

## Síntesis de un lípido catiónico derivado de un aminoácido básico y su caracterización química y biológica para la transferencia de genes

Oseguera Guerra Berenice<sup>1</sup>, Brito Arias Marco<sup>2</sup>, Ibáñez Hernández Miguel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.  
Laboratorio de Terapia Génica. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n  
Colonia Santo Tomás, México D.F. CP 11340.

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología  
Laboratorio de Proyectos de Química. Av. Acueducto de Guadalupe s/n  
Barrio La Laguna Ticomán, México, D.F. CP 07340.

ecinereb\_ari@hotmail.com

Fecha de aceptación: 29 de junio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

### RESUMEN

La terapia génica es una estrategia terapéutica basada en la modificación del repertorio genético de las células mediante la administración de ácidos nucleicos. La principal limitante de su aplicación *in vivo* es la dificultad de transportar el material genético hasta el núcleo de las células para su expresión, por lo que se han diseñado vehículos genéticos, como los liposomas catiónicos, para facilitar este proceso. Existe una gran variedad de lípidos catiónicos eficientes para la transferencia de genes, sin embargo, son caros y citotóxicos en cierto grado, por lo que se sigue en la búsqueda de nuevos lípidos catiónicos inocuos, eficientes y económicos. En el presente trabajo se diseñó, sintetizó y caracterizó un nuevo lípido catiónico derivado de un aminoácido básico y un alcohol alifático, el cual es eficiente para la transferencia de genes y seguro por estar formado con moléculas propias de la célula, además económico y de fácil manejo.

**Palabras clave:** lípidos catiónicos, lipofección, terapia génica.

### ABSTRACT

Gene therapy is a therapeutic strategy based on modification of genetic repertoire of cells by nucleic acids administration. The main limitation *in vivo* application is the difficulty to transport genetic material into nucleus cell without degradation and achieve its expression, for this it has been synthesized cationic liposomes as genetic vehicles that aid in this process. There is a variety of efficient cationic lipids for gene transfer, however, are expensive and cytotoxic, so that it remains in the search for new cationic lipids: safe, efficient and economical. In this work it was designed, synthesized and characterized a new cationic lipid derived from basic amino acid and aliphatic alcohol to use in gene therapy, because it was formed with self-molecules of cell, it is safe and because of its synthesis, it is economic and easy to use.

**Key words:** cationic lipids, lipofection, gene therapy.

## INTRODUCCIÓN

La terapia génica es una estrategia terapéutica basada en la modificación del repertorio genético de las células mediante la administración de ácidos nucleicos como DNA, mRNA, siRNA, microRNA u oligonucleótidos antisentido (Hao Yin et al., 2014). A pesar de las diferentes enfermedades que podrían tratarse por terapia génica, el principal problema que limita su aplicación *in vivo*, es la dificultad de transportar el material genético íntegro hasta el núcleo de las células blanco y lograr su expresión. Por lo que la clave para obtener una terapia génica exitosa es la creación de vehículos genéticos seguros y eficientes.

Los vehículos genéticos son sistemas que ayudan a entregar el material genético terapéutico a la célula blanco, facilitando su entrega y biodisponibilidad intracelular, para que éste pueda funcionar correctamente (Durviz, 2006). Dentro los vehículos genéticos más prometedores se encuentran los liposomas, por tener muy baja toxicidad y tener la posibilidad de transferir genes terapéuticos de gran tamaño, sin embargo, hasta hoy su principal desventaja radica en la baja eficiencia de transfección.

Los liposomas son vesículas sintéticas de lípidos, formados por una o más bicapas concéntricas alternadas por compartimentos acuosos (Balazs y Godbey, 2011), pueden variar en tamaño, composición y organización estructural (Sipai *et al*, 2012), ya que pueden formarse con lípidos aniónicos, neutros o catiónicos; sin embargo, para la transferencia de genes, los liposomas catiónicos son los más utilizados, por ser más eficientes en la interacción con los ácidos nucleicos y por tener mayor eficiencia de transfección en células eucariontes.

