



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria de Traballo de Fin de Grao

**Modificación genética de células madre
mesenquimales con polímeros activados con
hidrazona**

**Modificación xenética de células nai
mesenquimais con polímeros activados con
hidrazona**

**Genetic modification of mesenchymal stem cells
via hydrazone-activated polymers**

Alba Ramil Bouzas

Curso: 2021 - 2022

Convocatoria: Xuño

Director 1: Ana Rey Rico

Director 2: María Graciela Estévez Pérez

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Dña. Ana Rey Rico y Dña. María Graciela Estévez Pérez autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Grado "Modificación genética de células madre mesenquimales con polímeros activados con hidrazona". Presentado por Alba Ramil Bouzas para su defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 23 de junio de 2022



Fdo: Ana Rey Rico



Fdo: María Graciela Estévez Pérez

Contenido

Resumen	
Resumo	
Abstract	
Introducción.....	1
Células Madre Mesenquimales.....	1
Terapia Génica.....	2
Vectores virales.....	2
Vectores no virales.....	3
Objetivo.....	5
Materiales y Métodos.....	5
1. Obtención de la línea de iMSCs.....	5
2. Cultivo de iMSCs.....	5
3. Propagación, aislamiento y purificación del ADN plasmídico.....	6
3.1. Determinación de la concentración de <i>p/acZ</i>	7
3.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	7
4. Preparación de complejos de <i>p/acZ</i> y T1-P2-Tx.....	7
5. Transfección de las iMSCs con el complejo <i>p/acZ</i> -T1-P2-Tx.....	8
6. Análisis de la transfección celular.....	9
6.1. Determinación de la cantidad de proteína.....	10
7. Análisis de la viabilidad celular.....	10
8. Análisis de la capacidad de complejación del <i>p/acZ</i>	11
8.1. Ensayo de retardo en gel de agarosa.....	11
8.2. Ensayo de exclusión de SYBR™ Gold por Fluorescencia.....	11
9. Análisis estadístico de los datos.....	12
Resultados y discusión.....	13
1. Comprobación de la propagación, aislamiento y purificación del pADN.....	13
2. Análisis de la eficiencia de transfección.....	13
3. Caracterización complejo <i>placZ</i> -T1-P2-T5.....	16
3.1. Ensayo de retardo en gel.....	16
3.2. Ensayo de Exclusión de SYBR Gold®.....	18
4. Análisis de la viabilidad celular.....	20
Conclusiones.....	21
Conclusi3ns.....	22
Conclusions.....	22

Bibliografía 23
Anexo I 26

Resumen

Las células madre mesenquimales (MSCs) presentan un gran potencial en medicina regenerativa y terapia génica como consecuencia de sus múltiples propiedades, entre las que destacan su capacidad de renovación y diferenciación a distintos linajes mesodérmicos.

Dentro de los vectores utilizados en terapia génica, los polímeros activados con hidrazona han sido muy estudiados en los últimos años debido a su gran versatilidad química y reducida citotoxicidad. Estos sistemas son obtenidos mediante la co-funcionalización del polímero con grupos hidrazona (P2) con un aldehído catiónico (T1) necesario para la interacción con el ADN y un aldehído hidrofóbico (T2, T4, T5) responsable de reducir la citotoxicidad y mejorar la solubilidad. Los polímeros resultantes presentan carácter anfipático y capacidad de autoensamblaje.

En el presente trabajo se estudiaron diferentes formulaciones de polímero co-funcionalizado como vector no viral para comprobar su capacidad de transferencia génica en una línea celular inmortalizada de MSCs (iMSCs) con un plásmido de ADN que contiene el gen reportero, *lacZ* (*placZ*). Los resultados obtenidos sugieren que la formulación estudiada, T1P2T5, mostró una reducida citotoxicidad promoviendo valores detectables de actividad de β -galactosidasa.

Palabras clave: células madre mesenquimales (MSCs), polímero activado con hidrazona, aldehído catiónico, aldehído hidrofóbico, plásmido reportero *lacZ*, transfección.

Resumo

As células nai mesenquimais (MSCs) presentan un gran potencial en medicina rexenerativa e terapia xénica como consecuencia das súas múltiples propiedades, entre as que destacan a súa capacidade de renovación e diferenciación aos distintos linaxes mesodérmicos.

Dentro dos vectores utilizados en terapia xénica, os polímeros activados con hidrazona foron moi estudados nos últimos anos debido a súa gran versatilidade química e reducida citotoxicidade. Estes sistemas foron obtidos mediante a co-funcionalización do polímero con grupos hidrazona (P2) cun aldehído catiónico (T1) necesario para a interacción co ADN e un aldehído hidrofóbico (T2, T4 e T5) responsable de reducir a citotoxicidade e mellorar a solubilidade. Os polímeros resultantes presentan carácter anfipático e capacidade de autoensamblaxe.

No presente traballo foron estudadas diferentes formulacións de polímero co-funcionalizado como vector non viral para comparar a súa capacidade de transferencia xénica nunha liña celular inmortalizada de MSCs (iMSCs) cun

plásmido de ADN que contén o xen repoteiro, *lacZ* (*p**lacZ*). Os resultados obtidos suxiren que a formulación estudada, T1P2T5, mostrou unha reducida citotoxicidade promovendo valores detectables de actividade β -galactosidasa.

Palabras chave: células nai mesenquimais (MSCs), polímero activado con hidrazona, aldehído catiónico, aldehído hidrofóbico, plásmido repoteiro *lacZ*, transfección.

Abstract

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have a great potential in regenerative medicine and gene therapy due to their multiple properties, including their capacity for renewal and differentiation into different mesodermal lineages.

Among the vectors used in gene therapy, hydrazone-activated polymers have been extensively studied in recent years. The reason for this remains in their great chemical versatility and reduced cytotoxicity. These systems are obtained by co-functionalizing the polymer with hydrazone groups (P2) with a cationic aldehyde (T1) necessary for interacting with DNA and a hydrophobic aldehyde (T2, T4, T5) responsible for reducing cytotoxicity and improving solubility. The resulting polymers show amphipathic character and self-assembly capacity.

In the present study, different formulations of co-functionalized polymers were tested as non-viral vectors by evaluating their gene transference capacity in an immortalized MSCs line (iMSCs) with a DNA plasmid containing the reporter gene, *lacZ* (*p**lacZ*). The results obtained suggest that the formulation studied, T1P2T5, showed reduced cytotoxicity promoting detectable β -galactosidase activity values.

Key words: Mesenchymal Stem Cells (MSCs), hydrazone-activated polymer, cationic aldehyde, hydrophobic aldehyde, *lacZ* reporter plasmid, transfection.

Introducción

Células Madre Mesenquimales

Las células madre mesenquimales (del inglés: *Mesenchymal Stem Cells*) son un tipo de células adultas multipotentes con morfología fibroblástica. Las primeras MSCs fueron aisladas a partir de muestras de médula ósea de cobaya por el grupo Friedenstein en 1976, pero también pueden obtenerse a partir de otros tejidos como el tejido adiposo, la placenta, la sangre, el páncreas y el músculo esquelético entre otros (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018). Entre las fuentes anteriormente citadas, las MSCs de la médula ósea son las más utilizadas debido a su facilidad de aislamiento y elevada capacidad de proliferación y diferenciación (Amorin *et al.*, 2014).

Las MSCs son células primordiales, no especializadas y no hematopoyéticas que se caracterizan por su capacidad de autorenovación y de diferenciación a diferentes tipos celulares. Además, también tienen la capacidad de migrar a los lugares en donde existe inflamación o a microambientes tumorales, lo que se conoce como tropismo (Oggü *et al.*, 2017). Otros factores importantes son la capacidad de secreción de factores tróficos y sus efectos inmunomoduladores (Viswanathan *et al.*, 2019).

Tanto el origen como los protocolos seguidos para su aislamiento y cultivo pueden variar las propiedades de las MSCs, de ahí que la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica (del inglés: *International Society for Cell & Gene Therapy*, ISCT) estableciera 3 criterios mínimos para su caracterización (Dominici *et al.*, 2006):

- Las MSCs deben ser capaces de adherirse al plástico de los frascos de cultivo en condiciones estándar de cultivo.
- Deben expresar los factores CD73, CD90 y CD105 y carecer de la expresión de los marcadores hematopoyéticos y endoteliales CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a y HLA-DR.
- Deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* a linajes de adipocitos, condrocitos y osteoblastos en condiciones estándar de cultivo.

Las propiedades citadas anteriormente hacen de las MSCs una población celular con propiedades prometedoras para el tratamiento de múltiples patologías tal y como se recoge en el Figura 1.

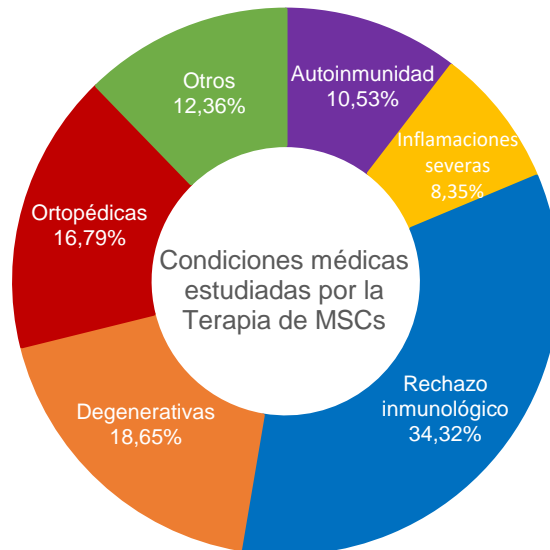


Figura 1. Condiciones médicas estudiadas por la Terapia de MSCs. Imagen adaptada de Naji et al., (2019).

Sin embargo, a pesar de su gran potencial terapéutico, el uso de MSCs se puede ver limitado por la disminución de su capacidad de proliferación y diferenciación con el aumento de la edad del paciente (Dimmeler & Leri, 2008), de la misma forma que sucede con su cultivo prolongado *in vitro*. De esta forma, la terapia génica de MSCs ha emergido como una potencial herramienta para incrementar su potencial terapéutico (Pawitan et al., 2020).

Terapia Génica

La Asociación Española de Terapia Génica y Celular define la Terapia Génica como la transferencia de material genético con un fin terapéutico (Sociedad Española de Terapia Génica y Celular, 2022). De esta manera, mediante la introducción de material genético exógeno en las células diana se consigue una expresión sostenida de determinadas proteínas con la intención de lograr un efecto terapéutico.

