

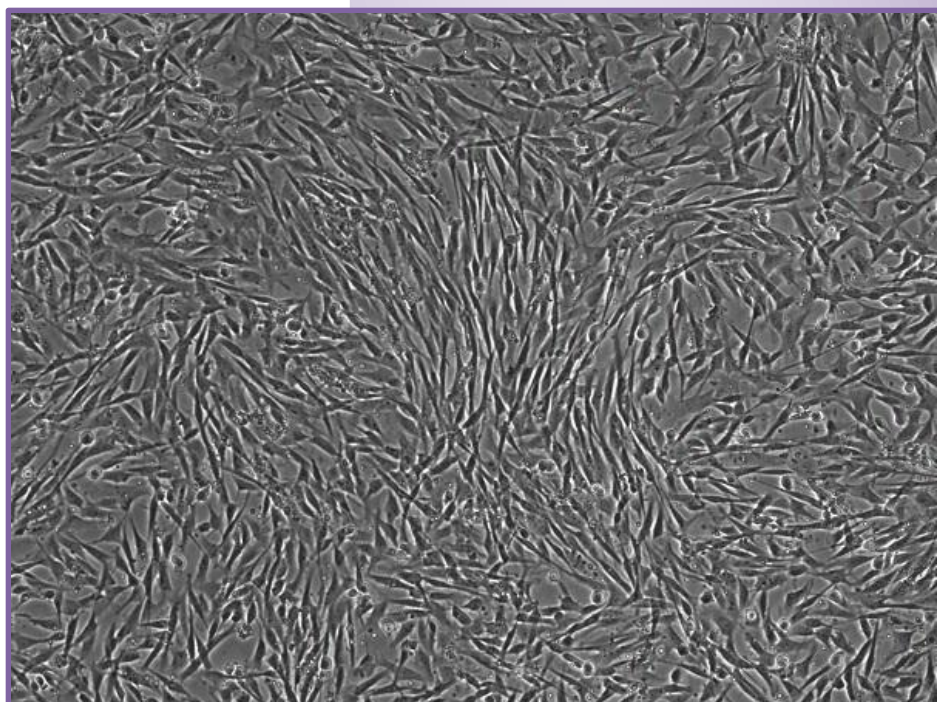


María Piñeiro Ramil
**Máster en Biología Molecular,
Celular y Genética**
Curso 2015-16

**INMORTALIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS
CON EL ANTÍGENO T DEL VIRUS SV40**

INMORTALIZACIÓN DE CÉLULAS NAI MESENQUIMAIS HUMANAS CO ANTÍXENO T DO VIRUS SV40

IMMORTALIZATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS WITH SV40 T ANTIGEN



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Directora:

Silvia María Díaz Prado

Co-Director:

Isaac Manuel Fuentes Boquete

Tutora:

María José López Armada

Fecha de Presentación:

23 de Junio de 2016

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Listado de abreviaturas | 2 |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| 1. Células madre mesenquimales (CMMs)..... | 4 |
| 2. Artrosis y destrucción del cartílago articular | 5 |
| 3. Terapia celular y regeneración del cartílago articular | 7 |
| 4. Generación de líneas celulares..... | 8 |
| 4.1 Inmortalización celular mediante la transfección de SV40 LT y hTERT | 9 |
| 4.2 Antígenos T del SV40: SV40 LT y SV40 sT | 10 |
| 4.3 Disgregación de los complejos Rb-E2F mediada por el SV40 LT | 11 |
| 4.4 Inhibición de la actividad de p53 mediada por el SV40 LT | 12 |
| 4.5 Inhibición de la actividad de PP2A mediada por el SV40 sT | 12 |
| 4.6 Expresión de hTERT para evitar la senescencia dependiente los telómeros..... | 12 |
| 5. Líneas celulares mesenquimales como modelo para el estudio de la artrosis | 13 |
| Objetivos | 14 |
| Materiales y Métodos | 15 |
| 1. Obtención y procesamiento de las muestras para aislar las CMMs-MO..... | 15 |
| 2. Inmortalización de las CMMs-MO obtenidas..... | 16 |
| 2.1 Amplificación y extracción de los plásmidos pBABE-SV40 y pBABE-hTERT..... | 17 |
| 2.2 Transfección de las células Φ NX para la producción de retrovirus | 19 |
| 2.3 Transfección de las CMMs-MO con los retrovirus producidos | 21 |
| 3. Selección de las CMMs-MO transformadas..... | 22 |
| 4. Obtención de clones aislados a partir de las células seleccionadas | 23 |
| 5. Extracción de proteínas y <i>Western blot</i> | 25 |
| Resultados | 29 |
| 1. Extracción de los plásmidos pBABE-SV40 y pBABE-hTERT | 29 |
| 2. Digestión del plásmido pBABE-SV40 con <i>EcoRI</i> y <i>NotI</i> | 30 |
| 3. Transfección de las CMMs con los retrovirus producidos y selección..... | 31 |
| 4. Obtención de clones aislados a partir de las células seleccionadas | 33 |
| 5. Extracción de proteínas y <i>Western blot</i> | 33 |
| Discusión | 34 |
| Conclusiones | 40 |
| Bibliografía | 41 |
| Agradecimientos | 44 |
| Anexo I - Información para el paciente..... | 45 |
| Anexo II - Consentimiento informado del paciente | 48 |
| Anexo III - Consentimiento informado del acompañante | 49 |

LISTADO DE ABREVIATURAS

CDK: Quinasa dependiente de ciclina.

CMMs: Células madre mesenquimales.

CMMs-MO: Células madre mesenquimales de la médula ósea.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

DMEM20: DMEM suplementado al 20% con suero bovino fetal y al 1% con penicilina/estreptomicina.

DMEM10: DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal y al 1% con penicilina/estreptomicina.

DMEM5: DMEM suplementado al 5% con suero bovino fetal y al 1% con penicilina/estreptomicina.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

Hsc70: Proteína de choque térmico 70 (*Heat shock cognate protein 70*).

hTERT: Transcriptasa reversa de la telomerasa humana.

hTR: ARN de la telomerasa humana.

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani.

LBA: Medio de cultivo LB con ampicilina.

MMPs: Metaloproteasas de la matriz.

pBABE-SV40: Plásmido pBABE-puro (Addgene plasmid #1764) con los nucleótidos 5163-2691 de la secuencia genómica del virus SV40 en el sitio de clonaje múltiple.

pBABE-hTERT: Plásmido pBABEhygroHigheGFPPhTERT (Addgene plasmid #28169).

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PSA: Persulfato amónico.

PVDF: Difluoruro de polivinilideno.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

SV40: *Simian Virus 40*.

SV40 LT: Antígeno T grande del SV40 (*SV40 large T antigen*).

SV40 sT: Antígeno T pequeña del SV40 (*SV40 small T antigen*).

S(x+y): Subcultivo número x (número de subcultivos antes de la immortalización) + y (número de subcultivos posteriores a la immortalización).

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

TTBS: Tampón Tris Salino con Tween.

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMMs) son células madre adultas multipotentes con una alta capacidad de proliferación, cultivables *in vitro* y que presentan propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Es por ello que tienen un gran interés en investigación y en terapia celular para el estudio y el tratamiento de enfermedades crónicas en las que se requiere la regeneración de tejidos, como es el caso de la artrosis, una enfermedad degenerativa de las articulaciones que afecta al 20% de la población mundial y al 70% de los mayores de 60 años, para la que actualmente no existe ningún tratamiento capaz de regenerar el tejido dañado.

Sin embargo, para estas aplicaciones es necesario expandir las CMMs *in vitro*, y este proceso puede acabar provocando la senescencia de las células y la adquisición de alteraciones relacionadas con la misma. Una forma de evitar la senescencia de las células humanas en cultivo es obtener una línea celular con un fenotipo estable y una capacidad de proliferación ilimitada mediante la immortalización de las células por transfección de genes virales, como el antígeno T del virus SV40 (SV40 LT), o humanos, como el gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT).

Por estos motivos se planteó el objetivo de este proyecto de investigación, que fue la obtención de líneas celulares para el estudio de la artrosis mediante la immortalización de CMMs humanas procedentes de la médula ósea (CMMs-MO) de un paciente con artrosis y un donante sano. Aunque no se ha conseguido la generación de una línea celular, con el protocolo de immortalización empleado se han obtenido algunos resultados prometedores que constituyen la base para continuar esta investigación, ya que se ha conseguido generar retrovirus portadores de la región codificante temprana del virus SV40 y transfectar de forma eficiente CMMs-MO de dos pacientes con artrosis y un donante sano con estos retrovirus.

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (CMMs).

Las células madre mesenquimales (CMMs), presentes en la médula ósea y otros tejidos adultos, son una fuente celular ampliamente utilizada en investigación para el estudio de diversas enfermedades y para el desarrollo de tratamientos mediante terapia celular, debido a su alta capacidad de proliferación y a su multipotencialidad. Ante los estímulos adecuados, estas células pueden diferenciarse hacia condrocitos, osteoblastos y adipocitos, entre otros tipos celulares. Además, tienen capacidad de inmunomodulación y secretan moléculas antiinflamatorias. Todas estas características convierten a las CMMs en una fuente celular muy interesante para el tratamiento enfermedades crónicas (autoinmunes, inflamatorias o degenerativas) como la artrosis, así como para el estudio de su fisiopatología en un modelo *in vitro* (Baghaban Eslaminejad y Malakooty Poor, 2014; Dimarino *et al.*, 2013; Ullah *et al.*, 2015).

En el campo de la Medicina Regenerativa existe la necesidad de encontrar una fuente de células madre estable, segura y accesible. Además de ser autorrenovables y multipotentes, las CMMs son fácilmente aislables y cultivables *in vitro* manteniendo su estabilidad genómica y evitando problemas éticos. Por ello, estas células podrían ser muy útiles para la reparación de tejidos dañados en diversas patologías. Las CMMs derivadas de la médula ósea (CMMs-MO) son las más utilizadas y se toman como estándar para la comparación con CMMs derivadas de otros tejidos (Ullah *et al.*, 2015).

Debido a la baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y a la ausencia de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), las CMMs no producen alorreactividad, lo que las convierte en un tipo celular factible para su aplicación alogénica. Por otra parte, estas células son capaces de inhibir la actividad de las células *Natural Killer* y los linfocitos T citotóxicos a través de diferentes rutas (Makris *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2015). El potencial para modular el microambiente local a través de sus funciones antiinflamatorias e inmunosupresoras confiere a las CMMs una ventaja adicional con respecto a su aplicación alogénica. Estas células, además, son capaces de migrar y de acumularse selectivamente en los lugares donde han ocurrido lesiones e inflamación (Gupta *et al.*, 2012; McCorry *et al.*, 2016).

El número de ensayos clínicos con CMMs se ha incrementado mucho a lo largo de la última década y, aunque el avance de los ensayos clínicos es lento, se están obteniendo resultados preliminares prometedores (Ullah *et al.*, 2015). Tanto las CMMs solas como incluidas en una matriz biodegradable son efectivas en el tratamiento de diversas enfermedades degenerativas, incluyendo la artrosis (Gupta *et al.*, 2012). Actualmente están registrados más de quinientos ensayos clínicos en humanos para evaluar la eficacia del tratamiento con CMMs en diferentes patologías, de los cuales 47 están dirigidos al tratamiento de la artrosis (ClinicalTrials.gov, consultado a 01/06/16).

2. ARTROSIS Y DESTRUCCIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.

La artrosis es un trastorno heterogéneo de las articulaciones móviles caracterizado por la degradación de la matriz extracelular del cartílago, el estrés celular y la inflamación como respuesta a lesiones en el tejido. Esta enfermedad se manifiesta primero como una alteración molecular seguida de alteraciones anatómicas y/o fisiológicas (Kraus *et al.*, 2015). Sus características principales son la degeneración del cartílago articular y el sobrecrecimiento óseo, aunque muchos componentes de la articulación, incluyendo la membrana sinovial y los meniscos, pueden verse afectados (Lories y Luyten, 2011), lo que produce dolor y pérdida de función de la articulación (Mobasheri *et al.*, 2014). La artrosis es la enfermedad crónica más común de las articulaciones y una de las causas más frecuentes de discapacidad, afectando a un 20% de la población mundial, y limita el movimiento del 80% de los pacientes que la padecen (Bomer *et al.*, 2015).

El cartílago articular es un cartílago hialino que cubre los extremos de cada hueso en las articulaciones, permitiendo el movimiento entre las dos superficies articulares y evitando la abrasión entre éstas al actuar como amortiguador entre los huesos (Figura 1). Este tejido, que consiste básicamente en condrocitos embebidos en una matriz extracelular formada por colágeno tipo II y proteoglicanos, tiene una capacidad de reparación limitada, debido a que carece de irrigación sanguínea y a que los condrocitos se encuentran en un estado de arresto del crecimiento, sin proliferación detectable (Bomer *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

El cartílago artrósico se caracteriza por la pérdida de colágeno y proteoglicanos, lo que modifica la estructura de la matriz extracelular y sus propiedades biomecánicas. Los condrocitos de las capas más profundas y calcificadas entran en apoptosis mientras que los de las capas más superficiales se hipertrofian. Durante la progresión de la enfermedad, estos

condrocitos producen enzimas degradadoras de la matriz, incluyendo metaloproteasas (MMPs), que aceleran la destrucción del cartílago. Todos estos cambios biomecánicos y bioquímicos (Figura 1) contribuyen a la patogénesis de la artrosis, lo que conlleva una reducción del espacio articular, la destrucción del cartílago y la pérdida de función de la articulación (Zhang *et al.*, 2016).

