



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**MÁSTER EN: ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2021-2022

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Sistemas no virales basados en niosomas
como nuevas herramientas para la
transferencia génica de células senescentes**

María Eugenia Martínez Quintana

20 Julio del 2022

Declaración

El presente Trabajo de Fin de Máster, de título “Sistemas no virales basados en niosomas como nuevas herramientas para la transferencia génica de células senescentes” se ha realizado en un marco colaborativo entre el Centro de Investigación Avanzadas de A Coruña (CICA) de la Universidade da Coruña (UDC) y el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

Ambos directores, Ana Rey Rico y Juan Fafián Labora, autorizan a la presentación de este trabajo de fin de máster por María Eugenia Martínez Quintana para ser defendido el día 27 de julio de 2022 ante el tribunal calificador correspondiente.

Índice

Resumen	V
Resumo	VII
Abstract	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Células madre mesenquimales.....	1
1.2 Senescencia.....	2
1.3 Medicina regenerativa basada en hUC-MSCs.....	5
1.4 Niosomas	6
2. Objetivos	8
3. Materiales y métodos	8
3.1 Aislamiento de células madre mesenquimales procedentes del estroma de cordón umbilical humano.	8
3.2 Cultivo de hUC-MSCs procedentes del estroma de cordón umbilical humano	10
3.3 Desarrollo del modelo de senescencia	10
3.4 Evaluación de la capacidad de proliferación empleando la tinción cristal violeta	11
3.5 Extracción de ARN.....	11
3.6 Obtención de ADNc (ADN complementario).....	12
3.7 Realización de PCR cuantitativa (qPCR).....	13
3.8 Aislamiento y purificación del ADN plasmídico conteniendo el gen luciferasa.....	13
3.8.1 Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pGL4.14[luc2/Hygro]	14
3.9 Producción de las formulaciones de niosomas.....	15
3.10 Caracterización de niosomas.....	16
3.10.1 Determinación del tamaño de los niosomas mediante Dynamic Light Scattering (DLS).....	16
3.10.2 Análisis de potencial Z de los niosomas mediante Electrophoretic Light Scattering (ELS)	16
3.11 Generación de los nioplejos.....	16
3.11.1 Caracterización de nioplejos	17
3.12 Transfección de células senescentes y no senescentes	19
3.13 Evaluación de la viabilidad celular	20

3.14 Evaluación de la eficiencia de transfección	21
3.14.1 Ensayo luciferasa	21
3.14.2 Ensayo de proteínas BCA.....	22
3.15 Análisis estadístico.....	24
4. Resultados y discusión	24
4.1 Determinación de la concentración del plásmido pGL4.14[luc2/Hygro]	24
4.2 Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pGL4.14[luc2/Hygro].....	24
4.3 Caracterización de MSCs	25
4.3.1 Evaluación morfológica de las MSCs aisladas de estroma de cordón umbilical	25
4.4 Evaluación de la inducción de senescencia celular.....	26
4.4.1 Medida de la capacidad de proliferación celular mediante tinción cristal violeta	26
4.4.2 Evaluación de la expresión de marcadores de senescencia empleando qPCR	27
4.5 Caracterización de niosomas y nioplejos.....	28
4.5.1 Medición del tamaño y carga de niosomas.....	28
4.5.2 Ensayo de protección frente a la ADNasa	29
4.5.3 Ensayo de exclusión de SYBR™ Gold	30
4.6 Evaluación de la viabilidad de hUC-MSCs	32
4.7 Evaluación de la eficiencia de transfección de hUC-MSCs.....	34
4. Conclusiones.....	39
5. Agradecimientos	40
6. Bibliografía	41

Resumen

El envejecimiento consiste en un proceso complejo que se caracteriza por la acumulación de células senescentes en los tejidos y órganos, produciendo el deterioro del funcionamiento del organismo con la edad. La senescencia celular es un proceso causado por un daño permanente en el ADN que conlleva a la pérdida de la capacidad de proliferación celular y que se asocia con enfermedades relacionadas con la edad como la osteoartritis. Con ello, hay un creciente interés en la formulación de modelos de células senescentes *in vitro* como medio para investigar nuevas dianas terapéuticas enfocadas a desarrollar tratamientos más eficaces para estas patologías. En concreto, la terapia génica de células madre mesenquimales (MSC) ha surgido como una herramienta prometedora para aumentar el potencial terapéutico de esta población celular. En los últimos años, se han estudiado diversos vectores basados en sistemas virales y no virales para la transferencia de genes terapéuticos. Sin embargo, la elevada citotoxicidad de estos vectores sumada a la alta sensibilidad de las células senescentes limita su utilización con fines de investigación biomédica. Con objeto de superar estas limitaciones, se han desarrollado los niosomas, vectores no virales autoensamblados con un rendimiento prometedor para la entrega de genes en comparación con los más ampliamente estudiados, liposomas.

De este modo, el objetivo del presente estudio fue desarrollar vehículos de administración de genes basados en niosomas en MSCs senescentes aisladas del estroma de cordón umbilical (hUC-MSCs). Para ello, se desarrolló un modelo de senescencia basado en el empleo del fármaco inhibidor de Cdk4/6, Palbociclib sobre las hUC-MSCs. Se prepararon dos formulaciones de niosomas conteniendo 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) como lípido catiónico, colesterol o escualeno como lípido auxiliar y polisorbato 60 y poloxámero como tensioactivos no iónicos. La eficiencia de transfección y perfil citotóxico de los niosomas complejados con el plásmido pGL4.14[luc2/Hygro] conteniendo el gen reportero luciferasa fue analizada en hUC-MSCs

(senescentes y no senescentes) y comparada con las obtenidas con el liposoma comercial Lipofectamina. Los resultados obtenidos mostraron que los complejos niosoma-plásmido (nioplejos) presentaron características fisicoquímicas apropiadas para la transfección celular de hUC-MSCs senescentes y no senescentes, siendo los nioplejos de colesterol formados a relación DOTMA/pADN de 5 los más eficientes. Además, ninguna de las formulaciones desarrolladas resultó citotóxica como vehículo de transfección de hUC-MSCs.

Resumo

O envellecemento consiste nun proceso complexo que se caracteriza pola acumulación de células senescentes nos tecidos e órganos, producindo a deterioración do funcionamento do organismo coa idade. A senescencia celular é un proceso causado por un dano permanente no ADN que conleva á perda da capacidade de proliferación celular e que se asocia con enfermidades relacionadas coa idade como a osteoartritis. Con iso, hai un crecente interese na formulación de modelos de células senescentes in vitro como medio para investigar novas dianas terapéuticas enfocadas a desenvolver tratamentos máis eficaces para estas patoloxías. En concreto, a terapia xénica de células nai mesenquimais (MSC) xurdiu como unha ferramenta prometedora para aumentar o potencial terapéutico desta poboación celular. Nos últimos anos, estudáronse diversos vectores baseados en sistemas virais e non virais para a transferencia de xenes terapéuticos. Con todo, a elevada citotoxicidade destes vectores sumada á alta sensibilidade das células senescentes limita a súa utilización con fins de investigación biomédica. Con obxecto de superar estas limitacións desenvolvéronse os niosomas, vectores non virais autoensamblados cun rendemento prometedor para a entrega de xenes, en comparación cos máis amplamente estudados, liposomas. Deste xeito, o obxectivo do presente estudo foi desenvolver vehículos de administración de xenes baseados en niosomas en MSCs senescentes illadas do estroma de cordón umbilical (hUC-MSCs). Para iso, desenvolveuse un modelo de senescencia baseado no emprego do fármaco inhibidor de Cdk4/6, Palbociclib sobre as hUC-MSCs. Preparáronse dúas formulacións de niosomas contendo 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) como lípido catiónico, colesterol ou escualeno como lípido auxiliar e polisorbato 60 e poloxámero como tensioactivos non iónicos. A eficiencia de transfección e perfil citotóxico dos niosomas complexados co plásmido pGL4.14[luc2/Hygro] contendo o xene reporteiro luciferasa foi analizada en hUC-MSCs (senescentes e non senescentes) e comparada coas obtidas co liposoma comercial Lipofectamina. Os resultados obtidos mostraron que os

complexos niosoma-plásmido (nioplexos) presentaron características fisicoquímicas apropiadas para a transfección celular de hUC-MSCs senescentes e non senescentes, sendo os nioplexos de colesterol formados á relación DOTMA/pADN de 5 os máis eficientes. Ademais, ningunha das formulacións desenvolvidas resultou citotóxica como vehículo de transfección de hUC-MSCs.

Abstract

Aging consists of a complex process characterized by the accumulation of senescent cells in tissues and organs, causing the deterioration of the functioning of the organism with age. Cellular senescence is a process caused by permanent DNA damage that leads to loss of cell proliferation capacity and is associated with age-related diseases such as osteoarthritis. With this, there is a growing interest in the formulation of senescent cell models *in vitro* as a means to investigate new therapeutic targets focused on developing more effective treatments for these pathologies. Specifically, mesenchymal stem cell (MSCs) gene therapy has emerged as a promising tool to increase the therapeutic potential of this cell population. In recent years, various vectors have been studied for the transfer of therapeutic genes based on viral and non-viral systems. However, the high cytotoxicity of these vectors added to the high sensitivity of senescent cells limits their use for biomedical research purposes. In order to overcome these limitations, niosomes have been developed, being non-viral self-assembled vectors with promising performance for gene delivery compared to the most widely studied, liposomes.

Thus, the aim of the present study was to develop niosome-based gene delivery vehicles in senescent MSCs isolated from the umbilical cord stroma (hUC-MSCs). To this end, a senescence model was developed based on the use of the Cdks4/6 inhibitor drug, Palbociclib, on hUC-MSCs. Two niosome formulations containing 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonio propane (DOTMA) as cationic lipid, cholesterol or squalene as auxiliary lipid, and polysorbate 60 and poloxamer as nonionic surfactants were prepared. The transfection efficiency and cytotoxic profile of the niosomes complexed with the plasmid pGL4.14[luc2/Hygro] containing the luciferase reporter gene was analyzed in hUC-MSCs (senescent and non-senescent) and compared with those obtained with the commercial liposome Lipofectamine. The results obtained showed that the niosome-plasmid complexes (nioplexes) presented appropriate physicochemical features for transfection of senescent and non-senescent hUC-MSCs, with cholesterol

nioplexes formed at a DOTMA/pDNA ratio of 5 being the most efficient. In addition, none of the formulations developed were cytotoxic as transfection vehicles for hUC-MSCs.

1. Introducción

1.1 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs, del inglés, *human mesenchymal stem cells*,) son células no hematopoyéticas capaces de autorrenovarse y diferenciarse en varios linajes de origen mesodérmico (1). Aunque la médula ósea es la fuente más ampliamente reconocida de MSCs, existen otras fuentes alternativas de MSCs tales como cordón umbilical, pulpa dental, sangre periférica, tejido adiposo o membrana sinovial, entre otras. De hecho, la evidencia sugiere que las MSCs pueden estar presentes prácticamente en cualquier tejido vascularizado (2).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular formuló en 2006 tres criterios mínimos para la caracterización uniforme de las MSCs, como la adherencia al plástico, el potencial de diferenciación a los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (3), así como la presencia de antígenos mesenquimales de superficie celular CD105, CD73, CD90 y la ausencia de marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR (Figura 1) (4).

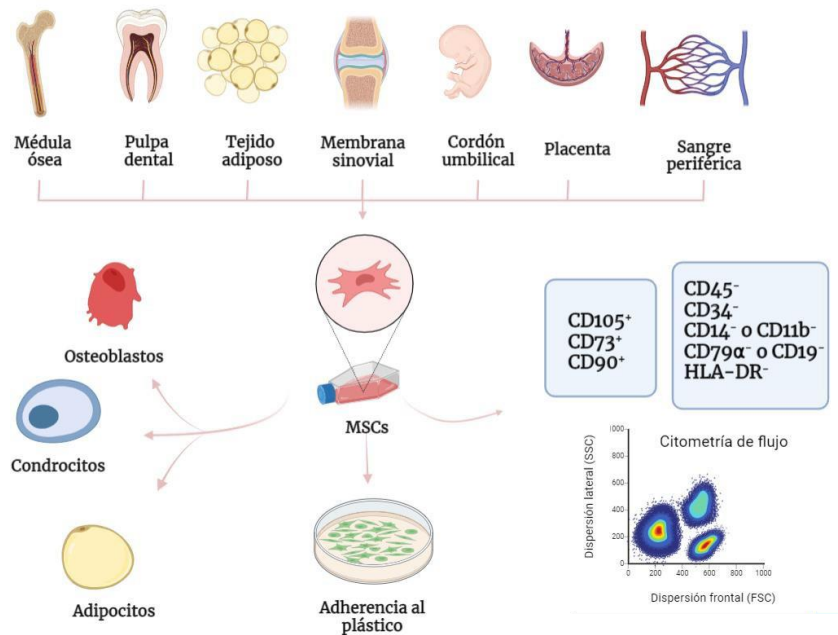


Figura 1. Origen y caracterización de MSCs. (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

Además de su potencial de diferenciación, las hMSCs tienen una notable capacidad de modular la respuesta inmune, una actividad conocida generalmente como inmunomodulación o inmunorregulación (**Figura 2**) (5).

Dicha capacidad inmunomoduladora, sumada a sus propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas así como su multipotencia y efecto paracrinos, convierten a las MSCs en una población celular clave para terapia celular. En la última década se han utilizado clínicamente para tratar una gran variedad de trastornos traumáticos, degenerativos y enfermedades autoinmunes (6).