El material genético no puede ser introducido de forma aislada en la célula debido a su alta distribución de cargas negativas, elevada hidrofiliidad y alto peso molecular, por lo que necesita de un vehículo o vector que lo transporte al interior celular. En función de su naturaleza, estos vectores pueden ser clasificados como virales, si se basan en el mecanismo natural de los virus para entrar en las células, o no virales, si se basan en la utilización de compuestos sintéticos.

Vectores virales

Los vectores virales se basan en la modificación genética de virus, en los cuales se eliminan los genes responsables de su capacidad infecciosa y patógena, y se introducen aquellos genes de interés terapéutico para ser

transportados al interior de las células (transducción). Estos vehículos utilizan las vías de internalización propias de los virus de los cuales derivan.

Los vectores virales más comunes derivan de los adenovirus, los virus recombinantes adeno-asociados (rAAV), los retrovirus, los lentivirus y los virus del herpes simple (VHS) (Cucchiariini & Rey-Rico, 2017).

Si bien los vectores virales dan lugar a una elevada eficiencia de transducción y expresión de la secuencia génica de interés a largo plazo *in vivo*, su uso se encuentra limitado por importantes limitaciones derivadas del virus del que proceden. Entre ellas se encuentran la elevada inmunogenicidad (adenovirus) o toxicidad (VHS), la probabilidad de generar una mutagénesis por inserción (retrovirus/lentivirus) y la reducida capacidad de empaquetamiento (rAAV) (Cucchiariini & Rey-Rico, 2017).

Asimismo, un problema común a todos los vectores virales es su gran coste de producción asociado a los elevados grados de bioseguridad requeridos (Juanes *et al.*, 2019).

Vectores no virales

Los sistemas no virales de transfección pueden ser clasificados en físicos y químicos. Los sistemas físicos como la electroporación se basan en la introducción mecánica del material genético en las células. En general, los métodos físicos son procesos sencillos, pero que presentan una baja eficiencia, además de que son muy invasivos y podrían dañar las membranas celulares y nucleares (Bono *et al.*, 2020).

Por otro lado, los sistemas químicos se basan en la formación de complejos del material genético con vectores químicos como: lípidos, polímeros catiónicos, partículas inorgánicas o combinaciones de los anteriores (Zu & Gao, 2021).

Por lo general, los vectores no virales son más fáciles de producir y por lo tanto más económicos que sus homólogos virales, además de presentar una considerable menor citotoxicidad, inmunogenicidad y mutagénesis.

Los vectores químicos basados en polímeros catiónicos han recibido gran atención durante los últimos años debido a su gran versatilidad química. Así, estos vectores suponen una sucesión de monómeros con determinados grupos funcionales (polímeros multivalentes) que les permiten incorporar cargas positivas a lo largo de su estructura molecular capaces de establecer interacciones electroestáticas con las cargas negativas de los grupos fosfatos del ADN, necesarias para la compactación del material genético (Bono *et al.*, 2020).

Sin embargo, la alta distribución de cargas positivas en estos sistemas conlleva también a una mayor citotoxicidad, lo que ha llevado a la necesidad de buscar diferentes estrategias químicas para disminuir este efecto y también para

mejorar su eficiencia de transfección (Kumar *et al.*, 2021), entre las que se encuentran:

- Diseño del tipo de grupos funcionales para la síntesis de los polímeros con carga positiva (policationes).
- Alteración de la estructura y peso molecular del polímero.
- Cambio en la composición química incorporando elementos hidrofóbicos, hidrofílicos o sensibles a estímulos.

Cabe destacar que la composición del monómero condiciona la estructura final del polímero tras la reacción de polimerización, es decir, la reacción por la cual los monómeros reaccionan entre sí dando lugar al polímero. En este sentido, se ha observado que la presencia del grupo hidrazona ($R_2C=N-NR_2$), permite la conjugación de formulaciones químicas en diferentes ambientes biomoleculares (Priegue *et al.*, 2018), lo que hace que los polímeros con estos grupos funcionales sean de gran interés en estudios de terapia génica.

En la misma línea, se ha estudiado el uso de la post-polimerización de polímeros de polihidrazonas para obtener polímeros anfipáticos activados *in situ* sin necesidad de una purificación adicional, siendo estables en medio acuoso. Además, estos polímeros pueden autoensamblarse en micelas o vesículas, lo que mejora su solubilidad (Kumar *et al.*, 2021).

De esta forma, a los polímeros catiónicos se les introduce un elemento hidrofóbico, en este caso un compuesto químico con un grupo funcional aldehído, para dar lugar a un polímero co-funcionalizado capaz de formar complejos con el ADN (poliplejos) con el fin de introducirlo en el interior de la célula (Figura 2).

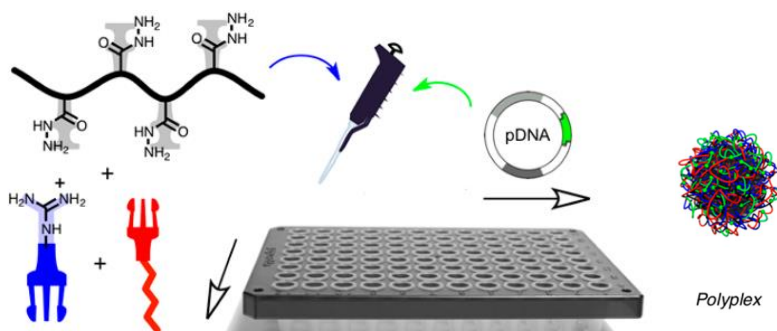


Figura 2. Representación esquemática de la reacción de polihidrazonas con los aldehídos catiónico (azul) e hidrofóbico (rojo) y su posterior incubación con el ADN plasmídico para la formación del complejo ADN-polímero catiónico (poliplejo). Imagen adaptada de Priegue *et al.* (2018).

Por lo tanto, los vectores no virales poliméricos de estudio se resumen en 3 componentes: monómeros con los grupos funcionales hidrazona, aldehídos catiónicos (aportan las cargas positivas) y aldehídos hidrofóbicos (ayudan a contrarrestar el exceso de cargas positivas y mejoran la eficiencia de transfección).

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la eficiencia de transfección de un sistema no viral basado en el complejo formado por el plásmido *lacZ* y un polímero catiónico sintético (T1-P2-Tx) en una línea inmortalizada de células madre mesenquimales (iMSCs).

Materiales y Métodos

1. Obtención de la línea de iMSCs

La línea celular de iMSCs fue donada por la Profesora Silvia Díaz Prado de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UDC. Las MSCs fueron aisladas a partir de la médula ósea de diferentes pacientes e inmortalizadas mediante un proceso de transducción de genes inmortalizadores. Algunos genes utilizados fueron el antígeno T del virus simio 40 (SV40LT) que promueve la progresión del ciclo celular o la telomerasa humana transcriptasa inversa (hTERT) que evita el acortamiento de los telómeros (Piñeiro-Ramil *et al.*, 2020).

Para lograr una máxima eficiencia en la inmortalización se utilizó el método de la espinoculación y se añadieron adyuvantes químicos como el ácido valproico (VPA) que actúa como inhibidor de la histona desacetilasa.

La capacidad de diferenciación de las iMSCs al triple linaje mesodérmico fue verificada mediante técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y moleculares (Piñeiro-Ramil *et al.*, 2020).

2. Cultivo de iMSCs

Los cultivos de iMSCs fueron mantenidos en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; *Sigma-Aldrich*, EE. UU) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, *Gibco-ThermoFisher Scientific*, Sudamérica) y 1% Penicilina/Estreptomicina (P/E; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, España) e incubados en un incubador de CO₂ (*Fisherbrand*, España) a una temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ en condiciones de atmosfera húmeda.

El mantenimiento de los cultivos celulares se basó en cambios periódicos del medio de cultivo DMEM 10% FBS 1% P/E (medio DMEM suplementado) cada 3-4 días con el fin de eliminar las posibles sustancias dañinas presentes en las células y aportar los nutrientes necesarios para su crecimiento. Previamente a cada cambio de medio de cultivo se realizó un lavado con *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS; *Sigma Aldrich*, EE. UU) para eliminar restos celulares indeseados.

El control del crecimiento celular se llevó a cabo con ayuda de un microscopio óptico invertido Olympus CKX53 (*Olympus*, España). Cuando se observó una alta confluencia celular, es decir, un alto porcentaje del área de la superficie del

frasco de cultivo cubierta por una monocapa de células, se realizaron subcultivos celulares.

Para realizar los subcultivos celulares se separaron las células adherentes de la superficie de cultivo utilizando tripsina-EDTA 1X (*MP Biomedicals™*, España), una enzima proteolítica que degrada las proteínas de adhesión (*Real Academia de Ingeniería*, 2022). De forma previa a la adición de la tripsina se realizó un lavado con PBS.

El cultivo se incubó durante 5 minutos a 37 °C, y posteriormente se inactivó la tripsina añadiendo medio de cultivo DMEM suplementado. La suspensión se centrifugó a 1650 rpm, a 21°C, durante 5 minutos y una vez eliminado el sobrenadante se resuspendieron las células en medio suplementado para ser sembradas en nuevos frascos de cultivo.

Para realizar los diferentes experimentos fue necesario realizar un recuento celular, y para ello se hizo uso de la cámara de Neubauer y el reactivo *Corning™ Azul de tripano cellgro™* (*Fisher Scientific*, España), un colorante azoico impermeable que permite distinguir las células viables de las no viables. Este tinte sólo es capaz de penetrar las células dañadas y, por lo tanto, solo estas células serán teñidas. Este recuento se realizó por duplicado. Posteriormente se procedió a la siembra en placas de 96 pocillos (*Costar™ Corning Incorporated*, EE. UU) a una densidad de 6400 células/pocillo.

3. Propagación, aislamiento y purificación del ADN plasmídico

El ADN plasmídico (pADN) se aisló y purificó a partir de stocks de *Escherichia coli* Top 10 competentes transformadas con el pCMV-SPORT-βgal (7853pb) cedidos por la Profesora Magali Cucchiari del Centro de Ortopedia Experimental de la Universidad de Saarland (Alemania) que se mantuvieron en glicerol a temperatura de -80 °C.

Este proceso consta de tres pasos: precultivo, escalado y aislamiento/purificación.