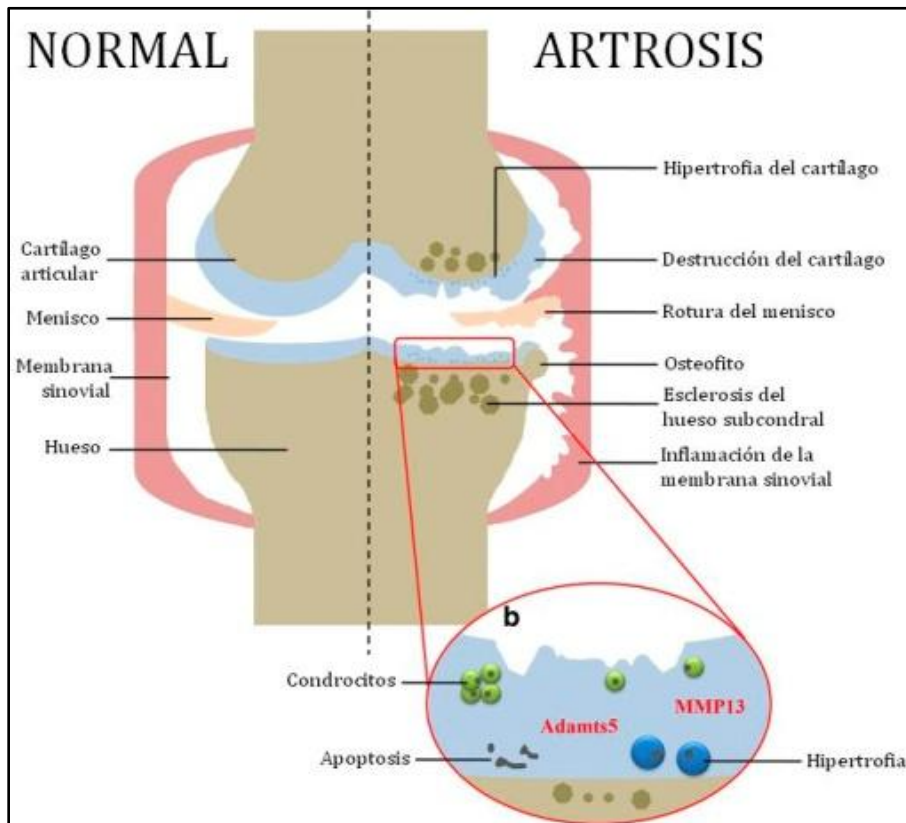


Figura 1. Articulación normal frente a articulación artrósica con destrucción del cartilago articular, crecimiento del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial, entre otros síntomas (adaptada de Zhang *et al.*, 2016).

Debido a que su función es soportar cargas, el cartílago articular es muy sensible al daño durante las actividades deportivas y se desgasta con el tiempo (Zhang *et al.*, 2016). Además, los condrocitos presentan poca capacidad de regeneración; esta habilidad se va perdiendo con la edad y es prácticamente nula después de los 60 años (Gupta *et al.*, 2012). Es por ello que la incidencia de esta patología degenerativa está directamente relacionada con la edad, presentando algún grado de artrosis el 70% de los mayores de 65 años (Kock *et al.*, 2012). Sin embargo, en los últimos años también ha aumentado su incidencia entre la población más joven, debido al exceso de ejercicio (Claus *et al.*, 2012).

Ya que el cartílago articular apenas tiene capacidad de regeneración, las lesiones de este tejido debidas a traumatismos o enfermedades tienden a empeorar con el tiempo, lo que puede llevar al desarrollo de artrosis (Claus *et al.*, 2012; Kock *et al.*, 2012; Makris *et al.*, 2015). Esta enfermedad es un problema para la sociedad tanto en términos de calidad de vida como de

gasto sanitario, pero a pesar de su alta prevalencia y elevado coste socioeconómico, actualmente no existe un tratamiento capaz de promover la reparación de las lesiones del cartílago articular; de hecho, en las últimas fases de la misma es común recurrir a la implantación de una prótesis (Bomer *et al.*, 2015; Lories y Luyten, 2011; Makris *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Además, todavía no se conocen a fondo los mecanismos moleculares que intervienen en la enfermedad (Lee *et al.*, 2013), lo que contribuye a la incapacidad de la comunidad científica de desarrollar tratamientos capaces de revertir el proceso patológico (Bomer *et al.*, 2015). Por todo ello, la búsqueda de nuevos tratamientos para esta enfermedad es un tema de gran interés en la investigación biomédica, como también lo es el desarrollo de buenos modelos *in vitro* para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a su desarrollo.

3. TERAPIA CELULAR Y REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.

La terapia celular ofrece la posibilidad de regenerar los tejidos dañados o perdidos para restaurar su estructura y función original. Así, en el caso de la artrosis ofrece una solución a largo plazo para regenerar el cartílago, aliviar los síntomas y retrasar la progresión de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2016). Muchos de los mecanismos que causan los síntomas y la fisiopatología de la artrosis se pueden revertir mediante la aplicación de terapias celulares y, de hecho, se han utilizado condrocitos autólogos para la regeneración del cartílago. Sin embargo, este tratamiento presenta varios inconvenientes, como el número limitado de células disponibles, la necesidad de realizar múltiples intervenciones quirúrgicas, la desdiferenciación de los condrocitos a fibroblastos durante su expansión en cultivo y la lesión en el sitio donador debida a la extracción de cartílago (Gupta *et al.*, 2012; Makris *et al.*, 2015).

Las CMMs se consideran una fuente celular más adecuada que los condrocitos del cartílago articular, ya que pueden obtenerse fácilmente a partir de varios tejidos, como la médula ósea, y tienen una alta tasa de proliferación, capacidad de diferenciación condrogénica y actividad inmunosupresora. Los resultados preliminares demuestran que la terapia con CMMs es eficaz en cuanto a la reducción del dolor y la recuperación de la función de la articulación en el tratamiento de la artrosis (Freitag *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

En varios modelos preclínicos de artrosis, el trasplante de CMMs ha sido efectivo para la reparación del cartílago. La administración de CMMs-MO autólogas o aleogénicas en la articulación de pacientes con artrosis es segura y eficaz en lo que se refiere a la reducción del

dolor, con un aumento de la regeneración del cartílago articular y la función de la articulación (Gupta *et al.*, 2012). Además, las CMMs-MO procedentes de pacientes con artrosis avanzada, en presencia de las señales adecuadas, son capaces de mantener un fenotipo condrogénico *in vitro*, con expresión de genes característicos del cartílago (Makris *et al.*, 2015). Estas células en una matriz tridimensional y bajo las señales de diferenciación adecuadas pueden adquirir un fenotipo condrogénico, y el constructo resultante se puede utilizar para reemplazar el tejido y reparar el cartílago articular dañado. Adicionalmente, al secretar factores solubles, las CMMs pueden proteger al cartílago de una mayor destrucción del tejido y facilitar la regeneración de las células progenitoras autóctonas *in situ* (Gupta *et al.*, 2012).

Las CMMs también han demostrado ser de utilidad en el tratamiento mediante terapia celular de otras enfermedades, ya que, si se les proporcionan las señales adecuadas, también tienen la capacidad de diferenciarse hacia células con las características de otros tipos celulares tan distintos como células nerviosas (Fu *et al.*, 2008), incluyendo neuronas colinérgicas (Naghdi *et al.*, 2009) y neuronas dopaminérgicas (Datta *et al.*, 2011), hepatocitos (An *et al.*, 2014; Stock *et al.*, 2014) y células pancreáticas productoras de insulina (Gabr *et al.*, 2013).

No obstante, se necesita mucha más investigación *in vitro* para comprender el potencial terapéutico de las CMMs y optimizar su diferenciación condrogénica. A pesar del potencial de la terapia celular con CMMs-MO, todavía es necesario determinar algunas cuestiones, como el número de células necesarias para promover la regeneración del tejido, si son necesarias una o más inyecciones para alcanzar el efecto deseado, el lapso de tiempo óptimo entre estas inyecciones y la seguridad a largo plazo de la técnica (Makris *et al.*, 2015).

4. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES.

La utilización de células humanas con fines de investigación o terapéuticos se ve restringida, en parte, por su limitada proliferación, ya que antes de ser utilizadas las células tienen que expandirse *in vitro*. Las células humanas primarias se dividen un número finito de veces en cultivo antes de detener de forma permanente el ciclo celular y entrar en un estado de arresto del crecimiento denominado senescencia (Ahuja *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2013), que puede ser dependiente o independiente del acortamiento de los telómeros (Kiyono, 2007). En el caso de las CMMs, existe una pérdida de potencia a lo largo de sucesivos subcultivos, lo que se manifiesta en una reducción del potencial de diferenciación y diversas alteraciones morfológicas asociadas a la senescencia de las células en cultivo (Ullah *et al.*, 2015).

El periodo de vida finito de las células en cultivo está regulado por un grupo de al menos diez genes de senescencia cuyos productos regulan negativamente la progresión del ciclo celular, como pRb y p53 (Freshney, 2010), que son reguladores comunes de la senescencia tanto dependiente como independiente del acortamiento de los telómeros (Kiyono, 2007). Para muchas aplicaciones es necesario disponer de un número ilimitado de células humanas, que mantengan su fenotipo evitando la senescencia, y uno de los métodos más comunes para lograr este objetivo es el establecimiento de líneas celulares. Esto se puede conseguir mediante la immortalización de células humanas, lo que se puede lograr mediante la infección con virus transformantes o mediante la transfección de determinados genes tumorales, víricos o celulares (Freshney, 2010; Lipps *et al.*, 2013; Yeager y Reddel, 1999).

4.1 INMORTALIZACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO MEDIANTE LA TRANSFECCIÓN DE SV40 LT Y hTERT.

La immortalización es un proceso de múltiples etapas que incluye la inactivación de diversos genes que regulan negativamente la progresión del ciclo celular. Para la immortalización de células en cultivo se han utilizado varios genes que actúan bloqueando la inhibición de la progresión del ciclo celular al inhibir la actividad de genes como pRb, p53, p16 y p21, dando lugar a un incremento en el número de generaciones que pueden producir las células y reduciendo la vigilancia sobre el ADN, aumentando, de esta forma, la probabilidad de que se produzcan otras mutaciones (Freshney, 2010; Takeuchi *et al.*, 2015). El gen codificante del antígeno T grande del virus SV40 (SV40 LT) es el que más se ha utilizado para la immortalización de células adherentes, como los fibroblastos, aunque también se ha utilizado el gen codificante de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT) para la immortalización de CMMs y otros tipos celulares (Freshney, 2010).

La transfección de estos genes provoca cambios fenotípicos en las células en cultivo que son inducidos por cambios heredables en el ADN y en la expresión génica. Esta transformación de las células está asociada a inestabilidad genética y a tres cambios fenotípicos principales: (1) immortalización, la adquisición de la capacidad de dividirse indefinidamente; (2) control aberrante del crecimiento, la pérdida de inhibición por contacto de la proliferación y/o de la dependencia de anclaje; y (3) tumorigenicidad. Aún así, la immortalización se puede conseguir sin grandes alteraciones en el control del crecimiento y evitando la tumorigenicidad, y muchas líneas celulares inmortales mantienen tanto la inhibición por contacto de la proliferación

celular como la dependencia de anclaje y no son tumorigénicas. Sin embargo, hay que asumir que en las líneas celulares inmortales algunos aspectos del control del crecimiento serán anormales y que habrá un incremento en la inestabilidad genómica (Freshney, 2010).

4.2 ANTÍGENOS T DEL SV40: SV40 LT Y SV40 sT.

El genoma del SV40 consiste en 5.243 pares de bases y codifica tres proteínas que son componentes estructurales del virión (VP1, VP2 y VP3), dos proteínas no estructurales (el antígeno T grande, SV40 LT, y el antígeno T pequeño, SV40 sT) y dos proteínas de función desconocida: la agnoproteína y el antígeno T 17K (Figura 2). Este genoma puede dividirse en tres elementos: una región codificante temprana, una región codificante tardía y una región regulatoria. En una infección productiva, la expresión de la región codificante temprana da lugar a la síntesis de los antígenos T grande, pequeño y 17K (Ahuja *et al.*, 2005).

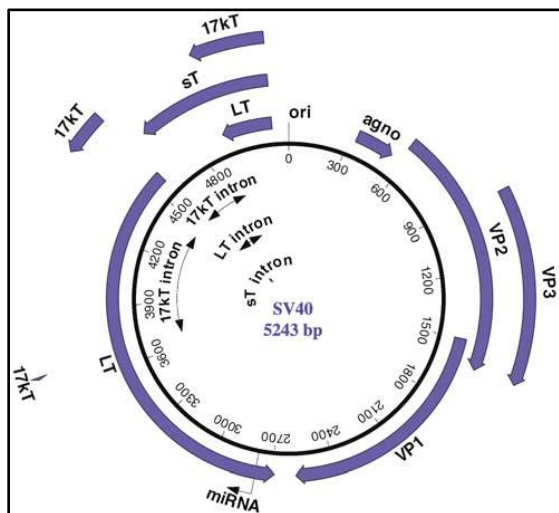


Figura 2. Genoma del SV40, en el que la región temprana incluye los antígenos T: LT, sT y T 17K (Ahuja *et al.*, 2005).

Los antígenos T del SV40 están formados por varios dominios y motivos, de entre los que destacan el dominio J, el motivo de unión a Rb (LXCXE), una señal de localización nuclear (NLS), un dominio de unión a PP2A y un dominio ATPasa (AAA+) (Figura 3). Los antígenos T del SV40 son oncoproteínas dominantes que llevan a cabo su acción al asociarse con ciertas proteínas celulares y alterar las rutas de señalización que regulan; el SV40 LT se une a la familia de supresores de tumores Rb (pRb, p107 y p130), al supresor de tumores p53 y a la chaperona de choque térmico Hsc70, mientras que el SV40 sT interacciona con la fosfatasa PP2A. El SV40 LT también interviene en la expresión de la región tardía (que incluye VP1, VP2, VP3 y la agnoproteína), en la replicación del ADN viral y en el ensamblaje del virión y, junto al SV40 sT, induce a las células a entrar en la fase S del ciclo celular (Ahuja *et al.*, 2005; Alwin Prem Anand *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2009).

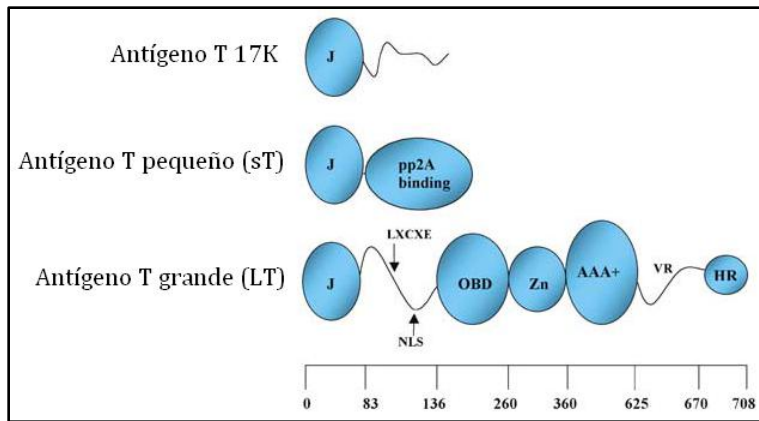


Figura 3. Dominios y motivos de los antígenos T del SV40, incluyendo el dominio LXCXE de unión a Rb, el dominio ATPasa (AAA+) de unión a p53 y el dominio de unión a la fosfatasa PP2A (adaptada de Ahuja *et al.*, 2005).

