



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE UN  
PLÁSMIDO PORTADOR DEL GEN DE PROTEÍNA DE  
FLUORESCENCIA VERDE EN CÉLULAS MADRES  
MESENQUIMALES BOVINAS OBTENIDAS DESDE MÉDULA ÓSEA  
FETAL

**PAULINA VERONICA DÍAZ PÉREZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la Producción Animal

PROFESOR GUÍA: OSCAR PERALTA TRONCOSO  
Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT N°11100205

SANTIAGO, CHILE  
2015



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE UN  
PLÁSMIDO PORTADOR DEL GEN DE PROTEÍNA DE  
FLUORESCENCIA VERDE EN CÉLULAS MADRES  
MESENQUIMALES BOVINAS OBTENIDAS DESDE MÉDULA ÓSEA  
FETAL

**PAULINA VERONICA DÍAZ PÉREZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la Producción Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ÓSCAR PERALTA T.	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: MONICA DE LOS REYES S.	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: LEONARDO SÁENZ I.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2015

# “DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE UN PLÁSMIDO PORTADOR DEL GEN DE PROTEÍNA DE FLUORESCENCIA VERDE EN CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES BOVINAS OBTENIDAS DESDE MÉDULA ÓSEA FETAL”

Paulina V. Díaz Pérez\*

\*Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile. Correo 2, Casilla 15, La Granja. Fono 56-02-9785638. Fax: 56-02-9785613.

## RESUMEN

El potencial de autorenovación y diferenciación multilinaje ha generado expectativas respecto del uso de células madres mesenquimales (CMM) para ingeniería tisular y medicina regenerativa. En este sentido es relevante evaluar el potencial de manipulación genética de las CMM. El objetivo del presente estudio fue determinar la eficiencia de transfección del plásmido pTracer/CMV/Bsd mediante la utilización de Lipofectamina LTX en CMM aisladas desde médula ósea bovina. CMM aisladas desde médula ósea de fetos bovinos (7-9 meses de gestación, n=3) mediante adherencia al plástico, fueron cultivadas en presencia de una combinación en concentraciones crecientes de pTracer/CMV/Bsd (250, 500 y 750 ng) y de Lipofectamina LTX (1, 1.5, 2, 3, 4.5, 6, 9, 12 µl/ml). Luego de 24 horas, el número de CMM positivas a la proteína de fluorescencia verde (GFP) fue determinado por conteo visual mediante microscopía de epifluorescencia y confirmado por citometría de flujo. Los niveles de mRNA de GFP en CMM fueron determinados mediante PCR cuantitativo (Q-PCR). La utilización de 750 ng/ml de pTracer/CMV/Bsd y 9 µl/ml de Lipofectamina LTX permitieron alcanzar una mayor proporción de células positivas a GFP (15,7%, P<0,05). La concentración mínima efectiva de blasticidina fue de 2 µg/ml. Cultivos de CMM transfectadas y seleccionadas con blasticidina por 21 días, generaron escasas colonias de CMM positivas a GFP. Estas células expresaron mRNA de GFP con un valor CT de 9,94. En conclusión, a pesar de presentar una baja eficiencia de transfección, es posible incorporar de manera estable el plásmido pTracer/CMV/Bsd utilizando Lipofectamina LTX en CMM bovinas fetales.

**Palabras clave:** células madres mesenquimales, diferenciación multilinaje, transfección.

# **“DETERMINATION OF THE TRANSFECTION EFFICIENCY OF A PLASMID CONTAINING GREEN FLUORESCENT PROTEIN GENE IN MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM BOVINE FETAL BONE MARROW”**

**Paulina V. Díaz Pérez\***

\*Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile. Correo 2, Casilla 15, La Granja. Fono 56-02-9785638. Fax: 56-02-9785613.

## **ABSTRACT**

The self-renewal and multilineage differentiation potential has generated expectations for the potential use of mesenchymal stem cells (MSC) in tissue engineering and regenerative medicine. In this respect, it is relevant to evaluate the potential for genetic manipulation of MSC. The main objective of the present study was to determine the transfection efficiency of the plasmid pTracer/CMV/Bsd using Lipofectamine LTX in bovine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC). MSC were isolated from bone marrow collected from bovine fetuses (7-9 months of gestation, n=3), based on the capacity to adhere to plastic culture flasks. Thereafter, MSC were cultured in presence of a combination of increasing concentrations of pTracer/CMV/Bsd (250, 500 y 750 ng) and Lipofectamine LTX (1, 1.5, 2, 3, 4.5, 6, 9, 12  $\mu$ L/mL). After 24 hours, the number of GFP-positive MSC was determined by visual counting using an epifluorescence microscope and corroborated by flow cytometry. The levels of GFP mRNA were determined by quantitative PCR (Q-PCR). The use of 750 ng/mL of pTracer/CMV/Bsd and 9  $\mu$ L/mL of Lipofectamina LTX allowed to achieve the highest proportion of GFP-positive MSC (15.7%,  $P<0.05$ ). The lowest effective blasticidin concentration was of 2  $\mu$ g/mL. Culture of transfected MSC and selection for 21 days using blasticidin resulted in reduced number of isolated GFP-positive MSC colonies. These cells expressed a GFP mRNA with a CT value of 9.94. In conclusion, despite the low transfection efficiency, it is possible to incorporate a pTracer/CMV/Bsd plasmid using Lipofectamine LTX in MSC isolated from bovine fetuses.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, multilineage differentiation, transfection

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las células madres (CM) se caracterizan por presentar capacidad de autorenovación y de diferenciación hacia tipos celulares específicos. Este tipo de células, se clasifican primariamente de acuerdo a su potencial de desarrollo en CM totipotentes, que pueden generar un organismo completo incluyendo tejido extraembrionario, (en mamíferos presentes solo en el cigoto y células del blastómero temprano), en CM pluripotentes, que pueden originar células pertenecientes a los tres linajes embrionarios (mesodermo, ectodermo y endodermo), o en CM multipotentes, que generan múltiples tipos celulares de un linaje embrionario específico (Jaenisch y Young, 2008). Por otro lado, según su origen en el desarrollo, las CM pueden clasificarse como embrionarias o adultas. Las CM embrionarias son células pluripotentes, que derivan desde el macizo celular interno del blastocisto en mamíferos y se diferencian en todas las líneas celulares, exceptuando las derivadas de placenta. A diferencia, las CM provenientes de tejidos adultos son capaces de desarrollar solo un limitado número de tipos celulares. Las CM adultas se encuentran prácticamente en todos los tejidos, sin embargo, los tejidos de médula ósea y adiposo han sido principalmente estudiados debido a la amplia disponibilidad de CM conocidas como células madres mesenquimales (CMM) que presentan (Odorico *et al.*, 2001).

### **1. 1. Células Madres Mesenquimales**

Las CMM fueron inicialmente definidas como células progenitoras con capacidad ilimitada de autorenovación y potencial de generar progenie del tipo celular musculoesquelético (Caplan, 1991). Basado tanto en investigaciones científicas, bajo condiciones de laboratorio, como en estudios preclínicos con CMM humanas, en el año 2006 la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios específicos para la identificación de estas células: 1) adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar, 2) expresión de marcadores de superficie mesenquimales CD105, CD73 y CD90 y ausencia de marcadores de linaje hematopoyético CD34, CD45 y CD19 y 3) capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, bajo condiciones de cultivo estándar *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

Las CMM están presentes en diversos tejidos adultos como médula ósea, tejido adiposo, periostio, membrana y fluido sinovial y músculo esquelético, entre otros (Augello *et al.*,

2010). La medula ósea cuenta con un ambiente especializado que permite la proliferación de células hematopoyéticas indiferenciadas, y posee también una población de CMM que corresponde a un 0.001-0.01% de la fracción total celular (Pittenger *et al.*, 1999). Las CMM pueden ser aisladas desde el estroma medular basándose en su habilidad de adherencia al plástico, permitiendo así una fácil separación de la fracción hematopoyética no adherible (Bosnakovski *et al.*, 2004). Bajo condiciones de cultivo celular apropiados y a través de estimulación exógena, principalmente determinada por el ambiente celular local y la interacción con células circundantes, o estimulación endógena, relacionada con la síntesis de proteínas específicas, estas células pueden diferenciarse hacia distintos linajes celulares (Bosnakovski *et al.*, 2005). Se ha reportado el potencial de las CMM para diferenciarse hacia linajes celulares mesenquimales como osteogénico, condrogénico y adipogénico (Pittenger *et al.*, 1999). Sin embargo, en el último tiempo se ha descrito adicionalmente la capacidad de diferenciación de estas células hacia linajes no mesenquimales como el neurogénico y el hepatogénico (Woodbury *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012, Dueñas *et al.*, 2014). Como consecuencia, las CMM han sido ampliamente estudiadas como una fuente alternativa para la ingeniería tisular debido a su habilidad de diferenciación y a que su estabilidad fenotípica se mantiene a través múltiples pasajes (Lee *et al.*, 2009).

En el ámbito de la Medicina Veterinaria, se ha desarrollado gran cantidad de investigación básica y aplicada para la utilización de CMM en medicina regenerativa, principalmente en las especies equina y canina. En equinos, se ha reportado el tratamiento de desmitis del ligamento suspensorio mediante inyecciones de aspirados de medula ósea (Herthel, 2001). En caninos, se han realizado estudios que buscan establecer la diferenciación osteocondral de CMM con el objetivo de desarrollar tratamientos para la osteoartritis crónica de la articulación coxofemoral (Kadiyala *et al.*, 1997). A pesar de su amplia utilización como modelo experimental, en la actualidad se dispone de limitada información sobre CMM en la especie bovina. En el caso del potencial uso de CMM para aplicación en medicina regenerativa, es imprescindible evaluar la capacidad de manipulación genética de estas células con el objetivo de mejorar su eficiencia de diferenciación y de transferencia de genes o factores que mejoren su potencial de regeneración tisular. Así mismo, el potencial

de transferencia de genes permitiría incorporar genes reporteros para realizar el seguimiento de estas células luego de su implantación *in vivo*.

