

Proyecto Final de Carrera  
BIOINGENIERÍA



---

Modificación genética de  
células madre mesenquimales  
para la sobreexpresión de SPARC

---

Luciana De Cesare

Tutores: Dr. Carlos Luzzani  
Lic. Antonella Lombardi

Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias  
FLENI/CONICET

Marzo 2021

# Agradecimientos

En primer lugar, no quiero dejar de agradecer a todas y cada una de las personas del LIAN, que me integraron y me ayudaron desde el día 1. Especialmente, un gracias enorme a Santiago, por permitirme unirme a este hermoso grupo de trabajo; a Charly, que me aceptó desde el primer momento; a Anto, que me enseñó casi todo; y a Darío, que me enseñó el resto.

Gracias totales a mi familia, que me bancó a lo largo de todos estos años. Gracias por siempre creer en mí, y por convencerme de que soy capaz de realizar todo lo que me proponga.

Gracias a mis amigas del ITBA, sin las cuales no hubiese sobrevivido a estos casi cinco años. Y gracias a Marto, mi compañero en todo, por compartir y por escuchar.

Este trabajo, mi Proyecto Final, también es un poco de ustedes.

# Resumen

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células madre multipotentes que se caracterizan por sus acciones de inmunomodulación, angiogénesis, antiapoptosis, estimulación de mitosis y quimioatracción. Estas propiedades regenerativas, que las MSCs ejercen sobre otras células del entorno por medio de su secretoma, las han hecho un blanco de estudio interesante para el desarrollo de terapias celulares. Una de las moléculas de interés terapéutico que son secretadas por estas células es SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*), una proteína de la matriz extracelular que está implicada en el cerrado de heridas.

En este Proyecto Final se busca modificar genéticamente MSCs para que sobreexpresen SPARC, con el objetivo final de potenciar los efectos regenerativos de las MSCs. Para ello, se diseñó y clonó un plásmido basado en Virus Adeno-Asociado que contiene la secuencia codificante de la proteína.

En cuanto a la introducción del plásmido dentro de la célula, se experimentó con vectores virales (Adenovirus) y no virales (nanopartículas y electroporación). Se analizó la eficiencia de transducción/transfección y la expresión de ARNm correspondiente a SPARC, y se determinó que el plásmido diseñado cumple con su objetivo de diseño, ya que resultó en una expresión cuatro veces mayor del transcripto de la proteína en las MSCs transfectadas por electroporación.

Una vez lograda la modificación genética transitoria de las células, se analizó mediante experimentos *in vitro* la capacidad regenerativa de las células. Estos ensayos de funcionalidad sirvieron para comparar los efectos biológicos de las células transfectadas respecto de las *wild type*, y se encontró que las células que sobreexpresan SPARC tienen una mayor acción proliferativa sobre otras células.

Además, teniendo como foco que una futura aplicación clínica basada en MSCs requeriría de gran cantidad de células, se experimentó con distintos tipos de cultivo. Al comparar la amplificación de estas células en placas 2D y biorreactores 3D, se halló una alternativa de cultivo escalable y práctica para la expansión de MSCs, que crecen en adherencia.

# Glosario de Contracciones

- AAV: *Adeno-Associated Virus*
- Ad: Adenovirus
- CMV: Citomegalovirus
- eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*
- FGF2: *Fibroblast Growth Factor 2*
- GFP: *Green Fluorescent Protein*
- HIF-1 $\alpha$ : *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*
- LB: *Lysogeny broth*
- MSC: *Mesenchymal Stem Cell*
- MOI: *Multiplicity Of Infection*
- PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*
- PEI: Polietilenimina
- PKB: *Protein Kinase B*
- SFB: Suero Fetal Bovino
- SPARC: *Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich*
- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
- WJ: *Wharton Jelly*

# Índice general

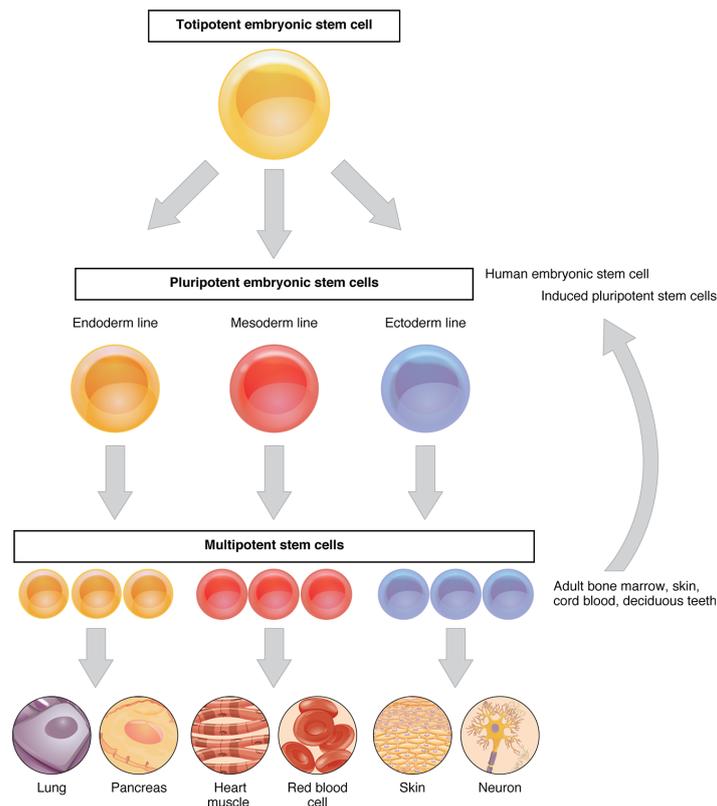
<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Células madre . . . . .	1
1.1.1	Células madre mesenquimales . . . . .	2
1.2	SPARC . . . . .	4
1.3	Técnicas de ingeniería genética . . . . .	7
1.3.1	Vectores virales y no virales . . . . .	8
1.3.2	Aplicación clínica . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Antecedentes, Hipótesis y Objetivos</b>	<b>15</b>
2.1	Antecedentes . . . . .	15
2.2	Hipótesis . . . . .	17
2.3	Objetivo general . . . . .	17
2.4	Objetivos específicos . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>19</b>
3.1	Cultivo celular . . . . .	19
3.2	Infección con Ad SPARC . . . . .	20
3.3	Producción de plásmido con inserto de SPARC . . . . .	20
3.3.1	Diseño <i>in silico</i> del plásmido AAV SPARC . . . . .	20
3.3.2	Clonado de SPARC en el plásmido AAV . . . . .	21
3.4	Transfección de MSCs con AAV SPARC . . . . .	25
3.4.1	Transfección con nanopartículas de PEI . . . . .	25
3.4.2	Transfección por electroporación . . . . .	25
3.5	Análisis de la expresión génica . . . . .	26
3.5.1	Microscopía . . . . .	26
3.5.2	Citometría de flujo . . . . .	26
3.5.3	PCR en tiempo real . . . . .	26
3.6	Análisis de funcionalidad biológica de WJ-MSCs modificadas . . . . .	27
3.6.1	Ensayo de proliferación . . . . .	27

<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>29</b>
4.1	Cultivo celular en 2D y 3D . . . . .	29
4.2	Transducción de las MSCs con Ad SPARC . . . . .	31
4.3	Clonado de SPARC . . . . .	33
4.3.1	Diseño <i>in silico</i> del plásmido AAV SPARC . . . . .	33
4.3.2	Clonado del SPARC <i>in vitro</i> . . . . .	38
4.4	Transfección de las MSCs con AAV SPARC . . . . .	45
4.4.1	Transfección por nanopartículas . . . . .	45
4.4.2	Transfección por electroporación . . . . .	46
4.5	Análisis de funcionalidad biológica de WJ-MSCs modificadas . .	50
4.5.1	Proliferación . . . . .	50
<b>5</b>	<b>Discusión</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>57</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>58</b>

# 1 Introducción

## 1.1. Células madre

Las células madre se caracterizan por su capacidad proliferativa, y su potencial para diferenciarse en distintos tipos celulares. Según este último aspecto, pueden clasificarse en células madre totipotentes, pluripotentes y multipotentes. Un esquema de este proceso de diferenciación celular, con los diferentes estadios involucrados, se observa en la Figura 1.



**Figura 1:** Esquema de células madre según su capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares. Fuente: [1].

Ejemplos típicos de células totipotentes son el cigoto y la mórula. Estas células se caracterizan por tener la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares del cuerpo humano, incluso en la placenta y otros tejidos extraembrionarios.

Un paso más adelante en el desarrollo embrionario se encuentran las células pluripotentes, que tienen la capacidad de generar células pertenecientes a las tres láminas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). En este grupo se encuentran tanto las células madre embrionarias, que se obtienen del macizo celular interno del embrión en su fase de blastocisto, como las células pluripotentes inducidas, que resultan de un proceso de reprogramación *in vitro* de células ya diferenciadas.

Se conoce como células madre multipotentes a las que tienen la capacidad de diferenciarse en células pertenecientes a una única lámina germinal. Las células pertenecientes al ectodermo se diferencian en tejidos del sistema nervioso, la piel y las glándulas suprarrenales. Por otro lado, las células del mesodermo se diferencian en tejidos cardíaco, renal, muscular, y en las células de la sangre, entre otras. Finalmente, las células del endodermo se diferencian en múltiples órganos internos, como los pertenecientes al aparato digestivo y el respiratorio.

### 1.1.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) son células multipotentes adultas, y como tales contribuyen a la homeostasis de los tejidos. Son ubicuas en el organismo, ya que se las puede encontrar en el tejido sinovial, la médula ósea, la gelatina de Wharton (WJ) del cordón umbilical, el músculo, y el tejido adiposo, entre otros. Estas células tienen la característica de poder diferenciarse a células adultas de tejido conectivo, incluyendo por ejemplo hueso, cartílago, tendón, músculo y grasa.

En un principio, las MSCs llamaron la atención dentro del campo de la medicina regenerativa justamente por su potencial de diferenciarse en estos distintos tipos celulares. Está demostrado que estas células son reclutadas a los sitios de lesión e inflamación [2], y se postuló que las mismas podrían diferenciarse en los diferentes tejidos necesarios para la reparación del daño. Sin embargo, actualmente se considera que el potencial regenerativo de las células mesenquimales no proviene únicamente de su diferenciación en distintos fenotipos, sino más bien de

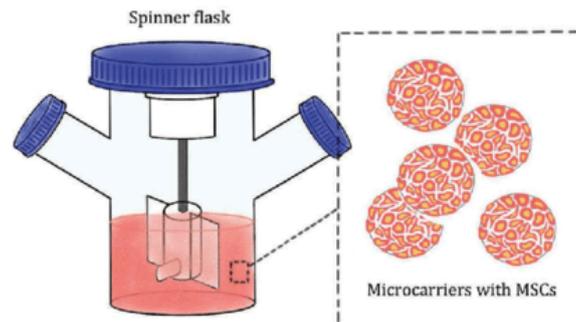
sus efectos paracrinos sobre otras células. A través de su secretoma, que incluye citoquinas y factores de crecimiento, entre otras moléculas, las MSCs tienen funciones de inmunomodulación, angiogénesis, antiapoptosis, estimulación de mitosis y quimioatracción [3]. Estas características contribuyen favorablemente a proveer un entorno regenerativo, lo que hace de estas células potenciales blancos de terapias celulares.

Los efectos paracrinos de las células mesenquimales se logran tanto con la secreción directa de factores solubles al medio extracelular como a través de vesículas extracelulares. En particular, los exosomas son un tipo de vesícula extracelular pequeña, de entre 50 y 100 nm de diámetro, y contienen lípidos, ARN mensajero, micro ARN (miRNA), y proteínas [4]. Pueden encontrarse en múltiples fluidos corporales, como la orina, la sangre y el líquido cefalorraquídeo, y median, al menos parcialmente, las actividades inmunosupresoras y pro-regenerativas características de las MSCs. Además, los exosomas, por su tamaño y estabilidad, no generan una respuesta inmunológica y pueden producirse y almacenarse en grandes cantidades, lo que los hace un blanco de estudio para futuras terapias libres de células, brindando ventajas no solo biológicas, sino también logísticas y de escalabilidad.

Ya sea para terapias celulares o acelulares, las MSCs tienen un gran potencial para aplicaciones clínicas. El desarrollo de terapias basadas en células madre mesenquimales requiere de grandes cantidades de células, ya que estos tratamientos utilizan dosis de entre 50.000 y 6 millones de células [5]. Además, es necesario que las mismas conserven el fenotipo característico de MSC, incluyendo la capacidad auto-regenerativa, el potencial para diferenciarse en distintos tipos celulares y, fundamentalmente, la secreción de factores tróficos [6].

Debido a que las células madre mesenquimales crecen en adherencia, el cultivo de las mismas requiere de una superficie de la cual anclarse. Aunque los métodos tradicionales son útiles para amplificar MSCs, los mismos son altamente imprácticos para el cultivo de grandes cantidades de células. La perspectiva de una posible terapia basada en este tipo de células madre revitalizó el interés en el campo de los biorreactores [5]. Estas herramientas de cultivo en tres dimensiones permiten la producción de grandes cantidades de células con una mayor eficiencia espacial. Para llevar a cabo el cultivo en suspensión de estas células dependientes

de adherencia, comúnmente se utilizan microesferas (*microcarriers*) de entre 100 y 300  $\mu\text{m}$  de diámetro, con diferentes recubrimientos, que ofrecen una alta relación superficie-volumen, resultando en una mayor cantidad de células por unidad de volumen [6]. En la Figura 2 se muestra un modelo de biorreactor que permite el cultivo 3D con agitación.



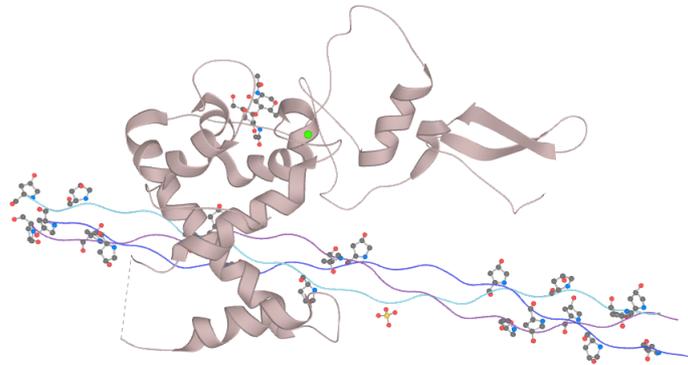
**Figura 2:** Esquema de biorreactor del tipo *spinner flask* para cultivo 3D con *microcarriers* en suspensión. Fuente: [7].

Los sistemas de cultivo en tres dimensiones, entonces, se plantean como una alternativa para lograr una gran expansión de células evitando el cuello de botella de las técnicas tradicionales. De esta manera, la utilización de biorreactores permitiría escalar la producción de células madre mesenquimales para potenciales aplicaciones en terapias regenerativas.

## 1.2. SPARC

Una de las proteínas que se encuentra presente en el secretoma de las células madres mesenquimales es SPARC (*secreted protein acidic and cysteine rich*), también conocida como osteonectina o BM-40. Se trata de una glicoproteína de 40 kDa que se encuentra presente en la matriz extracelular de tejidos tanto mineralizados y como no mineralizados. Aunque originalmente se propuso que SPARC es un homodímero formado por dos cadenas de 233 aminoácidos, actualmente se postula que se trata de una única cadena de 303 aminoácidos. La estructura tridimensional de SPARC, reportada por Hohenester *et al.* [8] se muestra unida a

cadena de colágeno, en la Figura 3, visualizada a utilizando el programa LiteMol [9] dentro de la web UniProt [10].



**Figura 3:** Estructura tridimensional de SPARC. En la representación se observa la glicosilación de la proteína y, en verde, los iones  $\text{Ca}(2+)$  en sus respectivos sitios de unión, así como también las cadenas de colágeno con las cuales SPARC forma complejos. Fuente: [10].

El gen que codifica para esta proteína, con el mismo nombre, se encuentra localizado en el cromosoma 5 del genoma humano. Como consecuencia de los mecanismos de *splicing* alternativo, existen tres transcritos posibles del gen SPARC, que se traducen en tres isoformas diferentes de la proteína, según lo reportado en la base de datos NCBI [11]. La representación tridimensional de la Figura 3 corresponde a la conformación predominante, que es la isoforma 1. La isoforma 2 es únicamente un aminoácido más corta que la 1, mientras que la isoforma 3 cuenta con un extremo C-terminal más largo, resultando en una secuencia de 341 aminoácidos [12].

El rol de las proteínas de la familia de SPARC no es estructural, sino que se encargan de mediar las interacciones entre células y matriz extracelular [13]. Algunas de las funciones en las cuales está involucrada SPARC son la regulación de la mitosis, la proliferación y la migración celular, la angiogénesis y la regeneración de tejidos.

En tejidos adultos, la expresión de SPARC se encuentra limitada principalmente a tejidos en reparación o remodelación, ya sea por procesos naturales o patológicos. Una elevada expresión de SPARC se observa en enfermedades renales, diabetes, metástasis de cáncer y artritis, aunque también se encuentra presente en la regeneración fisiológica de hueso y en la mucosa intestinal [14].