La expresión del SV40 LT es necesaria, y normalmente suficiente, para que se produzca la transformación. En la inmortalización mediada por el SV40 LT intervienen dos mecanismos principales: (1) la activación de la transcripción mediada por E2F mediante la disgregación de los complejos Rb-E2F y (2) la inhibición de p53. Estos mecanismos permiten superar el arresto del crecimiento, evitar la apoptosis a través de la inhibición de la función de p53 e inducir la proliferación por eliminación del efecto represivo de Rb sobre E2F (Alwin Prem Anand *et al.*, 2012; Pipas, 2009).

4.3 DISGREGACIÓN DE LOS COMPLEJOS Rb-E2F MEDIADA POR EL SV40 LT.

Muchas señales de senescencia inducen la activación de Rb, cuyo estado de fosforilación está controlado por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que a su vez pueden ser inactivadas por inhibidores de CDKs, como p16 y p21, y por la fosfatasa PP2A (Garriga *et al.*, 2004; Kiyono, 2007). La interacción de Rb con los factores de transcripción E2F inhibe la transcripción de los genes regulados por estos factores, muchos de los cuales codifican proteínas necesarias para la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular, de tal manera que éstos no se expresan en las células quiescentes. La inactivación de Rb por fosforilación permite la transcripción de los genes regulados por E2F. El SV40 LT, al unirse a Rb a través del motivo LXCXE, impide que se produzca la interacción con E2F y por lo tanto la regulación de su actividad, promoviendo la expresión de los genes dependientes de E2F y la entrada en la fase S del ciclo celular (Alwin Prem Anand *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2009).

Al menos en algunos casos, los dominio J del SV40 LT y del SV40 sT también colaboran con el motivo LXCXE en la disgregación de los complejos Rb-E2F. Estos dominios J presentan homología con el dominio J con las chaperonas moleculares DnaJ, que estimulan la actividad ATPasa de las chaperonas DnaK. El SV40 LT se une a Hsc70, un homólogo de DnaK

presente en las células de mamífero, a través del dominio J, y a complejos p130/p107-E2F a través del motivo LXCXE, y la Hsc70 unida al dominio J proporciona la energía generada por la hidrólisis de ATP para liberar E2F. El dominio J es necesario para la inactivación de p130 y p 107, pero no de pRb (Ahuja *et al.*, 2005; Pípas, 2009).

4.4 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE p53 MEDIADA POR EL SV40 LT.

Los daños en el ADN resultan en la activación de p53, lo que, dependiendo del tipo celular y de la gravedad del daño, puede inducir senescencia o apoptosis. En circunstancias normales, p53 se une al promotor de HDM2 y estimula su transcripción, y la proteína HDM2 se une a p53 e induce su poliubiquitinización y degradación. Sin embargo, ante diferentes tipos de estrés, como la presencia de daños en el ADN, se produce la fosforilación de p53 y esto inhibe su interacción con HDM2, de tal manera que p53 puede regular positivamente la expresión de genes que median senescencia o apoptosis. El SV40 LT interacciona a través de su dominio ATPasa con el dominio de unión a ADN de p53, bloqueando su capacidad de unirse a promotores. La unión del SV40 LT provoca la estabilización de p53, por lo que las células transformadas con SV40 contienen grandes cantidades de p53, pero esta proteína es funcionalmente inactiva (Ahuja *et al.*, 2005; Zaika *et al.*, 2015).

4.5 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PP2A MEDIADA POR EL SV40 sT.

En las situaciones en las que la expresión del SV40 LT no es suficiente para la transformación, la co-expresión del SV40 sT suele permitir que la transformación tenga lugar. La contribución del antígeno T pequeño a la transformación es dependiente de su unión a la subunidad catalítica de la fosfatasa PP2A, lo que resulta en la inhibición de la actividad fosfatasa y por lo tanto altera la regulación distintas rutas celulares que intervienen en el control del crecimiento (Arroyo y Hahn, 2005; Cheng *et al.*, 2009),

4.6 EXPRESIÓN DE hTERT PARA EVITAR LA SENESCENCIA DEPENDIENTE DEL ACORTAMIENTO DE LOS TELÓMEROS.

La expresión del SV40 LT no immortaliza directamente, pero inicia una cascada de eventos que resulta en la immortalización de las células con una baja probabilidad (10^{-5} - 10^{-9}). La transfección con el gen del SV40 LT extiende el período de vida de las células durante otros

20-30 subcultivos, después de los cuales las células dejan de proliferar y entran en crisis. Tras un periodo variable de crisis, una pequeña fracción de células inmortales reinicia la proliferación (Freshney, 2010; Li *et al.*, 2008).

Esta crisis se debe a que las células que expresan el SV40 LT, aunque pueden ser subcultivadas durante un periodo de tiempo más largo, finalmente acaban entrando en senescencia debido al acortamiento de los telómeros, ya el SV40 LT *per se* no tiene efecto sobre la expresión de la telomerasa. En ausencia de actividad telomerasa, los telómeros se acortan continuamente después de cada replicación, hasta que, finalmente, los cromosomas ya no pueden replicarse (Kiyono, 2007). La inestabilidad genómica debida a la expresión del SV40 LT puede favorecer la aparición de deleciones y/o mutaciones en los genes de senescencia o la sobreexpresión o mutación de uno o más oncogenes que sean capaces de anular la acción de los genes de senescencia, lo que finalmente puede permitir a las células superar el estado de arresto del crecimiento y re-expresar la telomerasa (Freshney, 2010; Li *et al.*, 2008).

La telomerasa humana es una ribonucleoproteína que sintetiza las repeticiones teloméricas y que está compuesta, fundamentalmente, por una subunidad de ARN (hTR) y una subunidad catalítica proteica con actividad transcriptasa reversa (hTERT). La subunidad hTR está presente en todos los tejidos, mientras que la subunidad hTERT sólo se expresa en células tumorales, células germinales y linfocitos activados. Algunos tipos celulares pueden ser immortalizados por transducción de hTERT; las células transfectadas con este gen extienden su periodo de vida, y una parte de ellas se hacen inmortales, pero no tumorígenas. Sin embargo, la mayoría de las células humanas entran en senescencia independiente del acortamiento telómeros y, en este caso, las células no pueden ser immortalizadas sólo con hTERT. Ya que la activación de las rutas p16/pRb y/o p53 suelen limitar la proliferación de las células humanas primarias y que para una immortalización eficiente de las células humanas también es necesario activar la expresión de la telomerasa, se puede utilizar el SV40 LT en combinación con hTERT (Kiyono, 2007).

5. LÍNEAS CELULARES MESENQUIMALES COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA ARTROSIS.

Actualmente están disponibles algunas líneas de CMMs (Hung *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2010; Inbiobanck-Inbiomed, consultado a 13/06/16), pero no disponemos de ningún modelo celular

mesenquimal autóctono, generado a partir de las células de pacientes gallegos artrósicos y sanos, para el estudio de la artrosis, una enfermedad en la que, además de la edad y el estrés mecánico, la genética es uno de los principales factores de riesgo (Bomer *et al.*, 2015; Fernández-Moreno *et al.*, 2008).

La regulación de la expresión génica a través de diferentes mecanismos permite a los condrocitos maduros del cartílago articular abandonar su estado de arresto del crecimiento para adaptarse al ambiente. Una señalización intracelular aberrante perturba la homeostasis del cartílago y provoca daños irreversibles en el tejido en situaciones de estrés, como un exceso de carga. Se cree que la alteración de la regulación de la expresión génica en los condrocitos podría ser uno de los mecanismos subyacentes a la fisiopatología de la artrosis, y también se han identificado mutaciones que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad en algunos de los genes regulados diferencialmente en las células del cartílago articular sano y artrósico, entre ellas polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) (Bomer *et al.*, 2015), microsatélites y minisatélites (Fernández-Moreno *et al.*, 2008). El estudio de estas variantes genéticas en condrocitos en cultivo podría contribuir a revelar la función de los genes alterados en la fisiopatología de la artrosis (Bomer *et al.*, 2015).

Por todo ello, con este proyecto se pretendía obtener líneas celulares mesenquimales autóctonas y, al mismo tiempo, poner a punto la metodología para la inmortalización de CMMs en el laboratorio, lo que nos permitiría disponer de excelentes modelos enfermedad para llevar a cabo estudios de diferenciación condrogénica, de fisiología del cartílago y de la fisiopatología de la artrosis, así como ensayos de reparación del tejido dañado y evaluación de nuevos fármacos destinados a tratar esta patología.

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de investigación fue la obtención de líneas celulares para el estudio de la artrosis mediante la inmortalización de células madre mesenquimales humanas de la médula ósea (CMMs-MO) de un paciente con artrosis y un donante sano.

Así, los objetivos específicos fueron:

1. Generar dos tipos de retrovirus para llevar a cabo la inmortalización mediante transfección de la secuencia codificante temprana del SV40 y de la región codificante de la hTERT.

2. Transfectar CMMs-MO humanas de un paciente con artrosis y un donante sano en cultivo con los retrovirus generados.

3. Evaluar el efecto de esta transfección en las CMMs-MO.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA AISLAR LAS CMMS-MO.

Se obtuvieron, con consentimiento informado, muestras de médula ósea de un paciente con artrosis y de un donante sano en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Estas muestras fueron procesadas en el Área de Cultivo Celular del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) para aislar las CMMs-MO. Después del procesamiento de la muestra, las células fueron sembradas en placas de cultivo adherentes (Costar Corning Incorporated, EEUU) con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Lonza, España) suplementado al 20% con suero bovino fetal (Gibco, España) y al 1% con penicilina/estreptomicina (Gibco, España) (DMEM20) y se introdujeron en una estufa de cultivos a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Con el objetivo de incrementar a) el número de células para iniciar el experimento y b) la pureza del cultivo, eliminando los macrófagos y los fibroblastos, se realizaron dos subcultivos con *preplating*. Para ello, se desechó el medio de cultivo, se realizaron dos lavados de las placas con suero salino y se levantaron las células utilizando tripsina con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich Química S.A., España), realizando una incubación de 2-3 minutos a 37°C.

El *preplating* es un procedimiento que se basa en el hecho de que las células como los macrófagos y los fibroblastos, que pueden contaminar los cultivos de CMMs-MO, se adhieren más rápidamente a las placas de cultivo que las CMMs (en unos 15 minutos frente a los 30 que necesitan las CMMs). Por ello, después de inactivar la tripsina con DMEM suplementado al 5% con suero bovino fetal y al 1% con penicilina/estreptomicina (DMEM5), se incubaron las células a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se recogieron las CMMs en suspensión a un tubo tipo Falcon y se realizó una centrifugación a 430 g durante 10 minutos. El *pellet* celular obtenido se resuspendió en DMEM20 y se sembraron las células en una placa

adherente de mayor superficie para su expansión.

Después de repetir este procedimiento dos veces, en los dos primeros subcultivos, se continuó la expansión de las células durante un subcultivo más para obtener unos dos millones de células de cada paciente/donante. Para realizar este subcultivo y los siguientes se utilizó el protocolo anterior pero recogiendo las células en suspensión inmediatamente después de inactivar la tripsina (sin *preplating*). Para determinar el número de células se hizo un conteo celular en una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) empleando un microscopio invertido IX51 (Olympus España S.A., España).

2. INMORTALIZACIÓN DE LAS CMMS-MO OBTENIDAS.

Se llevó a cabo un protocolo de immortalización de las CMMs-MO obtenidas empleando vectores víricos producidos por células Φ NX (Phoenix-AMPHO, ATCC CRL-3213) transfectadas con un plásmido pBABE con la región codificante temprana del virus SV40, que incluye el antígeno T grande (SV40 LT) y el antígeno T pequeño (SV40 sT). Las células Φ NX son una línea celular productora de retrovirus recombinantes, derivada de la línea celular hepática embrionaria 239T y que se caracteriza por presentar una alta eficiencia de transfección (Swift *et al.*, 2001).

En los dos primeros experimentos de immortalización probamos tanto los antígenos T del virus SV40 como la subunidad catalítica del gen de la telomerasa humana (hTERT), empleando las secuencias codificantes correspondientes a cada una de estas proteínas clonadas en un plásmido pBABE con un marcador de selección, un gen de resistencia a puromicina en el caso de los antígenos T del SV40 [pBABE-puro (Addgene plasmid #1764) con los nucleótidos 5163-2691 de la secuencia genómica del virus SV40 en el sitio de clonaje múltiple; **pBABE-SV40**] y a higromicina en el caso de la hTERT [pBABEhygroHigheGFPhTERT (Addgene plasmid #28169); **pBABE-hTERT**], respectivamente. En el tercer experimento de immortalización empleamos únicamente el plásmido pBABE-SV40.

Un plásmido pBABE consta de un origen de replicación en bacterias (ORI), un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), una 5'-LTR, un sitio donador del *splicing* mutado, un gen viral *gag* truncado, un sitio de clonaje múltiple, un promotor temprano de SV40 (SV40 IEP), un marcador de selección que puede ser un gen de resistencia a puromicina (puro) o a

higromicina (hygR) y una 3'-LTR (Figura 4).

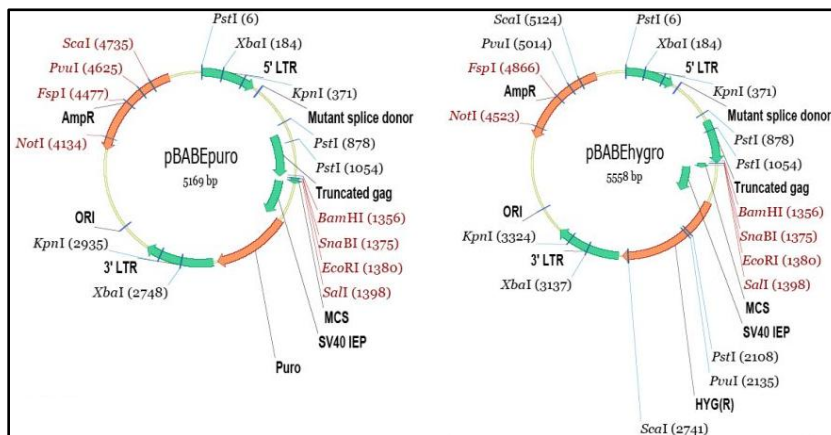


Figura 4. Plásmidos pBABEpuro y pBABEhygro (addgene.org).

