

2012 Noviembre, 3(2): 1-2

Estudios de la transferencia génica en células del tejido nervioso por medio de vectores adenovirales asistidos por fuerzas magnéticas

Autores: Joaquín Pardo, Gustavo R. Morel, Gloria M. Cónsole, Rodolfo G. Goya, Paula C. Reggiani.

Lugar de Trabajo: Cátedra de Histología B-INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

E-mail de contacto: joaquin_p88@hotmail.com; paulareggiani@yahoo.com.ar

Introducción

Estamos interesados en desarrollar herramientas biotecnológicas destinadas a una futura prevención y tratamiento de los cambios degradativos normales o patológicos que ocurren en el cerebro durante el envejecimiento, como la pérdida de neuronas dopaminérgicas y colinérgicas, cuyo reflejo clínico son las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Se desea desarrollar estrategias terapéuticas que mimeticen los mecanismos neuroprotectores fisiológicos. Dichas estrategias se basan en la transferencia en distintas regiones del cerebro de la rata senil de genes para moléculas neurotróficas que participen en dichos mecanismos naturales de neuroprotección. La alta invasividad que conlleva la inyección directa de vectores terapéuticos en el SNC puede evitarse con la asociación de la transferencia génica con la nanotecnología, combinando la Magnetic Drug Targeting con la magnetofección. Específicamente, nanopartículas magnéticas (MNP) se asocian con vectores adenovirales recombinantes (RAd) formando complejos adenovirales magnéticos (cAdM), que son concentrados en regiones precisas del organismo por medio de campos magnéticos externos. Se propuso entonces estudiar esta técnica en células del tejido nervioso *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos

- 1) Establecer *in vitro* la relación óptima de MNP por partícula viral física (PVP) utilizando cAdM.
- 2) Evaluar la eficiencia de la magnetofección en el parénquima cerebral de la rata.

Materiales y Métodos

Complejos adenovirales magnéticos:

Los cAdM fueron generados mezclando diferentes proporciones de MNPs y adenovector, expresado como fg de Fe por partícula viral física (PVP). Se utilizaron dos RAds: el RAd-GFP y el RAd-DsRed, que expresan la proteína fluorescente verde y roja, respectivamente. Se utilizó una MNP recubierta con polietilenimina, nombrada PEI-Mag2.

Estudios *in vitro*

Se utilizaron células gliales B92 incubadas en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos hasta una confluencia del 80% en medio MEM conteniendo 10% de suero fetal bovino y antibióticos-antimicóticos. Los cultivos se incubaron durante 30 minutos con los cAdMs (relación de 12,5 a 0,01 fg Fe/PVP). Después se sometieron los cultivos durante 30 min a un campo magnético de 2-2.4 T con una placa magnética comercial (Oz Biosciences). Luego de 48 hs, se observó y fotografió la expresión de GFP y DsRed en las monocapas celulares con un microscopio de fluorescencia invertido. Además, se cuantificó por espectrofluorimetría la intensidad de fluorescencia en los lisados celulares correspondientes para determinar la relación MNP/RAd óptima.

Estudios *in vivo*:

Se utilizaron ratas machos Sprague Dawley, las cuales fueron anestesiadas y posicionadas en un aparato estereotáxico. Se inyectó unilateralmente en el hipocampo (-3,8 AP; -2 L; -2,4 V, según el bregma) 20 µl de una suspensión de cAdM: PEI-Mag2/RAd-GFP, en dos relaciones (1,8 y 0,45 fg Fe/PVF). Inmediatamente después, se apoyó un imán cilíndrico sobre el punto de inyección durante 30 min. Dos días después, los animales se perfundieron por vía intracardíaca con PBS-4% paraformaldehído. El cerebro fue cuidadosamente disecado y cortado con un vibrátomo. Se realizaron cortes coronales seriados de 30 µm de espesor, los cuales se montaron en portaobjetos con Fluoromount G. Se observó y fotografió la fluorescencia de GFP con un microscopio de fluorescencia.

Resultados

Estudios *in vitro*: Utilizando una concentración de adenovector subóptima de 3,3x10⁷ PFU/ml (3,7x10⁹ PVP/ml) para 3x10⁵ células B92/ml por pocillo se observa que a la relación de 0,5 fg

2012 Noviembre, 3(2): 1-2

Fe/PVP (PEI-Mag2/RAd-GFP) se amplifica 7 veces la transferencia génica respecto al virus desnudo, magnitud que se mantiene constante a relaciones MNP/RAd mayores. Resultados equivalentes se obtuvieron con los cAdM PEI-Mag2/RAd-DsRed.

Estudio *in vivo*: Cualitativamente se observó una mayor expresión de GFP en el hipocampo de los animales inyectados con los cAdM, a las dos relaciones usadas, respecto de los animales que recibieron el virus desnudo.

Conclusión

De los datos aquí presentados concluimos que nuestros vectores adenovirales muestran una marcada mejora en su performance *in vitro* cuando se los utiliza complejados con PEI-Mag2. Los resultados de los estudios en el parénquima cerebral son alentadores, pues sugieren una mejora de la performance de la transferencia génica en el hipocampo de las ratas cuando estas son tratadas con los cAdM + imán. No obstante, estos resultados son preliminares y restan realizar más experimentos que confirmen la eficiencia de la implementación de magnetofección en el cerebro.