En primer lugar, se preparó un precultivo de la muestra bacteriana en tubos de polipropileno con medio *Luria Broth Base (LB; Fisher Scientific*, Suecia; 5 mL) y 100 µg/mL de antibiótico ampicilina (ampicilina sal sódica; *Fisher Bioreagents*, Suecia). Esta suspensión se incubó toda la noche a 37 °C y en agitación a 200 rpm. La adición del antibiótico asegura el crecimiento único de las bacterias que han incorporado el plásmido de interés.

En segundo lugar, se realizó un escalado de los cultivos trasvasando el contenido de cada tubo en matraces Erlenmeyer conteniendo medio LB (200 mL) y ampicilina (100 µg/mL). Los cultivos se dejaron incubando una noche a 37 °C y 200 rpm.

Por último, se realizó el aislamiento y purificación del plásmido *p/acZ* con el kit comercial *Genopure Plasmid Maxi Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1. Determinación de la concentración de *p/acZ*

La concentración del plásmido se midió en un bio-espectrofotómetro mediante microgota MySPEC Twin (VWR, EE. UU). También se realizó un análisis de la calidad y pureza del plásmido a través del registro del cociente A_{260}/A_{280} .

3.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para estudiar la integridad del plásmido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1X (Tris-acetato-EDTA; *Gibco-ThermoFisher Scientific*). Previamente a la polimerización del gel de agarosa en el soporte de electroforesis, se tiñó con *Green Safe Premium* (*Nyztech*, Portugal; 2 μ L).

Para la verificación del plásmido se sometió a un proceso de digestión con las enzimas *XbaI* y *Sall* (ambas de *ThermoFisher Scientific*, España). Para llevar a cabo la digestión se mezclaron 500 ng de plásmido (2,5 μ L de la disolución stock) con 1 μ L de *XbaI*, 1 μ L de *Sall* y 4 μ L de *Tango Buffer* (*Fisher Scientific*, España) y se completó hasta un volumen final de 30 μ L con agua libre de nucleasas. En paralelo se realizó un control del plásmido en ausencia de enzimas de restricción. Las muestras fueron cargadas en el gel de electroforesis tras su mezcla con 1 μ L de tampón de carga *BlueJuiceTM* (*BlueJuiceTM Gel Loading Buffer*; *Thermo Fisher Scientific*, España). Para la identificación del tamaño de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb (*1 Kb Plus DNA Ladder*; *InvitrogenTM*, EE. UU.). La electroforesis se llevó a cabo a 80V durante 40 min.

4. Preparación de complejos de *p/acZ* y T1-P2-Tx

La síntesis del polímero catiónico se realizó en el trabajo experimental del Trabajo de Fin de Grado de Química coordinado con el presente trabajo.

El polímero catiónico se obtuvo mediante polimerización de los monómeros de hidrazona (P2) con un aldehído catiónico, en este caso el guanidinio (T1) y un aldehído hidrofóbico Tx; T2: hexanal (aldehído alifático), T4: benzaldehído (aldehído aromático) y T5: L-perillaldehído (aldehído alifático ramificado).

Los complejos de las distintas formulaciones con el pADN (*p/acZ*; 500ng) fueron preparados en medio DMEM sin suplementar, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para los distintos ensayos se probaron las siguientes formulaciones a las concentraciones indicadas (Tabla 1).

Concentración P2 (μg /mL)	Polímero	Aldehído catiónico	Aldehído hidrofóbico (Tx)	Equivalentes Tx
6	P2	T1	-	-
6	P2	T1	T2	0,075
6	-	T1	T2	0,075
6	P2	T1	T2	0,15
6	-	T1	T2	0,15
6	P2	T1	T4	0,075
6	-	T1	T4	0,075
6	P2	T1	T4	0,15
6	-	T1	T4	0,15
6	P2	T1	T5	0,075
6	-	T1	T5	0,075
6	P2	T1	T5	0,15
6	-	T1	T5	0,15
0,6	P2	T1	T5	0,075
0,6	-	T1	T5	0,075
0,6	P2	T1	T5	0,15
0,6	-	T1	T5	0,15
8	P2	-	-	-
8	P2	T1	-	-
8	-	T1	-	-

Tabla 1. Formulaciones de ensayo. La concentración hace referencia a la cantidad de polímero P2 final en la formulación. P2 está presente en todas las formulaciones menos en los controles (-). Las formulaciones finales resultantes varían en su composición en el aldehído hidrofóbico (T2, T4 y T5) y en su relación de equivalentes (0,075 o 0,15) con respecto al aldehído guanidinio (T1).

5. Transfección de las iMSCs con el complejo p*lacZ*-T1-P2-Tx

Las iMSCs se sembraron en placas de 96 pocillos (*CostarTM Corning Incorporated*, EE. UU) a una densidad celular de 6400 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, atmosfera húmeda y 5% de CO₂ de forma previa a los ensayos de transfección.

Para los ensayos de transfección, se retiró el medio de cultivo de los pocillos, se realizó un lavado previo con PBS, y posteriormente se añadieron los complejos preparados de acuerdo con el apartado 4 (50 μL en cada pocillo, 4 replicados).

Además de los compuestos de estudio, se realizaron controles negativos y positivos. El control negativo se basó en células sin tratamiento cultivadas en medio de cultivo. Como control positivo se utilizaron células transfectadas con el reactivo comercial LipofectamineTM Stem Reagent (*InvitrogenTM de ThermoFisher*, Lituania).

Las células fueron incubadas con los complejos (cantidad final de p*lacZ* por pocillo 125 o 250 ng) durante 4 horas tras las cuales se adicionó medio suplementado hasta un volumen final de 100 μL . Finalmente, las placas se incubaron durante 20 horas a 37 °C, en atmosfera húmeda y 5% de CO₂.

6. Análisis de la transfección celular

Para verificar la transfección celular se utilizó el reactivo Beta-Glo® (*Promega*, EE. UU), que permite cuantificar la actividad β -galactosidasa en células de mamífero.

La metodología de este ensayo consiste en una reacción enzimática acoplada a una reacción colorimétrica. En primer lugar, la enzima β -galactosidasa escinde la molécula 6-O- β -galactopiranosil-luciferina en dos moléculas: β -galactosa y D-Luciferina. Posteriormente, la D-luciferina es metabolizada por la enzima luciferasa dando lugar a oxiluciferina, generándose una señal luminiscente (Figura 3) proporcional a la cantidad de β -galactosidasa presente en las células (*Promega Corporation*, 2011).

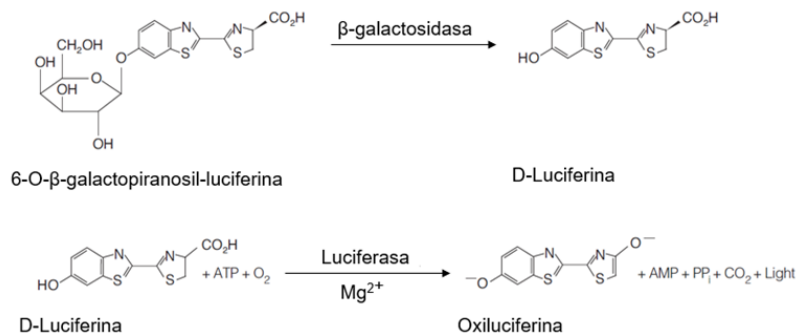


Figura 3. Reacción enzimática acoplada del Sistema de Ensayo Beta-Glo. Imagen adaptada de *Promega Corporation*, (2011).

A las 24 horas de la transfección, se realizó un lavado con PBS y posteriormente se adicionaron 110 μ L de buffer de lisis (1:50) (*Cell Culture Lysis 5X Reagent*, *Promega*, EE. UU). A continuación, la placa se sometió a un ciclo de congelación (2 horas a -80°C) -descongelación (37°C) antes de la realización del ensayo.

Para el ensayo se tomaron 50 μ L de los lisados que se dispusieron en una placa blanca (*Costar™ Corning Incorporated*, EE. UU) de 96 pocillos antes de la adición del reactivo Beta-Glo® (dilución 1:1). La placa se incubó durante 30 minutos en oscuridad, y la luminiscencia se leyó en el espectrofotómetro de placas *Synergy HTX* (*Biotek*, EE. UU) con modo de ganancia en automático.

Los datos de este ensayo se expresaron en unidades relativas de luminiscencia (URL), a los que se les substrajo los valores de URL correspondientes al control negativo de las células sin tratar para eliminar la expresión endógena de β -galactosidasa.

6.1. Determinación de la cantidad de proteína

Con el fin de correlacionar los resultados de transfección con el número de células presentes en cada pocillo se determinó la cantidad de proteínas totales mediante el ensayo de Micro BCA (Ácido Bicinchonínico, del inglés BCA) comercial de *Thermo Fisher Scientific* (España). Este método hace uso de la proteína seroalbumina bovina (del inglés *Bovine Serum Albumin*, BSA) como reactivo para la detección del ion Cu^+ , generado por la reducción del ion Cu^{2+} debido a la quelación de dos moléculas de BCA con el ion Cu^+ (*Thermo Scientific*, n.d.).

Se tomaron 20 μL de los diferentes lisados y se añadieron a una placa de 96 pocillos junto con 200 μL del reactivo BCA (dilución 1:10). Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C, y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm en el espectrofotómetro de placas. Para calcular la cantidad de proteína presente en cada pocillo se realizó una recta de calibrado con la proteína BSA.

7. Análisis de la viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular se llevó a cabo con el reactivo Alamar Blue (*Resazurin, sodium salt, pure, certified, ACROS Organics*, China) cuyo principio activo es la resazurina, caracterizada por ser soluble en agua, estable en medio de cultivo, permeable a través de las membranas celulares y fotosensible.

El colorante resazurina actúa como un aceptor de electrones en la cadena de transporte electrónico, de forma que pasa de su estado oxidado al reducido, la resorufina (Figura 4). Este cambio de color permite cuantificar la viabilidad celular mediante medidas de fluorescencia (Rampersad, 2012).

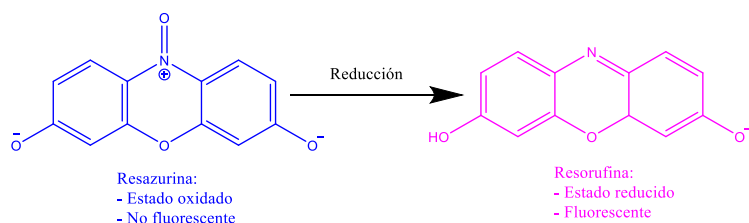


Figura 4. Esquema de la reducción de la resazurina elaborado con el programa ChemDraw.

