

# **SÍNTESIS DE UN LÍPIDO CATIÓNICO MULTIVALENTE PARA SU POSIBLE USO EN TERAPIA GÉNICA.**

## **I. INTRODUCCIÓN.**

### **1. TERAPIA GÉNICA**

La terapia génica es la transferencia de material genético en una célula, tejido u órgano, con el objetivo de curar una enfermedad o por lo menos mejorar el estado clínico de un paciente (Verma and Weitzman, 2005).

El efecto de la introducción del nuevo gen puede ser la activación o la supresión de alguna función fisiológica que se está produciendo incorrectamente en el individuo a tratar, o para introducir modificaciones genéticas que puedan ser beneficiosas en el tratamiento de enfermedades (Durviz, 1997, Ferber, 2001).

### **2. ESTRATEGIAS PARA TRANSFERIR EL GEN TERAPÉUTICO.**

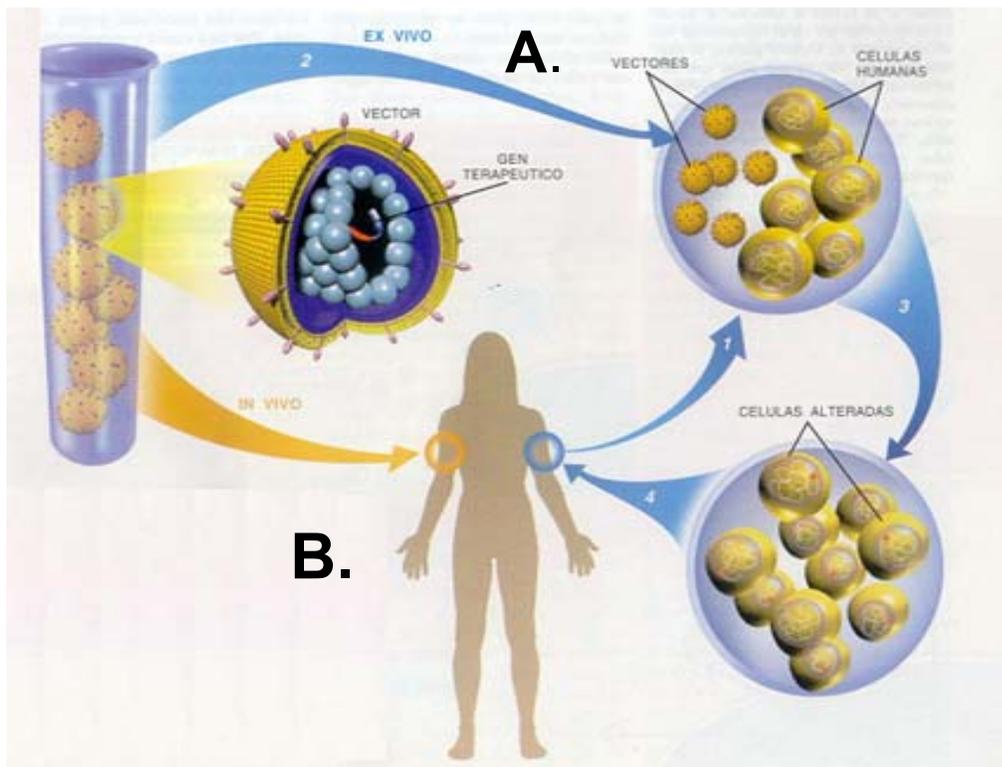
La estrategia a seguir para realizar terapia génica, respecto al modo de introducir el gen en el organismo, comprende dos procedimientos diferentes y pueden ser clasificados en: a) *ex vivo* y b) *in vivo* (Keown *et al.*, 1990).

#### **2.1. EX VIVO**

La terapia génica "*ex vivo*" consiste en obtener células del paciente del tejido u órgano de interés, se disgregan las células y se mantienen en condiciones de cultivo de tejidos en el laboratorio. Posteriormente, son transfectadas con el gen terapéutico de modo que se obtienen células modificadas genéticamente y después se introducen en el mismo individuo, luego de recolectarlas y amplificarlas (Nabel *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 1999) (Fig.1).

