



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

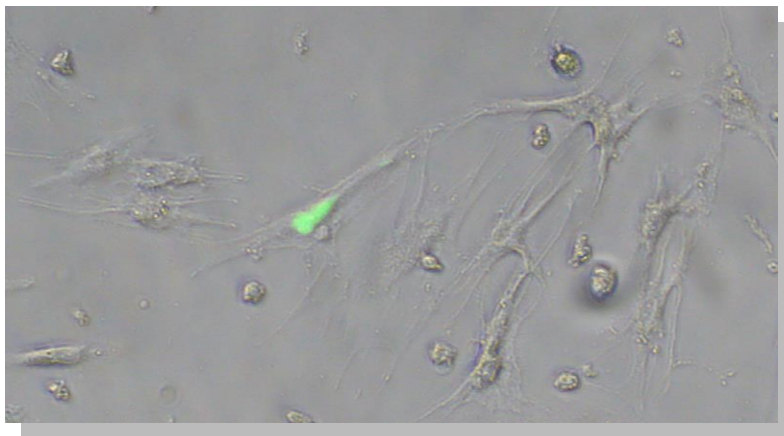
Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Sistemas de transferencia de genes para la transfección efectiva de células madre mesenquimales

Sistemas de transferencia de xenes para a transfección efectiva de células nai mesenquimais

Gene transfer systems for the effective transfection of mesenchymal stem cells



Diego Miranda Balbuena
Curso: 2019 – 2020: Convocatoria: Junio

Ana Rey-Rico
Andrés Martínez Lage

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Dña Ana Rey Rico y Don Andrés Martínez Lage autorizan la presentación del trabajo de Fin de Grado “Sistema de transferencia de genes para la transfección efectiva de células madre mesenquimales” presentado por Diego Miranda Balbuena para su defensa ante el tribunal calificador.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ana Rey". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the bottom.

Fdo: Ana Rey Rico

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Andrés". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the bottom.

Fdo: Andrés Martínez Lage

Índice

Resumen	I
Resumo	I
Summary	II
Palabras clave	II
Introducción.....	1
Células madre mesenquimales	1
<i>Papel de las MSCs en la reparación de cartílago</i>	2
Terapia génica	2
<i>Sistemas virales</i>	2
<i>Sistemas no virales</i>	3
Objetivo	7
Materiales y métodos	8
Propagación, aislamiento y purificación del ADN plasmídico: transposón <i>piggyBac</i> CMV-GFP-FRT y transposasa pCMV-hyPBase	8
Aislamiento de células madre.....	9
Mantenimiento del cultivo celular primario	10
Ensayos de transfección	11
<i>Siembra de MSCs</i>	11
<i>Transfección de MSCs</i>	12
<i>Evaluación de la eficiencia de transfección</i>	13
<i>Análisis estadístico</i>	14
Resultados	15
Análisis de la pureza y concentración del ADN plasmídico: <i>piggyBac</i> CMV-GFP-FRT y pCMV-hyPBase	15
Cultivo celular primario.....	16
Análisis de la eficiencia de transfección.	16
Discusión	20
Conclusiones	23
Conclusións	23
Conclusions	23
Bibliografía	24
Anexo	26

Resumen

La terapia celular con células madre mesenquimales (MSCs) se ha convertido en una herramienta de gran interés en diversas aplicaciones de medicina regenerativa debido a las numerosas propiedades de estas células, entre las que se incluyen, su capacidad de renovación y diferenciación. A su vez, la terapia génica de MSCs permite potenciar las propiedades de esta población celular, de modo que expresen el gen terapéutico de interés, con el fin de promover el proceso de regeneración tisular.

Los transposones son un tipo de sistema de transferencia génica no viral con gran potencial en este tipo de terapias, debido a que combinan la capacidad de lograr una expresión génica estable característica de los vectores virales, con el uso de componentes no infecciosos más seguros. Estos sistemas se basan en la utilización de dos plásmidos, un plásmido donante (transposón *piggyBac*) y un plásmido ayudante (transposasa) que mediante un mecanismo de “corta y pega” producen la integración del transposón en regiones específicas de la célula huésped.

En el presente trabajo se estudió la eficiencia de transfección del transposón *piggyBac* en cultivos primarios de MSCs mediante la utilización de dos tipos de vectores no virales: Lipofectamina y TransIT2020. Los resultados obtenidos mostraron que la combinación 100/100 transposón/transposasa con el reactivo TransIT2020 llevó a los niveles más altos y sostenidos de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en MSCs. Futuros estudios incluyendo la cuantificación de la expresión de GFP mediante medidas de fluorescencia y la selección de colonias de MSCs transfectadas de forma estable con el antibiótico G418, podrían ayudar a confirmar estas observaciones.

Resumo

A terapia celular con células nai mesenquimais (MSCs) converteuse nunha ferramenta de grande interese en diversas aplicacións de medicina rexenerativa, debido ás múltiples propiedades destas células, entre as que se inclúen a súa capacidade de renovación e diferenciación. Á súa vez, a terapia xénica de MSCs permite mellorar as propiedades desta poboación celular, de xeito que expresen o xene terapéutico de interese, co fin de promover o proceso de rexeneración do tecido.

Os transposóns son un tipo de sistema de transferencia xénica non viral cun gran potencial neste tipo de terapia, pois combinan a capacidade de obter unha expresión xénica estable característica dos vectores virais, co uso de compoñentes non infecciosos máis seguros. Estes sistemas están baseados na utilización de dous plásmidos, un

plásmido doante (transposón *piggyBac*) e un plásmido auxiliar (transposasa) que mediante un mecanismo "corte e pegado" producen a integración do transposón en rexións específicas da célula hóspede.

No presente traballo, estudouse a eficiencia de transfección do transposón *piggyBac* nos cultivos primarios de MSC utilizando dous tipos de vectores non virais: Lipofectamina e TransIT2020. Os resultados obtidos mostraron que a combinación de transposón/ transposasa 100/100 co reactivo TransIT2020 levou aos niveis de expresión máis altos e sostidos da proteína fluorescente verde (GFP) en MSC. Futuros estudos incluíndo a cuantificación da expresión de GFP por medicións de fluorescencia e a selección de colonias de MSC transfectadas de forma estable con antibióticos G418, poderían axudar a confirmar estas observacións.

Summary

Cell therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) has emerged as a tool of great interest in regenerative medicine, due to the multiple properties from these cells, including their capacity for renewal and differentiation. Likewise, gene therapy of MSCs allows to enhance the properties from this cell population, in order to express the therapeutic gene of interest promoting tissue regeneration process.

Transposons are a type of non-viral gene transfer system with strong potential in this type of therapy, as it combines the ability to achieve stable levels of transgene expression characteristic from viral vectors, with the use of safe non-infectious components. These systems are based on the use of two plasmids, a donor plasmid (transposon *piggyBac*) and a helper plasmid (transposase) that by means of a "cut and paste" mechanism lead to the integration of the transposon in specific regions from the host cell.

In the present work, the transfection efficiency of the *piggyBac* transposon in MSC primary cultures was studied using two types of non-viral vectors: Lipofectamine and TransIT2020. The results obtained showed that the 100/100 transposon/transposase combination with TransIT2020 reagent led to the highest and most sustained levels of green fluorescent protein (GFP) expression in MSCs. Further studies including the quantification of GFP expression by fluorescence measurements and the selection of MSC colonies stably transfecting with G418 antibiotics, could help to confirm these observations.

Palabras clave: MSCs, transposón, *piggyBac*, transposasa, GFP.

Introducción

Células madre mesenquimales

El empleo de células madre mesenquimales (MSCs) es un recurso cada vez más estudiado para el tratamiento de numerosas enfermedades y/o patologías como, por ejemplo, la artrosis, la enfermedad de Crohn, la diabetes, el infarto de miocardio o los accidentes cerebrovasculares (Oggu, et al., 2017).

Las MSCs son células primordiales, no especializadas e indiferenciadas con la capacidad de auto-renovarse a través de la división celular continua y de diferenciarse a otros linajes celulares (Oggu, et al., 2017). Otras propiedades de esta población celular incluyen además su tropismo que las capacita para migrar a los lugares de inflamación tisular, sus efectos inmunomoduladores y su ubiquidad en una gran diversidad de tejidos, incluyendo la médula ósea, el tejido adiposo, la sangre del cordón umbilical, la sangre periférica, el líquido amniótico o los tejidos dentales (Oggu, et al., 2017).

Existen diversos criterios para definir qué poblaciones celulares pueden considerarse MSCs según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (acrónimo inglés ISCT): “Primero, las MSCs, deben adherirse al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar. En segundo lugar, las MSCs deben expresar ciertos marcadores como CD105, CD73 y CD90, y carecer de la expresión de otras moléculas de superficie como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79alpha o CD19 y HLA-DR. En tercer lugar, las MSCs deben diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*”. Si bien estas pautas probablemente requerirán modificaciones a medida que se desarrollen nuevos conocimientos, se considera que este conjunto mínimo de criterios estándar fomentará una caracterización más uniforme de MSC y facilitará el intercambio de datos entre los investigadores (Dominici, et al., 2006) (**Figura 1**).

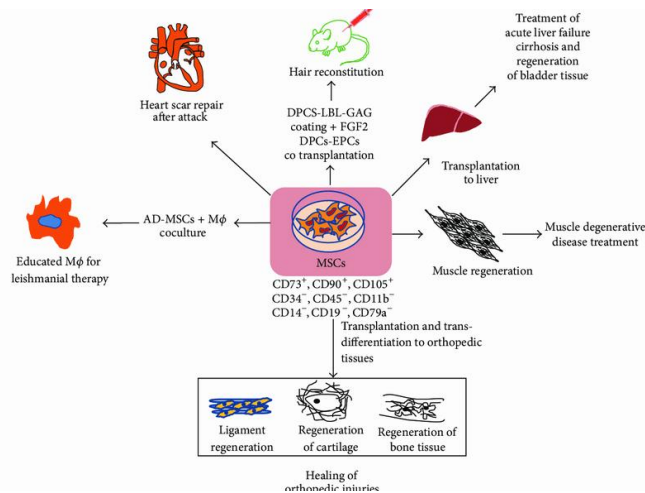


Figura 1. MSCs en medicina regenerativa. Tomado de: (Mahla, 2016)

Papel de las MSCs en la reparación de cartílago

A nivel mundial, la artrosis afecta a millones de personas y ocurre cuando el cartílago articular se desgasta de manera progresiva e irreversible, causando rigidez en las articulaciones. Las terapias disponibles para el tratamiento de la artrosis pueden aliviar sus síntomas, pero ninguno de ellas puede regenerar el cartílago hialino originario de la articulación (Cucchiari & Rey-Rico, 2017). Así, si bien en individuos de edad avanzada la opción terapéutica de primera elección es el reemplazo de la articulación, en el caso de personas jóvenes y atletas el trasplante de células madre representa una alternativa para la curación de estas lesiones del cartílago.