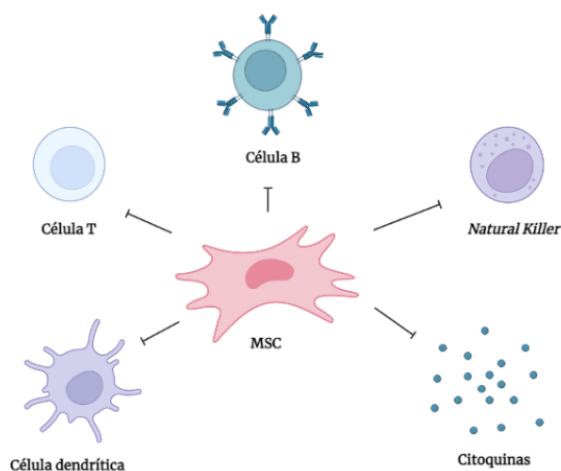


Figura 2. Supresión proliferativa de células inmunitarias innatas y adaptativas por parte de las MSCs. (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

1.2 Senescencia

La edad avanzada se ha convertido en el principal factor de riesgo de enfermedades crónicas de alta prevalencia, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las neurodegenerativas (7). El envejecimiento es un proceso complejo que resulta de la acumulación de alteraciones moleculares y celulares tales como inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, disfunción metabólica, disfunción mitocondrial, senescencia celular, disminución de la capacidad de renovación de las células madre y comunicaciones intercelulares alteradas (8).

La senescencia celular se caracteriza por la detención permanente del ciclo celular con resistencia a la muerte celular por necrosis, apoptosis o autofagia (8). El proceso de senescencia se asocia a la remodelación de los tejidos durante el

desarrollo y después de una lesión, pero también puede contribuir a la disminución del potencial regenerativo y de la función de los tejidos, así como a la inflamación y a la generación de tumores en organismos envejecidos. Por lo tanto, la identificación, caracterización y eliminación farmacológica de las células senescentes ha ganado especial atención en el campo de la investigación del envejecimiento (9).

La activación de las vías de respuesta al daño del ADN (*DDR*, del inglés, *DNA Damage Response*) está involucrada tanto en la inducción como en el mantenimiento de la senescencia. De esta manera, la senescencia celular puede considerarse como una activación permanente de respuesta al daño del ADN (1). Cualquiera que sea la señal inductiva, la senescencia está controlada principalmente por las vías de señalización p53/p21 y p16INK4A/pRB (8) en las que pRb y p53 activan los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (2A y 1A) (p16 y p21, respectivamente). Estas vías pueden actuar entre sí y cooperar para inducir la senescencia (1).

Aunque tradicionalmente se considera que la detención irreversible del ciclo celular es la principal característica de las células senescentes, estudios recientes han revelado algunas funciones adicionales. En este sentido, una de las características más notables es el aumento de la secreción de diversas proteínas secretoras (citocinas, quimiocinas proinflamatorias, proteasas y factores de crecimiento), mediadores lipídicos y vesículas extracelulares (10) denominado fenotipo asociado al secretoma de las células senescentes (*SASP*, del inglés, *senescence-associated secretory phenotype*), con potentes actividades autocrinas y paracrinas (1), contribuyendo a la alteración del microambiente tisular y a la pérdida de la homeostasis tisular (11).

Además, las MSCs senescentes se caracterizan por cambios fenotípicos distintivos, que incluyen morfología celular aplanada y agrandada, mayor número de fibras de estrés y mayor número de focos γ H2AX y de heterocromatina asociados a la senescencia (*SAHF*, del inglés, *senescence-associated heterochromatin foci*) (12). Las MSCs senescentes exhiben además una alta actividad lisosomal, determinada por la detección de la actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia (*SA- β -gal*) (1), acortamiento de los telómeros,

alteraciones epigenéticas, deterioro del potencial de diferenciación y disminución de la capacidad de proliferación (**Figura 3**) (13).

En cuanto a la comunicación entre células senescentes existen diversos mecanismos entre los que destacan el contacto directo célula-célula, la fusión celular, la formación de puentes citoplasmáticos, la formación de vesículas extracelulares (EV), y a través del SASP (14).

La senescencia contribuye a la aparición de patologías relacionadas con la edad como el cáncer, la diabetes tipo II (15), los trastornos renales o del tracto urinario (16), las enfermedades musculoesqueléticas, neurodegenerativas y cardiovasculares (17), la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (18), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, del inglés, *non-alcoholic fatty liver disease*) (19) y la osteoartritis (OA) (20) entre otras.

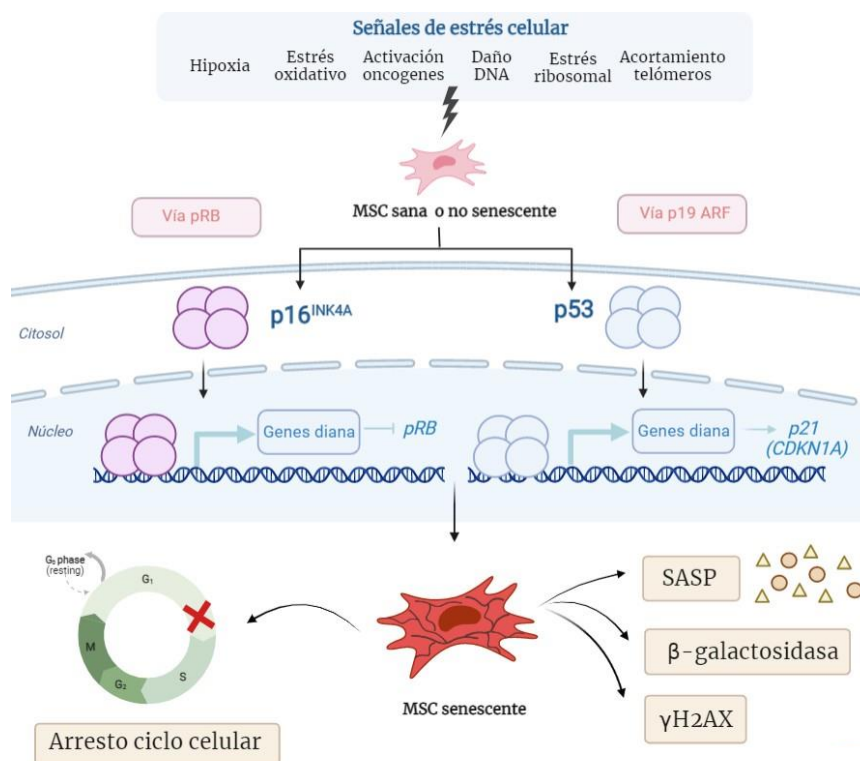


Figura 3. Resumen de la regulación transcripcional de la senescencia en MSCs. (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

1.3 Medicina regenerativa basada en hUC-MSCs

La medicina regenerativa es una rama de la tecnología médica mediante la cual los tejidos y órganos irreparablemente dañados por una lesión o enfermedad, se restauran mediante reconstrucción o reemplazo con el fin de restablecer su función normal. Un enfoque actual dentro del campo de la medicina regenerativa es la terapia con MSCs (21).

Las MSCs humanas procedentes del estroma del cordón umbilical humano (hUC-MSCs, del inglés, *human umbilical cord mesenchymal stem cells*) son una de las fuentes de células madre adultas típicamente utilizadas en distintos enfoques de medicina regenerativa. Así, las hUC-MSCs tienen diversas ventajas entre las que se incluyen su baja inmunogenicidad, procedimiento de recolección no invasivo y fácil expansión *in vitro* en comparación con las células madre de otras fuentes (22). Por lo tanto, las hUC-MSCs son un candidato prometedor en estrategias de terapia celular para el tratamiento de diferentes enfermedades o patologías (23). Así, las MSCs alogénicas aisladas del estroma del cordón umbilical representan un enfoque potencial para contrarrestar el entorno degenerativo e inflamatorio que caracteriza patologías, como la OA (24), la enfermedad crónica y degenerativa más común de las articulaciones sinoviales que constituye una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo (25).

Para la mayoría de los pacientes con OA, las únicas opciones farmacológicas incluyen analgésicos y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Sin embargo, estos medicamentos no son efectivos para modificar la enfermedad y su uso a largo plazo se asocia con efectos secundarios adversos.

La presencia en la OA de un perfil inflamatorio y catabólico similar al observado en las células senescentes clásicas sugiere la implicación de estas células en el desarrollo patológico de la enfermedad (26). Esta relación entre la presencia de células senescentes y el fenotipo OA pone en relieve la necesidad de la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos. Uno de los enfoques más prometedores en este contexto es la terapia génica surgiendo como un método

alternativo para conseguir una liberación dirigida y sostenida de agentes terapéuticos (27).

En la terapia génica se transfiere material genético exógeno a las células diana con el fin de modular la expresión de una proteína relacionada con el desarrollo de una determinada enfermedad. De los diversos desafíos involucrados en este proceso, uno de los más significativos es la dificultad de introducir el gen en el interior de la célula que se pretende transfectar. Para tal fin, se utiliza un transportador molecular llamado “vector” con el fin de introducir el gen en el interior celular. Para ello, el vector debe de ser muy específico, mostrar una elevada eficiencia en la transferencia génica, no ser reconocido por el sistema inmunitario del huésped y poder ser purificado en grandes cantidades y a altas concentraciones (28).

Los vectores que se utilizan actualmente en ensayos de terapia génica de células madre se pueden clasificar en vectores virales (como aquellos basados en adenovirus, lentivirus y virus adeno-asociados) y no virales (basados en la utilización de compuestos sintéticos como polímeros y lípidos) (29). Las principales ventajas de los vectores no virales frente a los sistemas virales radican en su reducida citotoxicidad, inmunogenicidad y capacidad de mutagénesis. Sin embargo, el uso de los vectores no virales se encuentra limitado por la reducida eficiencia en la transferencia de los genes de interés, o la duración transitoria de la expresión de los mismos (30).

Gracias a los avances en los campos de la tecnología de materiales y la nanotecnología, se está implementando la eficiencia de los vectores no virales para la transfección de MSCs. De este modo, las investigaciones más recientes se centran en el diseño de nuevos vectores, que puedan mejorar en gran medida la eficiencia de la transfección de MSCs, sin un incremento significativo de su citotoxicidad con respecto a los vectores no virales tradicionales (31).

1.4 Niosomas

Los niosomas son nanotransportadores vesiculares con capacidad de autoensamblaje y estructura en bicapa (32) ampliamente estudiados como sistemas de liberación de fármacos (33). Sin embargo a pesar de su gran

potencial, el uso de los niosomas como vectores de liberación de genes ha sido menos explorado (31). La estructura química de los niosomas ofrece ventajas frente a los ampliamente utilizados liposomas, dando lugar a la generación de formulaciones más estables, menos citotóxicas y con un menor coste de producción (34).

Los niosomas están compuestos por tres componentes principales: un lípido catiónico, un tensioactivo no iónico y un lípido auxiliar o excipiente (**Figura 4**) (32).

El lípido catiónico como el 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) es el responsable de las interacciones electrostáticas con las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN (35). El tensioactivo no iónico como el polisorbato o poloxámero reduce la agregación de las partículas. Así, la sustitución de los fosfolípidos por tensioactivos no iónicos en los niosomas, mejora notablemente su estabilidad, al mismo tiempo que reduce su citotoxicidad. Por último, la incorporación de un lípido auxiliar como escualeno, colesterol o licopeno a la formulación de niosomas ha demostrado mejorar sus propiedades físico-químicas, modulando la rigidez mecánica de las vesículas y su estabilidad coloidal (32).

De este modo, los complejos resultantes de la asociación de los niosomas con el plásmido de ADN de interés se denominan nioplejos (36). En este contexto, la mayoría de estas formulaciones de niosomas han sido probadas como vehículos de transfección de células de la retina o del sistema nervioso central (37). Sin embargo, más recientemente se han realizado estudios de transfección utilizando niosomas como vectores no virales de transferencia de genes en MSCs con prometedores resultados para la modificación genética de estas células (32, 38).

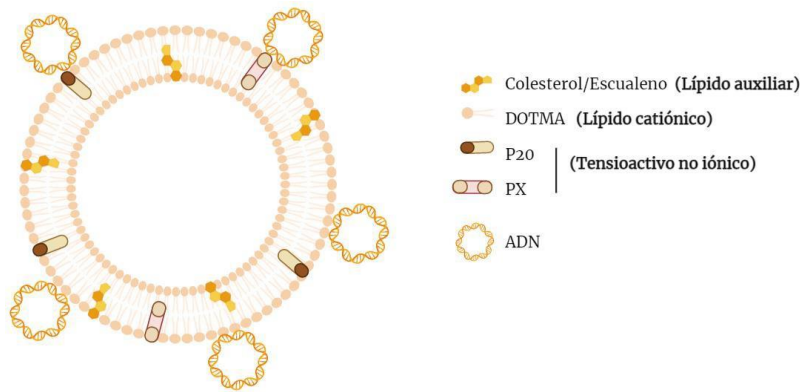


Figura 4. Representación esquemática de formulaciones de niosomas generados con colesterol o escualeno como lípidos auxiliares y poloxámero (PX) y polisorbato 20 (P20) como tensioactivos no iónicos, complejados con ADN plasmídico. (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

2. Objetivos

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron:

- Aislar y caracterizar células madre mesenquimales humanas procedentes del estroma de cordón umbilical (hUC-MSCs).
- Inducir senescencia en hUC-MSCs siguiendo el modelo *therapy-induced senescence* (TIS).
- Producir y caracterizar dos formulaciones de vectores no virales basados en niosomas para la transfección de hUC-MSCs.
- Evaluar la citotoxicidad y eficiencia de transfección alcanzada con los sistemas desarrollados en hUC-MSCs senescentes y no senescentes

3. Materiales y métodos

3.1 Aislamiento de células madre mesenquimales procedentes del estroma de cordón umbilical humano.

Las hUC-MSCs utilizadas en el presente trabajo fueron aisladas a partir de muestras del estroma de cordón umbilical humano procedentes de cesáreas previamente programadas a mujeres sanas en la unidad de maternidad del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado siguiendo las guías de la declaración de

Helsinki y aprobado por el comité ético del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) (2019/026 y 21/01/2019).