## **2. Transfección de CMM**

La transfección celular, es un método que permite incorporar ácidos nucleicos o genes en células mamíferas a través de transportadores o agentes específicos. Principalmente se describen dos métodos básicos que permiten la incorporación o transfección de genes en CMM. El primer método corresponde a la transfección viral mediante la utilización de virus modificado genéticamente (lentivirus, adenovirus o retrovirus) que permite el transporte y la incorporación de un gen de interés en el genoma celular (Pfeifer y Verma, 2001). Los vectores virales poseen una alta eficiencia de transfección generando entre 50 a 100% de células positivas al gen de interés (Goins *et al.*, 2004). Adicionalmente, este tipo de transfección, permite un alto nivel de expresión del gen. Sin embargo, este tipo de vectores posee ciertas desventajas como su potencial citotoxicidad, rechazo inmunológico y mutagénesis en la célula transfectada (Santos *et al.*, 2011). El segundo método corresponde a la transfección no viral basada en la utilización de un vector o plásmido que transporta la secuencia del gen de interés. Este método posee una alta eficiencia en la entrega de genes y una baja citotoxicidad (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008). El vector puede ser transfectado por medio de métodos químicos como la lipofección y el método calcio-fosfato o físicos como en el caso de la electroporación, microinyección y transfección por láser. Los métodos químicos utilizan el principio de cargas eléctricas para interactuar con la membrana celular, en cambio, los métodos físicos se basan en la utilización de herramientas que incorporan de manera mecánica ácidos nucleicos en el núcleo celular (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008).

La lipofectamina corresponde a un agente químico de lipofección no viral que está compuesta por varios tipos de lípidos, tales como, derivados cationizados de colesterol y diacilglicerol, y derivados lipídicos de poliaminas (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008). La estructura básica de los lípidos catiónicos, consiste de un grupo químico cargado positivamente unido a una o dos cadenas de hidrocarburos (Martin *et al.*, 2005). El grupo positivo del lípido genera la interacción con el fosfato del ácido nucleico del plásmido, formando así el complejo liposoma-plásmido (complejo de transfección). Al unirse el lípido con el plásmido, la carga de este se vuelve positiva lo que permite la interacción con la

membrana celular cargada negativamente, finalmente mediante un proceso de endocitosis el complejo de transfección entra al citoplasma celular (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008).

La expresión de un gen transfectado puede ser transitoria, sin integración al genoma celular y por lo tanto su expresión es por un periodo limitado de tiempo, en este caso es posible que el plásmido transfectado se mantenga episomal, donde una secuencia estable de ADN persiste en el núcleo celular sin integración en el genoma de la célula (Thomas *et al.*, 2003). Alternativamente, la expresión de un gen puede ser estable, permitiendo su incorporación al genoma de la célula y perpetuando su expresión en forma permanente en la célula y su progenie celular (Kim y Eberwine, 2010). Para desarrollar una línea estable de células transfectadas, se debe distinguir las células que expresan el ADN de forma transitoria, de aquellas que han logrado una transfección estable de la secuencia. Para este fin, se utilizan vectores que contienen un gen de resistencia antibiótica, y que permiten la selección de células que expresan la secuencia del vector transfectado. Aquellas células no transfectadas, no poseen este gen de resistencia, por lo tanto son incapaces de sobrevivir en condiciones de selección (Kim y Eberwine, 2010). Existen variados compuestos antibióticos que se utilizan para la selección de transfección estable. La Blastidina (Bsd) corresponde a uno de estos agentes selectivos, ha sido utilizada para la selección de células transfectadas establemente en CMM de ratones (Li *et al.*, 2006), y humanas (Schwars *et al.*, 2012). La Bsd, es un antibiótico nucleosídico aislado desde *Streptomyces griseochromogenes* que actúa inhibiendo la síntesis proteica en células procarióticas y eucarióticas (Izumi *et al.*, 1991).

En el ámbito de la manipulación génica, el uso de un gen reportero como la proteína de fluorescencia verde (GFP) es fundamental, esta corresponde a una proteína formada por 238 aminoácidos y su principal característica se basa en su fotoactividad, ya que al ser fotoestimulada puede expresar longitudes de ondas que proporcionan fluorescencia visible (Prasher y Eckenrode, 1992). La GFP se ha convertido en el gen marcador de elección a nivel experimental en distintos tipos celulares, entre estos las CMM, ya que puede ser detectado con alta sensibilidad y especificidad. El uso de la GFP como gen marcador o reportero, permite estimar los niveles de expresión de la proteína, así como también su ubicación en la célula, permitiendo monitorear procesos intracelulares y cambios

morfológicos (Franco y Longart, 2009). El método de detección de la GFP depende del tejido o tipo celular que contiene el gen, siendo generalmente a través de microscopía o citometría de flujo (Harting *et al.*, 2009). La GFP puede perder su fluorescencia directa durante la fijación del tejido, por esta razón se puede utilizar también anticuerpos comerciales para su detección inmunológica, y PCR para determinar la expresión relativa del gen que la codifica (Green *et al.*, 2005).

La mayor parte de las investigaciones que involucran CMMs se han realizado en roedores y humanos, en la actualidad se dispone de limitada información sobre CMM bovinas, a pesar de la gran aplicación del modelo experimental bovino, y de la prometedora nueva herramienta que representa para nuevos conceptos clínicos en la terapia celular (Bosnakovski *et al.*, 2005). En relación al uso de nuevas tecnologías en CMM, una de las áreas que han adquirido gran atención es el desarrollo de métodos que permitan la entrega de genes exógenos, generando por una parte la síntesis de proteínas específicas involucradas en el proceso de diferenciación (Kim y Eberwine, 2010) y por otra, produciendo proteínas reporteras capaces de permitir el seguimiento de la célula transfectada durante el proceso denominado “homing” (Sohni y Verfaillie, 2013). El principal propósito de realizar transfección celular, es el estudio del funcionamiento de genes o del producto de estos, estimulando o inhibiendo expresiones génicas específicas y produciendo proteínas recombinantes en células mamíferas (Kim y Eberwine, 2010).

Con el fin de sugerir un método adecuado para la introducción de genes exógenos en CMM bovinas, se realizó el siguiente estudio cuyo objetivo fue, determinar la eficiencia de transfección del plásmido pTracer/CMV/Bsd, mediante la utilización de Lipofectamina LTX en CMM aisladas desde medula ósea bovina.

## **HIPOTESIS**

El método de lipofectamina permite una alta eficiencia de transfección del plásmido pTracer-CMV/Bsd y la expresión estable de la proteína de fluorescencia verde (GFP) en CMM aisladas desde medula ósea fetal bovina.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

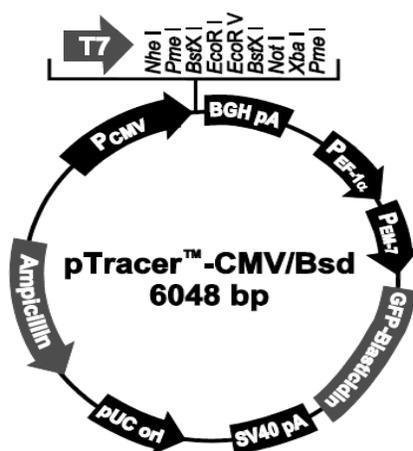
### **2.1. Obtención y aislamiento de CMM bovinas**

Los aspirados de médula ósea se obtuvieron desde fetos bovinos de 7 a 9 meses de gestación (n=3), provenientes de una planta faenadora local. La médula ósea fue aspirada desde ambas diáfisis femorales, mediante una bránula de 18 G conectada a una jeringa conteniendo 2 mL de medio de colección DMEM alto en glucosa (Hyclone Laboratories, USA), suplementado con 1000 UI de heparina (Laboratorio Sanderson, Chile), 100 µg/mL de estreptomicina y 100 UI/mL de penicilina de acuerdo a la técnica descrita previamente (Dueñas et al, 2014; Cortés et al, 2014). El volumen aspirado de aproximadamente 4 mL fue transferido a un tubo de polipropileno de 15 mL (Falcon, NJ, USA) y se centrifugó dos veces en solución tampón fosfato pH 7,4 (PBS; Hyclone Laboratories, Utah, USA), y dos veces en medio de colección sin heparina a 300 Xg por 5 minutos. El sedimento fue resuspendido en una placa de cultivo celular con medio de expansión, en DMEM 4,5 g/L de D-glucosa (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, Thermo Scientific, Utah, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Hyclone Laboratories, USA), 100 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina, 2,5 µg/mL de anfotericina B. El cultivo celular de médula se incubó a 38,5 °C, bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> (Shel Lab, OR, USA). Luego de 48 horas de cultivo, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante lavado con PBS y cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia, se realizaron pasajes de células mediante remoción con 0,25% de tripsina/EDTA (Hyclone Laboratories, USA) por 5 min.

### **2.2. Lipofección de CMM**

Inicialmente, las concentraciones de Lipofectamina (LTX, Invitrogen, USA) y del plásmido pTracer-CMV/Bsd (Invitrogen, USA, Figura 1) fueron optimizadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de 1 a 2 pasajes, las CMM se sembraron en una concentración de 200.000 células/mL en placas de 12 pocillos (Orange Scientific, BA, Bélgica), hasta obtener un 70% de confluencia. Luego de 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo compuesto de DMEM alto en glucosa, suplementado con 10% SFB. En un tubo de 15 mL, se mezclaron 10 µg de pTracer-CMV/Bsd en 2 mL de *Opti-MEM I Reduced Serum Medium* (OpM; Invitrogen, California, USA), con 20 µL de *PLUS Reagent* (PLUS;

Invitrogen, California, USA) y esta solución fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. En paralelo, se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de OpM en 3 tubos eppendorf (T1, T2 y T3), donde se realizaron 3 diluciones de lipofectamina (6, 18 y 36  $\mu\text{L}$  respectivamente). A cada tubo con la mezcla de OpM y lipofectamina se adicionó 600  $\mu\text{L}$  de la mezcla de PLUS y pTracer-CMV/Bsd. Esta solución se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fue distribuida en los cultivos de CMM en volúmenes de 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{L}$  (Tabla 1).