Las terapias celulares basadas en el uso de MSCs son opciones terapéuticas atractivas para mejorar la reparación del cartílago, ya que estas células podrían ser más efectivas a la hora de generar un mejor tejido de reparación en las lesiones de cartílago, en comparación con la utilización de condrocitos diferenciados que requieren métodos más invasivos de extracción y tienden a perder su fenotipo tras la expansión (Frisch, et al., 2015). En este sentido, las MSCs tienen un alto potencial de expansión y de diferenciación (plasticidad) a células del linaje mesodérmico (condrocitos, osteoblastos, adipocitos).

El empleo de MSCs modificadas con genes que induzcan una mayor producción de colágeno tipo II u otros marcadores del cartílago funcional, podría ser de gran utilidad en la reparación de este tejido.

Terapia génica

La terapia génica se basa en el tratamiento de enfermedades utilizando técnicas de transferencia génica para llevar a cabo la introducción de genes o secuencias génicas en las células de individuos afectados por ciertas patologías (Cucchiari & Rey-Rico, 2017). Según el tipo el tipo de vector a utilizar para llevar a cabo esta transferencia génica se puede distinguir dos tipos de sistemas.

Sistemas virales

Los sistemas virales emplean la capacidad infectiva de los virus para introducir el material genético en las células (transducción), logrando una expresión estable del gen de interés. Esta propiedad los convierte en vectores de transferencia génica muy efectivos (Robbins, et al., 1998).

Entre los vectores virales más utilizados en aplicaciones de terapia génica se encuentran aquellos basados en retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV) y herpes-virus (Cucchiaroni & Rey-Rico, 2017; Robbins, et al., 1998).

Los vectores retrovirales pueden integrarse en el genoma de la célula huésped de forma permanente, aunque requieren la división mitótica de la misma para su transducción. Estos vectores se integran de manera aleatoria en el genoma de la célula por lo que su uso conlleva asociado un elevado riesgo de mutágenesis por inserción (Cucchiaroni & Rey-Rico, 2017) Por su parte, los vectores adenovirales pueden transferir genes de manera eficiente en una amplia variedad de células que estén o no en división, aunque a menudo producen una elevada respuesta inmune en el huésped. En cuanto a los vectores virales basados en herpes-virus su principal ventaja es que pueden liberar grandes cantidades de ADN exógeno, sin embargo, presentan una alta citotoxicidad y su expresión génica es transitoria. Finalmente, los AAV infectan eficientemente células que están o no en división, pero su pequeño tamaño hace que sólo puedan transferir genes de tamaño reducido (Cucchiaroni & Rey-Rico, 2017; Robbins, et al., 1998).

Los inconvenientes asociados a cada tipo de vector sumados a su elevado coste de producción, limita la traslación clínica de los sistemas virales para el tratamiento de enfermedades.

Sistemas no virales

A diferencia de los vectores virales, los vectores no virales son seguros y escalables pudiendo ser producidos en elevadas cantidades y a bajo coste. Sin embargo, su principal limitación es la reducida eficiencia de transferencia génica (transfección) en comparación con sus homólogos virales (Hamann, et al., 2019).

El ADN puede ser incorporado en la célula como una molécula de ADN desnudo (plásmido de ADN), proceso altamente desfavorable debido a la carga negativa del ADN que limita su capacidad para atravesar la membrana plasmática celular. Es por ello que existe una gran variedad de procedimientos con los cuales el ADN puede ser introducido en la célula (Oggu, et al., 2017). Estos procedimientos pueden clasificarse en métodos físicos (electroporación, microinyección) que permeabilizan la membrana celular para facilitar la entrada del plásmido de ADN en la célula, o químicos (moléculas catiónicas) que forman complejos con el ADN con el fin de internalizarlo al interior celular.

Los métodos físicos se caracterizan por la relativa simplicidad con la que pueden llevarse a cabo, pero se ven condicionados por su limitado rendimiento e invasividad debido al daño que inducen en las membranas celulares. Por otro lado, el empleo de

métodos químicos basados en el uso de nanotransportadores catiónicos presenta el inconveniente de exhibir una reducida eficiencia de transfección de cultivos primarios, como el de MSCs.

Para mejorar la eficiencia de transfección de MSCs, se pueden optimizar las secuencias de los plásmidos vehiculizados mediante la elección del promotor más adecuado, la inclusión de DTS (DNA targeting sequences) o de secuencias de ADN unidas por factores de transcripción, y la eliminación de elementos bacterianos. Estos tres aspectos hacen que la expresión del gen sea más eficiente (dando una mayor respuesta en menor tiempo), facilitando la importación de las secuencias al núcleo celular, y evitando problemas asociados a la expresión de genes bacterianos no deseados (Hamann, et al., 2019).

Sistemas no virales basados en transposones

El empleo de sistemas no virales como transposones, los cuales combinan la capacidad de lograr una expresión génica estable (vectores virales) con el uso de componentes no infecciosos más seguros (no virales), constituye una alternativa a tener en cuenta para mejorar la eficiencia de transferencia génica en MSCs.

Los transposones son elementos genéticos móviles presentes en la mayoría de organismos, desde bacterias hasta mamíferos (Chénais, 2013). Su fácil integración en el genoma los convierte en herramientas de transferencia génica muy atractivas en diferentes aplicaciones.

Las secuencias móviles que más se repiten en el genoma humano son los elementos *Alu*, denominados de esta forma por la enzima de restricción *Alu I*, para la cual la mayoría presentan sitios de reconocimiento. De 1.6 millones de sitios del genoma humano en los que aparecen elementos dispersos cortos, 1.1 millones son elementos *Alu*.

Los sistemas no virales basados en transposones se basan en la utilización de 2 plásmidos; un plásmido donante (transposón) conteniendo el gen de interés flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) y un plásmido ayudante conteniendo la transposasa, que reconoce las secuencias ITR del transposón y a través de un mecanismo de "corta y pega " produce la integración del transposón en regiones específicas del genoma de la célula huésped (**Figura 2**). Este mecanismo específico de integración disminuye significativamente el riesgo de mutagénesis por inserción asociado a la utilización de vectores virales, y aumenta considerablemente la eficiencia de transfección con respecto a los plásmidos convencionales. Además, la manipulación de estos sistemas implica un aumento considerable de la seguridad biológica ya que implica la

manipulación de plásmidos, sin requerir complejos procedimientos con elevado grado de bioseguridad asociados a la manipulación de vectores virales.

Entre los sistemas de transposones que pueden usarse para la transfección de células de mamífero se incluyen: **(I)** *hAT-like Tol2*, el único sistema de transposón de vertebrados activo de forma natural, aislado del genoma del pez medaka japonés; **(II)** Transposones *Tcl-like* entre los que se encuentran el *Sleeping Beauty* y *Frog Prince* producidos a partir de transposones inactivos de genomas de peces y ranas, respectivamente; **(III)** Transposón *PiggyBac* aislado de la polilla de la col; *Trichoplusia ni*. (Zhao, et al., 2016).

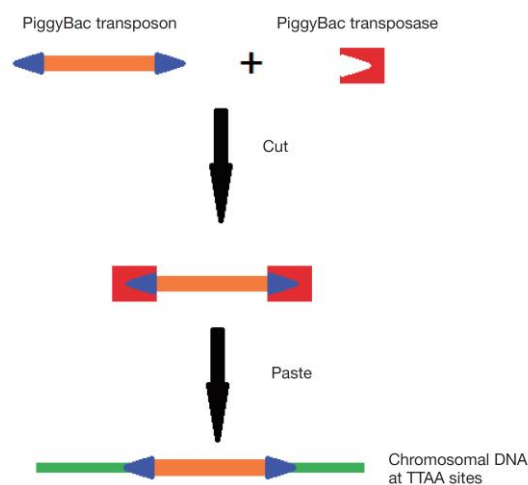


Figura 2. Mecanismo de transposición del transposón piggyBac Tomado de: (Zhao, et al., 2016)

Entre los sistemas citados anteriormente, los transposones *Sleeping Beauty* y *PiggyBac* presentan la mayor actividad de transposición en células de mamíferos. (Kim, et al., 2011). Sus principales características se detallan a continuación.

Sleeping Beauty

El transposón *Sleeping Beauty* fue desarrollado en 1997 por Ivics y colaboradores partir de copias inactivas de elementos *Tcl* encontrados en varios genomas de peces (Ivics, et al., 1997), constituyendo, hoy en día, uno de los sistemas de transposición más utilizados en ingeniería genética de células humanas.

A pesar de que este transposón es activo en tejidos de diferentes vertebrados incluidos los humanos, presenta una baja capacidad de carga permitiendo la transposición eficiente de genes hasta 6 Kb. Por encima de este límite se ha visto que la tasa de transposición se ve disminuida. Además, el uso de este sistema se haya condicionado por un fenómeno de inhibición por sobreproducción, por el cual disminuye la tasa de

transposición con el aumento de concentración de transposasa. Este hecho ha sido atribuido al plegamiento incorrecto o agregación de esta enzima durante el proceso de transfección, por lo que requiere una valoración minuciosa de la relación transposasa/transposón para lograr una transposición eficiente (Bire, et al., 2013).

PiggyBac

El transposón *piggyBac* fue aislado de la oruga de la col *Trichoplusia ni* y se caracteriza por su transposición altamente eficiente en diferentes células de mamíferos (Ding, et al., 2005; Chen, et al., 2010).

La configuración más común del sistema *PiggyBac*, al igual que el *Sleeping Beauty*, se basa en un sistema de dos plásmidos, uno que contiene el casete de expresión flanqueado por secuencias ITR y el otro que codifica para la transposasa (**Figura 3**). Se ha visto que la integración del gen de interés mediada por *piggyBac* tiene lugar en zonas ricas en AT del genoma de la célula huésped (Sheng, et al., 2014) (**Figura 2**).

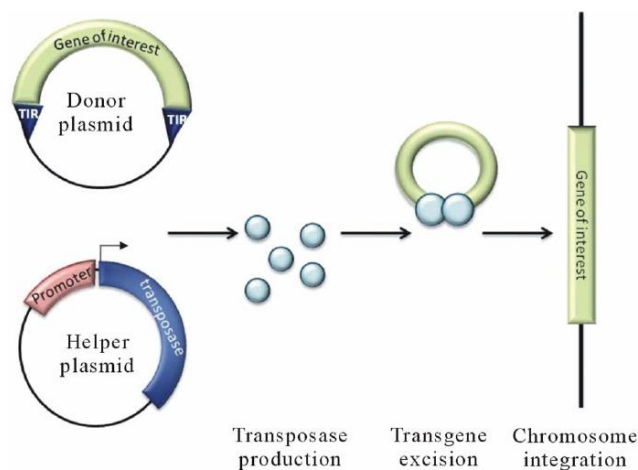


Figura 3. Vista esquemática de un sistema de transposición de ADN para la transferencia de genes. Los plásmidos donante y auxiliar se transfectan en las células huésped. El plásmido auxiliar es un vector de expresión que permite la producción de transposasa y el plásmido donante lleva el gen de interés que la transposasa integrará en el genoma del huésped. Los círculos de color azul claro representan las proteínas transposasa producidas a partir del plásmido auxiliar. Tomado de: (Chénais, 2013)

Este sistema es capaz de transponer insertos grandes de ADN (hasta 14 kb) sin una pérdida significativa de su eficiencia (Ding, et al., 2005). Además, otros trabajos más recientes han descrito la capacidad de transposición de regiones de hasta 100 kb, lo que permite la regulación fisiológica de la expresión génica mediante la transferencia de regiones reguladoras enteras (Li, et al., 2011). En comparación con el transposón *Sleeping Beauty*, *piggyBac* presenta una actividad de transposición más eficiente (Wu, et al., 2006) y generalmente no deja huella después de la escisión, lo que hace que *PiggyBac* sea menos

propenso a causar daño genómico durante la mutagénesis (Wang, et al., 2008; Nakanishi, et al., 2010).