Con objeto de obtener las hUC-MSCs, se recogió la muestra de estroma de cordón umbilical y se mantuvo en una placa de cultivo de 100 mm² (Thermo Fisher, EE. UU.) en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) (Thermo Fisher, EE. UU.) en ausencia de suero fetal bovino (SFB) y suplementado con penicilina/estreptomicina (P/E) al 1% (v/v) (Sigma-Aldrich, España) y gentamicina 1:1000 (v/v) (Sigma-Aldrich, España). Posteriormente, se diseccionó transversalmente el cordón lavando bien su interior con suero salino (Sigma-Aldrich, España) para eliminar los posibles restos de células hematopoyéticas.

Seguidamente, se diseccionó el cordón en fragmentos de no más de 1 cm² y se digirieron los mismos con un cóctel enzimático consistente en colagenasa 1% (v/v) y dispasa al 1% (v/v) (Sigma-Aldrich, España) en medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle Medium) 0% SFB 1% P/E en un tubo cónico de 50 ml (Falcon, España) durante 5 minutos a 37°C en agitación. Tras un total de tres digestiones enzimáticas se colocaron los fragmentos de tejido en placas de cultivo de 100 mm² (Thermo Fisher, EE. UU.) y se mantuvieron en un incubador a 37°C al 5% (v/v) de CO₂ durante 5 minutos a fin de asegurar la adherencia celular a la placa cultivo de 100 mm² (Thermo Fisher, EE. UU.).

Por último, se añadió medio DMEM (Sigma-Aldrich, España) suplementado con cuidado de no separar el tejido de la placa y se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% (v/v) de CO₂.

Durante los siguientes 5 días, se renovaron las placas con medio fresco suplementado. Posteriormente, se retiraron los fragmentos de estroma que se habían pegado a la placa, quedando las MSCs adheridas a la superficie de la misma.

3.2 Cultivo de hUC-MSCs procedentes del estroma de cordón umbilical

humano

Las hUC-MSCs aisladas de cordón umbilical se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm² (Thermo Fisher, EE. UU.) con medio suplementado y se mantuvieron a 37°C con un 5% (v/v) de CO₂, renovándose el medio suplementado cada 2 días. Para sembrar los cultivos primarios se procedió al recuento celular por duplicado en una cámara de Neubauer (Labolan, España).

Periódicamente, cuando el nivel de confluencia alcanzado fue de alrededor del 70%, se llevaron a cabo subcultivos celulares mediante la disociación de la monocapa celular incubando las células con tripsina 1X (Sigma-Aldrich, España) durante 5 minutos a 37°C. Tras inactivar la enzima mediante la adición de la misma cantidad de medio suplementado que tripsina, se recogió la muestra en un tubo cónico de 50 ml (Falcon, España). A continuación, se centrifugó el tubo a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Seguidamente se resuspendió el *pellet* obtenido con medio suplementado con objeto de realizar subcultivos sobre nuevas placas de 100 mm².

3.3 Desarrollo del modelo de senescencia

El modelo de senescencia empleado se basa en el uso del compuesto Palbociclib (1µM) que actúa inhibiendo selectivamente las quinasas dependientes de ciclinas 4/6 (Cdks 4/6), deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular al suprimir la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) (41). El Rb hipofosforilado resultante inhibe la actividad transcripcional de E2F, bloqueando así la transcripción de genes críticos necesarios para entrar en la fase S (42). Este modelo se denomina *therapy-induced senescence* (TIS) (41).

Con el fin de desarrollar el modelo de senescencia se sembraron las hUC-MSCs a razón de 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher, España) por triplicado en medio suplementado. Transcurridas 48 horas, se renovó el medio añadiéndole 1µl de Palbociclib a la concentración 1 µM (MedChemexpress, EE. UU.) en medio suplementado. La inducción de

senescencia fue completa a los 6 días desde la primera adición del inductor de senescencia.

3.4 Evaluación de la capacidad de proliferación empleando la tinción cristal violeta

Las MSCs son células adherentes que sufren arresto de proliferación al estar en contacto con inductores de senescencia como el Palbociclib. Con ello, a fin de realizar una cuantificación indirecta de la proliferación celular tras la estimulación con Palbociclib, se utilizó la tinción de cristal violeta, colorante que tiñe las células adheridas a la placa de cultivo.

Para ello, transcurridos 6 días desde la inducción de senescencia, se lavaron las células con suero salino 2 veces y se fijaron las mismas empleando paraformaldehído al 4% (v/v) (Sigma-Aldrich, España) en PBS (ThermoFisher, España) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células con agua destilada (ThermoFisher, España) para eliminar los restos de fijación y se adicionó el colorante cristal violeta al 0,5% (v/v) (SigmaAldrich, España) durante 30 minutos en agitación continua y oscuridad. Por último, se retiró el cristal violeta y se lavó la placa con agua destilada 3 veces para eliminar los restos de tinción. Para escanear la placa se empleó un escáner Epson Perfection V800 Photo (Epson, Japón).

3.5 Extracción de ARN

De forma previa a la extracción se sembraron las hUC-MSCs en una placa de 6 pocillos (Corning™ Incorporated Costar ThermoFisher, EE. UU.) a razón de 100000 células/pocillo. Las células fueron incubadas y sometidas al mismo protocolo de inducción de senescencia descrito anteriormente (sección 3.3).

Los cultivos se lavaron con suero salino frío 3 veces. Seguidamente, para proceder con la extracción de ARN se incubó cada pocillo de la placa con 500 µl de Trizol (Invitrogen, EE. UU.) durante 5 minutos. Posteriormente se homogenizó el contenido de cada pocillo con ayuda de una micropipeta y se recogió el contenido de los mismos en tubos Eppendorf. A continuación, se adicionaron

200 µl de cloroformo 100 % (v/v) (Panreac Applichem, EE. UU.) y se homogeneizaron las muestras de forma previa a su centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 15 minutos.

Después, se recogió la fase acuosa conteniendo el ARN de interés y se añadieron 200 µl isopropanol al 100 % (v/v) (Panreac Applichem, EE. UU.). Una vez homogeneizado el contenido de los tubos por agitación, se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos para posteriormente ser almacenados en frío a - 80°C durante 24 horas.

Transcurridas 24 horas, se centrifugaron las muestras a 11000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente, se lavaron los *pellets* resultantes con etanol frío al 75% (v/v) (Panreac Applichen, EE. UU.). Las muestras se centrifugaron nuevamente a 7500 rpm a 4°C durante 15 minutos y los sobrenadantes fueron retirados por decantación. Para la completa evaporación del etanol de las muestras se dejaron los tubos Eppendorf abiertos a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos. Después, se resuspendieron las muestras en 20 µl de agua destilada libre de ARNasas (Becton Dickinson S.A., España) y la concentración y pureza del ARN presente en las mismas se cuantificó con un NanoDrop (Thermo Fisher, EE. UU.).

3.6 Obtención de ADNc (ADN complementario)

Una vez obtenido el ARN se llevó a cabo una retrotranscripción con 500 ng de cada muestra a fin de sintetizar el ADN complementario (ADNc) empleando el kit comercial NZY Reverse Transcriptase (NZYTech, Portugal). Para ello, se preparó una *master mix* mezclando cada una de las muestras con 1 µl de *random hexamer*, 1 µl dNTPs y H₂O destilada libre de ARNasas hasta completar un volumen final de 16 µl. Tras incubar la *master mix* a 65°C durante 10 minutos empleando un termociclador VERETI 96-W (Applied Biosystems, EE. UU.) se añadió 1 µl de *Reaction buffer* junto con 1 µl de transcriptasa inversa (*NZY reverse transcriptase*). Por último, se incubaron los tubos en el mismo termociclador empleando un programa consistente en una fase de inicio a 25°C durante 10 minutos, seguido de una fase a 50°C durante 40 minutos y una última

fase a 85°C durante 5 minutos. Los tubos se guardaron a -20°C hasta que se llevó a cabo la PCR cuantitativa.

3.7 Realización de PCR cuantitativa (qPCR)

Se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) a partir de ADNc obtenido tras la extracción de ARN a fin de estudiar la expresión de determinados genes involucrados en el proceso de senescencia celular: *CDKN1A* (*p21*), *IL-8* e *CXCL1*, además del gen *HPRT1*, el cual fue utilizado como control. Para analizar la expresión de estos genes se realizó una *master mix* de cada muestra mezclando para cada reacción 2 µl de ADNc, 2 µl de la mezcla de los cebadores sentido y antisentido de cada uno de los genes (**Tabla 1**) y 7 µl del fluoróforo SYBR green (Light Cycle 4800 SYBR Green I Máster Kit).

Se empleó un analizador Light Cycler 480 Real Time PCR (Roche Diagnostics International, Suiza) empleando un programa compuesto por una fase inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de una fase de amplificación de 60 ciclos. Durante cada uno de los ciclos se realizó una desnaturalización de 10 segundos a 95°C, una fase de anillamiento de 6 segundos a 61°C y una fase de elongación de 7 segundos a 72°C.

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')
<i>HPRT</i>	GCTATAAATTCTTTGCTGACCTGCTG	AATTACTTTTATGTCCCCTGTTGACTGG
<i>p21</i>	CCTGTCACTGTCTTGTACCCT	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
<i>CXCL1</i>	TGCCATTCTGATTTGCTGCC	TGCAGGTACAGCGTACAGTT
<i>IL-8</i>	GAGTGGACCACACTGCGCCA	TCCACAACCCTCTGCACCCA

Tabla 1. Cebadores empleados en la qPCR.

3.8 Aislamiento y purificación del ADN plasmídico conteniendo el gen luciferasa

Con objeto de aislar y purificar el ADN del plásmido pGL4.14[luc2/Hygro] (pADN), que contiene el gen luciferasa se partió de *stocks* bacterianos de *Escherichia coli* competentes (Invitrogen, Alemania), transformadas con el plásmido y conservadas en glicerol a -80 °C.

En primer lugar, se realizó un cultivo mediante inoculación de la muestra bacteriana en tubos de polipropileno conteniendo medio *Luria Broth Base* (Miller's LB Broth Base) (LB; Fisher Scientific, Suecia) con 100 µg/mL de ampicilina (ampicilina sal sódica; Fisher Bioreagents, España) durante 12 horas a 37°C y en agitación a 200 rpm. El plásmido contiene el gen de resistencia al antibiótico ampicilina, permitiendo la selección de las bacterias *E. coli* que hayan incorporado el plásmido de interés.

Por último, el pADN fue extraído y purificado mediante el aislamiento de ADN en columna mediante el uso del kit comercial Miniprep (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cuantificar la concentración del plásmido se empleó un bio-espectrofotómetro para microgota MySPECT Twin (VMR, EE. UU.).

3.8.1 Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pGL4.14[luc2/Hygro]

Previamente a su utilización en los diferentes ensayos, se determinó la concentración del plásmido haciendo uso de un bio-espectrofotómetro para microgota. Con objeto de garantizar la pureza del plásmido aislado se registró la relación de absorbancias a 260/280 nm, para cada una de las muestras.

Seguidamente, se confirmó la eficiencia del aislamiento y purificación plasmídica mediante una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, las distintas muestras de plásmido fueron digeridas con las enzimas de restricción *Sal I* y *Kpn I* (Roche) a 37°C durante 1 hora. Para la preparación del gel de agarosa se procedió a la disolución de agarosa al 1% (Fisher Bioreagents, España) en tampón TAE (Gibco-ThermoFisher Scientific, España) en un horno microondas. A continuación, el gel fue teñido con 2 µl de Green Safe Premium (Nzytech, Portugal) y vaciado en un molde, dejándolo polimerizar durante 30 minutos.

Con el fin de identificar el tamaño de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (1kb Plus DNA Ladder; Invitrogen™, EE. UU.). La electroforesis se realizó a 80 V durante 45 minutos y los geles fueron visualizados con un fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EE. UU.).

3.9 Producción de las formulaciones de niosomas

Para la síntesis de ambas formulaciones de niosomas se empleó DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio) (Avanti Polar Lipids, EE. UU.) como lípido catiónico junto con colesterol (Sigma Aldrich, EE. UU.) (niosomas de colesterol) o escualeno (Alfa Aesar, Alemania) (niosomas de escualeno) como lípido auxiliar o excipiente para formar la fase orgánica. A su vez, para ambas formulaciones, se empleó una mezcla de los surfactantes no-iónicos polisorbato 20 (P20; Alfa Aesar, Alemania) y poloxámero 407 (PX; Lutrol® F 127, BASF, Alemania) a fin de generar la fase acuosa. Las suspensiones de niosomas fueron finalmente rehidratadas en medio Optimen® (Gibco-ThermoFisher Scientific, EE. UU.) Las cantidades de dichos compuestos se describen en la tabla inferior (**Tabla 2**).

Compuesto		Concentración <i>stock</i> (mg/mL)	Volumen (µL)
Lípido catiónico	DOTMA	5	400
Surfactantes no iónicos	Poloxámero 407	200	100
	Polisorbato 20	200	100
Excipiente	Colesterol	40	100
	Escualeno	858	10
	Optimen®	-	3000

Tabla 2. Concentraciones *stock* y volúmenes de los componentes empleados de para preparar las formulaciones de niosomas de colesterol o escualeno.

Para preparar los niosomas de colesterol o escualeno se mezclaron ambas fases en dos matraces de fondo redondo. A continuación, se sometieron las mezclas a sonicación empleando un sonicador UP200S (Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) durante 30 segundos a 45 W seguida de agitación magnética durante 3 horas, permitiendo la evaporación del diclorometano y consiguiendo así la recuperación de las suspensiones de niosomas en la fase acuosa (**Figura 5**).

3.10 Caracterización de niosomas

Tras su preparación, ambas formulaciones de niosomas se caracterizaron mediante las técnicas *Dynamic Light Scattering* (DLS) (sección 3.10.1) y *Electrophoretic Light Scattering* (ELS) (sección 3.10.2) para efectuar mediciones del tamaño de partícula y potencial Z, respectivamente.

