



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

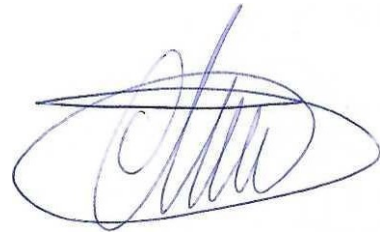
**SISTEMAS NO VIRALES DE TRANSFERENCIA DE  
GENES EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

**NON-VIRAL GENE TRANSFER SYSTEMS IN  
MESENCHYMAL STEM CELLS**

María Eugenia Martínez Quintana  
**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Febrero, 2021**

*Trabajo realizado por María Eugenia Martínez Quintana*

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'M' and 'E' intertwined, enclosed within a horizontal oval shape.

*León, a 4 de marzo de 2021*

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. Propagación, aislamiento y purificación del DNA plasmídico .....</b>	<b>5</b>
3.1.1. Electroforesis en agarosa del plásmido pCMV SPORT $\beta$ -Gal .....	5
<b>3.2. Cultivo, mantenimiento, subcultivo y siembra de las líneas celulares de iMSCs</b>	<b>6</b>
3.2.1. Cultivo de las iMSCs.....	6
3.2.2. Mantenimiento de las líneas celulares.....	6
3.2.3. Tripsinización y subcultivo .....	7
3.2.4. Siembra de las líneas celulares de iMSCs.....	7
3.2.5. Ensayos diferenciación de iMSCs.....	8
3.2.5.1. <i>Adipogénesis</i> .....	8
3.2.5.1.1. <i>Protocolo tinción Oil Red O</i> .....	8
3.2.5.1.2. <i>Protocolo extracción Oil Red</i> .....	9
3.2.5.2. <i>Osteogénesis</i> .....	9
3.2.5.2.1. <i>Protocolo tinción Alizarin Red</i> .....	9
3.2.5.2.2. <i>Protocolo extracción Alizarin Red</i> .....	9
3.2.5.3. <i>Condrogénesis</i> .....	10
3.2.5.3.1. <i>Protocolo tinción Alcian Blue</i> .....	10
3.2.5.3.2. <i>Protocolo extracción del Alcian Blue</i> .....	10
<b>3.3. Ensayos de transfección .....</b>	<b>11</b>
3.3.1. Preparación de los complejos de transfección.....	11
3.3.2. Ensayo de optimización de la transfección .....	12
3.3.3. Evaluación de la transfección a lo largo del tiempo.....	12
3.3.4. Análisis de la eficiencia de transfección .....	13
3.3.4.1. <i>Ensayo Beta-Glo</i> .....	13
3.3.4.2. <i>Kit de tinción Beta-Gal</i> .....	14
3.3.5. Análisis de la viabilidad celular .....	14
3.3.6. Análisis estadístico .....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Determinación de la concentración del plásmido. ....</b>	<b>15</b>
<b>4.2. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pCMV SPORT <math>\beta</math>-gal .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3. Potencial de diferenciación de las iMSCs .....</b>	<b>16</b>
4.3.1. Adipogénesis .....	16
4.3.2. Osteogénesis.....	17

4.3.3.	Condrogénesis .....	18
<b>4.4.</b>	<b>Ensayos de optimización de la transfección de iMSCs con los agentes de transfección Lipofectamina Stem, TransIT y JetOptimus .....</b>	<b>19</b>
4.4.1.	Análisis viabilidad celular .....	19
4.4.2.	Análisis eficiencia de transfección .....	21
4.4.3.	Determinación de las condiciones óptimas de transfección en base a los resultados obtenidos .....	23
<b>4.5.</b>	<b>Ensayos de transfección a dos tiempos .....</b>	<b>24</b>
4.5.1.	Análisis de la viabilidad celular de la transfección de las líneas celulares de iMSCs.....	24
4.5.2.	Análisis de la eficiencia de transfección de las líneas celulares de iMSCs.....	25
4.5.2.1.	<i>Ensayo <math>\beta</math>-glo</i> .....	25
4.5.2.2.	<i>Ensayo <math>\beta</math>-Gal Staining Kit</i> .....	27
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>28</b>

## RESUMEN

La prevalencia de la osteoartritis (OA), así como las dificultades actuales derivadas de su tratamiento han abierto paso a nuevos enfoques terapéuticos prometedores como es la terapia génica de las células madre mesenquimales (MSCs). Sin embargo, estas poblaciones celulares resultan difíciles de transfectar y los métodos virales estudiados han demostrado ser poco seguros pese a proporcionar altas eficiencias de transferencia génica. Por todo ello, las expectativas actuales se centran en la utilización de vectores químicos no virales que superen las limitaciones de seguridad de los anteriores, y generen además elevadas eficiencias de transfección. Por ello, el presente estudio se centra en la utilización de líneas inmortalizadas de MSCs (iMSCs) generadas a partir de muestras de médula ósea de pacientes con el fin de determinar las condiciones y los reactivos más eficaces para su transferencia génica. Las iMSCs fueron inicialmente caracterizadas con el fin de verificar su capacidad de diferenciación al linaje mesodérmico. Posteriormente, se evaluaron las condiciones óptimas de transfección de dos líneas de iMSCs mediante la complejación de un plásmido de ADN reportero con tres reactivos comerciales (Lipofectamina, TransIT o JetOptimus). Tras definir las condiciones óptimas de cada reactivo se evaluó su eficiencia de transfección a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos mostraron que las iMSCs mantienen un mayor potencial de diferenciación osteogénica y condrogénica en comparación con el adipogénico, lo cual podría tener interés terapéutico en el tratamiento de la OA. Además, se determinó que el reactivo más eficiente para transfectar las iMSCs es la Lipofectamina, a una dosis de 0.2  $\mu$ L, y a una densidad celular de 7,500 células por pocillo, aunque la toxicidad de este compuesto limita la supervivencia celular a partir de las 24 horas de contacto con el mismo.

**Palabras clave:** iMSCs, lipoplejos, poliplexos, terapia celular, vectores no virales.

## ABSTRACT

The prevalence of osteoarthritis (OA), as well as the current difficulties derived from its treatment, have led to promising new therapeutic approaches such as mesenchymal stem cell (MSC) gene therapy. However, these cell populations are difficult to transfect and the viral methods studied have proven to be unsafe despite providing high gene transfer efficiencies. Therefore, current expectations are focused on the use of non-viral chemical vectors that overcome the safety limitations of the previous ones generating high transfection efficiencies. Therefore, the present study focuses on the use of immortalized lines of MSCs (iMSCs) generated from bone marrow samples of patients to determine the most efficient conditions and reagents for their gene transfer. iMSCs were firstly characterized to verify their ability to differentiate to the mesodermal lineage. Subsequently, the optimal transfection conditions of two lines of iMSCs by complexing a reporter DNA plasmid with three commercial reagents (Lipofectamine, TransIT or JetOptimus), were determined. After defining the optimal conditions for each reagent, their transfection efficiency over time were studied. The results obtained show that iMSCs maintain a greater potential for osteogenic and chondrogenic differentiation compared to adipogenic, which could be of therapeutic interest for the treatment of OA. In addition, it was determined that the most efficient reagent to transfect iMSCs is Lipofectamine, at a dose of 0.2  $\mu$ L, and at a cell density of 7,500 cells per well, although the toxicity of this compound limits cell survival after 24 hours of contact.

**Key words:** cell therapy, iMSC, lipoplex, non-viral vectors, polyplex.

## 1. Introducción

Hoy en día la osteoartritis (OA) representa una de las enfermedades más frecuentes en países desarrollados siendo una de las principales causas de discapacidad crónica. De este modo con el aumento de la esperanza de vida, se espera que tanto su prevalencia como su incidencia aumenten. Esta condición es progresiva y conlleva a un deterioro funcional y pérdida de la calidad de vida, con importantes costes sanitarios y sociales (Pereira et al., 2015). El reemplazo articular es un tratamiento eficaz para la enfermedad sintomática en etapa terminal, aunque los resultados funcionales pueden ser deficientes y la vida útil de las prótesis es limitada (Glyn-Jones et al., 2015). La naturaleza avascular y aneural del cartílago articular junto con la limitada capacidad de proliferación de su única población celular, los condrocitos, hacen que la auto restauración y reparación de este tejido sean muy reducidas. Como consecuencia, la gravedad de la OA tiende a aumentar con el tiempo y los tratamientos actualmente disponibles no ofrecen una curación completa. Así el uso de células madre mesenquimales adultas (MSCs) ha emergido como enfoque terapéutico potencial para reparar las lesiones de cartílago y ralentizar, de esta forma, su progresión a OA (Gari et al., 2016).

Las MSCs constituyen una población celular adulta multipotente que puede ser aislada a partir de una gran parte de los tejidos adultos, entre los que se encuentra la médula ósea. Específicamente, las MSCs del estroma de la médula ósea representan una población de células no hematopoyéticas con la capacidad de autorrenovación y diferenciación a linajes mesodérmicos clásicos de hueso, cartílago y tejido adiposo (Samsonraj et al., 2017) (Abdallah et al., 2005).

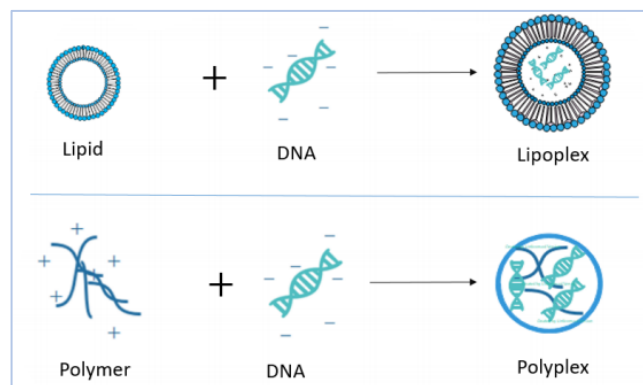
Las MSC han sido ampliamente investigadas para el tratamiento de diferentes lesiones tisulares como aquellas que afectan al cartílago y hueso, y en el tratamiento del cáncer (Boyette et al., 2014). Sin embargo, las propiedades de proliferación y diferenciación de estas células se ven reducidas con el aumento de la edad del paciente y su vida útil durante el cultivo *in vitro* es limitada (Yang et al., 2010) (Dimmeler y Leri, 2008). De ahí se ha visto una pérdida de su potencial de proliferación y diferenciación durante el subcultivo y pase (Shu et al., 2018).

La modificación genética de las MSCs con genes terapéuticos constituye una prometedora herramienta para aumentar su supervivencia y proliferación así como su capacidad para secretar factores paracrinos, incrementando considerablemente su potencial, con respecto a la utilización de las MSCs nativas (Pawitan et al., 2020). En general, los sistemas de liberación de genes se pueden clasificar en vectores virales, cuando se hace uso de la capacidad natural de los virus para introducir el material genético en las células, o en vectores no virales, la mayoría

de los cuales están basados en la utilización de lípidos o polímeros catiónicos (Cheung et al., 2018).

Aunque la terapia génica basada en la utilización de vectores virales ha avanzado sustancialmente durante los últimos años, existen importantes limitaciones asociadas al uso de estos vectores, entre las que se incluyen su alto riesgo mutagénico, inmunogenicidad, capacidad limitada de empaquetamiento de ADN y dificultad de producción. Por otra parte, la terapia génica no viral tiene el potencial de soslayar muchas de estas limitaciones, puesto que los "vehículos" sintéticos tienden a tener menor inmunogenicidad que los vectores virales, además de poseer una mayor capacidad de carga y mayor facilidad de producción (Yin et al., 2014).

Dos de los vectores más importantes en la terapia génica no viral son los lípidos y polímeros catiónicos, que presentan la capacidad de interactuar con las cargas negativas de los grupos fosfatos del ADN debido a la presencia en los mismos de grupos cargados positivamente, dando lugar a lipoplejos y lipoplejos, respectivamente (Hayat et al., 2019). Además, existe un tercer grupo denominado lipopoliplexos que constituye un complejo ternario formado por lípidos y polímeros catiónicos con el plásmido de ADN (pADN) (Billiet et al., 2012). De este modo, los lipopoliplexos constituyen una segunda generación de vectores no virales que pueden mejorar la transferencia de genes en comparación con los lipoplejos de primera generación (García et al., 2012).



