

2010 Diciembre, 2(2): 1-2

CONSTRUCCIÓN DE ADENOVECTORES Y MAGNETOADENOVECTORES PARA APLICACIONES DE TERAPIA GÉNICA EN EL MIOCARDIO SENIL

De Luca Y^{1,2}, Pereyra A¹, Goya R¹, Delbono O³, Mattiazzi A², Hereñú C¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata-INIBIOLP CONICET- Cát. Histología B, Fac. Cs. Médicas, UNLP. ²Centro de Investigaciones Cardiovasculares-CIC CONICET- Fac. Cs. Médicas, UNLP. ³Wake Forest University, School of Medicine, NC, USA.

e-mail: yanu.deluk@hotmail.com

Introducción

El factor de crecimiento insulino-simil (IGF-I) es un polipéptido de 72 kDa (70 aa), que se produce en el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento. Diversos trabajos han demostrado su acción cardioprotectora. Estudios previos de terapia génica con un vector adenoviral recombinante replicación defectivo portador del cDNA del IGF-I se han llevado a cabo con éxito en ratas con deterioro de la síntesis dopaminérgica neuronal. La construcción de un nuevo sistema adenoviral bidireccional regulable que exprese simultáneamente IGF-I y un gen reportero para la proteína fluorescente verde (GFP) daría idea del éxito y eficiencia de la transfección y permitiría la manipulación de la expresión de nuestro factor de interés. Por otro lado, la asociación de los adenovirus con nanopartículas magnéticas (MNP) ofrece la posibilidad de desarrollar estrategias de terapia génica mínimamente invasivas y de alta eficiencia de infección. Esta estrategia combina dos modernas tecnologías basadas en la utilización de MNP: Magnetic Drug Targeting y magnetofección, con el objetivo de concentrar complejos terapéuticos en áreas de interés del organismo utilizando campos magnéticos apropiados.

Objetivo

1) Construir un vector bidireccional que permita la coexpresión regulada del gen de IGF-I y GFP, ambos bajo el control de un promotor inducible por doxiciplina. Dicho vector constituirá la unidad funcional de expresión del adenovirus a construirse en pasos futuros. 2) Construir magnetoadenovectores a partir del complejamiento de MNP con nuestro adenovirus control que expresa GFP (RAd-GFP) y realizar experimentos de magnetofección in-vitro.

Materiales y métodos

Para la construcción de los adenovirus de expresión, se utilizará la variante del método de los dos plásmidos. En dicho sistema, el plásmido shuttle (portador del cDNA de interés) es cotransfectado con el plásmido genómico en células de riñón de embrión humano (HEK-293). Dentro de la célula, la FLP recombinasa es expresada, reconoce los sitios frt mediando la recombinación entre ambos plásmidos. La línea celular HEK, expresa constitutivamente la proteína E1a necesaria para que el adenovector pueda completar su ciclo replicativo, obteniéndose el stock adenoviral. Nos focalizaremos en la construcción del vector plasmídico shuttle (pDC516-GFP-TRE-IGF-I bidir). Con la finalidad de realizar los experimentos iniciales in-vitro con los magnetoadenovectores el RAd-GFP fue complejado a tres formulaciones de MNP (AdenoMag, SO-Mag 6-65 y PEI-Mag2). El complejo así generado fue adicionado a células N2a neuronales, B92 gliales, HEK293 de riñón de embrión humano y c2c12 (musculares esqueléticas) las cuales fueron expuestas a un campo magnético (conjunto de imanes permanentes de NdFeB dispuestos antiparalelos en forma alternada). Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y fueron fotografiados diariamente en un microscopio invertido de fluorescencia.

Resultados

Construcción del vector plasmídico pDC516-GFP-TRE-IGF-I bidir: Como material de partida para la obtención del cDNA de IGF-I se utilizó el plásmido pDC515-IGF-I. El fragmento IGF-I se liberó por digestión del plásmido con las enzimas de restricción (ER) NheI (5') y Sall (3'). El inserto se clonó en el vector pDC516-GFP-TRE-FTS, un vector de expresión bidireccional que posee el elemento regulable TRE flanqueado por dos promotores mínimos del citomegalovirus humano (PminhCMV). El pDC516-GFP-TRE-FTS se escindió con las ER SpeI (5') y XhoI (3'). Los extremos XhoI del pDC516-GFP-TRE-FTS y Sall del

2010 Diciembre, 2(2): 2-2

pDC515-IGF-I se convirtieron a extremos romos. Como las enzimas NheI y SpeI poseen extremos compatibles se ligó (vector-inserto) obteniéndose el plásmido pDC516-GFP-TRE-FTS-IGF-I. Por último, se extrajo el FTS con MluI (5') y XhoI (3') y luego se recircularizó. De esta manera se obtuvo el plásmido final pDC516-GFP-TRE-IGF-I donde el IGF-I y GFP quedan bajo el mando del promotor bidireccional regulable. Magnetofección en cultivos celulares con complejos MNP-Adenovirus: En las fotografías de los cultivos celulares en el microscopio invertido de fluorescencia resultó evidente que las células incubadas con el complejo magnético RAd-MNP fueron transducidas en mayor número.

Conclusiones

Se ha logrado construir exitosamente el shuttle que permitirá la construcción del sistema adenoviral bidireccional regulable. Con respecto a la magnetofección, en todos los casos los complejos magnéticos RAd/MNP mostraron una eficiencia de transducción mayor que la del adenovector por sí solo. Prevemos que la transferencia in vivo de genes terapéuticos al miocardio, podría optimizarse significativamente a través del atrapamiento, mediado por un campo magnético externo, de adenovectores magnéticos concentrados en el/los puntos deseados.