A pesar de las considerables ventajas del transposón *piggyBac*, algunos estudios han descrito un fenómeno de inhibición por sobreproducción de la transposasa de *piggyBac* similar al observado para *Sleeping Beauty*, si bien esta observación se encuentra aún en continuo debate (Wu, et al., 2006; Vargas, et al., 2016).

Los sistemas *piggyBac* han sido utilizados para transfectar diferentes tipos de células de mamífero incluyendo células madre mamarias epiteliales bovinas (bMESC) (Neelesh, et al., 2017) células madre mesenquimales murinas (Chen, et al., 2015) o células progenitoras de mesoangioblastos murinas (Iyer, et al., 2018).

Objetivo

Dado el interés clínico que suscitan las MSCs como población celular clave en múltiples enfoques de medicina regenerativa, y el potencial de los transposones *piggyBac* como sistemas de transferencia génica no viral alternativos al uso de vectores virales, el objetivo de este trabajo fue estudiar la eficiencia de transfección del transposón *piggyBac* en cultivos primarios de MSCs humanas, utilizando 2 reactivos comerciales (Lipofectamina; Lipofectamine™ Stem Transfection Reagent, *ThermoFisher* y Trans IT 2020; TransIT®-2020 Transfection Reagent; *Mirus Bio*) con una eficiencia mejorada de transfección de esta población celular. Para ello, con el fin de optimizar este sistema de transposición en MSCs, se probaron diferentes relaciones transposón/ transposasa con cada uno de los vectores comerciales.

nuevamente a 37 °C y 200 rpm durante 12 horas. Posteriormente, se realizó la lisis de las bacterias y se procedió al aislamiento y purificación de los plásmidos con el kit comercial *Genopure Plasmid Maxi Kit* (Roche, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La determinación de la concentración de ambos plásmidos fue realizada en un biospectrofotómetro para microgota MySpec (VWR International, EE. UU.). Con el fin de comprobar la calidad y pureza de todas las preparaciones de plásmido, se registraron las relaciones A260/280 y A260/230 para cada una de las muestras.

Por último, para garantizar el aislamiento efectivo de ambos plásmidos se realizó una electroforesis en agarosa. Las enzimas empleadas para digerir los plásmidos fueron *ApaI* y *AgeI* (ThermoFisher Scientific, España) para el plásmido *piggyBac* CMV-GFP-FRT y *EcoRI* y *NotI* (ThermoFisher Scientific, España) para pCMV-hyPBBase. Ambos plásmidos fueron digeridos durante 1 hora a 37 °C. En paralelo se realizaron controles de ambos plásmidos en ausencia de enzimas de restricción que fueron también incubados a 37 °C durante 1 hora.

El gel fue preparado mediante la disolución de agarosa (Fisher Bioreagents, España) al 1% en de tampón TAE (Gibco – Thermo Fisher Scientific, España), en un horno microondas. Posteriormente el gel fue teñido con 2 µl de Green Safe Premium (Nyztech, Portugal) y polimerizado en un molde durante 30 minutos.

Tras la digestión, los plásmidos fueron cargados en el gel de agarosa mediante la adición de un tampón de carga (BlueJuice™ Gel Loading Buffer - Thermo-Fisher Scientific, España). Para la identificación de las bandas en el gel se utilizó con un marcador de peso molecular 1 kB (Invitrogen, EE. UU.) La electroforesis se realizó a 80 V durante aproximadamente 1 h. Transcurrido este tiempo, los geles fueron visualizados en un fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EE. UU.).

Aislamiento de células madre

Las MSCs fueron aisladas a partir de las regiones proximal y distal del fémur de pacientes sometidos a artroplastia de cadera y/o rodilla. Todas las muestras fueron obtenidas del Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario (CHUAC), Xerencia e Xestión Integrada de A Coruña (XXIAC). El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de A Coruña (CEIC) (Código de Registro: 2019/066; **Figura 24 del Anexo**) Se obtuvieron un total de 6 muestras que fueron procesadas mediante las metodologías de cultivo directo o previo tratamiento de las mismas con un tampón de lisis de eritrocitos. Todos los procedimientos con células fueron realizados en una cabina de seguridad biológica tipo 2 (Telstar BIO-II-Advance, España).

Para el aislamiento celular mediante cultivo directo se realizaron lavados sucesivos de la epífisis femoral (**Figura 5**) mediante inyección de medio de Eagle con modificación de Dulbecco (DMEM, *Sigma-Aldrich*, EE.UU.) con un 10 % de suero fetal bovino (SFB, *Gibco-ThermoFisher Scientific*, Sudamérica) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (P/E, *Sigma-Aldrich*, EE.UU.) mediante una jeringa de 20 ml y una aguja de bisel ancho BD Microlance™ (*BD Medical*, EE.UU.). La mezcla se filtró con un filtro de nylon de 41 µm de tamaño de poro (*Millipore*, Irlanda) y el filtrado resultante se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El precipitado celular resultante se resuspendió en medio DMEM con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico P/E y se sembró en frascos de cultivo Nunc™ EasYFlask^k™ de 75 cm² (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.).

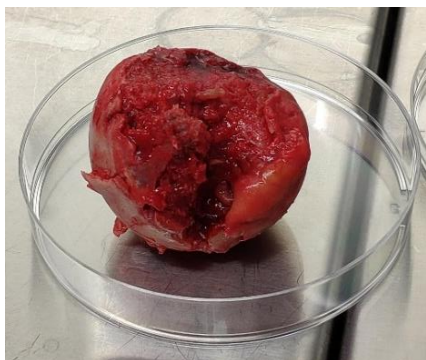


Figura 5. Muestra de cabeza de fémur utilizada en el aislamiento de MSCs mediante cultivo directo

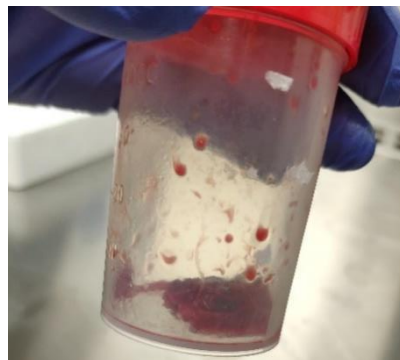


Figura 6. Muestra de médula ósea utilizada en el aislamiento de MSCs con tampón de lisis de eritrocitos.

Para el aislamiento de MSCs a partir de muestras de médula ósea (**Figura 6**) se procedió a su tratamiento con un tampón de lisis de eritrocitos (*Roche*, Alemania) con el fin de retirar los glóbulos rojos presentes en la misma tras su lisis y eliminación por centrifugación. El precipitado resultante fue sembrado en frascos de cultivo Nunc™ EasYFlask^k™ de 75 cm². Tras 48 h se procedió al lavado de los frascos con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; *Sigma-Aldrich*, EE. UU.) para eliminar las células no adherentes y reemplazar el medio.

Mantenimiento del cultivo celular primario

Los cultivos fueron mantenidos en un incubador Fisherbrand a 37°C en una atmosfera húmeda y 5 % CO₂. Periódicamente (2 veces por semana) se procedió al cambio de medio de cultivo (DMEM 10 % SFB y 1% P/E) con el fin de renovar los nutrientes. Además (una vez por semana) se procedió al suplementado del medio de cultivo con factor de crecimiento básico de fibroblastos (100 µg/ml, bFGF; *Gibco-*

ThermoFisher Scientific, España) con el fin de preservar la viabilidad y aumentar la proliferación celular (Oggu et al., 2017).

En cada cambio de medio, se retiró el medio de los frascos (medio antiguo); se realizó un lavado de las monocapas celulares con PBS con el fin de eliminar los restos celulares, y se añadió nuevamente medio de cultivo (DMEM 10% SFB y 1% P/E). Además, en cada cambio de medio se observaron las muestras al microscopio para verificar el estado de confluencia celular, y la posible existencia de contaminación.

Ensayos de transfección

Siembra de MSCs

Para los ensayos de transfección, las MSCs fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 100,000 células por pocillo e incubadas durante 24 horas a 37°C para garantizar la adhesión celular.

Para este fin, una vez que las células alcanzaron un porcentaje aproximado de confluencia del 90%, se procedió a la separación de la monocapa celular de los frascos de cultivo. Para ello, en primer lugar, se extrajo el medio de cultivo del frasco de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se añadieron 5 ml de tripsina-EDTA (*MP Biomedicals*TM, España) para proceder a la disociación de la monocapa. Los frascos fueron incubados a 37 °C durante 5 min y la tripsina fue inactivada mediante la adición de DMEM 10% SFB 1% P/E. La suspensión celular resultante fue centrifugada (5 minutos, 1500 rpm) y resuspendida en medio fresco (DMEM 10% SFB 1% P/E).

Para el conteo celular se mezclaron 10 µl de suspensión celular con 10 µl del colorante de exclusión azul tripano CorningTM Azul de tripano cellgroTM (*Fisher Scientific*, España). La mezcla resultante (10 µl) fue transferida a cada una de las secciones de una cámara Neubauer (*Marienfeld*, Alemania) con el fin de contar las células viables (**Figura 7A**). Dicho recuento fue realizado siempre por duplicado en un microscopio óptico invertido Olympus CKX53 (*Olympus*, España).



Figura 7. A) Cámara Neubauer. B) Visión microscópica de los cuadrantes de la cámara Neubauer durante el conteo.

A partir de este conteo, se determinó la concentración celular existente en la suspensión celular para llevar a cabo la siembra.

La ecuación empleada para convertir el conteo en concentración celular fue:

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{Células Contadas}}{\text{Número de cuadrantes de la cámara}} \times 2 \times 10^4$$

Haciendo esta operación se obtuvo la concentración en células/ml. Así mediante la división de las células totales contadas entre el número de cuadrantes de la cámara se obtiene una estimación de las células por cuadrante y al multiplicar por 10.000 se lleva el volumen de cada cuadrante a ml. La multiplicación x 2 hace referencia al factor de dilución de la suspensión celular con azul tripano realizado de forma previa a la introducción de la muestra en la cámara.

Transfección de MSCs

Transcurridas las 24 horas de incubación se verificó en primer lugar la adhesión de las MSCs (100,000 células/pocillo) a los diferentes pocillos de la placa de 24 pocillos mediante observación microscópica.