El proceso de cerrado de herida normal en adultos consta de cuatro etapas: la fase inflamatoria, la proliferativa, la maduración y el remodelamiento del tejido nuevo. Durante la fase proliferativa, son cruciales la angiogénesis, la formación de tejido granular y la re-epitelización. Además de fibroblastos, el tejido granular contiene macrófagos, vasos sanguíneos y una nueva matriz extracelular. SPARC se une a otras proteínas de la matriz extracelular e interactúa con las células, y se ha reportado su función moduladora de la morfología celular, la adhesión y migración de las células y la contracción de la matriz extracelular [15]. Adicionalmente, se ha demostrado que SPARC regula la actividad de al menos tres factores de crecimiento importantes para la homeostasis vascular: PDGF, VEGF y FGF2 [13]. Muchas de estas funciones son decisivas en el cerrado de heridas, y por eso se postula que SPARC está relacionada con este proceso.

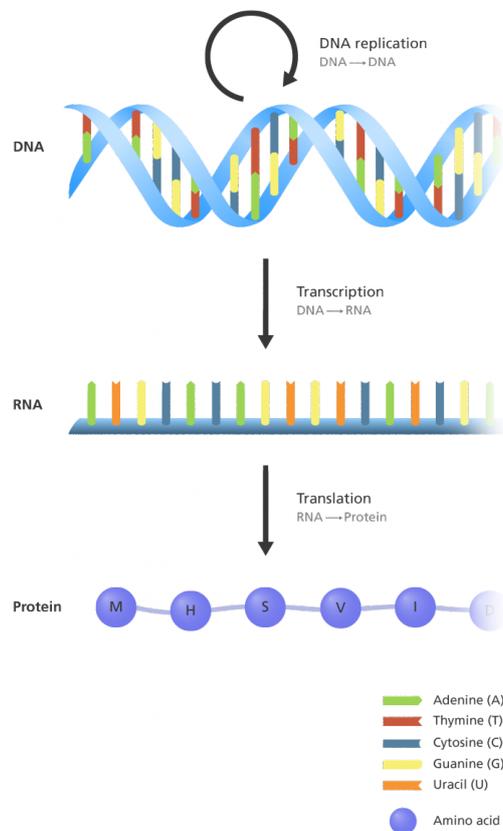
Existen diferentes poblaciones que son especialmente susceptibles a los problemas de cerrado de herida, como son los pacientes diabéticos o los de la tercera edad. Por distintos procesos que pueden darse en cualquiera de las etapas del cerrado de herida, estas personas sufren de úlceras u otros tipos de heridas crónicas. Solo en Estados Unidos, el costo anual asociado al cuidado de heridas crónicas se estima en 31,7 mil millones de dólares [16].

Aunque hoy en día existen tratamientos convencionales para el cerrado de herida, no se ha logrado aún desarrollar una alternativa que trate estas patologías eficientemente y logre restaurar el tejido dañado a su estado original. En este contexto, y teniendo en cuenta de que la población de riesgo para este tipo de trastornos se encuentra en crecimiento, las terapias basadas en células madre mesenquimales han ganado particular interés [17]. En especial, actualmente se encuentra en estudio cómo potenciar las propiedades regenerativas de estas células, analizando las moléculas de interés terapéutico involucradas, como es el caso de SPARC.

### 1.3. Técnicas de ingeniería genética

La ingeniería genética se define como la manipulación directa de los genes de un organismo mediante el uso de diferentes técnicas biotecnológicas. Esto implica manipular el genoma del organismo en cuestión, para modificar o eliminar un gen, o bien agregar una copia adicional del mismo.

Las técnicas utilizadas para la sobreexpresión de proteínas se basan en el Dogma Central de la Biología Molecular, formulado por Francis Crick en 1958 [18], el cual se encuentra esquematizado en la Figura 4.



**Figura 4:** Esquema que ilustra el flujo de información entre ADN, ARN y proteínas. Fuente: [19].

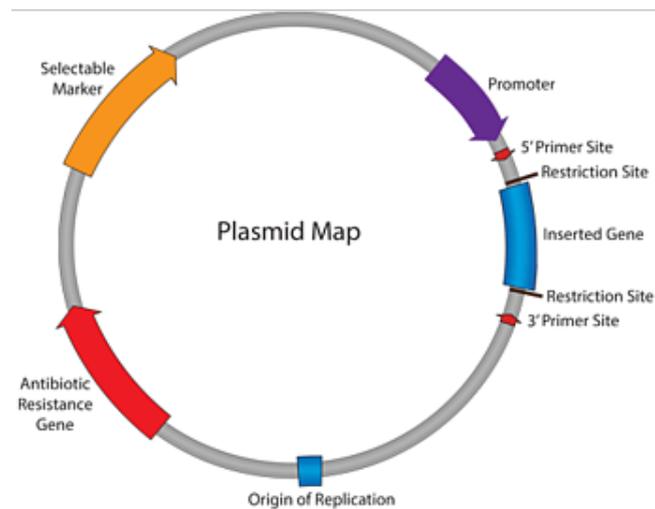
Básicamente, se plantea que la información contenida en el genoma de los organismos (en forma de ADN) se transcribe a ARN mensajero, y este a su vez

se traduce en proteínas, que son las efectoras de los procesos biológicos. Aunque luego la ciencia ha demostrado que la expresión génica es un proceso más complejo y menos lineal que el que se expresa en este dogma, es este el principio en el cual se basan las técnicas de modificación genética.

Para inserción del gen de interés (transgen) dentro de la célula a modificar, las técnicas de ingeniería genética requieren de la utilización de un vector. Hay diferentes tipos de vectores que pueden utilizarse para este fin, y a grandes rasgos pueden dividirse en dos tipos: vectores virales y no virales [20].

### **1.3.1. Vectores virales y no virales**

Los sistemas no virales consisten principalmente en la introducción de un plásmido a la célula mediante métodos físicos o químicos. Los plásmidos son cadenas relativamente pequeñas de ADN con forma circular, lo que los hace estables y fáciles de manipular. Los mismos se encuentran en la naturaleza dentro del citoplasma de las bacterias, y suelen contener genes que les brindan a estos microorganismos alguna ventaja selectiva, como por ejemplo la resistencia a antibióticos. Debido a su estabilidad y facilidad de manipulación, los plásmidos contruidos artificialmente se utilizan frecuentemente en los laboratorios de biología molecular para la modificación genética de organismos. En la siguiente figura se muestra un esquema de un vector plasmídico.



**Figura 5:** Esquema de un plásmido construido artificialmente para ser utilizado como vector de ingeniería genética. Fuente: [21].

Como se observa en la Figura 5, los plásmidos que se utilizan como vectores de ingeniería genética no contienen únicamente el gen de interés, sino también el origen de replicación necesario para su amplificación en bacterias. Comúnmente cuentan además con resistencia a un antibiótico en particular, lo cual permite seleccionar a las bacterias que contienen el plásmido durante el proceso de producción del mismo. En el esquema se observa que los plásmidos contienen adicionalmente promotores río arriba del gen insertado, que incrementan la expresión permitiendo la unión con la ARN polimerasa dentro del núcleo. Una de las mayores ventajas de estos vectores es que pueden modificarse, ya que cuentan con sitios de restricción que permiten cambiar el transgen por la secuencia de ADN deseada. Las enzimas de restricción son 'tijeras moleculares' que reconocen estos sitios y cortan la doble cadena de ADN, lo cual permite retirar el inserto original para luego reemplazarlo por un gen diferente.

Los vectores plasmídicos, sin embargo, requieren ser combinados con distintas técnicas para ingresar dentro de las células. Algunos ejemplos de métodos químicos son los que utilizan liposomas y polímeros para introducir el ADN dentro de la célula. Estas nanopartículas forman complejos con el plásmido y le permiten ingresar a la célula, ya que interactúan con la membrana plasmática, formada por una bicapa lipídica. Por otro lado, otros sistemas no virales utilizan herramientas físicas, como la magnetofección, el ultrasonido, la biolística (*gene*

*gun*), o la electroporación. Esta última consiste en la aplicación de un campo eléctrico transitorio a las células en suspensión, lo cual resulta en la aparición de poros en la membrana, que permiten el ingreso del plásmido al citoplasma. Estas metodologías tienen algunas ventajas sobre los vectores virales: no generan respuesta inmunológica en el tejido a transfectar, no suelen tener un límite en el tamaño del transgen, y son más fáciles de manejar [22]. No obstante, la principal desventaja de estos sistemas no virales es la eficiencia en la transfección, que suele ser mucho menor a la de los vectores virales [20].

Algunas de las terapias génicas más exitosas en la actualidad utilizan vectores virales [20]. En estos casos, el genoma del virus se modifica de manera tal que contenga el transgen deseado. Además, se eliminan ciertas áreas no deseadas para eliminar su patogenicidad, manteniendo los motivos estructurales necesarios para que sean capaces de ingresar a las células [23]. De esta manera, se busca eliminar la toxicidad del virus.

Los virus son relativamente fáciles de manipular, y a través de la evolución han desarrollado la habilidad de introducir su genoma en el núcleo de distintos tipos celulares de manera altamente eficiente [24]. Sin embargo, los vectores virales también tienen algunas desventajas generales para su utilización para modificaciones genéticas. En primer lugar, su inmunogenicidad puede inducir una respuesta inmune en el tejido a modificar, deteriorando el mismo [20]. Además, el tamaño máximo del inserto suele ser limitado, aunque depende de cada tipo de virus.

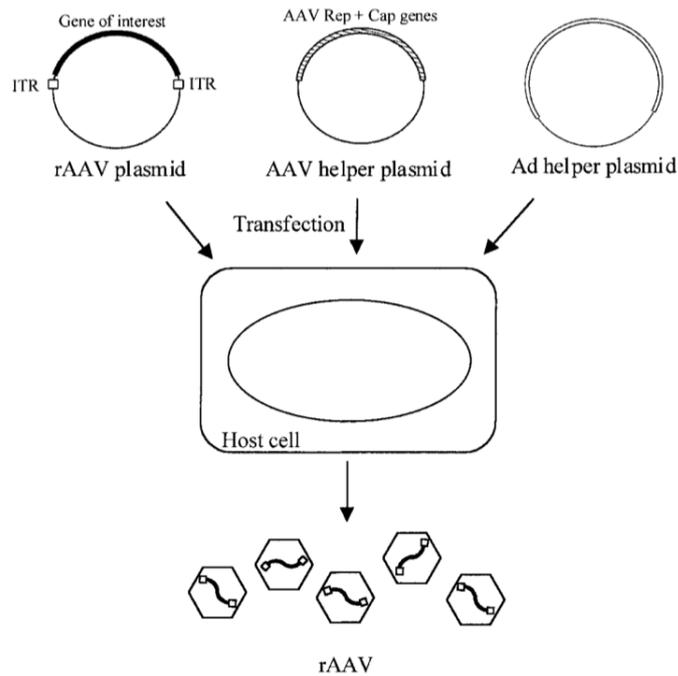
Sin perder generalidad, los virus pueden clasificarse en integrativos y no integrativos. Los virus integrativos, como los retrovirus y los lentivirus, tienen una principal desventaja: la posibilidad de causar mutagénesis. Este tipo de virus inserta su genoma dentro del ADN del huésped de manera aleatoria, lo cual puede provocar una activación indeseada de genes oncogénicos, o la silenciamiento de genes necesarios para el funcionamiento celular [22]. A pesar de este problema con respecto a la seguridad, los virus integrativos son ampliamente utilizados como vectores para terapias génicas, ya que logran una expresión del transgen sostenida en el tiempo [25]. En contraposición, los vectores virales no integrativos, como los adenovirus, resultan en una expresión transitoria del gen en las células genéticamente modificadas. Esta característica no necesariamente constituye

una desventaja, ya que en muchas aplicaciones se desea expresar el transgen de manera temporaria. Además, este tipo de virus no trae problemas de mutagénesis [25].

### **Virus adeno-asociado**

En particular, el virus adeno-asociado (AAV) es un tipo de virus no inmunogénico y no integrativo, de ADN simple cadena que no está asociado con ninguna enfermedad en humanos [26]. Estas características, sumadas a que puede infectar células de distintos tipos celulares, independientemente de que estén o no replicándose, hacen al AAV un candidato atractivo para utilizar como vector viral. Actualmente, cerca del 8% de los ensayos clínicos de terapias génicas utilizan virus adeno-asociados [27].

Como su nombre lo indica, el AAV es un dependovirus, es decir, únicamente puede replicarse en presencia de otro virus (generalmente adenovirus o, en algunos casos, virus del herpes simple) [22]. Para la generación del AAV recombinante, entonces, se suelen utilizar protocolos que requieren de una co-transfección de tres plásmidos. Al plásmido vector que contiene el transgen, se le suman un plásmido que contiene los genes replicativos y estructurales del AAV (Rep y Cap), y un plásmido *helper*, comúnmente derivado de Adenovirus, para permitir la infección productiva de las células [28]. En la Figura 6 se muestra un esquema del proceso de producción del AAV con el transgen de interés, donde se pueden observar los tres plásmidos involucrados. También en esta imagen se explicita la necesidad de utilizar células huésped, en las que se expresan los genes necesarios para la replicación y el ensamblado de las partículas virales. Estas son las que proveen la maquinaria celular para producir el virus.



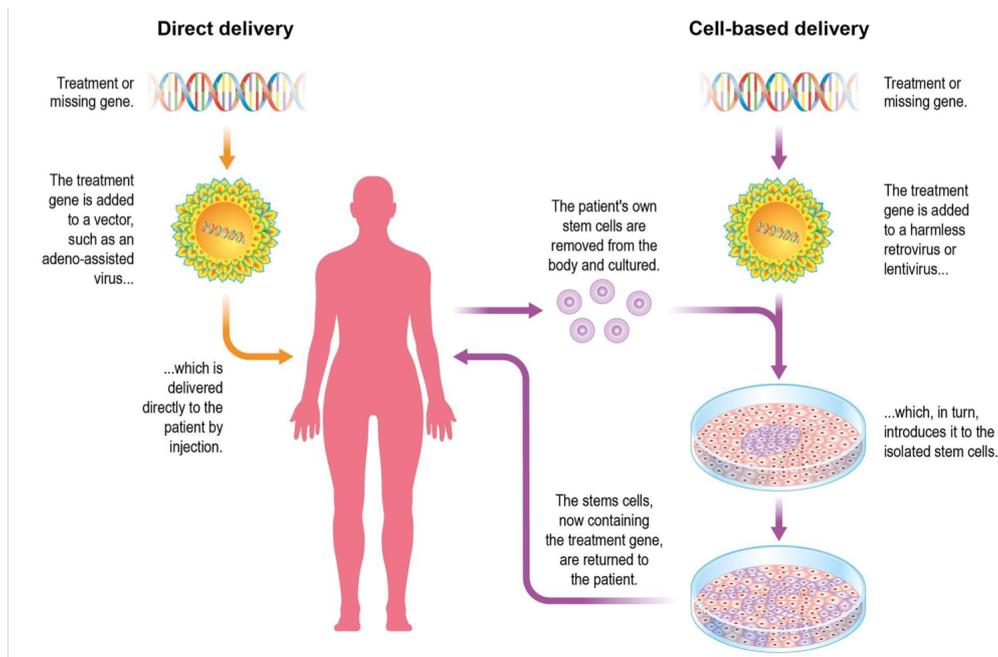
**Figura 6:** Esquema de la producción de AAV recombinante. Fuente: [29]

### 1.3.2. Aplicación clínica

La ingeniería genética tiene variadas aplicaciones en los campos de la industria alimenticia, la industria farmacéutica, la investigación y la medicina. Una de las áreas más relevantes donde actualmente se utilizan las herramientas de modificación genética es en el desarrollo de terapias génicas.

Las terapias génicas consisten en introducir uno o más genes funcionales dentro de células o tejidos humanos, con el fin de prevenir, tratar o curar patologías. Este tipo de técnicas pueden tener como objetivo el reemplazo de un gen faltante o defectuoso, la inactivación de un gen mutado, o bien la introducción de genes adicionales para provocar cierto efecto biológico deseado, que puede ser terapéutico o profiláctico. Un ejemplo de este último caso son las vacunas de ADN o ARN, en las cuales se inyecta un gen de un patógeno para generar inmunidad ante el mismo. También pueden introducirse genes que resultan en la destrucción de células cancerígenas, o que promueven la secreción de proteínas terapéuticas o regenerativas.

En cuanto a las células a modificar, existen distintos enfoques para llevar a cabo la terapia génica. Como se muestra en la Figura 7, la modificación genética de las células puede realizarse tanto *in vivo* como *ex vivo*.



**Figura 7:** Dos enfoques diferentes para la modificación genética de células somáticas: *in vivo* (izquierda) y *ex vivo* (derecha). Fuente: [30].

Por un lado, el enfoque más directo es el de modificación genética *in vivo*, en el cual se introduce directamente el vector que contiene el transgen en el individuo. En contraposición, el enfoque celular requiere la extracción previa de las células a modificar, para luego llevar a cabo la transducción o transfección *ex vivo*, para luego volver a insertarse dentro del paciente.

Finalmente, y debido a la evidencia mencionada anteriormente en relación a la función regenerativa de las vesículas extracelulares, actualmente se está investigando la utilización de las mismas como vectores de terapia génica [31]. De esta manera, los exosomas producidos por células modificadas genéticamente ofrecen un tercer enfoque: tratamientos libres de células con gran potencial terapéutico.

## 2 Antecedentes, Hipótesis y Objetivos

### 2.1. Antecedentes

Las células madre mesenquimales han ganado mucha atención en los últimos años gracias a sus características regenerativas e inmunomoduladoras. Se ha reportado que, a través de la secreción de factores solubles y vesículas extracelulares, estas células promueven la mitosis y la migración celular, desarrollando un entorno regenerativo y estimulando la angiogénesis. En particular, un tipo de vesícula extracelular, los exosomas, ha demostrado tener potencial terapéutico en distintos modelos animales [32, 33], lo cual ofrecería una alternativa no inmunogénica a las terapias celulares.