3.10.1 Determinación del tamaño de los niosomas mediante Dynamic Light Scattering (DLS)

Mediante la técnica de DLS, se determinó el movimiento browniano (coeficiente de difusión) con el fin de obtener el diámetro hidrodinámico de las dos formulaciones de niosomas siguiendo la ecuación de Stokes-Einstein (43).

Para ello, se trasvasaron los niosomas suspendidos en agua destilada a una cubeta de plástico semimicro de rango UV de PMMA, 45 mm x12 mm (Thermo Fisher, España) y sus tamaños fueron medidos a una temperatura de 20°C empleando un equipo NanoBrook 90Plus Zeta (Brookhaven Instruments Corporation, EE. UU.).

El tamaño de los niosomas se calculó haciendo la media de un total de 3 mediciones de 60 segundos para cada una de las muestras.

3.10.2 Análisis de potencial Z de los niosomas mediante Electrophoretic Light Scattering (ELS)

La técnica ELS se emplea para medir la movilidad electroforética de partículas en solución. Esta medida se utilizó para determinar el potencial Zeta, que es una medida de la repulsión/atracción electrostática o de carga entre las partículas aportando información sobre la estabilidad de la suspensión de los niosomas (43).

Se realizaron 3 medidas para cada una de las muestras utilizando el equipo NanoBrook 90Plus Zeta (Brookhaven Instruments Corporation, EE. UU.).

3.11 Generación de los nioplejos

Para la generación de los nioplejos se mezcló un volumen fijo de la solución *stock* de plásmido pGL4.14[luc2/Hygro] (700 ng), con volúmenes crecientes de

cada una de las formulaciones de niosomas, empleándose relaciones de DOTMA-pADN (p/p): 0/1, 5/1, 10/1, 15/1, 20/1, tal como se indica en la figura 5. Por simplificación en los siguientes apartados, dichas relaciones serán nombradas como 0, 5, 10, 15 y 20 respectivamente (**Figura 5**).

Posteriormente se sometieron estas mezclas a una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos con el fin de promover las interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de los ácidos nucleicos con las cargas positivas de los grupos amino del lípido catiónico DOTMA.

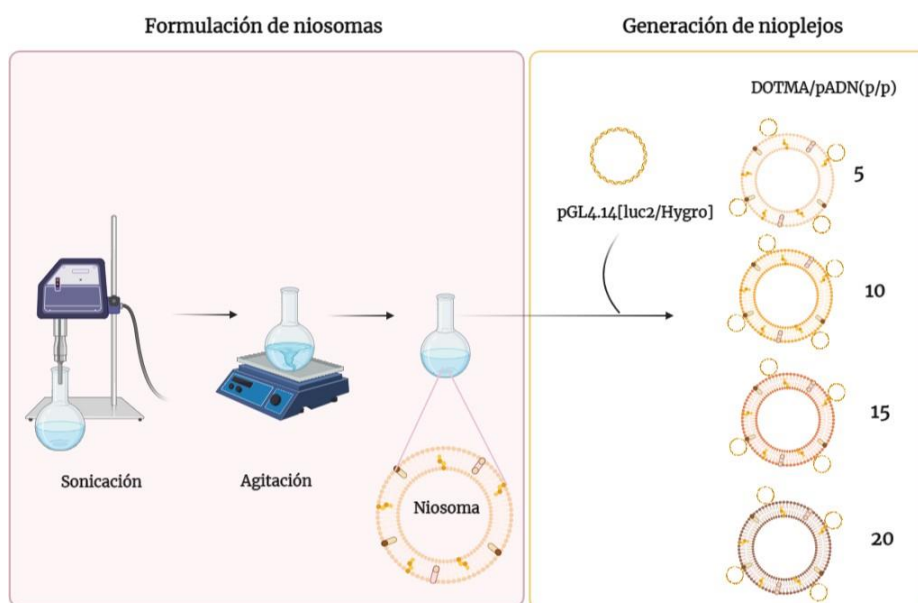


Figura 5. Formulación de niosomas y generación de nioplejos a distintas relaciones DOTMA/pDNA(p/p). (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

3.11.1 Caracterización de nioplejos

Para caracterizar los nioplejos se realizó un ensayo de exclusión de SYBRTM Gold con el fin de estudiar la mínima relación de lípido catiónico (DOTMA) de los niosomas capaz de unirse a una cantidad fija de pADN (sección 3.11.1.1).

Además, se efectuó una electroforesis en gel de agarosa en presencia de ADNasa y dodecilsulfato sódico (SDS) con objeto de evaluar la capacidad de protección del ADN por parte de los niosomas formulados (sección 3.11.1.2).

3.11.1.1 Ensayo de exclusión de SYBR™ Gold

Con objeto de determinar la mínima relación DOTMA/pADN (p/p) de los niosomas capaces de unirse a una cantidad fija de pADN (700 ng) se realizó un ensayo de exclusión del fluoróforo SYBR™ Gold.

Una vez formados los complejos en agua libre de nucleasas (volumen final de 50 µl) (Thermo Scientific, EE. UU.) siguiendo el protocolo especificado en apartados anteriores (sección 3.11), se llevó a cabo una incubación de 30 minutos. Seguidamente, se adicionaron 3 µl de una solución 200X del compuesto SYBR™ Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen, EE. UU.) a cada uno de los nioplejos y fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 300 µl de 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) a cada muestra y se realizaron 3 medidas de la emisión de fluorescencia a cada complejo en una placa negra de 96 pocillos (Corning™ Incorporated Costar ThermoFisher, EE. UU.) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm en un espectrofotómetro de placas Synergy HTX (Biotek, EE. UU.). Los valores obtenidos fueron expresados en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) normalizados con respecto a los valores de fluorescencia obtenidos con el plásmido libre siguiendo la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Fluorescencia relativa} = \frac{\text{Fluorescencia muestra}}{\text{Fluorescencia plásmido libre}} \cdot 100$$

3.11.1.2 Electroforesis en gel de agarosa

Con el fin de determinar la capacidad de protección del pADN de los nioplejos frente a la degradación en presencia de ADNasa, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

Para ello, se generaron los nioplejos a relaciones DOTMA/pADN (p/p) de 5, 10, 15, y 20 con una cantidad fija de pADN (100 ng) siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 3.11. Como control negativo se utilizó la misma cantidad de ADN sin la suspensión de nisomas. A continuación, se añadió 1 µl de ADNasa a todas las muestras (2,5 µg ADN/ 1 U DNasa) (ThermoFisher, Madrid, España) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, con el

fin de romper los complejos se adicionaron 3 μ l de SDS al 7% (v/v) a cada una de las muestras exceptuando el control negativo.

La capacidad de protección del pADN de las distintas muestras fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello las muestras se cargaron en el gel mediante la adición de las mismas junto con 1 μ l de tampón de carga 10x *Blue juice gel loading buffer* (Invitrogen, España) en cada pocillo. El gel fue preparado previamente mediante la disolución de agarosa (Fisher Bioreagents, España) en tampón Tris-Borato-EDTA 1X (TBE; Gibco-ThermoFisher Scientific España) al 0,8 % (m/v) en un horno microondas.

La electroforesis se realizó durante 40 minutos a 60 V. Posteriormente, el gel fue teñido mediante su incubación en una dilución 1:10000 de *SYBRTM Gold nucleic acid gel stain* a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación, y finalmente fue visualizado en un fotodocumentador Chemidoc (BioRad, España).

3.12 Transfección de células senescentes y no senescentes

Previamente a la realización de los ensayos de transfección se sembraron las hUC-MSCs en placas de 96 pocillos (Thermo Fisher, España) a una densidad celular de 5000 células/pocillo y se incubaron a 37°C y 5% (v/v) de CO₂. Posteriormente, se indujo senescencia siguiendo el modelo descrito anteriormente (sección 3.3) mediante la adición de 1 μ M de Palbociclib de forma que tras 6 días de tratamiento se obtuvo un modelo de células senescentes. Las células no senescentes fueron sembradas y cultivadas en placas de 96 pocillos en las mismas condiciones que las hUC-MSCs senescentes, pero en ausencia Palbociclib. Este procedimiento fue repetido con hUC-MSCs obtenidas a partir de 3 pacientes distintos.

Los nioplejos fueron preparados en medio Optimen® (Gibco-ThermoFisher Scientific, EE. UU.) a relaciones DOTMA/pADN (p/p) de 5, 10, 15, y 20 siguiendo el mismo protocolo expuesto en apartados anteriores (sección 3.11).

Como control negativo de transfección se utilizaron células (senescentes y no senescentes) cultivadas en el mismo medio de transfección en ausencia de nioplejos. Asimismo, como control positivo de la transfección se utilizó el reactivo comercial Lipofectamina (6 μ l) (ThermoFisher, España) para la formación de los complejos con el pADN (lipoplejos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

De forma previa a la transfección se lavaron las monocapas de células con suero salino. A continuación, se añadieron los correspondientes nioplejos o lipoplejos en Optimen® y las placas se incubaron a 37°C durante 3 horas a un 5% (v/v) de CO₂. Posteriormente, el medio fue sustituido por medio suplementado y las placas fueron de nuevo incubadas durante 24 horas. Este procedimiento fue realizado en paralelo para las hUC-MSCs senescentes y no senescentes (**Figura 6**).

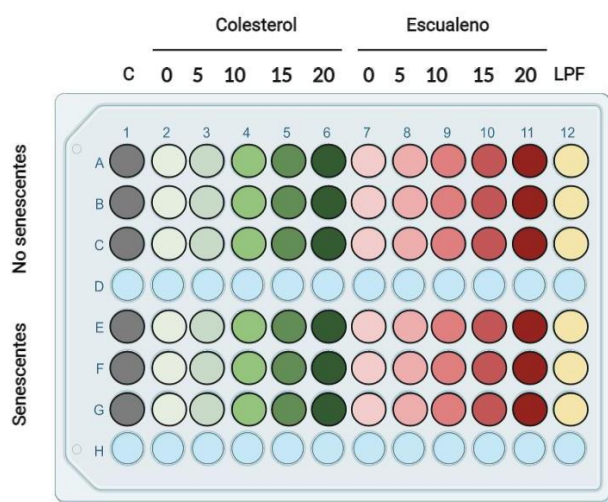


Figura 6. Distribución de placa de 96 pocillos sembrada con hUC-MSCs senescentes y no senescentes transfectadas con los nioplejos correspondientes a las dos formulaciones de niosomas (colesterol y escualeno) a distintas relaciones DOTMA/pADN (p/p) (0, 5, 10, 15, 20) junto con sus respectivos controles positivo (Lipofectamina; LPF) y negativo (C). El ensayo fue realizado por triplicado y repetido en 3 experimentos independientes con hUC-MSCs aisladas a partir de 3 pacientes distintos. (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

3.13 Evaluación de la viabilidad celular

El reactivo de viabilidad celular *Alamar Blue* (Thermo Fisher, España) es un reactivo no tóxico de color índigo (resazurina) que detecta células metabólicamente activas y se utiliza para el análisis cuantitativo de la viabilidad y proliferación celular. El reactivo se reduce al entrar en las células generando un compuesto fluorescente permitiendo la cuantificación de la viabilidad celular mediante medidas de fluorescencia (44).

Para realizar el ensayo se lavó la monocapa celular con PBS y posteriormente se adicionaron 100 µl del colorante directamente sobre los pocillos. La placa se incubó durante 2 horas empleando un incubador a 37°C al 5% (v/v) de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la fluorescencia en un lector de placas a longitud de onda de excitación 485 nm y emisión de 528 nm. Los datos obtenidos fueron expresados en URFy normalizados con respecto a las URF obtenidos con el control negativo de hUC-MSCs sin transfectar con el fin de calcular los porcentajes de viabilidad celular de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% Viabilidad\ celular = \frac{URF\ muestra}{URF\ control} \cdot 100$$

3.14 Evaluación de la eficiencia de transfección

Con objeto de evaluar la eficiencia de transfección del plásmido pGL4.14[luc2/Hygro] con los distintos nioplejos en hUC-MSCs senescentes y no senescentes se cuantificó la emisión de luminiscencia correspondiente al gen reportero luciferasa (sección 3.14.1). Con el fin de corregir los valores de transfección de acuerdo con el número de células presentes en los cultivos, los valores obtenidos fueron normalizados por la cantidad de proteína presente en cada pocillo (sección 3.14.2).

3.14.1 Ensayo luciferasa

La eficiencia de transfección se cuantificó mediante el empleo del reactivo luciferasa (Promega, EE. UU.), un reactivo altamente sensible y rápido para la cuantificación de la expresión génica de la enzima bioluminiscente luciferasa.

La enzima codificada por el gen reportero de la luciferasa cataliza la reacción quimioluminiscente basada en la oxidación del sustrato luciferina en presencia de ATP, Mg²⁺ y O₂ como cosustratos generando como producto fluorescente oxiluciferina (**Figura 7**).

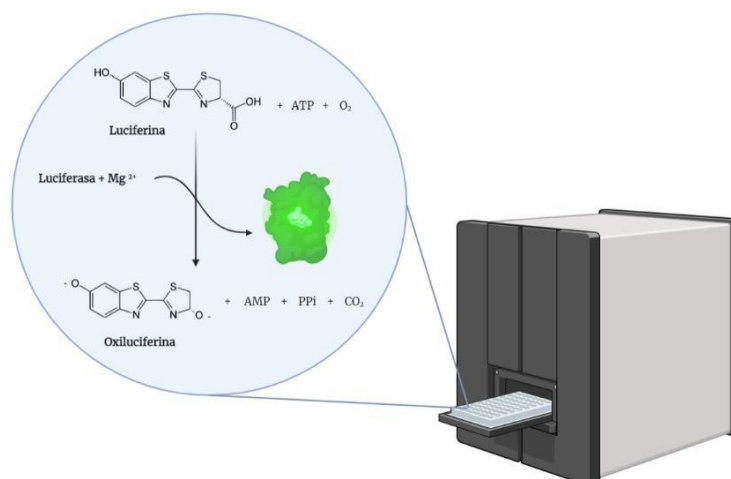


Figura 7. Reacción bioluminiscente catalizada por la enzima luciferasa. (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

A las 24 horas después de la transfección se lisaron las células con 100 µl buffer de lisis *Luciferase Cell Culture Lysis Reagent* (Promega, EE. UU.) y las placas se congelaron a -80°C.