Los liposomas catiónicos se forman con lípidos catiónicos sintéticos, puesto que no existen en la naturaleza. Felgner y colaboradores (1987), diseñaron y sintetizaron el primer lípido catiónico (DOTMA: N-[<sup>+</sup>1-(2,3,-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio clorhidrato). A partir de éste, se han sintetizado una gran variedad de lípidos catiónicos con buena eficiencia para la transferencia de genes (Herrera, 2007), sin embargo, son caros y citotóxicos en cierto grado, por lo que se sigue en la búsqueda de nuevos lípidos catiónicos inocuos, eficientes y económicos. Por lo que en el presente trabajo se diseñó, sintetizó y caracterizó un nuevo lípido catiónico, derivado de moléculas propias de la célula para evitar la toxicidad, por lo que sería seguro y de fácil manejo.

## OBJETIVO GENERAL

Obtener las características químicas y biológicas de un nuevo lípido catiónico sintetizado a partir de un aminoácido básico y un alcohol alifático para ser aplicado en terapia génica.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y sintetizar un lípido catiónico a partir del aminoácido básico lisina y un alcohol alifático de 20 carbonos.
- Caracterizar químicamente el nuevo lípido catiónico.
- Formar liposomas con el nuevo lípido catiónico y diferentes lípidos ayudadores para formar lipocomplejos con el pDNA pSV-β-gal.
- Transfectar cultivos de la línea celular C-33 A y determinar la eficiencia de transfección por la actividad de la β-galactosidasa.

## METODOLOGÍA

La síntesis del lípido catiónico se llevó a cabo por el método de esterificación para aminoácidos polares. Se verificó la síntesis por cromatografía analítica en placa fina de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (TLC), con una fase móvil para lípidos anfipáticos formado con cloroformo: metanol: ácido acético: agua (85:25:8:4 v/v) y se reveló con ninhidrina 1% en etanol y con ácido sulfúrico 5% en etanol. La purificación se efectuó por

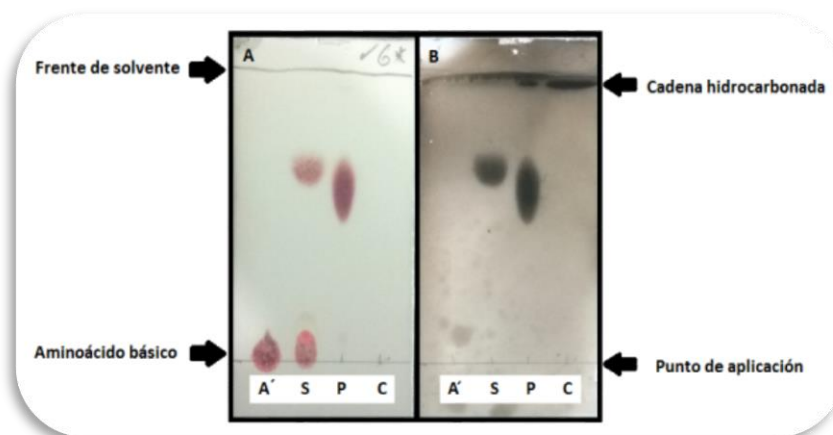
extracción líquido-líquido con diferentes solventes orgánicos. La caracterización química se realizó por espectroscopía de infrarrojo en un equipo Perkin Elmer FT-IR modelo Spectrum GX 2000 y por espectrometría de masas en un equipo micrOTOF-Q II 10392.

Por otro lado, se realizó el aislamiento y purificación del pDNA pSV- $\beta$ -gal, por la técnica de lisis alcalina con el juego comercial de reactivos Ultra Clean MoBio®. Se verificó su integridad por electroforesis en agarosa al 1% y se calculó su concentración y pureza con el Multidetector Syneigy2 con el programa Gen5.

Además, los liposomas se formaron por el método de sonicación con el nuevo lípido catiónico en combinación con los lípidos ayudadores; colesterol, DOPE, DOPC y/o DEPE, a diferentes proporciones molares. Los lipocomplejos se formaron al agregar a los liposomas diferentes cantidades del pDNA, con los cuales se transfeció la línea celular C-33 A (cáncer de cérvix humano). Como método de comparación para la transfección se utilizó la Lipofectamina®. La eficiencia de transfección se determinó *in situ* mediante la expresión del gen Lac Z por la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. Por último, se evaluó la citotoxicidad por medio del colorante vital azul tripán.