## 2.2. IN VIVO

La terapia génica "*in vivo*", consiste en la introducción del gen terapéutico directamente al paciente. Este método se puede realizar por vía sistémica o específicamente hacer la administración directa en el órgano o tejido de interés (*in situ*) (Makiya *et al.*, 2001) ( Fig. 1).



**Figura 1. Estrategias para transferir el gen terapéutico a las células del paciente. A) ex vivo y B) in vivo**

## 3. VEHÍCULOS GENÉTICOS PARA LA TRANSFERENCIA DEL GEN TERAPEUTICO.

Las células de eucariontes, en condiciones muy especiales, pueden captar DNA exógeno, el cual puede llegar a expresarse. Sin embargo, la entrada del DNA intacto a la célula y su subsecuente expresión genética, es un proceso muy ineficiente, debido al tamaño y a la carga del DNA, así como a las múltiples

barreras, tanto de membrana como enzimáticas que existen en la célula. Por lo tanto, para introducir DNA exógeno a las células de eucariontes, lo habitual es recurrir a la ayuda de algún vehículo genético que facilite el proceso de transferencia del gen y permita la entrada y expresión intracelular del mismo, proceso que se conoce como transfección (Ferber, 2001).

Los vehículos para transferir genes, son sistemas que ayudan en el proceso de transporte del gen exógeno a la célula, al facilitar la entrega y bio-disponibilidad intracelular para la expresión correcta del gen en la célula transfectada (Ibañez *et al.* 1991).

Se han diseñado una gran variedad de vehículos genéticos con fines experimentales, los cuales se pueden clasificar en dos grupos principales: a) vehículos virales y, b) vehículos no virales (Pislaru *et al.*, 2002).

Los vehículos no virales sintéticos tienen muchas ventajas potenciales comparados con los sistemas virales, incluyendo significativamente menor toxicidad, inmunogenicidad y no son inmunogénicos. La entrega de los ácidos nucleicos es independiente del tamaño de los mismos (pueden acarrear desde oligonucleótidos hasta cromosomas artificiales), tienen un sistema de control de calidad más simple, y los requerimientos regulatorios de tipo farmacéuticos son mucho más sencillos, pero no son tan eficientes para ser usados clínicamente (Kostarelos *et al.*, 2005).

#### **4.- LIPOSOMAS.**

Los liposomas son microvesículas formadas por una o varias bicapas de lípidos anfipáticos, las cuales delimitan uno o varios compartimentos en su interior acuoso (Bangham, 1968), se pueden formar de diferentes tamaños obteniéndose por lo general de 25 nm a 5 µm de diámetro, dependiendo del tipo de lípidos que

los formen. Los liposomas pueden atrapar moléculas biológicamente activas en su interior acuoso o en su bicapa lipídica (Keown, 1990, Chesnoy and Huang, 2000).

Las ventajas del uso de estos vehículos para transportar genes, en relación a otros vehículos genéticos, es que son fácilmente degradables, no despiertan respuesta inmunológica, son poco tóxicos y pueden atravesar las barreras biológicas como la hematoencefálica y las membranas celulares (Dokka *et al*, 2000).

Sin embargo, como desventaja presentan la baja eficacia de encapsulamiento del transgen y por lo tanto una baja transfección, que se manifiesta en una baja expresión genética; además, de poder interferir con componentes séricos cuando se administran por vía sistémica (Conwell and Huang, 2005).

Los liposomas se forman experimentalmente con lípidos anfipáticos como los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol, que son los mismos que integran la matriz de las membranas celulares (Baeza *et al.*, 1998). Estos lípidos se pueden usar de origen animal o vegetal y pueden conferir cargas en la superficie del liposoma dependiendo de los lípidos que se utilicen, obteniéndose liposomas neutros o aniónicos, porque los lípidos aniónicos o neutros son los únicos que se encuentran en la naturaleza (Hui *et al*, 1996).

El colesterol no forma liposomas por si solo, pero se integra en las bicapas lipídicas. En los liposomas causa una disminución tanto en la fluidez de la bicapa lipídica como en la permeabilidad, pero le confiere gran estabilidad al liposoma (Ibañez *et al.* 1991; Ferrari, 2002).