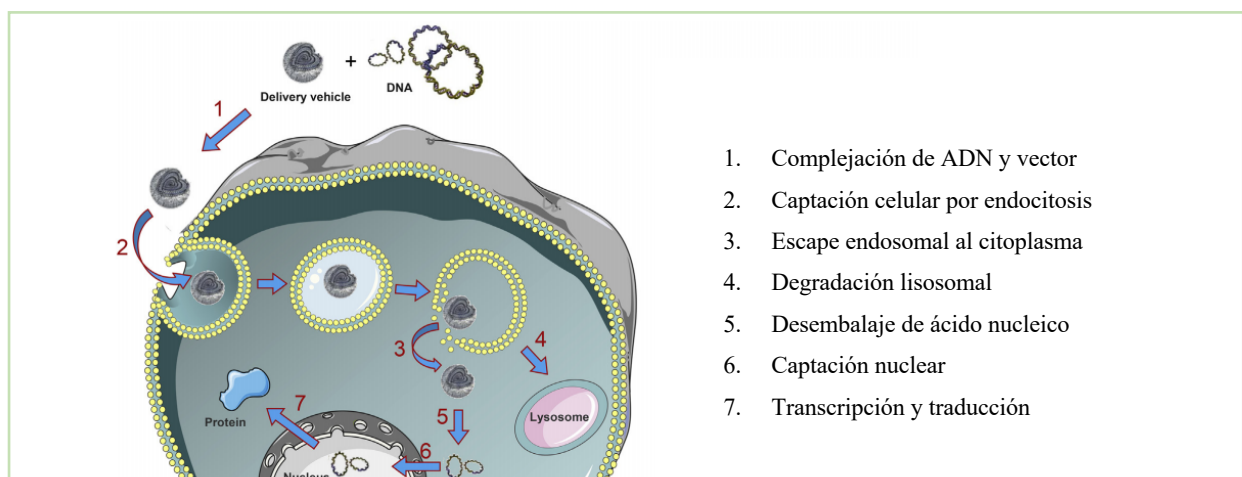
**Figura 1.** Mecanismo de formación de complejos entre un ADN plasmídico y lípidos o polímeros catiónicos. (Shende et al., 2019)

Los lípidos catiónicos a menudo consisten en una combinación de lípidos catiónicos y neutros que se combinan en agua para producir liposomas. Los liposomas son esferas huecas con un núcleo acuoso y un diámetro de entre 100 y 400 nm (Felgner et al., 1987). La carga superficial positiva en el liposoma también permite su unión superficial de grupos cargados negativamente como el ADN, condensándolo y movilizándolo a través de la membrana plasmática hidrófoba hacia el interior de la célula donde lo libera (Ohki et al., 2001).

Los polímeros catiónicos se diferencian de los lípidos catiónicos a parte de la propia naturaleza de sus moléculas, en que estos últimos no contienen un residuo hidrófobo y son completamente solubles en agua. En términos de capacidad de complejación del ADN, la diferencia más notable

entre los lípidos y los polímeros catiónicos es la capacidad de estos últimos para condensar más eficazmente el ADN (Elouahabi y Ruyschaert, 2005).

Los mecanismos generales de vectorización de los poliplejos, lipoplejos y lipopoliplejos se inician con la complejación del ácido nucleico, un paso crucial ya que aumenta su estabilidad frente a la degradación. La formación de los complejos permite una compactación del ácido nucleico y en la mayoría de los casos va acompañada de una inversión de su carga. El segundo paso requiere la captación celular del complejo y comúnmente se realiza a través de rutas endocíticas. Los complejos catiónicos se asocian con los componentes de la bicapa de fosfolípidos cargados negativamente de la membrana celular y luego pueden penetrar la célula por endocitosis mediada por clatrina o caveolas dependiendo del tamaño del complejo, la naturaleza del vector y el tipo de célula (Pitard y Habrant, 2017). Una vez dentro de la célula, el pH de los compartimentos del endosoma desciende de pH 7 a 5.5 y parte de los ácidos nucleicos unidos escapan de los endosomas tempranos al citosol, antes de que tenga lugar la degradación lisosomal. Los mecanismos de escape de los endosomas son diferentes para lipoplejos y poliplejos. El transporte citoplásmico de endosomas juega un papel activo en acercar el material de transfección a la región perinuclear. Los lipoplejos y poliplejos luego se disocian y el ADN plasmídico liberado ingresa al núcleo por dos vías no excluyentes: (i) entrada pasiva del ADN al núcleo durante la división celular cuando la membrana nuclear se desintegra temporalmente o (ii) transporte activo del ADN a través de los poros nucleares. Se ha demostrado que la captación nuclear es una barrera significativa para la internalización de genes (Elouahabi y Ruyschaert, 2005).



**Figura 2.** Representación esquemática de la transfección de ADN mediada por vectores no virales (Pitard y Habrant, 2017).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de transfección de varios reactivos comerciales diseñados para la transferencia génica de MSCs (Lipofectamina, TransIT



y JetOptimus), en dos líneas celulares humanas immortalizadas de MSCs (iMSCs) obtenidas a partir de muestras de médula ósea de pacientes geriátricos. El estudio fue diseñado con el fin de seleccionar en primer lugar las mejores condiciones (densidad celular y volumen de reactivo) que permitieran una mayor expresión génica de cada uno de los reactivos para la posterior evaluación de la misma a lo largo del tiempo.

## **2. Hipótesis y objetivos**

Ensayos previos determinaron que la immortalización de MSCs permite que estas células aumenten su tasa de proliferación y eviten su senescencia, manteniendo el fenotipo mesenquimal así como su multipotencia. Las líneas de MSC immortalizadas generadas por este método mostraron la capacidad de diferenciarse al linaje osteogénico y adipogénico en cultivos bidimensionales, y también hacia linajes condrogénicos en cultivos tridimensionales con varios niveles de éxito (Piñeiro-Ramil et al., 2020).

De este modo, la hipótesis del presente trabajo es que las iMSCs conservan su potencial de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos tras su immortalización y que pueden ser eficientemente transfectadas con los compuestos recientemente desarrollados TransIT y JetOptimus, dando lugar a mayores eficiencias de transfección que el liposoma más ampliamente estudiado (Lipofectamina,) sin afectar a su supervivencia celular.

El objetivo general del presente estudio fue evaluar la citotoxicidad y eficiencia de transfección de varios reactivos comerciales (Lipofectamina, TransIT y JetOptimus) de dos líneas celulares humanas immortalizadas de MSCs (iMSCs) obtenidas a partir de muestras de médula ósea de pacientes. De igual modo se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Verificar la conservación del potencial de diferenciación de las líneas celulares de iMSCs hacia distintos linajes mesodérmicos (adipocitos, osteocitos y condrocitos), tras su immortalización.
- Seleccionar las condiciones óptimas (densidad celular y volumen de reactivo de transfección) que permitan una mayor expresión de actividad beta-galactosidasa en las líneas celulares, sin afectar a la supervivencia celular.
- Evaluar la expresión transgénica a lo largo de tiempo tras seleccionar las condiciones óptimas de transfección para cada reactivo.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Propagación, aislamiento y purificación del DNA plasmídico

Con objeto de aislar y purificar el plásmido pCMV SPORT- $\beta$ -Gal, que contiene el gen reportero *lacZ*, se partió de stocks bacterianos de *E. coli* Top 10 competentes (Invitrogen, Alemania), transformadas con el plásmido y conservadas en glicerol a -80 °C.

En primer lugar, se realizó un precultivo durante 24 horas a 37 °C y 300 rpm mediante inoculación de la muestra bacteriana en tubos de polipropileno conteniendo medio Luria Broth Base (*Miller's LB Broth Base*) con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina (ampicilina sal sódica; *Fisher Bioreagents*, España). El gen de la beta-lactamasa de pCMV SPORT- $\beta$ -Gal proporciona resistencia al antibiótico ampicilina, permitiendo la selección de las bacterias *E. coli* que hayan incorporado el plásmido de interés.

A continuación, se procedió al escalado de los precultivos bacterianos mediante su dilución en matraces Erlenmeyer con medio LB y ampicilina (100  $\mu$ g/mL) (**Figura 3**). Los cultivos fueron incubados nuevamente durante 12 horas en agitación a 300 rpm. Por último, tras una lisis alcalina, el plásmido fue aislado y purificado mediante la utilización del kit comercial *Genopure Plasmid Maxi Kit* (*Roche*) siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Figura 3.** Matraces Erlenmeyer conteniendo el escalado del cultivo.

##### 3.1.1. Electroforesis en agarosa plásmido pCMV SPORT $\beta$ -Gal

De forma previa a su utilización en los diferentes ensayos, se determinó la concentración del plásmido haciendo uso de un bio-espectrofotómetro para microgota y cubeta *MySPECT Twin* (VMR, EE. UU.). Para garantizar la pureza del plásmido aislado se registró la relación de absorbancias a 260/280 nm, para cada una de las muestras.

A continuación, para confirmar la eficiencia del aislamiento y purificación plasmídica, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, las distintas muestras de plásmido pCMV SPORT  $\beta$ -Gal fueron digeridas con las enzimas de restricción *Sal I* y *Xba I* (*Roche*) a 37 °C durante 1 hora. El gel de agarosa fue preparado mediante la disolución de agarosa al 1 % (*Fisher Bioreagents*, España) en tampón TAE (*Gibco-ThermoFisher Scientific*, España) en un horno microondas. Posteriormente el gel fue teñido con 2  $\mu$ l de Green Safe Premium (*Nzytech*, Portugal) y vaciado en un molde, dejándolo polimerizar durante aproximadamente 30 minutos. Con el fin de identificar el tamaño de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de

1kb (*1kb Plus DNA Ladder*; *Invitrogen*<sup>TM</sup>, EEUU). La electroforesis se realizó a 80 V durante 45 minutos. Los geles fueron visualizados con un fotodocumentador *ChemiDoc MP Imaging System* (*Bio-Rad*, EEUU).

### **3.2. Cultivo, mantenimiento, subcultivo y siembra de las líneas celulares de iMSCs**

#### **3.2.1. Cultivo de las iMSCs**

Se utilizaron dos líneas celulares humanas de iMSCs derivadas de médula ósea de pacientes de edad avanzada. Los viales de las iMSCs (densidades celulares de 3.5 y 2 millones) fueron mantenidos en nitrógeno líquido mediante la adición a los mismos de un medio de congelación *Gibco Recovery*<sup>TM</sup> *Cell Culture Freezing Medium* (*Gibco-ThermoFisher Scientific*, España), conteniendo un 10 % dimetilsulfóxido (DMSO) como agente criopreservante para evitar la formación de cristales. Para su descongelación, se travesó el contenido de los viales a dos tubos cónicos de centrifuga de 50 mL conteniendo medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB, *Gibco, Thermo Fisher Scientific* España), previamente atemperados en un baño termostatzado a 37 °C. A continuación, ambos tubos fueron centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (21 °C).

Seguidamente, se decantó el sobrenadante, se adicionó medio DMEM completo suplementado con SFB al 10 % y penicilina/estreptomocina al 1 % (P/E, *Gibco, Thermo Fisher Scientific*, España) (DMEM 10 % SFB 1 % P/E), y se resuspendió el *pellet* de ambas líneas celulares. Por último, se sembró el contenido de ambos tubos en frascos de cultivo adherentes de 75 cm<sup>2</sup> (*ThermoFisher Scientific*, EE. UU.), y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. En los frascos, se anotó la línea celular (iMSCs), paciente (#6 o #13) (Piñeiro-Ramil et al., 2020), número de pase y fecha, con el fin de hacer un seguimiento adecuado de las líneas celulares inmortalizadas.

#### **3.2.2. Mantenimiento de las líneas celulares**

Periodicamente, cada tres días se procedió a cambiar el medio para renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos parcialmente tóxicos para las células. Para ello, se retiró el medio de los frascos y se lavaron con 10 mL de *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS; *Sigma-Aldrich*, EE.UU.) para eliminar las células no adherentes. A continuación, se adicionaron 12 mL de DMEM 10 % SFB 1 % P/E a cada frasco. Durante cada cambio de medio se realizó un seguimiento de los cultivos mediante su observación al microscopio óptico invertido *Olympus CKX53* (*Olympus*, España).

### 3.2.3. Tripsinización y subcultivo

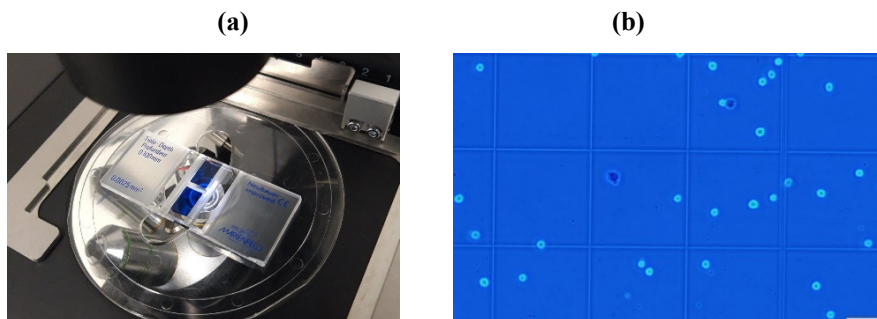
Cuando el porcentaje de confluencia de las células alcanzó aproximadamente un 80 %, se realizaron subcultivos celulares. Para ello, se disoció la monocapa celular mediante la adición de 5 mL de tripsina-EDTA (*MP Biomedicals<sup>TM</sup>*, España). A continuación, los frascos se incubaron a 37 °C durante 5 minutos y la tripsina fue inactivada mediante la adición de DMEM 10 % SFB 1 % P/E. Posteriormente, se centrifugó la suspensión celular y se resuspendió el precipitado celular resultante (**Figura 4**) para ser seguidamente resembrado en nuevos frascos de cultivo con DMEM 10 % SFB 1 % P/E.



