

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE QUITOSÁN EN EL ENSAMBLAJE DE NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIA GÉNICA UTILIZANDO EL PLÁSMIDO pEGFP-N1

María Eugenia Aranda Barradas, Saúl Enrique Trejo López. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli. 54714. mariaaranda500@gmail.com

Palabras clave: nanopartículas, terapia génica, quitosán

Introducción. El quitosán es un copolímero catiónico lineal de N-acetilglucosamina y glucosamina de origen natural. Tiene la capacidad de interactuar electrostáticamente con DNA plasmídico formando nanopartículas para fines de terapia génica (1,2). El grado de interacción está en función del peso molecular de ambos componentes y la relación molar de quitosán con respecto al plásmido (3). La electroforesis ha sido ampliamente utilizada para determinar la relación molar óptima plásmido : polímero catiónico para el ensamblaje de nanopartículas a través de la retención en la migración del DNA plasmídico tras su interacción con concentraciones crecientes de polímero catiónico (2,4). El objetivo del presente trabajo consistió en encontrar la concentración óptima de quitosán de dos pesos moleculares (20.6 y 57.5 kDa) para el ensamblaje de nanopartículas utilizando el plásmido pEGFP-N1 mediante retención electroforética.

Metodología. Se extrajo el plásmido pEGFP-N1 por lisis alcalina a partir de un cultivo de *E. coli* DH5- α transformada. Se realizaron soluciones de quitosán de ambos pesos moleculares utilizando ácido acético al 1% como disolvente. Se obtuvieron diluciones utilizando agua destilada para obtener diferentes concentraciones de quitosán y se ajustó el pH a 5.5. El plásmido (6 nM) y las soluciones de quitosán ($V_f=150\mu\text{L}$) se acoplaron electrostáticamente durante 30 min utilizando un vórtex a aprox. 3,500 rpm. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% durante 50 min a 120 V y se utilizó el colorante GelRed para la tinción del DNA.

Resultados. Las bandas correspondientes a la interacción del plásmido pEGFP-N1 a una concentración constante (6 nM) con quitosán de dos pesos moleculares diferentes (20.6 y 57.5 kDa) a relaciones molares crecientes pEGFP-N1:quitosán (1:12 a 1:36), presentaron una migración electroforética comparable a la del Control (plásmido sin quitosán) (Figura 1A). Con base en esto, se evaluó el ensamblaje de las nanopartículas utilizando concentraciones mayores de quitosán. En este caso, se observa una retención electroforética del DNA en los pozos (Figura 2A). Esto sugiere que a estas concentraciones, el quitosán (en el caso de ambos pesos moleculares) interactúa electrostáticamente con el plásmido formando estructuras con un mayor grado de

compactación y cuya carga se neutraliza por la acción del polímero catiónico (4).

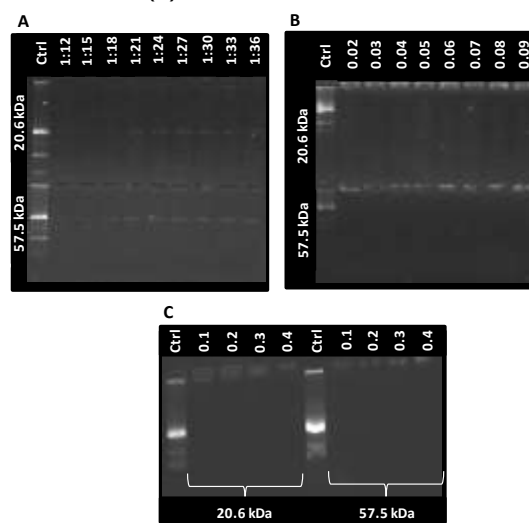


Fig. 1. Electroforesis de la interacción del plásmido pEGFP-N1 con quitosán (pesos moleculares: 20.6 y 57.5 kDa) a diferentes concentraciones. A) Interacción de pEGFP-N1 6 nM con diferentes relaciones molares de quitosán; B y C) Interacción de pEGFP-N1 6 nM con diferentes porcentajes de quitosán. Ctrl: pEGFP-N1 sin quitosán.

A partir de la concentración de quitosán 0.1% no se observa el plásmido (Figura 1C). Esto sugiere que hay un mayor grado de interacción entre ambos componentes generando neutralización de cargas y un estado de supercompactación en el plásmido que impide la tinción del DNA por el GelRed.

Conclusiones. La concentración óptima de quitosán (de 20.6 y 57.5 kDa) para el ensamblaje de nanopartículas con el plásmido pEGFP-N1 y sugerida para estudios posteriores de caracterización física y biológica de las nanopartículas es de 0.1%.

Agradecimientos. El quitosán de ambos pesos moleculares fue proporcionado por la Dra. Susana Patricia Miranda Castro. Los reactivos y materiales para la purificación de plásmido y la electroforesis fueron otorgados por la QFB. Nydia Berenice González Ángeles.

Bibliografía.

1. Bozkir, A and Mehmet S. (2003). *Drug Delivery*. (11):107-112.
2. Hallaj-Nezhadi, S. et al. (2011). *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* (14):181-195.
3. Lavertu, M. et al. (2006). *Biomaterials*. (27):4815-4824.
4. Mansouri, S. et al. (2006). *Biomaterials*. (27):2060-2065.

