;39(3):266–71. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074910>
157. Long J, Li P, Du H, Liu L, Zheng X, Lin Y, et al. Effects of bone morphogenetic protein 2 gene therapy on new bone formation during mandibular distraction osteogenesis at rapid rate in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. 2011 Jul;112(1):50–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21194991>
158. Jhin M-J, Kim K-H, Kim S-H, Kim Y-S, Kim S-T, Koo K-T, et al. Ex vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using bone marrow stem cells in rabbit maxillary sinus augmentation in conjunction with implant placement. *J Periodontol* [Internet]. 2013 Jul;84(7):985–94. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22897653>
159. Sun M, Tan W, Wang K, Dong Z, Peng H, Wei F. Effects of allogeneous periosteal-derived cells transfected with adenovirus-mediated BMP-2 on

- repairing defects of the mandible in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2013 Oct;71(10):1789–99. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676775>
160. Chang SC-N, Wei FC, Chuang H, Chen YR, Chen JK, Lee KC, et al. Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2003 Dec;112(7):1841–50. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14663228>
161. Ashinoff RL, Cetrulo CL, Galiano RD, Dobryansky M, Bhatt KA, Ceradini DJ, et al. Bone morphogenic protein-2 gene therapy for mandibular distraction osteogenesis. *Ann Plast Surg* [Internet]. 2004 Jun;52(6):585–90; discussion 591. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166991>
162. Drago JL, Lieberman JR, Lee RS, Deugarte DA, Lee Y, Zuk PA, et al. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2005 May;115(6):1665–73. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861072>
163. Peterson JR, De La Rosa S, Sun H, Eboda O, Cilwa KE, Donneys A, et al. Burn injury enhances bone formation in heterotopic ossification model. *Ann Surg* [Internet]. 2014 May;259(5):993–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673767>