A las 24 horas después de la transfección se retiró el medio de cultivo de los pocillos, y se añadieron 100 μL de una disolución de Alamar Blue en DMEM suplementado (dilución 1:10). La placa se incubó durante 2 horas a 37 °C, 5% de CO_2 en atmosfera húmeda.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midió la fluorescencia en el espectrofotómetro de placas. Los datos obtenidos fueron expresados en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) normalizados con respecto a los valores de fluorescencia obtenidos con el control negativo de las células sin

tratar para calcular los porcentajes de viabilidad, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad Celular (\%)} = \frac{\text{URF muestra}}{\text{URF control negativo}} \cdot 100$$

En este ensayo se analizó en primer lugar la citotoxicidad del disolvente en el que se prepararon posteriormente las distintas formulaciones. Para ello se analizó la viabilidad celular en presencia de los siguientes disolventes: ácido acético 100 mM, agua pH 5 y dimetilsulfóxido (DMSO). Además, paralelamente a los ensayos de transfección, se analizó la viabilidad celular en presencia de las distintas formulaciones.

8. Análisis de la capacidad de complejación del p*lacZ*

En paralelo a los ensayos de transfección, y una vez fijadas las cantidades de polímero (P2) y de aldehído hidrofóbico (T5), se analizó la capacidad de complejación de las diferentes formulaciones mediante el análisis de su movilidad electroforética y capacidad de exclusión del colorante SYBR™ Gold.

8.1. Ensayo de retardo en gel de agarosa

Esta técnica se basa en el movimiento electroforético de los compuestos en el gel, de forma que se puede detectar la compactación del pADN. La migración debido al campo eléctrico va a depender del tamaño, la carga y de la forma de las partículas que se introducen en el gel (Hanauer *et al.*, 2007). De este modo, el ADN que se encuentre condensado en los complejos migrará más lentamente en el gel que el ADN plasmídico libre.

Tras fijar las cantidades de polímero (P2) y de aldehído hidrofóbico (T5) se investigaron las relaciones molares de los aldehídos guanidinio/L-perillaldehído (T1/T5) y las concentraciones de las disoluciones madre T1P2T5. En paralelo, se analizó la movilidad electroforética del plásmido libre y de los aldehídos sin el polímero que fueron utilizados como controles. Asimismo, se estudiaron estas interacciones con dos cantidades de pADN, 125 y 250 ng. La electroforesis se realizó utilizando un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1X que fue teñido con *Green Safe Premium* (Nyztech, Portugal; 2 µL). Las condiciones de electroforesis fueron 45 minutos a 70V.

Con el fin de confirmar la posible migración del ADN en los complejos formulados se sometió el gel a una segunda tinción con *Green Safe Premium* durante 30 minutos a temperatura ambiente.

8.2. Ensayo de exclusión de SYBR™ Gold por Fluorescencia

El SYBR™ Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen™, EE. UU) es un colorante de cianina asimétrico que al unirse a ácidos nucleicos, experimenta un aumento notable en la emisión de fluorescencia (Molecular Probes, 2006). Por

lo tanto, constituye una herramienta útil para examinar la capacidad que tiene el polímero catiónico (T1P2T5) de condensar el pADN.

Para la realización del ensayo, se prepararon los poliplejos del pADN y T1P2T5 utilizando agua libre de nucleasas (*Ambion® de ThermoFisher*, España) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 3 µL del colorante *SYBR Gold™ 200X* a los complejos y se dejaron incubar durante 10 minutos. Finalmente, se adicionó *HEPES Buffer Solution 10mM (Gibco-ThermoFisher, Reino Unido)* hasta un volumen final de 300 µL.

Las distintas muestras fueron dispuestas en una placa negra de 96 pocillos (*Costar™ Corning Incorporated, EE. UU*) y su fluorescencia fue medida en el espectrofotómetro de placas. Los valores fueron expresados en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) normalizados con respecto a los URF obtenidos con el plásmido libre sin tratar, con el fin de calcular el porcentaje de fluorescencia relativa:

$$\text{Fluorescencia Relativa (\%)} = \frac{\text{URF muestra}}{\text{URF plásmido libre}} \cdot 100$$

El porcentaje de fluorescencia relativa se relaciona inversamente con el nivel de complejación, puesto que el ADN sólo emite fluorescencia en su estado libre, que es cuando se puede unir al colorante. De esta forma, a mayores porcentajes de fluorescencia, menores porcentajes de complejación.

9. Análisis estadístico de los datos

Los valores obtenidos en cada ensayo (n=3) fueron expresados como valor medio \pm desviación estándar (DE), representados en los distintos análisis mediante gráficos de barras o líneas con las correspondientes barras de error.

La comparación de los distintos grupos de ensayo fue realizada mediante análisis factoriales de la varianza (ANOVAs de 1, 2 y 3 vías) en los que se incluyeron como variables dependientes la transfección, la fluorescencia y la viabilidad celular. Para la comprobación de las hipótesis estructurales de los modelos, normalidad y homocedasticidad, se calcularon los residuos y se aplicaron los tests de Shapiro Wilks y Levene, respectivamente.

Por último, la realización de los contrastes múltiples (post-hoc) se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey.

El análisis de los datos se realizó con ayuda de los programas estadísticos R 4.2.0, Rstudio versión 2022.2.2.485 (R Core Team, 2020; RStudio Team, 2022) e IBM SPSS Statistics 28.0. Los gráficos fueron realizados en Microsoft Excel. Se ha trabajado a un 5% de significación, por tanto, p-valores inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) indican contrastes estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

1. Comprobación de la propagación, aislamiento y purificación del pADN

En la Tabla 2 se muestran los valores de concentración, los valores de absorbancia a 260 y 280 nm, así como el cociente de ambos (A260/A280) obtenidos tras la purificación del plásmido pCMV-SPORT-βgal (p*lacZ*) en un bio-espectrofotómetro mediante microgota MySPEC Twin.

Los valores de concentración obtenidos en las muestras ensayadas (n=2) fueron del orden de 1987,784 µg/mL. La relación de absorbancia 260/280 es un buen indicador de contaminación por proteínas de modo que una muestra de ADN tendrá un grado de pureza óptima si su cociente de valores se encuentra entre 1,8 y 2. Asimismo, los valores por encima de 1,6 se consideran de calidad aceptable (Banco Nacional de ADN & Carlos III (Universidad de Salamanca), 2020). Tal y como se puede observar en la Tabla 2 los cocientes obtenidos para las muestras de p*lacZ* presentaron una pureza dentro del rango aceptable.

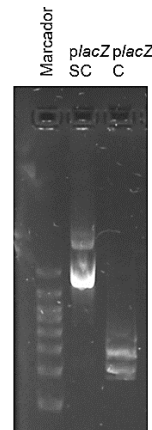
Muestra	[p <i>lacZ</i>] en µg/mL	A (260 nm)	A (280 nm)	A (260/280)
1	1990,244	39,805	24,682	1,613
1.2	1985,323	39,706	25,934	1,531

Tabla 2. Concentración y relación A(260/280) del plásmido utilizado

Los resultados de la electroforesis en el gel de agarosa se muestran en la Figura 5. Se puede observar como el plásmido no digerido (sin cortar; SC) presenta una banda de aproximadamente 7000 pb, que se corresponde con el tamaño completo del ADN plasmídico (7853 pb).

Por otra parte, en el plásmido digerido (cortado; C) se observan dos bandas de 3500 pb y 4350 pb, correspondientes con los valores esperados tras la digestión con *Xba*I y *Sal*I.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pCMV-SPORT-βgal sin cortar (SC) y cortado (C) con las enzimas de restricción, y el marcador de peso molecular.



2. Análisis de la eficiencia de transfección

Para estudiar la eficiencia de transfección del vector polimérico sintetizado se realizaron diferentes ensayos, a lo largo de los cuales se intentó optimizar la formulación en base a los valores de transfección obtenidos con el fin de obtener un vector polimérico con una elevada eficiencia.

En primer lugar, se estudió la concentración óptima de P2 para formar los complejos con sus respectivos controles (P2 y T1). Tal y como se recoge en la Figura 6, la formulación T1P2 con 6 µg/mL dio lugar a una mayor eficiencia de transfección con respecto a las otras formulaciones, cuyas eficiencias

resultaron similares. La cantidad de P2 es objeto de análisis puesto que existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio ensayados ($p=0,04$).

Eficiencia de transfección

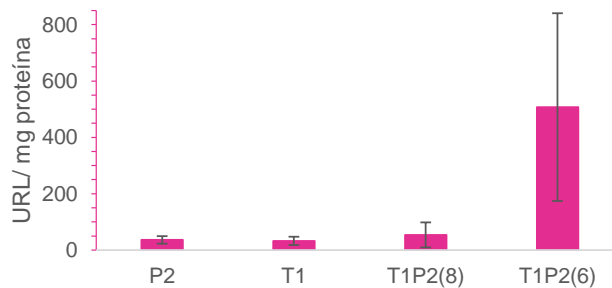


Figura 6. Eficiencia de transfección para los compuestos P2, T1 y T1P2 a diferentes concentraciones (6 ó 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Una vez seleccionada la cantidad de P2 final en el complejo, se examinaron diferentes posibilidades de aldehídos hidrofóbicos para determinar la formulación final del complejo T1P2Tx. Los resultados obtenidos mostraron una interacción significativa entre las variables formulación y relación sobre la capacidad de transfección ($p=2,04\text{e-}06$) (Figura 7).

Tal y como se aprecia en la Figura 7 todas las combinaciones de los aldehídos conllevaron a valores detectables de transfección. Sin embargo, la combinación de aldehído T1T5 para la relación $x_{T5}:0,075$, fue la única que logró obtener en combinación con el polímero (T1P2T5) valores de transfección equivalentes a las formulaciones en las que no estaba presente el polímero ($p=0,88$). De este modo se seleccionó esta relación para ensayos posteriores. Además, la relación de 0,15 fue incluida a modo de comparación.

Se escogió el aldehído T5 por ser el que presenta dentro de los aldehídos alifáticos una estructura más compleja, además de quiralidad.

