

2012 Noviembre, 3(2): 1-2

TRANSFERENCIA GENICA ASISTIDA POR MAGNETOVECTORES EN MUSCULO ESQUELETICO

Autores **Andrea Soledad Pereyra MD¹**, **Gustavo Morel PhD¹**, **Olga Mykhaylyk PhD²**, **Claudia Hereñú PhD¹**

Lugar de Trabajo: ¹ Instituto de Investigaciones Bioquímicas La Plata-CONICET, Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Argentina; ² Institute of Experimental Oncology and Therapy Research, Technical University of Munich, Munich, Germany.

E-mail de contacto: andrapereyra@gmail.com

Introducción

La asociación entre vectores virales y nanotecnología ha posibilitado el desarrollo de nuevas y más eficientes estrategias de transferencia génica que se posicionan como valiosas e innovadoras herramientas para el estudio de procesos fisiológicos y fisiopatológicos como así también en la intervención terapéutica. Los sistemas de *transferencia asistida por magnetismo* combinan los principios de modernas tecnologías sustentadas en el uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) y cuyo objetivo principal es dirigir y concentrar moléculas terapéuticas complejadas con elementos magnéticamente activos en sitios diana de tejidos o sistemas utilizando un campo magnético. La *Magnetofección* incorpora a la metodología previamente descrita un sistema viral o no viral que actúa como vector para el gen de interés. En el marco de nuestra línea de investigación el desarrollo de herramientas confiables para la manipulación experimental de la expresión génica en las células maduras del musculo esquelético es determinante. Aunque las células musculares esqueléticas pueden ser receptivas a sistemas convencionales de transfección *in vitro* e *in vivo* ninguno de ellos presenta el potencial demostrado por los vectores virales en lo que respecta a la transferencia génica. Sin embargo, y a pesar que los mioblastos inmaduros son perfectamente abordados por las mencionadas estrategias, los miotúbulos multinucleados maduros son mayormente refractarios y el uso alternativo de vectores virales ofrece una relativa baja eficiencia.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo es determinar si la magnetofección puede constituir una alternativa eficiente para la transferencia génica *in vitro* e *in vivo* en células maduras del musculo esquelético.

Materiales y Métodos

Los experimentos de *magnetofección in vitro* fueron realizados en la línea celular estable derivada de musculo esquelético C2C12, tanto en su forma inmadura (mioblastos) como madura (miotúbulos). Los vectores virales utilizados, RAd-GFP y RAd-DHPRBeta1a-EYFP fueron construidos previamente en nuestro laboratorio utilizando el método de los dos plásmidos. Las formulaciones de NPMs ensayadas fueron PEI-Mag2 y Atto550-PEI-Mag2 que se encuentra conjugada con un tinte fluorescente rojo. La relación elegida de *fgFe de NPM/Partícula Física Viral* fue de 2,5 teniendo en cuenta referencias bibliográficas. Luego de la incorporación de las distintas combinaciones a los cultivos celulares estos fueron expuestos a un campo magnético de 300 mT. La eficacia de la transducción fue evaluada 48 hs después mediante observación directa y cuantificación de la fluorescencia en un lector de microplacas. Para los *ensayos in vivo* se utilizaron ratones machos adultos (22 semanas) de la cepa C57BL/6. Las intervenciones se realizaron en el musculo Soleo derecho e izquierdo de cada animal. En ellos se inyectaron 10^7 pfu de RAd-GFP y 10^7 pfu RAd-GFP+Atto550-PEI-Mag2 respectivamente. La relación *fgFe/PV* ensayada en este caso fue de 4. El miembro trasero izquierdo fue inmediatamente expuesto a un campo magnético externo durante 30 minutos. La expresión de GFP fue evaluada 6 días post inyección mediante microscopia de fluorescencia.

Resultados

Los experimentos de *magnetofección in vitro* fueron realizados en la línea celular estable derivada de musculo esquelético C2C12, tanto en su forma inmadura (mioblastos) como madura

2012 Noviembre, 3(2): 1-2

(miotúbulos). Los vectores virales utilizados, RAd-GFP y RAd-DHPRBeta1a-EYFP fueron contruidos previamente en nuestro laboratorio utilizando el método de los dos plásmidos. Las formulaciones de NPMs ensayadas fueron PEI-Mag2 y Atto550-PEI-Mag2 que se encuentra conjugada con un tinte fluorescente rojo. La relación elegida de *fgFe de NPM/Partícula Física Viral* fue de 2,5 teniendo en cuenta referencias bibliográficas. Luego de la incorporación de las distintas combinaciones a los cultivos celulares estos fueron expuestos a un campo magnético de 300 mT. La eficacia de la transducción fue evaluada 48 hs después mediante observación directa y cuantificación de la fluorescencia en un lector de microplacas. Para los *ensayos in vivo* se utilizaron ratones machos adultos (22 semanas) de la cepa C57BL/6. Las intervenciones se realizaron en el musculo Soleo derecho e izquierdo de cada animal. En ellos se inyectaron 10^7 pfu de RAd-GFP y 10^7 pfu RAd-GFP+Atto550-PEI-Mag2 respectivamente. La relación *fgFe/PV* ensayada en este caso fue de 4. El miembro trasero izquierdo fue inmediatamente expuesto a un campo magnético externo durante 30 minutos. La expresión de GFP fue evaluada 6 días post inyección mediante microscopia de fluorescencia.

Conclusión

Las células musculares esqueléticas se convierten en estructuras postmitóticas durante estadios tempranos de su desarrollo y por tanto el músculo maduro normal no presenta células en división activa. Esta condición de tejido estático puede presentarse, en algunas situaciones, como una limitante para su manipulación experimental. A pesar que los Vectores Adenovirales Recombinantes (RAds) sostienen una posición jerárquica dentro de las herramientas de transferencia y terapia génica, la reducida transducibilidad de las fibras musculares maduras relacionada con la baja expresión del receptor viral de superficie CAR representa una de las mayores dificultades a sortear. Aquí la Magnetofección se presenta como una importante alternativa ya que la endocitosis de los RAds se produciría mediante un mecanismo CAR-independiente. Los resultados expuestos en el presente trabajo demuestran, mediante la visualización y cuantificación de la Green Fluorescent Protein (GFP) codificada en el genoma viral, que el uso de Nanopartículas Magnéticas asociadas a los vectores virales aumenta significativamente la transducibilidad de los mioblastos y miotúbulos de la línea celular C2C12 bajo la influencia de un campo magnético. De las imágenes obtenidas en el musculo esquelético de ratones adultos podría inferirse, de manera preliminar, la capacidad de estos magnetoadenovectores para abordar las miofibras maduras en contraste con los RAds no complejados con NPMs.

Por lo tanto, el presente trabajo valida el uso de magnetovectores virales como una eficiente herramienta para la transferencia génica magnéticamente asistida en células maduras derivadas del musculo esquelético.