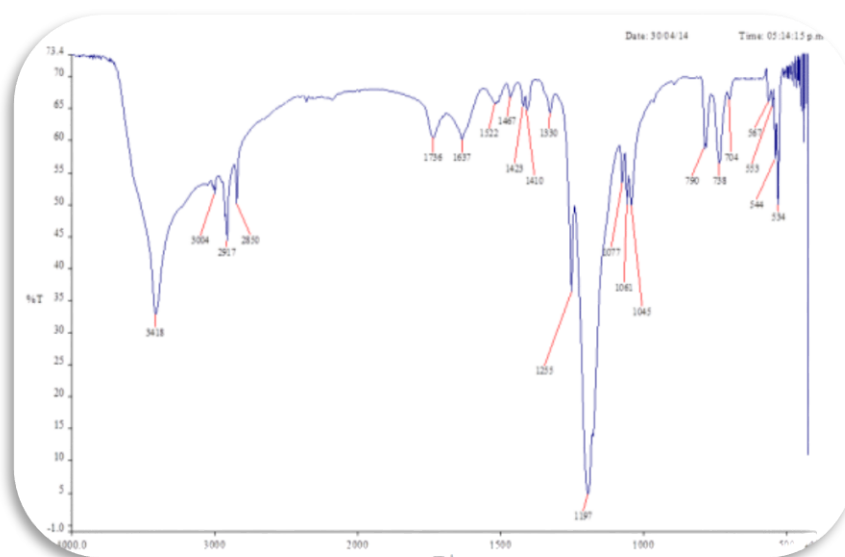
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nuevo lípido sintetizado presentó un aspecto ceroso. La reacción tuvo un rendimiento de 35%. En cuanto a la caracterización, en la cromatografía en capa fina (Figura 1), el lípido se separó en la región media de la cromatoplaaca con un  $R_f=0.7$  (Figura 1 S y P), a diferencia de la materia prima (Figura 1 A y C), lo que indicó su carácter anfipático.



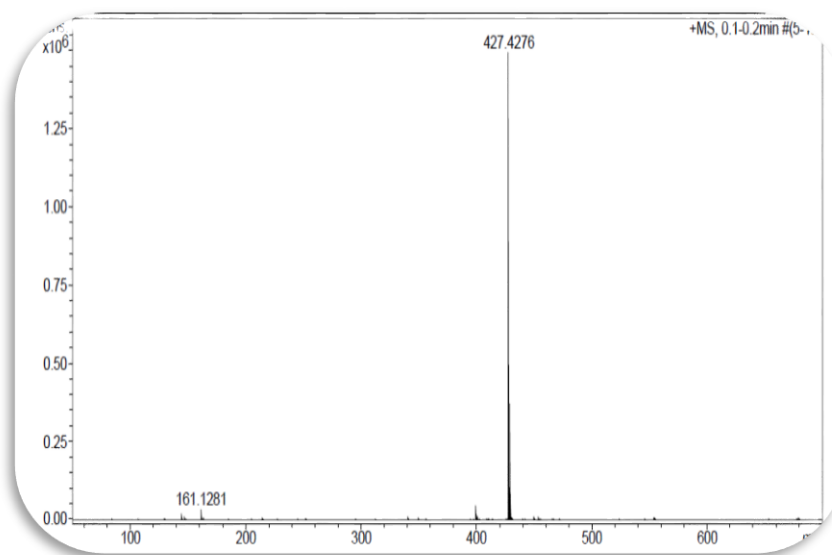
**Figura 18.** Cromatograma del nuevo lípido catiónico. El lípido se desplazó con un  $R_f=0.7$  lo que indica su carácter anfipático. A' = lisina, C = alcohol alifático, S = lípido sin purificar y P = lípido purificado. A) Cromatograma revelado con ninhidrina, B) Cromatograma revelado con ácido sulfúrico.

En el espectro del análisis espectroscópico de IR, se encontraron las señales de alargamiento C=O del enlace éster ( $1736\text{ cm}^{-1}$ ), el alargamiento de los grupos -NH ( $3418\text{ cm}^{-1}$ ) y los alargamientos C-H de la cadena alifática ( $2917$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$ ), con lo que se comprobó la unión del aminoácido y el alcohol alifático por el enlace éster (Figura 2).



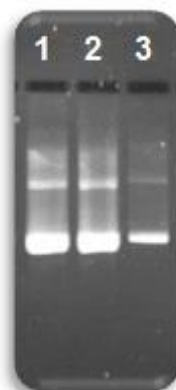
**Figura 19.** Espectro de infrarrojo del nuevo lípido catiónico. La señal a  $1736\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al alargamiento de C=O del enlace éster. La señal a  $3418\text{ cm}^{-1}$  corresponde al alargamiento de los grupos  $\text{-NH}$ . Las señales a  $2918\text{ cm}^{-1}$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a los alargamientos C-H de los grupos metilenos del alcohol alifático y del aminoácido.

