

ONDAS DE CHOQUE PARA LA TRANSFECCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS

Bernardette San Román, Francisco Fernández, Achim M. Loske, Luz M. López-Marín
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla No. 3001, Querétaro, Qro., C.P. 76230, México, sanromanb@comunidad.unam.mx

Palabras clave: Ondas de choque, transfección, monocitos

Introducción. Uno de los pilares para el desarrollo de terapias celulares y génicas es la transfección celular, la cual consiste en introducir material genético al interior de una célula eucariota, con el propósito de inducir o regular la expresión de un producto génico (1). Los monocitos y macrófagos son células que participan en la respuesta inmunitaria y han sido objeto de múltiples estudios de terapia celular; sin embargo, su modificación a través de métodos no virales ha mostrado eficiencias bajas (2). Una alternativa es la aplicación de ondas de choque (OCH), ya que estudios anteriores demuestran que se pueden usar OCH como un método físico de transfección, que permeabiliza transitoriamente la membrana plasmática por la cavitación acústica generada, debido a las variaciones de presión. Además, su uso se ha asociado a una baja citotoxicidad (3). El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de las ondas de choque para transfectar monocitos humanos, y evaluar la expresión del transgén en células que se han diferenciado a macrófagos.

Metodología. Se utilizó la línea de monocitos humanos THP-1 y el plásmido reportero *pCX::GFP-GPI2*, que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) con anclaje a la membrana celular. Las OCH fueron generadas por un equipo de tipo piezoeléctrico, Piezoson100 Plus (Richard Wolf, Knittlingen, Alemania), ajustado para producir ondas de choque con una presión máxima del pulso positivo de 18.1 MPa. Se aplicaron 0, 32, 64 y 128 OCH. El análisis de la integridad del plásmido se realizó mediante un gel de agarosa al 1%, utilizando un control tratado por sonicación. Se evaluó la viabilidad celular y la eficiencia de transfección de los distintos tratamientos de OCH mediante citometría de flujo y microscopía confocal, respectivamente.

Resultados. Bajo las condiciones utilizadas para la permeabilización de membranas celulares, las OCH no degradaron el plásmido (Fig. 1B).

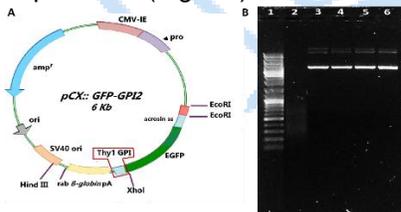


Fig. 1. Análisis de la integridad del plásmido. A) Mapa del plásmido *pCX::GFP-GPI2*. B) Electroforesis en gel de agarosa 1% (1) estándar de tallas moleculares, (2) plásmido sometido a sonicación, (3-6) plásmidos 0, 32, 64, 128 OCH, respectivamente.

Al analizar la supervivencia de células THP-1 tratadas bajo distintas condiciones de ondas de choque, se observó que la mortalidad celular incrementó proporcionalmente al número de OCH. Esto se evaluó por conteo en cámara de

Neubauer (Fig. 2A) y por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio (PI) (Fig. 2B), observando muerte celular en porcentajes del 1 al 18% (Fig. 2C).

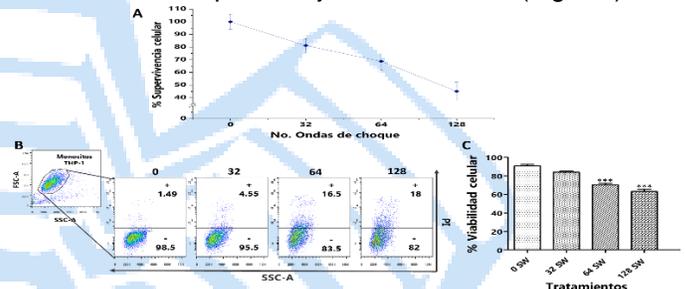


Fig. 2. Viabilidad celular de monocitos THP-1 A) Supervivencia celular. B) Media del no. células viables tinción PI ± SEM y ANOVA 1-way $p < 0.05$. C) SSC-A vs PI población de monocitos THP-1.

Las células THP-1 no sufrieron transfección mediante tratamiento con lipofectamina (resultados no mostrados), pero sí expresaron GFP en la membrana plasmática luego de tratamientos con 32, 64 y 128 OCH (Fig. 3).

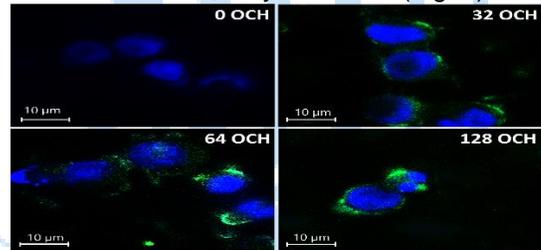


Fig. 3. Análisis por microscopía confocal de la expresión de GFP en monocitos humanos THP-1 transfectados con OCH.

Conclusiones. Las células THP-1 pueden ser genéticamente modificadas mediante ondas de choque, bajo condiciones que no afectan significativamente la viabilidad celular. Quedan por optimizarse las condiciones de tratamiento, así como explorar la expresión del transgén en células diferenciadas a macrófagos.

Agradecimiento. Este trabajo fue apoyado por el CONACYT y la DGAPA-UNAM (proyectos CF2019-53395 y PAPIIT IT200421, respectivamente). Forma parte de la tesis de maestría de B. San Román, en el Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM. Agradecemos el apoyo técnico de Paula Bernardino y de Nydia Hernández, así como el acceso al equipo de citometría de flujo por la Dra. Karla Juárez.

Bibliografía.

- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178.
- Schnoor, M., Buers, I., Sietmann, A., Brodde, M. F., Hofnagel, O., Robenek, H., & Lorkowski, S. (2009). Efficient non-viral transfection of THP-1 cells. *Journal of Immunological Methods*, 344(2), 109–115.
- López-Marín, L. M., Rivera, A. L., Fernández, F., & Loske, A. M. (2018). Shock wave-induced permeabilization of mammalian cells. *Physics of Life Reviews*, 26-27, 1–38.