**Figura 1.** Mapa del vector pTracer-CMV/Bsd, utilizado para lipofección en CMM fetales bovinas. P<sub>CMV</sub>, promotor citomegalovirus, GFP-Blasticidin, genes fusionados 3-GFP y gen de resistencia a la blasticidina, pUC, sitio de origen para replicación en *E. coli*, P<sub>EF-1 $\alpha$</sub> , promotor humano EF-1 $\alpha$ , BGH pA, señal de poliadenilación hormona de crecimiento bovina, SV40 pA, señal de poliadenilación SV40, Ampicillin, gen de resistencia a la ampicilina, T7, sitio promotor/priming, y P<sub>EM-7</sub>, sitio promotor EM-7.

**Tabla 1.** Diagrama de optimización de concentraciones de Lipofectamina (LTX) y pTracer-CMV/Bsd (pTracer) en CMM bovinas distribuidos en placas de cultivos de 12 pocillos.

pTracer: 0 ng; LTX: 0 $\mu\text{L}$	pTracer: 250 ng; LTX: 1,5 $\mu\text{L}$	pTracer: 250 ng; LTX: 3 $\mu\text{L}$
pTracer: 500 ng; LTX: 1 $\mu\text{L}$	pTracer: 500 ng; LTX: 3 $\mu\text{L}$	pTracer: 500 ng; LTX: 6 $\mu\text{L}$
pTracer: 750 ng; LTX: 1,5 $\mu\text{L}$	pTracer: 750 ng; LTX: 4,5 $\mu\text{L}$	pTracer: 750 ng; LTX: 9 $\mu\text{L}$

pTracer: 1 µg; LTX: 2 µL	pTracer: 1 µg; LTX: 6 µL	pTracer: 1 µg; LTX: 12 µL
--------------------------	--------------------------	---------------------------

Las CMM fueron incubadas a 38,5°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 horas post transfección, las muestras se sometieron a tinción DAPI, y se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus, Tokyo, Japón). Desde cada pocillo, se obtuvieron dos imágenes del mismo sector con las cuales se realizó un conteo celular visual, y se dividió el número de células positivas a GFP sobre el número de células positivas a DAPI, obteniendo así el porcentaje de células positivas a GFP en cada pocillo bajo cada condición.

### **2.3. Determinación de la sensibilidad a Blastidina**

Con el fin de generar una línea celular estable GFP-positiva, se determinó la concentración mínima efectiva de Blastidina (Bsd) requerida para eliminar las CMM no transfectadas. Para esto, se sembraron aproximadamente 60.000 células/mL en una placa de 12 pocillos, las cuales se cultivaron hasta alcanzar una confluencia celular de 25% en cada pocillo (Miyaki et al, 2012). Al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado con medio de expansión, suplementado con concentraciones crecientes de Bsd (0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL). Cada concentración de Bsd fue probada en dos repeticiones. El medio de cultivo conteniendo Bsd se reemplazó cada 3 días, y las CMM se incubaron a 38,5°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> por un total de 14 días. La concentración mínima efectiva de Bsd fue determinada por observación microscópica periódica de los cultivos de CMM tratados.

### **2.4. Selección de CMM con expresión estable de GFP**

Se sembraron 200.000 células/mL en placas de cultivo de 12 pocillos, y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia celular de 70%. Al día siguiente, se adicionó medio de transfección, cuya composición corresponde a DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de SFB, y con las concentraciones previamente optimizadas de pTracer-CMV/Bsd, OpM, PLUS y lipofectamina. Las CMM se cultivaron a 38,5°C en una atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 horas desde la transfección, las CMM fueron lavadas con PBS y nuevamente cultivadas en medio de transfección por 24 horas, bajo las mismas condiciones

descritas. Posteriormente, las CMM fueron removidas de la placa utilizando tripsina (0,25X), y resuspendidas en medio de expansión suplementado con la concentración mínima efectiva de Bsd. El medio se reemplazó cada 3 días, hasta detectar colonias de CMM resistentes a Bsd. Las CMM resistentes fueron evaluadas mediante epifluorescencia para detección de colonias positivas a GFP. Luego, las CMM resistentes fueron fijadas en *buffer* RLT (Qiagen, USA), suplementado con 1%  $\beta$ -mercaptoetanol, y conservadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por PCR cuantitativo (Q-PCR).

## 2.5. PCR cuantitativo

La expresión relativa de gen reportador GFP fue cuantificada mediante Q-PCR en CMM seleccionadas por medio de Bsd. El RNA total se aisló utilizando un “mini kit” *RNAeasy* (Qiagen Inc, CA, USA), y fue cuantificado mediante espectrofotometría (260 nm) (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). El cDNA se sintetizó y amplificó mediante un “kit” *Brilliant II SYBR Green RT-PCR* (Stratagene, CA, USA) utilizando un termociclador (Applied Biosystems, CA, USA). Para la reacción de PCR, se utilizó un “kit” *Brilliant SYBR Green QPCR Master mix* (Stratagene, La Joya, CA). Cada tubo de reacción contenía 12,5  $\mu\text{l}$  de *Master mix*, 200 nM de partidores (Tabla 2), 0,375  $\mu\text{l}$  de tinción de referencia Rox, 2  $\mu\text{l}$  de cDNA y  $\text{H}_2\text{O}$  hasta alcanzar un volumen total de 25  $\mu\text{l}$ . La reacción se cuantificó en un termociclador *Step One* a una temperatura de  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, seguido de 40 ciclos repetitivos por 30 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$  y por 1 minuto a  $60^{\circ}\text{C}$ . La expresión de GFP fue comparada con la expresión del gen endógeno GAPDH y posteriormente cuantificada mediante el método de  $\Delta\Delta\text{CT}$ .

**Tabla 2.** Secuencia nucleotídica de partidores utilizados en Q-PCR

Gen		Secuencias nucleotídicas (5'- 3')
<i>GFP</i>	Forward	TGACAGACACACCATGAGAACCC
	Reverse	AGCTCTAGACTGGGCCGTAGAAG
<i>GAPDH</i>	Forward	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA
	Reverse	TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG

## **2.6. Citometría de Flujo**

El porcentaje de CMM positivas a GFP obtenido luego de cultivo bajo concentraciones óptimas de lipofectamina/pTracer-CMV/Bsd (9 uL/750 ng), fue cuantificado mediante citometría de flujo (Gallius Beckman Coulter, CA USA). Luego de 48 horas de transfección, las CMM se desprendieron de la placa usando Tripsina 0,25% por 5 minutos a 38°C, luego fueron permeabilizadas usando Foxp3 kit (eBioscience, San Diego, CA, USA), y posterior a tres enjuagues con PBS se resuspendieron en solución *buffer* de citometría. Se analizaron 10,000 eventos en dos repeticiones, utilizando luz laser de 488 nm (azul) y un software (Gallios 1.2, Beckman Coulter, Miami, Fla., USA). El umbral para diferenciar eventos negativos se determinó en la primera década del nivel de fluorescencia.

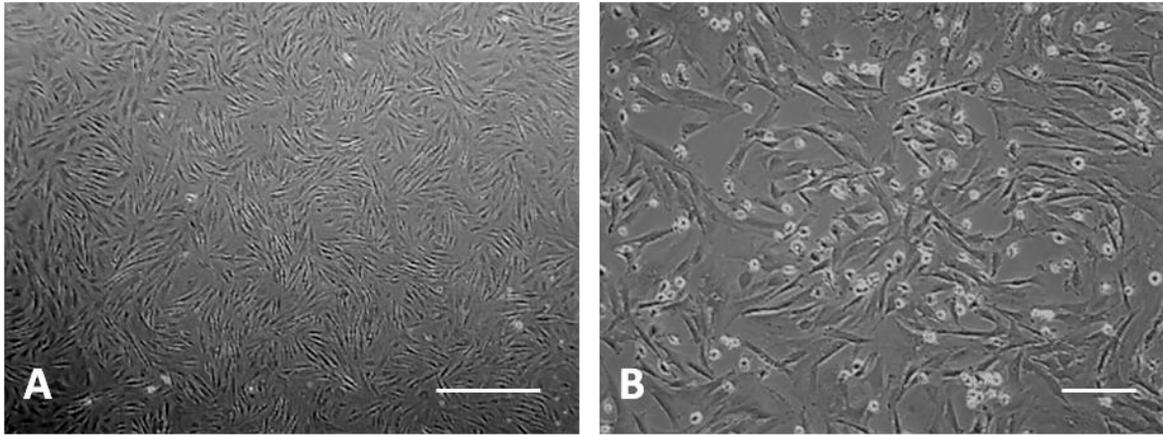
## **2.7. Análisis estadístico**

Los datos de un mínimo de tres repeticiones independientes, se evaluaron y expresaron como media y desviación estándar. El número de CMM positivas a GFP para las distintas concentraciones de Lipofectamina y pTracer-CMV/Bsd, se analizaron mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilks. Posteriormente, los efectos del tratamiento fueron evaluados estadísticamente por ANOVA de una vía. Las diferencias entre promedios para los distintos tratamientos se determinaron por medio del post test de Duncan. Se utilizó un valor de significancia ( $P < 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Info Stat.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Aislamiento y caracterización de CMM bovinas**