**Figura 4.** Pellet de la línea celular de iMSC (#13) tras ser centrifugada a 1550 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para sembrar las líneas celulares se procedió al recuento celular con una cámara de Neubauer y el reactivo *Corning<sup>TM</sup> Azul de tripano cellgro<sup>TM</sup>* (*Fisher Scientific*, España), tomando 10  $\mu$ l de la suspensión celular y 10  $\mu$ l del colorante (**Figura 5b**). Dicho contaje fue realizado por duplicado. La concentración celular se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular} \left( \frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \frac{n^{\circ} \text{células}}{4 \text{ cuadrantes}} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$



**Figura 5.** (a) Recuento celular de las líneas celulares de iMSCs en cámara de Neubauer. (b) Contaje celular de la línea #13 de iMSCs en un cuadrante de la cámara de Neubauer. En blanco se aprecian las células vivas, y teñidas de azul las células no viables. Barra de escala 100  $\mu$ m.

### 3.2.4. Siembra de las líneas celulares de iMSCs

Para realizar los ensayos de transfección, las líneas celulares de iMSCs fueron sembradas en placas de 96 pocillos (*Corning<sup>®</sup> Costar<sup>®</sup> Incorporated*, Alemania.). Para ello, se siguió el protocolo mencionado anteriormente de tripsinización y recuento celular en cámara de Neubauer determinando así la concentración celular de las suspensiones de las líneas de iMSCs. A continuación, se sembraron 100  $\mu$ L de la suspensión celular de las líneas celulares de iMSCs preparada a una concentración de 75,000 y 150,000 células/mL con el fin de tener una densidad de 7,500 y 15,000 células por pocillo, respectivamente.

Para los ensayos de diferenciación celular las iMSCs fueron sembradas en placas de 6 pocillos o en tubos cónicos de centrifuga de 15 mL. En los ensayos de diferenciación osteogénica y adipogénica, se sembraron 2.5 mL de suspensión celular (80,000 células/mL) en placas de 6 pocillos (densidad celular 200,000 células por pocillo). Para los ensayos de diferenciación condrogénica, se utilizó un modelo de cultivo en agregado o *pellet* para el cual se procedió a la centrifugación de la suspensión celular de iMSCs a 1550 rpm durante 5 minutos en tubos cónicos de centrifuga de 15 mL (200,000 células por tubo). Tanto la obtención de la suspensión celular como el conteo de la misma fue realizada siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior (véase 3.2.3 *Tripsinización y subcultivo*).

Tanto las placas, como los tubos se mantuvieron a 37 °C en condiciones de atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> procediendo siempre al cambio cada tres días para eliminar los productos de desecho celular y renovar los nutrientes.

### **3.2.5. Ensayos diferenciación de iMSCs**

Para verificar la preservación de la multipotencia de las iMSCs durante el cultivo se realizaron ensayos de diferenciación al triple linaje (adipocitos, osteoblastos y condrocitos) en una de las dos líneas de iMSCs empleadas (#13) mediante su cultivo en el medio de diferenciación adecuado.

#### **3.2.5.1. Adipogénesis**

Para inducir su diferenciación adipogénica las iMSCs fueron sembradas a una densidad celular de 200,000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, tal y como se describió anteriormente en el apartado 3.2.4. *Siembra de las líneas celulares*. Las células fueron cultivadas durante 14 días en medio de diferenciación adipogénico, *Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium 2 (Promocell, Alemania)* o en DMEM 10 % SFB 1 % P/E en el caso de las células correspondientes al control negativo. Las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. Cada tres días se procedió al cambio de medio, con cuidado de no alterar la monocapa celular. Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

##### **3.2.5.1.1. Protocolo tinción *Oil Red O***

Tras completar los pasos de diferenciación, se retiró la placa del incubador y se aspiró con cuidado el medio. Posteriormente, se lavaron las monocapas celulares con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (*Sigma-Aldrich Química S.A.*). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se aspiró el paraformaldehído y se lavaron las células con agua destilada. A continuación, se agregó suficiente isopropanol al 60 % para cubrir la monocapa

celular (1 mL) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, se aspiró el isopropanol al 60 %, se añadió la disolución de tinción *Oil Red O* (*Sigma-Aldrich*, Alemania; 1 mL) y se dejó incubar 30 minutos. A continuación, se retiró el colorante, se lavaron las células reiteradamente con agua destilada (1 mL) y se agregó PBS para su observación microscópica. Mediante esta tinción las vesículas lipídicas intracelulares en los adipocitos maduros se tiñen de color rojo brillante.

#### **3.2.5.1.2. Protocolo extracción Oil Red**

Tras la evaluación microscópica se procedió a la cuantificación espectrofotométrica de la tinción. Para ello, se aspiró el PBS y se añadió isopropanol absoluto (2.5 mL) con el fin de extraer el colorante, dejando la placa 10 minutos en agitación a 90 rpm. A continuación, se transfirió el contenido de los pocillos a una placa de 96 pocillos y se procedió a la lectura de la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro de placas, utilizando isopropanol absoluto como blanco.

#### **3.2.5.2. Osteogénesis**

Para la diferenciación osteogénica las iMSCs fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 200,000 células por pocillo (véase 3.2.4. *Siembra de las líneas celulares*). Las células fueron cultivadas durante 14 días en medio de diferenciación osteogénico, *Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium* (*PromoCell*, Alemania) o en DMEM 10 % SFB 1 % P/E en las células correspondientes al control negativo. Las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub>, con reemplazo del medio de cultivo cada 3 días. Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

##### **3.2.5.2.1. Protocolo tinción Alizarin Red**

La tinción de las iMSCs con el colorante *Alizarin Red* se realizó de forma análoga a los ensayos de adipogénesis (véase 3.2.5.1.1. *Protocolo tinción Oil Red O*).

Las iMSCs indiferenciadas (sin depósitos de calcio extracelulares) son incoloras o ligeramente púrpuras, mientras que los osteoblastos derivados de las iMSCs (con depósitos de calcio extracelulares) se tiñen de rojo anaranjado brillante.

##### **3.2.5.2.2. Protocolo extracción Alizarin Red**

La determinación espectrofotométrica del *Alizarin Red* se realizó de forma análoga a los ensayos de adipogénesis (véase 3.2.5.1.1. *Protocolo tinción Oil Red O*), utilizando en este caso cloruro de cetilpiridinio al 10% como blanco y realizándose la lectura de la absorbancia a 540 nm.

### 3.2.5.3. Condrogénesis

Para los ensayos de diferenciación condrogénica, se utilizó un cultivo celular tridimensional en esferoide, agregado o *pellet*. Los esferoides de iMSCs (200,000 células por esferoide) fueron generados mediante centrifugación de las iMSC en tubos de centrifuga de 15 mL, tal y como se describió en el apartado 3.2.4 *Siembra de las líneas celulares*. Los agregados celulares fueron cultivados durante 21 días en medio de diferenciación condrogénico (DMEM, 0.1 mM dexametasona, 20 mg/mL ácido ascórbico, 11 mg/mL piruvato sódico, 100 X Insulin-Transferrina-Selenio A, 100 µg/mL TGFβ-3). Como control negativo de diferenciación se emplearon esferoides cultivados en medio DMEM 10 % SFB 1 % P/E. Los tubos fueron mantenidos en una cámara de atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>, con las tapas ligeramente abiertas para permitir el intercambio gaseoso. Periódicamente, cada 3 días, se renovó el medio de cultivo con el objeto de reponer los nutrientes y eliminar los desechos tóxicos.



**Figura 6.** Esferoide formado a partir de la línea celular de iMSC #13 cultivado en medio de diferenciación condrogénico.

#### 3.2.5.3.1. Protocolo tinción *Alcian Blue*

Transcurridos 21 días de incubación, los tubos se retiraron del incubador y se aspiró con cuidado el medio. Los esferoides se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se aspiró el paraformaldehído y se lavaron las células con agua destilada (1 mL) y HCl 1N (*Fisher Chemical*, Reino Unido; 1 mL). A continuación, se añadió una disolución de colorante *Alcian Blue* 8GX (*Alfa Aesar*, Alemania), previamente filtrado con un filtro Millex PES de 0.22 µm, en cantidad suficiente para cubrir la totalidad de los esferoides. Después se dejaron incubar en una cámara de atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> toda la noche. Transcurridas 24 horas, se retiró el colorante, se lavaron las células repetidas veces con agua destilada (1 mL) y se añadió PBS para su observación microscópica. El colorante *Alcian Blue* tiñe de un color azul oscuro intenso los glucosaminoglicanos sulfatados, siendo éstos uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular sintetizada por los condrocitos.

#### 3.2.5.3.2. Protocolo extracción del *Alcian Blue*

Para la determinación espectrofotométrica del *Alcian Blue*, se aspiró el PBS y los esferoides fueron transferidos a una placa de 96 pocillos. Para la extracción del colorante se añadió una disolución guanidina-HCl 6 M (*Fisher Scientific*, España; 150 µL) y se incubó la placa toda la noche en una cámara de atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Transcurridas 24 horas, se

procedió a la lectura por triplicado de la absorbancia a 595 nm, utilizando guanidina-HCl como blanco, en un espectrofotómetro de placas.

### 3.3. Ensayos de transfección

#### 3.3.1. Preparación de los complejos de transfección

Con el fin de determinar el efecto de la densidad celular sobre la eficiencia de transfección se estudiaron dos densidades celulares (7,500 y 15,000 células por pocillo; véase 3.2.4. *Siembra de las líneas celulares de iMSCs*). Las placas de 96 pocillos conteniendo las iMSCs fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C con el fin de garantizar la adhesión celular antes de la realización de los ensayos.

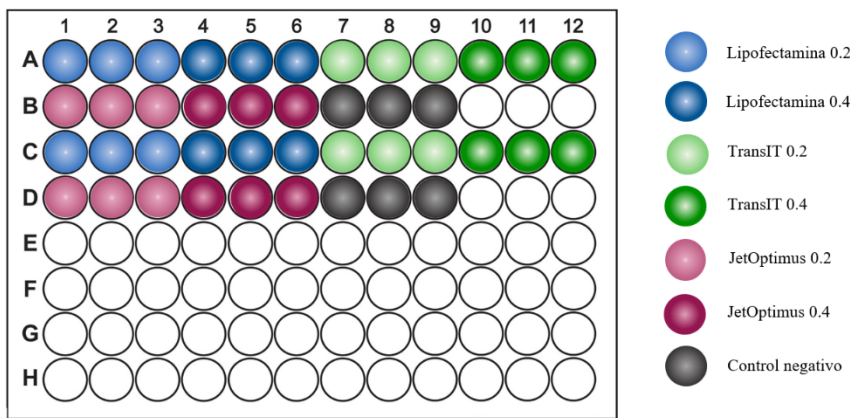
Con objeto de determinar el efecto de la dosis de reactivo sobre la eficiencia transfección se prepararon complejos del plásmido pCMV SPORT  $\beta$ -Gal (100 ng) con distintos volúmenes de los reactivos de transfección Lipofectamina<sup>TM</sup> Stem, (*Invitrogen<sup>TM</sup> ThermoFisher Scientific*, España), TransIT<sup>®</sup> (*Mirus Bio<sup>®</sup>, ThermoFisher Scientific*) y JetOptimus<sup>®</sup> (*Polyplus-transfection<sup>®</sup>*), siguiendo las instrucciones del fabricante, en cada caso:

- Para preparar los complejos de transfección con Lipofectamina se realizaron diluciones separadas del plásmido (100 ng) y la cantidad correspondiente a ensayar del reactivo (0.2 o 0.4  $\mu$ l), en 5  $\mu$ l de medio OptiMEM<sup>TM</sup> (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*), en tubos de centrifuga de 1.5 mL. A continuación, ambas diluciones fueron combinadas en partes iguales e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la formación de los complejos.
- Los complejos con TransIT se formaron añadiendo directamente el reactivo (0.2  $\mu$ l o 0.4  $\mu$ l) a las diluciones de plásmido (100 ng) en medio Opti-MEM 1 X (9  $\mu$ l) en tubos de 1.5 mL. A continuación, se dejaron incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente para favorecer la formación de los complejos.
- Para preparar los complejos con JetOptimus se añadieron los volúmenes correspondientes de reactivo (0.2  $\mu$ l o 0.4  $\mu$ l) a las diluciones de plásmido (100 ng) en 12.5  $\mu$ l de solución tampón JetOptimus<sup>®</sup> en tubos de 1.5 mL. A continuación, se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con el fin de favorecer la formación de los complejos.