Para la transfección de las MSCs con el plásmido *piggyBac* CMV-GFP-FRT y/o pCMV-hyPBase se utilizaron 2 sistemas comerciales de transfección; uno basado en un lípido catiónico (Lipofectamina; Lipofectamine™ Stem Transfection Reagent, *ThermoFisher*) y otro basado en una mezcla de polímero/lípido catiónico (Trans IT 2020; TransIT®-2020 Transfection Reagent; *Mirus Bio*). Con el fin de optimizar la relación transposón/transposasa se probaron diferentes relaciones de transposón y transposasa (2:1, 1.5:1 y 1:1), con distintas cantidades de cada uno de los plásmidos (**Figura 8**). En paralelo se ensayaron las mismas cantidades del transposón *piggyBac*, pero en ausencia de transposasa. La concentración de trabajo de ambos plásmidos fue 10 µg/ml. Todas las condiciones fueron ensayadas en duplicado. Todos los procedimientos fueron realizados en una cabina de seguridad biológica tipo 2.

Plásmido (ng)	Control	200/-	150/-	100/-	200/100	150/100	100/100
Transposón	-	200	150	100	200	150	100
Transposasa	-	-	-	-	100	100	100


Figura 8. Diferentes relaciones de transposón (piggyBac CMV-GFP-FRT) y transposasa (pCMV-hyPBase) ensayadas en los estudios de transfección.

Para la transfección de las células con Lipofectamina, tanto el plásmido (200, 150 o 100 ng) como el reactivo (1 µl) fueron previamente diluidos en medio Opti-MEM 1X (*Gibco*, EE. UU.) (50 µl) y combinados en igual proporción. Las mezclas fueron

incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con el fin de permitir la formación de los complejos.

Para la transfección de las células con Trans IT 2020 se añadió directamente al reactivo (1.5 μ l) a las diluciones de plásmido en medio Optimen (200, 150 o 100 ng; volumen final 50 μ l). Todas las mezclas fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron los complejos a las monocapas de MSCs mediante goteo y cubriendo diferentes zonas de cada uno de los pocillos siguiendo el esquema de la **Figura 9**. Posteriormente se añadió medio DMEM (sin suero) hasta un volumen final de 500 μ l y las placas fueron incubadas durante 3 h a 37 °C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Finalmente, se añadieron 500 μ l de DMEM 20% SBF y 2% P/E y las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C.



	1	2	3	4	5	6
A	C-	C-				
B	Transposón 200 ng	Transposón 200 ng	Transposón 150 ng	Transposón 150 ng	Transposón 100 ng	Transposón 100 ng
C	Transposón/ transposasa (ng) 200/100	Transposón/ transposasa (ng) 200/100	Transposón/ transposasa (ng) 150/100	Transposón/ transposasa (ng) 150/100	Transposón/ transposasa (ng) 100/100	Transposón/ transposasa (ng) 100/100
D						

Figura 9. A) Placas con pocillos donde se realizó la transfección a las distintas condiciones B) Esquema con las relaciones de cada plásmido para cada uno de los reactivos. C-: representa el control de células sin transfectar.

Evaluación de la eficiencia de transfección

La eficiencia de transfección fue evaluada a las 24 y 48 horas mediante monitorización de la fluorescencia viva de la proteína verde fluorescente (GFP) en un microscopio óptico invertido Olympus CKX53, empleado el filtro 2 de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$ 470-490 nm; $\lambda_{\text{emisión}}$ 505-535 nm). Para ello, con el fin de eliminar la autofluorescencia del medio de cultivo en el momento de la visualización, se reemplazó el medio de cada uno de los pocillos con PBS. Cada condición fue documentada en duplicado utilizando siempre microscopía de campo claro y fluorescencia para cada uno de los campos evaluados, con el objetivo de 10x. Todas las imágenes fueron tomadas con el programa *CellSens* de Olympus utilizando las mismas condiciones de ganancia y exposición en modo automático. Además, todas las imágenes (fluorescencia y campo claro) correspondientes al mismo campo fueron superpuestas con el programa de procesamiento de imágenes de *CellSens*.

Para realizar un análisis cuantitativo de la eficiencia de la transfección a partir de las imágenes tomadas con el microscopio se empleó el programa *ImageJ*, con el paquete de procesamiento *Fiji* (Schindelin, et al., 2012).

El procedimiento realizado consistió en el conteo de células fluorescentes y células totales de todas las imágenes superpuestas (**Figura 10**) para poder estimar los porcentajes de transfección con cada reactivo a las distintas condiciones ensayadas. Las células de ambas poblaciones celulares (tipo 1: fluorescentes; tipo 2: totales) fueron contadas en modo manual siguiendo la ruta del programa: *Plugins > Analyze > Cell Counter*.

Para cada grupo de ensayo se contaron las células de 2 imágenes distintas obteniéndose de esta forma 2 replicados para cada condición (**Figura 20 del Anexo**).

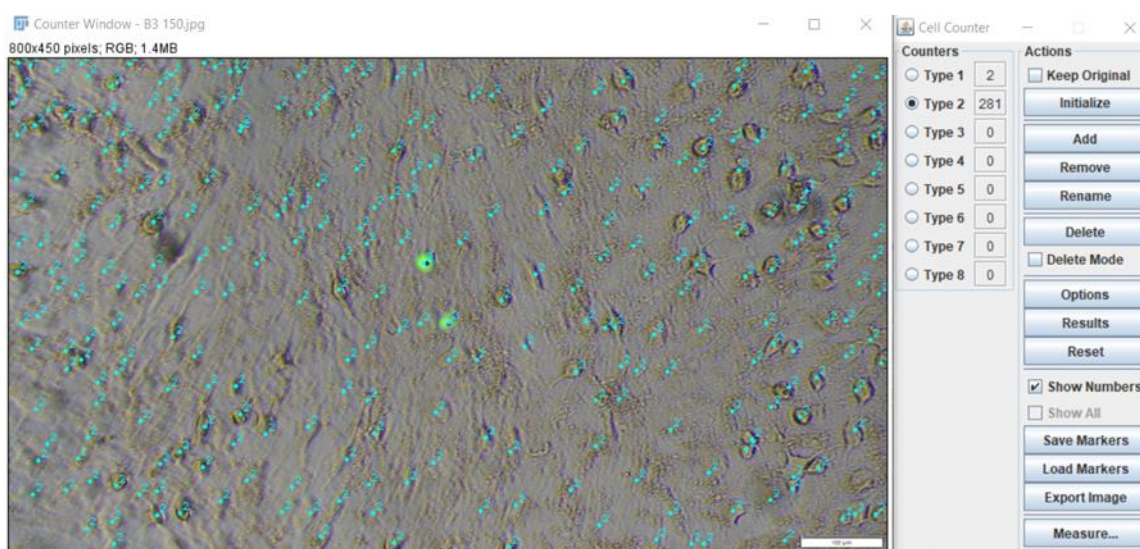


Figura 10. Resultado del conteo en *ImageJ,Fiji* (Schindelin, et al., 2012) de la imagen tomada del pocillo B3 a las 48h, en el que se empleó solo transposón y TransIT 2020.

Análisis estadístico

Los porcentajes de transfección obtenidos en cada uno de los grupos de estudio fueron promediados y expresados como el valor medio de los dos replicados \pm su desviación típica (SD). Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante la prueba estadística *t de Student* con un nivel de significación (α) del 0.05. Los p-valores < 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos (Excel 2019 (v19.0)).

Resultados

Análisis de la pureza y concentración del ADN plasmídico: *piggyBac* CMV-GFP-FRT y pCMV-hyPBase.

Las concentraciones y relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230 nm registradas en el bio-espectrofotómetro para microgota MySpec (VWR International, EE. UU.) se muestran en la **Figura 11**.

	PiggyBac CMV-GFP-FRT		pCMV-hyPBase		Valor promedio PiggyBac CMV-GFP-FRT	Valor promedio pCMV-hyPBase
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2		
Concentración (µg/ml)	1384.756	1180.876	230.610	263.673	1282.816	247.142
Relación absorbancia 260/280	1.917	1.883	1.903	1.863	1.900	1.883
Relación absorbancia 260/230	2.538	2.646	2.464	2.473	2.592	2.469

Figura 11. Concentraciones y relaciones de absorbancia de los diferentes plásmidos aislados.

Las concentraciones obtenidas fueron mayores a 1000 µg/ml para el plásmido *piggyBac* CMV-GFP-FRT y próximas a 250 µg/ml para pCMV-hyPBase. Para ambos plásmidos la relación de 260/280 fue cercana a 1.8, mientras que la relación 260/230 se encontró próxima a 2.5 (ligeramente por encima en el *piggyBac* y por debajo en pCMV-hyPBase). Estos valores apuntaron a un elevado grado de pureza de las diferentes muestras aisladas para cada plásmido.

Para verificar el correcto aislamiento de ambos plásmidos se realizó una electroforesis en agarosa (**Figura 12**) tras la digestión con las correspondientes enzimas de restricción. En paralelo se cargaron las muestras correspondientes a los controles de ambos plásmidos sin digerir.

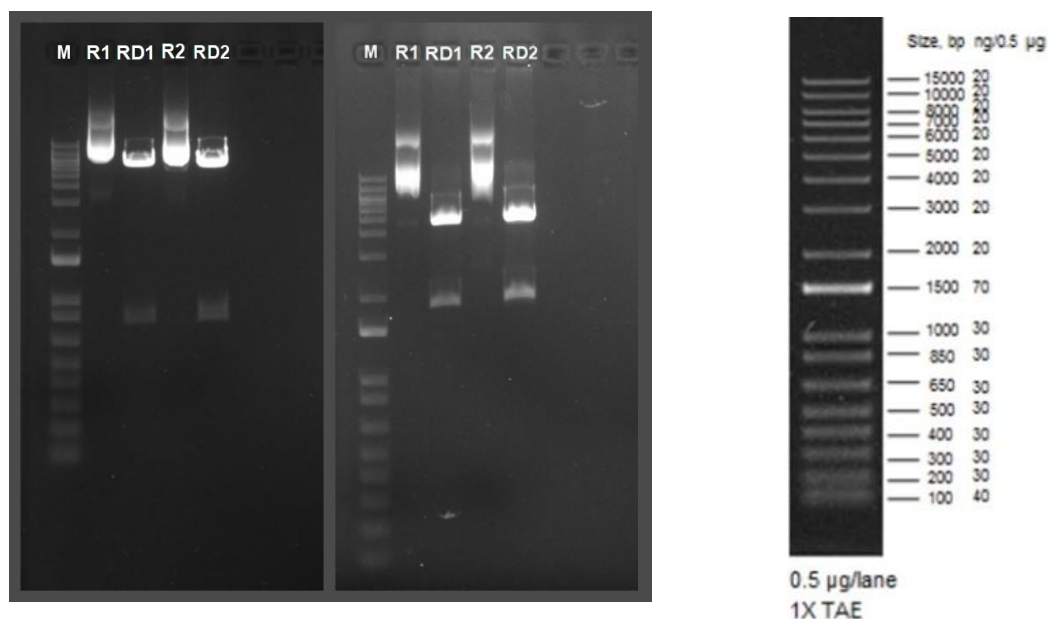


Figura 12. Electroforesis en agarosa de los plásmidos A) *piggyBac* CMV-GFP-FRT y B) pCMV-hyPBase. M) Marcador, R1) Réplica 1, RD1) Réplica digerida 1, R2) Réplica 2 y RD2) Réplica digerida 2. C) Tamaños del marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen EE. UU.).