Se ha observado que las MSCs producen y secretan SPARC, una proteína mediadora de las interacciones de las células con la matriz extracelular. Se probó que el medio condicionado de células madre mesenquimales, rico en SPARC, genera una mejora en el curado de heridas *in vitro*, dado que promueve la migración celular [34]. Además, se observa que en ratones que no poseen el gen de SPARC, el cerrado de las heridas se ve significativamente retrasado [15]. Esto podría indicar que esta proteína se encuentra implicada en los mecanismos de curación de heridas.

En cuanto a los exosomas de MSCs, se ha planteado que la modificación genética de estas células podría cambiar el contenido de los mismos, y de esta manera aumentar su potencial terapéutico [7]. Por ejemplo, la sobreexpresión de la proteína quinasa B (PKB), de propiedades angiogénicas, en las células madre mesenquimales resultó en exosomas que promueven la proliferación y migración de células endoteliales [35]. También se ha estudiado sobreexpresar la subunidad  $\alpha$  del factor 1 inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), que se expresa normalmente en MSCs y también está asociado con la neovascularización y la angiogénesis. Se observó que los exosomas derivados de estas células modificadas genéticamente tenían propiedades angiogénicas, y fueron usados para tratar isquemia en ratones

[36].

Aunque se han completado más de 350 ensayos clínicos con MSCs [37], no existe actualmente ningún tratamiento que utilice este tipo celular aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, agencia regulatoria estadounidense). Esto se debe principalmente a las dificultades para producir grandes cantidades de estas células *in vitro*, y luego utilizarlas para tratamientos sin que pierdan sus propiedades regenerativas [38]. Para poder aprovechar el potencial terapéutico de las células mesenquimales es necesario lograr escalar su cultivo, y aumentar aún más sus capacidades expansivas, proliferativas y regenerativas mediante la modificación genética de las mismas.

La modificación genética de las células madre mesenquimales no es trivial. Los protocolos para generar clones estables requieren el cultivo extendido de las células. A diferencia de otros tipos celulares, las MSCs no suelen mantener su fenotipo cuando se las cultiva por un número alto de pasajes. Por ende, para conservar el fenotipo celular se ha planteado un enfoque de modificación transitoria de las células mesenquimales, utilizando herramientas de ingeniería genética a partir de vectores virales o no virales.

En particular, se ha reportado que los AAV son eficientes y seguros como vectores de modificación genética de células madre mesenquimales. Además, se observa que la expresión del transgen puede sostenerse hasta tres meses post-infección [39]. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la utilización de vectores virales conlleva preocupaciones en cuanto a la seguridad, la toxicidad y la escalabilidad de la modificación genética.

Por otro lado, los métodos de modificación genética no virales son, como ya se mencionó, más seguros y más prácticos para la escalabilidad, pero suelen tener menor eficiencia que los virus [38]. En los últimos años se han obtenido resultados prometedores con el uso de nanopartículas lipídicas, polímeros y electroporación para transfectar MSCs [40].

## 2.2. Hipótesis

La hipótesis a contrastar en este Proyecto Final de Carrera es que es posible modificar las células madre mesenquimales para que sobreexpresen SPARC de manera transitoria.

## 2.3. Objetivo general

El objetivo general es modificar genéticamente células madre mesenquimales para que sobreexpresen la proteína SPARC.

## 2.4. Objetivos específicos

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Familiarizarse con el cultivo de diferentes tipos celulares, en específico de células madre mesenquimales, tanto de gelatina de Wharton como derivadas de células pluripotentes inducidas, en placas (2D) y en *spinner flasks* (3D).
- Construir las herramientas moleculares necesarias para la sobreexpresión de SPARC en células mesenquimales.
- Modificar genéticamente las células madre mesenquimales con el plásmido generado. Evaluar la eficiencia de distintos métodos para introducir el plásmido en las células.
- Analizar el resultado de la modificación. Realizar ensayos de cuantificación de ARNm para comparar con células *wild type*.
- Analizar mediante experimentos *in vitro* la funcionalidad biológica de las células madre mesenquimales modificadas en comparación a las *wild type*.

## 3 Materiales y Métodos

### 3.1. Cultivo celular

Las células madre mesenquimales obtenidas de la gelatina de Wharton (WJ-MSCs) fueron cultivadas tanto en placas (2D) como en *spinner flasks* (3D) con medio  $\alpha$ -MEM suplementado con lisado de plaquetas 10 %.

Para el cultivo en 3D se utilizaron *microcarriers* Cytodex 3 (GE Healthcare Life Sciences), las cuales proveen a las células de una superficie de contacto a la cual adherirse. En el caso de cultivo 2D las células crecen directamente adheridas a la superficie de las placas.

Se sembraron inicialmente para ambos métodos de cultivo 4,5 millones de células, y luego de cinco días de amplificación se cuantificó el número total de células utilizando cámara de Neubauer. Para analizar los datos se utilizó el programa GraphPad Prism [41]. En el cálculo del valor p para los datos del día 5 de ambas condiciones, se utilizaron dos métodos diferentes. En primer lugar, asumiendo que se trata de muestras con distribución normal, se utilizó el t-test de Welch, por tener varianzas diferentes. Por otro lado, asumiendo que las variaciones no tienen distribución normal, se utilizó la prueba de Mann-Whitney [42].

Para el cultivo 3D también se realizaron mediciones de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en los días 1, 2 y 5, como una medida indirecta del crecimiento de las células. Para ello, se utilizó el kit Glicemia Enzimática (Wiener Lab), según el protocolo indicado por el fabricante, y se realizaron las mediciones a 505 nm en un espectrofotómetro DU 530 de la marca Beckman Coulter. En el día 2, se realizó la medición antes y después de llevar a cabo el cambio de medio correspondiente.

## 3.2. Infección con Ad SPARC

Para la modificación genética de las células, en primer lugar se utilizó un vector adenoviral (Ad SPARC) producido por Atorrasagasti *et al.*, siguiendo el protocolo reportado previamente [43]. A modo de control se realizó a su vez una transducción con un vector análogo para la proteína GFP (Ad GFP). La infección de las WJ-MSCs se realizó para MOI (*multiplicity of infection*) 50 y 100, parámetro que indica la cantidad de partículas virales por célula. Se agregaron las partículas de Ad diluidas en DMEM 2% SFB, y se incubó las células por 3 horas en estufa a 37 °C, agitando cada 20 minutos. Luego, se retiró el medio y se colocó  $\alpha$ -MEM suplementado con lisado de plaquetas 10%.

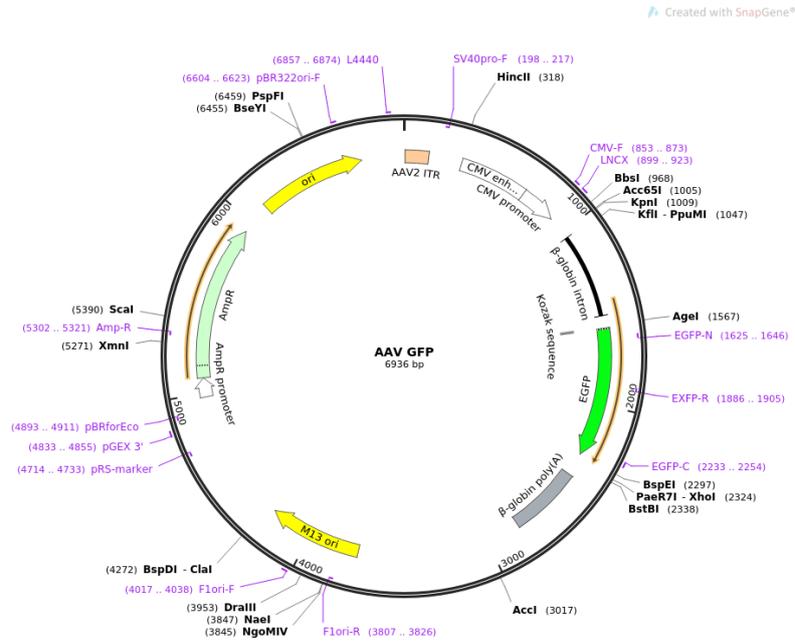
## 3.3. Producción de plásmido con inserto de SPARC

### 3.3.1. Diseño *in silico* del plásmido AAV SPARC

Antes de llevar a cabo el clonado del gen de SPARC experimentalmente se realizó el diseño *in silico* utilizando el programa Geneious Prime [44].

La secuencia de referencia de SPARC se descargó de la base de datos NCBI, donde se encuentra anotada con el código NM\_003118.4 [45]. A partir de este archivo del tipo GenBank se obtuvo el transcripto con la secuencia codificante de la isoforma 1 de SPARC, por ser la más predominante.

El plásmido diseñado para la sobreexpresión de SPARC (AAV SPARC) se basa en un plásmido AAV GFP #49055 desarrollado por Fred Gage [46]. El mapa del mismo se muestra en la Figura 8. Es importante notar que el mismo contiene el promotor CMV, el cual ha sido reportado como un promotor fuerte [47], para aumentar la expresión del transgen dentro de la célula.



**Figura 8:** Mapa del plásmido AAV GFP #49055.

### 3.3.2. Clonado de SPARC en el plásmido AAV

#### Digestión y purificación del AAV GFP

El clonado del plásmido AAV SPARC se realizó a partir del plásmido AAV GFP mencionado anteriormente. Se digirieron 2  $\mu\text{g}$  de este plásmido con las enzimas de restricción XhoI (20 U, Takara Bio) y AgeI (20 U, Thermo Fisher Scientific) con Buffer O 10X (2  $\mu\text{l}$ , Thermo Fisher Scientific) en 20  $\mu\text{l}$  de volumen final. Se experimentó también con las mismas condiciones utilizando Buffer H 10X (Thermo Fisher Scientific). La incubación se realizó a 37°C por 2 horas. Luego, se inactivaron las enzimas de restricción a una temperatura de 80°C por 15 minutos, siguiendo con el protocolo recomendado por el fabricante. Estas muestras se guardaron a -20°C.

Para la purificación, se corrió la muestra en un gel de agarosa 0,8%, y posteriormente se utilizó el PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo con el protocolo propuesto por el fabricante. La concentración del plásmido purificado (ng de ADN/ $\mu\text{l}$  de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 controlado por el software ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se verificó también que las relaciones OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>

y OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> fuesen de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del plásmido obtenido.

### **Obtención y purificación del inserto de SPARC**

Se extrajo ARN del cultivo de las WJ-MSCs, utilizando TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Luego de incubar por 5 minutos a temperatura ambiente con cloroformo (Merck), se centrifugó la muestra a 11000G durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa traslúcida, para luego precipitar el ARN con isopropanol (Merck). Después de incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente a 11000G durante 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75 %. Se centrifugó a 7000G durante 5 minutos a 4°C y, luego de eliminar el sobrenadante, se dejó secar el pellet a 37°C, y posteriormente se resuspendió en agua estéril libre de RNAsas. La muestra se incubó a 55°C durante 20 minutos, y la concentración de ARN obtenido se cuantificó con el NanoDrop 1000 como se mencionó anteriormente. Estas muestras se guardaron a -20°C.

Antes de realizar la retrotranscripción se procedió a hacer un tratamiento con DNAsa. Se incubaron a 37°C 1 µg de ARN con DNAsa I (1 µl, Thermo Fisher Scientific) y su respectivo buffer 10X (1 µl, Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 10 µl. Luego de 30 minutos se agregó 1 µl de EDTA 50mM (Thermo Fisher Scientific) y se incubó la muestra a 65°C por 10 minutos, y posteriormente se colocó en hielo por 5 minutos.

Para efectuar la transcripción reversa se utilizó el ARN tratado con DNAsa (1 µg, Invitrogen), junto con 1 µl de una mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) de la marca Invitrogen, OligodT (2 µg, Life Technologies), enzima MMLV (2 µg, Promega) y su respectivo buffer 5X (4 µl, Promega). La mezcla se colocó en la termocicladora Mastercycler Gradient (Eppendorf), y el programa utilizado fue el siguiente:

1. Estabilización de primers: 5 minutos a 25°C.
2. Polimerización: 60 minutos a 37°C.
3. Inactivación de la enzima: 15 minutos a 70°C.

A partir del cDNA obtenido (1  $\mu\text{g}$ ) se realizó una PCR de punto final con los *primers forward* y *reverse* diseñados para amplificar el inserto con la secuencia codificante de SPARC (2,5  $\mu\text{l}$  de cada uno, a concentración 5  $\mu\text{M}$ , Macrogen). A modo de control se utilizó el gen que codifica para la enzima GAPDH, y para los controles negativos se colocaron *primers* sin muestra de cDNA. Se utilizaron la enzima DreamTaq DNA Polymerase (1 U, Thermo Fisher Scientific) y su respectivo buffer (2,5  $\mu\text{l}$ , Thermo Fisher Scientific), junto la mezcla de dNTPS 10mM (0,5  $\mu\text{l}$ , Invitrogen), en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ .

Se utilizó la termocicladora Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). En este caso, el programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 4 minutos a 95°C.
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 95°C.
3. Apareamiento: 30 segundos a un gradiente de 60, 65 y 68°C.
4. Elongación: 90 segundos a 72°C.
5. Repetición de los pasos 2, 3 y 4 por 35 ciclos.
6. Extensión Final: 5 minutos a 72°C.

Estas muestras se guardaron a 4°C. Luego, el amplicón de SPARC obtenido se purificó con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Nuevamente, se midió la concentración del ADN resultante con el NanoDrop 1000 como se explicó anteriormente, y las muestras se almacenaron a -20°C.

### **Digestión y purificación del inserto de SPARC**

Se realizó la digestión del amplicón de SPARC purificado (2,2  $\mu\text{g}$ ) con las mismas enzimas de restricción que para el vector AAV GFP: XhoI (22 U, Takara Bio) y AgeI (22 U, Thermo Fisher Scientific) con Buffer O 10X (3  $\mu\text{l}$ , Thermo Fisher Scientific) en 30  $\mu\text{l}$  de volumen final. Se incubaron las muestras por 2 horas a 37°C y luego se inactivaron las enzimas de restricción a una temperatura de 80°C por 15 minutos.

Posteriormente, se volvió a realizar una purificación del ADN utilizando el mismo Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y se midió la concentración resultante con el NanoDrop 1000. Las muestras se almacenaron a -20°C.

### **Ligación**

Se realizó la ligación entre el vector y el inserto purificados luego de la digestión con las enzimas de restricción, con tres relaciones molares inserto:vector diferentes (2:1, 3:1 y 5:1). En todos los casos, se utilizaron 200 ng de vector AAV en un volumen final de 35  $\mu$ l. Se usó la enzima T4 DNA Ligase (2 Weiss U, Thermo Fisher Scientific) con su respectivo buffer 10X (3,5  $\mu$ l, Thermo Fisher Scientific). Se incubaron las muestras a 22°C durante 45 minutos, para después inactivar la enzima a 65°C por 10 minutos.

### **Transformación de bacterias competentes**

Se utilizaron 5  $\mu$ l de los productos de cada ligación (2:1, 3:1 y 5:1) para transformar bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa Stbl3. Estas se colocaron durante 30 minutos en hielo y luego se las sometió a un shock térmico de 42°C durante 90 segundos, y posteriormente se colocaron en hielo por 5 minutos. A continuación se agregó 1 ml de LB líquido (10 g/l de Peptona de Caseína, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de cloruro de Sodio), sin antibiótico, a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, 200  $\mu$ l de las bacterias se sembraron en placas de Petri con LB-agar (LB + 15 g/l de agar) con Ampicilina (100  $\mu$ g/ml), y se dejaron hasta el día siguiente en una estufa a 37°C. Se utilizó este antibiótico para seleccionar las colonias de bacterias que contienen el plásmido diseñado, ya que este otorga resistencia a Ampicilina.

Las colonias obtenidas se picaron y se estriaron en nuevas placas de LB-agar con Ampicilina, dejándolas crecer 24 horas más a 37°C. Se realizaron dos Colony PCR de las colonias obtenidas. En primer lugar, con un par de *primers* que amplifican un segmento de la secuencia codificante de SPARC de aproximadamente 100 pares de bases (Macrogen). Luego, se realizó otra Colony PCR con los *primers* diseñados para la obtención del inserto de SPARC (Macrogen). En ambos casos, la reacción se llevó a cabo en la termocicladora Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y el programa utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 95°C.
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 95°C.
3. Apareamiento: 30 segundos a un gradiente de 60°C.
4. Elongación: 90 segundos a 72°C.
5. Repetición de los pasos 2, 3 y 4 por 35 ciclos.
6. Extensión Final: 5 minutos a 72°C.

Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa 1%. Luego, se realizaron mini cultivos de los clones que dieron un resultado positivo para la amplificación de SPARC, y se purificaron los plásmidos utilizando el Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se realizó el maxi cultivo del clon chequeado y se purificó siguiendo el protocolo propuesto por el Wizard® Plus Maxiprep DNA Purification System (Promega).

### **Secuenciación**

Se purificaron los mini cultivos de los clones 11 y 14 con el Monarch® Plasmid DNA Miniprep Kit Protocol (NEB), según lo indicado por el fabricante. Luego, se enviaron las muestras a la empresa Macrogen para su secuenciación. Los resultados se analizaron con el programa Geneious Prime [44].