Para la realización del ensayo se tomaron 30 µl del correspondiente lisado celular junto con 50 µl del reactivo luciferasa y se dispusieron en una placa de fondo blanco de 96 pocillos (Corning™ Incorporated Costar ThermoFisher, EE. UU.) La luminiscencia de cada una de las muestras fue medida usando un espectrofotómetro de placas Synergy HTX (Biotek, EE. UU.) con una ganancia de 255. Los valores obtenidos fueron expresados en Unidades Relativas de Luminiscencia (URL). Los URL obtenidos fueron normalizados con respecto al contenido de proteínas presente en cada uno de los pocillos medido mediante el ensayo BCA tal y como explica en la siguiente sección.

3.14.2 Ensayo de proteínas BCA

El kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) constituye un ensayo colorimétrico de alta precisión y sensibilidad para la determinación de la concentración de proteínas. En primer lugar, tiene lugar la reacción de Biuret basada en la reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺ en medio alcalino formando un complejo azul claro siendo dicha reducción proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. A continuación, se lleva a cabo una detección colorimétrica altamente selectiva del catión cuproso (Cu¹⁺) por dos moléculas de

ácido biconínico (BCA) que reacciona con el catión formando un producto de reacción de color púrpura intenso (**Figura 8a**) (45).

Para llevar a cabo este ensayo, se tomaron 20 μl de cada lisado celular y se dispusieron en una placa de 96 pocillos (*Corning™ Incorporated Costar ThermoFisher*, EE. UU.) junto con 200 μl del reactivo BCA. La placa se incubó durante 2 horas en una estufa a 37°C después de las cuales se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm empleando un espectrofotómetro de placas.

Para calcular la concentración de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) de las muestras se diseñó una curva patrón estándar con concentraciones conocidas crecientes de la proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*) a partir de la cual se extrapolaron los valores de las concentraciones de las células transfectadas con los nioplejos a distintas relaciones DOTMA/pADN (p/p) (**Figura 8b**). Para calcular la cantidad de proteína por pocillo se multiplicó este valor por el factor de dilución (5,5).

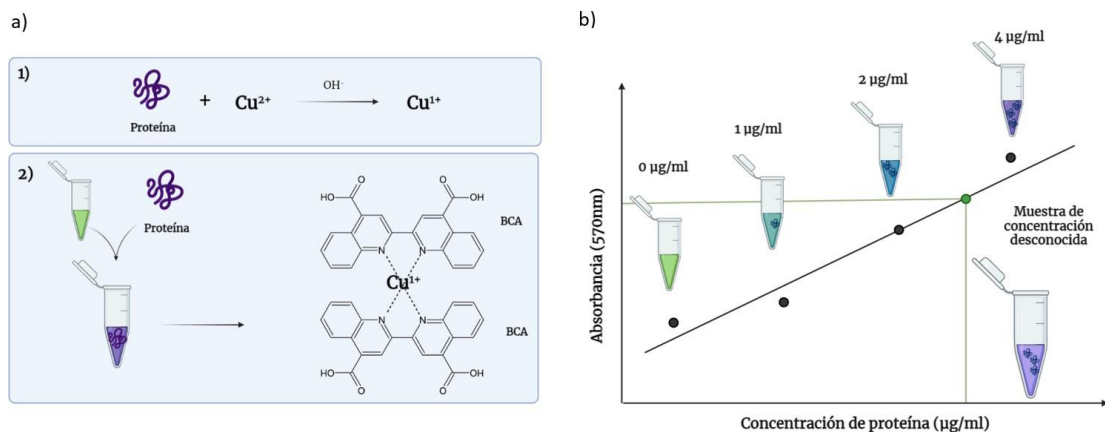


Figura 8. a) Ensayo colorimétrico de BCA en dos pasos: 1) Reacción de oxidación del cobre catalizada por proteínas. 2) Quelación de dos moléculas de BCA con el catión Cu^{1+} generado en el paso anterior; b) Determinación de la concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$) a partir de la curva patrón estándar constituida por concentraciones crecientes de BSA. (Imagen generada a partir del programa Biorender disponible en www.biorender.com).

Para el cálculo de eficiencia de transfección se normalizaron los valores de URL obtenidos con respecto a los mg de proteína presentes en cada una de las muestras (URL/mg proteína). Con el fin de eliminar la posible interferencia de

fondo en las mediciones, a los valores de URL/mg proteína obtenido en cada una de las muestras se les substrajo los valores de URL/mg proteína obtenido con el control negativo de células sin transfectar.

$$\frac{URL}{mg\ prote\acute{a}na} = \frac{URL\ muestra}{mg\ prote\acute{a}na\ muestra} - \frac{URL\ control}{mg\ prote\acute{a}na\ control}$$

3.15 Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los valores obtenidos en cada grupo de estudio fueron promediados y expresados como el valor medio de los distintos replicados \pm su desviación típica (SD).

La normalidad de los datos fue estudiada con un test de Shapiro-Wilk con el fin de seleccionar el test más adecuado para evaluar las diferencias entre los grupos. Las diferencias observadas entre los distintos grupos fueron analizadas mediante la prueba estadística ANOVA de 1 factor fijo, y la prueba t-Student a un nivel de significación (α) del 0,05. En caso de no cumplirse normalidad se realizó la prueba no paramétrica para muestras independientes Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados con el programa IBM SPSS Statistics 23. Los p-valores (p) $<$ 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Las representaciones gráficas de los datos fueron generadas mediante el programa OriginLab 2021

4. Resultados y discusión

4.1 Determinación de la concentración del plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*]

La muestra aislada del plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*] mostró un valor de concentración en torno a 1033,2 μ g/ml, con un cociente de absorbancias a 260/280 próximo al rango óptimo de 1,8 a 2, confirmándose de este modo la pureza del plásmido.

4.2 Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*]

La electroforesis en gel de agarosa permitió verificar el correcto aislamiento del ADN plasmídico. Así, la doble digestión del plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*] con

las enzimas *Kpn I* y *Sal I* generó 3 bandas de 5841, 3606 y 2235 pares de bases como indica su mapa (**Figura 9**).

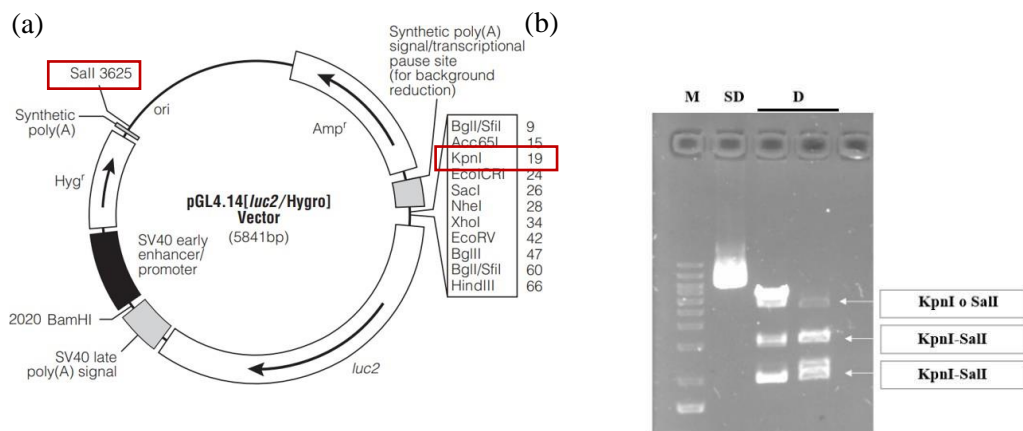


Figura 9. (a) Esquema del plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*] indicando los puntos de corte de las enzimas *Kpn I* y *Sal I*. (b) Electroforesis en gel de agarosa. Se observa el marcador de peso molecular (M), el plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*] sin digerir (SD) y los tres fragmentos en los que se escinde el plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*] al ser digerido con las enzimas de restricción *Kpn I* y *Sal I* (D).

4.3 Caracterización de MSCs

4.3.1 Evaluación morfológica de las MSCs aisladas de estroma de cordón umbilical

Los cultivos primarios de hUC-MSCs se obtuvieron a partir del aislamiento del estroma de cordón umbilical humano obtenido en las cesáreas de 3 donantes sanas, y exhibieron la morfología fibroblástica característica de poblaciones celulares de MSCs (**Figura 10**).

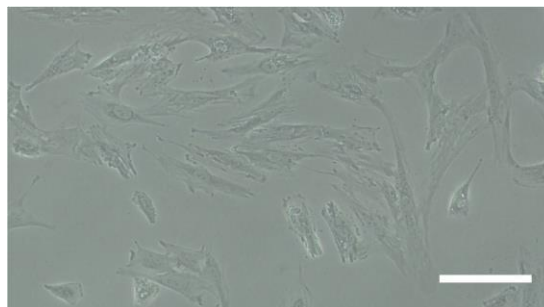


Figura 10. Imagen representativa de hUC-MSCs aisladas del estroma de cordón umbilical adheridas en una placa de cultivo de diámetro de 100 mm. Imagen en campo claro adquirida con

un microscopio Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japón) a 20x. El valor de la escala de la imagen es de 100µm.

4.4 Evaluación de la inducción de senescencia celular

4.4.1 Medida de la capacidad de proliferación celular mediante tinción cristal violeta

La tinción con cristal violeta es un método de detección sencillo para evaluar la capacidad de proliferación de células adherentes bajo la acción de agentes quimioterapéuticos inhibidores del crecimiento celular como Palbociclib (41), tal como se describió en el apartado de la sección de materiales y métodos.

Las imágenes obtenidas mostraron que en contraste a las hUC-MSCs no senescentes, las senescentes experimentaron una disminución de su capacidad proliferativa, evidenciada a través de la disminución de su intensidad de tinción con cristal violeta (**Figura 11**). Estos hallazgos coinciden con los resultados previos del grupo (46).

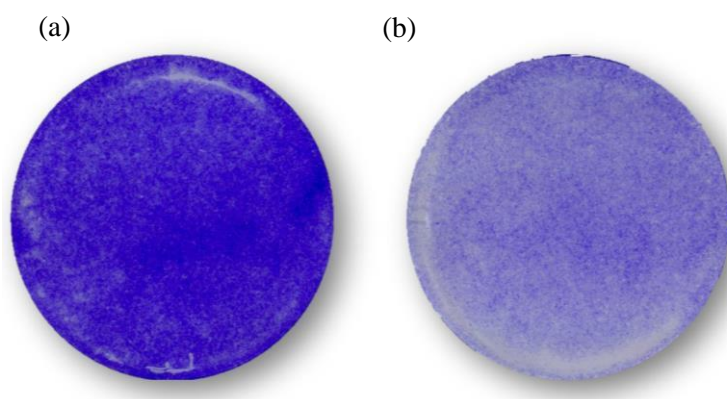


Figura 11. Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta. Imágenes representativas de un experimento de (a) hUC-MSCs no senescentes (tratadas con DMSO), (b) hUC-MSCs senescentes (tratadas con Palbociclib) durante 6 días.

4.4.2 Evaluación de la expresión de marcadores de senescencia empleando qPCR

Con objeto de complementar la evaluación de la senescencia celular *in vitro*, se realizó un análisis de la expresión génica de marcadores de SASP característicos de MSCs senescentes, mediante q-PCR (**Figura 12**). Los genes estudiados fueron *CXCL1*; una quimiocina inflamatoria, *CDKN1A* conocido como *p21*; un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1 y un gen regulador de la progresión del ciclo celular (47), y *IL-8*; una citoquina pro-inflamatoria (48).

Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la expresión de los tres marcadores (*CXCL1*, *p21* y *IL-8*) en hUC-MSCs senescentes generadas con Palbociclib, siendo la expresión de dichos marcadores 4, 13 y 18 veces superior respectivamente, a la del control de células tratadas con DMSO denominadas no senescentes. Sin embargo, únicamente los marcadores de senescencia *CXCL1* y *p21* evidenciaron un incremento estadísticamente significativo ($p \leq 0,025$).

A la luz de los resultados obtenidos en la tinción cristal violeta y en la cuantificación de la expresión génica se pudo inferir que la inducción de senescencia en hUC-MSCs mediante el modelo TIS fue completa.

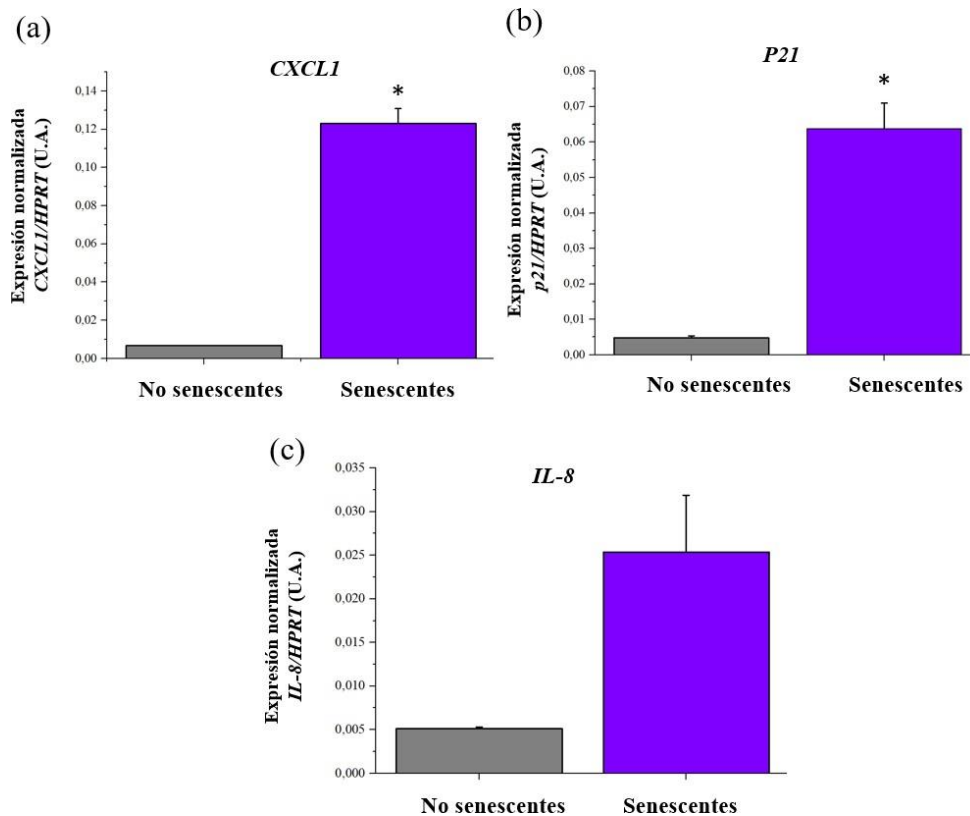


Figura 12. Expresión génica de los marcadores de SASP mediante qPCR. Niveles normalizados de ARNm de (a) *CXCL1*, (b) *CDKN1A* (*p21*) y (c) *IL-8* con respecto al gen control (*HPRT1*). Los resultados son de un experimento representativo. U.A (Unidades arbitrarias). Nivel de significación: $*=p<0,05$.