El tamaño de *piggyBac* CMV-GFP-FRT es de 7077 pb (**Figura 4A**), y tras ser digerido con *ApaI* y *AgeI* deberían de generarse dos fragmentos de 755 pb y 6322 pb, mientras que pCMV-hyPBase tiene un tamaño de 6954 pb (**Figura 4B**) y tras su digestión con *EcoRI* y *NotI* debería de dar lugar a 2 bandas de 1804 pb y 5150 pb. Como se puede observar en la **Figuras 12A y 12B** y teniendo en cuenta las referencias del marcador (**Figura 12C**) se pudo concluir que el tamaño de los fragmentos obtenidos tras la digestión y el tamaño completo de los plásmidos se corresponden con los mencionados en el anterior párrafo.

Cultivo celular primario.

A lo largo del periodo de cultivo se verificó la adherencia al plástico de las MSCs, siendo uno de los criterios mínimos de la ICST para definir esta población celular. Además, se comprobó la morfología fibroblástica con prolongaciones citoplasmáticas prominentes, característica de las MSCs. En un primer momento, las MSC se encontraban agrupadas en pequeñas colonias, pero según iban proliferando se generaba una capa más homogénea de las mismas en el fondo del frasco de cultivo.

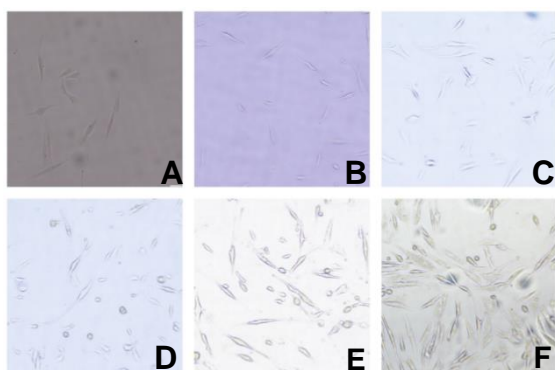


Figura 13. Evolución temporal del cultivo primario de MSC magnificación 10x. MSCs aisladas a partir muestras de un mismo paciente. A) 11 días, B) 15 días, C) 19 días, D) 22 días, E) 26 días y F) 29 días.

Análisis de la eficiencia de transfección.

Un análisis de la eficiencia de transfección de las MSCs a las 24 horas utilizando el reactivo Lipofectamina (LPF), reveló un mayor porcentaje de expresión de GFP (~ 2%) mediante la aplicación del transposón (200 ng) sólo, en ausencia de transposasa (**Figura 14**). Además, la presencia de transposasa incrementó ligeramente la expresión de GFP para las células modificadas con 150 ng de transposón, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos de células transfectadas con o sin transposasa ($p \geq 0.09$) (**Figuras 14 y 15**).

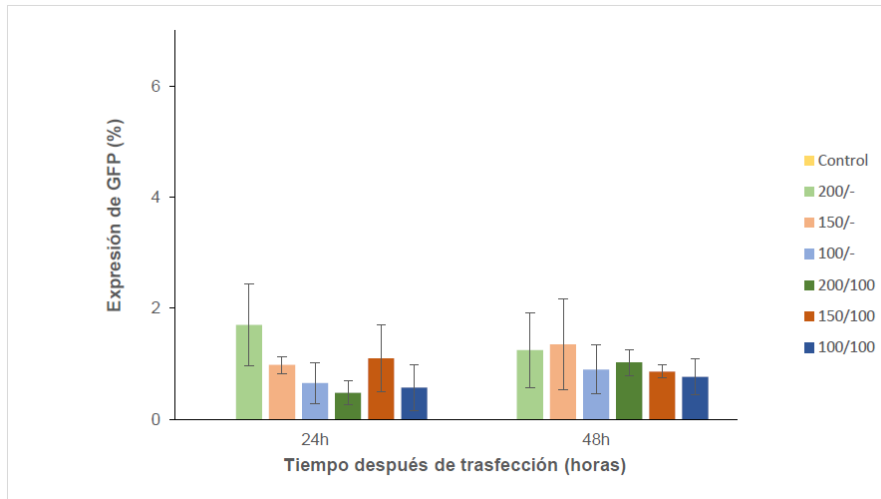


Figura 14. Expresión de GFP en MSCs transfectadas con los complejos de LPF y transposón (200, 150 o 100 ng), en ausencia (-) o presencia de transposasa (100 ng). El control representa a células sin transfectar.

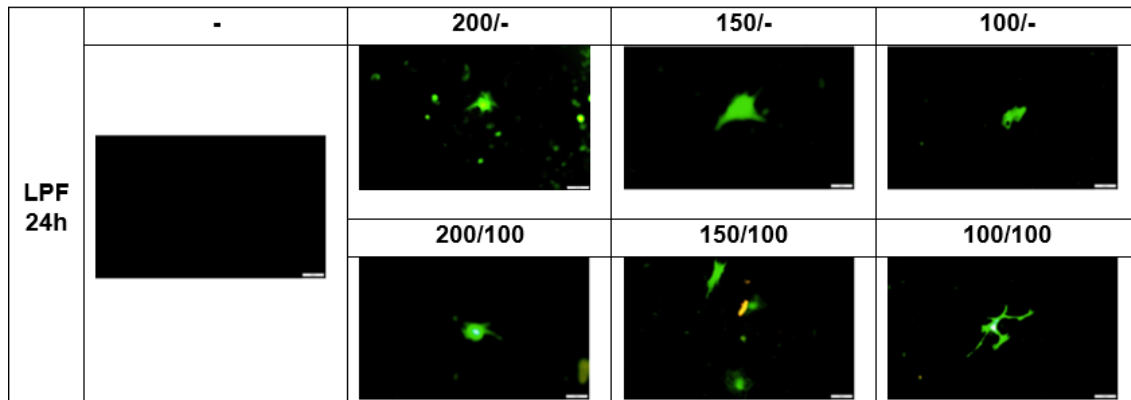


Figura 15. Expresión de GFP en MSCs a las 24 horas de su transfección con los complejos de LPF y transposón (200, 150 o 100 ng), en ausencia (-) o presencia de transposasa (100 ng). El control (-) representa a células sin transfectar. Imágenes representativas (magnificación 10x).

Transcurridas 48 horas desde la transfección con Lipofectamina, se observó que los mayores porcentajes de expresión de GFP fueron obtenidos en aquellas células transfectadas con 200 ng (200/-) y 150 ng (150/-) de transposón y en menor medida con la combinación 200/100 transposón/transposasa. De nuevo, no se observaron diferencias significativas entre las células transfectadas con y sin transposasa mediante la utilización de este reactivo ($p \geq 0.19$) (**Figura 14 y Figura 21 del Anexo**).

Empleando como medio de transfección TransIT2020 y tras 24 horas de incubación, se observó que las células tratadas con transposón y transposasa en una relación 2:1 mostraron el mayor porcentaje de expresión de GFP (~ 3.5%). Además, se vio que la combinación de transposón (200 ng) con la transposasa (100 ng) incrementó 3.5 veces la expresión de GFP con respecto a las células transfectadas sólo con transposón

($p = 0.04$). Asimismo, se observó que para la dosis de transposón de 150 ng la presencia de transposasa llevó a un descenso significativo de la expresión de GFP ($p = 0.02$). (**Figuras 16 y 17**).

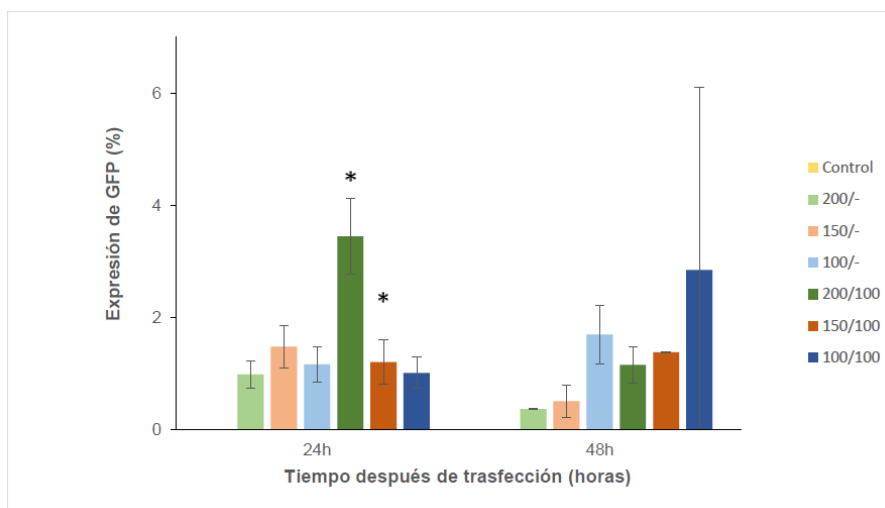


Figura 16. Expresión de GFP en MSCs transfectadas con TransIT y transposón (200, 150 100 ng), en ausencia (-) o presencia de transposasa (100 ng). El control representa a células sin transfectar. Los (*) indican un $p < 0.05$ en la comparación de la expresión de GFP entre las MSCs transfectadas con y sin transposasa.

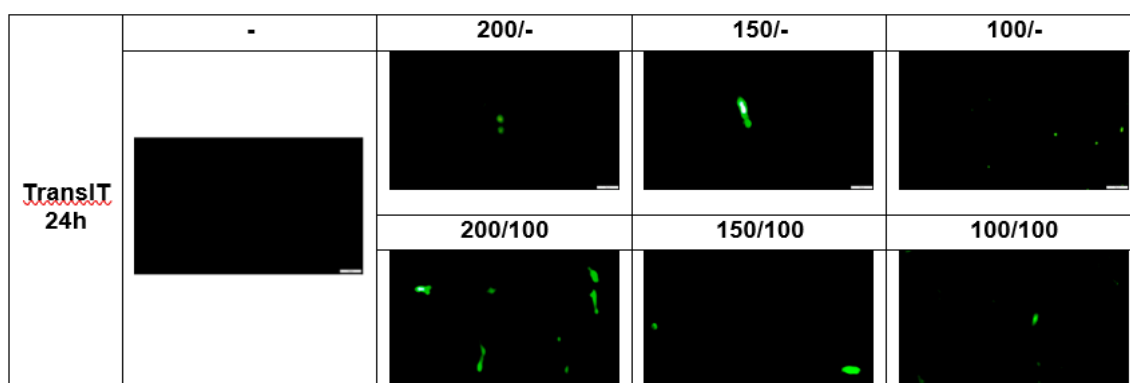


Figura 17. Expresión de GFP en MSCs a las 24 horas de su transfección con los complejos de TransIT2020 y transposón (200, 150 o 100 ng), en ausencia (-) o presencia de transposasa (100 ng). El control (-) representa a células sin transfectar. Imágenes representativas (magnificación 10x).