### 3.3.2. Ensayo de optimización de la transfección

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la adición de los complejos a los diferentes pocillos de la placa, previamente sembrados con las células. Antes de la transfección, se realizó un lavado de las monocapas celulares con DMEM y a continuación se añadieron los diferentes complejos mediante goteo, siguiendo el esquema mostrado en la **Figura 7**. Posteriormente, se añadió medio DMEM sin suplementar hasta un volumen final de 50  $\mu$ l y las placas fueron incubadas durante 3 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda. Finalmente, se añadieron 50  $\mu$ l de DMEM 20 % SFB 2 % P/E y las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control negativo de la transfección se emplearon células sin transfectar cultivadas en 100  $\mu$ l de DMEM 10 % SFB 1 % P/E.



**Figura 7.** Esquema de las condiciones del ensayo de transfección. Las iMSCs fueron sembradas a las densidades celulares de 7,500 y 15,000 células por pocillo, y transfectadas con Lipofectamina o Trans IT (filas A y D) y JetOptimus (filas B y D) a las dosis indicadas. Como control negativo se emplearon células sin transfectar cultivadas en medio de cultivo (filas B y D). Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

### 3.3.3. Evaluación de la transfección a lo largo del tiempo

Tras el ensayo de optimización de la transfección se seleccionaron las condiciones (densidad celular, volumen de reactivo) que dieron lugar a valores más elevados de expresión génica, y se evaluó la efectividad de los diferentes reactivos de transfección a lo largo del tiempo. Para ello, se sembraron las líneas celulares a la densidad escogida en los ensayos de optimización (7,500 células por pocillo) en placas de 96 pocillos en medio DMEM 10 % SFB 1 % P/E. Las placas de 96 pocillos conteniendo las iMSCs fueron incubadas durante 24 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda con el fin de garantizar la adhesión celular antes de la realización de los ensayos. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaron con DMEM antes de proceder a la transfección por goteo. La distribución de la placa es análoga a la **Figura 7** eliminando una dosis de cada reactivo de transfección. Posteriormente, se añadió medio DMEM sin suplementar hasta un volumen final de 50  $\mu$ l y las placas fueron incubadas durante 3 horas. Finalmente, se añadieron 50  $\mu$ l de DMEM 20 % SFB 2 % P/E y las placas se incubaron durante

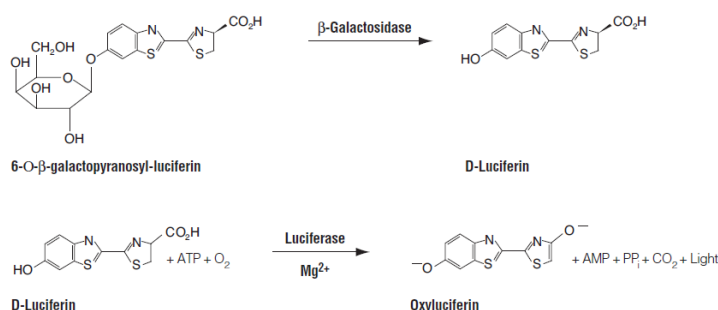
24 y 96 horas a 37 °C. Como control negativo de la transfección se emplearon células cultivadas en 100 µl de DMEM 10 % SFB 1 % P/E.

### 3.3.4. Análisis de la eficiencia de transfección

#### 3.3.4.1. Ensayo Beta-Glo

El análisis de la eficiencia de la transfección se llevó a cabo mediante el ensayo Beta-Glo (*Promega*, España). Este sistema de ensayo está constituido por dos componentes que son mezclados para formar el reactivo Beta-Glo®. Dicho reactivo proporciona un sistema de reacción enzimática acoplada que usa un sustrato de luciferina-galactósido (6-O-β-galactopiranosil-luciferina). La β-galactosidasa es la enzima responsable de la ruptura de la luciferina-galactósido dando lugar a luciferina y galactosa. Después una luciferasa metaboliza la luciferina para generar luz con una intensidad directamente proporcional a la cantidad de β-galactosidasa presente en las células (**Figura 8**).

Transcurridos 1 día (3.3.2 *Ensayo de optimización de la transfección*) y/o 3 días (3.3.3 *Evaluación de la transfección a lo largo del tiempo*) desde la transfección se retiró el medio de los pocillos, se hizo un lavado de los mismos con medio DMEM y, posteriormente se añadieron 100 µl de DMEM y 100 µl del reactivo Beta-Glo (relación 1:1 con el volumen del medio). Las placas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos y su contenido fue transferido a placas blancas de luminiscencia (*Nunclon™ Delta Surface ThermoFisher*, Dinamarca). Las placas fueron leídas en un espectrofotómetro de placas *Sinergy HTX (Biotek*, EE. UU.), utilizando el modo de luminiscencia. Los valores obtenidos fueron expresados como Unidades Relativas de Luminiscencia (URL). Para minimizar la interferencia de fondo de las mediciones, se utilizaron como blanco los valores URL correspondientes a las células del control negativo que fueron sustraídos en los cálculos de cada grupo de estudio.



**Figura 8.** Reacción enzimática acoplada del sistema de ensayo Beta-Glo. Tomada de: protocolo del sistema de ensayo Beta-glo (*Promega*).

### 3.3.4.2. Kit de tinción Beta-Gal

El kit de tinción  $\beta$ -Gal ( *$\beta$ -gal staining set, Roche, España*) permite la detección específica del gen *lacZ* bacteriano que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa. En combinación con un tampón de hierro específico, la tinción  $\beta$ -Gal ofrece un procedimiento histoquímico que permite la detección mediante microscopía óptica de células individuales que expresan el gen *lacZ*, produciendo una coloración azul de las células que han sido transfectadas.

En primer lugar, se incubó la solución X-Gal en un baño a 37 °C hasta que la solución se volvió transparente y seguidamente se pasó por el vórtex. A continuación, se diluyó 1 parte de la solución X-Gal (150  $\mu$ L) con 19 partes de tampón de hierro (2850  $\mu$ L). La mezcla resultante se mantuvo en agitación durante 10 minutos y posteriormente se filtró con un filtro de 0.22  $\mu$ m.

Transcurridas 24 y 72 horas desde la transfección se lavaron los pocillos con 200  $\mu$ L de PBS, y las células fueron fijadas con 100  $\mu$ L de formaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el formaldehído y se lavaron los pocillos tres veces con PBS. Tras el lavado, se adicionaron 150  $\mu$ L de reactivo de tinción por pocillo y se dejó incubar la placa durante 3 horas a 37 °C en condiciones de atmósfera húmeda, verificando periódicamente el desarrollo de coloración bajo el microscopio óptico. Una vez teñidas las células, se retiró la solución de tinción, se lavaron nuevamente las células 3 veces con PBS y se analizaron bajo el microscopio óptico.

### 3.3.5. Análisis de la viabilidad celular

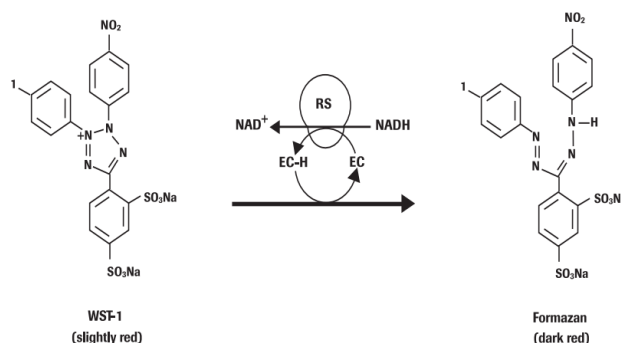
Para el estudio de la viabilidad celular se utilizó el reactivo *Cell Proliferation Reagent WST-1* (Roche, España) basado en un ensayo colorimétrico para la cuantificación espectrofotométrica de la proliferación y de la viabilidad celular. Este reactivo es una sal de tetrazolio de color rojo claro que al ser reducida por las enzimas celulares genera formazán de tonalidad rojo oscuro (**Figura 9**). De esta forma, se produce un aumento de la absorbancia que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo celular.

Así, a los mismos tiempos indicados anteriormente desde la transfección (3.3.5. *Análisis de la eficiencia de transfección*), se retiró el medio de cultivo de las células y se añadió medio DMEM (100  $\mu$ l) y el reactivo WST-1 (10  $\mu$ l) (dilución final 1:10). Las placas fueron incubadas a 37 °C y en atmósfera húmeda al 5 % CO<sub>2</sub> durante tres horas, realizándose mediciones de las variaciones de la absorbancia a 450 nm cada hora en un espectrofotómetro de placas.

El porcentaje de viabilidad celular de cada grupo de estudio fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \text{Absorbancia muestra} / \text{Absorbancia control negativo} \times 100$$

correspondiendo el control negativo a los valores de absorbancia registrados en las células sin transfectar, cultivadas en medio de cultivo DMEM 10 % SFB 1 % P/E.



**Figura 9.** Escisión de la sal de tetrazolio WST-1 a formazán. (EC = reactivo de acoplamiento de electrones RS = sistema succinato-tetrazolio-reductasa mitocondrial). Tomada de protocolo *Cell Proliferation Reagent WST-1*(Roche).

### 3.3.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en 2 líneas celulares de iMSCs. Los ensayos de optimización de la transfección fueron además repetidos en 2 experimentos independientes. Los valores obtenidos en cada grupo de estudio fueron promediados y expresados como el valor medio de los distintos replicados  $\pm$  su desviación típica (SD).

La normalidad de los datos fue estudiada con un test de *Shapiro-Wilk* con el fin de seleccionar el test más adecuado para evaluar las diferencias entre los grupos. Las diferencias observadas entre los distintos grupos fueron analizadas mediante la prueba estadística ANOVA de 1 factor fijo, y la prueba *t-Student* a un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 0.05. En caso de no cumplirse normalidad se realizaron las pruebas no paramétricas para muestras independientes *Kruskal-Wallis* y pruebas de rango con signo de *Wilcoxon*. Todos los análisis fueron realizados con el programa *IBM SPSS Statistics 23*. Los p-valores ( $p$ )  $<$  0.05 fueron considerados estadísticamente significativos

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Determinación de la concentración del plásmido.

Las concentraciones obtenidas de ambas muestras del plásmido, así como sus relaciones de la relación de absorbancias a 260/280 nm se muestran en la **Tabla 1**.

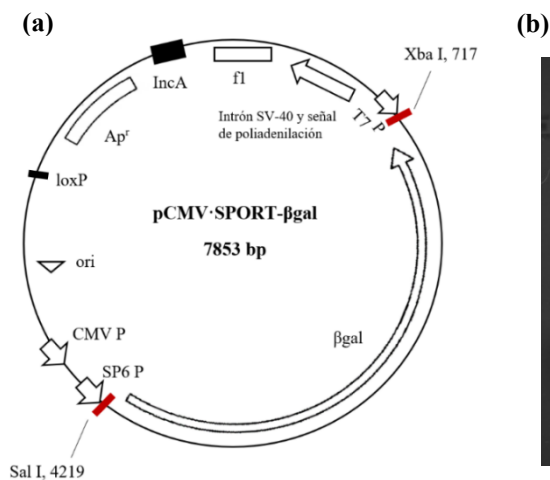
**Tabla 1.** Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) y relaciones de absorbancia (A) 260/280 (nm) medidas en un bio-espectrofotómetro para microgota y cubeta para ambas muestras del plásmido pCMV Sport  $\beta$ -gal.

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	A 260/280
1	60.508	1.809
2	326.405	1.706

Las muestras aisladas mostraron valores de concentración en torno a 60 µg/ml y 320 µg/ml, mostrando la primera de ellas una pureza óptima, al estar sus cocientes de absorbancias dentro del rango de 1.8 a 2.

#### 4.2. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pCMV SPORT β-gal

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa efectuada para la verificación del ADN plasmídico se muestran en la **Figura 10**. Tras la digestión del pCMV SPORT-β-gal con las enzimas *Xba I* y *Sal I* se obtuvieron 2 bandas en torno a 3502 pares de bases (pb) y 4351 pb, correspondiéndose con los fragmentos esperados tras su digestión.