Eficiencia de transfección

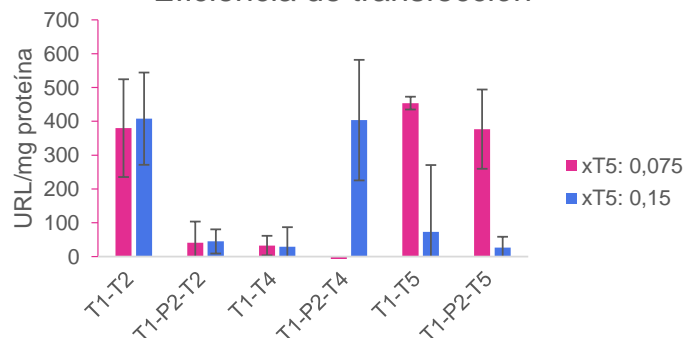


Figura 7. Eficiencia de transfección con diferentes aldehídos hidrofóbicos (T2, T4 y T5).

Una vez seleccionada la formulación T1P2T5 (Figura 8) se realizó un ensayo final de transfección. Este estudio se llevó a cabo con una disolución madre de P2 con concentración 0,1 mM, de forma que la concentración final de P2 en el complejo fue de 0,6 µg/mL. Esta concentración se seleccionó como óptima una vez realizados los ensayos de retardo en gel de agarosa y el de exclusión SYBR Gold™ (ver Figuras 10, 11, 12 y 13; sección 3 de Caracterización del complejo *placZ-T1-P2-T5*).

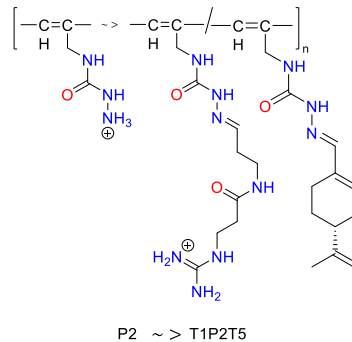


Figura 8. Esquema de la co-funcionalización de P2 para dar lugar al complejo T1P2T5 realizado con el programa ChemDraw.

El ensayo se realizó con dos cantidades diferentes de pADN: 125 ng y 250 ng de pADN (Figura 9).

En la Figura 9 se observa como el incremento de la cantidad de pADN supuso un descenso significativo de la eficiencia de transfección ($p=4,77e-06$). Además, los valores más elevados de transfección fueron obtenidos con la formulación T1T5 (0,15) 1x en ausencia de polímero con 125 ng de pADN, observándose diferencias significativas en todas las comparaciones dos a dos, excepto para la formulación: T1T5 (0,075) 0,25x ($p=0,54$). Sin embargo, para la cantidad de 250 ng de pADN la mayor eficiencia de transfección fue alcanzada con la formulación con el polímero T1P2T5 (0,075) 0,25x, siendo las comparaciones dos a dos únicamente significativas con respecto a las formulaciones: T1P2T5 (0,075) 0,5x, T1T5 (0,075) 0,25x y T1T5 (0,15) 0,5x ($p<0,02$).

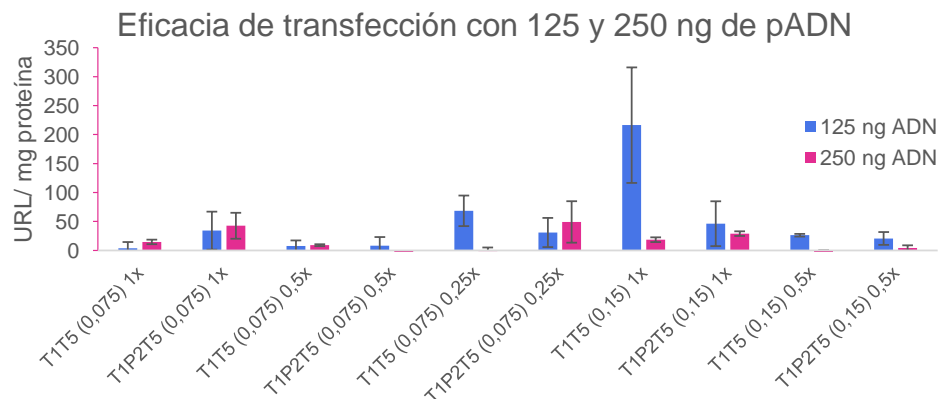


Figura 9. Eficiencia de transfección con T1P2T5 con 125 ng y 250 ng de pADN partiendo de P2 0,1 mM.

Una posible explicación a la baja capacidad de transfección alcanzada podría deberse a las diferentes barreras intracelulares dependientes del tipo celular que los polímeros catiónicos deben superar para lograr acceder a la maquinaria celular para la síntesis de proteínas. De este modo, diversos estudios han descrito que tanto el mecanismo de internalización celular como el transporte intracelular y la entrada en el núcleo condicionan notablemente la eficiencia de transfección de los vectores no virales (Kumar *et al.*, 2021). Asimismo, la superación de cada una de las barreras existentes depende también de la identidad y tamaño del ácido nucleico y del tipo celular.

Otro factor que también hay que tener en cuenta es la longitud del polímero catiónico activado con hidrazona. Priegue y colaboradores estudiaron cómo afectaba la longitud del polímero catiónico a la transferencia del plásmido pGFP en células HeLa, y vieron que las mayores eficiencias de transfección eran alcanzadas con los polímeros más largos (Priegue *et al.*, 2018). Así, los mejores resultados de transfección fueron obtenidos con el aldehído hidrofóbico ácido oleico (C18) a una relación de equivalentes de 0,3.

En este sentido cabe destacar que la línea celular utilizada en este estudio fue de carácter tumoral, siendo diferente a la empleada en el presente trabajo. De este modo se requeriría la realización de un análisis más exhaustivo para comprobar el efecto de la longitud del polímero catiónico activado con hidrazona sobre la transfección de células madre mesenquimales.

Con todo, futuras investigaciones podrían dirigirse hacia el estudio de otros aldehídos hidrofóbicos, así como diferentes relaciones entre sus equivalentes.

3. Caracterización complejo *placZ-T1-P2-T5*

3.1. Ensayo de retardo en gel

En las Figuras 10 y 11 se muestran las electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los complejos de estudio. En los cuatro ensayos se estudiaron las distintas formulaciones con dos cantidades de *placZ* (125 ng y 250 ng) utilizando los factores de dilución 1/1 (1x), 1/2 (0,5x) y 1/4 (0,25x). Dichos factores hacen referencia a la cantidad de P2 final en el complejo, siendo 1x la cantidad óptima seleccionada tras el ensayo de transfección (6 µg/mL), 0,5x la mitad de esa cantidad (3 µg/mL) y, por lo tanto, 0,25x la cuarta parte (1,5 µg/mL).

Asimismo, las formulaciones fueron preparadas utilizando dos concentraciones de la disolución madre de P2 (1mM o 0,1mM) y a dos relaciones distintas de T1/T5, donde x_{T5} puede ser 0,075 y 0,15. Con el fin de evaluar la influencia de los aldehídos en la capacidad de migración del ADN, los ensayos de electroforesis se realizaron también con las formulaciones sin P2 (Figuras 15 y 16 en el Anexo I). En estos ensayos se vio que al disminuir la cantidad de T1T5

se reducía la capacidad de complejación del ADN resultando, por tanto, en una mayor migración del ADN libre.

La reducción de la cantidad de T5, como aldehído hidrofóbico y neutro, supuso una menor protección de las cargas positivas y un menor impedimento estérico para la formación de agregados. De esta forma, las estructuras coloidales no están favorecidas, y con ellas se obtuvo una menor estabilidad y complejación del pADN (Smith *et al.*, 2015).

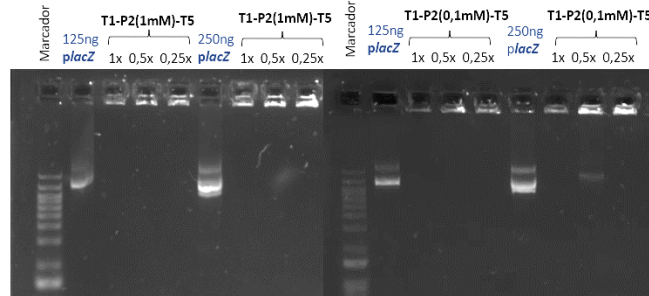


Figura 10. Ensayo de retardo en gel de agarosa al 0,8 % tras la complejación de *placZ* (125 ng *placZ* y 250 ng *placZ*) con las distintas formulaciones preparadas con concentraciones de disolución madre de P2 0,1 mM y 1 mM, a una relación T1/T5 (χ_{T5} :0,075) y factores 1x, 0,5x y 0,25x.

La Figura 10, panel izquierdo, muestra los patrones de migración del ADN de los complejos de T1-P2(1mM)-T5 formados a relación T1/T5 χ_{T5} :0,075, a una concentración de la disolución madre de P2 de 1 mM. Para los tres factores de dilución ensayados y a las dos cantidades de ADN testadas (125 ng y 250 ng) se observó una retención total del ADN en lo pocillos, lo que es indicativo de que la condensación del ADN en los complejos fue muy elevada, impidiendo de esta forma su migración en forma libre. En contra, las bandas observadas para el ADN sin complejar (125 ng *placZ* y 250 ng *placZ*) confirmaron la capacidad de migración del mismo.

Una disminución de la concentración de P2 final en el complejo T1-P2(0,1mM)-T5 (Figura 10; panel derecho) supuso una menor retención del ADN en el pocillo del gel correspondiente a T1-P2(0,1Mm)-T5 con 250 ng de *placZ* y factor de dilución 0,5x, en el que se observó una segunda banda, aunque con una intensidad muy tenue. Del mismo modo que en el caso anterior, el plásmido libre fue capaz de migrar en el gel de agarosa, independientemente de la cantidad ensayada.

En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos con las mismas formulaciones ensayadas en la Figura 10 anterior, pero a una relación T1T5 ($x_{T5}:0,15$).