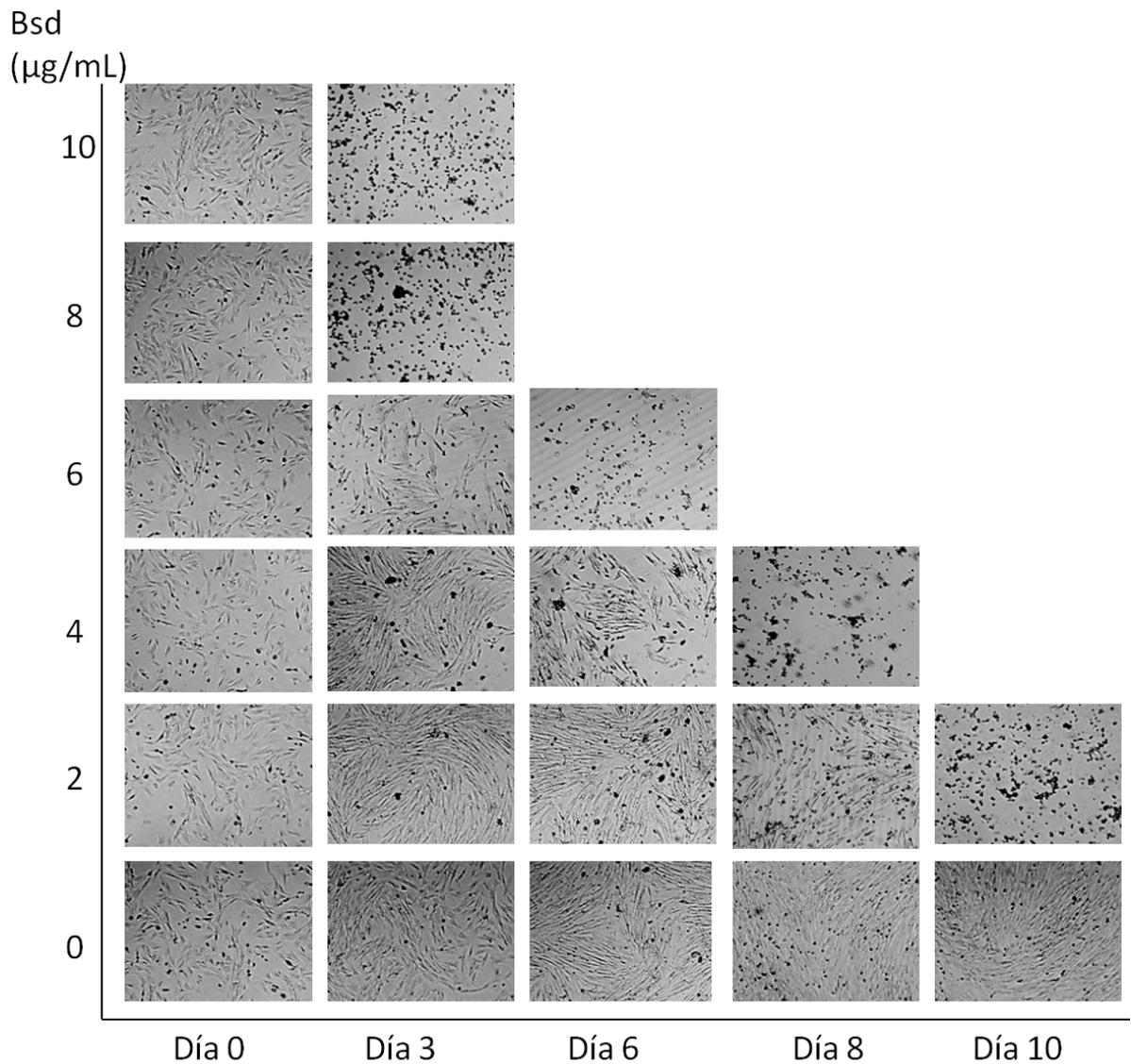
Las CMM bovinas, fueron aisladas gracias a su propiedad de adherencia a las placas de cultivo de plástico. Posteriormente, fueron cultivadas en monocapa hasta obtener una confluencia del 80 - 90%, entre el día 5 y 6 de cultivo (Figura 2). Las CMM presentaron una morfología fibroblástica característica y no se evidenciaron cambios morfológicos significativos durante los ensayos de transfección.



**Figura 2.** Microfotografías de CMM bovinas luego de 6 días de cultivo, posterior a la extracción medular, alcanzando una confluencia celular aproximada de 80 – 90%. Se logra evidenciar la morfología fibroblástica típica. Barra de escala (A) = 200  $\mu\text{m}$ ; (B) = 25  $\mu\text{m}$ .

### **3. 2. Determinación de la sensibilidad a la Blastidina (Bsd)**

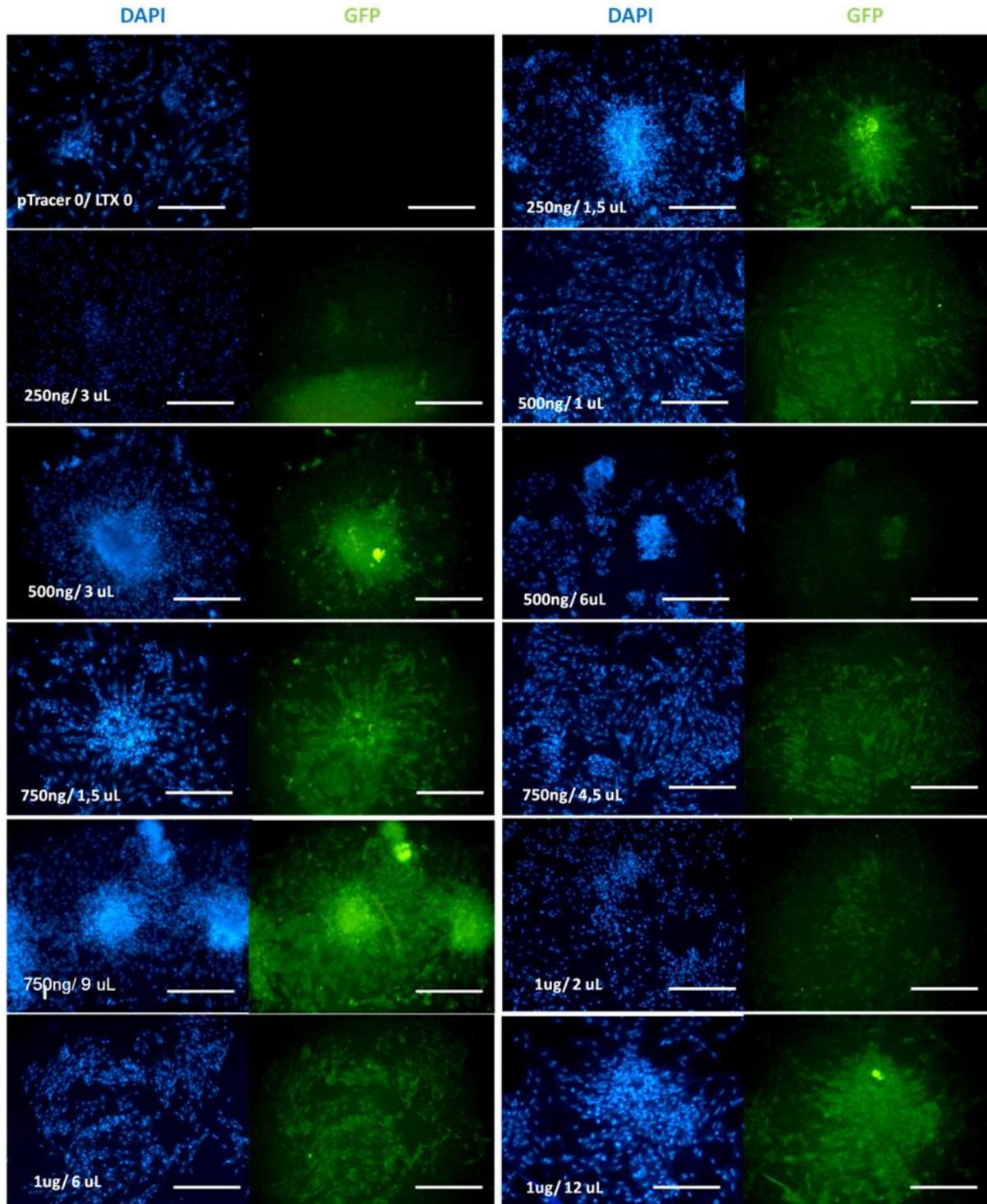
Las CMM bovinas aisladas fueron cultivadas en medio DMEM, suplementado con concentraciones crecientes de Bsd (2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La proporción de muerte celular en el cultivo fue estimada mediante observación microscópica (Figura 3). Los cultivos de CMM expuestos a las mayores concentraciones de Bsd (8 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) presentaron muerte celular luego de 3 días de cultivo. Los cultivos de CMM expuestos a 6 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Bsd, presentaron muerte celular luego de 6 y 8 días de cultivo, respectivamente. Finalmente las CMM suplementadas con la concentración menor (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sobrevivieron hasta el día 10 de cultivo. El cultivo control no presentó variación en su proporción de muerte celular.



**Figura 3.** Microfotografías de CMM bovinas expuestas a la suplementación de concentraciones crecientes de Bsd: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL (eje vertical), con relación a los días de exposición (eje horizontal). Esta secuencia de imágenes indica que la concentración de Bsd necesaria para generar la muerte celular es inversamente proporcional al día de exposición. Se determina que 2 µg/mL corresponde a la concentración mínima de Bsd necesaria para producir la muerte de todas las CMM bovinas, en el intervalo de tiempo determinado.