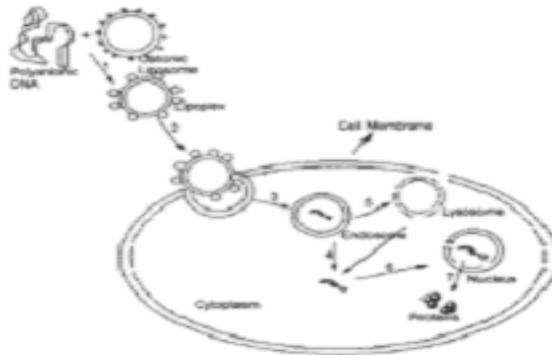
## 5. LIPOSOMAS CATIONICOS.

Philip Felgner (1978), de la compañía de biotecnología Vical, en San Diego, desarrolló una forma más eficiente de introducir los genes en células eucariontes, formando liposomas con un lípido sintético cargado positivamente. A estas estructuras se les denominaron lipocomplejos, los cuales se fijan a la membrana celular y liberan los genes al interior de la célula, con lo que se ha incrementado la eficiencia de encapsulamiento del DNA en los liposomas, y por lo tanto en la transfección genética. A partir de esa fecha, se han diseñado y sintetizado lípidos con carga positiva para formar liposomas catiónicos, y muchos de ellos ya están disponibles comercialmente. Con estos lípidos, los liposomas se forman fácilmente y pueden interaccionar al 100% con el DNA terapéutico, además puede emplearse DNA de cualquier tamaño, lineal o circular y la baja inmunogenicidad del liposoma permite su aplicación con cierta seguridad *in vivo* (Felgner et al., 1994; Ferber, 2001).

La estrategia para realizar la transfección con liposomas catiónicos, se basa en las cargas que tienen, el DNA, los lípidos catiónicos y la membrana celular, lo que les permite interaccionar electrostáticamente entre sí. Los lípidos catiónicos son capaces de interaccionar con la mayoría de las cargas negativas del DNA condensándolo, formando los complejos DNA-liposomas que se conocen como lipocomplejos. A su vez, estos lipocomplejos pueden interaccionar con las cargas negativas de las membranas celulares, lo que facilita su introducción principalmente por endocitosis (Fig. 2) (Fewell *et al.*, 2005).

La mayoría de los liposomas catiónicos, además del lípido de carga positiva, deben de tener un lípido “ayudador” para estabilizar la bicapa lipídica y permitir la penetración del lipocomplejo a la célula (Xu y Szoka, 1996; Ferrari, 2002). Típicamente, el lípido catiónico y el lípido neutro se mezclan juntos en una proporción molar apropiada y se induce la formación de las vesículas unilamelares por algún método usado para tal fin, como la evaporación,

deshidratación-rehidratación, extrusión, etc. (Miller, 1998; Tagawa et al.,2002). También se pueden ensamblar las estructuras micelares después de ser dispersadas en agua o solventes orgánicos (Miller, 1998). Las vesículas unilamelares o micelas, pueden, posteriormente combinarse con ácidos nucleicos para formar partículas nanométricas denominadas lipocomplejos (Ewert *et al*, 2005).



**FIGURA 2. EVENTOS DE LA TRANSFECCIÓN GENÉTICA MEDIADA POR LIPOCOMPLEJOS.** (1) Formación del lipocomplejo, (2) Interacción con la célula, (3) Endocitosis del lipocomplejo, (4) “Escape” del transgen al citoplasma, (5) Degradación de algunos lipocomplejos, (6) Entrada del transgen al núcleo celular y (7) Expresión del gen terapéutico

Desafortunadamente, la mayoría de los lípidos catiónicos que están disponibles comercialmente, tienen algún grado de citotoxicidad, tal vez debido a que no pueden ser degradados en el interior de la células transfectadas, por su naturaleza química (Fillion ands Philips, 1997; Ilies and Balaban, 2001). Por tal motivo, en el laboratorio de Biomembranas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, se ha sintetizado un lípido catiónico, derivado del ácido esteárico y el aminoácido lisina (Meneses, 2005), moléculas presentes de manera natural en la célula. Los lipocomplejos formados con este lípido catiónico, presentan una buena eficiencia de transfección y aparentemente no son tóxicos.