Transcurridas 48 horas desde la transfección con este reactivo, se observó siempre un mayor porcentaje de expresión de GFP en aquellas células transfectadas con la combinación de ambos plásmidos (transposón/transposasa), llevando la combinación 100/100 de transposón/transposasa a un mayor porcentaje de transfección (~3%) (**Figura 17 y Figura 22 del Anexo**). Sin embargo, debido a la alta dispersión de los datos obtenidos para este grupo de células (100/100), no se observaron diferencias significativas en la expresión de GFP entre estas células y las células transfectadas sólo con transposón, en ausencia de transposasa (100 ng) ($p = 0.33$). La combinación

transposón/transposasa 200/100 produjo el mayor incremento en la expresión de GFP con respecto a la utilización del transposón libre (~3.2 veces mayor), si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($p \geq 0.09$).

Cuando se comparó la expresión de GFP con las distintas combinaciones de transposón transposasa (200/100; 150/100; 100/100) mediante la utilización de ambos reactivos (LPF o Trans IT2020), se observó siempre una mayor eficiencia del reactivo TransIT2020 (**Figura 18**). Así, a las 24 horas la mayor diferencia entre ambos reactivos fue observada con la combinación 200/100 siendo la expresión de GFP en el orden de 7 veces mayor con el reactivo TransIT ($p = 0.03$). Transcurridas 48 horas la expresión de GFP fue 2 veces superior con el reactivo Trans a la relación 150/100 ($p = 0.046$) y hasta 7 veces con la relación 1:1, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas con esta última combinación debido a la alta dispersión de los datos obtenidos con el TransIT ($p = 0.25$) (**Figura 18A**).

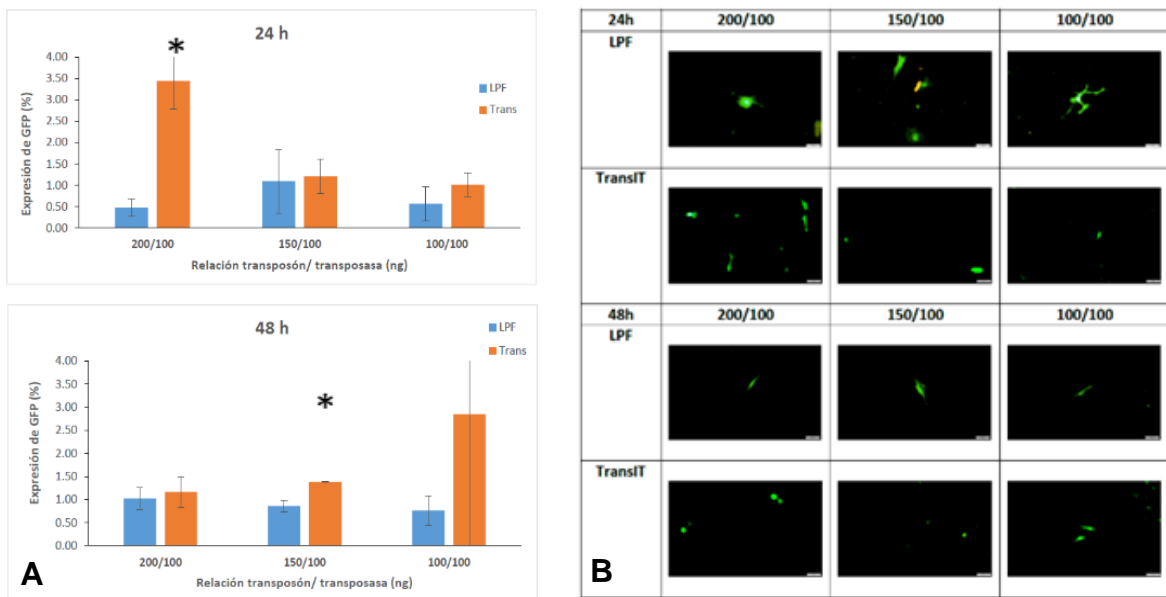


Figura 18. Expresión de GFP en MSCs transfectadas con los complejos de LPF o Trans IT2020 con las diferentes combinaciones transposón/transposasa (200/100; 150/100; 100/100) **A**) Análisis cuantitativo. Los (*) indican un $p < 0.05$ tras comparar la expresión de GFP utilizando la misma dosis de transposón y transposasa pero con distinto reactivo **B**) Imágenes representativas (magnificación 10x).

Discusión

En el presente estudio se investigó la eficiencia de transfección de un sistema no viral basado en un transposón *piggyBac* en cultivos primarios de células madre mesenquimales humanas. Este sistema se basa en la utilización de 2 plásmidos; un plásmido donante *piggyBac* CMV-GFP-FRT conteniendo un gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) y las secuencias ITR de reconocimiento de la transposasa, y un plásmido ayudante pCMV-hyPBase basado en una transposasa hiperactiva con elevada eficiencia de transposición en células de mamíferos. Esta transposasa hiperactiva ha sido aislada de una biblioteca de transposasas mutantes generada en levaduras, gracias a la capacidad de transposición que presenta el transposón *piggyBac* en organismos diferentes (que parece ser independiente del hospedador en el que se encuentre) (Yusa, et al., 2011). De estas transposasas mutantes, 5 eran hiperactivas en mamíferos. Mediante la combinación de todas estas mutaciones en una única secuencia plasmídica se obtuvo esta transposasa de *piggyBac* mutante (pCMV-hyPBase) (Yusa, et al., 2011).

Con el fin de estudiar la eficiencia de transfección con este sistema se probaron diferentes relaciones transposón/transposasa. En este sentido, se ha visto que la eficiencia de transposición con el transposón *piggyBac* depende de la disponibilidad del transposón (plásmido donante) y transposasa (plásmido ayudante) en las células. Así algunos estudios han descrito que relación óptima de transposón/transposasa para conseguir una elevada tasa de transposición es 2:1 por encima de la cual la actividad se ve reducida (Wu, et al., 2006). Sin embargo, otros autores han implicado una relación 1:1 para la reprogramación de células pluripotenciales inducidas (Yusa, et al., 2009). En base a la literatura previa se seleccionaron por tanto las relaciones 2:1, 1.5:1 y 1:1, cubriendo así los rangos en los que trabajaron estos autores y pudiendo comparar los resultados obtenidos con cada relación.

A pesar de los reducidos porcentajes de transfección alcanzados en el presente estudio, los resultados obtenidos mostraron una expresión de GFP más estable mediante la utilización de la relación transposón/transposasa 1:1. Dicha relación fue la única que dio lugar a un incremento de expresión de GFP a lo largo del tiempo con ambos reactivos (**Figura 19**).

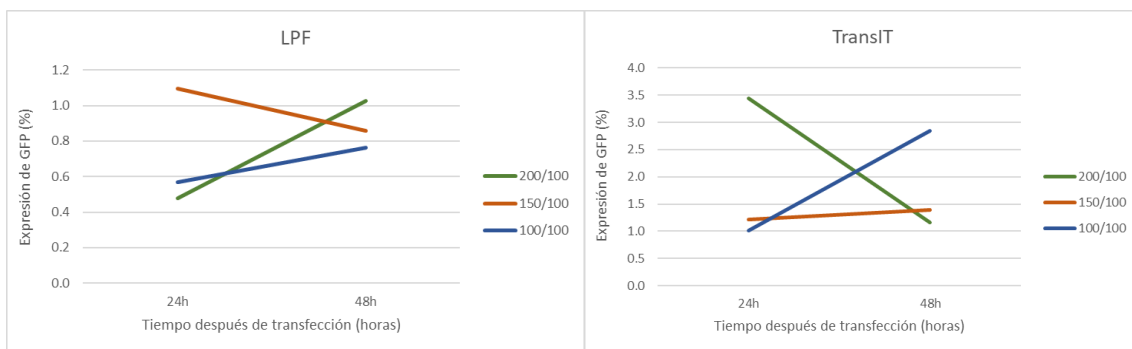


Figura 19. Expresión de GFP a lo largo del tiempo (24h y 48h tras la transfección) en MSCs transfectadas con A) Lipofectamina y B) TransIT con diferentes combinaciones transposón/transposasa (200/100, 150/100 y 100/100 ng).

Para llevar a cabo dicha transfección se utilizaron 2 sistemas no virales comerciales (Lipofectamina y TransIT2020) seleccionados en base a su mayor eficiencia de transferencia génica en MSCs de acuerdo con la literatura (de Carvalho, et al., 2018; Cheung, et al., 2018). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una eficiencia de transfección de ≈ 0.5 -1.1% para las MSCs transfectadas con Lipofectamina y de ≈ 1.1 -3.5% para las transfectadas con TransIT. Estudios previos han mostrado porcentajes de expresión de GFP entorno al 20-30% utilizando LPF como vehículo de transferencia del transposón *piggyBac* (Wen, et al., 2014). Cabe destacar que estos estudios fueron realizados en la línea celular fibroblastos embrionarios murinos IMEF, a diferencia del estudio actual en el que se usaron cultivos primarios de células mesenquimales humanas derivadas de médula ósea. En este sentido es importante resaltar la mayor dificultad intrínseca de transfección de estas células en comparación con la utilización de líneas celulares.

En el estudio actual los porcentajes de expresión de GFP fueron siempre mayores con el TransIT2020 en comparación con la Lipofectamina. Cheung y colaboradores compararon la eficiencia de transfección de MSCs utilizando varios tipos de TransIT (entre ellos el TransIT2020) y Lipofectamina. Sus resultados mostraron que el reactivo TransIT2020 dio lugar a una mayor eficiencia de transfección que otros polímeros y lípidos catiónicos sin afectar a la viabilidad celular. Este aspecto es especialmente relevante cuando las MSCs van a ser utilizadas con fines terapéuticos en los que se requiere un alto número de células (Cheung, et al., 2018).

Aunque en el presente estudio no se evaluó la viabilidad celular con ambos reactivos siempre se contabilizó un mayor número de células por campo al emplear el reactivo TransIT2020 frente a la Lipofectamina (**Figura 23 del Anexo**).

En su conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntan a que la utilización del reactivo TransIT2020 con la combinación transposón/transposasa 100/100 promueve los niveles más altos y sostenidos de expresión de GFP a lo largo del tiempo. En este sentido, los siguientes pasos programados en el presente trabajo que se detallan a continuación y que no han podido realizarse debido a la declaración del estado de alarma del 14 de marzo, podrían haber ayudado a confirmar estos resultados.

Así, se había planteado la realización de una cuantificación de la fluorescencia (medida en Unidades relativas de Fluorescencia) correspondiente a la actividad GFP de las células transfectadas con ambos reactivos y a las distintas combinaciones transposón/transposasa en un lector de placas de fluorescencia configurado con un filtro de excitación 485/20 y con un filtro de emisión 528/20. Este ensayo podría haber ayudado a confirmar los resultados obtenidos en la evaluación microscópica de la expresión de GFP.

