

TRANSFERENCIA DE GENES CON LIPOCOMPLEJOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS PARA EL DESARROLLO DE UNA TERAPIA GÉNICA *EX VIVO*.

Martínez Cinthya, Alcántara Verónica, Wong Isabel, Baeza Isabel, e Ibáñez Miguel.
Depto. de Bioquímica, ENCB-IPN. México, D.F., C.P. 11340. Tel/Fax 57296000 ext. 62326.
cinthyasalimah@hotmail.com

Introducción: La ausencia o alteración de algún gen o genes son un factor importante en el desarrollo de algunas enfermedades como la fibrosis quística, distrofias musculares, hemofilia entre otras; así mismo, un defecto en la información genética de un individuo contribuye a la susceptibilidad o resistencia a enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, artritis reumatoide, etc. La terapia génica tiene como finalidad la introducción de material genético (DNA o RNA) a células para revertir o prevenir un proceso patológico mediante la administración de la copia de un gen normal, la cual puede realizarse a través de vehículos genéticos (virales y no virales). Dentro de los vehículos no virales, se encuentran los liposomas catiónicos. En el laboratorio de Biomembranas se han sintetizado los lípidos catiónicos: N-colesteril-formil-espermina y estearil-espermina. Con estos lípidos se han formado lipocomplejos que han mostrado ser eficientes y seguros en la transferencia de genes en líneas celulares y en animales de experimentación. Debido a que las líneas celulares están constituidas por células transformadas que poseen un metabolismo muy acelerado con respecto a las células normales, la utilización de cultivos primarios para la transferencia de genes nos permitirá establecer las condiciones óptimas para desarrollar una metodología adecuada de transfección, ya que éste es un sistema que refleja más adecuadamente las condiciones de un organismo. El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones de transferencia de genes en cultivos primarios de células de diferentes órganos de ratones de la cepa NIH, empleando complejos que contienen lípidos catiónicos (N-colesteril-formil espermina o estearil-espermina) y DNA plasmídico, para establecer una estrategia de terapia génica *ex vivo*.

Metodología: Se realizó la transformación genética de la cepa *E. coli* HB5⁺ con los plásmidos pRSV⁺gal y pIRES2-EGFP. Se llevó a cabo el aislamiento y purificación de estos plásmidos por el método de hidrólisis alcalina y gradiente de cloruro de cesio. Los complejos se formaron con los lípidos catiónicos N-formil-colesteril-espermina (EspCHOL) o estearil-espermina (EE) y un lípido ayudador la dioleoilfosfatidil-etanolamina (DOPE) o el colesterol (CHOL) asociados a DNA plasmídico por el método de Felgner (modificado por Ibáñez, et al. 1996). Se realizó

la transfección con los plásmidos PIRES2-EGFP y pRSV⁺gal en las líneas celulares C33 y L929, así como en los cultivos primarios de fibroblastos de peritoneo y de médula ósea de ratón.

Resultados: La mayor eficiencia de transfección en los cultivos primarios y en las líneas celulares C33 y L929, se obtuvo con los lipocomplejos que contenían el lípido catiónico estearil-espermina y el colesterol como lípido ayudador además de la polilisina (pLis). Se obtuvo una mejor eficiencia de transfección en los cultivos primarios con respecto a la eficiencia observada en las líneas celulares (Fig. 1).

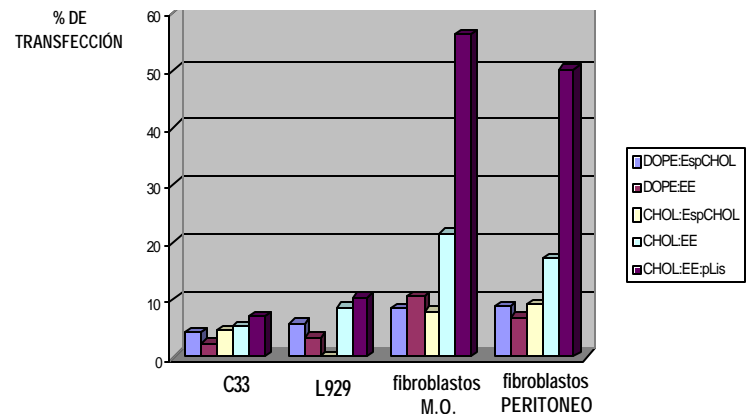


Fig. 1. Porcentaje de transfección genética en los cultivos celulares con los diferentes lipo-complejos que contienen pIRES2-EGFP.

Conclusiones: 1. Los lipocomplejos formados con el lípido catiónico estearil-espermina y DNA plasmídico transfectaron con mayor eficiencia a los cultivos primarios y a las líneas celulares. 2. El lípido ayudador más eficiente fue el colesterol. 3. La eficiencia de transfección se incrementó al utilizar la polilisina en los lipocomplejos. 4. Esta metodología permitirá establecer una estrategia muy eficiente para realizar terapia génica *ex vivo*.

Agradecimiento: Este trabajo pertenece al proyecto CGPI-IPN Clave 20030737.

Bibliografía:

Ibáñez, M., Gariglio P., Chávez P., Santiago, R., Wong, C, and Baeza, I., (1996) Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes. *Cell Biol. and Biochim.* 74 : 633-643.