## II. JUSTIFICACIÓN.

Los liposomas se han utilizado como vehículos para transferir genes a células, porque son potencialmente más seguros que otros vehículos desarrollados para este fin (Palmer *et al.*, 2004). Desafortunadamente, muchos de los lípidos catiónicos que se han diseñado para transfección genética y que están disponibles comercialmente, aunque son eficientes en la transferencia de genes, son tóxicos para muchos de los cultivos celulares (Sokol *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 2005) y para los tejidos de modelos animales, en los que se desencadenan procesos inflamatorios (Li *et al.*, 1998, Eliot *et al.*, 2003, Luton *et al.*, 2004). Con la finalidad de formar liposomas catiónicos que sean eficaces, seguros y prácticos en la transferencia de genes, en este trabajo se postula el diseño y la síntesis de un nuevo lípido catiónico, derivado del ácido esteárico y el dipéptido dilisina unidos por un enlace ester, moléculas que normalmente se encuentran en la célula y que pueden ser utilizadas por ésta en sus procesos metabólicos, después de ser transfectadas. La producción de este lípido tendría un bajo costo y sería estable; además, podría permitir una interacción más adecuada con el DNA, por el aumento de cargas positivas del lípido, lo que se podría traducir en una buena eficiencia de transfección genética, con una baja o nula citotoxicidad.

### **III. OBJETIVO GENERAL.**

Diseñar y sintetizar un lípido catiónico derivado del ácido graso esteárico y del dipéptido dilisina que sea eficiente en la transfección genética en cultivos celulares y que no sea tóxico.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Sintetizar el lípido catiónico (estearil-dilisina) derivado del dipéptido dilisina y el ácido esteárico.
- Caracterizar el lípido catiónico por cromatografía en placa fina de sílica gel, por su punto de fusión y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .
- Formar liposomas con el lípido catiónico estearil-lisina y el colesterol, como lípido “ayudador”, para hacer los lipocomplejos con el DNA del plásmido pRSV $\beta$ gal.
- Realizar la transferencia del material genético con los lipocomplejos en las líneas celulares C33 y Vero.
- Determinar la eficiencia de expresión de la  $\beta$ -galactosidasa por histoquímicas en los cultivos celulares.
- Determinar si estos liposomas catiónicos son citotóxicos en los cultivos celulares.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. REACTIVOS Y SOLUCIONES. Ver anexos.

2. METODOLOGÍA.

a) *Síntesis del lípido catiónico estearil-dilisina.*

Se realizó la síntesis del lípido catiónico estearil-dilisina por los siguientes métodos:

**Reacción de esterificación entre el 1-octadecanol y la dilisina (Método de esterificación de aminoácidos polares).**

Para obtener el lípido catiónico, se coloca el 1-octadecanol (30 g o 111mmol) en un matraz de bola en baño de aceite a 122°C, una vez derretida la cera se agrega el monohidroclorhidrato de L-dilisina (8 g o 44 mmol) y posteriormente se añadió el ácido metansulfónico (por goteo lento en 5 min aproximadamente) en volumen total de 5.8 mL o 90 mmol. Esta reacción se agitó durante 2.5 h a temperatura entre 124 y 129°C. Después, se añadió con agitación una mezcla tibia de agua (300mL) y metanol (50 mL). Posteriormente, la solución se filtró en un embudo Bukner con papel Whatman 4 y al filtrado se le añadió lentamente hidróxido de sodio (50 mL al 2 N) por goteo muy lento durante 20 minutos, con lo que se obtuvo una solución lechosa con un pH ~12. A la fase acuosa se le hicieron dos extracciones con éter (2 x 200 ml con 5 min de agitación cada una). Las porciones eterales se mezclaron, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró en un embudo Bukner con papel Whatman 4, quedando un líquido claro. A este filtrado se le insufló gas de ácido clorhídrico por 10 min, produciendo el burbujeo de la solución y el producto nebuloso se guardó a 4°C por 2 h. Finalmente se filtró en un embudo Bukner con papel Whatman 4 y el producto sólido se secó al vacío.