## **3.4. Transfección de MSCs con AAV SPARC**

### **3.4.1. Transfección con nanopartículas de PEI**

Se partió de una confluencia de 50% de MSCs en  $\alpha$ -MEM suplementado con lisado de plaquetas 10%. Se formaron los complejos con polietilenimina (PEI, 25 kDa) (5  $\mu$ l, Polysciences Inc.) y el plásmido AAV GFP (1  $\mu$ g) en medio Opti-MEM (Invitrogen). Luego de 15 minutos de incubación, se agregaron a las células en forma de gotas. Después de 24 horas se realizó un cambio de medio.

### **3.4.2. Transfección por electroporación**

Se utilizó el equipo Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) para electroporar las células. Para la cámara de electroporación de 10  $\mu$ l se utilizaron

150.000 células suspendidas en buffer R (Thermo Fisher Scientific), y 2  $\mu\text{g}$  de plásmido (tanto AAV GFP como AAV SPARC). Se realizó un único pulso de 30 ms y 1400 V. Luego, se colocaron las células en una placa multi-well de 6 con 2 ml de medio  $\alpha$ -MEM suplementado con lisado de plaquetas 10 %.

Después, al utilizar la cámara de electroporación de 100  $\mu\text{l}$ , se transfectaron 1.500.000 células utilizando un pulso de 30 ms y 1300 V. Posteriormente se colocaron en una placa p100 con 6 ml de medio.

## **3.5. Análisis de la expresión génica**

### **3.5.1. Microscopía**

Las WJ-MSCs analizadas en este trabajo se observaron y fotografiaron en el microscopio EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health).

### **3.5.2. Citometría de flujo**

Para evaluar la eficiencia de la transducción, las células infectadas con Ad GFP fueron sometidas a un análisis de citometría en los días 1, 4 y 7 luego de la infección. También se evaluó la eficiencia de transfección con Neon Transfection System del plásmido AAV GFP por citometría de flujo, 48 horas luego de la electroporación.

Para ello, se trató a las células con Tripsina, para luego resuspenderlas en PBS. Se colocaron en el equipo en el citómetro BD Accuri (BD Biosciences), y se analizaron los resultados obtenidos mediante el software BD Accuri C6, provisto por el fabricante del equipo.

### **3.5.3. PCR en tiempo real**

Se extrajo ARN del cultivo de las células infectadas con Ad SPARC a las 24, 96 y 168 horas post-infección, utilizando TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Análogamente, el mismo proceso se realizó para las células transfectadas con AAV SPARC utilizando el Neon Transfection System, en las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores. Se cuantificó la cantidad de ARN de las muestras utilizando

nuevamente NanoDrop 1000.

Se procedió a realizar el tratamiento con DNAsa y la retrotranscripción de las muestras siguiendo con el protocolo descrito anteriormente en la sección 3.3.2.

El ADN complementario obtenido se utilizó para la reacción de PCR cuantitativa con SYBR-Green Master mix (Roche) en la termocicladora Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Activación de UNG (*Uracil-DNA glycosylases*): 2 minutos a 50°C.
2. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 95°C.
3. Desnaturalización del ADN molde: 15 segundos a 95°C.
4. Apareamiento y extensión: 1 minuto a 60°C.
5. Lectura de fluorescencia.
6. Repetición de los pasos 3, 4 y 5 por 40 ciclos.
7. Extensión Final: 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 70°C y 15 segundos a 90°C.

El procesamiento de los resultados se realizó con los programas LinReg PCR, y Microsoft Excel.

## **3.6. Análisis de funcionalidad biológica de WJ-MSCs modificadas**

### **3.6.1. Ensayo de proliferación**

Para analizar la funcionalidad biológica de las MSCs modificadas genéticamente con el plásmido AAV SPARC, se condicionó el medio de las mismas 48 horas luego de la transfección con Neon Transfection System, utilizando un único pulso de 1300 V y 30 ms en una cámara de electroporación de 100  $\mu$ l con 1.500.000 células. Es decir, se retiró el medio de cultivo normal y se reemplazó por  $\alpha$ -MEM suplementado con ITS (Insulina-Transferrina-Selenio, Thermo Fisher Scientific).

Se incubaron las células transfectadas con este medio por otras 24 horas. Paralelamente se realizó este procedimiento para WJ-MSCs no transfectadas (*wild type*).

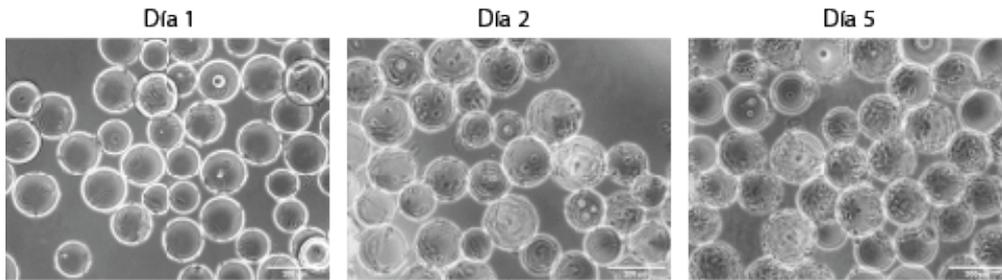
Se plaquearon 2.000 WJ-MSCs en una placa multi-well de 96. Pasadas las 72 horas posteriores a la transfección, se retiró el medio condicionado de ambas condiciones y se colocó a estas células. También se utilizó un control de células cultivadas con  $\alpha$ -MEM.

24 horas después, se cuantificó la proliferación utilizando el CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo con el protocolo propuesto por el fabricante. Se cuantificó la fluorescencia en Fluoroskan™ Microplate Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), con una excitación de 485 nm, para detectar la emisión de 538 nm. Los resultados se analizaron con el programa SkanIt, provisto por el fabricante, y Microsoft Excel.

## 4 Resultados

### 4.1. Cultivo celular en 2D y 3D

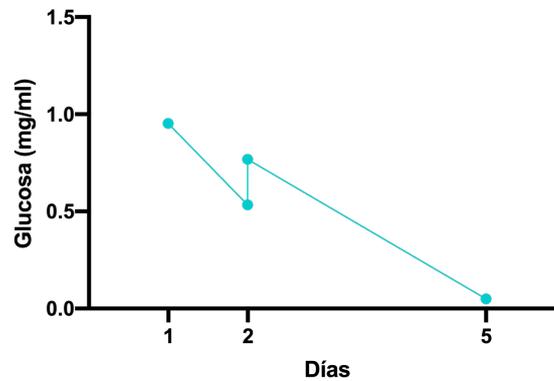
Con el fin de familiarizarme con el tipo celular a utilizar en este trabajo, y teniendo en cuenta que se busca desarrollar una herramienta de modificación genética escalable, se experimentó el cultivo de MSCs en 2D y 3D. Para determinar si existe alguna diferencia entre la amplificación de las células mesenquimales en los diferentes tipos de cultivo, se colocaron 4,5 millones de WJ-MSCs tanto en placas tradicionales (2D) como en *spinner flasks* (3D). Luego de cinco días, se contabilizó la cantidad de células obtenidas en las ambas modalidades. En la Figura 9 se observa el crecimiento de la población de células en el método de cultivo en tres dimensiones.



**Figura 9:** Amplificación de WJ-MSCs en *spinner flasks* en Día 1, 2 y 5. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

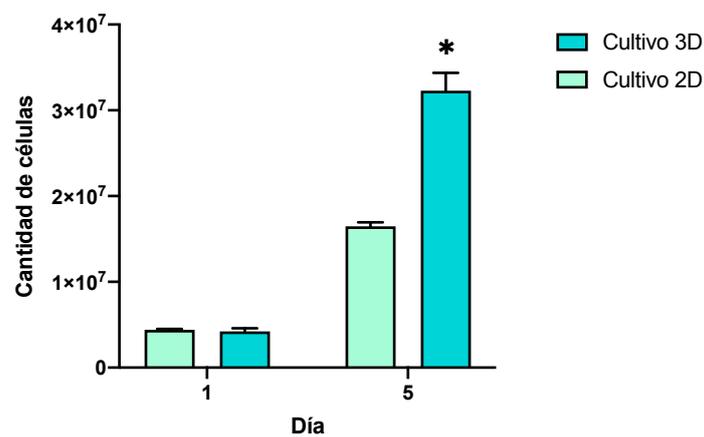
Además, a lo largo de los 5 días, se tomaron muestras medio de cultivo en 3D para cuantificar el nivel de glucosa. Así, fue posible obtener una medida cualitativa indirecta de la proliferación a partir del consumo metabólico de las células, ya que al encontrarse adheridas en *microcarriers* y en suspensión dentro del biorreactor, se dificulta su visualización directa. Los valores medios de estas mediciones para los días 1, 2 y 5 se representaron en el gráfico de la Figura 10. En el día 2, se realizó la medición antes y después de llevar a cabo el cambio de medio, como se reporta en Tsai *et al.* [6]. Puede observarse que, en promedio,

los niveles de glucosa decrecieron durante los 5 días, lo que se relaciona con el aumento de la población de células.



**Figura 10:** Niveles de glucosa en el medio durante la amplificación de WJ-MSCs en cultivos 3D en 5 días. En el día 2, se realizó la medición antes y después de llevar a cabo el cambio de medio.

Al cuantificar la amplificación, se observó que al día 5 las células cultivadas en 2D resultaron en una población cercana a 17 millones de células, mientras que las cultivadas en 3D llegaron a 32 millones. Se obtuvo entonces una cantidad de células significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ , para ambas técnicas estadísticas) para el cultivo en *spinner flasks*. Estos resultados se encuentran en la Figura 11.

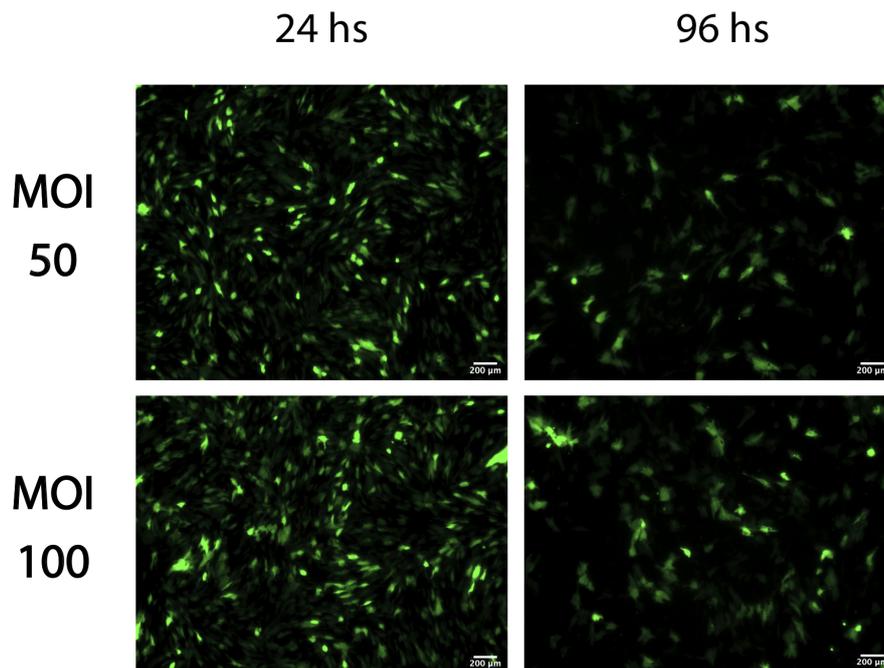


**Figura 11:** Amplificación de WJ-MSCs en cultivos 2D y 3D en 5 días. El \* indica un  $p \leq 0,05$  entre los valores del día 5 de ambas condiciones.

## 4.2. Transducción de las MSCs con Ad SPARC

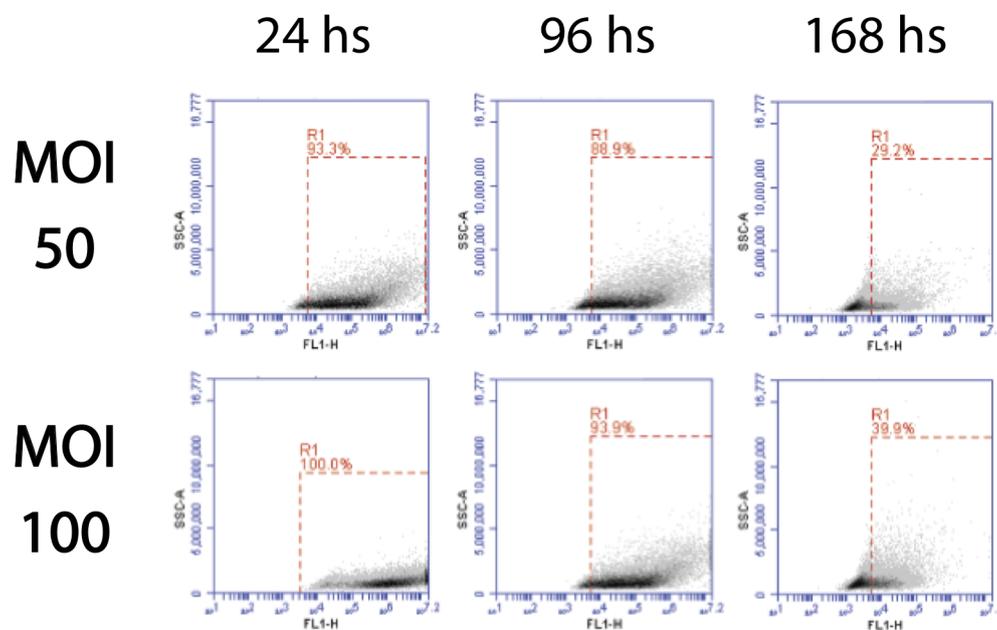
En un principio, se recibieron partículas virales (Adenovirus con plásmidos para la expresión de GFP o SPARC) ya desarrolladas por otro laboratorio, y se procedió a verificar su capacidad para sobreexpresar proteínas. Con el objetivo de evaluar la eficiencia de este Adenovirus como vector de modificación genética, se analizó la expresión de GFP en los días posteriores a la infección.

En primer lugar, se observó la fluorescencia de las células al microscopio 24 y 96 horas después de la infección con Ad-GFP para evaluar cualitativamente por cuánto tiempo se mantiene la expresión del transgen. Las imágenes obtenidas para ambos MOI se muestran en la Figura 12. Además, se observa que la expresión del transgen es transitoria, ya que la fluorescencia de las células disminuye a las 96 horas. Es importante mencionar que la toxicidad del vector se evaluó por observación de las células modificadas al microscopio, y que la proporción de muerte celular fue baja, y sin diferencias con la condición de control.



**Figura 12:** WJ-MSCs modificadas con Ad-GFP 24 y 96 horas post-infección, para MOI 50 y 100. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

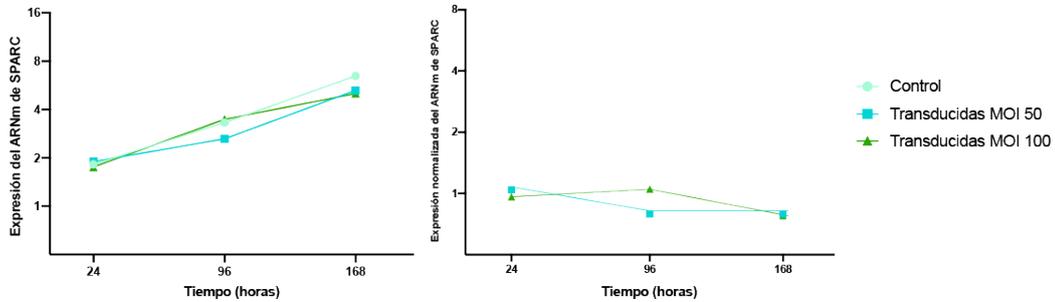
Para confirmar y cuantificar estos resultados, se realizó un estudio de citometría de flujo a las 24, 96 y 168 horas (1, 4 y 7 días, respectivamente) luego de la infección con Ad-GFP. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 13. Nuevamente, se observa que la transducción de las células es eficiente, teniendo fluorescencia de 93.3% y 100% para MOI 50 y 100 respectivamente en el día 1. Luego, la expresión de GFP va disminuyendo, pasando a 88.9% (MOI 50) y 93.9% (MOI 100) al día 4, para finalmente representar únicamente un 29.2% (MOI 50) y 39.9% (MOI 100) al día 7. Es evidente que para un MOI más elevado se obtiene una expresión sostenida mayor del transgen. Sin embargo, en ambos casos se confirmaría que la sobreexpresión es transitoria.



**Figura 13:** Citometría de flujo de WJ-MSCs modificadas con Ad GFP 1, 4 y 7 días post-infección, para MOI 50 y 100.

Finalmente, mediante qPCR se buscó cuantificar la sobreexpresión de SPARC a partir del ARN mensajero. El resultado de este estudio se muestra en la Figura 14. Aunque este análisis se realizó una única vez, en el gráfico de la derecha se observa que no hay diferencia entre las células infectadas y el grupo control. El aumento en la expresión de SPARC con el paso del tiempo podría explicarse por la mayor confluencia de células a medida que transcurren los días. A mayor

cantidad de células, es probable observar una mayor expresión de SPARC, ya que se trata de una proteína de la matriz extracelular. Por lo tanto, en base a este análisis no se observa un aumento en la producción de la proteína luego de la infección con el Adenovirus diseñado para sobreexpresar SPARC.