El gen de resistencia a puromicina (puro) codifica una puromicina N-acetil transferasa, una enzima producida por la bacteria *Streptomyces alboniger* capaz de conferir resistencia a este antibiótico, que inhibe el crecimiento de las células eucariotas debido al bloqueo de la síntesis de proteínas a nivel de los ribosomas 80S (Vara *et al.*, 1986; Lanza *et al.*, 2013). La higromicina es un antibiótico producido por *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe la síntesis proteica en células eucariotas al unirse a los ribosomas; el gen de resistencia (hygR) codifica una higromicina fosfotransferasa que inactiva el antibiótico por fosforilación (Zalacain *et al.*, 1986; Lanza *et al.*, 2013).

2.1 AMPLIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pBABE-SV40 Y pBABE-hTERT.

Para la realización de este experimento se disponía del plásmido pBABE-SV40 en un cultivo clónico de *E. coli* DH5- α criopreservado en el laboratorio y del plásmido pBABE-hTERT en un cultivo de *E. coli* DH5- α sembrado por picadura en medio sólido Luria-Bertani (LB), proporcionado por Addgene.

En primer lugar sembramos las células de *E. coli* DH5- α en placa para amplificar el plásmido pBABE-hTERT. Para ello realizamos una siembra mediante la técnica de los cuatro cuadrantes en medio sólido Agar LB con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina (LBA) en una placa Petri (VWR, EEUU), empleando un asa de siembra estéril y un mechero de alcohol para mantener la esterilidad. Después se realizó una incubación a 37° durante 16-24 horas y a continuación se escogieron cuatro colonias aisladas para su expansión en medio sólido LBA en otra placa Petri. Para realizar la resiembra se recogió cada colonia seleccionada con un asa de siembra

estéril y se sembró en el cuadrante correspondiente. Se permitió el crecimiento de las bacterias a 37°C durante 16-24 horas y después se conservó la placa a 4°C.

Para la amplificación del plásmido crecimos, por un lado, cuatro réplicas de un clon de *E. coli* con el plásmido pBABE-SV40 a partir del cultivo clónico criopreservado en el laboratorio y, por otro lado, los cuatro clones de *E. coli* con el plásmido pBABE-hTERT aislados y expandidos en medio sólido LBA. Para ello, en primer lugar preparamos el medio LB líquido con 2,5 gramos de medio LB en polvo (Fisher Scientific S.L., España) en 100 mL de agua y lo esterilizamos empleando un autoclave. Como el medio LBA debe tener una concentración de 40 ng/mL de ampicilina, preparamos un *stock* a 40 mg/mL con 20 mg de ampicilina (Fisher Scientific S.L., España) en 500 µL de agua y lo filtramos empleando un filtro Millex de 0,22 µm (Millipore, EEUU), para evitar la contaminación del medio.

En el momento de utilizar el medio LBA añadimos 1 µL de la solución filtrada de ampicilina por cada mililitro de medio LB esterilizado. Para el crecimiento de cada cultivo se utilizaron 5 mL de medio LBA. Los cultivos se mantuvieron en agitación (200-250 rpm) a 37°C durante 16 horas para permitir el crecimiento selectivo de aquellas bacterias que contuvieran los plásmidos pBABE-SV40 y pBABE-hTERT.

Transcurrido este tiempo procedimos a la extracción de los plásmidos empleando el *kit* comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific, EEUU). En primer lugar, centrifugamos los tubos de cultivo a 3.900 g durante cinco minutos y eliminamos todo el medio de cultivo, quedándonos únicamente con el *pellet* bacteriano. A continuación resuspendimos este *pellet* en un tampón de resuspensión y añadimos un tampón de lisis que permite la lisis de las bacterias en condiciones alcalinas. Cuando las bacterias se lisan en estas condiciones el ADN cromosómico y las proteínas se desnaturalizan, mientras que el ADN plasmídico permanece estable. A continuación añadimos un tampón de neutralización con acetato que provoca la precipitación del ADN cromosómico y las proteínas, mientras que el ADN plasmídico permanece en solución.

Después realizamos una centrifugación a más de 12.000 g y transferimos el sobrenadante a una columna de purificación. Tras una serie de centrifugaciones y lavados para eliminar contaminantes del ADN plasmídico adsorbido en la membrana de la columna de purificación, transferimos esta columna a un tubo estéril y añadimos un pequeño volumen de tampón de elución, incubamos durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos a más de 12000 g durante 2 minutos. Tras la purificación se cuantificó la concentración del ADN

plasmídico en un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, EEUU).

Adicionalmente, se realizó una digestión del plásmido pBABE-SV40 con las enzimas *EcoRI* y *NotI* para comprobar la presencia del inserto en el plásmido, por tratarse de un plásmido cedido por otro laboratorio. La comprobación del plásmido pBABE-hTERT no se llevó a cabo por tratarse de un plásmido comercial. Para ello, realizamos cuatro cultivos adicionales del clon de *E. coli* con el plásmido pBABE-SV40 y extrajimos el ADN plasmídico siguiendo el protocolo anteriormente descrito. A continuación cuantificamos la concentración del ADN plasmídico y realizamos la reacción de digestión con un 10 U de *EcoRI* (New England Biolabs, Reino Unido), 10 U de *NotI* (New England Biolabs, Reino Unido) un 10% de tampón *CutSmart Buffer* (New England Biolabs, Reino Unido) y 1 µg de ADN plasmídico en un volumen final de 20 µL a 37°C durante 3 horas. Por último realizamos un gel de agarosa al 1% (Sigma-Aldrich Química S.A., España) con un 0,01% de *SYBR Safe* (Invitrogen, EEUU) en el que cargamos un control sin *NotI*, un control sin *EcoRI*, dos marcadores de pesos moleculares (*DNA molecular weight markers XVII* y *XIV*, Roche, Alemania) y el plásmido pBABE-SV40 digerido con *EcoRI* y *NotI*. Para visualizar el resultado se utilizó una cámara de revelado LAS-3000 (Fujifilm, Japón) y excitación del *SYBR Safe* con luz ultravioleta.

2.2 TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS ΦNX PARA LA PRODUCCIÓN DE RETROVIRUS.

Antes de comenzar el primer experimento de inmortalización se expandieron las células ΦNX sembrándolas en placas adherentes con DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal y al 1% con penicilina/estreptomicina (DMEM10) y se introdujeron en una estufa de cultivos a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Se realizaron sucesivos subcultivos utilizando tripsina al 0,05% con EDTA (Gibco, España) siguiendo el protocolo descrito anteriormente para las CMMs.

También se decidió criopreservar parte de estas células para tener reserva. Para ello se siguió el mismo protocolo descrito para la realización de un subcultivo pero, en lugar de resuspender el *pellet* celular obtenido en DMEM20 para resembrar las células, se llevó a cabo esta resuspensión en medio de congelación, que consiste DMEM suplementado al 50% con suero bovino fetal y al 1% con dimetil sulfoxido (Sigma-Aldrich Química S.A., España). Esta suspensión celular se introdujo en varios crioviales que se introdujeron en un contenedor de

congelación (*CoolCell Cell Freezing Container*, BioCision, EEUU) y este contenedor de congelación se llevó a un congelador a -80°C .

Posteriormente, para comenzar el primer experimento de immortalización, se sembraron, en DMEM10, 4,5 millones de células ΦNX en dos placas adherentes de 100 mm, la densidad recomendada para transfectarlas al día siguiente. Para el segundo experimento de immortalización se sembraron, en DMEM10, 4,5 millones de células ΦNX en dos placas de 100 mm partiendo de los *stocks* criopreservados en el laboratorio. Para descongelar las células se introdujo el criovial en un baño a 37°C , se pasaron las células en suspensión a un volumen mayor de DMEM5, se centrifugaron a 430 g durante 10 minutos y se resuspendió el *pellet* celular en su medio de cultivo, en este caso DMEM10, para pasar las células a las placas adherentes. Por último, para el tercer experimento de immortalización, volvimos a partir de los *stocks* criopreservados en el laboratorio para sembrar, en DMEM10, 4,5 millones de células ΦNX en tres placas de 100 mm.

Al día siguiente se realizó la transfección de las células ΦNX . Para cada placa de 100 mm se necesitan 873 μL de Opti-MEM (Gibco, España), 81 μL del reactivo de transfección, *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche, Alemania), y 9 μL de un *stock* de ADN con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En nuestro caso, en el primer experimento utilizamos 9 μL de un *stock* a 212,2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para el plásmido pBABE-SV40 [correspondiente a la réplica SV40(3)] y un *stock* a 173,7 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para el plásmido pBABE-hTERT (correspondiente al clon hTERT3), a fin de utilizar los dos plásmidos a la concentración más similar posible. En el segundo experimento de immortalización utilizamos todo el volumen disponible (aproximadamente 10 μL) de la solución de cada plásmido, con una concentración de 396,2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en el caso del plásmido pBABE-SV40 y 330,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en el caso del plásmido pBABE-hTERT.

En el tercer experimento de immortalización empleamos únicamente el plásmido pBABE-SV40 y decidimos mantener la concentración de ADN requerida (1 μg) en lugar del volumen (9 μL). Por lo tanto, empleamos 15,9 μL de un *stock* concentración de 566 $\text{ng}/\mu\text{L}$. En ningún caso consideramos la posibilidad de emplear un *kit* concentrador porque no contábamos con volumen suficiente de la solución de ADN.

En cuanto al Opti-MEM, se trata de un medio esencial mínimo cuya composición incluye algunas modificaciones de la composición del DMEM y que mejora la eficiencia de la transfección con lípidos catiónicos (Thermo Fisher Scientific MAN0007448 - Opti-MEM

Reduced Serum Medium). El X-tremeGENE es un reactivo de transfección compuesto por lípidos catiónicos y otros componentes que forma un complejo con el ADN y permite una transferencia eficiente a través de las membranas eucariotas (Roche Applied Science *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent*, Cat. No. 06 365 752 001).

Para realizar la transfección de las células Φ NX, en primer lugar se mezcló el Opti-MEM con la solución de ADN plasmídico y se mezcló mediante vórtex. A continuación se añadió el X-tremeGENE, se mezcló mediante agitación suave y se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante 25-30 minutos antes de comenzar la transfección. Transcurrido este tiempo, esta mezcla se añadió al medio de cultivo presente en las placas con las células a transfectar gota a gota, comenzando por el centro y realizando una espiral hacia fuera. Después, las células Φ NX se incubaron a 37°C durante 24 horas.

2.3 TRANSFECCIÓN DE LAS CMMS-MO CON LOS RETROVIRUS PRODUCIDOS.

Al día siguiente de la transfección se sembraron las células a inmortalizar en su medio de cultivo (en nuestro caso, CMMs-MO humanas en DMEM20). Para ser transfectadas con virus las células deben estar a un 70-80% de confluencia (Freshney, 2010). En los dos primeros experimentos de inmortalización, sembramos 100.000 células en un pocillo y 150.00 células en otro pocillo en dos placas adherentes de seis pocillos para ensayar la inmortalización con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40 en una placa y con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-hTERT en la otra placa. En el primer experimento de inmortalización se utilizaron CMMs-MO humanas procedentes de un donante sano y, en el segundo, CMMs-MO humanas procedentes de un paciente con artrosis.

En el tercer experimento de inmortalización sembramos a una densidad de 100.000 células/pocillo seis pocillos de dos placas de seis pocillos, una con CMMs-MO humanas procedentes de un donante sano y otra con CMMs-MO humanas procedentes de un paciente con artrosis. También se sembraron a esta densidad dos pocillos de dos placas de seis pocillos para cada paciente para utilizar como control y se criopreservaron parte de las células para realizar comparaciones con las células inmortalizadas en experimentos posteriores.

El mismo día se realizó un cambio de medio a las células Φ NX, añadiéndoles DMEM10, y se transfirieron las placas a una estufa de incubación a 32°C. Este primer sobrenadante lo desechamos ya que no se podía utilizar para la infección de las CMMs, puesto que contenía

reactivo de transfección, y, además, los virus no son tan estables a 37°C como a 32°C (Gentaur Molecular Products, Phoenix™ Retrovirus Expression System, Cat. No. RVK-10001). Todos los residuos contaminados con virus fueron desechados en una botella con lejía para inactivarlos y después se introdujeron en un bidón de residuos biológicos almacenado en el interior de un congelador.

Al día siguiente realizamos la transfección de las CMMs con los retrovirus producidos por las células Φ NX transfectadas durante 24 horas a 32°C. Para incrementar la eficiencia de la infección retroviral se utilizó *hexadimethrine bromide* (Sigma-Aldrich Química S.A., España) a una concentración de 10 mg/mL, que preparamos disolviendo 10 mg de este producto en 1 mL de agua y esterilizando esta solución haciéndola pasar por un filtro Millex de 0,22 μ m. A continuación, añadimos a un frasco 7 μ L de esta solución de *hexadimethrine bromide* por cada 10 mL de sobrenadante de las células Φ NX transfectadas.

Después recogimos el sobrenadante de las células Φ NX y lo filtramos para introducirlo en este mismo frasco, empleando un filtro de 0,45 μ m (Millipore, EEUU) para permitir el paso de los virus y evitar la contaminación con células Φ NX. A continuación desechamos el medio de las CMMs a inmortalizar y añadimos 2 mL de este sobrenadante de las células Φ NX filtrado con *hexadimethrine bromide* a cada pocillo. A continuación centrifugamos las placas a una velocidad de 700 g y a una temperatura de 32°C durante 45 minutos, y, por último las incubamos a 37°C en una estufa de cultivos.

Al día siguiente repetimos este procedimiento de infección retroviral, tras lo cual se incubaron las CMMs transfectadas a 37°C durante 48-72 horas antes de añadir el antibiótico de selección (puromicina (Fisher Scientific S.L., España) en el caso de la transfección con retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40 e higromicina (AMRESCO, EEUU) en el caso de la transfección con retrovirus portadores del plásmido pBABE-hTERT). Es importante permitir que las células se recuperen durante 48 horas a partir de la última transfección antes de añadir el antibiótico de selección (Freshney, 2010).

3. SELECCIÓN DE LAS CMMS-MO TRANSFORMADAS MEDIANTE SU MANTENIMIENTO EN UN MEDIO CON EL ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN.