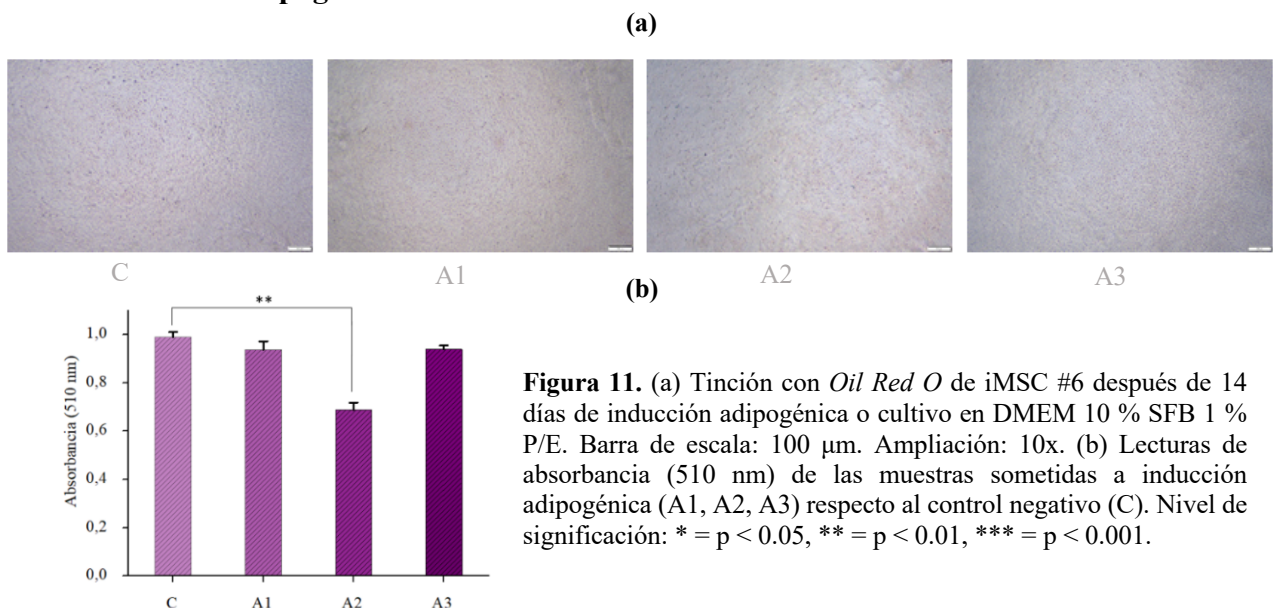


**Figura 10.** (a) Esquema del plásmido pCMV SPORT β-gal indicando los puntos de corte de las enzimas *Xba I* y *Sal I*. (b) Electroforesis en gel de agarosa. Se observa el marcador de peso molecular (M) y los dos fragmentos en los que se escinde el plásmido pCMV SPORT β-gal (P) al ser digerido con las enzimas de restricción *Sal I* y *Xba I*.

#### 4.3. Potencial de diferenciación de las iMSCs

Para comprobar el mantenimiento de la multipotencia de las iMSCs se cultivó una de las dos líneas celulares (#13) bajo condiciones inductoras de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica.

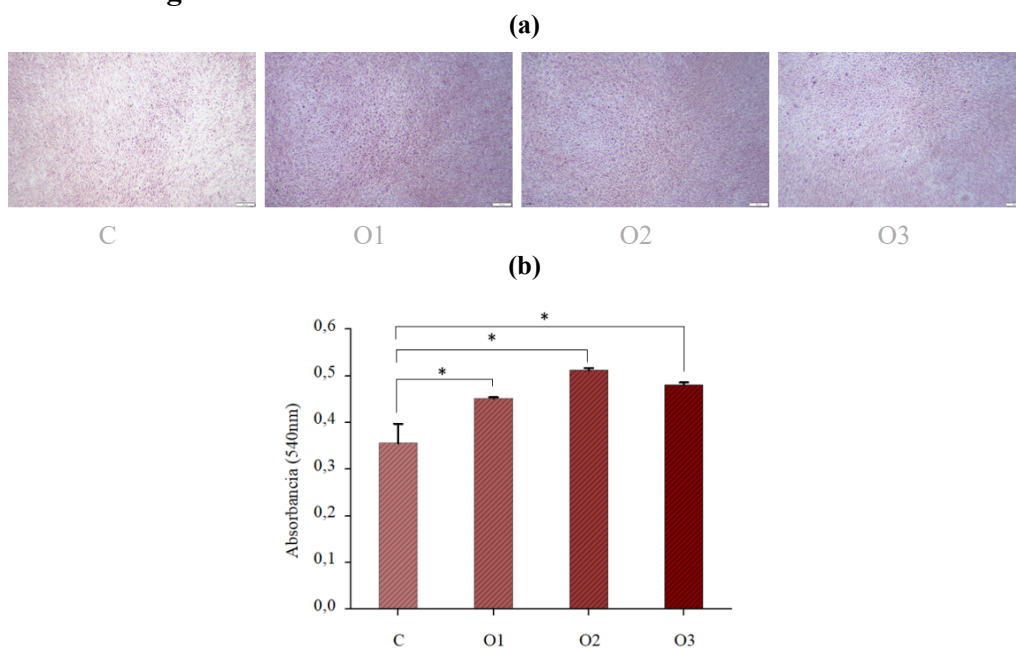
##### 4.3.1. Adipogénesis



**Figura 11.** (a) Tinción con *Oil Red O* de iMSC #6 después de 14 días de inducción adipogénica o cultivo en DMEM 10 % SFB 1 % P/E. Barra de escala: 100 µm. Ampliación: 10x. (b) Lecturas de absorbancia (510 nm) de las muestras sometidas a inducción adipogénica (A1, A2, A3) respecto al control negativo (C). Nivel de significación: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

El colorante *Oil Red O* proporciona una coloración rojiza a las gotas de lípidos intracelulares. (Piñeiro-Ramil et al., 2020). Las iMSC del ensayo superior (**Figura 11**) no mostraron tinción y por lo tanto se deduce que o bien estas células carecen del potencial para diferenciarse en el linaje adipogénico, o bien que se podría requerir un tiempo mayor de inducción para observar diferenciación. Estos resultados son consistentes con estudios previos sobre la evaluación de la capacidad de diferenciación adipogénica de MSCs inmortalizadas. En ellos, las iMSCs (#6) mostraron una reducción significativa de la diferenciación adipogénica respecto las MSCs primarias después de 21 días de inducción. Aunque las iMSCs se diferenciaron a pre-adipocitos estos resultaron menos maduros que los formados por MSCs primarias y contenían vacuolas lipídicas más pequeñas (Piñeiro-Ramil et al., 2020).

#### 4.3.2. Osteogénesis



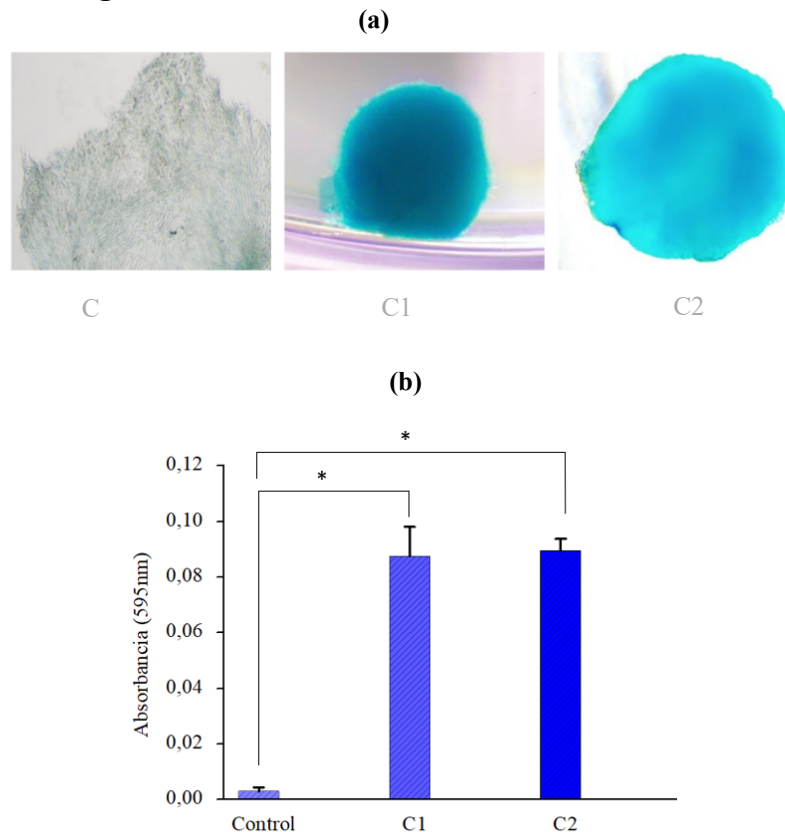
**Figura 12.** (a) Tinción con *Alizarin Red* de la línea de iMSC #6 después de 14 días de inducción osteogénica o cultivo en DMEM 10 % SFB 1 % P/E. Barra de escala: 100  $\mu$ m. Ampliación: 10x. (b) Lecturas de absorbancia (540 nm) de las muestras sometidas a inducción osteogénica (O1, O2, O3) respecto al control negativo (C). Nivel de significación \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Las iMSC pudieron diferenciarse en células del linaje osteogénico después de 14 días de inducción, como lo demuestran los depósitos de fosfato de calcio teñidos de rojo con *Alizarin Red* que se muestran en la **Figura 12a**. Además, las tres muestras analizadas evidenciaron diferencias significativas respecto al control tal como se ilustra en la **Figura 12b** ( $p \leq 0.029$ ).

Estos resultados concuerdan con estudios previos sobre la evaluación de la capacidad de diferenciación osteogénica de MSCs inmortalizadas en los que las iMSCs (#6) mostraron una extensión del área de mineralización cuatro veces mayor respecto las MSCs primarias sometidas a 21 días de inducción osteogénica (Piñeiro-Ramil et al., 2020).

Por ello podemos esperar que el desarrollo de una terapia génica segura y eficiente en las MSCs humanas pueda resultar útil por su potencial aplicación terapéutica en la regeneración y reparación ósea. Esto nos lleva a especular que la regeneración ósea podría lograrse de manera óptima en el futuro mediante el uso de vehículos apropiados que liberen moléculas capaces de dirigirse selectivamente a las MSC para promover la diferenciación osteogénica de las MSC de manera controlada (Marie y Fromigué, 2006).

### 4.3.3. Condrogénesis



**Figura 13.** (a) Tinción con *Alcian Blue* de la línea de iMSCs #6 tras 21 días de inducción condrogénica o cultivo en DMEM 10 % SFB 1 % P/E. Barra de escala: 100  $\mu$ m. Ampliación: 10x. (b) Lecturas de absorbancia (595 nm) de las muestras sometidas a inducción condrogénica (C1, C2) respecto al control negativo (Control). Nivel de significación: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Como se puede observar en la **Figura 13a** las muestras sometidas a 21 días de inducción condrogénica pasaron de una morfología fibroblástica en monocapa (células control) a una forma de esferoides compactos (Almalki y Agrawal, 2016). De este modo se puede concluir que las células del control no desarrollaron la estructura esférica como consecuencia de la ausencia de síntesis de los componentes de la matriz extracelular característica de condrocitos. Tras la extracción del colorante *Alcian Blue* de los agregados se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las iMSCs del control ( $p \leq 0.032$ ) (**Figura 13b**). Por tanto, se deduce que las iMSCs mantienen el potencial de diferenciación condrogénica.

Estos resultados coinciden con estudios previos sobre la evaluación de la capacidad de diferenciación condrogénica de MSCs inmortalizadas. Las iMSCs (#6) pudieron diferenciarse en el linaje condrogénico después de 21 días de inducción en cultivo celular tridimensional (Piñeiro-Ramil et al., 2020).

#### **4.4. Ensayos de optimización de la transfección de iMSCs con los agentes de transfección Lipofectamina Stem, TransIT y JetOptimus**

Con objeto de maximizar la eficiencia de transfección de cada reactivo sin comprometer la viabilidad celular, se estudiaron diferentes condiciones de transfección variando tanto la dosis de los distintos reactivos de transfección (RT) como la densidad celular de siembra de las dos líneas celulares estudiadas. Así para una cantidad de DNA plasmídico constante de 0.1  $\mu\text{g}$  se ensayaron las relaciones de RT/DNA de 2 y 4.

##### **4.4.1. Análisis viabilidad celular**

En las **Figuras 14 y 15** se muestran los resultados de viabilidad celular de las dos líneas celulares (iMSCs #6: **Figura 14**; iMSCs #13: **Figura 15**) sembradas a las densidades celulares de 7,500 (**a y c**) y 15,000 células/pocillo (**b y d**) tras 24 horas de contacto con los diferentes reactivos de transfección (Lipofectamina, TransIT, JetOptimus) a distintas dosis (0.2, 0.4  $\mu\text{L}$ ). Ambos estudios fueron repetidos en 2 experimentos independientes para cada línea celular con el fin de contrastar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

El tratamiento de la línea celular de iMSCs #6 (**Figura 14**) mostró una clara disminución de sus porcentajes de supervivencia cuando fueron tratadas con el reactivo JetOptimus (hasta  $\sim 45\%$ ) con respecto al resto de reactivos ensayados, aunque solo se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el segundo de los ensayos realizados ( $p \leq 0.000$ ) (**Figura 14 c, d**).