**Figura 14:** Resultados de la PCR en tiempo real de ARN mensajero de SPARC, para los días 1, 4 y 7 post-infección con Ad SPARC, para las tres condiciones (control, MOI 50 y MOI 100). En el gráfico de la izquierda se observa la expresión del ARNm SPARC respecto de las proteínas de referencia (*housekeeping*), y en el de la derecha los valores de las células transducidas con MOI 50 y 100 respecto del control.

A partir de estos resultados, se decidió realizar el clonado de SPARC para producir un vector de modificación genética propio, que resulte en una sobreexpresión apreciable de SPARC.

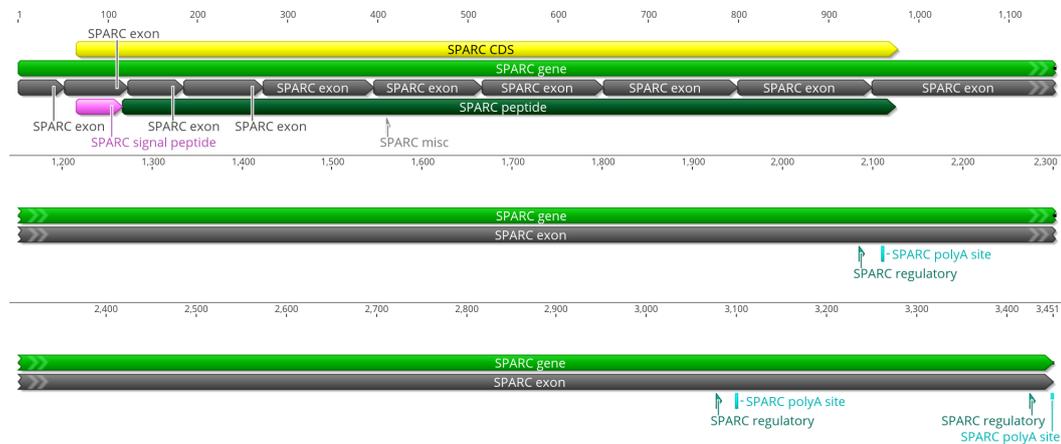
### 4.3. Clonado de SPARC

Basados en los resultados de la infección con Ad SPARC, se resolvió diseñar un plásmido propio, en este caso basado en Virus Adeno-Asociado. Con ello se buscó conservar la alta eficiencia de transducción observada con el Adenovirus, y además sumar mayor seguridad al manejo del vector y lograr una expresión del transgen transitoria pero mantenida por cierto tiempo, entre otras ventajas mencionadas del AAV.

#### 4.3.1. Diseño *in silico* del plásmido AAV SPARC

Para el clonado *in silico* de SPARC se comenzó por descargar las secuencias correspondientes al ARN mensajero de la proteína en el programa Geneious Prime. En la Figura 15 se muestra la secuencia del gen sin intrones en verde, y

la secuencia codificante en amarillo.

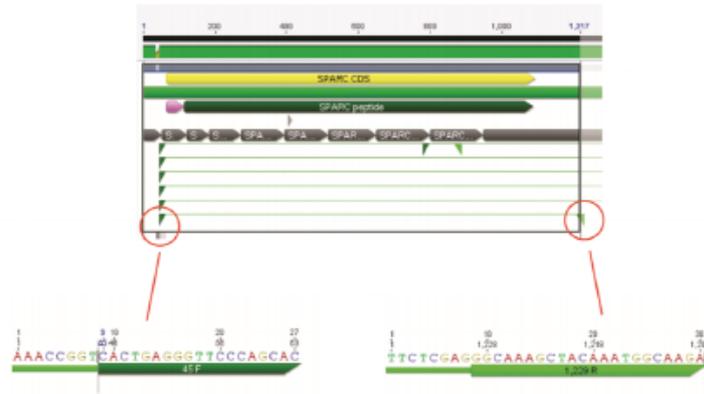


**Figura 15:** Secuencia de SPARC en el programa Geneious Prime. En amarillo se observa la secuencia codificante.

Para diseñar los *primers* con los cuales posteriormente se amplificó el inserto de SPARC, se utilizó la función *Design new primers* del programa Geneious Prime, usando como *target* la secuencia codificante de SPARC, y los parámetros configurados por defecto. Se diseñaron *primers forward* y *reverse*. La función ofreció como resultado cinco pares de *primers*, como se observa en la Figura 16.

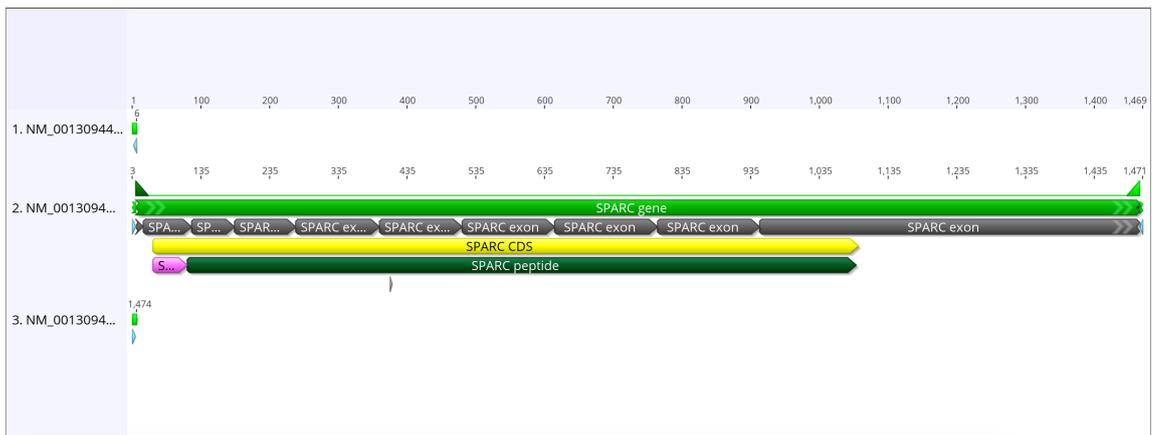
Se seleccionó el par de *primers* que determina la secuencia más corta, es decir, 45 F y 1229 R, resultando en un amplicón de 1185 pares de bases nucleotídicas, chequeando que los mismos sirvieran para amplificar las tres isoformas existentes de SPARC. Luego, a estos *primers* seleccionados se les adicionó la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción AgeI (para el *primer forward*) y XhoI (para el *primer reverse*). Además, se agregaron dos nucleótidos extra en los extremos (AA, en ambos casos) para facilitar la unión de las enzimas a la cadena de nucleótidos. Los *primers* resultantes se muestran también en la Figura 16, expresados de 5' a 3'. La temperatura de fusión ( $T_m$ , por sus siglas en inglés) de los mismos es de  $72,8^{\circ}\text{C}$  para el *primer forward* y  $70,7^{\circ}\text{C}$ , para el *primer reverse*. Por otro lado, su contenido de GC es de 59,3% y 46,7%, respectivamente.

%

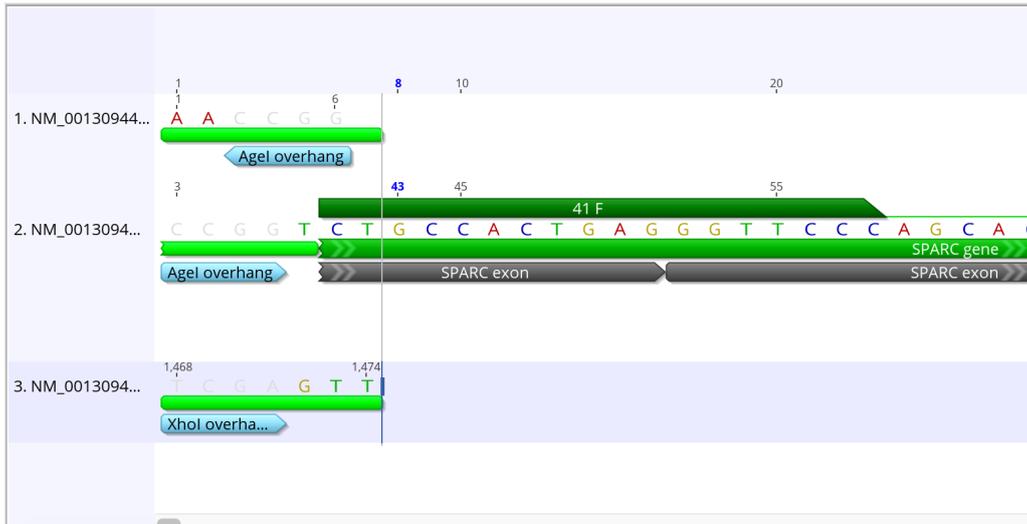


**Figura 16:** Cinco pares de *primers* diseñados por Geneious Prime. Se marcan los *primers* seleccionados para amplificar SPARC: 45 F y 1229 R.

Posteriormente, se procedió a realizar la digestión *in silico* de la secuencia de SPARC con los *primers* de la Figura 16, utilizando las enzimas de restricción mencionadas. El resultado de este paso se observa en la Figura 17 y, con mayor aumento, en la Figura 18. Notamos que se obtienen tres secuencias resultantes. La primera y la tercera consisten en los extremos cohesivos producto del corte de las enzimas AgeI y XhoI (denominados *overhang*), mientras que la secuencia del centro sería el inserto a utilizar para el clonado.

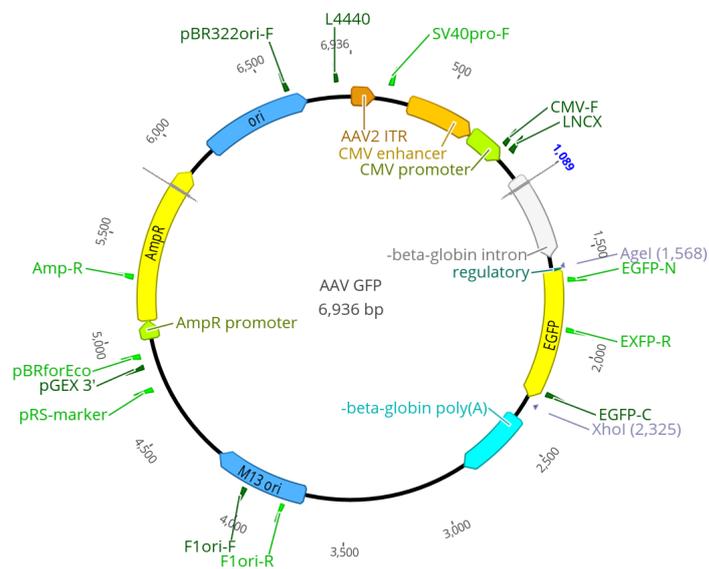


**Figura 17:** Resultado de la digestión de la secuencia de SPARC con los *primers* diseñados, utilizando las enzimas de restricción AgeI y XhoI en Geneious Prime. Se observan tres fragmentos: los dos extremos *overhang* y el inserto.



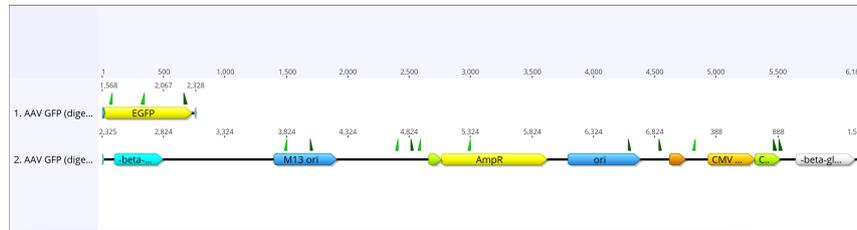
**Figura 18:** Resultado de la digestión de la secuencia de SPARC con los *primers* diseñados, utilizando las enzimas de restricción AgeI y XhoI en Geneious Prime, con mayor aumento. Se observan tres fragmentos: los dos extremos *overhang* y el inserto.

Por otro lado, también se realizó una simulación de la digestión del plásmido AAV GFP, que se muestra en la Figura 19, utilizando las mismas enzimas de restricción.



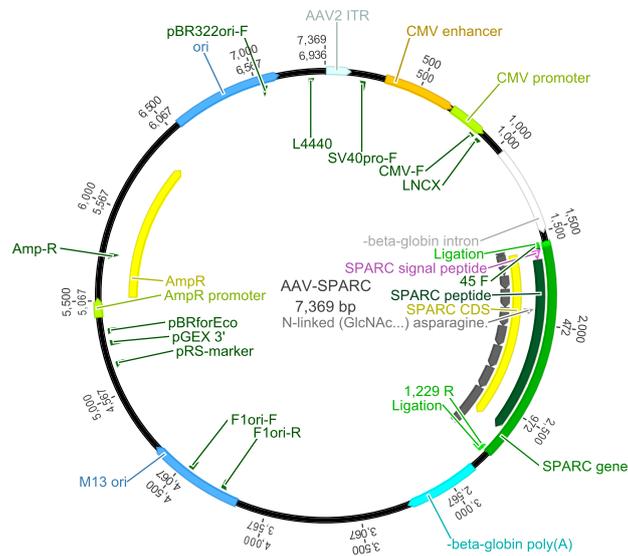
**Figura 19:** Plásmido AAV GFP en Geneious Prime.

Los resultados de la digestión del plásmido con las enzimas AgeI y XhoI se encuentran en la Figura 20. En este caso se obtuvieron dos secuencias resultantes. En primer lugar, se encuentra la secuencia codificante del gen de GFP, mientras que en la segunda secuencia queda el resto del plásmido.



**Figura 20:** Resultado de la digestión del plásmido AAV GFP utilizando las enzimas de restricción AgeI y XhoI en Geneious Prime. Se observan dos fragmentos: el vector y el inserto de eGFP.

Finalmente, se simuló la ligación la secuencia del inserto de SPARC (segunda secuencia de las Figuras 17 y 18) y el plásmido AAV (segunda secuencia de la Figura 20). En la Figura 21 se muestra el resultado final del clonado *in silico* de SPARC. A este plásmido se lo denominó AAV SPARC.

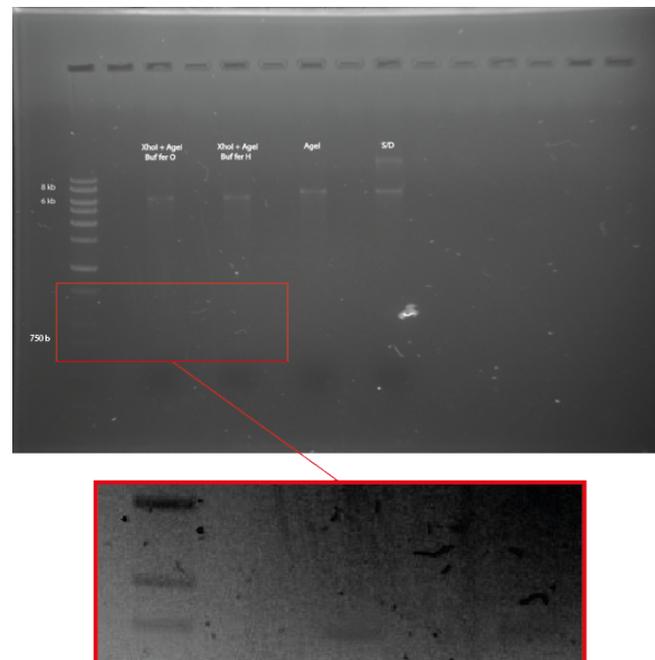


**Figura 21:** Resultado de la ligación del plásmido AAV y el inserto de SPARC en Geneious Prime, es decir, AAV SPARC.

Se observa que el resultado es una única secuencia de ADN circular que incluye la secuencia codificante de SPARC. Por lo tanto, es posible concluir que el clonado *in silico* fue exitoso. A partir de estos resultados se continuó hacia el clonado experimental, utilizando los *primers* diseñados y las enzimas de restricción analizadas con esta herramienta bioinformática.

#### 4.3.2. Clonado del SPARC *in vitro*

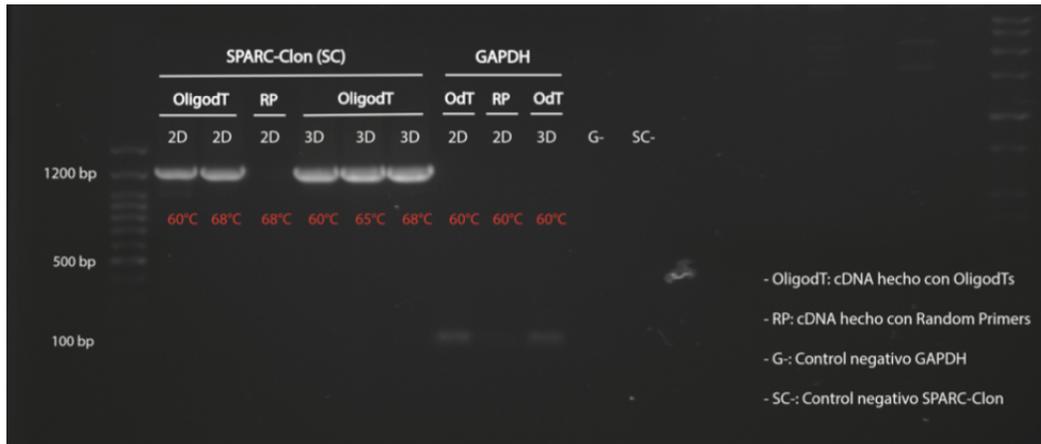
El proceso del clonado del plásmido AAV SPARC comenzó con la digestión del plásmido AAV GFP con las enzimas de restricción AgeI y XhoI, probando con ambos buffers recomendados para dichas enzimas (buffer O y H, respectivamente). El resultado de esta reacción se muestra en la Figura 22.