4.5 Caracterización de niosomas y nioplejos

4.5.1 Medición del tamaño y carga de niosomas

Una vez producidas las suspensiones de niosomas de colesterol y escualeno éstas fueron caracterizadas mediante un análisis del tamaño y carga de las mismas.

Los resultados obtenidos no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$) en cuanto al tamaño de ambas formulaciones de niosomas. Sin embargo, los niosomas formulados con escualeno ($266,52\pm 10,37$) mostraron un mayor tamaño respecto a las formulaciones conteniendo colesterol ($212,75\pm 0,91$). Del mismo modo, los valores de potencial Z de los niosomas de escualeno ($1,65\pm 0,12$) fueron ligeramente superiores a los niosomas formulados con colesterol ($1,5\pm 0,005$) (**Figura 13**), si bien no se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre ambos ($p=0,099$). Estos resultados concuerdan con estudios previos (49) observándose una mayor electropositividad de los niosomas de escualeno con respecto a aquellos formulados con colesterol.

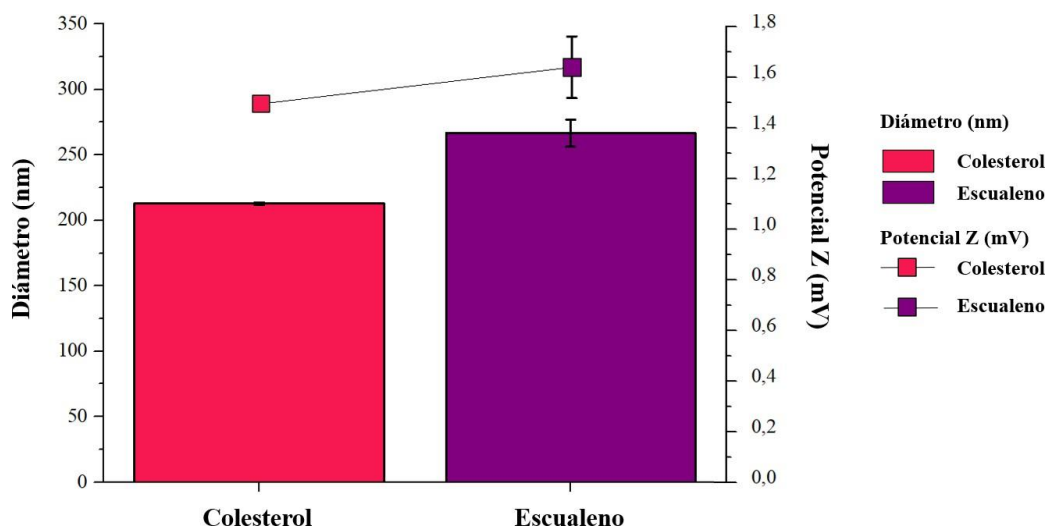


Figura 13. Representación agrupada del diámetro (nm; barras) y del potencial Z (mV; líneas) de las formulaciones de niosomas con colesterol y escualeno.

4.5.2 Ensayo de protección frente a la ADNasa

Uno de los principales factores que condicionan la idoneidad de los vectores no virales es su capacidad de protección del ADN debido a que a la presencia de enzimas en el citosol podrían degradar fácilmente el ADN y, por lo tanto, dificultar su llegada al núcleo celular (50).

Con el fin de evaluar la capacidad de los niosomas de proteger el pADN frente a la degradación en presencia de la enzima ADNasa, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los nioplejos generados a relaciones DOTMA/pADN (p/p) de 0, 5, 10, 15 y 20. La relación DOTMA/pADN de 0 fue utilizada como control de ADN plasmídico libre, es decir sin estar complejado con los niosomas.

Tal como se muestra en la **Figura 14**, la presencia de bandas correspondientes al ADN superenrollado en su conformación nativa (SC, del inglés: *supercoiled*, forma más activa) y circular abierto (OC, del inglés: *open circular*, forma menos activa) en ambas formulaciones confirmaron la capacidad de complejación de

los niosomas y la consecuente protección del pADN frente a la digestión enzimática.

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron una mayor capacidad de protección de las formulaciones de colesterol frente a las de escualeno. Así, la presencia de bandas SC correspondientes a la forma más activa del plásmido a todas las relaciones ensayadas de las formulaciones de colesterol, evidenciaron su capacidad de protección frente a la enzima ADNasa. Estos hallazgos concuerdan con resultados previos del grupo (38) en los que se constató la capacidad de protección del pADN con niosomas formulados con DOTMA, colesterol y P60 a estas mismas relaciones. En contra, tras la complejación del pADN con los niosomas de escualeno solo se apreciaron bandas SC a la relación de 5. Estas observaciones pueden deberse a una menor capacidad de condensación de pADN de los niosomas de escualeno que llevaría a una menor capacidad de protección (39).

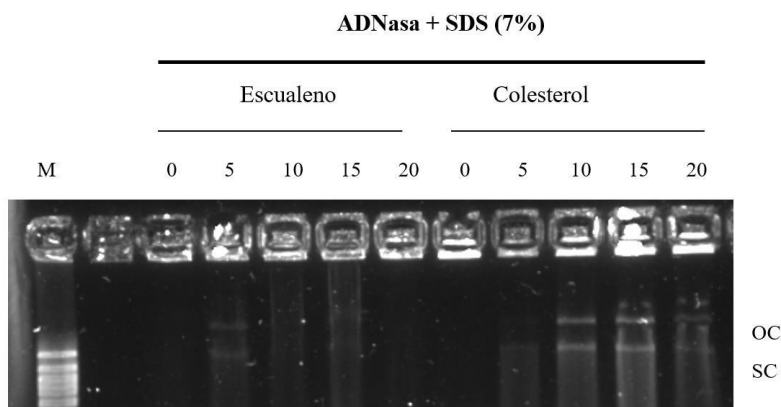


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los nioplejos de colesterol y escualeno formados a relaciones DOTMA/pADN de 0, 5, 10, 15 y 20 y posteriormente tratados con ADNasa+SDS (7%). OC: forma circular abierta del plásmido, SC: forma superenrollada del plásmido. En el primer carril se representa el marcador de peso molecular (M).

4.5.3 Ensayo de exclusión de SYBRTM Gold

El compuesto SYBRTM Gold es un colorante fluorescente de alta afinidad por el ADN, ampliamente utilizado en ensayos de biología molecular (51).

El principio del ensayo de exclusión de SYBRTM Gold se basa en que la complejación del pADN en los nioplejos obstaculiza la unión del fluoróforo SYBRTM Gold al mismo, lo que se traduce en una reducción de la emisión de su fluorescencia con respecto al plásmido en su forma libre. De este modo la capacidad de complejación es inversamente proporcional a la emisión de fluorescencia.

Tal como se aprecia en la **Figura 15**, a medida que se aumentó la relación DOTMA/pADN en ambas formulaciones de niosomas se observó una disminución de la fluorescencia relativa. En consonancia con estudios previos del grupo (32), las mayores capacidades de complejación fueron obtenidas a relaciones de 15 y 20, obteniéndose porcentajes de complejación en torno al 98 % para ambas formulaciones de niosomas

Cuando se compararon ambas formulaciones, los nioplejos de colesterol formados a la relación DOTMA/pADN de 5 evidenciaron porcentajes de fluorescencia relativa estadísticamente superiores a los de aquellos formados con escualeno a la misma relación ($p=0,002$).

Estos hallazgos ponen de manifiesto una mayor capacidad de complejación del plásmido pGL4.14[*luc2/Hygro*] con los niosomas de escualeno, frente a aquellos formulados con colesterol.

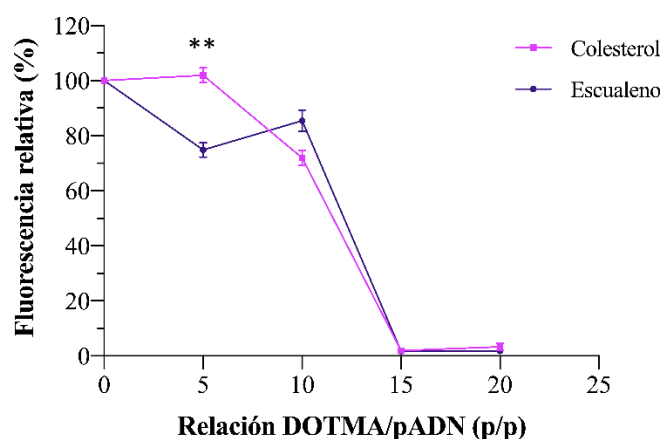


Figura 15. Fluorescencia relativa (%) de los complejos niosoma-pADN-SYBRTM Green a diferentes relaciones DOTMA/pADN. Nivel de significación: * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 tras comparar ambas formulaciones a la misma relación DOTMA/pADN.

4.6 Evaluación de la viabilidad de hUC-MSCs

En las **Figuras 16 y 17** se muestran los resultados de viabilidad celular de las hUC-MSCs (no senescentes, **Figura 16**; senescentes, **Figura 17**) a las 24 horas de la transfección con las formulaciones de niosomas de colesterol y escualeno a las relaciones DOTMA/pADN(p/p) de 5, 10, 15 y 20. Los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron comparados con los valores obtenidos con las hUC-MSCs sin transfectar (control negativo; C) y las hUC-MSCs transfectadas con el liposoma comercial LipofectaminaTM (control positivo; LPF) Ambos estudios fueron repetidos en 3 experimentos independientes y cada uno de ellos con tres réplicas técnicas con el fin de contrastar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Los ensayos de citotoxicidad en hUC-MSCs no senescentes de los pacientes #1, #2 y #3 mostraron valores de viabilidad superiores al 95, 99 y 97% respectivamente tras el tratamiento de las mismas con las distintas relaciones de nioplejos. Únicamente se evidenció una disminución significativa de la viabilidad respecto al control negativo (p=0,007) a las relaciones DOTMA/pADN (p/p) más altas (20) de los nioplejos de colesterol en las células del paciente #3. Por consiguiente, no se constató un perfil citotóxico de las formulaciones de niosomas a ninguna de las relaciones ensayadas en hUC-MSCs no senescentes. Estos resultados concuerdan con los descritos por Carballo-Pedrares y colaboradores (32), en los cuales se evidenció una alta supervivencia celular (~70%) de las líneas inmortalizadas de MSCs (iMSCs) transfectadas con nioplejos formulados con colesterol.

Asimismo, los niosomas evidenciaron porcentajes de viabilidad similares (99%) a los obtenidos con el liposoma comercial (100%) en los tres pacientes de estudio (p≥ 0,008). Estos resultados contrastan con estudios previos en los que se evidenció una disminución significativa de la viabilidad celular en líneas inmortalizadas de MSCs transfectadas con Lipofectamina (52). Las

discrepancias observadas entre ambos estudios podrían deberse a los diferentes tiempos de incubación estudiados (24 horas en el presente estudio frente a las 48 horas ensayadas por Carballo- Pedrares y colaboradores).