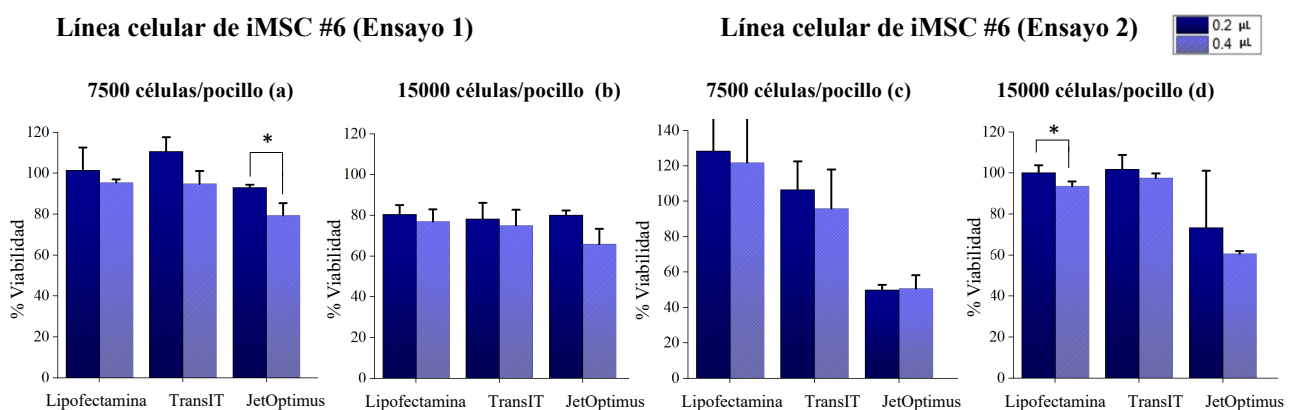
Centrándose en la dosis de reactivo a la densidad celular de 7,500 células/pocillo en esta misma línea celular, se observó además una disminución de la viabilidad dosis-dependiente con los 3 tipos de reactivos estudiados, aunque sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con el reactivo JetOptimus ( $p = 0.02$ ) (**Figura 14a**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las muestras tratadas con distintas dosis de Lipofectamina y TransIT en estas mismas condiciones en ninguno de los 2 ensayos ( $p \geq 0.08$ ) (**Figura 14 a y c**).

Con respecto a la mayor densidad celular estudiada (15,000 células/pocillo; **Figura 14 b y d**) se observó también una disminución de la viabilidad dependiente de la dosis con los reactivos



Lipofectamina y JetOptimus, aunque sólo la Lipofectamina dio lugar a diferencias estadísticamente significativas en el segundo ensayo realizado ( $p = 0.04$ ).

Cuando se compararon las viabilidades obtenidas a ambas densidades celulares se observaron en general porcentajes muy próximos de supervivencia celular a ambas densidades estudiadas, con tendencia a disminuir al duplicar la densidad de siembra. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas únicamente en el primer ensayo, con caídas de la viabilidad de aproximadamente un 20, 18 y 14 % al someterse las células al tratamiento con los reactivos Lipofectamina (dosis 0.4  $\mu\text{L}$ ), TransIT (dosis 0.2  $\mu\text{L}$ ) y JetOptimus (dosis 0.4  $\mu\text{L}$ ) respectivamente ( $p \leq 0.02$ ).

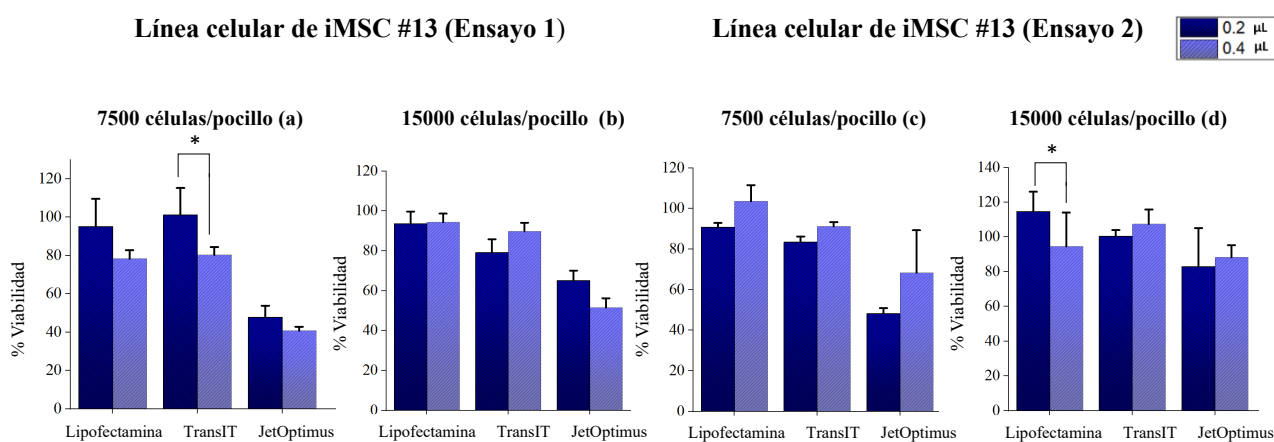


**Figura 14.** Porcentajes de viabilidad celular de la línea celular de iMSCs #6 sembrada a densidades celulares de 7,500 y 15,000 células por pocillo en función del tratamiento con distintas dosis (0.2 y 0.4  $\mu\text{L}$ ) de los distintos complejos formados entre el plásmido y los agentes de transfección (Lipofectamina, TransIT o JetOptimus). Cada condición fue ensayada por triplicado en 2 experimentos independientes (Ensayo 1 y 2). Nivel de significación: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Los ensayos realizados en la línea celular #13 (**Figura 15**) mostraron también una caída significativa de la viabilidad celular en presencia del reactivo JetOptimus (~ 40 %) mostrando diferencias significativas con respecto al resto de los reactivos estudiados en los 2 ensayos realizados ( $p \leq 0.013$ ). Del mismo modo que en la línea #6 a la menor densidad celular estudiada (7,500 células/pocillo), se observó una reducción de la viabilidad con el incremento de la dosis en los 3 reactivos estudiados, si bien sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas con el reactivo TransIT (**Figura 15 a y b**) en el primero de los ensayos realizados ( $p = 0.034$ ). Asimismo, y en concordancia con los ensayos realizados en la línea #6 a la densidad celular de 15,000 células por pocillo, sólo se observó una disminución de la viabilidad celular con el incremento de la dosis de Lipofectamina, en el segundo de los ensayos realizados ( $p = 0.027$ ).

Cuando se compararon las viabilidades obtenidas a ambas densidades celulares se observó una tendencia general a aumentar la supervivencia celular al duplicar la densidad celular de siembra,

en contraste con los resultados obtenidos en la línea #6. En el primer ensayo, se observaron incrementos significativos de la viabilidad celular al aumentar la densidad de siembra de aproximadamente un 16, 10 y 17 % frente al tratamiento con los reactivos de transfección Lipofectamina (dosis 0.4  $\mu\text{L}$ ), TransIT (dosis 0.4  $\mu\text{L}$ ) y JetOptimus (dosis 0.2  $\mu\text{L}$ ) respectivamente ( $p \leq 0.03$ ). En el segundo ensayo, se mostró una caída significativa de la viabilidad celular al aumentar la densidad de siembra únicamente al tratar las células con Lipofectamina (dosis 0.4  $\mu\text{L}$ ) y TransIT (dosis 0.2 y 0.4  $\mu\text{L}$ ) ( $p < 0.03$ ). Sin embargo, JetOptimus, no generó diferencias estadísticamente significativas en concordancia con los resultados obtenidos en el segundo ensayo de la línea #6.



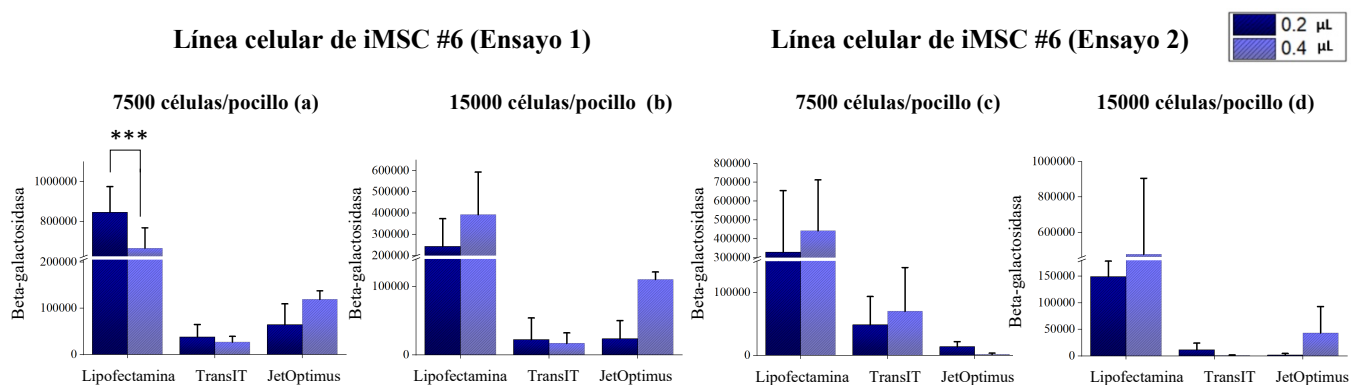
**Figura 15.** Porcentajes de viabilidad celular de la línea celular de iMSCs #13 sembrada a densidades celulares de 7,500 y 15,000 células por pocillo en función del tratamiento con distintas dosis (0.2 y 0.4  $\mu\text{L}$ ) de los distintos complejos formados entre el plásmido y los agentes de transfección (Lipofectamina, TransIT, JetOptimus). Cada condición fue ensayada por triplicado en 2 experimentos independientes (Ensayo 1 y 2). Nivel de significación: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

#### 4.4.2. Análisis eficiencia de transfección

La evaluación de la eficacia de la transfección se basó en la cuantificación de la actividad beta-galactosidasa de las células transfectadas (**Figuras 16 y 17**).

El primer ensayo realizado en la línea #6 (**Figura 16 a y b**) evidenció diferencias significativas entre las muestras tratadas con los compuestos Lipofectamina, TransIT y JetOptimus, siendo el primer compuesto el que promovió mayores eficiencias de transfección para ambas densidades celulares ( $p \leq 0.000$ ) seguido de TransIT y en último lugar de JetOptimus. Además, se apreció una disminución significativa de la actividad beta-galactosidasa ( $\sim 21\%$ ) en las células tratadas con la mayor dosis de Lipofectamina (0.4  $\mu\text{L}$ ) frente a la dosis más baja (0.2  $\mu\text{L}$ ) a la menor densidad celular estudiada (7,500 células/pocillo) (**Figura 16a**) ( $p = 0.0005$ ). En el segundo ensayo (**Figura 16 c y d**) las muestras tratadas con Lipofectamina mostraron una actividad beta-galactosidasa significativamente superior a las muestras tratadas con TransIT y JetOptimus, corroborando así los resultados obtenidos en el primer ensayo ( $p \leq 0.01$ ).

Cuando se compararon las eficiencias obtenidas a ambas densidades celulares se observaron en general mayores eficiencias de transfección a la menor densidad estudiada. En el ensayo 1, la eficiencia de transfección disminuyó en todos los casos al duplicar la densidad de siembra, pero sólo lo hizo de manera significativa en las muestras tratadas con Lipofectamina (0.4  $\mu$ L), cuya expresión de la actividad beta-galactosidasa se redujo un 71 % ( $p = 0.02$ ). Del mismo modo, en el ensayo 2, se observó un descenso de la eficiencia de transfección al aumentar la densidad celular estudiada. El reactivo de transfección TransIT (0.4  $\mu$ L) fue el único que evidenció una disminución significativa de la expresión de actividad beta-galactosidasa (~ 98 %) al aumentar la densidad de siembra ( $p = 0.03$ ).



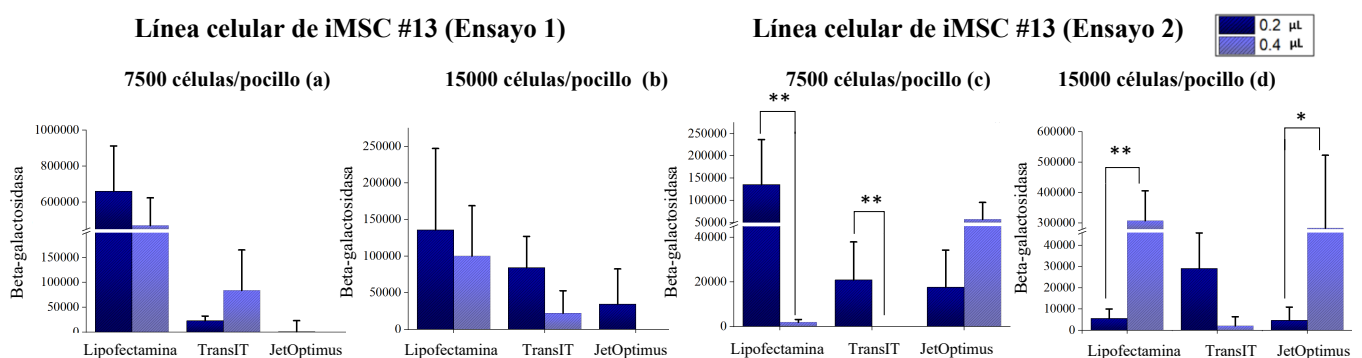
**Figura 16.** Actividad beta-galactosidasa de la línea celular de iMSCs #6 a densidades celulares de 7,500 y 15,000 células por pocillo en función del tratamiento con los distintos complejos formados entre el plásmido y los agentes de transfección (Lipofectamina, TransIT, JetOptimus) a dosis de 0.2 y 0.4  $\mu$ L. Cada condición fue ensayada por triplicado en 2 experimentos independientes (Ensayo 1 y 2). Nivel de significación: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

En concordancia a lo observado en la línea #6 los ensayos de transfección realizados en la línea de iMSCs #13, mostraron una mayor eficiencia de transfección de la Lipofectamina, si bien no se observaron diferencias significativas con respecto al resto de reactivos ensayados ( $p \geq 0.108$ ).