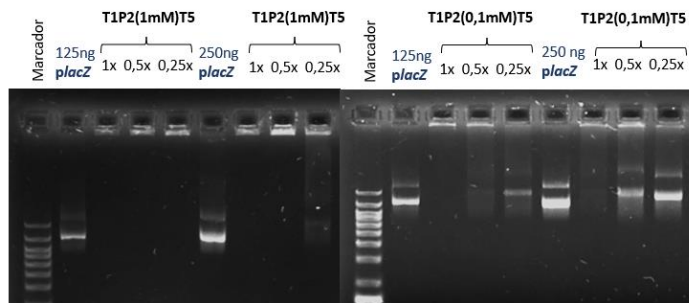


Figura 11. Ensayo de retardo en gel de agarosa al 0,8 % tras la complejación de *placZ* (125 ng *placZ* y 250 ng *placZ*) con las distintas formulaciones preparadas con concentraciones de disolución madre de P2 0,1 mM y 1 mM, a una relación T1/T5 ($x_{T5}:0,15$) y factores de dilución 1x, 0,5x y 0,25x.

Como en el caso anterior, los complejos formulados con una concentración de P2 1 mM mostraron una retención total del *placZ* en los pocillos debido a su elevada capacidad de complejación (Figura 11; panel izquierdo).

En contra, los complejos formulados a concentración de P2 0,1 mM, dieron lugar a distintos patrones de migración de acuerdo con el factor de dilución ensayado (Figura 11; panel derecho). Así, a un factor de dilución 1x, los polímeros promovieron una retención total del ADN, mientras que, la presencia de dos bandas a un factor 0,5x confirmó la migración parcial del mismo. Por último, se observó una migración total de ADN al menor factor de dilución ensayado (0,25x), lo que puede atribuirse a una ausencia de complejación por parte del polímero.

A la vista de estos resultados se pudo concluir que una concentración de la disolución madre de P2 de 0,1 mM es suficiente para que se dé la interacción necesaria con el ADN, puesto que se consigue una retención parcial del pADN. analizaron también la compactación del ADN mediante el ensayo de retardo en gel, y observaron que una retención total del ADN en el complejo llevaba a una reducida capacidad de transfección Mashal *et al.*, 2018; Priegue *et al.*, 2018 , en concordancia con los resultados observados en este estudio.

3.2. Ensayo de Exclusión de SYBR Gold®

El compuesto SYBR Gold es una cianina asimétrica con capacidad de unión al ADN con la propiedad de aumentar notablemente la señal de fluorescencia cuando se une a ácidos nucleicos (Dragan *et al.*, 2012; Uno *et al.*, 2017). De esta forma, este ensayo permite evaluar la capacidad del pADN de unirse a los polímeros a través de las variaciones de fluorescencia obtenidas tras la adición del compuesto fluorescente SYBR Gold™ a los complejos previamente preparados.

Así, en base a los resultados obtenidos de transfección (Figura 7) se decidió estudiar el grado de complejación del plásmido *p/acZ* con las formulaciones de estudio con el fin de valorar su efecto sobre la eficiencia de transferencia génica alcanzada. Para ello, se estudiaron los complejos T1P2T5 y T1T5 bajo las mismas condiciones ensayadas en el estudio de transfección (125 ng pADN; Figura 12 y 250 ng pADN; Figuras 17 y 18 en el Anexo I).

Tal y como se muestra en la Figura 12, el porcentaje de fluorescencia relativa obtenido con ambas relaciones de T1T5 fue menor del 15%, lo que indica que la complejación del pADN fue muy elevada (en torno al 85%). Esta observación podría explicar en parte la baja eficiencia obtenida en los ensayos de transfección, ya que un elevado porcentaje de complejación dificulta la liberación del ADN en el interior celular. Esto se debe a que los poliplejos formados son muy estables y no permiten la liberación del ADN. Por ello, es necesario encontrar un equilibrio entre la estabilidad de los poliplejos y la liberación del ADN (Bono *et al.*, 2019).

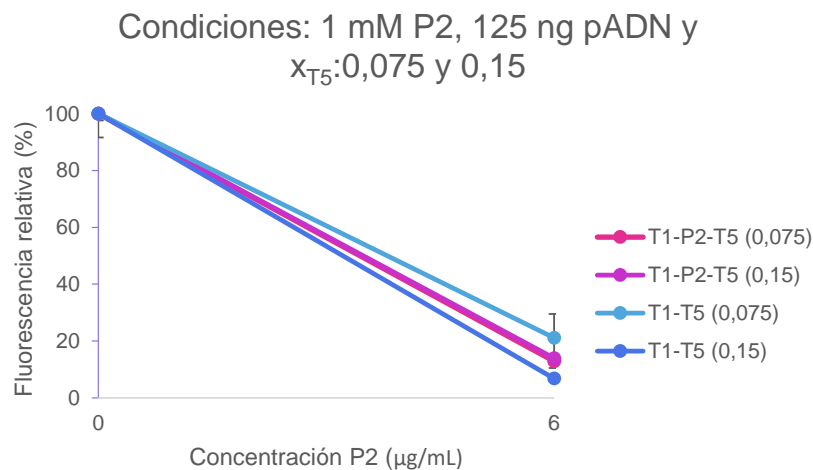


Figura 12. Ensayo de exclusión del SYBR Gold™ para 1 mM P2, 125 ng de pADN y $x_{T5}: 0,075$ y $0,15$.

Asimismo, el ensayo fue repetido con distintas cantidades de P2 (diluciones 0,25x, 0,5x y 1x) con el fin de ver cómo se verían afectados los porcentajes de complejación (125 ng pADN; Figura 13 y 250 ng pADN; Figuras 19 y 20 en el Anexo I).

A medida que se incrementó la cantidad del complejo T1P2T5 (Figura 13) el porcentaje de fluorescencia relativa disminuyó significativamente ($p=2,20e-16$), lo que se tradujo en una mayor capacidad de complejación del pADN.

El mayor porcentaje de complejación alcanzado por el poliplexo con $x_{T5}:0,075$ fue de aproximadamente 75%, mientras que para $x_{T5}:0,15$ fue del 55% ($p=1,88e-12$) (Figura 13). Es decir, a medida que se aumentó la relación de T5, para las mismas condiciones, se obtuvo una menor capacidad de complejación y, por lo tanto, un mayor porcentaje de fluorescencia relativa. Estas observaciones concuerdan con los resultados mostrados en la Figura 9, en donde se puede ver la mayor transfección obtenida con la relación $x_{T5}:0,075$ del complejo p/lacZ-T1P2T5 .

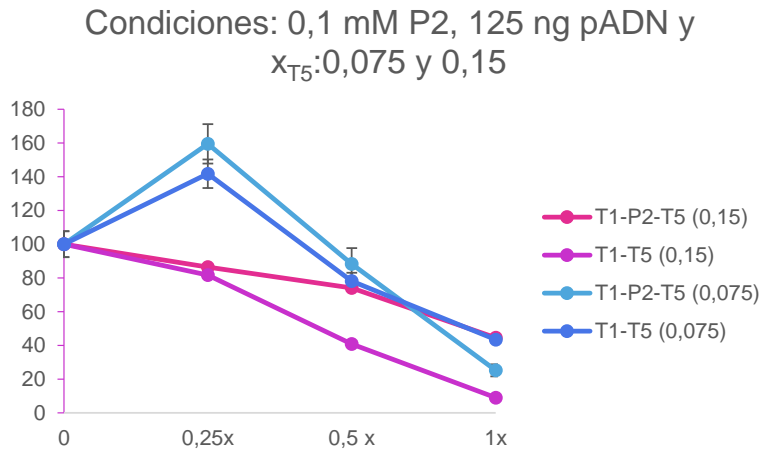


Figura 13. Ensayo de exclusión del SYBR Gold™ para 0,1 mM P2, 125 ng de pADN y $x_{T5}:0,075$ y 0,15.

4. Análisis de la viabilidad celular

Uno de los principales objetivos a la hora de diseñar vectores no virales es que presenten una baja toxicidad, por ello, analizar la viabilidad celular tras la transfección con los complejos es un punto clave en la investigación.

En primer lugar, se realizó un ensayo con los diferentes disolventes utilizados, ácido acético 100 mM (AcOH 100 mM), agua a pH 5 (H₂O pH 5) y dimetilsulfóxido (DMSO), en la síntesis del compuesto para comprobar su citotoxicidad. Como se puede ver en la Figura 14, todos los disolventes dieron lugar a porcentajes elevados de supervivencia celular (>90%) sin diferencias significativas entre ellos ($p=0,43$).

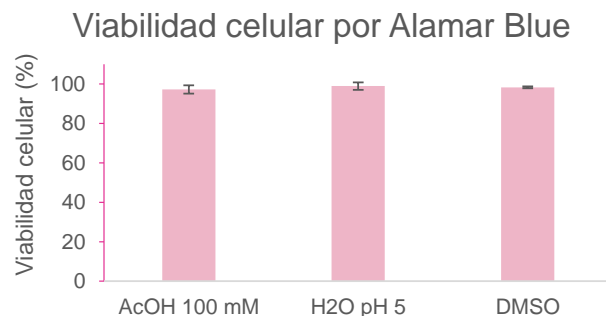


Figura 14. Viabilidad celular en presencia de los diferentes disolventes.

Del mismo modo, los análisis de viabilidad celular asociados a los ensayos de transfección mostraron porcentajes de viabilidad celular superior al 90%. Además, los elevados valores de supervivencia celular alcanzados en todos los casos no mostraron una interacción entre el tipo de formulación y el polímero ($p=0,26$). La formulación hace referencia a las distintas combinaciones ensayadas: T1, P2, T1P2, mientras que la cantidad de polímero indica la concentración final de P2 en el complejo T1P2: 6 ó 8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21 en el Anexo I).

De la misma forma, se observaron interacciones significativas en la viabilidad celular asociada a las diferentes formulaciones de aldehídos ensayadas (T1P2T2, T1P2T4, T1P2T5 y sus respectivas formulaciones sin P2) con la relación T1Tx ($\chi_{T5}:0,075$ y $\chi_{T5}:0,15$) (Figuras 22 y 23 en el Anexo I) ($p<0,05$).

A pesar de su elevada eficiencia como agente transfectante, diversos estudios han descrito altos niveles de citotoxicidad asociados al reactivo comercial Lipofectamina (al Qtaish *et al.*, 2020) (Carballo-Pedrares *et al.*, 2021). En las condiciones ensayadas en el presente trabajo no se observó una reducción del porcentaje de viabilidad de las iMSCs en presencia de Lipofectamina. Las discrepancias observadas en este estudio con respecto a la bibliografía previa podrían deberse a los diferentes tiempos de incubación estudiados (24 horas frente a las 48 horas ensayadas por Carballo- Pedrares y colaboradores) (Carballo-Pedrares *et al.*, 2021). De este modo, un mayor tiempo de incubación con el reactivo comercial podría dar lugar a una reducción significativa de la viabilidad de iMSCs. Otra posible explicación a estas diferencias podría deberse al principio del ensayo utilizado para medir la viabilidad celular, así estudios previos han descrito una reducida sensibilidad del reactivo Alamar Blue en determinadas líneas celulares (Rampersad, 2012).