Asimismo, una vez confirmada que la combinación 100/100 transposón/transposasa con el reactivo TransIT2020 lleva a los niveles más altos y sostenidos de expresión de GFP, el siguiente paso sería la selección de colonias estables. Debido a la presencia del marcador de selección NeoR en el plásmido *piggyBac* CMV-GFP-FRT (**Figura 4A**) se podrían seleccionar aquellas colonias de MSCs que han sido transfectadas de manera estable con GFP. Para ello se necesita la utilización del antibiótico G418 que es tóxico para células tanto procariotas como eucariotas interfiriendo con los ribosomas y por tanto en la síntesis de proteínas. Su uso más común es el de agente de selección haciendo que todas las células que hayan incorporado el NeoR sean resistentes al antibiótico.

Para la realización de este ensayo, en primer lugar, es necesario realizar una curva de citotoxicidad con este antibiótico con el fin de determinar la mínima concentración que da lugar a la muerte celular en 1 semana. Para averiguar esta concentración se deben cultivar las MSCs (80% de confluencia en placa de 24 pocillos) con diferentes concentraciones de G418 (ensayadas por duplicado), que se renuevan cada 2-3 días. La dosis de G418 con la que todas las células hayan muerto tras una semana es la adecuada para realizar el ensayo. Una vez seleccionada esta concentración se procedería a la selección de colonias 48 horas después de la transfección de MSCs con la combinación 100/100 transposón/transposasa y el reactivo TransIT. En un tiempo aproximado de 10 días todas las células sin el plásmido deberían haber muerto, permitiendo la expansión de las células transfectadas de forma estable.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio permiten concluir que la transfección de MSCs con el reactivo TransIT2020 y la combinación transposón/transposasa 100/100 promovió los niveles más altos y sostenidos de expresión de GFP a lo largo del tiempo.

1. La utilización de Lipofectamina, además de generar niveles de expresión más reducidos, muestra un menor número de células viables tras la transfección.
2. Podemos concluir que el TransIT2020 supera a la Lipofectamina tanto en la expresión del gen por las células transfectadas como en la supervivencia de éstas.

Futuros estudios incluyendo la cuantificación de la expresión de GFP mediante medidas de fluorescencia y la selección de colonias de MSCs transfectadas de forma estable con el antibiótico G418, podrían ayudar a confirmar estas observaciones.

Conclusión

Os resultados do presente estudo permitiron concluir que a transfección de MSCs co reactivo TransIT2020 e a combinación transposón/transposasa 100/100 promoveu os niveis máis altos e sostidos de expresión GFP ao longo do tempo.

1. O uso de Lipofectamina, ademais de xerar niveis máis baixos de expresión, amosa menos células viables despois da transfección.
2. Podemos concluir co TansIT2020 supera á lipofectamina tanto na expresión do xene polas células transfectadas como na súa supervivencia.

Futuros estudos, incluíndo a cuantificación da expresión de GFP mediante medidas de fluorescencia e a selección de colonias de MSCs transfectadas de forma estable co antibiótico G418, poderían axudar a confirmar estas observacións.

Conclusions

The results from the present study allow to conclude that transfection of MSCs with TransIT2020 reagent and 100/100 transposon/transposase combination promoted the highest and the most sustained levels of GFP expression overtime.

1. The use of Lipofectamine generates lower levels of expression and shows fewer viable cells after transfection.
2. We can conclude that TransIT2020 surpasses Lipofectamine both in the expression of the gene by the transfected cells and in their survival.

Further studies including the quantification of GFP expression by fluorescence measurements and the selection of colonies from MSCs stably transfected with the antibiotic G418, could help to support these observations.

Bibliografia

- Bire, S., Casteret, S., Arnaoty, A., Piégu, B., Lecomte, T., & Bigot, Y. (2013). Transposase concentration controls transposition activity: Myth or reality? *Gene*, *530*, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.039>
- Chen, X., Cui, J., Yan, Z., Zhang, H., Chen, X., Wang, N., He, T. C. (2015). Sustained high level transgene expression in mammalian cells mediated by the optimized piggyBac transposon system. *Genes and Diseases*, *2*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.12.001>
- Chen, Y. T., Furushima, K., Hou, P. S., Ku, A. T., Deng, J. M., Jang, C. W., ... Behringer, R. R. (2010). PiggyBac transposon-mediated, reversible gene transfer in human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, *19*, 763–771. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0118>
- Chénais, B. (2013). Vectors for gene therapy: A place for DNA transposon. *Open Journal of Genetics*, *03*, 1–11. <https://doi.org/10.4236/ojgen.2013.32a1001>
- Cucchiari, M., & Rey-Rico, A. (2017). Controlled gene delivery systems for articular cartilage repair. In *Advanced Structured Materials*, *66*, 261–300. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3328-5_7
- de Carvalho, T. G., Pellenz, F. M., Laureano, A., da Rocha Silla, L. M., Giugliani, R., Baldo, G., & Matte, U. (2018). A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnology Letters*, *40*, 617–622. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2505-8>
- Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y., & Xu, T. (2005). Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, *122*, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.013>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*, 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Frisch, J., Venkatesan, J., Rey-Rico, A., Madry, H., & Cucchiari, M. (2014). Current Progress in Stem Cell-Based Gene Therapy for Articular Cartilage Repair. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *10*, 121–131. <https://doi.org/10.2174/1574888x09666140922112326>
- Hamann, A., Nguyen, A., & Pannier, A. K. (2019). Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: A review of nonviral methods and applications. *Journal of Biological Engineering*, *13*. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0140-0>
- Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H., & Izsvák, Z. (1997). Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, *91*, 501–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)
- Iyer, P. S., Mavoungou, L. O., Ronzoni, F., Zemla, J., Schmid-Siegert, E., Antonini, S., Mermod, N. (2018). Autologous Cell Therapy Approach for Duchenne Muscular Dystrophy using PiggyBac Transposons and Mesoangioblasts. *Molecular Therapy*, *26*, 1093–1108. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.01.021>
- Kim, A., & Pyykko, I. (2011). Size matters: Versatile use of PiggyBac transposons as a genetic manipulation tool. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *354*, 301–309. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0832-3>
- Li, M., Turner, D., Ning, Z., Yusa, K., Liang, Q., Eckert, S., Rad, L., Fitzgerald, T., Craig, N., Bradley, A. (2011). Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Oxford University Press*, *39*, e148. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr764>

- Mahla, R. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, 1-24. <https://doi.org/10.1155/2016/6940283>
- Oggu, G. S., Sasikumar, S., Reddy, N., Ella, K. K. R., Rao, C. M., & Bokara, K. K. (2017). Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13, 725–740. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9760-2>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Vargas, J. E., Chicaybam, L., Stein, R. T., Tanuri, A., Delgado-Cañedo, A., & Bonamino, M. H. (2016). Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: Advances, current challenges and perspectives. *Journal of Translational Medicine*, 14, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1047-x>
- Wang, W., Lin, C., Lu, D., Ning, Z., Cox, T., Melvin, D., Liu, P. (2008). Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 9290–9295. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801017105>
- Wen, S., Zhang, H., Li, Y., Wang, N., Zhang, W., Yang, K., Wei, G. (2014). Characterization of constitutive promoters for piggyBac transposon-mediated stable transgene expression in Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *PLoS ONE*, 9, e94397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094397>
- Wu, S. C. Y., Meir, Y. J. J., Coates, C. J., Handler, A. M., Pelczar, P., Moisyadi, S., & Kaminski, J. M. (2006). piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to Sleeping Beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15008–15013. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606979103>
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., & Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature Methods*, 6, 363–369. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1323>
- Yusa, K., Zhou, L., Li, M. A., Bradley, A., & Craig, N. L. (2011). A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1531–1536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008322108>
- Zhao, S., Jiang, E., Chen, S., Gu, Y., Shangguan, A. J., Lv, T., Yu, Z. (2016). PiggyBac transposon vectors: The tools of the human gene encoding. *Translational Lung Cancer Research*, 5, 120–125. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.05>

Anexo

Figura 20. Capturas de pantalla de los contajes realizados con el programa *ImageJ* en las imágenes superpuestas obtenidas con el programa *CellSens* de Olympus.

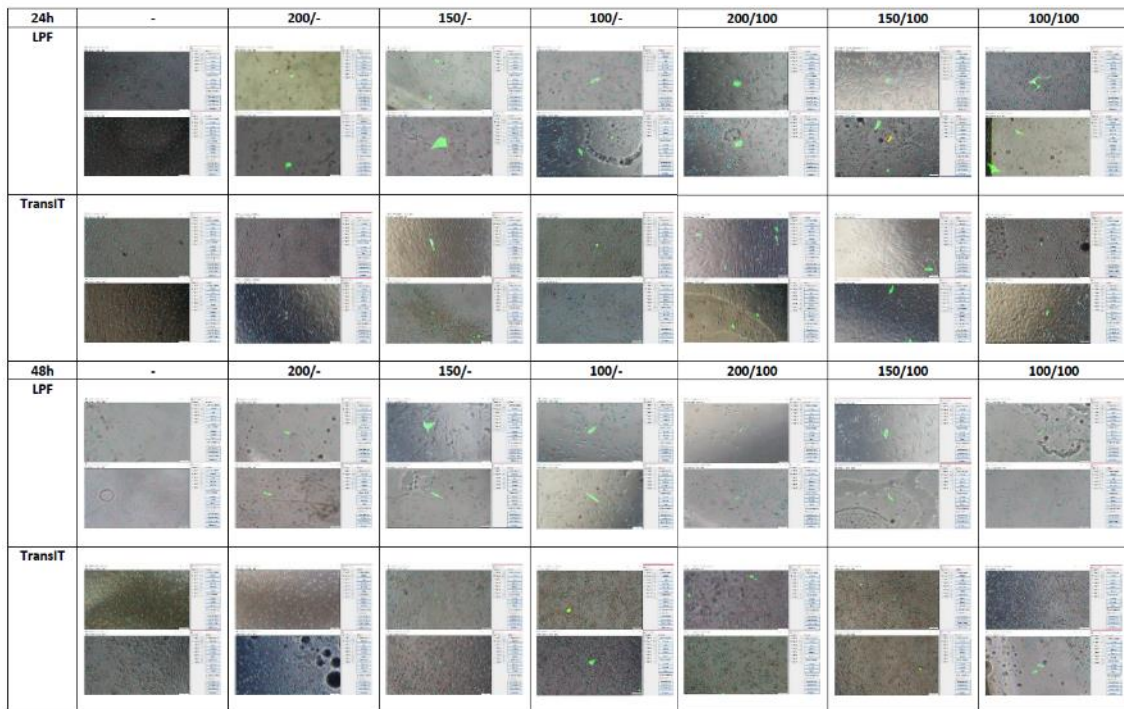


Tabla 1. Análisis de la eficiencia de transfección con LPF. Se muestran el número de células totales y fluorescentes para cada réplica, así como sus porcentajes de transfección. Estos porcentajes fueron promediados y expresados como su valor medio (Media) \pm su desviación típica (SD). Los porcentajes de expresión de GFP más elevados aparecen resaltados en amarillo. Se muestra también el incremento de la expresión de GFP tras comparar cada combinación transposón/transposasa frente a su control en ausencia de transposasa (en amarillo se representan los incrementos más altos), junto a sus p- valores.