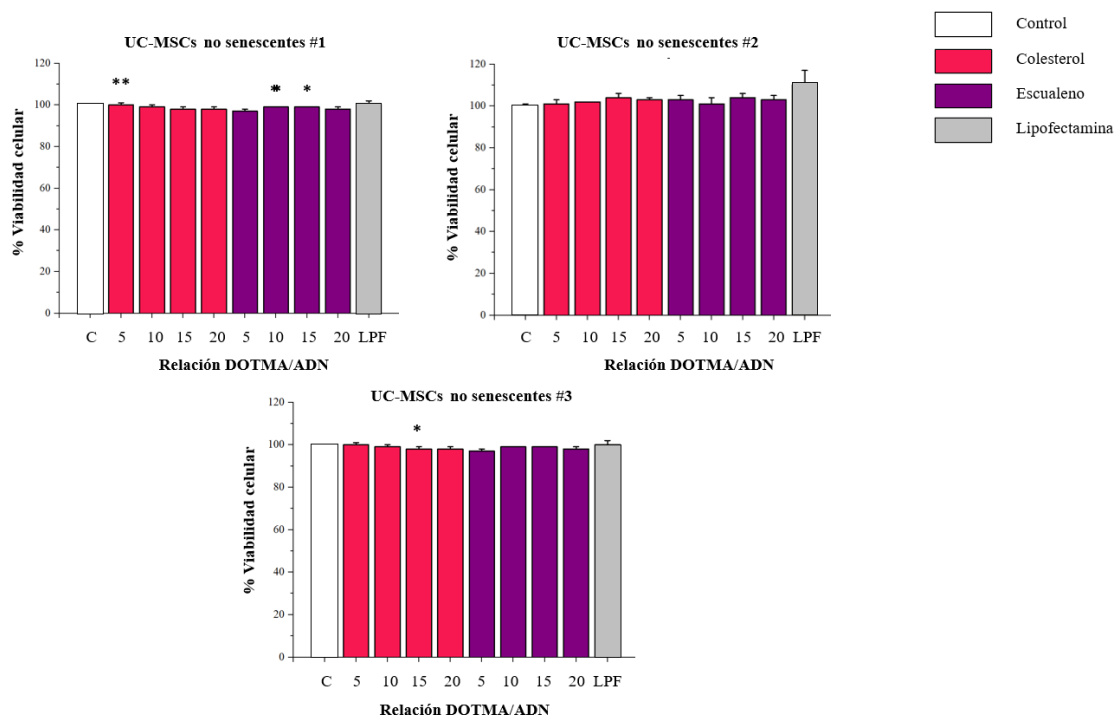


Figura 16. Viabilidad celular de hUC-MSCs no senescentes sin transfectar (C; control) o transfectadas con los nioplejos de colesterol y escualeno a las relaciones de DOTMA/pADN indicadas, o con el reactivo comercial Lipofectamina (LPF). Las barras representan la media \pm desviación típica de las 3 réplicas técnicas de cada formulación para los tres ensayos. Nivel de significación respecto al control negativo: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Por otro lado, los estudios de supervivencia celular en hUC-MSCs senescentes (**Figura 17**) tras la transfección con las distintas formulaciones de niosomas o el reactivo comercial mostraron porcentajes de viabilidad celular superior al 88% en los tres pacientes estudiados.

Asimismo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas formulaciones de niosomas (colesterol y escualeno) en lo que a su influencia sobre la supervivencia celular de las hUC-MSCs se refiere ($p \geq 0,876$).

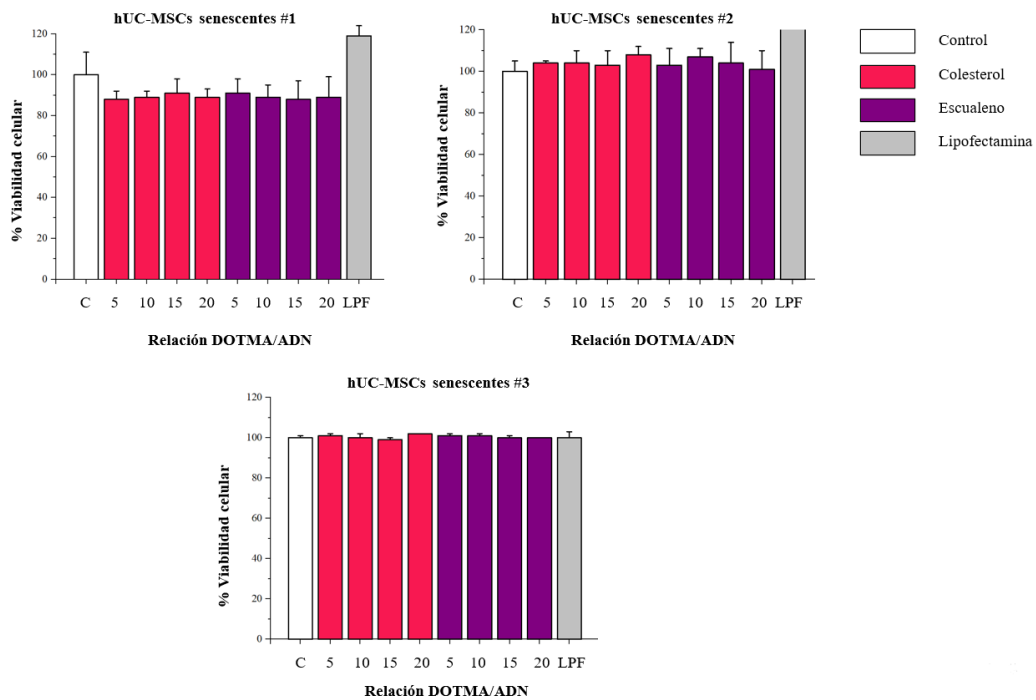


Figura 17. Viabilidad celular en hUC-MSCs senescentes transfectadas (C; control) o transfectadas con los nioplejos de colesterol y escualeno a las relaciones de DOTMA/pADN indicadas o con el reactivo comercial Lipofectamina (LPF). Las barras representan la media \pm desviación típica de las 3 réplicas técnicas de cada formulación para los tres ensayos. Nivel de significación respecto al control negativo: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.7 Evaluación de la eficiencia de transfección de hUC-MSCs

La evaluación de la eficacia de la transfección celular se basó en la cuantificación de la actividad luciferasa de las hUC-MSCs senescentes y no senescentes transfectadas con las formulaciones de niosomas a las distintas relaciones DOTMA/pADN(p/p). Al igual que en el ensayo de viabilidad celular se incluyó un control negativo de células sin transfectar (C) y un control positivo de células transfectedas con el reactivo comercial Lipofectamina (LPF).

En general, las formulaciones de niosomas de colesterol llevaron a un incremento de la eficiencia de transfección de hUC-MSCs no senescentes con respecto al Liposoma comercial a todas las relaciones DOTMA/pADN ensayadas. Así los nioplejos de colesterol incrementaron la actividad luciferasa hasta 5 veces con respecto al Liposoma comercial cuando se formularon a una relación DOTMA/pADN (p/p) de 5 en hUC-MSCs no senescentes, si bien no se observaron diferencias significativas entre ellos ($p \geq 0,394$). Esta misma tendencia

fue observada a relaciones intermedias de 10 y 15 incrementado dicha actividad hasta 2 (paciente #1) y 5 veces (paciente #3) respectivamente ($p \leq 0,812$). El incremento de la cantidad de DOTMA de los nioplejos a 20 no supuso una mejora significativa de dicha eficiencia, siendo esta 2 veces superior a la alcanzada con el reactivo comercial (paciente #1; $p \leq 1,000$).

A su vez, los nioplejos de escualeno a la relación de 15 evidenciaron la mayor eficiencia de transfección en comparación al resto nioplejos estudiados en el paciente #3, registrándose un incremento de la actividad luciferasa de las células transfectadas hasta 8 veces superior respecto al control de Lipofectamina ($p=0,936$). También se registraron altas eficiencias de transfección a la relación DOTMA/pADN(p/p) de 20, incrementando hasta 3 veces la actividad luciferasa con respecto a las células transfectadas con el liposoma comercial ($p= 0,936$). Estudios previos en los que se utilizaron niosomas de escualeno para la transferencia de un plásmido reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP; del inglés *Green fluorescent protein*) a relación DOTMA/pADN(p/p) de 30 en células del epitelio pigmentario de retina ARPE-19, atribuyeron la eficiencia de transfección de estas formulaciones a la facilidad de reconocimiento de los mismos por parte de las células, contribuyendo a aumentar su permeabilidad (49).

Asimismo, las relaciones de 5 y 10 en las formulaciones de escualeno únicamente evidenciaron eficiencias de transfección superiores a las de los lipoplejos de Lipofectamina en el paciente #1, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=1,000$).

Comparando ambas formulaciones se puede concluir que los niosomas de colesterol fueron más eficientes para la transfección de hUC-MSCs no senescentes a relaciones bajas e intermedias (relaciones 5 y 15) en concordancia con estudios previos (32) en iMSCs transfectadas con formulaciones de niosomas de colesterol. Mientras tanto, los nioplejos de escualeno mostraron mayores eficiencias a la relación más alta estudiada (relación 20). Estos hallazgos concuerdan con los descritos por Ojeda y colaboradores obteniéndose las eficiencias más altas de transfección con

nioplejos de escualeno formulados a relaciones de 30 (49). Asimismo, estudios realizados en MSCs corroboran la eficiencia de transfección por parte de los vectores no virales basados en niosomas (40).

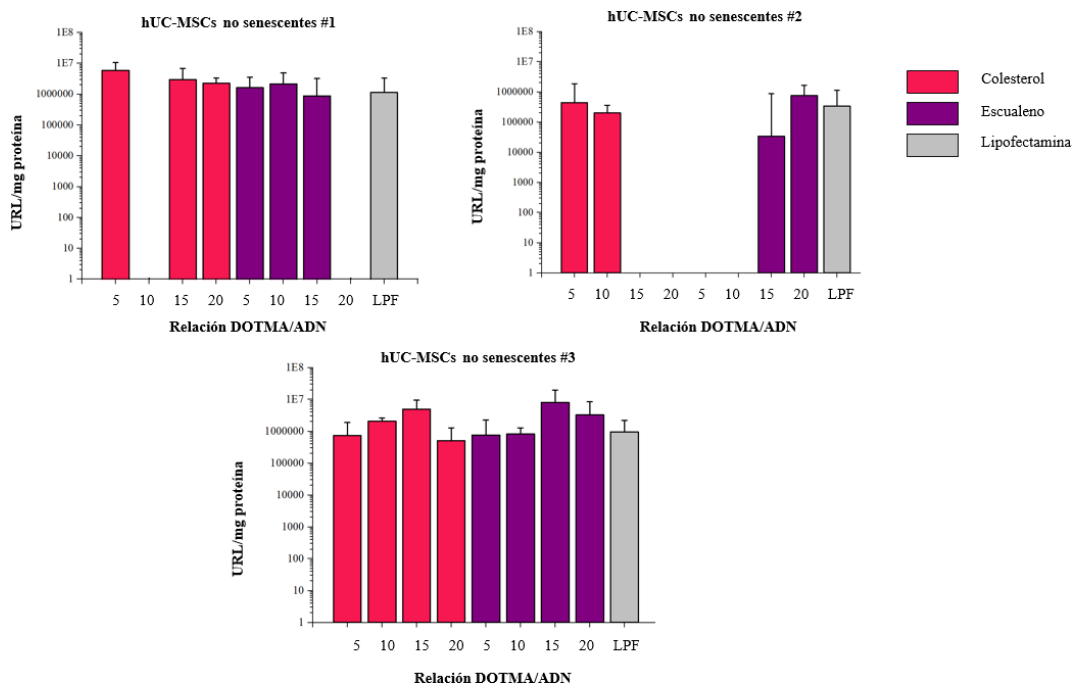


Figura 18. Eficiencia de transfección en hUC-MSCs no senescentes transfectadas con nioplejos de formulaciones de colesterol y escualeno a diferentes relaciones de DOTMA/pADN en comparación con hUC-MSCs transfectadas con Lipofectamina (LPF). Las barras representan la media \pm desviación típica de las 3 réplicas técnicas de cada formulación para los tres ensayos.

En el caso de las hUC-MSCs senescentes (**Figura 19**), los niosomas formulados con colesterol mostraron resultados favorables de transfección a todas las relaciones estudiadas en el paciente #1, exhibiendo las células una actividad luciferasa hasta 8 veces superior a la obtenida con el liposoma comercial ($p > 0,799$). En contraste, no se detectó un incremento de la actividad luciferasa en las células senescentes transfectadas con nioplejos de colesterol en el paciente #3, en comparación con los lipoplejos de Lipofectamina. Del mismo modo, debido posiblemente a un error experimental durante la transfección, no se registraron valores de transfección detectables con el reactivo comercial Lipofectamina de las células aisladas del paciente #2. Este hecho imposibilitó la

realización de comparaciones entre los nioplejos y los lipoplejos en las células de este paciente.

En cuanto a las formulaciones de escualeno, las mayores eficiencias de transfección fueron alcanzadas con los nioplejos formados a relaciones DOTMA/pADN (p/p) de 10, incrementando los valores de transfección hasta 8 veces con respecto a aquellos obtenidos con Lipofectamina ($p > 0,840$). El incremento de la relación DOTMA/pADN de 10 hasta 20 dio lugar a disminución de las eficiencias de transfección en los pacientes (#1, #3), resultando las mismas no estadísticamente significativas.

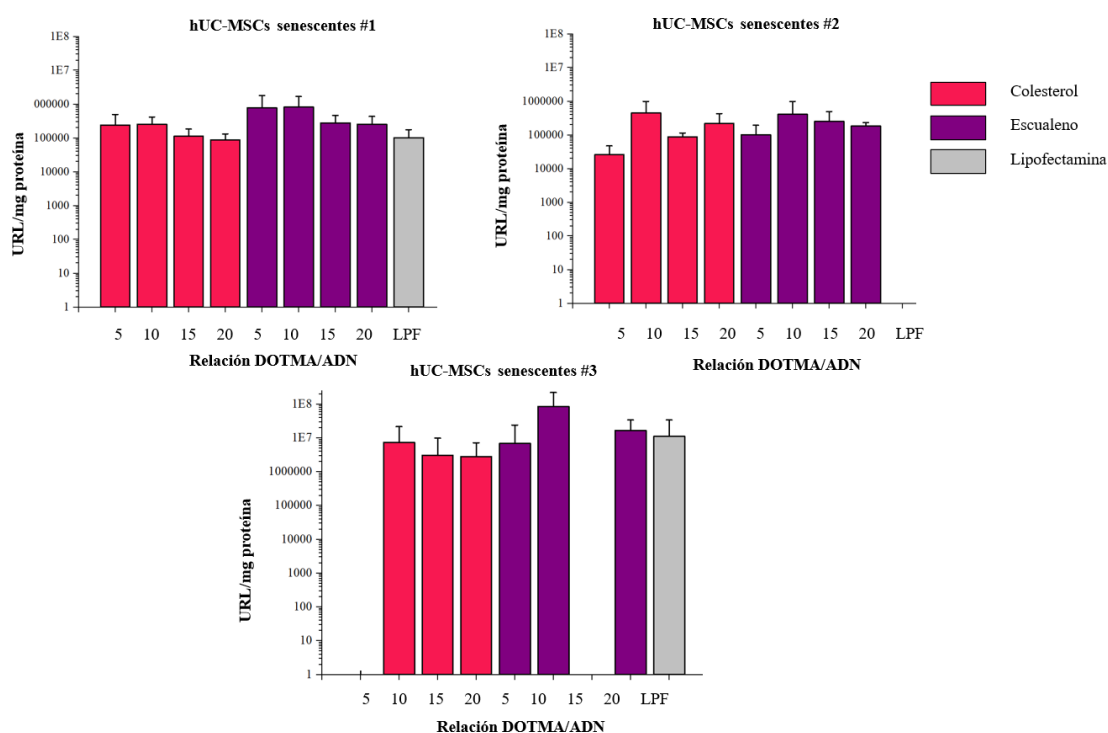


Figura 19. Eficiencia de transfección en hUC-MSCs senescentes transfectadas con nioplejos de formulaciones de colesterol y escualeno a diferentes relaciones de DOTMA/pADN en comparación con hUC-MSCs transfectadas con Lipofectamina (LPF). Las barras representan la media \pm desviación típica de las 3 réplicas técnicas de cada formulación para los tres ensayos. Nivel de significación: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

A falta de datos previos en la bibliografía con los que contrastar estos resultados, se puede concluir que en base al presente estudio experimental las formulaciones de colesterol resultaron más eficientes a relaciones de 5 y 10, mientras que las formulaciones de escualeno promovieron la mayor eficiencia de transfección a la relación DOTMA/pADN (p/p) de 10.