**Figura 22:** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del plásmido AAV GFP con las enzimas de restricción AgeI y XhoI. Se aumentó y se invirtió la porción de la imagen en el recuadro rojo, para ayudar a la visualización de las bandas correspondientes a 700 pares de bases. Contenido de cada calle, de izquierda a derecha: 1. Marcador de peso molecular; 2. Plásmido AAV GFP digerido con XhoI y AgeI en Buffer O; 3. Plásmido AAV GFP digerido con XhoI y AgeI en Buffer H; 4. Plásmido AAV GFP digerido con AgeI en Buffer H; 5. Plásmido AAV GFP sin digerir.

En la figura anterior se observa una banda aproximadamente a la altura correspondiente a 6200 pares de bases, lo cual es consistente con el plásmido digerido con las enzimas mencionadas. A partir de esa porción de gel se realizó la purificación del mismo. Las bandas correspondientes al transgen eGFP se observan muy tenuemente a la altura de 700 pares de bases. Es por ello que esta sección de la imagen fue aumentada e invertida, para ayudar a su visualización. En dicha figura es posible notar también dos bandas en la columna correspondiente al plásmido AAV GFP sin digerir, que corresponden al plásmido en su versión superenrollada y lineal. Esta última coincide, como es esperable, con la banda resultante de la digestión con AgeI, que corta al plásmido en un único sitio de restricción, resultando en su forma lineal.

Luego de realizar la PCR para amplificar el ARN mensajero de SPARC, se chequeó el resultado de la misma mediante un ensayo de electroforesis en gel de agarosa. Se probó un gradiente de temperaturas (60, 65 y 68 °C) para encontrar la temperatura óptima en la que la reacción es más eficiente para amplificar el fragmento, y con muestras de cDNA obtenidas tanto con Random Primers como con OligodT. En la Figura 23 se muestra el revelado del mismo. Se observa que tanto para las muestras de cultivo de MSCs en 2D y 3D se logró obtener el ARN mensajero de SPARC, representado por las cinco bandas a la altura aproximada de 1200 pares de bases. Además, es posible notar que la amplificación del fragmento de SPARC puede realizarse a cualquiera de las tres temperaturas mencionadas. Se eligió continuar con la amplificación realizada a 65°C por ser un valor intermedio, además de que parece tener la banda más brillante. También es importante destacar que los controles negativos (realizados con *primers* para amplificar otro gen, en este caso GAPDH) no dieron como resultado bandas en el rango correspondiente a SPARC, por lo que se podría afirmar que los fragmentos amplificados en las muestras con los *primers* de SPARC son específicos.



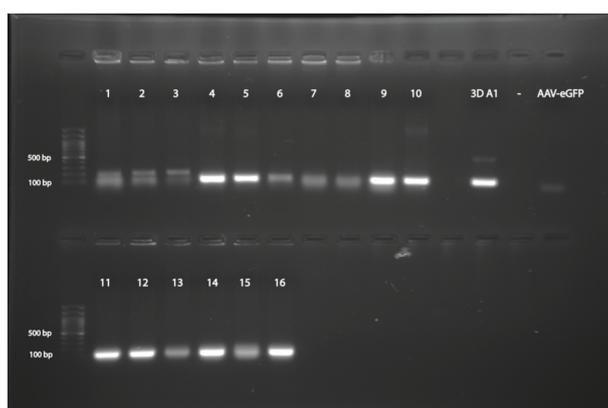
**Figura 23:** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del inserto de SPARC. Se indica en cada caso el método de obtención del cDNA a partir de la muestra de ARN (RP: Random Primers y OdT: OligodT). Contenido de cada calle, de izquierda a derecha: 1. Marcador de peso molecular; 2. cDNA (OdT) de MSCs cultivadas en 2D, con *primers* diseñados para amplificar el ARNm de SPARC, a 60°C; 3. cDNA (OdT) de MSCs cultivadas en 2D, con *primers* diseñados para amplificar el ARNm de SPARC, a 68°C; 4. cDNA (RP) de MSCs cultivadas en 2D, con *primers* diseñados para amplificar el ARNm de SPARC, a 60°C; 5. cDNA (OdT) de MSCs cultivadas en 3D, con *primers* diseñados para amplificar el ARNm de SPARC, a 60°C; 6. cDNA (OdT) de MSCs cultivadas en 3D, con *primers* diseñados para amplificar el ARNm de SPARC, a 65°C; 7. cDNA (OdT) de MSCs cultivadas en 3D, con *primers* diseñados para amplificar el ARNm de SPARC, a 68°C; 8. cDNA (OdT) de MSCs cultivadas en 2D, con *primers* de GAPDH, a 60°C; 9. cDNA (RP) de MSCs cultivadas en 2D, con *primers* de GAPDH, a 60°C; 10. cDNA (OdT) de MSCs cultivadas en 3D, con *primers* de GAPDH, a 60°C; 11. Control negativo de GAPDH (sin muestra); 12. Control negativo de SPARC (sin muestra).

Luego de ligar el vector y el inserto, se realizó la transformación de bacterias competentes con el producto de ligación resultante. Se obtuvieron en total 16 colonias, de las cuales 5 fueron a partir de la condición 2:1, 7 de la condición 3:1 y 4 de la condición 5:1. Las placas de LB agar con sus respectivas colonias se muestran en la Figura 24.



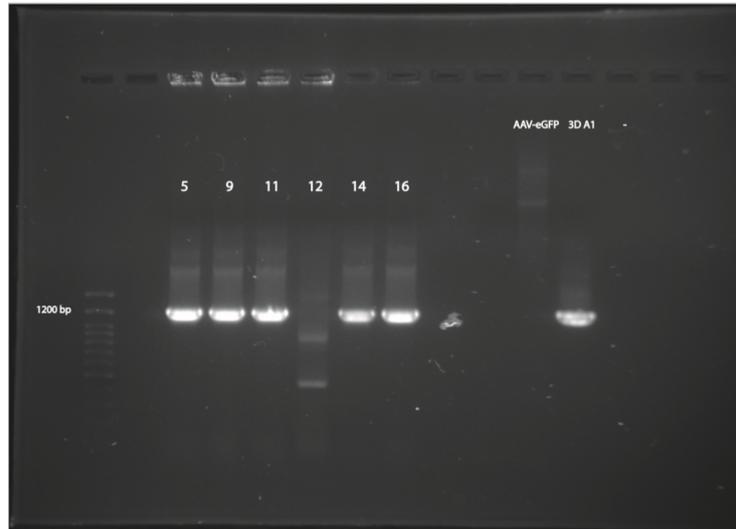
**Figura 24:** Placas de LB agar con colonias de bacterias competentes transformadas con el plásmido AAV SPARC.

Posteriormente se realizó una *Colony PCR* para las 16 colonias, utilizando *primers* que amplifican un segmento de aproximadamente 100 pares de bases del gen de SPARC. El resultado de esta reacción se muestra en la Figura 25, junto con un control positivo de cDNA de WJ-MSCs y un control negativo del plásmido base que se usó para clonar (AAV GFP).



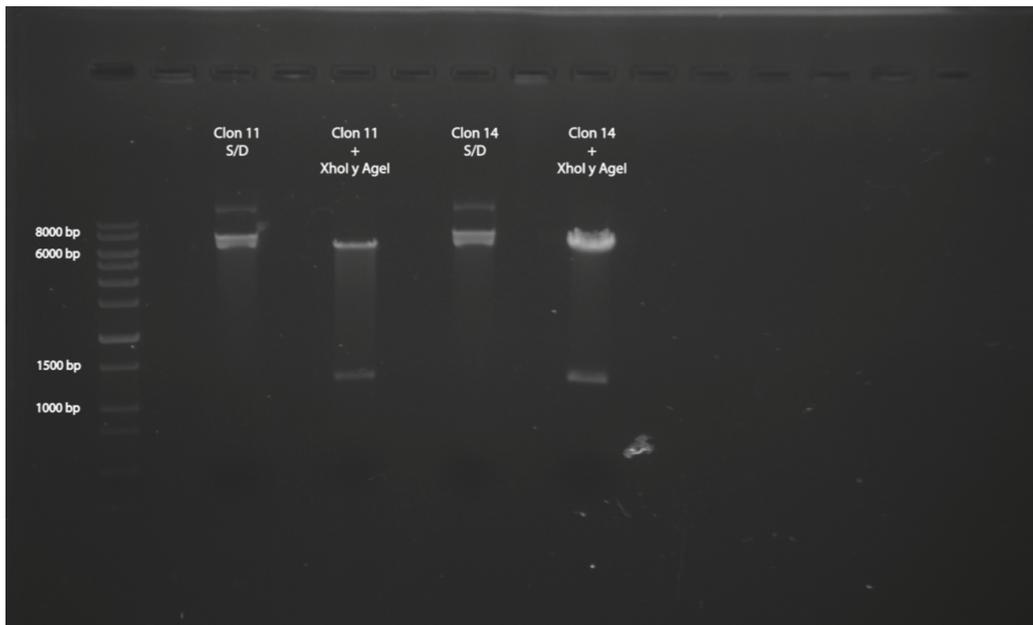
**Figura 25:** Electroforesis en gel de agarosa de las *Colony PCR* para las 16 colonias obtenidas con el plásmido AAV SPARC, con un par de *primers* que amplifican un segmento de 100 pares de bases del gen de SPARC. Como control positivo se utilizó una muestra de cDNA obtenida de WJ-MSCs cultivadas en *spinner flask* (3DA1), y de control negativo el plásmido AAV GFP (AAV-eGFP). Contenido de cada calle en el gel superior, de izquierda a derecha: 1. Marcador de peso molecular; 2. Clon 1; 3. Clon 2; 4. Clon 3; 5. Clon 4; 6. Clon 5; 7. Clon 6; 8. Clon 7; 9. Clon 8; 10. Clon 9; 11. Control positivo; 12. Control negativo. Contenido de cada calle en el gel inferior, de izquierda a derecha: 1. Marcador de peso molecular; 2. Clon 11; 3. Clon 12; 4. Clon 13; 5. Clon 14; 6. Clon 15; 7. Clon 16.

Finalmente, se volvió a realizar una reacción de *Colony PCR* para los clones 5, 9, 11, 12, 14 y 16, que en la Figura 25 muestran una banda intensa consistente con el tamaño del amplicón de SPARC, y que a su vez coincide con la del control positivo. Esta vez se utilizaron los *primers* del clonado de SPARC, cuyo tamaño de amplicón es de aproximadamente 1200 pares de bases, y los mismos controles positivo y negativo que en la reacción anterior. El gel de agarosa resultante se muestra en la Figura 26.



**Figura 26:** Electroforesis en gel de agarosa de las *Colony PCR* para los clones 5, 9, 11, 12, 14 y 16, con el par de *primers* diseñado para clonar el plásmido, que amplifican un segmento de 1185 pares de bases del gen de SPARC. A modo de control positivo se utilizó una muestra de cDNA obtenida de WJ-MSCs cultivadas en *spinner flask* (rotulada como 3DA1), y a modo de control negativo el plásmido AAV GFP (rotulado AAV-eGFP). Contenido de cada calle, de izquierda a derecha: 1. Marcador de peso molecular; 2. Clon 5; 3. Clon 9; 4. Clon 11; 5. Clon 12; 6. Clon 14; 7. Clon 16; 8. Control negativo; 9. Control positivo.

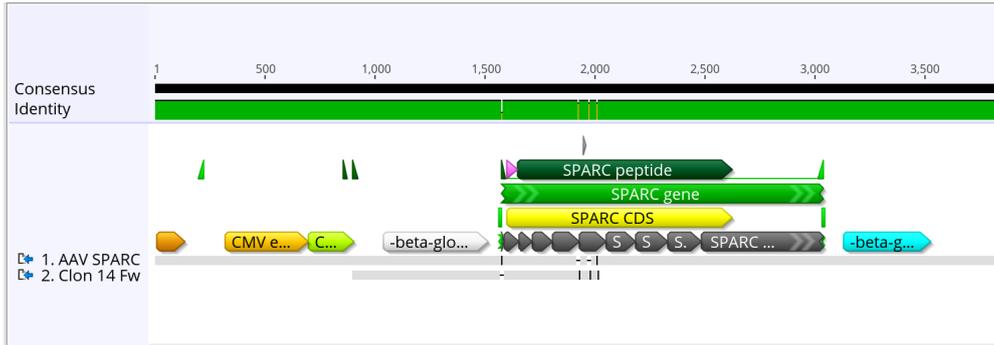
A partir del gel de la Figura 26, es posible concluir que los clones 5, 9, 11, 14 y 16 son positivos, es decir, que tienen el vector AAV con el inserto de SPARC incorporado. Para finalizar con el chequeo de los plásmidos resultantes del clonado, se purificaron los clones 11 y 14 y posteriormente se realizó una digestión de los mismos con las enzimas AgeI y XhoI, para verificar que el tamaño de los mismos fuera el adecuado. En la Figura 27 se muestra el gel resultante.



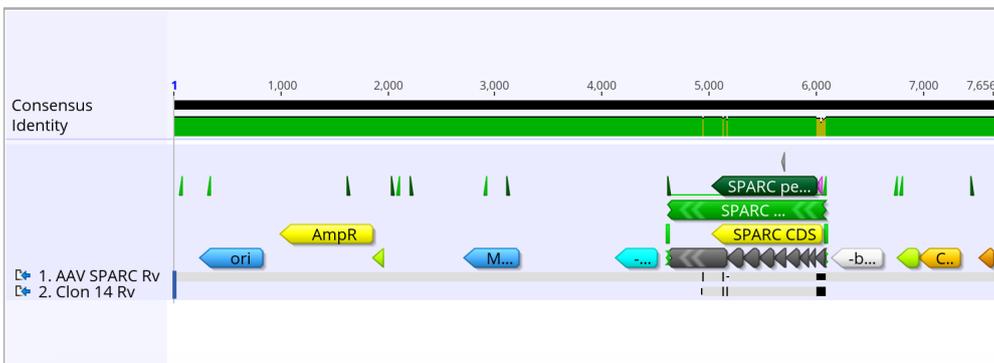
**Figura 27:** Electroforesis en gel de agarosa de los clones 11 y 14 digeridos con las enzimas AgeI y XhoI. Contenido de cada calle, de izquierda a derecha: 1. Marcador de peso molecular; 2. Clon 11 sin digerir; 3. Clon 11 digerido con XhoI y AgeI; 4. Clon 14 sin digerir; 5. Clon 14 digerido con XhoI y AgeI.

En el gel de la Figura 27 se observa que ambos clones muestran las tres bandas correspondientes al plásmido sin digerir: circular, superenrollado y lineal. Esta última, se encuentra a la altura de aproximadamente 7400 pares de bases. Por otro lado, en ambos clones se encuentran las dos bandas esperadas como resultado de la digestión con las enzimas de restricción, a la altura de aproximadamente 6100 y 1200 pares de bases.

Finalmente, además de corroborar que el plásmido tuviera el tamaño indicado en el gel, se envió una muestra de los clones 11 y 14 a secuenciar. Para la secuenciación, se eligieron *primers* tales que se pudiera observar el inserto de SPARC dentro del plásmido, que se encuentra entre las bases 1573 y 3034, con la secuencia codificante entre 1597 y 2624. Los resultados de la secuenciación se alinearon con el plásmido en el clonado *in silico*, obteniendo una identidad de secuencia del 99,4% para el *primer forward* y 98,7% para el *primer reverse*. Estos alineamientos se muestran en las Figuras 28 y 29, respectivamente.



**Figura 28:** Alineamiento entre la secuencia de AAV SPARC diseñada *in silico* y el resultado de la secuenciación a partir del *primer forward*.



**Figura 29:** Alineamiento entre la secuencia de AAV SPARC diseñada *in silico* y el resultado de la secuenciación a partir del *primer reverse*.

En la Figura 28 se observa que hay cuatro diferencias entre la secuencia esperada del plásmido y el resultado de la secuenciación. La primera, en las posiciones 1573 a 1576, son cuatro bases que no se encuentran presentes en el plásmido AAV SPARC clonado, ya que no son parte de la secuencia codificante del gen. Luego, hay otras tres faltantes en las posiciones 1925, 1971 y 2009. Sin embargo, al encontrarse muy cercanas al final del fragmento secuenciado a partir del *primer forward*, no son mediciones muy confiables, debido a la naturaleza del proceso de secuenciación en sí. Por lo tanto, ese fragmento se analizó con la secuencia obtenida con el *primer reverse*.

En la Figura 29 se observa alineamiento entre el resultado de la secuenciación con el *primer reverse* y la secuencia del plásmido reversa y complementaria, por lo que se observan los mismos en sentido contrario a la anterior, y en este caso

el inserto de SPARC está entre 4613 y 6084. Nuevamente se encuentran cuatro diferencias entre la cadena de nucleótidos esperada y la obtenida. En primer lugar, habría una delección en la posición 4933, aunque esta medición no es muy confiable por estar al comienzo de la secuencia obtenida. Luego, se puede notar una diferencia en la base 5128: una A cambia por una G. Sin embargo, ambos codones resultantes (GGA y GGG) codifican para una glicina, por lo que no hay cambios en la secuencia de la proteína resultante. Más adelante, hay un faltante de dos bases (5166 y 5167) que corresponden a un intrón del gen, por lo que es esperable que no estén presentes en el inserto obtenido a partir del ARN mensajero de SPARC. Esto se debe a que el ARNm está conformado únicamente a partir de los exones, como resultado de un proceso de *splicing*. Por lo tanto, estas bases, que estaban presentes en el diseño *in silico*, razonablemente no se encuentran en la secuencia del plásmido resultante, y no hay consecuencias a nivel transcripcional. Finalmente, es posible notar que cerca del final de la secuencia (al principio de la secuencia codificante) hay unas cuantas bases faltantes, pero nuevamente se desestimó este resultado por lo cercano al final de la secuenciación, ya que en la Figura 28 el fragmento se encuentra perfectamente alineado.