Transcurridas 48-72 horas a partir de la última transfección con retrovirus se desechó el medio de las células transfectadas y se les añadió DMEM20 con puromicina 2,5 μ g/mL o

higromicina 100 µg/mL. Durante el proceso de selección, las CMMs sometidas a la transfección pero que no integren de forma estable en su genoma la secuencia de ADN con los genes destinados a su immortalización (SV40/hTERT) y el gen de resistencia al antibiótico de selección (puro/hygR) mueren en presencia del antibiótico de selección, mientras que las células con el constructo que contiene la secuencia codificante del gen de resistencia integrado de forma estable en su genoma pueden crecer en presencia de este antibiótico (Lanza *et al.*, 2013).

Las CMMs vivas permanecen adheridas a la placa, al contrario que las muertas, lo que permite la identificación y separación, de forma sencilla, de las células transformadas (Dominici *et al.*, 2006). A lo largo de varias semanas se mantuvieron estas células en un medio con el antibiótico de selección, realizando cambios de medio frecuentes para ir eliminando las células muertas no transformadas. Adicionalmente, en el tercer experimento de immortalización se obtuvieron varias fotos en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Europe B.V., Países Bajos) acoplado a una cámara digital. Cuando el cultivo alcanzó el 80-90% de confluencia se realizó un subcultivo de las células transformadas.

En el caso de los ensayos de immortalización con retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40, en la primera transfección intentamos mantener el cultivo transfectado con una mayor densidad de CMMs, correspondiente al pocillo en el que habíamos sembrado 100.000 células de partida. Cuando las células alcanzaron una confluencia adecuada se realizó un subcultivo a una placa de 100 mm. En la segunda transfección cuando las células de ambos pocillos (con 100.000 y 150.000 células de partida respectivamente) alcanzaron una confluencia adecuada se realizó un subcultivo de cada pocillo a dos pocillos de la misma placa. En la tercera transfección, cuando las CMMs del donante sano alcanzaron un nivel de confluencia del 60-70% se levantaron con tripsina, se reservaron la mitad de ellas para realizar una extracción de proteínas y se resembraron el resto en una placa de 60 mm.

4. OBTENCIÓN DE CLONES AISLADOS A PARTIR DE LAS CÉLULAS SELECCIONADAS EN EL MEDIO CON EL ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN.

Para el aislamiento de colonias existen varios métodos, de los cuales probamos la dilución límite y el aislamiento con cilindros. La técnica de la dilución límite se basa en el hecho de que las células diluidas por debajo de una cierta densidad forman colonias discretas. Este método se llevó a cabo en placas de 48 pocillos y, confirmando el origen clonal de cada

colonia en cada pocillo durante su formación, mediante la observación microscópica, tratamos de aislar diferentes colonias clónicas.

En cuanto al método del aislamiento con cilindros, se trata de sembrar las células a una baja densidad, de forma que se encuentren suficientemente separadas en la placa de cultivo para dar lugar a colonias aisladas. En este caso, después de confirmar el origen clonal de cada colonia en una placa de cultivo mediante observación microscópica, se intentó aislar cada una de las colonias seleccionadas utilizando cilindros de aislamiento y tripsinizando únicamente las células que se encontraran en el interior del cilindro. Después del aislamiento de las colonias se intentó proceder a la expansión de cada una de ellas en placa, ya que sería necesario mantener las colonias aisladas en un medio con el antibiótico de selección durante varios subcultivos antes de proceder a su caracterización (Freshney, 2010).

En el caso de las CMMs de la primera transfección, contaminadas con células Φ NX, intentamos el aislamiento con cilindros para rescatar colonias de CMMs aisladas. Mediante la observación microscópica se escogieron varias colonias de CMMs más o menos separadas de las células Φ NX y de un tamaño adecuado para su aislamiento con cilindros. Para aislar cada colonia se desechó el sobrenadante de las células, se realizaron dos lavados de placa con suero salino y se colocó el cilindro de aislamiento (Sigma-Aldrich Química S.A., España) sobre la colonia previamente identificada, empleando pinzas estériles. En el interior del cilindro se introdujeron 100 μ L de tripsina con EDTA, realizando una incubación de 2-3 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se observó si las células presentaban sus prolongaciones retraídas; en caso negativo se prolongó el tiempo de incubación con tripsina unos minutos más, y en caso afirmativo se inactivó la tripsina con 100 μ L de DMEM5 y se resuspendieron las células con una micropipeta sin tocar el cilindro. Estas células en suspensión se pasaron a un tubo tipo Falcon con 2-3 mililitros de DMEM5 y se centrifugaron a 430 g durante 10 minutos. Por último se resuspendieron las células DMEM20 con higromicina 100 μ g/mL y se sembraron en una placa adherente de 60 mm.

En el caso de las CMMs de la segunda transfección, decidimos criopreservar parte de las células para tener reserva y llevar a cabo diluciones límite en dos placas adherentes de 48 pocillos y aislamiento con cilindros en cuatro placas de 100 mm. De esta forma, levantamos las células de cada uno de los cuatro pocillos con tripsina con EDTA siguiendo el protocolo anteriormente descrito, congelamos las células de dos pocillos y utilizamos las de los otros dos pocillos para realizar el aislamiento. Para ello realizamos un contaje celular empleando

una cámara de Neubauer y llevamos a cabo los cálculos y las diluciones necesarias para sembrar 1 célula en cada pocillo en las placas de 48 pocillos y 100 células por placa en las placas de 100 mm. Las células restantes se resembraron en dos placas de 100 mm. A todas las células se les añadió DMEM20 con puromicina (2,5 µg/mL).

En las placas de 100 mm se identificaron las células aisladas rodeándolas con un rotulador en el fondo de la placa. También se identificaron, en las placas de 48 pocillos, los pocillos en los que se observó una única célula. Estas células aisladas se observaron al microscopio cada día para controlar su crecimiento y proceder al aislamiento con cilindros cuando la colonia alcanzara un tamaño adecuado. Al cabo de quince días decidimos repetir las siembras a baja densidad en 16 placas de 100 mm empleando las células que habíamos resembrado en el intento de aislamiento previo. Para ello levantamos las células con tripsina con EDTA siguiendo el protocolo anteriormente descrito, realizamos un contaje celular empleando una cámara de Neubauer y llevamos a cabo los cálculos y las diluciones necesarias para sembrar 100 células por placa en DMEM20 con puromicina (2,5 µg/mL). Las células restantes fueron resembradas en dos placas de 100 mm.

5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT.

Para la primera extracción de proteínas se utilizaron las dos placas de 100 mm con CMMs-MO de un paciente con artrosis transfectadas con el SV40 en pase S(3+3), un subcultivo de parte de estas células en pase S(3+4) en una placa de 60 mm, un cultivo en una placa de 60 mm a partir de las células criopreservadas en pase S(3+2) y un cultivo en una placa de 60 mm de células 3A6, una línea celular mesenquimal humana, como control negativo de inmortalización. Para la segunda extracción de proteínas se utilizaron la mitad de las CMMs-MO del donante sano transfectadas con el SV40 presentes en la placa de seis pocillos utilizada para la transfección en el momento de realizar el primer subcultivo, S(4+0), y un cultivo de CMMs sin transfectar del mismo donante en pase S5 una placa de 100 mm como control negativo de inmortalización.

Partiendo de cultivos a un 70-80% de confluencia, levantamos las células con tripsina con EDTA siguiendo el protocolo anteriormente descrito, realizamos dos lavados con suero salino y nos quedamos con el *pellet* celular seco en un tubo tipo eppendorf. A este *pellet* celular le añadimos, en función de su tamaño, 30-100 µL de un tampón de lisis que contiene Tris-HCl 0,2 M pH 6,8, un 2% de dodecil sulfato sódico (SDS) y un 20% de glicerol con fluoruro de

fenilmetilsulfonilo 0,1 M (PMSF) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich Química S.A., España) en proporción 1:100. A continuación se mezcló la muestra en un vórtex y se incubó a 100°C durante 5 minutos en un termobloque. Transcurrido este tiempo introducimos la muestra en hielo y realizamos una medida de la concentración de proteínas en un espectrofotómetro NanoDrop. Una vez cuantificada su concentración, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Para la separación de las proteínas presentes en los extractos proteicos realizamos una electroforesis en gel del poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, en presencia de SDS (SDS-PAGE). Para ello preparamos un gel separador al 10% de poliacrilamida, para lo que mezclamos (1) 1,998 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30% (Sigma-Aldrich Química S.A., España), (2) 2,784 mL de agua, (3) 1,128 mL de Tris-HCl 2 M pH 8,8, (4) 60 µL de SDS, (5) 7,2 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich Química S.A., España), el agente catalizador de la polimerización, y 15 µL de persulfato amónico (PSA) (Sigma-Aldrich Química S.A., España), el agente iniciador de la polimerización. Tras añadir el PSA al tubo mezclamos por inversión e introducimos la mezcla entre los cristales, previamente montados en el soporte electroforético. A continuación añadimos un poco de agua sobre esta mezcla, ya que el oxígeno inhibe la polimerización del gel.

Una vez polimerizado el gel concentrador entre los cristales, eliminamos el agua que habíamos echado sobre la mezcla y preparamos el gel concentrador con (1) 2,2 mL de agua, (2) 400 µL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, (3) 375 µL de Tris-HCl 2 M pH 6,8, (4) 60 µL de SDS, (5) 3 µL de TEMED y (6) 15 µL de PSA. Mezclamos por inversión, añadimos esta mezcla entre los cristales sobre el gel concentrador y colocamos un peine de diez pocillos. Una vez finalizada la polimerización del gel, sacamos los cristales del soporte y los introducimos en la cubeta de electroforesis, a la que añadimos tampón de electroforesis (Tris Base 0,025 mM, glicina 0,192 M y un 0,1% de SDS). Después sacamos el peine y limpiamos los pocillos con tampón de electroforesis empleando una micropipeta.

En cuanto a la preparación de las muestras, empleamos un tampón de carga al 5X con un 50% de glicerol; un 10% de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Química S.A., España), un agente reductor de los puentes disulfuro; un 10% de SDS, un agente desnaturizante; un 0,1% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich Química S.A., España) y Tris-HCl 0,2 M pH 6,8. Tras la primera extracción de proteínas decidimos cargar en el gel 6 µg de proteína de cada muestra, con 6 µL de tampón de carga, 1-24 µL de la muestra en función de su concentración y agua

para alcanzar un volumen final de 30 μ L. En el caso de las muestras de la segunda extracción de proteínas cargamos en el gel toda la muestra disponible. En ambos casos cargamos también un marcador de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Dual Color Standard*, Bio-Rad, EEUU). Antes de cargar las muestras en el gel, las desnaturalizamos a 100°C durante 5 minutos en un termobloque y las sometimos a una centrifugación breve en una microcentrífuga. La electroforesis se llevó a cabo con el equipo Mini-PROTEAN System (Bio-Rad, EEUU) con un voltaje de a 80 V los primeros 20-40 minutos y después a 120 V hasta el final de la electroforesis.

A continuación realizamos un *Western Blot* con un anticuerpo anti-SV40 LT de ratón (*Mouse Monoclonal Antibody SV40 T Ag (Pab 108)*, Santa Cruz Biotechnology) para comprobar que las células transfectadas estaban expresando el antígeno con el que se pretendía inmortalizarlas. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti- α -tubulina de ratón (*Monoclonal Anti- α Tubulin produced in mouse*, Sigma-Aldrich Química S.A., España). En ambos casos se utilizó como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (*ECL Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab (from sheep)*, GE Healthcare, Reino Unido).

Para realizar la transferencia a membrana, previamente cortamos una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, EEUU) de 8x7 cm y la activamos introduciéndola primero en metanol durante cinco minutos, a continuación en agua durante cinco minutos y finalmente otra vez en metanol durante 5 minutos, todo ello en agitación a 20-50 rpm. También cortamos dos filtros de papel Whatman (Sigma Aldrich Química S.A., España) del mismo tamaño, 8x7 cm, y preparamos tampón de transferencia con Tris Base 0,025 mM, glicina 0,192 M y un 10% de metanol y lo introducimos en dos cubetas limpias en las que colocamos los componentes del sándwich (papeles de filtro Whatman, gel de electroforesis y membrana de PVDF) para equilibrarlos a 4°C durante 15 minutos.

Una vez terminada la electroforesis, separamos el gel de los cristales empleando una espátula y lo lavamos con agua. Utilizando un bisturí eliminamos el gel concentrador y recortamos los bordes sin muestra del gel separador para utilizarlo en la transferencia semihúmeda a membrana. Esta transferencia se realizó a un voltaje de 20 V durante 50 minutos en un Trans-Blot (Bio-Rad, EEUU) en el que montamos los componentes del sándwich en el siguiente orden: (1) papel de filtro Whatman, (2) membrana de PVDF, (3) gel de electroforesis y (4) papel de filtro Whatman.

Al terminar la transferencia se realizó una tinción con Rojo Ponceau (*ATX Ponceau S red staining solution*, Sigma-Aldrich Química S.A., España) durante 1-3 minutos para comprobar que ésta se había realizado correctamente. Después de realizar un lavado suave con agua para ver con más claridad las bandas en la membrana, hicimos una muesca para identificar la parte superior y eliminamos la tinción haciendo un lavado con TTBS (*Tris-Buffered Saline with Tween*) en agitación (20-50 rpm). A continuación bloqueamos la membrana durante 60 minutos en agitación (20-50 rpm) con un tampón de bloqueo que se preparó disolviendo 2,5 gramos de leche en polvo (Sigma-Aldrich Química S.A., España) en 50 mL de TTBS. Transcurrido este tiempo realizamos un lavado suave de la membrana con TTBS.

Después realizamos una incubación de la membrana con una mezcla con 1/3 de tampón de bloqueo, 2/3 de TTBS y el anticuerpo primario anti- α -tubulina en dilución 1:1000 en una bolsa sellada. Esta incubación se realizó en rotación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente realizamos cuatro lavados de quince minutos de duración de la membrana con TTBS en agitación (20-50 rpm) y después realizamos la incubación de la membrana con una mezcla con 1/3 de tampón de bloqueo, 2/3 de TTBS y el anticuerpo secundario anti-ratón en dilución 1:2000 en una bolsa sellada. Esta incubación se realizó en rotación a temperatura ambiente durante una hora. Por último se realizaron otros cuatro lavados de 15 minutos de duración de la membrana con TTBS en agitación (20-50 rpm). Para visualizar el resultado se utilizó una cámara de revelado LAS-3000 (Fujifilm, Japón) empleando 500 μ L de luminol (*ECL Western Blotting Detection Reagent*, GE Healthcare, Reino Unido) y revelando la quimioluminiscencia con el software *Image Reader LAS-3000*.