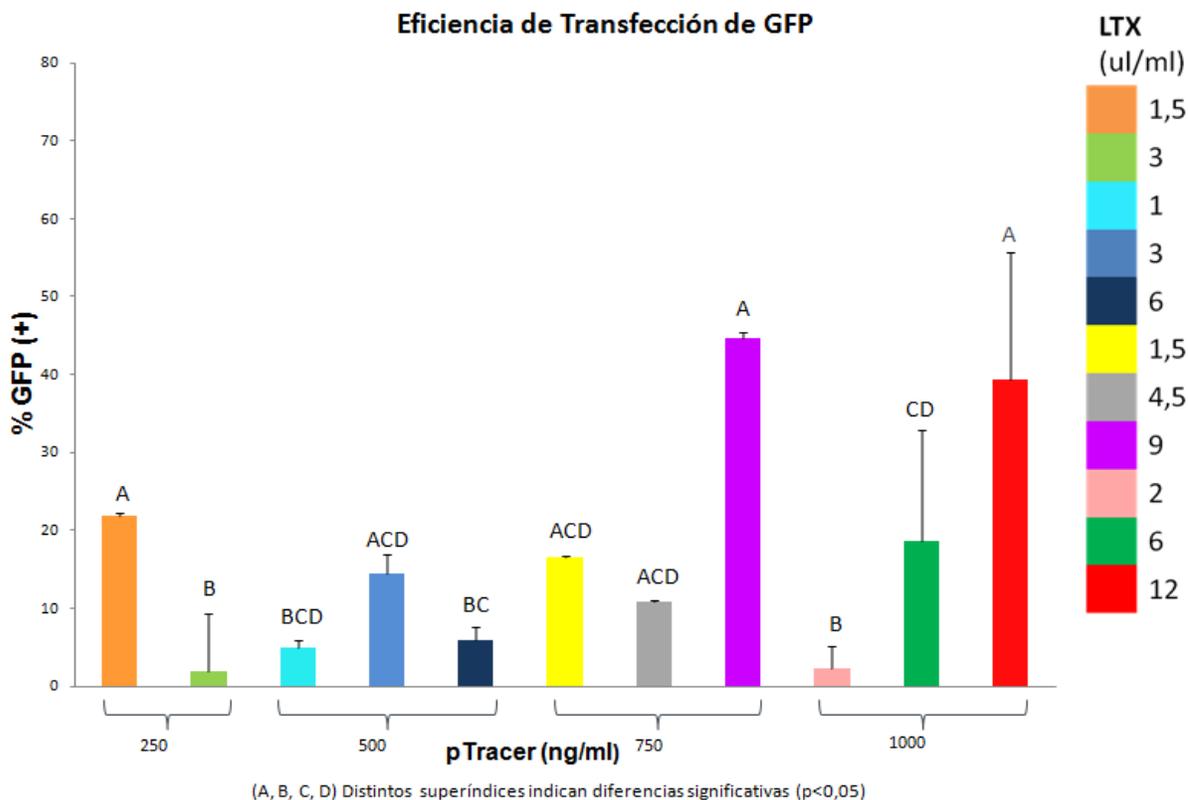
### 3. 3. Eficiencia de expresión transitoria de GFP en CMM bovinas

El porcentaje de CMM positivas a GFP fue evaluado luego de 24 horas de cultivo en presencia de distintas concentraciones de pTracer y lipofectamina (Figura 4).



**Figura 4.** Microfotografías de CMM bovinas positivas a GFP obtenidas con microscopio de epifluorescencia, 24 horas luego de ser transfectadas. Las concentraciones de lipofectamina y pTracerCMV/Bsd (pTracer/LTX) son indicadas en cada fotografía. La columna DAPI corresponde a las imágenes obtenidas utilizando filtro azul y determina el número total de CMM a cuantificar. Barra de escala = 500  $\mu$ m.

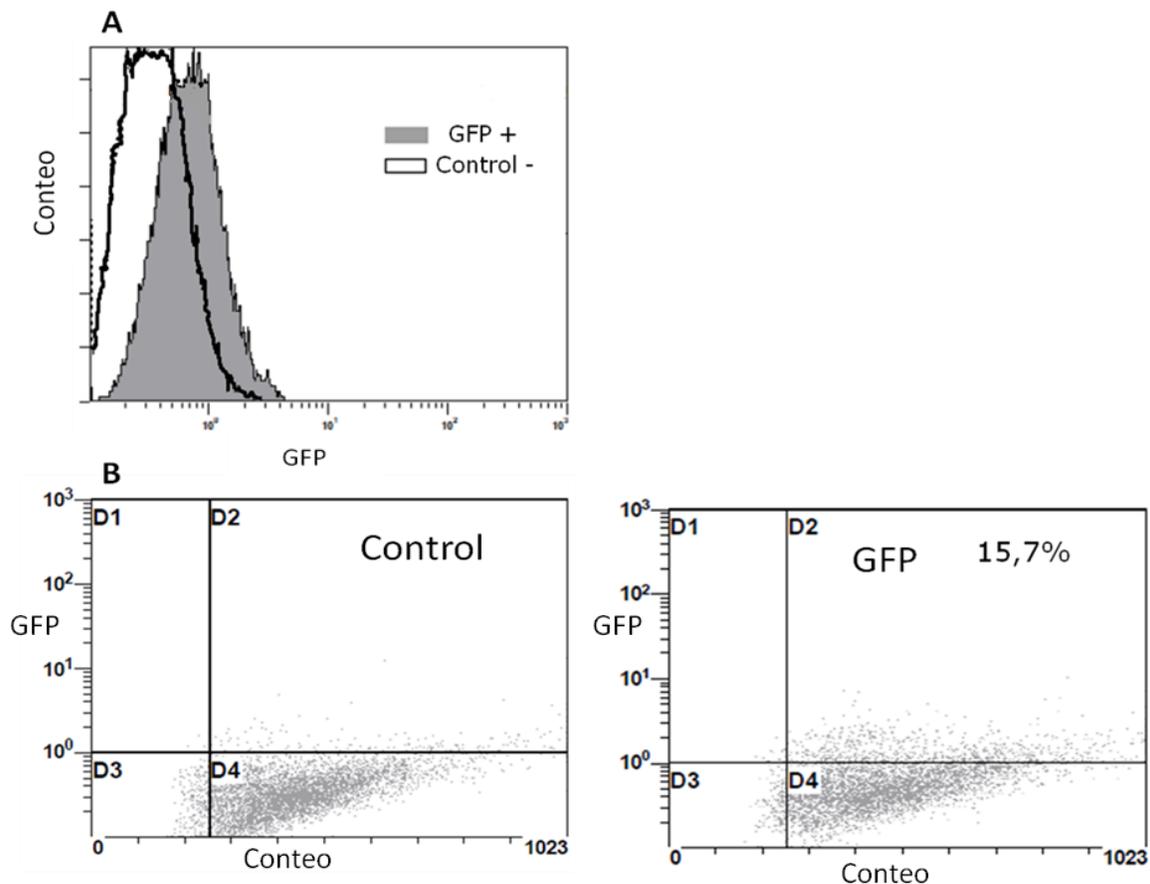
Se calculó la eficiencia de transfección, y se logró determinar que tres relaciones de lipofectamina y pTracer alcanzaron los mayores valores de eficiencia de transfección de GFP. La utilización de 750 ng/mL de pTracer con 9  $\mu$ l/mL de lipofectamina permitió obtener una eficiencia del 44,6%. En comparación, la utilización de 1000 ng/mL de pTracer y 12  $\mu$ l/mL de lipofectamina resultó en una eficiencia de transfección de 39,2%; y al utilizar una combinación de 250 ng/mL de pTracer con 1,5  $\mu$ l/mL de lipofectamina el porcentaje de eficiencia fue de 21,7% (Figura 5). Estas tres relaciones, alcanzaron eficiencias de transfección del plásmido pTracer significativamente mayores en relación al resto de las concentraciones. La combinación de 9  $\mu$ l de lipofectamina y 750 ng de pTracer, fue la que permitió alcanzar un mayor valor cuantitativo, correspondiente a un 44,6% de células positivas a GFP, por lo que fue la combinación utilizada para realizar posteriores ensayos de transfección.



**Figura 5.** Porcentajes de eficiencia de transfección de GFP en CMM bovinas, luego de 24 horas de ser sometidas a una transfección, utilizando las concentraciones indicadas de

Lipofectamina (LTX) y del plasmido (pTracer). El mayor valor cuantitativo alcanzado, fue de un 44,6% de células positivas a GFP utilizando 9  $\mu$ l de lipofectamina y 750 ng de pTracer. Superíndices (A, B, C y D) distintos indican diferencias ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos.

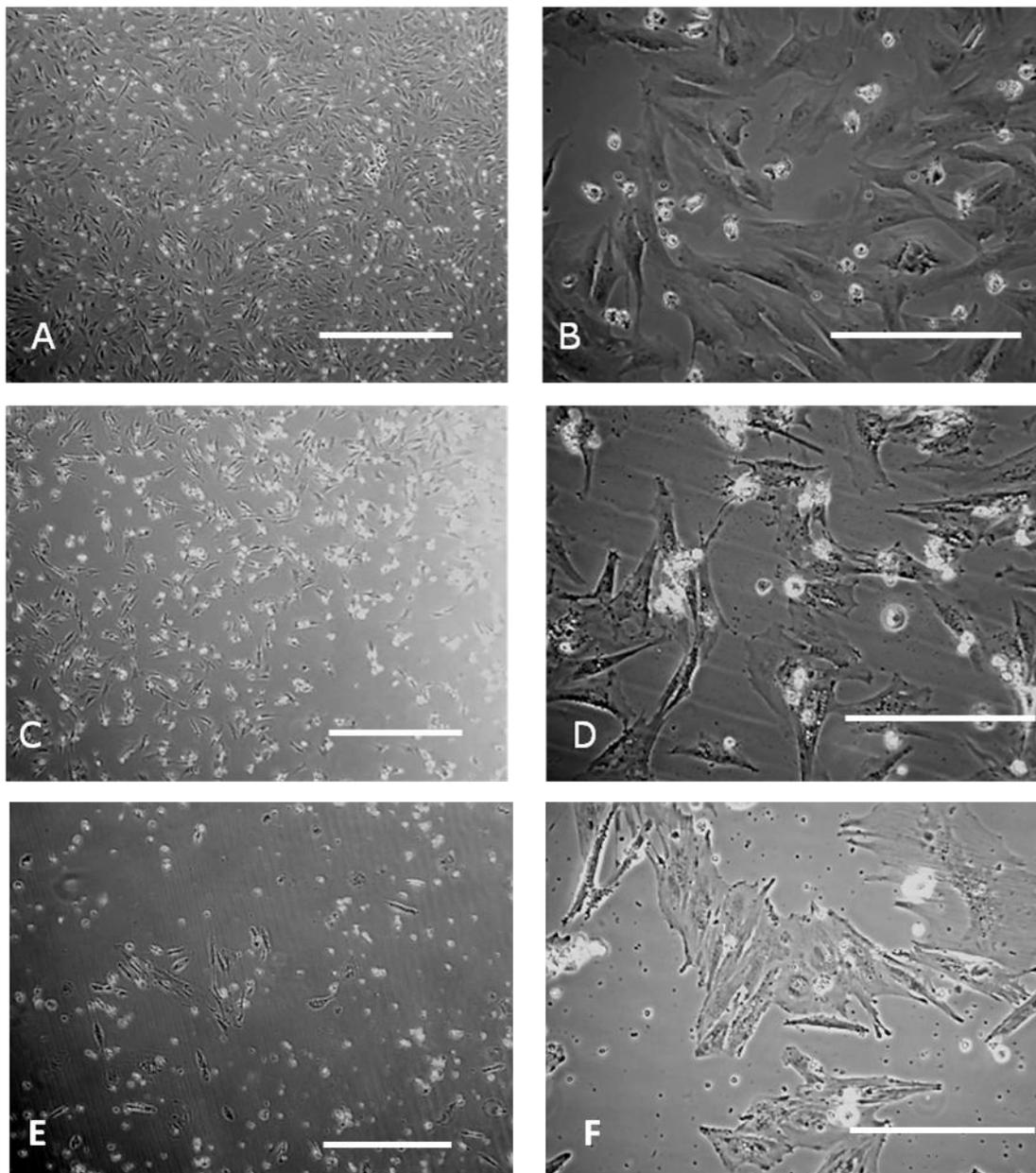
El porcentaje de CMM positivas a GFP, alcanzado con 750 ng/mL de pTracer y 9  $\mu$ l/mL de lipofectamina, fue posteriormente confirmado utilizando citometría de flujo. Mediante esta técnica, se determinó que el porcentaje de CMM positivas a GFP fue de 15,7% (Figura 6).