### ***Purificación del lípido catiónico estearil-dilisina.***

La pureza del lípido catiónico se determinó por cromatografía en capa fina en placas preparativas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, de 20x20 cm con un espesor de 3-4 mm. Se activaron las placas a 150°C por 5 h y la muestra disuelta en cloroformo se aplicó con una jeringa a todo lo ancho de la placa. El sistema de corrimiento para la cromatografía fue: cloroformo-metanol-ácido acético-agua (65-25-8-4 v/v) y se desarrolló durante 2 h aproximadamente. Después, se reveló un extremo de la placa con ninhidrina al 0.1%, para localizar el lípido catiónico en la cromatoplaca. Por último, se raspó toda línea a la altura en que se reveló el lípido y se eluyó con cloroformo-metanol (2:1 v/v) para ser analizado por espectroscopía.

### ***Caracterización del lípido catiónico estearil-dilisina.***

La pureza del lípido catiónico se determinó por cromatografía en capa fina y se caracterizó por su punto de fusión y por resonancia magnética nuclear (NMR) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

### **Análisis de pureza por cromatografía en capa fina de sílica gel.**

Para la cromatografía en capa fina de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> de 250 μm de espesor, se utilizó como sistema de desarrollo los solventes cloroformo:metanol:ácido acético:agua (65:25:8:4 v/v) y se reveló con ninhidrina al 0.1%. Como estándares se utilizaron L-lisina (monohidroclorhidrato) y 1-octadecanol.

### **Punto de fusión.**

El punto de fusión se determinó en el aparato digital Gallen Kemp, modelo MFB-595, en tubos capilares abiertos.

### **Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .**

El lípido catiónico se analizó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , a temperatura ambiente, usando una muestra de 10 mg, con una amplitud de 112.0 KHz en los espectrómetros JEOL GSX-270, Bruker DMX 300 y Jeol Eclipse +400, con transformadas de Fourier y con pulsos de 5 $\mu$ seg, utilizando 0.5 mL de cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente y tetrametilsilano (TSM) como referencia interna. Los valores de los desplazamientos están en partes por millón (ppm) respecto al TSM y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

### **Aislamiento y purificación del plásmido pRSV $\beta$ gal.**

El aislamiento del material genético se hizo por el método de lisis alcalina (Birnhom et al., 1979). Se sembró un preinóculo de la bacteria *Escherichia Coli* DH5 $\alpha$ , transformada con el plásmido pRSV $\beta$ gal, en 5 mL de medio Luria-ampicilina líquido y se incubó 12 h a 37°C. Con 1 mL del preinóculo, se sembró un matraz con 1.5 Lt del mismo medio y se incubó 12 h más con agitación a 150 rpm. Posteriormente, se le añadió cloranfenicol (60 mg/Lt de medio Luria-ampicilina) y se incubó otras 12 h con agitación a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 2,500 x g por 30 min a 4°C.

Para la purificación del plásmido, se usó el **KIT ULTRA CLEAN MoBio®**. Al paquete bacteriano se le adicionaron 5 mL de la Solución 1 y se resuspendió con el vórtex por 1 min. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de la Solución 2 a temperatura ambiente y se mezcló por inversión tres veces. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se adicionaron 30 mL de la Solución 3 y se mezcló por inversión dos veces, para incubar a temperatura ambiente 10 min. Después, se transfirió a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 5000 x g por 20 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo con filtro y se sometió a centrifugación a 3500 x g por 5 min. Se quitó el filtro y se desechó el

sobrenadante. Luego se adicionaron 15 mL de la Solución 4 al filtro, se sometió a centrifugación a 3500 x g por 5 min, se desechó el filtrado. Finalmente, el filtro se colocó en un tubo nuevo de 50 mL, se adicionaron 4 mL de la Solución 5 y se centrifugó a 3500 x g durante 5 min. El plásmido, recuperado en el filtrado, se guardó a 4°C para su uso posterior.