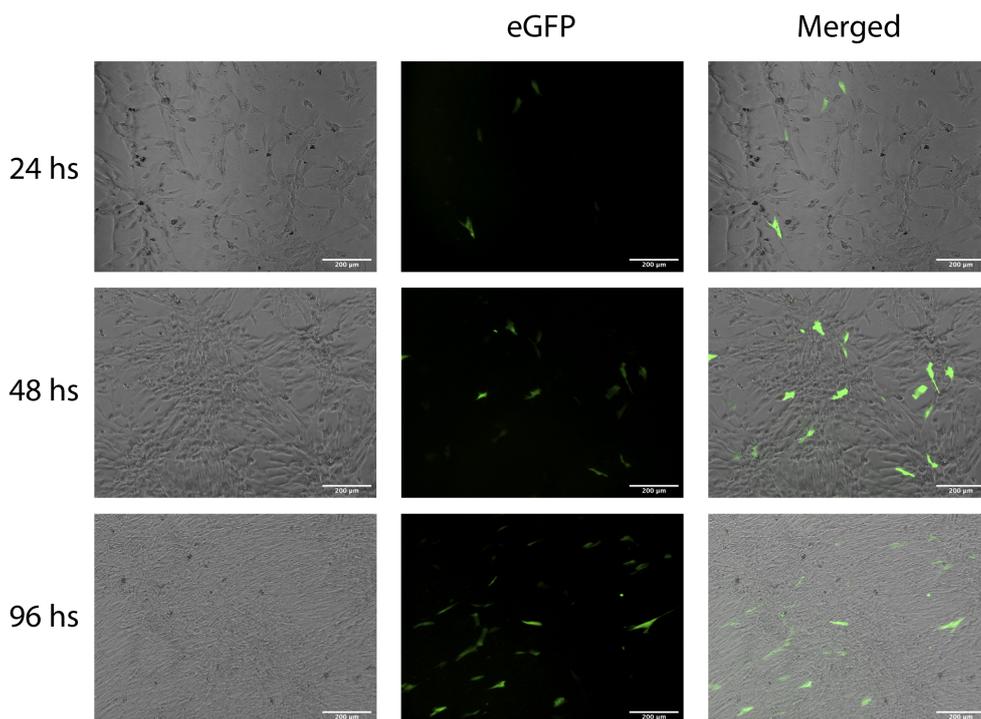
Observando ambas figuras se puede concluir, entonces, que el clonado del plásmido fue exitoso, y que hay una coincidencia total entre lo diseñado *in silico* y la secuencia obtenida.

## 4.4. Transfección de las MSCs con AAV SPARC

Una vez chequeado el plásmido, se procedió a experimentar con diferentes métodos no virales para insertar el mismo dentro de las células madre mesenquimales. Las metodologías estudiadas fueron la transfección con nanopartículas formadas a partir de PEI, y la electroporación.

### 4.4.1. Transfección por nanopartículas

Con el fin de evaluar la eficiencia de la transfección de WJ-MSCs con PEI, se utilizó el plásmido AAV GFP. En la Figura 30 se observa la expresión de GFP 24, 48 y 96 horas luego de la transfección con nanopartículas.

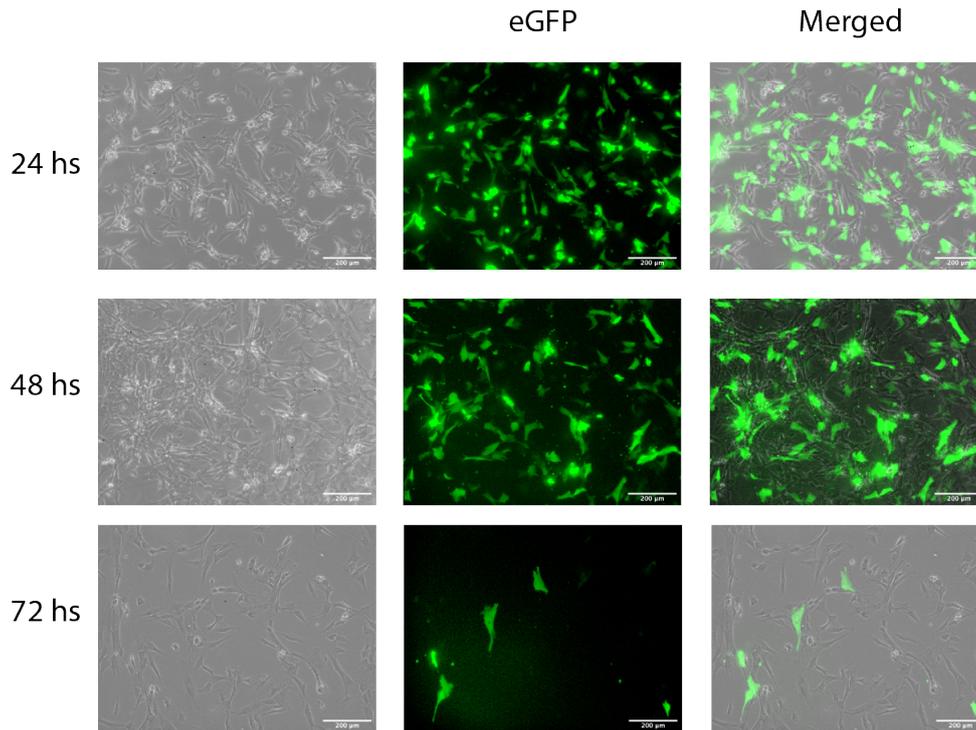


**Figura 30:** WJ-MSCs transfectadas con AAV GFP utilizando PEI. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

En la segunda columna de la Figura 30 se puede observar que a medida que pasaron los días fue aumentando la expresión de GFP. Sin embargo, en la tercera columna, donde se muestra la superposición de las imágenes en campo claro y fluorescencia, es claro que la eficiencia de la transfección es baja.

#### 4.4.2. Transfección por electroporación

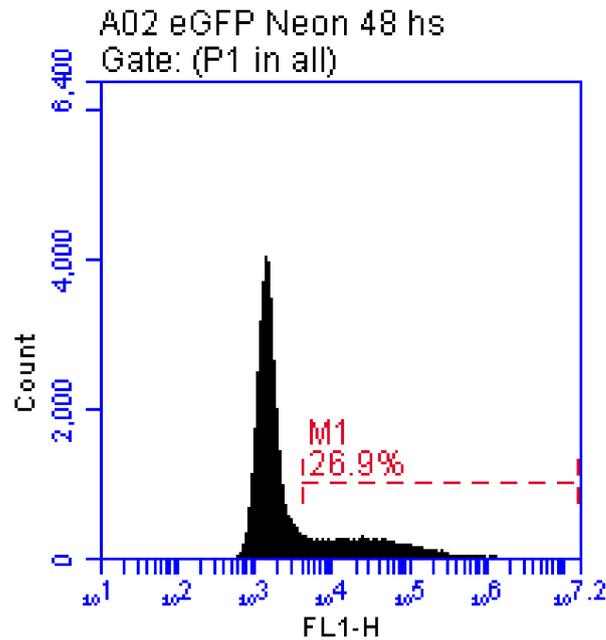
Nuevamente, se utilizó la transfección con el plásmido AAV GFP para cuantificar la eficiencia de la técnica. En la Figura 31 se observa la expresión de fluorescencia a 24, 48 y 72 horas de la transfección utilizando el equipo Neon Transfection System. Se configuraron los parámetros según lo reportado por Madeira *et al.* [40]: un pulso de 1400 V y 30 ms, para 150.000 células en una cámara de electroporación de 10  $\mu\text{l}$ , con 2  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico.



**Figura 31:** WJ-MSCs transfectadas con AAV GFP utilizando Neon Transfection System. Se utilizó un único pulso de 1400 V y 30 ms, 150.000 células y 2  $\mu\text{g}$  de plásmido. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 31 puede observarse que 24 horas luego de la transfección hay una expresión considerable de GFP, que continúa aumentando hasta las 48 horas. Luego, a 72 horas puede notarse que únicamente una pequeña proporción de las células expresan GFP. Además, al analizar las imágenes del campo claro puede observarse que el proceso de la transfección por Neon Transfection System provoca cierto grado de muerte celular.

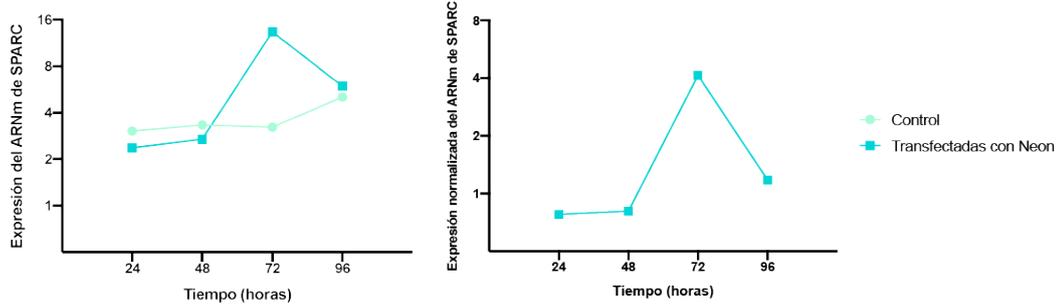
Luego de este experimento, se determinó que la máxima expresión de eGFP utilizando este método de transfección se da a 48 horas. Por lo tanto, se analizó la eficiencia por medio de citometría de flujo 2 días después de la transfección, cuyo resultado se muestra en la siguiente figura.



**Figura 32:** Citometría de flujo de WJ-MSCs transfectadas con AAV GFP utilizando Neon Transfection System. Se utilizó un único pulso de 1400 V y 30 ms para 150.000 células.

En la Figura 32 se observa que la eficiencia de transfección de este experimento fue del 26,9%, lo cual es relativamente bajo, pero se encuentra dentro de lo esperable al utilizar vectores de transfección no virales.

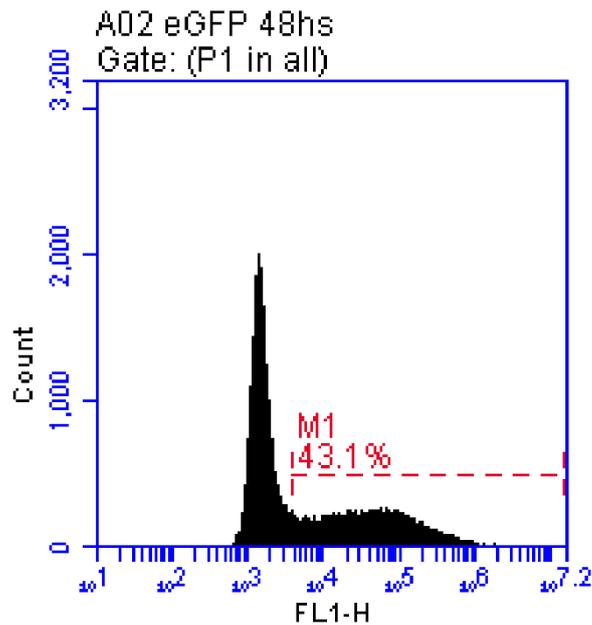
Por otro lado, una porción de estas mismas células se sometieron a extracción de ARN y posterior qPCR, para cuantificar el mensajero de SPARC y analizar si existen diferencias respecto a las WJ-MSC *wild type*. En la Figura 33 se muestran los gráficos resultantes.



**Figura 33:** Resultados de la PCR en tiempo real de ARN mensajero de SPARC, a 24, 48, 72 y 96 horas de la transfección con Neon Transfection System. Se utilizó un único pulso de 1400 V y 30 ms para 150.000 células. En el gráfico de la izquierda se observa la expresión del ARNm de SPARC respecto de las proteínas de referencia (*housekeeping*) para ambas condiciones, y en el de la derecha los valores de las células transfectadas respecto del control.

Como puede observarse en el gráfico de la derecha, las células transfectadas con el plásmido diseñado expresan 4,14 veces más el ARN mensajero de SPARC a 72 horas de la transfección, respecto de las WJ-MSCs *wild type*. Es importante tener en cuenta que este nivel de sobreexpresión se corresponde con una eficiencia de transfección de únicamente 26,9 %, y sin haber realizado ningún tipo de selección de las células modificadas. Aún así, este resultado demuestra que el plásmido diseñado cumple con el objetivo de sobreexpresar SPARC en células madre mesenquimales.

Finalmente, se realizó un nuevo experimento con el Neon Transfection System utilizando parámetros algo diferentes, con el fin de disminuir la muerte celular post-electroporación y así mejorar la eficiencia de transfección. En este caso, se configuró un único pulso de 1300 V y 30 ms, y se utilizó una cámara de electroporación de 100  $\mu$ l para 1.500.000 células, colocando 15  $\mu$ g del plásmido AAV GFP. Nuevamente, se analizó la eficiencia de la transfección a 48 horas por citometría de flujo, como se muestra en la Figura 34.



**Figura 34:** Citometría de flujo de WJ-MSCs transfectadas con AAV GFP utilizando Neon Transfection System. Se utilizó un único pulso de 1300 V y 30 ms para 1.500.000 células.

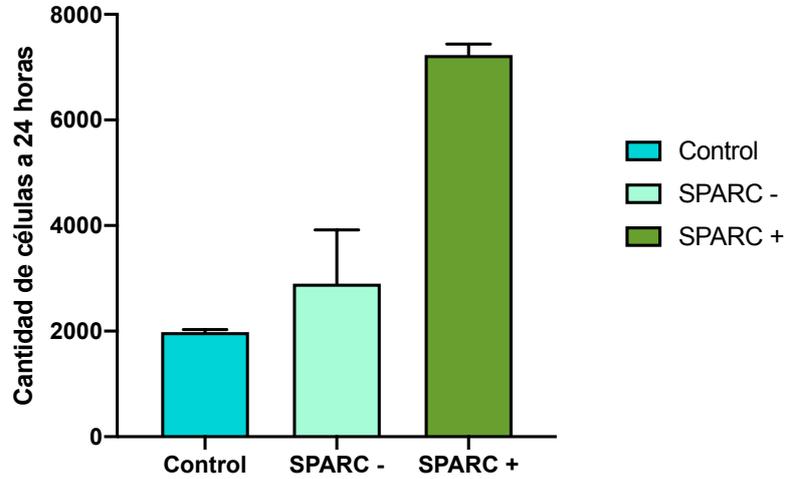
Observando las Figuras 32 y 34, se puede notar que las nuevas condiciones de transfección aumentan en más de un 15 % la eficiencia de transfección, resultando en un valor final de 43,1 %. Aunque no se volvió a medir la cantidad de ARNm producido por las células transfectadas, es posible suponer que la expresión del mensajero de SPARC también se vería incrementada en un porcentaje similar al utilizar los nuevos parámetros, análogamente a lo sucedido con el de GFP.

## 4.5. Análisis de funcionalidad biológica de WJ-MSCs modificadas

### 4.5.1. Proliferación

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de SPARC en la acción proliferativa de las células madre mesenquimales, se cuantificó el número de células de WJ-MSCs luego de 24 horas de cultivo con medio condicionado de las células

transfectadas (SPARC +). A modo de control, se utilizó medio condicionado de células *wild type* (SPARC -), y también  $\alpha$ -MEM (Control). Los resultados se muestran en la Figura 35.



**Figura 35:** Proliferación de WJ-MSCs luego de ser cultivadas por 24 horas con medio condicionado de células que sobreexpresan SPARC (SPARC +), medio condicionado de células *wild type* (SPARC -), y  $\alpha$ -MEM (Control).

Al observar el gráfico de la figura anterior es notable el aumento en la proliferación de las células que se trataron con el medio condicionado de células transfectadas, por sobre las otras dos condiciones. Luego de 24 horas, las WJ-MSCs cultivadas con medio condicionado de las células modificadas fueron cuantificadas en un promedio de  $7229 \pm 207$ . Por otro lado, las WJ-MSCs cultivadas con medio condicionado de WJ-MSCs *wild type* alcanzaron una media de  $2900 \pm 1017$ ; mientras que el control con  $\alpha$ -MEM tuvo un promedio de  $1982 \pm 48$ .

## 5 Discusión

Las MSCs tienen propiedades terapéuticas muy prometedoras que las han hecho de interés en el campo de la medicina regenerativa. Además de poder autopropagarse, es de principal interés su capacidad de dirigirse hacia los sitios de inflamación y facilitar la reparación de los tejidos, principalmente mediante la secreción de factores de crecimiento, citoquinas y vesículas extracelulares. De esta manera, se promueve la migración y la proliferación celular, además de modular la respuesta inmunológica [40].

Una de las principales limitaciones que existen actualmente para el desarrollo de terapias basadas en células madre mesenquimales es la cantidad de células necesaria para su aplicación clínica. A diferencia de otros tipos celulares, como las células hematopoyéticas, las MSCs crecen en adherencia, por lo que su cultivo tradicionalmente suele ser en placas de Petri, lo cual es muy poco práctico para la escalabilidad del cultivo. Es por ello que se optó por una técnica tridimensional de cultivo. Al utilizar biorreactores de tipo *spinner flasks* con células en suspensión adheridas a *microcarriers*, se logró amplificar las WJ-MSCs de una manera más práctica y eficiente. Luego de cinco días de cultivo, esta metodología logró casi duplicar la cantidad de células totales, respecto del uso de placas de Petri. Se concluye entonces que el cultivo en 3D provee de una buena alternativa para la expansión de este tipo de células de manera escalable, siendo de especial utilidad para futuras aplicaciones de terapias celulares.