**Figura 6.** Análisis de citometría de flujo de CMM bovinas 24 horas después de ser transfectadas con 9  $\mu$ l/mL de lipofectamina y 750 ng/mL de pTracer. Histograma en escala logarítmica (A) representa conteo celular con relación al nivel de fluorescencia. Las CMM transfectadas muestran un desplazamiento hacia la derecha (área gris), demostrando un mayor nivel de fluorescencia alcanzado. (B) El porcentaje de CMM positivas a GFP fue de 15,7%.

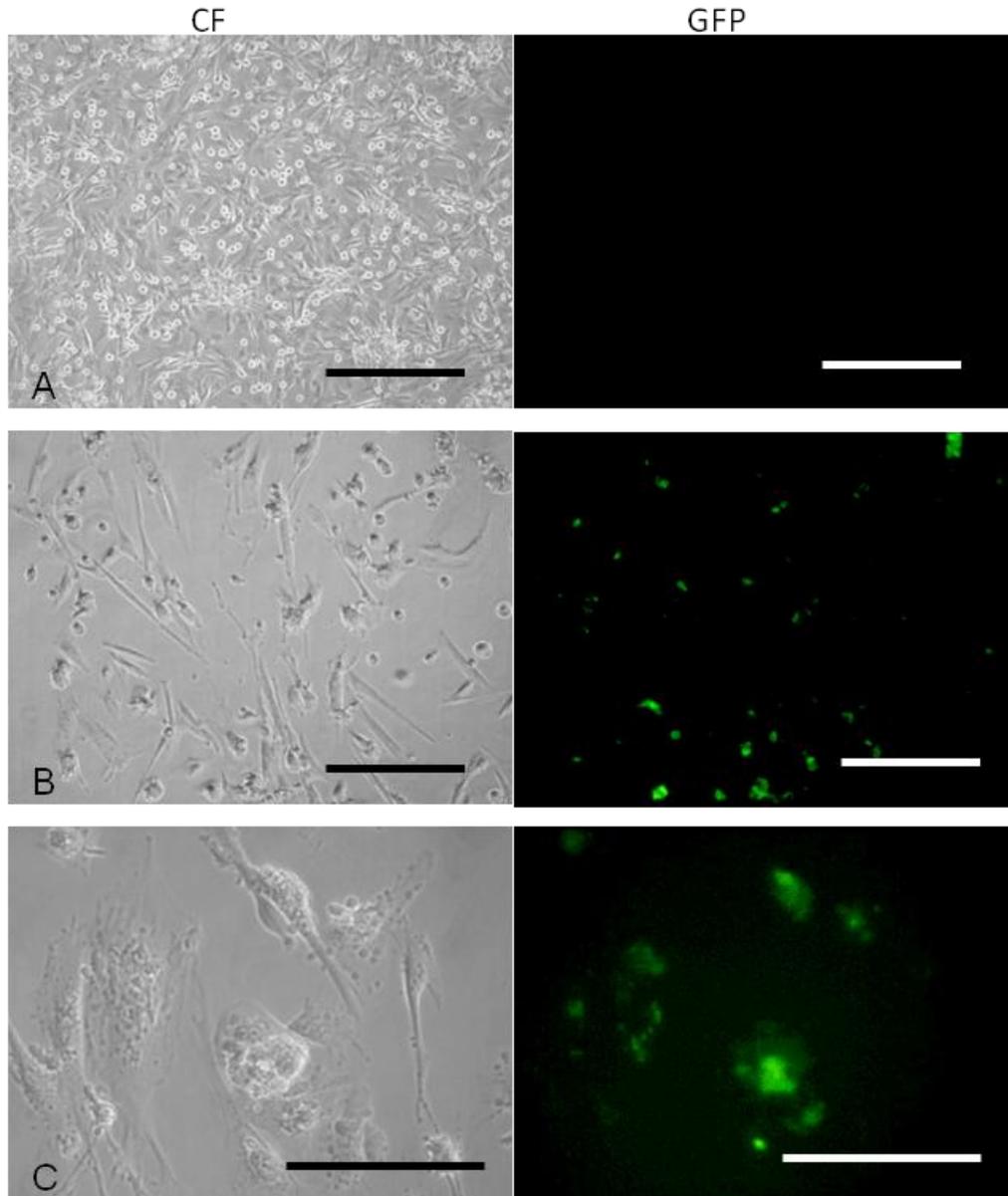
### 3.4. Determinación de CMM bovinas con expresión estable de GFP

Las CMM fueron transfectadas con las concentraciones que alcanzaron mayor porcentaje de transfección transitoria (9  $\mu$ l/mL de lipofectamina y 750 ng/mL de pTracer) (Figura 4). A pesar de que las CMM no fueron cuantificadas luego del tratamiento, fue posible observar a través de microscopio óptico, 24 horas luego de realizar la transfección, una disminución del número de células adheridas a la placa (Figura 7, A y C).



**Figura 7.** Microfotografías de CMM bovinas previas a la transfección (A y B), transfectadas con 750 ng/mL del plásmido pTracer y 9  $\mu$ l/mL de lipofectamina, luego de 24 horas de ser tratadas (B y C), y posterior a la selección antibiótica de 9 días con 2  $\mu$ g/mL de Bsd (E y F). Se hace evidente la disminución progresiva de CMM adheridas a la placa. Barra de escala (A), (C) y (E) = 250  $\mu$ m; (B), (D) y (F) = 25  $\mu$ m.

Luego de 48 horas de ser transfectadas, las CMM fueron sometidas a selección antibiótica utilizando 2  $\mu$ g/mL de Bsd (Figura 2). Desde el tercer día posterior a la suplementación con Bsd, se evidenció un aumento progresivo del número de CMM desprendidas, observadas por microscopio óptico. Finalmente, entre el día 8 y 9, se produjo una muerte celular masiva, observándose entre 5 a 6 colonias de CMM transfectadas resistentes a Bsd (Figura 6, E y F). Las CMM resistentes a Bsd fueron positivas a GFP bajo observación mediante microscopia de epifluorescencia (Figura 8).

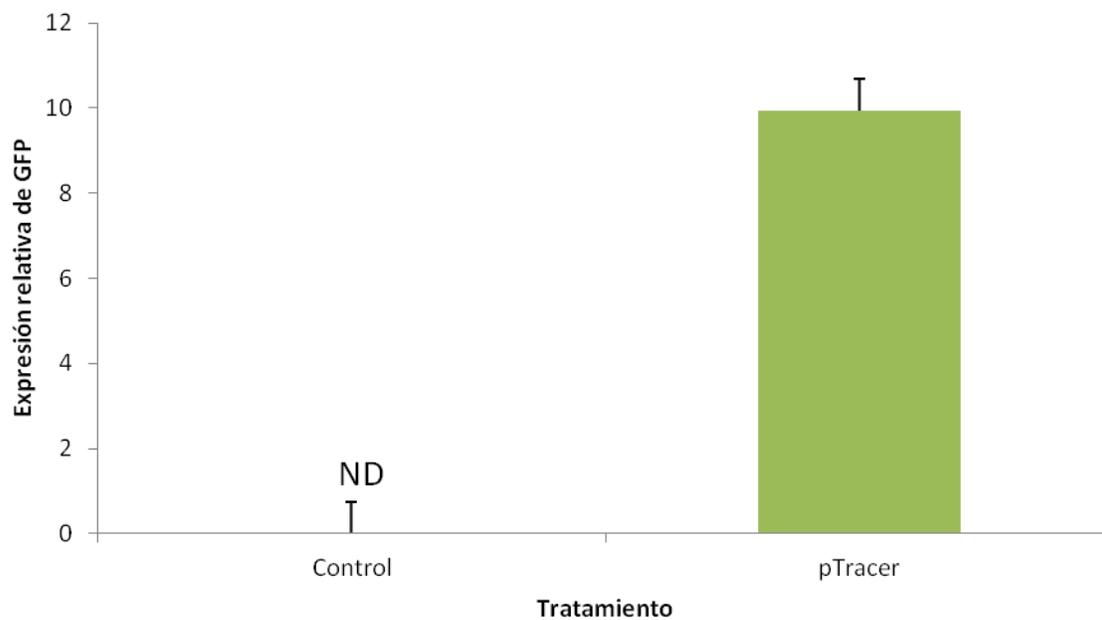


**Figura 8.** Microfotografías de epifluorescencia de CMM bovinas sin tratamiento (A), y luego de 20 días de ser transfectadas con 750 ng/mL del plásmido pTracer y 9  $\mu$ L/mL de lipofectamina, y posterior a ser sometidas a la selección antibiótica con 2  $\mu$ g/mL de Bsd (B y C). Barra de escala (A) y (B) 75  $\mu$ m; (C) 25  $\mu$ m.