Después de dejar la membrana en TTBS durante toda la noche y volver a bloquearla durante 30 minutos en agitación (20-50 rpm) con un tampón de bloqueo, realizamos un lavado de la misma con TTBS y procedimos a su incubación con una mezcla con 1/3 de tampón de bloqueo, 2/3 de TTBS y el anticuerpo primario anti-SV40 LT en dilución 1:1000 en una bolsa sellada. Esta incubación se realizó en rotación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente realizamos cuatro lavados de quince minutos de duración de la membrana con TTBS en agitación (20-50 rpm) y después realizamos la incubación de la membrana con una mezcla con 1/3 de tampón de bloqueo, 2/3 de TTBS y el anticuerpo secundario anti-ratón en dilución 1:2000 en una bolsa sellada. Esta incubación se realizó en rotación a temperatura ambiente durante una hora. Por último se realizaron otros cuatro lavados de 15 minutos de duración de la membrana con TTBS en agitación (20-50 rpm) y se utilizó para visualizar la cámara de revelado LAS-3000 siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

RESULTADOS

1. EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pBABE-SV40 Y pBABE-hTERT.

Al cuantificar la concentración de ADN plasmídico en el espectrofotómetro tras la amplificación y extracción de los plásmidos pBABE-SV40 y pBABE-hTERT para el primer experimento de immortalización se obtuvieron las siguientes concentraciones y ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, que se utilizan como indicadores de pureza (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones y ratios de absorbancia obtenidos en el primer experimento de immortalización.

| Muestra | Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | 260/280 | 260/230 |
|----------|------------------------------------|---------|---------|
| SV40 (1) | 263,3 | 1,35 | 0,47 |
| SV40 (2) | 292,7 | 1,36 | 0,50 |
| SV40 (3) | 212,2 | 1,42 | 0,51 |
| SV40 (4) | 378,6 | 1,59 | 0,78 |
| hTERT1 | 104,9 | 0,94 | 0,21 |
| hTERT2 | 143,2 | 1,01 | 0,25 |
| hTERT3 | 173,7 | 1,03 | 0,29 |
| hTERT4 | 137,8 | 0,98 | 0,24 |

En el segundo experimento de immortalización modificamos el protocolo de extracción, resuspendiendo los cuatro cultivos líquidos de cada clon de *E. coli* con el plásmido pBABE-SV40 o pBABE-hTERT empleados en el experimento anterior en el mismo tampón de resuspensión, para así realizar la extracción del ADN plasmídico de los cuatro cultivos en la misma columna de purificación y aumentar la concentración del ADN extraído, ya que necesitamos obtener un *stock* con una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para intentar aumentar la concentración también se modificó el volumen del tampón de elución, empleando $12 \mu\text{L}$ en lugar de 20 . Así se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones y ratios de absorbancia obtenidos en el segundo experimento de immortalización.

| Muestra | Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | 260/280 | 260/230 |
|---------|------------------------------------|---------|---------|
| hTERT | 330,5 | 1,34 | 0,51 |
| SV40 | 396,2 | 1,51 | 0,68 |

En el tercer experimento de immortalización, debido a los resultados obtenidos con el plásmido pBABE-hTERT, empleamos únicamente el plásmido pBEBE-SV40. Empleando el protocolo de purificación con las modificaciones comentadas anteriormente, realizando dos centrifugaciones después de la neutralización, antes de recoger el sobrenadante, y con un volumen de tampón de elución de 20 μ L se consiguió una concentración de 566 ng/ μ L con un ratio 260/208 de 1,56 y un ratio 260/230 de 0,87.

2. DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO pBABE-SV40 CON *EcoRI* y *NotI* Y VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO DE DIGESTIÓN EN UN GEL DE AGAROSA.

La visualización del producto de digestión del plásmido pBABE-SV40 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* en un gel de agarosa con *SYBR Safe* nos permitió comprobar la presencia del inserto en el plásmido pBABE-SV40 utilizado para la transfección de las células Φ NX y la producción de retrovirus por las mismas. En la foto del gel de agarosa (Figura 5) podemos observar (1) el control sin *NotI*, (2) el control sin *EcoRI*, los marcadores de pesos moleculares (3) XVII y (4) XIV de Roche y (5) el plásmido pBABE-SV40 digerido con *EcoRI* y *NotI*. De esta forma comprobamos que el inserto tenía un tamaño de unas 2.500-2.700 pares de bases que se aproxima al tamaño esperado, ya que la región codificante temprana del virus SV40 tiene una longitud de 2.472 pares de bases.

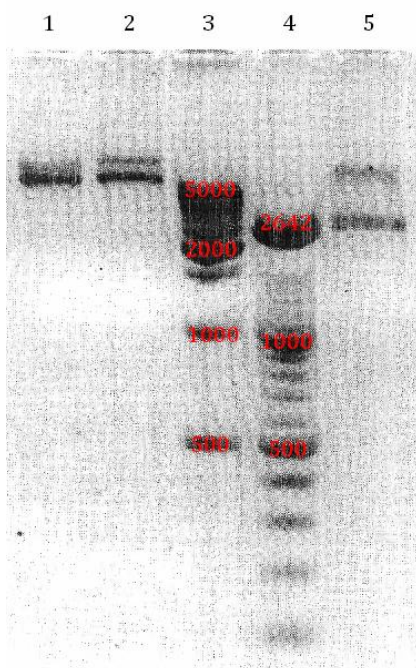


Figura 5. Gel de agarosa con los marcadores de pesos moleculares (3) XVII y (4) XIV de Roche, controles de digestión (1) sin *NotI*, y (2) sin *EcoRI*, y (5) el plásmido pBABE-SV40 digerido con *EcoRI* y *NotI*, que revela un inserto de unas 2.500 pares de bases.

3. TRANSFECCIÓN DE LAS CMMS CON LOS RETROVIRUS PRODUCIDOS Y SELECCIÓN DE LAS CMMS TRANSFORMADAS.

En el caso de los ensayos de immortalización con retrovirus portadores del plásmido pBABE-hTERT no se pudo realizar ningún subcultivo porque las CMMS no sobrevivieron en el antibiótico de selección tras la transfección. En el caso de los ensayos de immortalización con retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40, en la primera transfección, empleando las CMMS-MO del donante sano, tuvimos contaminación con células Φ NX. Pese a esta contaminación intentamos mantener el cultivo transfectado con una mayor densidad de CMMS y aislar colonias de estas células empleando el método de aislamiento con cilindros.

En la segunda transfección con retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40, las CMMS se mantuvieron durante dos meses en el antibiótico de selección, período durante el cual se realizaron varios subcultivos y varios intentos de aislamiento de clones. Sin embargo, transcurrido un mes a partir de la transfección, empezaron a observarse signos de hipertrofia en las CMMS además de una ralentización de su crecimiento cada vez más acusada hasta que, finalmente, una parte importante de la población entró en apoptosis. En este momento se decidió realizar una extracción de proteínas de la población remanente para comprobar mediante *Western Blot* si había expresión de SV40 LT y, por lo tanto, el protocolo de immortalización se había realizado correctamente.

En el tercer experimento de immortalización con retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40, cuatro días después de la última transfección y un día después de la adición del antibiótico de selección, se observó una menor densidad celular en los pocillos con CMMS transfectadas (Figuras 6c y 6g) que en los pocillos control (CMMS del donante sano y el paciente con artrosis no transfectadas pero mantenidas en un medio con el antibiótico de selección, puromicina) (Figura 6a), sobre todo en el caso del paciente con artrosis (Figura 6g).

Sin embargo, diez días después (once días después de la adición del antibiótico de selección), se observó que todas las CMMS de los pocillos control habían muerto, ya que no quedaba ninguna célula adherida a la placa ni en el caso del donante sano ni en el caso del paciente artrósico (Figura 6b). Por el contrario, las CMMS transfectadas sobrevivieron al antibiótico de selección, presentando las CMMS del donante sano una mayor densidad celular y una morfología con un citoplasma más irregular y con más prolongaciones citoplasmáticas (Figuras 6d-f) y las CMMS del paciente artrósico una menor densidad celular y una morfología más fibroblástica (Figuras 6h-j).

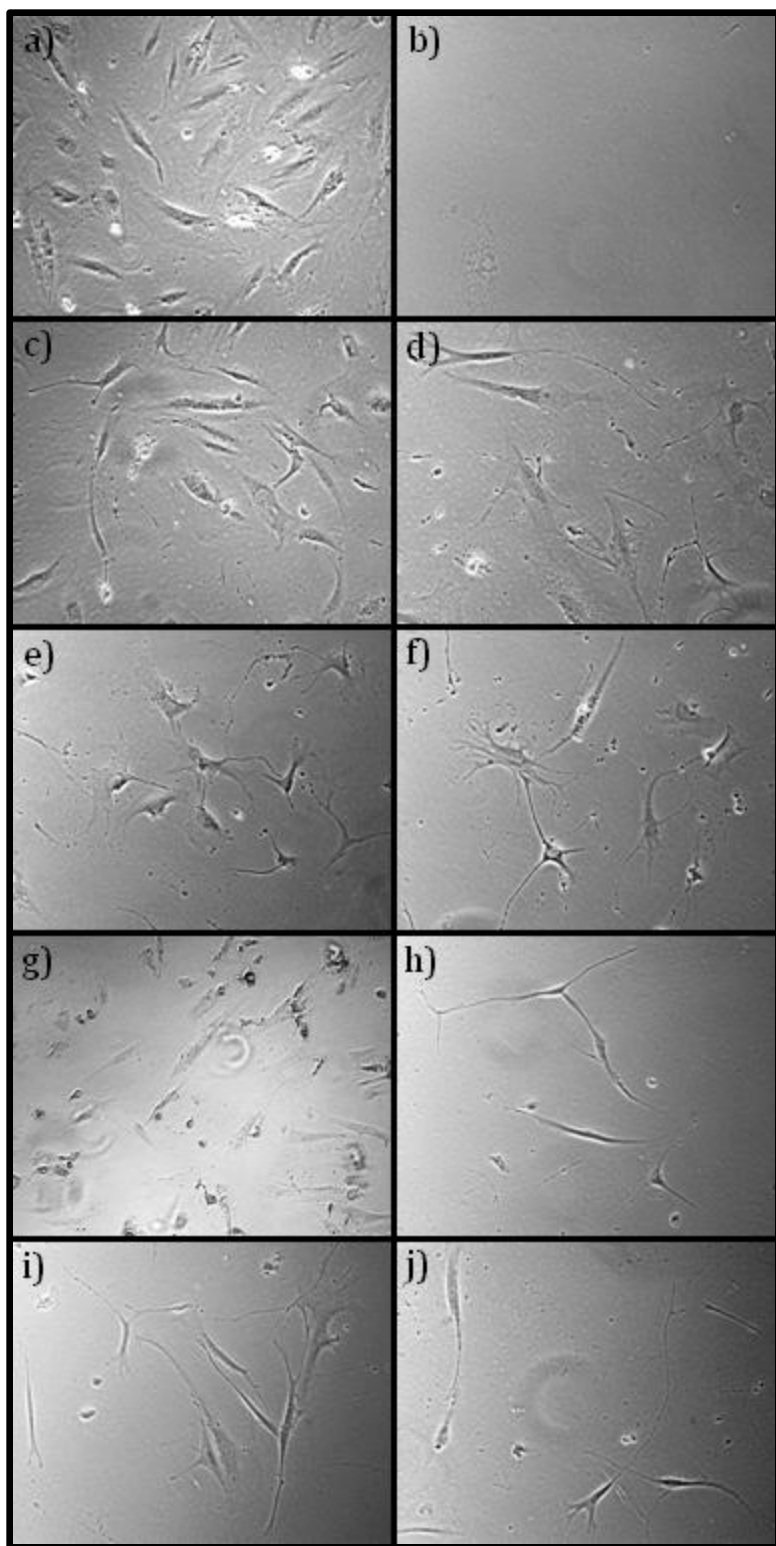


Figura 6. (a) CMMs-MO control, no transfectadas, a las 24 horas de la adición de puromicina; (b) CMMs-CMMs-MO control, no transfectadas, a los 11 días de la adición de puromicina; (c) CMMs-MO del donante sano transfectadas, 24 horas después de la adición de puromicina; (d,e,f) CMMs-MO del donante sano transfectadas, 11 días después de la adición de puromicina; (g) CMMs-MO del paciente con artrosis transfectadas, 24 horas después de la adición de puromicina; (h,i,j) CMMs-MO del paciente con artrosis transfectadas, 11 días después de la adición de puromicina.

A pesar de estos resultados, aproximadamente veinte días después de la adición del antibiótico de selección empezaron a observarse signos de hipertrofia en las CMMs, sobre todo en las procedentes del donante sano, y también empezó a reducirse la densidad celular, sobre todo en el caso de las procedentes del paciente con artrosis.

4. OBTENCIÓN DE CLONES AISLADOS A PARTIR DE LAS CÉLULAS SELECCIONADAS EN EL MEDIO CON EL ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN.

En el caso de las CMMs de la primera transfección, contaminadas con células Φ NX, intentamos el aislamiento con cilindros para rescatar colonias de CMMs aisladas. Aunque el procedimiento de aislamiento permitió evitar la contaminación con células Φ NX, tras su resiembra en una placa de 60 mm, las CMMs aisladas adquirieron un fenotipo hipertrófico, en la mayoría de los casos sin haber llegado a dividirse y en algunos casos después de haber llevado a cabo una única división, por lo que, transcurrido un mes sin cambios aparentes, todas las placas fueron desechadas.

En el caso de las CMMs de la segunda transfección con retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40, se llevaron a cabo diluciones límite en dos placas adherentes de 48 pocillos y aislamiento con cilindros en cuatro placas de 100 mm. Al cabo de dos días se observaron entre 4 y 12 células aisladas en cada placa de 100 mm. Sin embargo, al cabo de quince días no se observó crecimiento significativo de ninguna de las colonias, por lo que decidimos repetir las siembras a baja densidad en 16 placas de 100 mm. Transcurrido un mes a partir de estas segundas siembras a baja densidad siguió sin observarse crecimiento significativo de ninguna de las colonias identificadas, por lo que finalmente se desecharon todas las placas.

5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT.

Dada la ausencia de éxito en los intentos de aislamiento de clones en el segundo experimento de immortalización, para el *Western Blot* empleamos un *pool* de CMMs-MO transfectadas del paciente con artrosis sin aislar, ya que las células del donante sano estaban contaminadas con células Φ NX. Mediante esta técnica se evaluó la expresión del SV40 LT en el control de células 3A6, CMMs transfectadas en fase S(3+3) sembradas originalmente a una densidad de 150.000 células/pocillo, CMMs transfectadas en fase S(3+3) sembradas originalmente a una densidad de 100.000 células/pocillo, CMMs transfectadas en fase S(3+2) y CMMs transfectadas en fase S(3+4), empleando la expresión de la α -tubulina como control. En todas las células se detectó expresión de α -tubulina, pero en ninguna de ellas se detectó expresión de SV40 LT, a pesar de que las CMMs transfectadas sobrevivieron durante meses en un medio con el antibiótico de selección.