Otro de los desafíos presentes actualmente en el campo de la medicina regenerativa con MSCs es la dificultad para aprovechar las propiedades terapéuticas de estas células. Para mejorar el desempeño de estas células en el ámbito clínico, se está estudiando en la actualidad modificarlas, mediante distintas herramientas de ingeniería genética, con el fin de potenciar sus efectos positivos sobre otros tejidos. Una de las estrategias posibles es fomentar la sobreexpresión de genes que están relacionados con estos procesos regenerativos. Como se mencionó anteriormente,

SPARC es una proteína que modula la interacción entre las células y la membrana extracelular, que se encuentra implicada en el cerrado de heridas. Se planteó entonces que la sobreexpresión de esta proteína podría aumentar las propiedades terapéuticas intrínsecas de las MSCs, y posiblemente también las de los exosomas que estas células secretan.

En este trabajo se diseñó y desarrolló una herramienta de modificación genética para la sobreexpresión transitoria de SPARC específicamente en MSCs. De esta manera, se logró clonar el inserto de SPARC en un vector AAV que contiene, además, río arriba de la secuencia codificante, el promotor del citomegalovirus (CMV). Este es un promotor fuerte que ha demostrado aumentar la expresión del transgen dentro de las células de mamíferos [47]. La utilización de promotores fuertes es uno de los factores clave para el mantenimiento de la expresión en el tiempo, con el fin de poder utilizar las células modificadas para el desarrollo de alguna aplicación terapéutica. El proceso del clonado del plásmido, diseñado en primer lugar mediante herramientas bioinformáticas, e implementado posteriormente utilizando diferentes técnicas de laboratorio, fue exitoso, y adicionalmente se comprobó que el mismo cumple con el objetivo para el cual fue desarrollado.

En cuanto a la inserción del plásmido dentro de la célula, se analizaron diferentes tipos de vectores virales y no virales. La primera experiencia, utilizando partículas de Adenovirus, demostró que la eficiencia de transducción de este tipo de vectores es muy alta, y la toxicidad baja. En los análisis de la infección de MSCs con Ad GFP, se obtuvo una eficiencia muy alta. Sin embargo, al utilizar Ad SPARC no se detectó diferencia en la expresión de este gen respecto de las células *wild type*. Luego, al desarrollar un vector de sobreexpresión propio, el objetivo original fue utilizar otro virus para mantener la eficiencia de transducción lograda: el AAV. Estos vectores virales, según lo reportado, logran modificar genéticamente MSCs con una expresión sostenida por semanas luego de la transducción de las células [22]. Además, al no ser replicativos en humanos, el manejo de este tipo de virus en el laboratorio es más sencillo.

Dado que no se contó con las herramientas necesarias para el armado de las partículas virales de AAV, se optó por experimentar con técnicas de transducción no basadas en virus. Los métodos no virales suelen ser prácticos y escalables, pero tienen como principal desventaja su limitada eficiencia, especialmente en

el tipo celular estudiado [40]. La primera opción, la transfección mediante las nanopartículas lipídicas demostró que el plásmido desarrollado fue capaz de expresarse en MSCs. No obstante, la eficiencia de transfección fue demasiado baja, y luego de 96 horas la proporción de células modificadas respecto de las *wild type* era muy pequeña. Por ende, se experimentó con la técnica de electroporación. Aunque con las condiciones iniciales la eficiencia de transfección utilizando el Neon Transfection System fue relativamente baja (aproximadamente 27%), las MSCs modificadas expresaron más de cuatro veces más ARNm de SPARC que las *wild type*. Posteriormente, se optimizaron los parámetros de electroporación para lograr una eficiencia de transfección de más del 43%, por lo cual se supone que podría aumentarse análogamente la expresión del ARN mensajero. Estos resultados comprueban que la herramienta de ingeniería genética desarrollada en este trabajo cumple con su objetivo primordial, el de sobreexpresar SPARC en células madre mesenquimales.

Finalmente, al estudiar la funcionalidad biológica de las MSCs modificadas, se observó que al sobreexpresar SPARC se aumentarían los efectos proliferativos inherentes a este tipo celular. Se observó que al cultivar WJ-MSCs con el medio condicionado de células que sobreexpresan esta proteína, la cantidad de MSCs final es 3,6 veces mayor que al cultivar con  $\alpha$ -MEM, y 2,5 veces mayor que al utilizar medio condicionado de MSCs *wild type*. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de esta proteína de la matriz extracelular podría mejorar las propiedades regenerativas de este tipo de células madre, y abren el camino a futuro para aplicaciones clínicas prometedoras. Es necesario que se continúe realizando estudios en esta línea.

El siguiente paso que se propone para continuar con esta línea de investigación es el armado de las partículas virales, como se había planificado originalmente. Se plantea que a futuro, cuando sea posible conseguir los insumos necesarios, pueda implementarse el protocolo de producción de AAV, lo cual podría resultar un vector con una mayor eficiencia de transducción, y probablemente una expresión del transgen sostenida por más tiempo. De esta manera, se podría analizar la modificación genética de las MSCs en paralelo con el cultivo en *spinner flasks*, que potencialmente podría resultar en una mayor cantidad de células modificadas.

Además, se propone que se continúe estudiando las potenciales acciones prolife-

rativas de las MSCs modificadas en otros tipos celulares. El ensayo de proliferación realizado podría indicar que las MSCs que sobreexpresan SPARC favorecen la proliferación de células del mismo tipo mediante su secretoma. En línea con los antecedentes mencionados [34, 35], podría analizarse el efecto de las mismas en fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, con el fin de determinar si existe algún efecto biológico de estas células sobre el proceso de cierre de herida. En un futuro, podría experimentarse no solamente con ensayos *in vitro*, sino con pruebas *in vivo*.

Para finalizar con las perspectivas futuras, y a partir de una mayor cantidad de células que sobreexpresan SPARC, se propone el estudio de la funcionalidad biológica de los exosomas de estas células modificadas. Como fue mencionado, hay evidencia de que la modificación genética de MSCs puede provocar un cambio en el contenido de las vesículas extracelulares que estas secretan [15]. Teniendo en cuenta que los exosomas son, al menos parcialmente, responsables de los efectos regenerativos característicos de este tipo celular [32], es posible pensar que las vesículas producidas por células que sobreexpresan SPARC pueden tener propiedades terapéuticas potenciadas. De esta manera, los exosomas de las células madre modificadas con la herramienta desarrollada en este trabajo podrían convertirse en una alternativa terapéutica libre de células para el cerrado de heridas crónicas.

## 6 Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo fue modificar genéticamente células madre mesenquimales para que sobreexpresen la proteína SPARC. A partir de los resultados expuestos, se concluye que el plásmido desarrollado en este trabajo cumple con el fin de sobreexpresar SPARC en MSCs derivadas de WJ. Esta herramienta de ingeniería genética queda disponible en el LIAN para ser utilizada en otros experimentos futuros.

Para lograr el cumplimiento del objetivo general, se procedió a diseñar y construir el plásmido AAV SPARC. Luego, se experimentó con diferentes tipos de vectores virales y no virales para la introducción del ADN plasmídico dentro de la célula. Posteriormente, para analizar los efectos de la transducción o transfección se utilizaron diferentes técnicas de laboratorio, como la citometría de flujo y la qPCR. Estas experiencias demostraron que el desarrollo de la herramienta de ingeniería genética fue exitoso. Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de proliferación para estudiar la funcionalidad biológica de las células modificadas genéticamente.

Por otro lado, y nuevamente teniendo como foco las potenciales aplicaciones clínicas basadas en MSCs, se experimentó con biorreactores para escalar el cultivo de estas células. Se demostró que la amplificación de WJ-MSCs es considerablemente mayor al cultivarlas en *spinner flasks*, ofreciendo una alternativa de alto rendimiento y gran practicidad a las tradicionales placas de Petri.

# Bibliografía

- [1] OpenStax, *Anatomy and Physiology*. OpenStax CNX, 2016.
- [2] A. I. Caplan, “Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 213, no. 04, pp. 341–347, 2007.
- [3] A. I. Caplan and D. Correa, “The MSC: an injury drugstore,” *Cell Stem Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 11–15, 2011.
- [4] C. Théry, L. Zitvogel, and S. Amigorena, “Exosomes: composition, biogenesis and function,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 8, pp. 569–579, 2002.
- [5] A. Chen, R. S., and O. S.K., “Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction,” *Biotechnology Advances*, vol. 31, p. 1032–1046, 2013.
- [6] A. C. Tsai and T. Ma, “Expansion of human mesenchymal stem cells in a microcarrier bioreactor,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1502, pp. 77–86, 2016.
- [7] J. Phan, P. Kumar, D. Hao, K. Gao, D. Farmer, and A. Wang, “Engineering mesenchymal stem cells to improve their exosome efficacy and yield for cell-free therapy,” *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 7, p. 1522236, 2018.
- [8] E. Hohenester, T. Sasaki, C. Giudici, R. W. Farndale, and H. P. Bächinger, “Structural basis of sequence-specific collagen recognition by sparc.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 18273–18277, Nov 2008.
- [9] Sehnal, David and Deshpande, Mandar and Vařeková, Radka Svobodová and Mir, Saqib and Berka, Karel and Midlik, Adam and Pravda, Lukáš and Velankar, Sameer and Koča, Jaroslav, “LiteMol Suite.” [Disponibile en <https://www.litemol.org>].

- [10] The UniProt Consortium, “UniProtKB - P09486 (SPRC\_HUMAN),” 2020. [En línea; consultado el 3-03-2021].
- [11] National Center for Biotechnology Information (NCBI), “SPARC secreted protein acidic and cysteine rich [ Homo sapiens (human) ],” 2021. [En línea; consultado el 3-03-2021].
- [12] National Center for Biotechnology Information (NCBI), “SPARC isoform 3 precursor [Homo sapiens],” 2021. [En línea; consultado el 3-03-2021].
- [13] R. A. Brekken and E. H. Sage, “SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication,” *Matrix Biology*, vol. 19, no. 8, pp. 816–827, 2001.
- [14] M. J. Reed and E. H. Sage, “SPARC and the extracellular matrix: Implications for cancer and wound repair,” *Current Topics Microbiology and Immunology*, vol. 213, no. 1, pp. 81–94, 1996.
- [15] A. Basu, L. Kligman, S. Samulewicz, and C. Howe, “Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40),” *BMC Cell Biology*, vol. 2, p. 15, 2001.
- [16] S. R. Nussbaum, M. J. Carter, C. E. Fife, J. DaVanzo, R. Haught, M. Nussgart, and D. Cartwright, “An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic nonhealing wounds,” *Value Health*, vol. 21, no. 1, pp. 27–32, 2018.
- [17] N. Kosaric, H. Kiwanuka, and G. C. Gurtner, “Stem cell therapies for wound healing,” *Expert Opin Biol Ther*, vol. 19, no. 6, pp. 575–585, 2019.
- [18] F. Crick, “On protein synthesis,” *Symposia of the Society for Experimental Biology*, vol. 12, pp. 138–163, 1958.
- [19] YourGenome.org, “What is the ‘Central Dogma’?,” 2016. [En línea; consultado el 16-04-2020].
- [20] N. Nayerossadat, T. Maedeh, and P. A. Ali, “Viral and nonviral delivery systems for gene delivery,” *Advanced biomedical research*, vol. 1, pp. 27–27, 2012.
- [21] Addgene’s blog, “Plasmids 101: What is a plasmid?,” 2020. [En línea; consultado el 25-11-2020].

- [22] A. Nowakowski, A. Andrzejewska, M. Janowski, P. Walczak, and B. Lukomska, "Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy," *Acta neurobiologiae experimentalis*, vol. 73, pp. 1–18, 2013.
- [23] Y. Huang, X. Liu, L. Dong, Z. Liu, X. He, and W. Liu, "Development of viral vectors for gene therapy for chronic pain," *Pain Reaserch and Treatment*, vol. 2011, pp. 1–8, 2011.
- [24] D. Stone, "Novel viral vector systems for gene therapy," *Viruses*, vol. 2, no. 4, pp. 1002–1007, 2010.
- [25] R. Gardlík, R. Pálffy, J. Hodosy, J. Lukács, J. Turna, and P. Celec, "Vectors and delivery systems in gene therapy," *Medical Science Monitor*, vol. 11, no. 4, pp. 110–121, 2005.
- [26] S. Teramoto, T. Ishii, and T. Matsuse, "Crisis of adenoviruses in human gene therapy," *The Lancet*, vol. 355, no. 9218, pp. 1911–1912, 2000.
- [27] "Vectors used in gene therapy clinical trials." [En línea; consultado el 17-04-2020].
- [28] S. Daya and K. I. Berns, "Gene therapy using adeno-associated virus vectors," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, no. 4, pp. 583–593, 2008.
- [29] C. M. Lai, Y. K. Y. Lai, and P. E. Rakoczy, "Adenovirus and adeno-associated virus vectors," *DNA and Cell Biology*, vol. 21, no. 12, pp. 895–913, 2002. PMID: 12573049.
- [30] A. King, "The quest to cure HIV," 2018. [En línea; consultado el 16-04-2020].
- [31] A. Fuster-Matanzo, F. Gessler, T. Leonardi, N. Iraci, and S. Pluchino, "Acellular approaches for regenerative medicine: on the verge of clinical trials with extracellular membrane vesicles?," *Stem cell Research Therapy*, vol. 6, p. 227, 2015.
- [32] J. R. Lavoie and M. Rosu-Myles, "Uncovering the secretes of mesenchymal stem cells," *Biochimie*, vol. 95, no. 12, pp. 2212–2221, 2013.
- [33] J. Zhang, J. Guan, X. Niu, G. Hu, S. Guo, Q. Li, Z. Xie, C. Zhang, and Y. Wang, "Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen

- synthesis and angiogenesis,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 1, p. 49, 2015.
- [34] M. N. Walter, K. T. Wright, H. R. Fuller, S. MacNeil, and W. E. Johnson, “Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays,” *Experimental Cell Research*, vol. 316, no. 7, pp. 1271–1281, 2010.
- [35] J. Ma, Y. Zhao, L. Sun, X. Sun, X. Zhao, X. Sun, H. Qian, W. Xu, and W. Zhu, “Exosomes derived from Akt-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells improve cardiac regeneration and promote angiogenesis via activating platelet-derived growth factor D,” *Stem cells translational medicine*, vol. 6, 2016.
- [36] H. González-King Garibotti, N. A. Garcia, I. Ontoria-Oviedo, M. Ciria, A. Montero, and P. Sepulveda, “Hypoxia inducible factor-1 alpha potentiates jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes,” *Stem Cells*, vol. 35, 2017.
- [37] U.S National Library of Medicine, “Clinicaltrials.gov.” [En línea; consultado el 28-12-2020].
- [38] A. Hamann, A. Nguyen, and A. K. Pannier, “Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications,” *Journal of Biological Engineering*, vol. 13, no. 1, p. 7, 2019.
- [39] S. J. Kim, W. I. Lee, H. Heo, O. Shin, Y. K. Kwon, and H. Lee, “Stable gene expression by self-complementary adeno-associated viruses in human MSCs,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 360, no. 3, pp. 573–579, 2007.
- [40] C. Madeira, S. C. Ribeiro, I. S. M. Pinheiro, S. A. M. Martins, P. Z. Andrade, C. L. da Silva, and J. M. S. Cabral, “Gene delivery to human bone marrow mesenchymal stem cells by microporation,” *J Biotechnol*, vol. 151, no. 1, pp. 130–136, 2011.
- [41] GraphPad Software, “Graphpad Prism 9.0.0.” [Disponibile en <https://www.graphpad.com>].

- [42] H. B. Mann and D. R. Whitney, “On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other,” *The Annals of Mathematical Statistics*, vol. 18, no. 1, pp. 50 – 60, 1947.
- [43] C. Atorrasagasti, M. Malvicini, J. B. Aquino, L. Alaniz, M. Garcia, M. Bolontrade, M. Rizzo, O. L. Podhajcer, and G. Mazzolini, “Overexpression of SPARC obliterates the in vivo tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells.,” *Int J Cancer*, vol. 126, no. 11, pp. 2726–2740, 2010.
- [44] Biomatters Ltd, “Geneious Prime 2020.1.2.” [Disponibile en <https://www.geneious.com>].
- [45] National Center for Biotechnology Information (NCBI), “Homo sapiens secreted protein acidic and cysteine rich (SPARC), transcript variant 1, mRNA,” 2021. [En línea; consultado el 3-03-2021].
- [46] B. Kaspar, B. Vissel, T. Bengoechea, S. Crone, L. Randolph-Moore, R. Muller, E. Brandon, D. Schaffer, I. Verma, K. Lee, S. Heinemann, and F. Gage, “Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 4, pp. 2320–5, 2002.
- [47] W. Xia, P. Bringmann, J. McClary, P. P. Jones, W. Manzana, Y. Zhu, S. Wang, Y. Liu, S. Harvey, M. R. Madlansacay, K. McLean, M. P. Rosser, J. MacRobbie, C. L. Olsen, and R. R. Cobb, “High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines,” *Protein Expression and Purification*, vol. 45, no. 1, pp. 115 – 124, 2006.