### 3.6. Análisis de la Expresión Génica.

El proceso de transfección fue caracterizado a través de la cuantificación de la expresión relativa del gen GFP. Las muestras para Q-PCR fueron obtenidas entre los días 20 y 21 post

transfección, para los tratamientos de transfección estable (CMM resistentes a Bsd) y control (Figura 8). Las CMM transfectadas expresaron mARN con un valor CT de 9,94.



**Figura 9.** Niveles relativos de mARN de GFP en CMM bovinas luego de 20 – 21 días de ser sometidas a una transfección estable. Se utilizó una concentración de 750 ng/mL del plásmido pTracer a través del método de Lipofectamina, utilizando 9  $\mu$ l/mL de lipofectamina (sigla ND corresponde a no determinado).

## 5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró realizar una transfección en CMM obtenidas desde medula ósea fetal bovina, utilizando el método de lipofectamina, y el gen que codifica para GFP como gen reportero.

La terapia celular basada en CM se describe como la incorporación de células, sean o no previamente manipuladas genéticamente, en distintos tejidos para el tratamiento de patologías específicas. En este sentido, las CM embrionarias han resultado una poderosa herramienta de investigación, sin embargo, últimamente su uso ha sido limitado, debido a los problemas éticos, específicamente en humanos, y al alto riesgo de generación de teratomas que presentan (Wei, *et al.*, 2013). En cambio, la utilización de CMM para investigación no posee este tipo de limitantes, por lo que actualmente su uso se ha ampliado en forma significativa (Sohni y Verfaillie, 2013).

Previamente, utilizando el método de lipofección, se ha demostrado la incorporación de genes exógenos en CMM obtenidas desde medula ósea en diversas especies, incluyendo murina (Gheisari *et al.*, 2008), canina (Zhu *et al.*, 2006), humana (Madeira *et al.*, 2010; Hoelters *et al.*, 2005) y ovina (Locatelli *et al.*, 2013).

Las CMM fueron aisladas en base a su propiedad de adherencia al plástico, y el protocolo de cultivo de las CMM bovinas, utilizado en este ensayo, corresponde al desarrollado en estudios previos en nuestro laboratorio (Cortés *et al.*, 2013; Dueñas *et al.*, 2014).

Con el fin de establecer la concentración mínima efectiva de Bsd a utilizar en la selección de células transfectadas establemente, se realizó un ensayo dosis dependiente. En este estudio se evidenció que la Bsd presenta una alta efectividad a bajas concentraciones en CMM bovinas, generando la muerte celular total luego de 10 días de ser expuestas al medio de selección suplementado con 2 µg/mL de Bsd. Previamente, se ha reportado que las concentraciones mínimas efectivas utilizadas en CMM varían ampliamente, principalmente debido a los diferentes tiempos de exposición al medio de selección que requieren los ensayos, en el presente se observó que la concentración de Bsd necesaria para generar la muerte celular varía de acuerdo al tiempo de exposición (Figura 3), en CMM humanas las concentraciones van de 3 µg/mL (Shiota y Yoshida 2012) a 7,5 µg/mL (Limbert *et al.*,

2011), mientras que en CMM de medula ósea de ratas se requiere generalmente una concentración mayor de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Xiang *et al.*, 2009).

El protocolo de transfección utilizado en este estudio siguió las indicaciones del fabricante, y consistió inicialmente en una transfección de tipo transitoria para obtener una optimización de las concentraciones a usar, del plásmido y lipofectamina. Se obtuvieron diversos porcentajes de eficiencia de transfección, sin mostrar una relación dosis-respuesta determinada al analizar los valores conseguidos a través de conteo de CMM positivas a GFP, mediante microscopía óptica. Los resultados alcanzados con los distintos tratamientos indicaron una baja eficiencia de transfección al utilizar este método en CMM de médula ósea bovina. Se determinó que las concentraciones más efectivas fueron de 9  $\mu\text{l}/\text{mL}$  de Lipofectamina y 750  $\text{ng}/\text{mL}$  del plásmido, obteniendo un 44,6% de células positivas a GFP a través del método de conteo visual. En contraste utilizando las mismas concentraciones, el porcentaje de eficiencia analizado con citómetro de flujo fue de un  $15,7\% \pm 3.5$ . Luego de transfectar las CMM, bajo las mismas condiciones experimentales, los valores de eficiencia de transfección transitoria de GFP obtenidos a través del conteo visual (44,6%) y cuantificado por citometría de flujo (15,7%) difieren ampliamente. Esto se puede explicar debido a que la cuantificación visual de una imagen puede tener sesgos significativos, principalmente relacionados a la intensidad de la fluorescencia, la que varía según la concentración de fluoróforos presentes en la célula (Waters, 2009), y adicionalmente, el área fotografiada y el número de células evaluadas, puede no resultar representativa de la placa en su totalidad.

En este estudio se obtuvo una eficiencia de transfección transitoria de  $15.7\% \pm 3.5$ , utilizando las concentraciones optimizadas, 750  $\text{ng}/\text{ml}$  de pTracer/CMV/Bsd y 9  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de lipofectamina, lo que indica que el uso de lipofectamina como método de transfección, proporciona un valor de eficiencia de entrega de GFP moderadamente bajo, en CMM bovinas. En ensayos previos, utilizando el mismo método en CMM de ratas, cerdos y primates se obtuvieron valores menores a un 25% de células transfectadas (McMahon *et al.*, 2006; Stiehler *et al.*, 2006; Ke *et al.*, 2009). En cambio, al utilizar métodos virales, se registran valores de eficiencia de transfección considerablemente mayores, en CMM humanas se han reportado valores de transfección de aproximadamente un 70% de las

células transfectadas a través de un vector lentiviral (Van Damme *et al.*, 2006), y más de un 95% con un vector adenoviral (Barbash *et al.*, 2003). Adicionalmente, utilizando un vector lentiviral en CMM bovinas y porcinas, se ha reportado una eficiencia de aproximadamente el 100%, sin embargo, posteriormente se produjo muerte celular debido al efecto citopático del virus (Colleoni *et al.*, 2005). Aunque se debe considerar que los métodos de análisis de eficiencia de transfección en los distintos estudios pueden diferir (citometría de flujo, cámara de Neubauer, microscopía de epifluorescencia, etc.), los resultados de ensayos previos, así como del presente estudio, confirman una baja eficiencia de transfección en CMM al utilizar métodos de transfección no virales en comparación con vectores virales.

Para desarrollar una línea de CMM bovinas transfectadas de manera estable con GFP, se realizó la transfección adicionando las concentraciones previamente optimizadas: 750 ng/mL del plásmido y 9  $\mu$ L de la lipofectamina. A pesar de no realizar un conteo, se logró observar, luego de 24 horas de realizada la transfección, una disminución del número de CMM adheridas a la placa con relación al día 0 y control. Esto se puede asociar al uso de altas concentraciones de lipofectamina, ya que previamente se ha descrito una correlación directa entre la cantidad de reactivo utilizado y el porcentaje de muerte celular (Gheisari *et al.*, 2008). Para determinar la citotoxicidad de diferentes reactivos de transfección, basándose en que cada respuesta tóxica se acompaña por cambios en la expresión génica, un estudio analizó la expresión génica de células sometidas a transfección (Khodthong *et al.*, 2012). Dentro de los cambios más evidentes, se describió un aumento de aproximadamente 50 veces del nivel de estrés oxidativo sobre el parámetro normal, en células transfectadas con lipofectamina. Así mismo, se determinó que la función biológica celular más significativamente afectada, en respuesta a la transfección por lipofectamina, se relaciona con el daño del ADN celular y la respuesta de proteína desplegada, proceso que se activa como respuesta adaptativa cuando estímulos interfieren con la homeostasis del retículo endoplasmático (Khodthong *et al.*, 2012; Osowski y Urano, 2011). Finalmente, en el presente estudio, luego de la selección antibiótica, las CMM resistentes a Bsd, no continuaron con el proceso de multiplicación y desarrollo típico, resultando en la generación de escasas colonias de CMM positivas a GFP incapaces de expandirse a través de cultivo clonal.

Por otro lado, se cuantifico la expresión relativa de GFP en las células control y las colonias de CMM resistentes a Bsd, con el fin de confirmar la presencia del gen que codifica para GFP en la célula luego del proceso de transfección. En este sentido se confirmó la permanencia de la expresión transgénica luego de 20 días desde la transfección. Ensayos previos describen una permanencia de hasta 7 días utilizando el método de lipofectamina en CMM humanas (Madeira *et al.*, 2010). La estabilidad de la expresión génica de GFP en una célula puede variar debido a distintos factores, ambientales o propios de la célula, que pueden aumentar o disminuir las tasas de expresión del gen.

En conclusión, en el presente estudio se demostró que las CMM derivadas desde medula ósea fetal bovina, pueden ser modificadas genéticamente a través del uso de lipofectamina como método para incorporar el plásmido pTracer/CMV/Bsd. Se evidenció, también, que al utilizar el método mencionado, se obtiene una eficiencia de transfección transitoria moderadamente baja. Adicionalmente, luego de la selección antibiótica para transfección estable se identificaron escasas colonias de CMM positivas a GFP, por lo tanto, no fue posible realizar la expansión de estas a través de cultivo clonal. Es posible que la utilización de métodos virales de transfección, permita obtener eficiencias mayores a las alcanzadas en el presente estudio mediante lipofectamina, sin embargo, es necesario establecer nuevos ensayos para determinar esta diferencia.

## **6. AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue financiada a través del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT (proyecto N° 11100205). Agradecimientos por la disponibilidad de equipos a los Laboratorios Vaccimed y de Reproducción Animal (FAVET-Universidad de Chile), así como también, al Dr. Jaime Palomino por su disposición y colaboración en este estudio.

Gracias a mi profesor guía, Dr. Oscar Peralta, por su confianza, conocimiento y dedicación durante el desarrollo de este estudio. Y a mis compañeros de laboratorio por su incondicional ayuda.