LPF (24h)	Réplica 1		Réplica 2		Transfección réplica 1 (%)	Transfección réplica 2 (%)	Media	sd	Incrementos frente control no transposasa	PVALOR
	Totales	Fluorescentes	Totales	Fluorescentes						
Control	177	0	235	0	0.000	0.000	0.000	0.000		
200/-	135	3	170	2	2.222	1.176	1.699	0.739		
150/-	184	2	230	2	1.087	0.870	0.978	0.154		
100/-	259	1	220	2	0.386	0.909	0.648	0.370		
200/100	160	1	304	1	0.625	0.329	0.477	0.209	0.281	0.095
150/100	297	2	263	4	0.673	1.521	1.097	0.599	1.122	0.430
100/100	357	1	233	2	0.280	0.858	0.569	0.409	0.879	0.108
LPF (48h)	Réplica 1		Réplica 2		Transfección réplica 1 (%)	Transfección réplica 2 (%)	Media	sd	Incrementos frente control no transposasa	PVALOR
	Totales	Fluorescentes	Totales	Fluorescentes						
Control	196	0	286	0	0.000	0.000	0.000	0.000		
200/-	130	1	116	2	0.769	1.724	1.247	0.675		
150/-	104	2	130	1	1.923	0.769	1.346	0.816		
100/-	172	1	83	1	0.581	1.205	0.893	0.441		
200/100	84	1	233	2	1.190	0.858	1.024	0.235	0.822	0.394
150/100	106	1	129	1	0.943	0.775	0.859	0.119	0.638	0.252
100/100	186	1	101	1	0.538	0.990	0.764	0.320	0.855	0.186

Tabla 2. Análisis de la eficiencia de transfección con Trans IT2020. Se muestran el número de células totales y fluorescentes para cada réplica, así como sus porcentajes de transfección. Estos porcentajes fueron promediados y expresados como su valor medio (Media) \pm su desviación típica (SD). Los porcentajes de expresión de GFP más elevados aparecen resaltados en amarillo. Se muestra también el incremento de la expresión de GFP tras comparar cada combinación transposón/transposasa frente a su control en ausencia de transposasa (en amarillo se representan los incrementos más altos), junto a sus p- valores (los p-valores < 0.05 aparecen resaltados en amarillo).

TransIT (24h)	Réplica 1		Réplica 2		Transfección réplica 1 (%)	Transfección réplica 2 (%)	Media	sd	Incrementos frente control no transposasa	PVALOR
	Totales	Fluores- centes	Totales	Fluores- centes						
Control	280	0	234	0	0.000	0.000	0.000	0.000		
200/-	172	2	244	2	1.163	0.820	0.991	0.243		
150/-	164	2	344	6	1.220	1.744	1.482	0.371		
100/-	317	3	287	4	0.946	1.394	1.170	0.316		
200/100	204	8	168	5	3.922	2.976	3.449	0.668	3.479	0.039
150/100	216	2	201	3	0.926	1.493	1.209	0.401	0.816	0.024
100/100	244	2	247	3	0.820	1.215	1.017	0.279	0.869	0.054
TransIT (48h)	Réplica 1		Réplica 2		Transfección réplica 1 (%)	Transfección réplica 2 (%)	Media	sd	Incrementos frente control no transposasa	PVALOR
	Totales	Fluores- centes	Totales	Fluores- centes						
Control	284	0	211	0	0.000	0.000	0.000	0.000		
200/-	265	1	271	1	0.377	0.369	0.373	0.006		
150/-	281	2	318	1	0.712	0.314	0.513	0.281		
100/-	301	4	290	6	1.329	2.069	1.699	0.523		
200/100	287	4	322	3	1.394	0.932	1.163	0.327	3.116	0.089
150/100	287	4	290	4	1.394	1.379	1.387	0.010	2.702	0.069
100/100	361	2	136	7	0.554	5.147	2.851	3.248	1.678	0.329

Tabla 3. Comparativa de la eficiencia de transfección de los complejos formados por las distintas combinaciones transposón/transposasa con Lipofectamina o TransIT2020. Se muestran los porcentajes medios de expresión de GFP para cada combinación transposón/transposasa con cada uno de los reactivos (LPF; verde y Trans IT2020 amarillo). Se muestra también el incremento de la expresión de GFP tras comparar el TransIT2020 frente a la LPF junto a sus p-valores (los p-valores < 0.05 aparecen resaltados en amarillo).

24h	Media	Incremento	PVALOR
200/100 LPF	0.477		
200/100 TransIT	3.449	7.231	0.035
150/100 LPF	1.097		
150/100 TransIT	1.209	1.102	0.286
100/100 LPF	0.569		
100/100 TransIT	1.017	1.787	0.064
48h	Media	Incremento	PVALOR
200/100 LPF	1.024		
200/100 TransIT	1.163	1.135	0.140
150/100 LPF	0.859		
150/100 TransIT	1.387	1.614	0.046
100/100 LPF	0.764		
100/100 TransIT	2.851	3.732	0.249

Figura 21. Expresión de GFP en MSCs a las 48 horas de su transfección con los complejos de LPF y transposón (200, 150 o 100 ng), en ausencia (-) o presencia de transposasa (100 ng). El control (-) representa a células sin transfectar. Imágenes representativas (magnificación 10x).

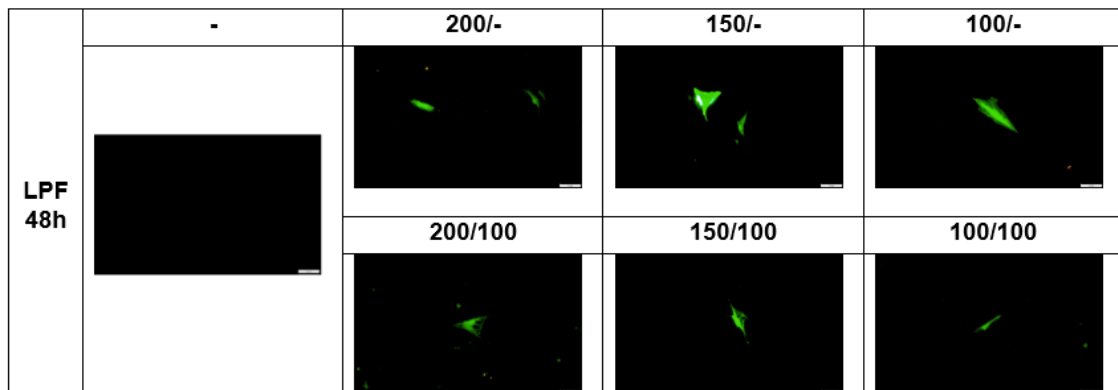


Figura 22. Expresión de GFP en MSCs a las 48 horas de su transfección con los complejos de Trans IT2020 y transposón (200, 150 o 100 ng), en ausencia (-) o presencia de transposasa (100 ng). El control (-) representa a células sin transfectar. Imágenes representativas (magnificación 10x).

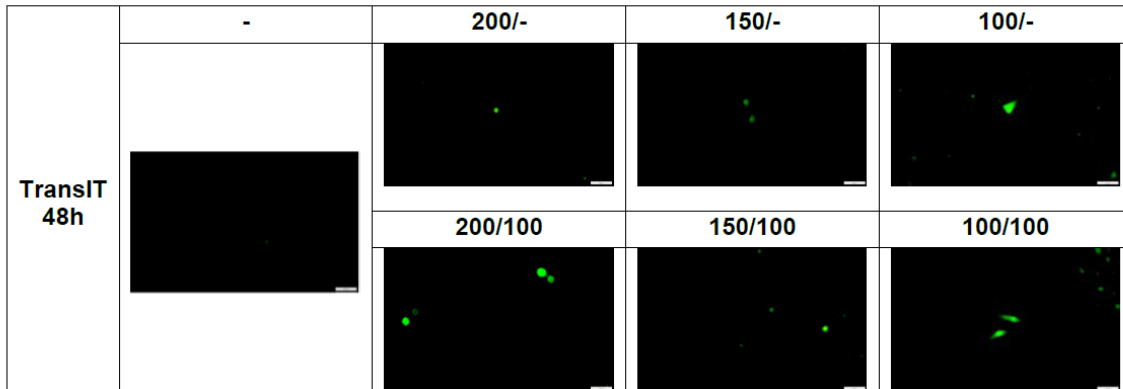


Figura 23. Número de células contabilizadas células tras 48h de la transfección con las distintas combinaciones de transposón y transposasa, y los reactivos Lipofectamina (naranja) o TransIT 2020 (verde).

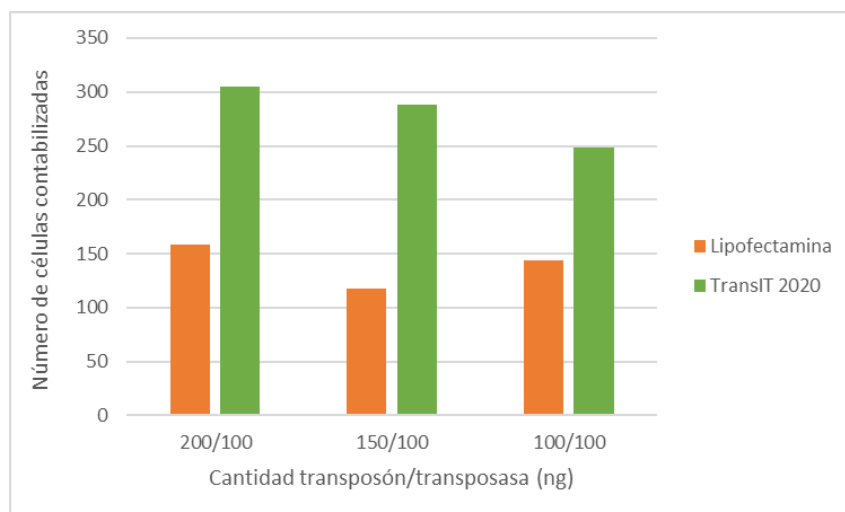


Figura 24. Aprobación del Comité de Ética de Investigación de A Coruña (CEIC)
(Código de Registro: 2019/066).



Secretaría Técnica
Comités de Ética de Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE A CORUÑA - FERROL

Natalia Cal Purriños, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 25/03/19 el estudio:

Título: Gene-activated cryogels for cartilage repair (CRYO-GAM)

Versión:

Promotor/a: Ana Rey Rico

Investigador/a: Ana Rey Rico

Código de Registro: 2019/066

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registro y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

Documento firmado digitalmente por:
Natalia Cal Purriños (03/04/2019 11:27)
<https://sede.xunta.gal/cve?idcve=SAOC-MGA-BOAH-OF4O-TCA-P155-4283-6372-07>