Conclusiones

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- El aldehído hidrofóbico L-perillaldehído (T5) dio lugar a los valores más altos de transfección entre todos los aldehídos ensayados; de esta forma la formulación final seleccionada fue T1P2T5.
- Los ensayos de electroforesis en gel de agarosa y de exclusión del SYBR Gold™ mostraron que tanto la concentración inicial de polímero (0,1 o 1 mM) como el factor de dilución empleado (0,25x, 0,5x y 1x) afectan de manera significativa a la capacidad de complejación y liberación del pADN de las distintas formulaciones de polímero.
- Todas las formulaciones estudiadas promovieron valores elevados de supervivencia celular independientemente del aldehído utilizado.

Con el fin de incrementar la eficiencia de transfección de las formulaciones desarrolladas, futuras investigaciones podrían centrarse en la utilización de otros aldehídos hidrofóbicos, como el ácido oleico, ya estudiado por otros autores, así como la posibilidad de aumentar la relación del mismo en la

formulación final. Asimismo, con el fin de obtener el equilibrio óptimo entre capacidad de complejación y transfección se podrían utilizar otros plásmidos de ADN de menor tamaño.

Conclusións

Cos resultados obtidos neste traballo pódese concluír que:

- O aldehído hidrofóbico L-perillaldehído (T5) deu lugar ós mellores resultados de transfección entre tódolos aldehídos ensaiados; desta forma, a formulación final seleccionada foi T1P2T5.
- Os ensaios de electroforesis en xel de agarosa e de exclusión do SYBR Gold™ mostraron que tanto a concentración inicial do polímero (0,1 ou 1 mM) como o factor de dilución empregado (0,25x, 0,5x e 1x) afectan de maneira significativa á capacidade de complexación e liberación do pADN das distintas formulacións do polímero.
- Tódalas formulacións estudadas promoveron valores elevados de supervivenza celular independentemente do aldehído utilizado.

Co fin de incrementar a eficiencia de transfección das formulacións desenroladas, futuras investigación poderían centrarse na utilización de outros aldehídos hidrofóbicos, como o ácido oleico, xa estudado por outros autores, así como a posibilidade de aumentar a relación do mesmo na formulación final. Asemesmo, co fin de obter un equilibrio óptimo entre a capacidade de complexación e transfección poderíanse utilizar outros plásmidos de ADN de menor tamaño.

Conclusions

According to the results obtained in this work, it can be concluded that:

- The hydrophobic aldehyde L-perillaldehyde (T5) promoted the best transfection results among all aldehydes tested; thus, the final formulation selected was T1P2T5.
- Agarose gel electrophoresis and SYBR Gold™ exclusion assays showed that both of the initial polymer concentration (0,1 or 1 mM) and the dilution factor employed (0,25x, 0,5x and 1x) significantly affect the pDNA complexation and release capacity of the different polymer formulations.
- All the formulations studied promoted high cell survival values regardless of the aldehyde used.

In order to increase the transfection efficiency of the developed formulations, future research could focus on the use of other hydrophobic aldehydes, such as oleic acid, already studied by other authors. As well as the possibility of increasing the ratio of the aldehyde in the final formulation. Also, to obtain the optimal balance between complexation and transfection capacity, other smaller DNA plasmids could be used.

Bibliografía

- al Qtaish, N., Gallego, I., Villate-Beitia, I., Sainz-Ramos, M., López-Méndez, T. B., Grijalvo, S., Eritja, R., Soto-Sánchez, C., Martínez-Navarrete, G., Fernández, E., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2020). Niosome-based approach for in situ gene delivery to retina and brain cortex as immune-privileged tissues. In *Pharmaceutics* 12(3), 198. MDPI AG. doi:10.3390/pharmaceutics12030198
- Amorin, B., Alegretti, A. P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A. M., da Silva, M. A. L., Wieck, A., & Silla, L. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Human Cell*, 27(4), 137–150. doi:10.1007/s13577-014-0095-x
- Banco Nacional de ADN, & Carlos III (Universidad de Salamanca). (2020). Programa control de calidad de muestras de ADN y ARN. Banco Nacional de ADN. www.bancoadn.org
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 18(3), e264–e277. doi:10.18295/squmj.2018.18.03.002
- Bono, N., Pennetta, C., Bellucci, M. C., Sganappa, A., Malloggi, C., Tedeschi, G., Candiani, G., & Volonterio, A. (2019). Role of Generation on Successful DNA Delivery of PAMAM-(Guanidino)Neomycin Conjugates. *ACS Omega*, 4(4), 6796–6807. doi:10.1021/acsomega.8b02757
- Bono, N., Ponti, F., Mantovani, D., & Candiani, G. (2020). Non-viral in vitro gene delivery: It is now time to set the bar! *Pharmaceutics* 12(2), 183, 1-23. MDPI AG. doi:10.3390/pharmaceutics12020183
- Carballo-Pedrares, N., Kattar, A., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Rey-Rico, A. (2021). Niosomes-based gene delivery systems for effective transfection of human mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering C*, 128, 1-12. doi:10.1016/j.msec.2021.112307
- Cucchiari, M., & Rey-Rico, A. (2017). Controlled Gene Delivery Systems for Articular Cartilage Repair. *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications* 66, 261–300. doi:10.1007/978-981-10-3328-5_7
- Dimmeler, S., & Leri, A. (2008). Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. In *Circulation Research* 102(11), 1319–1330. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.175943
- Dominici, M., le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.

- The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., Schenerman, M. A., & Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, 22(4), 1189–1199. doi:10.1007/s10895-012-1059-8
- Hanauer, M., Pierrat, S., Zins, I., Lotz, A., & Sönnichsen, C. (2007). Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape. *Nano Letters*, 7(9), 2881–2885. doi:10.1021/nl071615y
- Juanes, M., Creese, O., Fernández-Trillo, P., & Montenegro, J. (2019). Messenger RNA delivery by hydrazone-activated polymers. *MedChemComm*, 10(7), 1138–1144. doi:10.1039/c9md00231f
- Kumar, R., Santa Chalarca, C. F., Bockman, M. R., Bruggen, C. van, Grimme, C. J., Dalal, R. J., Hanson, M. G., Hexum, J. K., & Reineke, T. M. (2021). Polymeric Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. *Chemical Reviews* 121(18), 11527–11652. American Chemical Society. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00997
- Mashal, M., Attia, N., Soto-Sánchez, C., Martínez-Navarrete, G., Fernández, E., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2018). Non-viral vectors based on cationic niosomes as efficient gene delivery vehicles to central nervous system cells into the brain. *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1–2), 48–55. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.09.038
- Molecular Probes, I. (2006). *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain | 2 A B*.
- Oggü, 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. In *Stem Cell Reviews and Reports* 13(6), 725–740. Humana Press Inc. doi:10.1007/s12015-017-9760-2
- Pawitan, J. A., Bui, T. A., Mubarak, W., Antarianto, R. D., Nurhayati, R. W., Dilogo, I. H., & Oceandy, D. (2020). Enhancement of the Therapeutic Capacity of Mesenchymal Stem Cells by Genetic Modification: A Systematic Review. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 1-14. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fcell.2020.587776
- Piñeiro-Ramil, M., Castro-Viñuelas, R., Sanjurjo-Rodríguez, C., Rodríguez-Fernández, S., Hermida-Gómez, T., Blanco-García, F. J., Fuentes-Boquete, I., & Díaz-Prado, S. (2020). Immortalizing Mesenchymal Stromal Cells from Aged Donors while Keeping Their Essential Features. *Stem Cells International*, 1-24. doi:10.1155/2020/5726947

- Priegue, J. M., Lostalé-Seijo, I., Crisan, D., Granja, J. R., Fernández-Trillo, F., & Montenegro, J. (2018). Different-Length Hydrazone Activated Polymers for Plasmid DNA Condensation and Cellular Transfection. *Biomacromolecules*, 19(7), 2638–2649. doi:10.1021/acs.biomac.8b00252
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: www.Rproject.org/
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. doi:10.3390/s120912347
- Real Academia de Ingeniería*. (2022, Abril 13). diccionario.raing.es
- RStudio Team (2022). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL: www.rstudio.com/
- Smith, R. J., Beck, R. W., & Prevette, L. E. (2015). Impact of molecular weight and degree of conjugation on the thermodynamics of DNA complexation and stability of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biophysical Chemistry*, 203–204, 12–21. doi:10.1016/j.bpc.2015.04.005
- Sociedad Española de Terapia Génica y Celular*. (2022, Mayo 10). URL: www.setgyc.es/
- Uno, K., Sasaki, T., Sugimoto, N., Ito, H., Nishihara, T., Hagihara, S., Higashiyama, T., Sasaki, N., Sato, Y., & Itami, K. (2017). Key Structural Elements of Unsymmetrical Cyanine Dyes for Highly Sensitive Fluorescence Turn-On DNA Probes. *Chemistry - An Asian Journal*, 12(2), 233–238. doi:10.1002/asia.201601430
- Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolte, J., Phinney, D. G., & Sensebe, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, 21(10), 1019–1024. doi:10.1016/j.jcyt.2019.08.002
- Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS Journal* 23(4), 78. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. doi:10.1208/s12248-021-00608-7

Anexo I

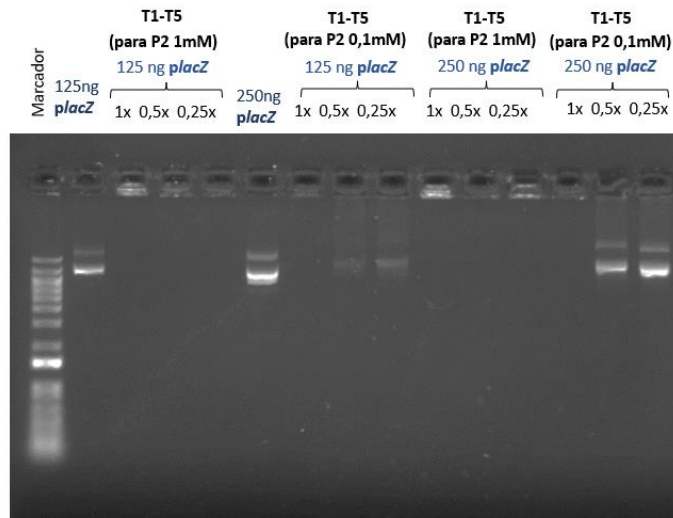


Figura 15. Ensayo de retardo en gel de agarosa al 0,8 % tras la complejación de *placZ* (125 ng *placZ* y 250 ng *placZ*) con las distintas formulaciones preparadas con concentraciones de disolución madre de P2 0,1 mM y 1 mM, a una relación T1/T5 ($x_{T5}:0,075$) y factores de dilución 1x, 0,5x y 0,25x.