También, por espectrometría de masas se confirmó la síntesis del nuevo lípido catiónico al indicar la masa exacta del lípido:  $427.4276\text{ Da}$  (Figura 3). Además, al obtener una sola señal en el espectro se comprobó la pureza del lípido.



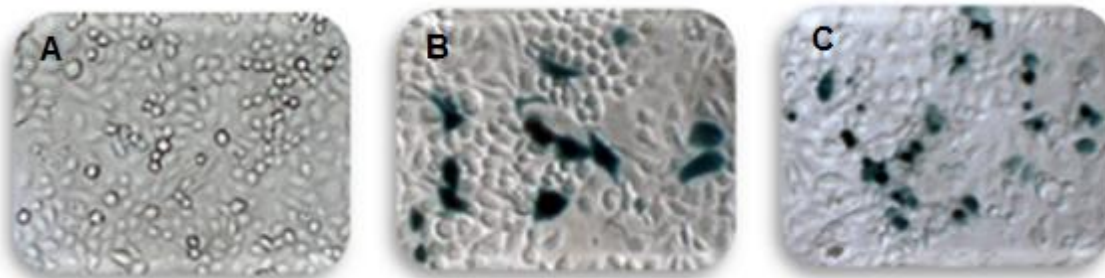
**Figura 20.** Espectro de masas del nuevo lípido catiónico. Se observa un único pico que representa la masa exacta ( $427.4276\text{ Da}$ ) y la pureza del lípido.

Por otro lado, el pDNA purificado presentó un 80% de la forma molecular I (Figura 4), con lo que se aseguró una buena expresión genética por la integridad estructural. Además, se obtuvo una concentración de 284.7 ng/ $\mu$ L y una relación A260/A280 de 2.061, lo que indicó su alto grado de pureza.



**Figura 21.** Electroferograma del plásmido pSV- $\beta$ -gal. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa la alta integridad del pDNA (Forma molecular I 80%). Carriles 1-3) Corresponden a 5, 3 y 1  $\mu$ L del pDNA purificado.

Se obtuvieron los liposomas catiónicos con diferentes relaciones molares con los lípidos ayudadores, encontrando que los más estables contenían colesterol y DOPC. Con éstos liposomas, se formaron lipocomplejos y se transfectó la línea celular C-33 A, observado transfección únicamente con los que contenían colesterol, alcanzando una eficiencia hasta del 40%, similar al de la lipofectamina (Figura 5).



**Figura 22.** Transfecciones con lipocomplejos que contienen el nuevo lípido sintetizado en células C-33 A. Las transfecciones se pusieron de manifiesto por la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa con el sustrato X-Gal, que al ser hidrolizado da un compuesto de color azul. A) Control de células sin transfectar. B) Transfección con lipocomplejos que contienen el nuevo lípido catiónico C) Transfección con Lipofectamina.

No se observó citotoxicidad con ninguna de las mezclas de lípidos utilizadas para la transfección.

## CONCLUSIÓN

Se sintetizó y caracterizó químicamente el nuevo lípido catiónico derivado de la lisina y un alcohol alifático, además, presentó una alta eficiencia de transfección, similar a la Lipofectamina®, y no presentó citotoxicidad, por lo que se puede utilizar de forma segura en terapia génica.

## REFERENCIAS

- Balazs D., Godbey W. (2011). Liposomes for use in gene delivery. *Journal of Drug Delivery*. 2011: 1-12.
- Durviz S. L. (2006). Terapia génica. Programa de terapia génica, Universidad de Valencia, pp. 365 – 372.
- Felgner P., Gadek T., Holm M., Roman R., Chan H., Wenz M., Northrop J., Ringold G., Danielsen M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad.* 84: 7413-7417.
- Lonez C. *et al.* (2008). Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling. *Prog Lip Res* 47: 340–347.
- Hao Yin et al. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Gen*, 15: 541–555.
- Herrera Z. (2007). Lipofección y caracterización de lipocomplejos formados con el lípido catiónico Estearil-lisina y DNA plasmídico. Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México.
- Sipai Altaf Bhai M., Vandana Yadav, Mamamtha Y., Prasanth V. V. (2012). Liposomes an overview. *JPSI*, 1: 13-21.