Además, en el segundo de los ensayos realizados (**Figura 17 c y d**) se observaron caídas significativas del 26 y 73 % de la actividad beta-galactosidasa en las iMSCs tratadas con la mayor dosis (0.4  $\mu$ L) frente a la menor dosis (0.2  $\mu$ L) de los compuestos Lipofectamina y TransIT respectivamente, a la densidad de 7,500 células por pocillo ( $p \leq 0.0038$ ). En contraste, a la mayor densidad celular estudiada (15,000 células/pocillo) se observaron aumentos significativos del 98 y 92 % de la actividad beta-galactosidasa en las iMSCs tratadas con la dosis más alta de los compuestos Lipofectamina y JetOptimus ( $p \leq 0.01$ ).

Cuando se compararon los niveles de actividad beta-galactosidasa alcanzados a ambas densidades celulares se observaron en general, mayores eficiencias de transfección a la menor densidad celular ensayada, en concordancia a lo observado en la línea #6. En el primer ensayo, el tratamiento con Lipofectamina (dosis 0.4  $\mu$ L) supuso una disminución significativa de la

actividad beta-galactosidasa (~ 79 %) ( $p = 0.02$ ). En contraposición, el tratamiento con TransIT (dosis 0.2  $\mu\text{L}$ ) dio lugar a un incremento de la eficiencia de transfección de un 72 % ( $p = 0.003$ ). En el segundo ensayo, la Lipofectamina fue el único reactivo que supuso cambios significativos de la eficiencia de transfección de la línea celular, obteniéndose resultados antagónicos para ambas dosis del reactivo. Al incrementar la densidad celular disminuyó la eficiencia de transfección (~ 95 %) con las dosis menores de reactivo (0.2  $\mu\text{l}$ ) ( $p = 0.03$ ). Sin embargo, a mayores dosis de Lipofectamina (0.4  $\mu\text{L}$ ) se observó un incremento significativo de la actividad beta-galactosidasa (~ 99 %) al aumentar la densidad de estudio ( $p = 0.005$ ), análogamente a los resultados obtenidos en el ensayo 2 de la línea de iMSC #6.



**Figura 17.** Actividad beta-galactosidasa de la línea celular de iMSCs #13 a densidades celulares de 7,500 y 15,000 células por pocillo en función del tratamiento con los distintos complejos formados entre el plásmido y los agentes de transfección (Lipofectamina, TransIT, JetOptimus) a dosis 0.2 y 0.4  $\mu\text{L}$ . Cada condición fue ensayada por triplicado en 2 experimentos independientes (Ensayo 1 y 2). Nivel de significación: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

#### 4.4.3. Determinación de las condiciones óptimas de transfección en base a los resultados obtenidos

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y transfección se eligieron las mejores condiciones de cada reactivo con el fin de estudiar su eficiencia transfección a lo largo del tiempo. Así se seleccionó la menor densidad celular estudiada (7,500 células por pocillo) ya que evidenció valores más elevados de actividad beta-galactosidasa sin un aumento acusado de la citotoxicidad de los distintos reactivos con respecto a la mayor densidad ensayada (15,000 células/pocillo).

En cuanto a la dosis óptima de cada reactivo se seleccionaron las siguientes:

Con respecto al reactivo Lipofectamina se seleccionó la menor de las dosis ensayadas (0.2  $\mu\text{l}$ ) puesto que el aumento de esta supuso una reducción de la viabilidad y de la eficiencia de transfección. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que el tratamiento de MSCs derivadas de médula ósea con cantidades crecientes de liposomas catiónicos, manteniendo constante la cantidad de pADN (2  $\mu\text{g}$ ), llevaron a una reducción de la viabilidad celular (Da Silva et al., 2010). Además, se concluyó que mayores cantidades de lípido catiónico

no se correlacionan con mayores cantidades de pADN dentro de las células. De hecho, se demostró que para cada tipo de célula existe una dosis óptima de plásmido, por encima de la cual cualquier plásmido adicional no contribuirá a la expresión del transgén aunque pueda llegar al núcleo.

El reactivo lípido-polímero TransIT evidenció una mejora significativa de la eficiencia de transfección a relaciones reactivo/pADN de 2 sin comprometer la viabilidad celular de las líneas. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se utilizó este mismo agente para la transfección de MSCs humanas derivadas de médula ósea. Tras comparar las relaciones de reactivo/pADN de 3 y 6 se observó una mayor expresión del gen reportero a la menor relación estudiada (Cheung et al., 2018). Por ello, al igual que para la Lipofectamina se seleccionó la menor dosis de este reactivo.

El reactivo JetOptimus mostró una mayor citotoxicidad que el resto de los reactivos sin diferencias evidentes entre ambas dosis estudiadas, promoviendo la mayor de ellas (0.4  $\mu$ L) valores más elevados de actividad beta-galactosidasa. Por consiguiente, se escogió la dosis de 0.4  $\mu$ L para los posteriores ensayos de transfección a dos tiempos. Estos resultados contrastan con ensayos realizados con JetOptimus en líneas celulares de MSCs y tumorales en las que se obtuvieron eficiencias de transfección superiores a las obtenidas con otros reactivos de transfección comerciales como Lipofectamina, mientras se mantenía una excelente viabilidad celular (Nyamay'Antu Alengo et al., 2019).

#### **4.5. Ensayos de transfección a dos tiempos**

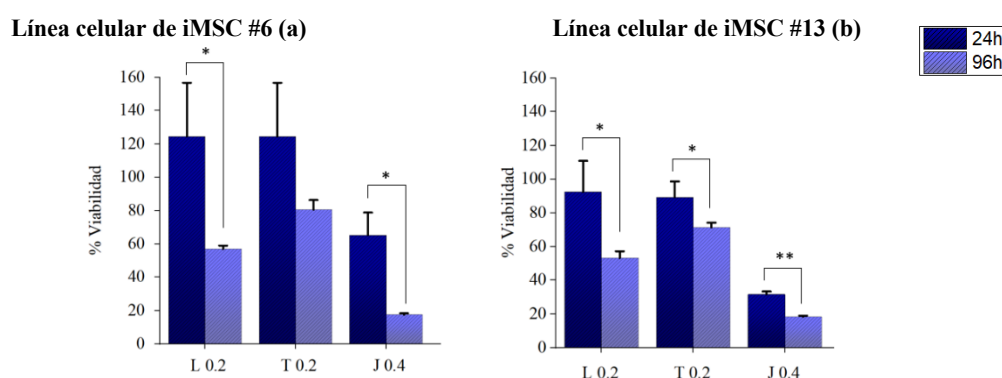
##### **4.5.1. Análisis de la viabilidad celular de la transfección de las líneas celulares de iMSCs**

Tras seleccionar las mejores condiciones de cada reactivo se amplió el tiempo de contacto de las iMSCs con los complejos de pADN con los distintos reactivos y se evaluó la viabilidad celular tras el proceso de transfección.

Analizando los ensayos a dos tiempos para cada línea celular, se observaron diferencias significativas entre los dos tiempos de incubación tal y como se muestra en la **Figura 18**, apreciándose una reducción del porcentaje de viabilidad celular a medida que se incrementa el tiempo del tratamiento con el agente de transfección. Así, en la línea #6 la viabilidad celular decayó un 54, 35 y 73 % al extender el tiempo de incubación de 24 a 96 horas en las muestras tratadas con Lipofectamina, TransIT y JetOptimus, respectivamente. Sin embargo, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento con Lipofectamina y JetOptimus ( $p \leq 0.027$ ). Análogamente, los resultados en la línea #13 mostraron un descenso

de la viabilidad celular de hasta un 40 % en las mismas condiciones, con diferencias estadísticamente significativas en los tres reactivos ensayados ( $p \leq 0.022$ ).

Estos resultados concuerdan con estudios previos en células HeLa en los que el tratamiento con distintas dosis de Lipofectamina causó una pérdida significativa de viabilidad (20-55 %) con el tiempo de exposición con el reactivo. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el presente estudio no se observó una disminución significativa de la viabilidad en las células que fueron tratados con los complejos de pADN y TransIT (Khodthong et al., 2012). Por otra parte, la alta citotoxicidad observada con los complejos con JetOptimus concuerda con ensayos previos de transfección de MSCs humanas utilizando poliplexos análogos (PEI) en los que la supervivencia celular mostró una caída significativa al prolongar el tiempo de exposición al reactivo de 1 a 4 días (King et al., 2012).



**Figura 18.** Porcentaje de viabilidad celular de las líneas celulares de iMSCs #6, (a), y #13, (b) en función del tratamiento con los distintos complejos de transfección formados entre el plásmido y los agentes de transfección a distintas concentraciones: Lipofectamina 0.2 µL (L 0.2), TransIT 0.2 µL (T 0.2), y JetOptimus 0.4 µL (J 0.4). Cada condición fue ensayada por triplicado. Nivel de significación \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## 4.5.2. Análisis de la eficiencia de transfección de las líneas celulares de iMSCs

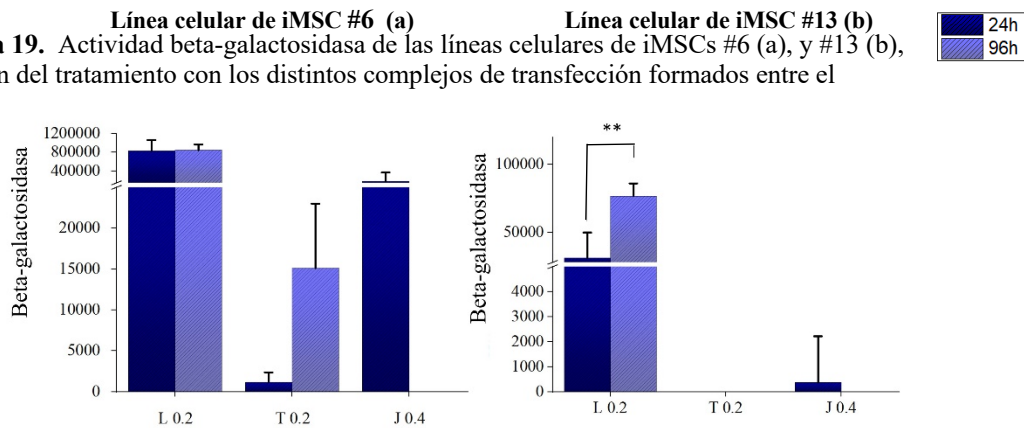
### 4.5.2.1. Ensayo β-glo

Los resultados de la actividad beta-galactosidasa tras 1 y 3 días de contacto con los distintos reactivos se muestran en la **Figura 19**.

Los ensayos en la línea celular #6 no evidenciaron diferencias significativas en la actividad beta-galactosidasa observada al analizar por separado los tratamientos con los distintos agentes de transfección a lo largo del tiempo ( $p \geq 0.052$ ). El tratamiento con Lipofectamina dio lugar a los valores más elevados de transfección siendo estos valores significativamente superiores a los obtenidos con TransIT a las 24 horas de incubación ( $p = 0.07$ ). Además, la incubación con Lipofectamina dio lugar a un mantenimiento de los niveles de actividad beta-galactosidasa a lo largo del tiempo, siendo estos valores significativamente superiores a los obtenidos con el reactivo JetOptimus a las a las 96 h de incubación ( $p = 0.06$ ). En este sentido es importante

resaltar que los valores de transfección con JetOptimus a las 96 horas fueron próximos a los obtenidos con el control negativo de células sin transfectar.

**Figura 19.** Actividad beta-galactosidasa de las líneas celulares de iMSCs #6 (a), y #13 (b), en función del tratamiento con los distintos complejos de transfección formados entre el



plásmido y distintas dosis de los agentes de transfección: Lipofectamina 0.2  $\mu$ L (L 0.2), TransIT 0.2  $\mu$ L (T 0.2), y JetOptimus 0.4  $\mu$ L (J 0.4). Cada condición fue ensayada por triplicado. Nivel de significación: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Los ensayos realizados en la línea celular #13 mostraron una tendencia similar en cuanto a que el tratamiento con Lipofectamina dio lugar a los valores más elevados de actividad con respecto al resto de los reactivos. En esta línea se observó un aumento significativo del 60 % en la actividad beta-galactosidasa en los tratamientos con Lipofectamina a las 96 horas en comparación con las 24 horas de incubación ( $p = 0.013$ ). Por el contrario, no se detectaron niveles de actividad beta-galactosidasa con el agente de transfección TransIT a ninguno de los tiempos de incubación. Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos en el ensayo de optimización en los que si se detectó actividad beta-galactosidasa utilizando la misma dosis de reactivo y densidad celular de esta misma línea celular. Sin embargo, es importante señalar la alta dispersión de los datos obtenidos en general con este reactivo, y el procesamiento de los datos realizado en el que se empleó como blanco los valores URL correspondientes a las células del control negativo, lo que podría explicar en parte la ausencia de expresión con este reactivo a este tiempo de incubación.