Finalmente, es preciso señalar que las discrepancias observadas en los resultados de transfección tanto en las células no senescentes como senescentes de los 3 pacientes (#1, #2 y #3), podrían por un lado atribuirse a la propia variabilidad intrínseca de las hUC-MSCs al tratarse de cultivos primarios, así como a las propias fluctuaciones de las condiciones experimentales al tratarse de tres ensayos independientes. De este modo, sería necesario realizar más ensayos para obtener resultados más consistentes y reproducibles con objeto de determinar las condiciones más idóneas para la transfección de hUC-MSCs con niosomas, y su aplicabilidad en investigación con modelos de senescencia celular con fines de investigación biomédica.

4. Conclusiones

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

- Se aislaron MSCs a partir de muestras de estroma de cordón umbilical que exhibieron una caracterización morfológica afín a este tipo celular.
- Se desarrolló un modelo de senescencia (TIS) sobre estas células, basado en el empleo del fármaco Palbociclib, que provoca su entrada en senescencia a través de la expresión de los marcadores de senescencia (CXCL1, CDKN1A y IL-8) y pérdida de la capacidad proliferativa de las mismas.
- Se generaron dos formulaciones de niosomas conteniendo colesterol o escualeno como lípido auxiliar, presentando ambas, características fisicoquímicas apropiadas para la transfección celular de hUC-MSCs.
- Ninguna de las formulaciones de niosomas ensayadas resultó citotóxica como vehículo de transfección de hUC-MSCs.
- Los nioplejos de colesterol formados a la relación DOTMA/pADN (p/p) de 5 mostraron eficiencia para la transfección de hUC-MSCs senescentes y no senescentes.

5. Agradecimientos

Quisiera agradecer a los Doctores Juan Antonio Fafián Labora y Ana Rey Rico por hacer posible este trabajo con su ayuda, paciencia y dedicación. Gracias a la Fundación San Rafael por concederme la beca para cursar este máster. Gracias también al grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (TCMR) del CICA e INIBIC por acompañarme en este proyecto y brindarme su tiempo y ayuda: a Diego, Junquera, Rocío, Carmen, Sergio y especial mención a Natalia Carballo Pedrares por acompañarme durante tantas horas de ensayos experimentales. Agradezco a la coordinadora de este máster Silvia María Díaz Prado por su orientación a lo largo de todo el curso y a mis compañeras de máster, familiares y amigos por su apoyo y confianza.

6. Bibliografía

1. Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jul 19 [cited 2022 Apr 21];17(7). Available from: [/pmc/articles/PMC4964536/](#)
2. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2022 Apr 25];32(6):1408–19. Available from: <https://academic.oup.com/stmcls/article/32/6/1408/6444515>
3. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Apr 21];15(1):36. Available from: [/pmc/articles/PMC5765738/](#)
4. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Apr 20];6(12):2173. Available from: [/pmc/articles/PMC5702523/](#)
5. Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jul 19 [cited 2022 Mar 7];17(7). Available from: [/pmc/articles/PMC4964536/](#)
6. Li J, Luo M, Li B, Lou Y, Zhu Y, Bai X, et al. Immunomodulatory Activity of Mesenchymal Stem Cells in Lupus Nephritis: Advances and Applications. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Mar 10 [cited 2022 Apr 25];13:1. Available from: [/pmc/articles/PMC8960601/](#)
7. Schmeer C, Kretz A, Wengerodt D, Stojiljkovic M, Witte OW. Dissecting Aging and Senescence—Current Concepts and Open Lessons. *Cells* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 May 30];8(11). Available from: [/pmc/articles/PMC6912776/](#)
8. Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Feb 21 [cited 2022 May 27];8:107. Available from:

- /pmc/articles/PMC7047768/
9. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 May 28];28(6):436–53. Available from: <http://www.cell.com/article/S0962892418300205/fulltext>
 10. Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, Hara E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 May 28];108(4):563. Available from: /pmc/articles/PMC5406532/
 11. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 27];32(43):5129–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23416979/>
 12. Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Feb 21 [cited 2022 May 30];8:107. Available from: /pmc/articles/PMC7047768/
 13. Weng Z, Wang Y, Ouchi T, Liu H, Qiao X, Wu C, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2022 Apr 29 [cited 2022 May 29];11(4):356. Available from: /pmc/articles/PMC9052415/
 14. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* [Internet]. 2020 Dec 12 [cited 2022 May 30];34(23–24):1565. Available from: /pmc/articles/PMC7706700/
 15. Narasimhan A, Flores RR, Robbins PD, Niedernhofer LJ. Role of Cellular Senescence in Type II Diabetes. *Endocrinology* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 Jun 1];162(10):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34363464/>
 16. Santin Y, Lluet P, Rischmann P, Gamé X, Mialet-Perez J, Parini A. Cellular Senescence in Renal and Urinary Tract Disorders. *Cells* [Internet]. 2020 Nov 5 [cited 2022 Jun 1];9(11). Available from: /pmc/articles/PMC7694377/
 17. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Jun 1];217(1):65. Available from: /pmc/articles/PMC5748990/

18. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Feb 23 [cited 2022 Jun 1];8. Available from: [/pmc/articles/PMC5331226/](#)
19. Papatheodoridi AM, Chrysavgis L, Koutsilieris M, Chatzigeorgiou A. The Role of Senescence in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jun 1];71(1):363–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31230380/>
20. Coryell PR, Diekman BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jun 1];17(1):47. Available from: [/pmc/articles/PMC8035495/](#)
21. Um S, Ha J, Choi SJ, Oh W, Jin HJ. Prospects for the therapeutic development of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 22];12(12):1511. Available from: [/pmc/articles/PMC7789129/](#)
22. Shareghi-oskoue O, Leili A-M, Yousefi M. Transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells to treat premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12:454.
23. Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2015 Sep 2 [cited 2022 Apr 14];15(9):1293–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26067213/>
24. Arrigoni C, D'Arrigo D, Rossella V, Candrian C, Albertini V, Moretti M. Umbilical Cord MSCs and Their Secretome in the Therapy of Arthritic Diseases: A Research and Industrial Perspective. *Cells* [Internet]. 2020 May 28 [cited 2022 Apr 22];9(6). Available from: [/pmc/articles/PMC7348802/](#)
25. Zhao X, Zhao Y, Sun X, Xing Y, Wang X, Yang Q. Immunomodulation of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles in Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Oct 29 [cited 2022 May 30];8. Available from: [/pmc/articles/PMC7673418/](#)

26. Jeon OH, David N, Campisi J, Elisseff JH. Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. *J Clin Invest* [Internet]. 2018 Apr 2 [cited 2022 Jun 1];128(4):1229–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29608139/>
27. Uzieliene I, Kalvaityte U, Bernotiene E, Mobasher A. Non-viral Gene Therapy for Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Jan 13 [cited 2022 Apr 24];8:618399. Available from: </pmc/articles/PMC7838585/>
28. Gonçalves GAR, Paiva R de MA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 May 30];15(3):369. Available from: </pmc/articles/PMC5823056/>
29. Chen X, Nomani A, Patel N, Nouri FS, Hatefi A. Bioengineering a Non-Genotoxic Vector for Genetic Modification of Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 May 30];152:1. Available from: </pmc/articles/PMC5671363/>
30. Uzieliene I, Kalvaityte U, Bernotiene E, Mobasher A. Non-viral Gene Therapy for Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Jan 13 [cited 2022 May 30];8. Available from: </pmc/articles/PMC7838585/>
31. Grijalvo S, Puras G, Zárata J, Sainz-Ramos M, Qtaish NAL, López T, et al. Cationic niosomes as non-viral vehicles for nucleic acids: Challenges and opportunities in gene delivery. Vol. 11, *Pharmaceutics*. 2019.
32. Carballo-Pedrares N, Kattar A, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, Rey-Rico A. Niosomes-based gene delivery systems for effective transfection of human mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C*. 2021 Sep 1;128:112307.
33. Bartelds R, Nematollahi MH, Pols T, Stuart MCA, Pardakhty A, Asadikaram G, et al. Niosomes, an alternative for liposomal delivery. *PLoS One* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 May 30];13(4). Available from: </pmc/articles/PMC5896898/>
34. Attia N, Mashal M, Grijalvo S, Eritja R, Zárata J, Puras G, et al. Stem cell-based gene delivery mediated by cationic niosomes for bone regeneration. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2018 Feb 1;14(2):521–31.
35. Yeo PL, Lim CL, Chye SM, Ling APK, Koh RY. Niosomes: A review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications.

- Asian Biomed. 2017 Aug 1;11(4):301–13.
36. Ojeda E, Agirre M, Villate-Beitia I, Mashal M, Puras G, Zarate J, et al. Elaboration and Physicochemical Characterization of Niosome-Based Nioplexes for Gene Delivery Purposes. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 4];1445:63–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27436313/>
 37. Al Qtaish N, Gallego I, Villate-Beitia I, Sainz-Ramos M, López-Méndez TB, Grijalvo S, et al. Niosome-based approach for in situ gene delivery to retina and brain cortex as immune-privileged tissues. Vol. 12, *Pharmaceutics*. 2020.
 38. Carballo-Pedrares N, Kattar A, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, Rey-Rico A. Niosomes-based gene delivery systems for effective transfection of human mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Jun 1];128. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34474858/>
 39. Stellwagen NC, Stellwagen E. Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility. *J Chromatogr A*. 2009 Mar 6;1216(10):1917–29.
 40. Attia N, Mashal M, Grijalvo S, Eritja R, Zárata J, Puras G, et al. Stem cell-based gene delivery mediated by cationic niosomes for bone regeneration. *Nanomedicine* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Jul 14];14(2):521–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29157978/>
 41. Mangini NS, Wesolowski R, Ramaswamy B, Lustberg MB, Berger MJ. Palbociclib: A Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor for Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *Ann Pharmacother* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jul 12];49(11):1252. Available from: </pmc/articles/PMC7331461/>
 42. Maskey RS, Wang F, Lehman E, Wang Y, Emmanuel N, Zhong W, et al. Sustained mTORC1 activity during palbociclib-induced growth arrest triggers senescence in ER+ breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2021;20(1).
 43. Understanding Dynamic Light Scattering Theory - Wyatt Technology [Internet]. [cited 2022 Jul 15]. Available from: <https://www.wyatt.com/library/theory/dynamic-light-scattering-theory.html>
 44. alamarBlue Assays for Cell Viability | Thermo Fisher Scientific - ES

- [Internet]. [cited 2022 Jul 15]. Available from: https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/alamarblue-assay-cell-viability.html?ef_id=CjwKCAjw_b6WBhAQEiwAp4HyIEoVyrzbX4kv-3MM9iZVx60fCaXRVmKtvTz7CnMTflwLZoUMT_R6xoCFoIQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!585719784892!e!!g!!alarblue&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con&gclid=CjwKCAjw_b6WBhAQEiwAp4HyIEoVyrzbX4kv-3MM9iZVx60fCaXRVmKtvTz7CnMTflwLZoUMT_R6xoCFoIQAvD_BwE
45. Pierce™ BCA Protein Assay Kit [Internet]. [cited 2022 Jul 11]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>
 46. Mato-Basalo R, Morente-López M, Arntz OJ, van de Loo FAJ, Fafián-Labora J, Arufe MC. Therapeutic potential for regulation of the nuclear factor Kappa-B transcription factor p65 to prevent cellular senescence and activation of pro-inflammatory in mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
 47. Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prosperi E. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2022 Jul 5];89(2):155–78. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-014-1430-4>
 48. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2022 Jul 5];7(2):122. Available from: [/pmc/articles/PMC1871893/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/161871893/)
 49. Ojeda E, Puras G, Agirre M, Zarate J, Grijalvo S, Eritja R, et al. The role of helper lipids in the intracellular disposition and transfection efficiency of niosome formulations for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *Int J Pharm* [Internet]. 2016 Apr 30 [cited 2022 Jul 12];503(1–2):115–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26956159/>
 50. Midoux P, Monsigny M. Efficient Gene Transfer by Histidylated Polylysine/pDNA Complexes. *Bioconjug Chem* [Internet]. 1999 [cited 2022 Jul 16];10(3):406–11. Available from:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc9801070>

51. Kolbeck PJ, Vanderlinden W, Gemmecker G, Gebhardt C, Lehmann M, Lak A, et al. Molecular structure, DNA binding mode, photophysical properties and recommendations for use of SYBR Gold. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 May 21 [cited 2022 Jul 5];49(9):5143–58. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/9/5143/6255699>
52. Puras G, Mashal M, Zárate J, Agirre M, Ojeda E, Grijalvo S, et al. A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *J Control Release* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 13];174(1):27–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24231407/>