En el tercer experimento de immortalización, para evaluar la expresión del SV40 LT mediante *Western Blot* empleamos un *pool* de CMMs-MO transfectadas del donante sano en fase S(4+0), ya que el nivel de confluencia de las CMMs-MO transfectadas del paciente con artrosis no era adecuada para realizar una extracción proteica, y un cultivo de CMMs-MO no transfectadas del mismo donante en fase S5 como control. Así se obtuvieron los siguientes resultados en la tinción de Ponceau (Figura 7), que permitió comprobar la separación de los extractos proteicos en la SDS-PAGE y su transferencia a la membrana de PVDF; la detección de la α -tubulina (Figura 8a), que se expresa en todas las células; y la detección del SV40 LT (Figura 8b), que también da lugar a la aparición de bandas en todas las células.

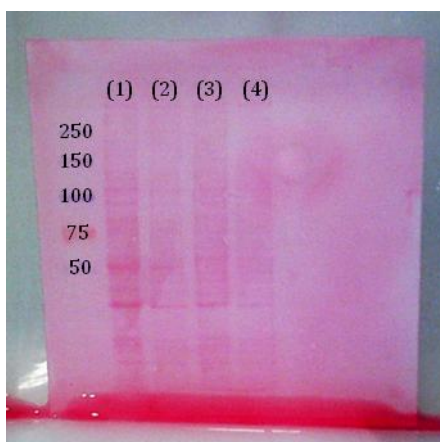


Figura 7. Tinción de Ponceau. Se aprecia la separación de los extractos proteicos en la SDS-PAGE y su transferencia a la membrana de PVDF. Los dos primeros pocillos (1 y 2) corresponden al extracto proteico de las CMMs-MO no transfectadas, empleadas como control negativo, y los dos últimos (3 y 4) al extracto proteico de las CMMs-MO transfectadas con la región codificante temprana del SV40.

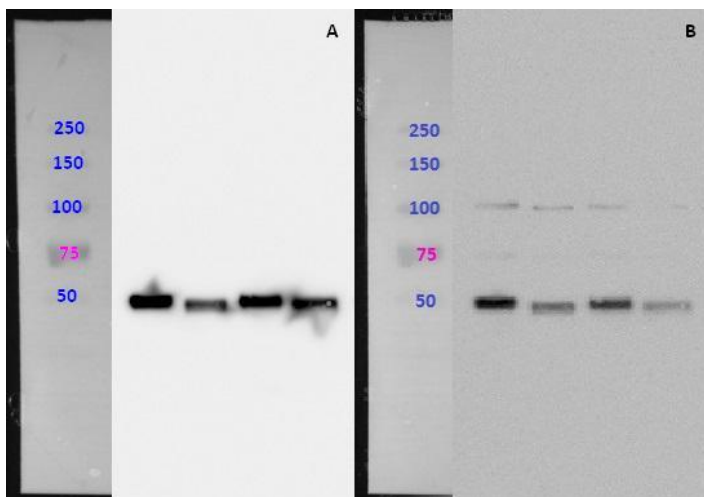


Figura 8. Fotos de la membrana que muestran las bandas obtenidas en el revelado con un anticuerpo anti-ratón tras la incubación con los anticuerpos anti- α -tubulina (a) y anti-SV40 LT (b). Los dos carriles de la derecha corresponden al control sin transfectar y los dos de la izquierda a las CMMs-MO transfectadas.

DISCUSIÓN

La immortalización de células humanas es un método ampliamente utilizado para obtener líneas celulares estables, capaces de mantener su fenotipo y de evitar la senescencia (Freshney,

2010). Las células inmortalizadas pueden expandirse en cultivo de forma ilimitada y, por su disponibilidad y homogeneidad, son más útiles que las células primarias para múltiples aplicaciones tanto en investigación como en clínica (Lipps *et al.*, 2013). Por sus características (alta capacidad de proliferación, multipotencia, inmunomodulación...) las CMMs son un tipo celular de mucho interés (Ullah *et al.*, 2015). Estas células se pueden emplear para la reparación de tejidos dañados en enfermedades crónicas, como la artrosis, con buenos resultados (Zhang *et al.*, 2016). Aunque estas células son fácilmente cultivables *in vitro*, en estas condiciones, al igual que todas las células humanas primarias, las CMMs acaban entrando en senescencia. Para superar esta limitación se han generado varias líneas celulares mesenquimales con capacidad de proliferación ilimitada (Tsai *et al.*, 2010).

Siguiendo esta línea, en este proyecto de investigación se pretendía la inmortalización de CMMs-MO de un paciente con artrosis y un donante sanos, con el objetivo de obtener líneas celulares útiles para el estudio de esta enfermedad de las articulaciones. La artrosis tiene una alta incidencia y un elevado impacto en la calidad de vida de los pacientes, pero, pese a ello, todavía no existe un tratamiento capaz de promover la regeneración del tejido dañado (Bomer *et al.*, 2015; Makris *et al.*, 2015). Para llevar a cabo la inmortalización de CMMs-MO, se generaron dos tipos de retrovirus con la región codificante temprana del SV40 y con la secuencia codificante de la hTERT, se transfectaron secuencialmente varios cultivos de CMMs-MO humanas procedentes de dos pacientes con artrosis y dos donantes sanos con los retrovirus generados y se evaluó el efecto de estas transfecciones en las CMMs-MO.

En cuanto a la generación de retrovirus, podemos decir que fue exitosa al emplear la secuencia codificante temprana del SV40, ya que las CMMs transfectadas con estos retrovirus sobrevivieron en el antibiótico de selección. Sin embargo, al emplear la secuencia codificante de la hTERT, las CMMs transfectadas con estos retrovirus no sobrevivieron en el antibiótico de selección. Esto ocurrió a pesar de que se utilizó el mismo protocolo para la extracción de los dos plásmidos y para la transfección de las células Φ NX productoras de retrovirus, y ambos plásmidos se utilizaron a una concentración similar en la transfección. Aunque el plásmido pBABE-hTERT es un poco más grande que el pBABE-SV40 ambos tienen un tamaño similar y, además, en el método de transfección utilizado, basado en lípidos catiónicos, no existe una limitación de tamaño para el ADN transfectado (Kim y Eberwine, 2010). Además, para compensar la baja eficiencia de este método de transfección (Kim y Eberwine, 2010) se emplearon células Φ NX, que se caracterizan por ser altamente transfectables por métodos basados en lípidos catiónicos, lo que permite aumentar la eficiencia de la

transfección más del 50% (Swift *et al.*, 2001).

No obstante, es importante señalar que en las extracciones plasmídicas hubo contaminación con solventes orgánicos, ya que, en la cuantificación espectrofotométrica del ADN, un ratio de absorbancia 260/280 menor que 1,8 indica contaminación con proteínas o solventes y un ratio de absorbancia 260/230 menor que 2 indica contaminación con solventes (Thermo Fisher Scientific - NanoDrop Products T042-Technical Bulletin). Por tanto, los ratios obtenidos pueden estar indicando la presencia de residuos de etanol del tampón de lavado utilizado para la extracción del ADN plasmídico. Además, estos ratios son peores en todos los casos para el plásmido pBABE-hTERT que para el plásmido pBABE-SV40. La presencia de etanol en la solución de ADN plasmídico puede afectar a la conformación y al grado de compactación del ADN superenrollado, y por lo tanto a su capacidad de formar complejos con el reactivo de transfección y a la eficiencia de este proceso (De La Vega *et al.*, 2013). Tampoco se consiguió la concentración de ADN plasmídico requerida para la transfección (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y esta concentración fue menor en las extracciones del plásmido pBABE-hTERT, lo que también pudo afectar a la eficiencia de la transfección (De La Vega *et al.*, 2013). A pesar de todo, los cambios introducidos en el protocolo de extracción de ADN plasmídico a lo largo de sucesivos experimentos fueron útiles para aumentar la concentración y también para mejorar los ratios de absorbancia, aunque en menor medida.

A la hora de llevar a cabo la transfección de las CMMs-MO con los retrovirus generados, durante los dos primeros experimentos de immortalización comprobamos que para alcanzar el nivel de confluencia adecuado para realizar la infección (70-80%), era más conveniente sembrar las células a una densidad de 100.000 células/pocillo que a 150.000 células/pocillo. Por ello, en el tercer experimento de immortalización, el día anterior a la transfección sembramos todas las células a esta densidad. Podemos decir que la transfección con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-hTERT no tuvo éxito, ya que las células no sobrevivieron en el antibiótico de selección. Sin embargo, la transfección con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40 permitió a las células sobrevivir en un medio con una concentración del antibiótico de selección capaz de matar CMMs-MO no transfectadas en un periodo de diez días, lo que indica el gen de resistencia a puomicina contenido en este plásmido comenzó a expresarse en las CMMs-MO transfectadas.

La immortalización de células humanas en cultivo depende de alteraciones funcionales en varios genes, incluyendo cambios en los genes involucrados en el mantenimiento de los

telómeros, el bloqueo de las rutas supresoras de tumores y la activación de oncogenes. Además, distintos tipos celulares presentan diferencias considerables en su susceptibilidad a la immortalización. Así, la transformación de CMMs en cultivo se puede conseguir mediante la co-expresión de MYC, RAS y hTERT combinada con pérdida de función de los supresores de tumores Rb, p53 y PTEN, pero también se puede lograr mediante la transfección de la secuencia codificante de la hTERT en solitario. Sin embargo, mientras que algunas CMMs transfectadas con el gen hTERT muestran fenotipos transformados, otras son resistentes a la immortalización (Takeuchi et al., 2015). Por lo tanto, la transfección con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-hTERT pudo fallar por distintos motivos, entre ellos, que la calidad o la cantidad de ADN plasmídico fuera insuficiente para realizar una transfección eficiente de las células ΦNX o que las CMMs empleadas en nuestros experimentos resultaran resistentes a la immortalización por hTERT.

Al nivel de este proyecto de investigación únicamente podemos evaluar el resultado de la transfección, pero no de la immortalización, ya que se define como inmortal aquella célula que ha sobrevivido al clonaje y que es capaz de crecer durante un mínimo de cien subcultivos después de la transfección (Freshney, 2010), lo que excedería con creces el límite de tiempo para este proyecto. No obstante, conseguir una transfección eficiente de las células es el primer requisito para lograr su immortalización, y por lo tanto se puede considerar una transfección eficiente como un buen resultado. Si evaluamos la eficacia de la transfección en las CMMs en función de la resistencia al antibiótico de selección, podemos decir que la transfección con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40 fue eficaz, ya que en los tres experimentos de immortalización se obtuvieron células capaces de sobrevivir en un medio con puromicina.

En todos los casos, las transfecciones seguidas de la adición del antibiótico de selección provocó una reducción importante en la densidad celular observable a las 24 horas de la adición de la puromicina. Esta disminución en el número de células puede deberse, por una parte, al estrés celular inducido por los procedimientos de transfección (Fischer-Kierzkowska et al., 2011) y, por otra parte, a la selección llevada a cabo por la puromicina en el medio de cultivo, que provoca la muerte de las células no transfectadas. El estrés celular inducido por las transfecciones puede explicar que 24 horas después de la adición de puromicina la densidad se hubiera reducido más en las células transfectadas que en las células control. A pesar de esto, a lo largo de los diez días siguientes la densidad celular en los cultivos control de CMMs-MO sin transfectar fue disminuyendo hasta que no quedó ninguna célula adherida a

la placa de cultivo. Simultáneamente, en los cultivos de CMMs-MO transfectadas la densidad celular se mantuvo y las células fueron adquiriendo una morfología más característica de las CMMs, fibroblástica, con un citoplasma abundante, un núcleo grande y numerosas prolongaciones citoplasmáticas (Li *et al.*, 2015), lo que indica que estas células expresaban el gen de resistencia a puromicina con el que habían sido transfectadas.

A pesar de la aparente eficiencia de la transfección, las CMMs-MO transfectadas con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40 no fueron capaces de proliferar después de su aislamiento en los dos primeros experimentos de transfección y en los tres experimentos empezaron a adquirir un fenotipo hipertrófico a los 20-30 días posteriores a la immortalización. Esta transformación tuvo lugar tanto después de haber sido sometidas a varios subcultivos como habiendo permanecido durante todo este tiempo en la misma placa y tanto en el caso de las CMMs-MO de los pacientes con artrosis como en el caso de las CMMs-MO del donante sano. La hipertrofia se define como una expansión del volumen de la célula que afecta a su función, ya que viene acompañada por diversos cambios intracelulares (Chen *et al.*, 2015).

A la vez que las CMMs transfectadas adquirían este fenotipo hipertrófico se reducía de forma importante su proliferación. Transcurridas 1-2 semanas se detectaron en estos cultivos fenómenos de apoptosis que afectaron de forma importante a las poblaciones celulares. Este decaimiento puede deberse a que las CMMs procedían de donantes de edad avanzada. Estas células se ven afectadas por el envejecimiento del organismo, lo que se detecta en indicios como el aumento del estrés oxidativo, el incremento en los niveles de proteínas como p53 y p21 y una cierta pérdida de funcionalidad (Stolzing *et al.*, 2008). En comparación con las CMMs procedentes de donantes jóvenes, las CMMs obtenidas de donantes de edad avanzada muestran una viabilidad reducida, una menor capacidad de diferenciación y tendencia a la senescencia, así como una capacidad de diferenciación reducida (Choudhery *et al.*, 2014). Es posible que la introducción de la región codificante temprana del SV40 no pudiera compensar esta tendencia a la senescencia de las CMMs envejecidas en nuestros experimentos.

Sin embargo, las CMMs que adquirieron el gen de resistencia a puromicina durante la transfección también debieron adquirir la secuencia codificante temprana del SV40, que incluye los antígenos LT, sT y T 17K, de los cuales el LT es el más importante para la immortalización. Sabiendo que las células transformadas con el SV40 siguen expresando el LT de forma estable durante muchas generaciones y que la integración del SV40 en las líneas celulares transformadas es tal que el promotor de la región codificante temprana y la

secuencia codificante del LT permanecen intactas (Pipas, 2009), esperábamos poder detectar la expresión del SV40 LT mediante *Western Blot*. Sin embargo, en el *Western Blot* realizado tras el segundo experimento de immortalización no detectamos expresión del SV40 LT, probablemente debido a errores en el procedimiento experimental (insuficiente cantidad de proteína extraída, insuficiente tiempo de exposición..).