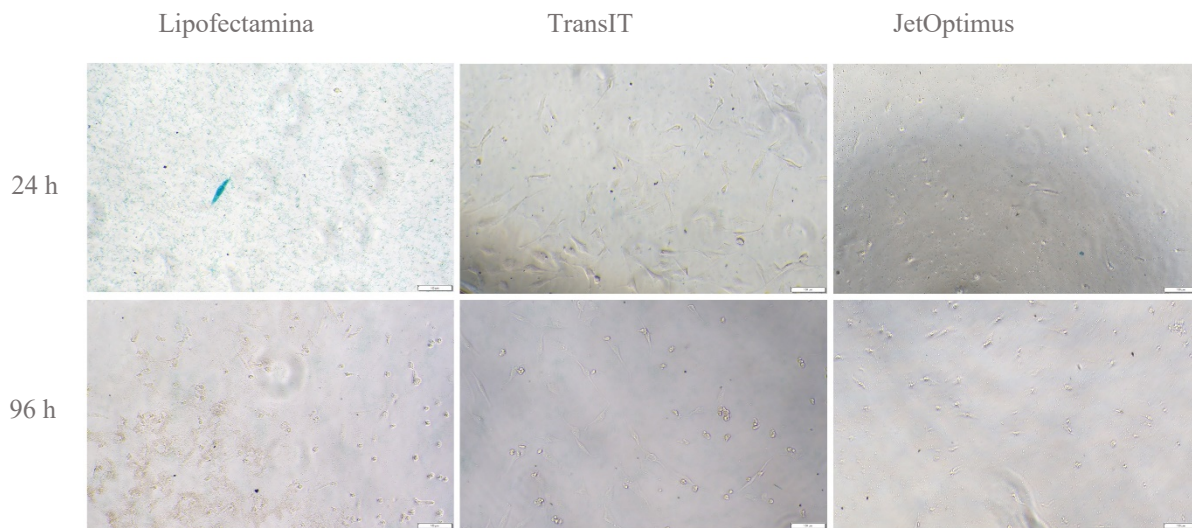
Finalmente, y en concordancia a lo observado en la línea celular #6, no se detectaron niveles de actividad beta-galactosidasa con el tratamiento con JetOptimus a las 96 horas de incubación.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en ensayos previos con poliplejos análogos a JetOptimus (PEI) en MSCs, en los que se evidenció un aumento de la eficiencia de transfección al prolongar el tiempo de exposición con el reactivo de 1 a 4 días (King et al., 2012). Además, también difieren con los resultados obtenidos en estudios previos en los que se comparó la eficiencia de transfección de los reactivos Lipofectamina y TransIT en células HeLa. En ellos la eficiencia de transfección de la Lipofectamina se redujo notablemente en comparación con las células que se transfectaron con TransIT a lo largo del tiempo (Khodthong et al., 2012).

#### 4.5.2.2. Ensayo $\beta$ -Gal Staining Kit

Finalmente se evaluó de forma cualitativa la expresión beta-galactosidasa inducida por los distintos reactivos mediante el ensayo de tinción  $\beta$ -Gal (**Figura 20**).

La tinción de las monocapas celulares de iMSCs tras la transfección con los distintos reactivos sólo evidenció positividad en las células tratadas con Lipofectamina a las 24 horas de la incubación con el complejo. Estos resultados pueden ser atribuidos a una posible menor sensibilidad de esta técnica con respecto al reactivo  $\beta$ -glo basado en medidas de luminiscencia de las células transfectadas.



**Figura 20.** Tinción con el Kit  $\beta$ -Gal Staining de la línea celular de iMSC #6 transfectadas con los complejos formados entre el plásmido pCMV SPORT  $\beta$ -gal y los distintos agentes de transfección en las condiciones determinadas en el estudio de optimización a dos tiempos de incubación (24 y 96 h).

Asimismo, es importante señalar que al extender el tiempo de incubación con los agentes de transfección se observó una clara disminución de la densidad celular. Este resultado concuerda con los ensayos de viabilidad realizados a distintos tiempos en las líneas celulares para estas condiciones (Véase **Figura 18**). Por consiguiente, se puede deducir que la toxicidad de los agentes de transfección se incrementa significativamente de manera proporcional al tiempo de incubación de las muestras, afectando negativamente a la eficiencia de transfección de estos.



## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido concluir los siguientes aspectos:

- Las líneas celulares de iMSCs derivadas de médula ósea conservan un mayor potencial de diferenciación hacia linajes osteogénicos y condrogénicos frente a linajes adipogénicos.
- La Lipofectamina es el reactivo más eficiente para transfectar líneas celulares de iMSCs derivadas de médula ósea y presenta una toxicidad moderada para su supervivencia. Por ello, presenta un alto potencial de transferencia no viral de genes para mejorar la eficacia terapéutica de las MSCs.
- TransIT presenta una menor eficiencia de transfección en comparación con la Lipofectamina, pero es más efectivo y menos citotóxico que JetOptimus en iMSCs.
- JetOptimus resulta muy citotóxico y poco eficiente para transfectar células difíciles de transfectar como iMSCs, en contraste a lo observado en estudios previos.
- Mayores densidades celulares limitan la eficiencia de la transfección de las iMSCs.
- Lipofectamina y TransIT son más eficientes a dosis bajas mientras que JetOptimus es más eficiente a dosis superiores.
- La Lipofectamina es el único reactivo capaz de mantener la expresión transgénica al cabo de 3 días.
- La supervivencia celular disminuye con el tiempo de exposición con los distintos reactivos de transfección estudiados.

## 6. Bibliografía

Abdallah, B. M., Haack-Sørensen, M., Burns, J. S., Elsnab, B., Jakob, F., Hokland, P. y Kassem, M. (2005) "Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(3), pp. 527–538.

Almalki, S. G. y Agrawal, D. K. (2016) "Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells", *Differentiation*, 92, pp. 41–51.

Billiet, L., Gomez, J. P., Berchel, M., Jaffrès, P. A., Le Gall, T., Montier, T., Bertrand, E., Cheradame, H., Guégan, P., Mével, M., Pitard, B., Benvegna, T., Lehn, P., Pichon, C. y Midoux, P. (2012) "Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line", *Biomaterials*, 33(10), pp. 2980–2990.

Boyette, L. B., Creasey, O. A., Guzik, L., Lozito, T. y Tuan, R. S. (2014) "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning", *STEM CELLS Translational Medicine*, 3(2), pp. 241–254.

Cheung, W. Y., Hovey, O., Gobin, J. M., Muradia, G., Mehic, J., Westwood, C. y Lavoie, J. R. (2018) "Efficient nonviral transfection of human bone marrow mesenchymal stromal cells shown using placental growth factor overexpression", *Stem Cells International*. doi:10.1155/2018/1310904.

- Dimmeler, S. y Leri, A. (2008) "Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy", *Circulation Research*, 102(11), pp. 1319–1330.
- Elouahabi, A. y Ruysschaert, J. M. (2005) "Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes", *Molecular Therapy*, 11(3), pp. 336–347.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. y Danielsen, M. (1987) "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), pp. 7413–7417.
- García, L., Urbiola, K., Düzgüneş, N. y Tros De Ilarduya, C. (2012) "Lipopolyplexes as nanomedicines for therapeutic gene delivery", *Methods in Enzymology*, 509, pp. 327–338.
- Gari, M., Alsehli, H., Gari, A., Abbas, M., Alkaff, M., Abuzinadah, M., Al-Sayes, F., Gari, M., Dallol, A., Abuzinadah, A. M. y Gauthaman, K. (2016) "Derivation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients", *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(6), pp. 732–739.
- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H. y Carr, A. J. (2015) "Osteoarthritis", *The Lancet*, 386(9991), pp. 376–387.
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Safdarian, E., Roointan, A. y Sahebkar, A. (2019) "Gene delivery using lipoplexes and polyplexes: Principles, limitations and solutions", *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 29(1), pp. 29–36.
- IBM Corporation (2019) *IBM SPSS Statics for Machintosh (Versión 26)* [Programa de ordenador]. Armonk, Nueva York: IBM Corporation.
- Khodthong, C., Ismaili, I. y Juckem, L. (2012) "The impact of transfection mediated toxicity-gene expression and cytotoxicity analysis of transfection reagents". Disponible en: [www.mirusbio.com/assets/technical-documents/the-impact-of-transfection-mediated-toxicity.pdf](http://www.mirusbio.com/assets/technical-documents/the-impact-of-transfection-mediated-toxicity.pdf) (Accedido: 12 febrero de 2021).
- King, W. J., Kouris, N. A., Choi, S., Ogle, B. M. y Murphy, W. L. (2012) "Environmental parameters influence non-viral transfection of human mesenchymal stem cells for tissue engineering applications", *Cell and Tissue Research*, 347(3), pp. 689–699.
- Marie, P. J. y Fromigué, O. (2006) "Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells", *Regenerative medicine*, 1(4), pp. 539–548.
- Nyamay'A., Moreau V., Premartin F., Benchimol T., Philipson Y., Denu M., Hella M. y Erbacher P. (2019) "Improved gene expression in hard-to-transfect cells with jetOPTIMUS® Transfection Reagent". Disponible en: [www.researchgate.net/publication/330778841\\_Improved\\_gene\\_expression\\_in\\_hard-to-transfect\\_cells\\_with\\_jetOPTIMUS\\_R\\_Transfection\\_Reagent](http://www.researchgate.net/publication/330778841_Improved_gene_expression_in_hard-to-transfect_cells_with_jetOPTIMUS_R_Transfection_Reagent) (Accedido 22 febrero de 2021)
- Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Ciccarone, V. C. y Price, P. J. (2001) "Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons", *Journal of Neuroscience Methods*, 112(2), pp. 95–99.
- Pawitan, J. A., Bui, T. A., Mubarak, W., Antarianto, R. D., Nurhayati, R. W., Dilogio, I. H. y Oceandy, D. (2020) "Enhancement of the therapeutic capacity of mesenchymal stem cells by genetic modification: a systematic review", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. doi: 10.3389/fcell.2020.587776.
- Pereira, D., Ramos, E. y Branco, J. (2015) "Osteoarthritis", *Acta Medica Portuguesa*, 28(1), pp. 99–106.
- Piñeiro-Ramil, M., Castro-Viñuelas, R., Sanjurjo-Rodríguez, C., Rodríguez-Fernández, S., Hermida-Gómez, T., Blanco-García, F. J., Fuentes-Boquete, I. y Díaz-Prado, S. (2020) "Immortalizing mesenchymal stromal cells from aged donors while keeping their essential features", *Stem Cells International*. doi:10.1155/2020/5726947.
- Pitard, B. y Habrant, D. (2017) "Supramolecular gene transfection agents", *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, 5, pp. 365–389.
- Roche diagnostics (2011) *Beta-Glo® Assay System*. Disponible en: <https://www.promega.es/products/luciferase-assays/reporter-assays/beta-glo-assay-system/?catNum=E4720> (Accedido: 15 enero de 2021).
- Samsonraj, R. M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J. H., van Wijnen, A. J. y Cool, S. M. (2017) "Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine", *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), pp. 2173–2185.

Shende, P., Ture, N., Gaud, R. S. y Trotta, F. (2019) "Lipid- and polymer-based plexes as therapeutic carriers for bioactive molecules", *International Journal of Pharmaceutics*, 558, pp. 250–260.

Shu, Y., Yang, C., Ji, X., Zhang, L., Bi, Y., Yang, K., Gong, M., Liu, X., Guo, Q., Su, Y., Qu, X., Nan, G., Zhao, C., Zeng, Z., Yu, X., Zhang, R., Yan, S., Lei, J., Wu, K. y Li, Y. (2018) "Reversibly immortalized human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) are responsive to BMP9-induced osteogenic and adipogenic differentiation", *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(11), pp. 8872–8886.

Sigma-Aldrich (2018) *Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability*. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html> (Accedido: 15 enero de 2021).

Yang, J., Cao, C., Wang, W., Tong, X., Shi, D., Wu, F., Zheng, Q., Guo, C., Pan, Z., Gao, C. y Wang, J. (2010) "Proliferation and osteogenesis of immortalized bone marrow-derived mesenchymal stem cells in porous polylactic glycolic acid scaffolds under perfusion culture", *Journal of Biomedical Materials Research*, 92(3), pp. 817–829.

Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R. y Anderson, D. G. (2014) "Non-viral vectors for gene-based therapy", *Nature Reviews Genetics*, 15(8), pp. 541–555.