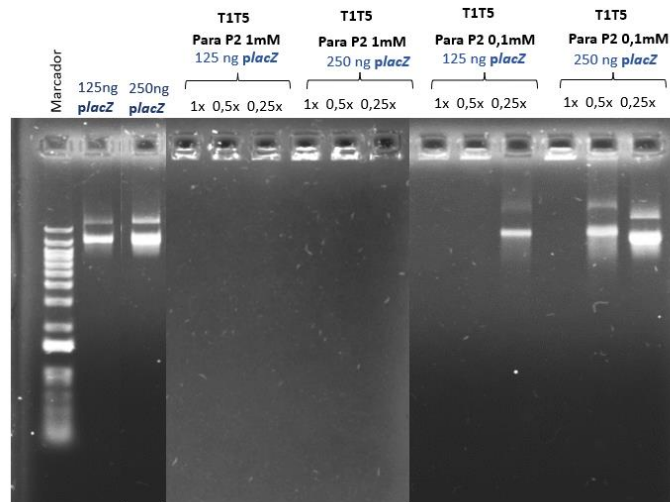


Figura 16. Ensayo de retardo en gel de agarosa al 0,8 % tras la complejación de *placZ* (125 ng *placZ* y 250 ng *placZ*) con las distintas formulaciones preparadas con concentraciones de disolución madre de P2 0,1 mM y 1 mM, a una relación T1/T5 ($x_{T5}:0,15$) y factores de dilución 1x, 0,5x y 0,25x.

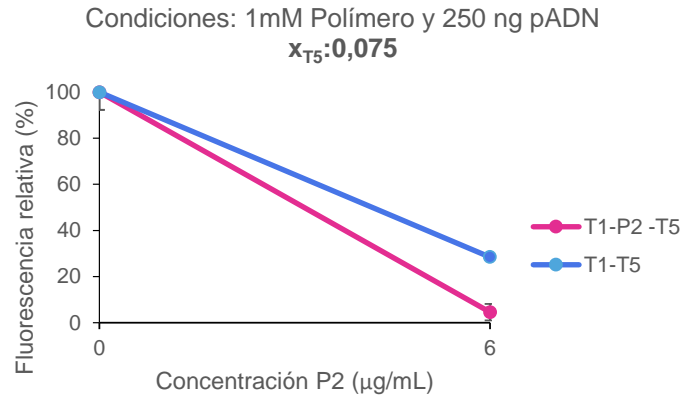


Figura 17. Ensayo de exclusión del SYBR Gold™ para 1 mM P2, 250 ng de pADN y $x_{T5}:0,075$.

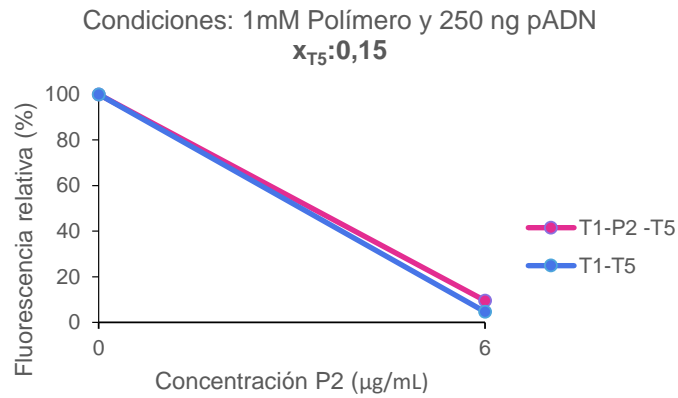


Figura 18. Ensayo de exclusión del SYBR Gold™ para 1 mM P2, 250 ng de pADN y $x_{T5}:0,15$.

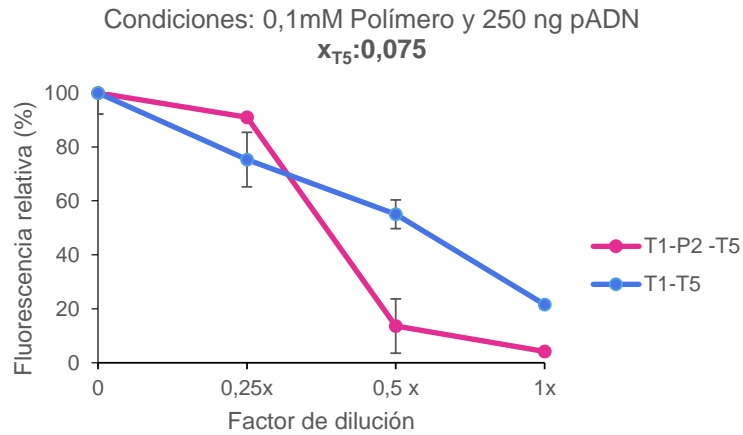


Figura 19. Ensayo de exclusión del SYBR Gold™ para 0,1 mM P2, 250 ng de pADN y $x_{T5}:0,075$.

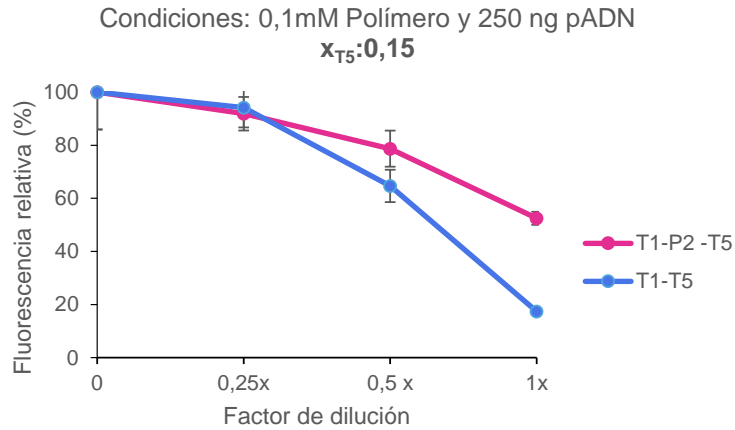


Figura 20. Ensayo de exclusión del SYBR Gold™ para 0,1 mM P2, 250 ng de pADN y $x_{T5}:0,15$.

Viabilidad celular por Alamar Blue

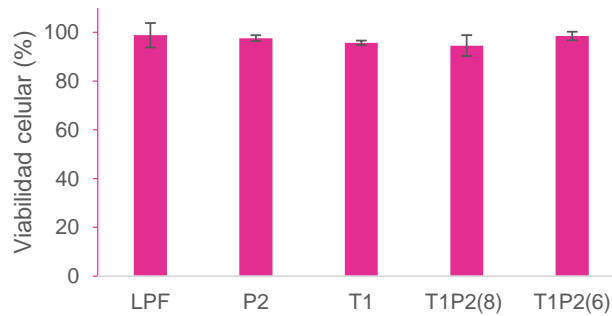


Figura 21. Viabilidad celular a las 24 horas de las transfección con los complejos T1P2 formulados con diferentes cantidades de P2 (6 ó 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de sus correspondientes controles.

Análisis de la viabilidad por Alamar Blue

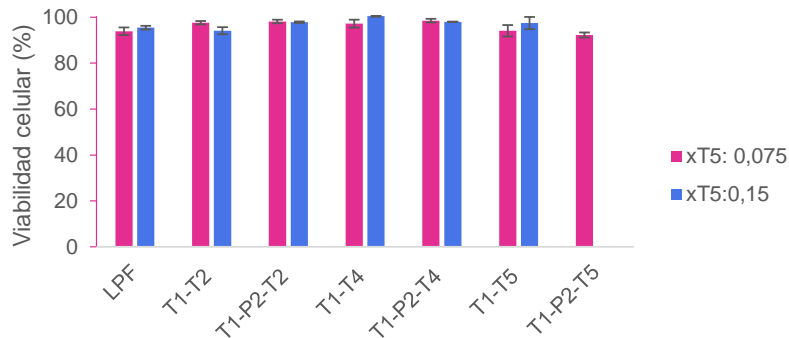


Figura 22. Viabilidad celular a las 24 horas de las transfección con los complejos T1P2T5 formulados con diferentes aldehídos hidrofóbicos (T2: hexanal, T4: benzaldehído y T5: L-perilaldehído) y de sus correspondientes controles sin polímero.

Viabilidad celular con distintas cantidades de pADN

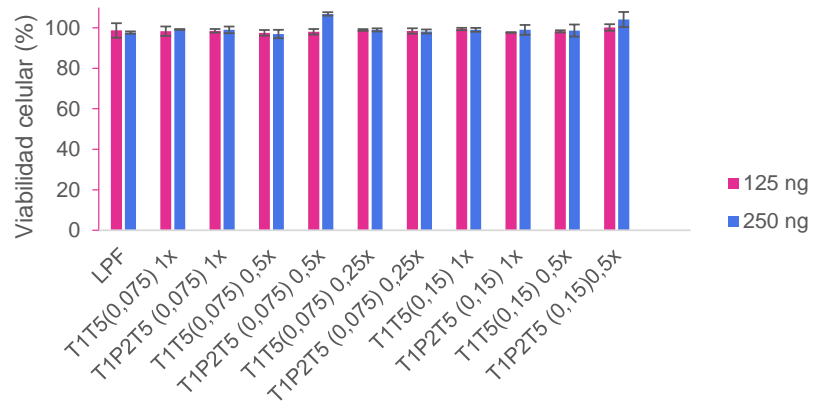


Figura 23. Viabilidad celular a las 24 horas de la transfección con los complejos T1P2T5 ensayados a diferentes factores de dilución (0,25x, 0,5x y 1x) y relaciones T1T5 (x_{T5} : 0,075 o x_{T5} : 0,15).