Por el contrario, en el *Western blot* realizado tras el tercer experimento de immortalización, al revelar el resultado de la incubación con el anticuerpo anti-SV40 LT con un anticuerpo secundario anti-ratón se observan varias bandas de varios pesos moleculares diferentes, presentes por igual en las CMMs-MO transfectadas y en las CMMs-MO sin transfectar que se utilizaron como control (Figura 8). La más ligera de estas bandas, correspondiente a una proteína de unos 50 kDa, probablemente corresponde a la α -tubulina, ya que dos días antes se había realizado la incubación con un anticuerpo anti- α -tubulina de ratón. Los anticuerpos dirigidos contra la α -tubulina son altamente específicos y generan una señal intensa empleando tiempos cortos de exposición, por lo que al realizar una exposición larga es posible que obtuviéramos de nuevo señal generada por los anticuerpos anti- α -tubulina remanentes, pese a haber bloqueado y lavado nuevamente la membrana, al emplear para el revelado el mismo anticuerpo secundario.

Además de esta banda a 50 kDa se observa una banda a 100 kDa, que excede el peso molecular esperado, ya que, según la base de datos UniProt, el SV40 LT [UniProtKB - P03070 (LT_SV40)] tiene un peso molecular de 81,582 kDa. También se observa otra banda más tenue a 75 kDa. El anticuerpo anti-SV40 utilizado puede unirse al extremo N-terminal de los antígenos LT y sT del SV40 y del antígeno T del virus BK (Santa Cruz Biotechnology, SV40 T Ag Anticuerpo Pab 108 Datasheet). La presencia de estas bandas en los extractos proteicos tanto de las CMMs transfectadas como de las no transfectadas puede indicar que este anticuerpo presenta reactividad cruzada con alguna proteína propia de las CMMs que conste de algún dominio similar al dominio N-terminal de estos antígenos T (Crawford *et al.*, 1982) o incluso con alguna proteína del suero bovino fetal empleado en el medio de cultivo, ya que estas proteínas pueden quedar retenidas por las proteínas de superficie de las CMMs (Ullah *et al.*, 2015). También es posible que las CMMs transfectadas hubieran sido previamente infectadas por un virus con un antígeno similar al LT, como el virus BK, o por el propio SV40. De hecho, se ha detectado SV40 en muestras clínicas de CMMs con más frecuencia que otros poliomavirus (Comar *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

1. Se generaron retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40 mediante la transfección de células Φ NX con este plásmido. Sin embargo, empleando el mismo método, no se consiguió generar retrovirus portadores del plásmido pBABE-hTERT o estos no fueron efectivos en la transfección las CMMs-MO.
2. Se transfectaron CMMs-MO humanas, aisladas a partir de muestras de médula ósea de dos paciente con artrosis y dos donantes sanos, con los retrovirus generados.
3. La transfección con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-hTERT no fue efectiva ni en la transferencia de resistencia a higromicina a las células transfectadas ni en su immortalización. Por el contrario, la transfección con los retrovirus portadores del plásmido pBABE-SV40 fue efectiva en cuanto a la transferencia de resistencia a puomicina a las células transfectadas, pero hasta ahora no ha demostrado ser efectiva para evitar la senescencia de estas células en cultivo, es decir, para immortalizarlas y generar líneas celulares.

Este Trabajo de Fin de Máster ha sido dirigido por los doctores Silvia María Díaz Prado, en calidad de directora, e Isaac Manuel Fuentes Boquete, en calidad de co-director.

Alumna:

María Piñeiro Ramil

Directora:

Silvia María Díaz Prado

Co-director:

Isaac Manuel Fuentes Boquete

BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 2005; 24(52):7729-45.
- Alwin Prem Anand A, Gowri Sankar S, Kokila Vani V. Immortalization of neuronal progenitors using SV40 large T antigen and differentiation towards dopaminergic neurons. *J Cell Mol Med* 2012; 16(11):2592-610.
- An SY, Han J, Lim HJ, Park SY, Kim JH, Do BR, Kim JH. Valproic acid promotes differentiation of hepatocyte-like cells from whole human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 2014; 46(2):127-35.
- Arroyo JD, Hahn WC. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* 2005; 24(52):7746-55.
- Baghaban Eslaminejad M, Malakooty Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World J Stem Cells* 2014; 6(3):344-54.
- Bomer N, den Hollander W, Ramos YF, Meulenbelt I. Translating genomics into mechanisms of disease: Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2015; 29(6):683-91.
- Chen S, Fu P, Cong R, Wu H, Pei M. Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes Dis* 2015; 2(1):76-95.
- Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol* 2009; 19(4):218-28.
- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med* 2014; 12:8.
- Claus S, Mayer N, Aubert-Foucher E, Chajra H, Perrier-Groult E, Lafont J, Piperno M, Damour O, Mallein-Gerin F. Cartilage-characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(2):104-12.
- Comar M, Delbue S, Zanotta N, Valencic E, Piscianz E, Del Savio R, Tesser A, Tommasini A, Ferrante P. In vivo detection of polyomaviruses JCV and SV40 in mesenchymal stem cells from human umbilical cords. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(8):1347-9.
- Crawford L, Leppard K, Lane D, Harlow E. Cellular proteins reactive with monoclonal antibodies directed against simian virus 40 T-antigen. *J Virol* 1982; 42(2):612-20.
- Datta I, Mishra S, Mohanty L, Pulikkot S, Joshi PG. Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2011; 13(8):918-32.
- De La Vega J, Braak BT, Azzoni AR, Monteiro GA, Prazeres DM. Impact of plasmid quality on lipoplex-mediated transfection. *J Pharm Sci* 2013; 102(11):3932-41.
- Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013; 4:201.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-7.
- Estrada JC, Torres Y, Benguría A, Dopazo A, Roche E, Carrera-Quintanar L, Pérez RA, Enríquez JA, Torres R, Ramírez JC, Samper E, Bernad A. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis* 2013; 4:e691.
- Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-García V, Blanco FJ. Genetics in osteoarthritis. *Curr Genomics* 2008; 9(8):542-7.
- Fischer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarzab M, Lisowska KM, Krawczyk Z. Liposome-based DNA carriers may

induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol Biol* 2011; 12:27.

Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, Tenen A. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a review. *BMC Musculoskelet Disord* 2016; 17(1):230.

Freshney RI. *Transformation and Immortalization in Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Sixth Edition (Ed. Wiley-Blackwell) 2010; 279-97.

Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee TD, Forman SJ, Shih CC. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev* 2008; 17(6):1109-21.

Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, Ismail AM, Abou-El-Mahasen MA, Ashamallah SA, Khater SM, El-Halawani SM, Ibrahim RY, Uin GS, Kloc M, Calne RY, Ghoneim MA. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant* 2013; 22(1):133-45.

Garriga J, Jayaraman AL, Limón A, Jayadeva G, Sotillo E, Truongcao M, Patsialou A, Wadzinski BE, Graña X. A dynamic equilibrium between CDKs and PP2A modulates phosphorylation of pRB, p107 and p130. *Cell Cycle* 2004; 3(10):1320-30.

Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3(4):25.

Hung SC1, Yang DM, Chang CF, Lin RJ, Wang JS, Low-Tone Ho L, Yang WK. Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes. *Int J Cancer* 2004; 110(3):313-9.

Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397(8):3173-8.

Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(12):1623-37.

Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res* 2012; 347(3):613-27.

Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23(8):1233-41.

Li CY, Wu XY, Tong JB, Yang XX, Zhao JL, Zheng QF, Zhao GB, Ma ZJ. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6:55.

Li L, Willimsky G, Seitz S, Xu Y, Li Y, Schwarz LE, Schlag PM, Blankenstein T. SV40 large T antigen-transformed human primary normal and cancerous mammary epithelial cells are phenotypically similar but can be distinguished in 3D culture with selection medium. *Int J Cancer* 2008; 123(7):1516-25.

Lipps C, May T, Hauser H, Wirth D. Eternity and functionality - rational access to physiologically relevant cell lines. *Biol Chem* 2013; 394(12):1637-48.

Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(1):43-9.

Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11(1):21-34.

McCorry MC, Puetzer JL, Bonassar LJ. Characterization of mesenchymal stem cells and fibrochondrocytes in three-dimensional co-culture: analysis of cell shape, matrix production, and mechanical performance. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7:39.

Naghdhi M, Tiraihi T, Namin SA, Arabkheradmand J. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytotherapy* 2009; 11(2):137-52.

Pipas JM. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology* 2009; 384(2):294-303.

Stock P, Brückner S, Winkler S, Dollinger MM,

Christ B. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. *Int J Mol Sci* 2014; 15(4):7004-28.

Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 2008; 129(3):163-73.

Swift S, Lorens J, Achacoso P, Nolan GP. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol* 2001; 10:10.17C.

Takeuchi M, Higashino A, Takeuchi K, Hori Y, Koshiba-Takeuchi K, Makino H, Monobe Y, Kishida M, Adachi J, Takeuchi J, Tomonaga T, Umezawa A, Kameoka Y, Akagi K. Transcriptional Dynamics of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells during Transformation. *PLoS One* 2015; 10(5):e0126562.

Tsai CC, Chen CL, Liu HC, Lee YT, Wang HW, Hou LT, Hung SC. Overexpression of hTERT

increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *J Biomed Sci* 2010; 17:64.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep* 2015; 35(2). pii: e00191.

Yeager TR, Reddel RR. Constructing immortalized human cell lines. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10(5):465-9.

Zaika AI, Wei J, Noto JM, Peek RM. Microbial Regulation of p53 Tumor Suppressor. *PLoS Pathog* 2015; 11(9):e1005099.

Zalacain M, González A, Guerrero MC, Mattaliano RJ, Malpartida F, Jiménez A. Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygrosopicus*. *Nucleic Acids Res* 1986; 14(4):1565–1581.

Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Res* 2016; 4:15040.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación pudo llevarse a cabo gracias a los recursos del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y al apoyo del Grupo de Reumatología. Gracias al Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este proyecto, especialmente a la Dra. Silvia Díaz, por su orientación y por su dedicación constante, y al Dr. Isaac Fuentes; a Rocío Castro y Clara Sanjurjo, por dedicar su tiempo a enseñarme, a ayudarme y a resolver todas mis dudas; y a la Dra. Ángela Vela y la Dra. Tamara Hermida, por ayudarme con sus conocimientos y sus consejos. Gracias también al área de Cultivos Celulares de Reumatología, en especial a María José Sánchez, y al Grupo de Proteómica, en especial a la Dra. Lucía Lourido, por enseñarme las técnicas necesarias para llevar a cabo la última parte del trabajo.

ANEXO I - INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE.



INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

D. / Dña.:

INTRODUCCIÓN.-

Se le propone participar en un proyecto de investigación sobre enfermedades del aparato locomotor que será realizado por el Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo la dirección del Dr. Blanco.

Este proyecto será realizado en la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña.

OBJETIVO DEL PROYECTO.-

El objetivo de este estudio se centra en estudiar los mecanismos que participan en la patogénesis de las enfermedades del aparato locomotor.

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.-

Usted ha sido sometido a una intervención quirúrgica en la que se le han extraído tejidos articulares los cuales, siguiendo la normativa de eliminación de residuos biológicos, serán incinerados. Si usted decide participar en este estudio, sus tejidos, en lugar de ser eliminados, serán enviados a la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña para que se almacenen en el Banco de Muestras de dicho Hospital para, posteriormente, realizar los estudios de investigación encaminados a conocer mejor por qué se producen algunas enfermedades del aparato locomotor.

Así mismo se le solicita autorización para la extracción de saliva o 10ml de sangre, siendo extraída esta última siguiendo el procedimiento rutinario para efectuar análisis estándar de sangre.

RIESGOS.-

Usted no va a sufrir ningún tipo de inconveniente o riesgo físico adicional al de la propia intervención quirúrgica a la que se le ha sometido, por consentir la utilización de las muestras que se le han extraído durante la misma.

COMPENSACIÓN.-

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación, independientemente de que los resultados de los estudios que se van a realizar puedan dar lugar a patentes con fines médicos.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información que se obtenga de analizar su muestra, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en las investigaciones futuras, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra de sangre no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el mismo momento de la extracción con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en las bases de datos donde figure la información clínica o genética referida a usted. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del equipo investigador, adoptándose las medidas necesarias para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de su muestra de sangre permanezca confidencial.

Es importante que entienda que existe la posibilidad de que sus datos y parte de su muestra sean transferidos a otros equipos de investigación que trabajen en el mismo campo. En tal caso, se asegurará que estos datos sean tratados con la misma confidencialidad descrita anteriormente.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en el proyecto, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.-

Como ya se ha descrito, se adoptarán estrictas medidas de seguridad para garantizar la confidencialidad de los resultados de los estudios realizados.

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se hayan completado los proyectos de investigación.

Usted debe saber que, en cumplimiento de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, se podrá informar a los afectados o a sus representantes legales.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA.-

Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria.

Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.

Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos.

Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida y sólo se guardará la información obtenida hasta ese momento.

Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL.-

Usted puede contactar con cualquier miembro del Servicio de Reumatología del C.H.U. A Coruña si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente, en el teléfono 981176399.

En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

ANEXO II - CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Yo, _____(nombre del paciente),

He leído la información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado de ello con _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

| FIRMA DEL PACIENTE | Nombre | Fecha |
|---------------------------|---------------|--------------|
|---------------------------|---------------|--------------|

He explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al donante y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

| FIRMA | Nombre | Fecha |
|--------------|---------------|--------------|
|--------------|---------------|--------------|

ANEXO III - CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ACOMPAÑANTE.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ACOMPAÑANTE

Yo, _____(nombre del acompañante del paciente), con
DNI:_____ y en calidad de _____(parentesco con el
donante) certifico que a _____(nombre del paciente)

Se le ha leído la información establecida en este escrito.

Se le ha entregado copia de esta información.

Ha podido hacer preguntas sobre el proyecto.

Ha recibido suficiente información sobre el mismo.

Hemos hablado de ello con_____

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirar su consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presta libremente su conformidad para participar en el proyecto.

Me autoriza a firmar en su nombre.

FIRMA DEL ACOMPAÑANTE DEL PACIENTE

Nombre

Fecha

He explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al donante y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

FIRMA

Nombre

Fecha