Gracias a mis padres y hermano, por acompañarme y apoyarme en todo momento, siempre animándome a seguir mi vocación y creer en mí.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- **AUGELLO, A.; KURTH, T.; DE BARI, C.** 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Eur Cell Mater* 20:121-133.
- **BARBASH, I.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; FEINBERG, M.; ETZION, S.; TESSONE, A.; MILLER, L.; GUETTA, E.; ZIPORI, D.; KEDES, L.; KLONER, R.; LEOR, J.** 2003. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108:863-868.
- **BOSNAKOVSKY, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; ISHIGURO, T.; OKUMURA, M.; IWANAGA, T.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T.** 2004. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol* 32:502-509.
- **BOSNAKOVSKY, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T.** 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319:243-253.
- **CAPLAN, A.** 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641-650.
- **CHENG, Z.; OU, L.; ZHOU, X.; LI, F.; JIA, X.; ZHANG, Y.; LIU, X.; LI, Y.; WARD, C. A.; MELO, L. G.; KONG, D.** 2008. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther* 16, 571–579.
- **COLLEONI, S.; DONOFRIO, G.; LAGUTINE, I.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G.** 2005. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7, 154–166.
- **CORTES, Y.; OJEDA, M.; ARAYA, D.; DUEÑAS, F.; FERNANDEZ, M.S.; PERALTA, O.A.** 2013. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res* 9, 133.

- **DOMICINI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E.** 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317.
- **DUEÑAS, F.; BECERRA, V.; CORTES, Y.; VIDAL, S.; SAENZ, L.; PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M.; PERALTA, O. A.** 2014. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res* 10: 154.
- **FRANCO, A.; LONGART, M.** 2009. Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. *RET Redalyc*. 1(2):84-96.
- **GHEISARI, Y.; SOLEIMANI, M.; AZADMANESH, K.; ZEINALI, S.** 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. *Cytotherapy* 10(8):815-823.
- **GOINS, W.; WOLFE, D.; KRISKY, D.; BAI, Q.; BURTON, E.; FINK, D.; GLORIOSO, J.** 2004. Delivery using herpes simplex virus: an overview. *Methods Mol Biol* 246:257–299.
- **GREEN, C.B.; ZHAO, X.; HOYER, L.L.** 2005. Use of green fluorescent protein and reverse transcription-PCR to monitor *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression in a murine model of disseminated candidiasis. *Infect Immun* 73(3):1852-1855.
- **HARTING, M.; JIMENEZ, F.; COX, C.** 2009. Isolation of mesenchymal stem cells (MSCs) from green fluorescent protein positive (GFP+) transgenic rodents: The grass is not always green(er). *Stem Cells Dev* 18:127-135.
- **HERTHEL, D.** 2001. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. *AAEP Proceedings* 47:319-321.
- **HOERTELS, J.; CICCARELLA, M.; DRECHSEL, M.; GEISSLER, C.; GULKAN, H.; BOCKER, W.; SCHIEKER, M.; JOCHUM, M.; NETH, P.** Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* 7: 718–728.

- **IZUMI, M.; MIYAZAWA, H.; KAMAKURA, T.; YAMAGUCHI, I.; ENDO, T.; HANAOKA, F.** 1991. Blasticidin s-resistance gene (brs): A novel selectable marker for mammalian cells. *Exp Cell Res* 197:229-233.
- **JAENISCH, R.; YOUNG, R.** 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132(4):567-582.
- **JUN-ICHIRO, J.; YASUHIKO, T.** 2008. Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *Eur J Pharm Biopharm* 68:90-104.
- **KADIYALA, S.; YOUNG, R.; THIEDE, M.; BRUDER, S.** 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant.* 6:125–134.
- **KE, H.; WANG, P.; YU, W.; LIU, X.; LIU, C.; YANG, F.; MAO, F.F.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; LAHN, B.T.; XIANG, A.P.** 2009. Derivation, characterization and gene modification of cynomolgus monkey mesenchymal stem cells. *Differentiation* 77: 256–262.
- **KHODTHONG, C.; ISMAILI, I.; JUCKEM, L.** 2012. The impact of transfection mediated toxicity – Gene expression and cytotoxicity analysis of transfection reagents. [en línea]. Mirus Bio LLC Technical documents. <[https://www.mirusbio.com/assets/misc\\_technical\\_documents/the\\_impact\\_of\\_transfection\\_on\\_mediated\\_toxicity.pdf](https://www.mirusbio.com/assets/misc_technical_documents/the_impact_of_transfection_on_mediated_toxicity.pdf)>.
- **KIM, T.; EBERWINE, J.** 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397:3173-3178.
- **LEE, H.; CHOI, B.; MIN, B.; PARK, S.** 2009. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes *in vitro*. *Arthritis Rheum* 60: 2325-2332.
- **LEE, H.; JUNG, J.; CHO, K.; LEE, C.; HWANG, S.; KIM, G.** 2012. Comparison of *in vitro* hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes. *Differentiation* 84:223–231.
- **LI, H.; CHEN P.; WANG, L.; XU, J.; WANG, G.; JIA, Y.; YANG, L.** 2006. Effect of lenti-mCCL20 on the growth of mouse tumor. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37:712–716.

- **LIMBERT, C.; PATH, G.; EBERT, R.; ROTHHAMMER, V.; KASSEM, M.; JAKOB, F.; SEUFERT, J.** 2011. PDX1- and NGN3- mediated in vitro reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into pancreatic endocrine lineages. *Cytotherapy* 13:802-813.
- **LOCATELLI, P., OLEA, F.D., HNATIUK, A., SEPULVEDA, D., PEREZ-SAEZ, J.M., ARGUELLO, R. CROTTOGINI, A.** 2013. Efficient plasmid-mediated gene transfection of ovine bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 15:163-170.
- **MADEIRA, C.; MENDES, R.; RIBEIRO, S.; BOURA, J.; AIRES-BARROS, M.; DA SILVA, C.; CABRAL, J.** 2010. Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. *J Biomed Biotech* 735349:1-12.
- **MARTIN, B.; SAINLOS, M.; AISSAOUI, A.; OUDRHIRI, N.; HAUCHECORNE, M.; VIGNERON, J.P.; LEHN, J.M.; LEHN, P.** 2005. The design of cationic lipids gene delivery. *Curr Pharm Des* 11(3): 375-394.
- **MCCMAHON, J.M.; CONROY, S.; LYONS, M.; GREISER, U.; O'SHEA, C.; STRAPPE, P.; HOWARD, L.; MURPHY, M.; BARRY, F.; O'BRIEN, T.,** 2006. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev* 15: 87–96.
- **MIYAKI, L.A.M.; SIBOV, T.T.; PAVON, L.F.; MAMANI, J.B.; GAMARRA, L.** 2012. Study of internalization and viability of multimodal nanoparticles for labeling of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Einstein* 10(2): 189-196.
- **ODORICO, J.; KAUFMAN, D.; THOMSON, J.** 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19:193-204.
- **OSLOWSKI, C.M.; URANO, F.** 2011. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzimol* 490:71-92.
- **PFEIFER, A.; VERMA, I.** 2001. Gene Therapy: Promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:177-211
- **PITTENGER, M.; MACKAY, A.; BECK, S.; JAISWAL, R.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.; MOORMAN, M.;SIMONETTI, D.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.**

1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.
- **PRASHER, D.C.; ECKENRODE, V.K.** 1992. *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
  - **SANTOS, J.L.; PANDITA, D.; RODRIGUES, J.; PEGO, A.; GRANJA, P.L.; TOMÁS, H.** 2011. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr Gene Ther* 11: 46-57.
  - **SCHWARS, T.; LEICHT, S.; RADIC, T.; RODRIGUEZ-ARABOALAZA, I.; HERMANN, P.; BERGER, F.; SAIF, J.; BOCKER, W.; ELLWART, J.; AICHER, A.; HEESCHEN, C.** 2012. Vascular Incorporation of Endothelial Colony-Forming Cells Is Essential for Functional Recovery of Murine Ischemic Tissue Following Cell Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(2):13-21.
  - **SHIOTA, G.; YOSHIDA, Y.** 2012. “Test-on” system toward hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells by hepatocyte nuclear factor. *Methods Mol Biol* 826:125-132.
  - **SOHNI, A; VERFAILLIE, C.** 2013. Mesenchymal stem cells homing and tracking. *Stem Cells Int* 2013:130763.
  - **STIEHLER, M.; DUCH, M.; MYGIND, T.; LI, H.; ULRICH-VINTHER, M.; MODIN, C.; BAATRUP, A.; LIND, M.; PEDERSEN, F.S.; BÜNGER, C.E.** 2006. Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells. *Adv Exp Med Biol* 585: 31–48.
  - **THOMAS, C.; EHRHARDT, A.; KAY, M.** 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4(5): 346-358.
  - **TONDREAU, T.; LAGNEAUX, L.; DEJENEFFE, M.; MASSY, M.; MORTIER, C.; DELFORGE, A.; BRON, D.** 2004. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72(7):319 – 326.
  - **VAN DAME, A.; THORREZ, L.; MA, L.; VANDENBURGH, H.; EYCKMANS, J.; DELL’ACCIO, F.; DE BARI, C.; LUYTEN, F.; LILICRAP, D.; COLLEN, D.; VANDENDRIESSCHE, T.; CHUAH, M.K.L.** 2006. Efficient lentiviral

transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells* 24(4):896-907.

- **WATERS, J.C.** 2009. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J. Cell Biol* 185(7): 1135-1148.
- **WEI, X; YANG, X; HAN, Z; QU, F; SHAO, L; SHI, Y.** 2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 34(6): 747- 754.
- **WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLACK, I.B.** 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61(4):364–370
- **XIANG, J.; TANG, J.; SONG, C.; YANG, Z.; GRAHAM, D.; ZHENG, Q.; LI, G.** 2009. Mesenchymal stem cells as a gene therapy carrier for treatment of fibrosarcoma. *Cytotherapy* 11(5): 516 – 526.
- **ZHU, G.Q.; WU, Z.F.; LI Y.F.; HU, D.H.; WANG, Q.T.** 2006. Experimental study on dog's bone marrow stem cells transfected by pIRES2-EGFP-IGF-1 gene. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 41(12):739-742.