### **Formación de los lipocomplejos.**

La formación de los liposomas se hizo por el método de sonicación de Felgner et al. (1987) modificado por Ibáñez (1996). Se tomaron diferentes cantidades del lípido estearil-dilisina y se colocaron en tubos estériles de 13 x 100 mm con tapón de rosca y se les adicionó el colesterol como lípido ayudador en proporción 1:1 (p/p), disueltos en cloroformo.. El disolvente se evaporó a presión reducida y a la película de lípidos obtenida se le adicionaron 350 µL de medio de cultivo DMEM-F12 sin suero. Se realizaron tres ciclos de sonicación de 5 seg por 30 seg de reposo, en un sonicador de baño, Laboratory Supplies Co., con lo que se obtuvo una suspensión lechosa de liposomas. A estos liposomas se les adicionó el DNA del plásmido pRSVβgal, en diferentes cantidades, con lo que se formaron los lipocomplejos.

### **Cultivo de las líneas celulares.**

Las células se sembraron en botellas de cultivo GIBCO de 50 ml con medio DMEM-F12 completo con 10% de SFT, hasta 100% de confluencia. Para propagar el cultivo, se eliminó el medio de cada botella y la monocapa de células se lavó 2 veces con 2 ml de regulador PBS estéril. Se le adicionó 1 ml de tripsina-EDTA al 0.001% y se dejó actuar sobre la capa celular 1 min a 37°C. Las células se desprendieron y se pasaron, con una pipeta, a un tubo Falcon de 20 mL que contenía medio DEMF-F12 completo. Se centrifugó a 1000 x g por 5 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y finalmente se sembraron cajas Petri p20 nuevas con 0.5 mL de las células, más 3 mL de medio DMEM-F12

completo (10% de SFT) y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> , hasta llegar a 80% de confluencia para realizar la transfección.

### **Transfección genética.**

Se utilizaron las células C33 y Vero al 80% de confluencia, en cajas Petri p20. Se les retiró el medio y se lavaron dos veces con 500 µL de PBS estéril; se adicionó la preparación de lipocomplejos, que contenían diferentes cantidades de DNA, en 350 µL de medio DMEM-F12 sin suero. Se incubaron 1 h a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Posteriormente, se retiraron los lipocomplejos por decantación y las células se lavaron una vez con 500 µL de PBS estéril. Se agregaron 3 mL de medio DMEM-F12 completo (SFT 10%), se incubaron 24 h a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se cambió una vez más el medio de cultivo. A las 48 h postransfección, se determinó *in situ* la actividad de la β-galactosidasa, producto de la expresión genética del DNA del plásmido pRSVβgal , por la técnica histoquímica que utiliza como sustrato al X-gal, con lo que las células transfectadas se tiñen de azul.

### **Determinación de la actividad de la β-galactosidasa.**

A las 48 h postransfección, a las células se les retiró el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS estéril y se fijaron con 500 µL de formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0.2% durante 5 min. Posteriormente, se lavaron dos veces con 500 µL de PBS estéril y se les adicionó una mezcla de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil-D-galactopiranosido), en ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM en PBS 1X y se incubaron de 24 a 48 h a temperatura ambiente. Las células transfectadas se tiñeron de color azul por la acción de la β-galactosidasa sobre el sustrato X-gal y se fotografiaron en un microscópio invertido de contraste de fases Nikon a diferentes aumentos.

### *Determinación de la citotoxicidad de los liposomas catiónicos.*

A las células C33, crecidas al 80% de confluencia, se les retiró el medio y se lavaron con 500 µL de PBS estéril. Se les adicionaron los lipocomplejos que contenían diferentes cantidades del lípido estearil-dilisina y el colesterol (1/1 p/p),

con diferentes cantidades de DNA del plásmido pRSV $\beta$ gal, en un volumen final de 350  $\mu$ L de medio incompleto. Posteriormente, se incubaron de 1 a 2 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los liposomas se retiraron por decantación y las células se lavaron dos veces con 500  $\mu$ L de PBS, se les adicionaron 3 mL de medio completo y se volvieron a incubar durante 5 h. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron con 500  $\mu$ L de PBS y se les adicionaron 500  $\mu$ L de azul de tripán (0.2% en PBS) estéril y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 20 min. De esta manera, las células muertas o que presentaban algún daño, se tiñeron de color azul y se observaron en un microscopio óptico invertido de contraste de fases y se fotografiaron (Fillion and Philips, 1997).

## V. RESULTADOS.

### 1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL LÍPIDO CATIÓNICO ESTEARIL-LISINA.

El lípido estearil-lisina que se sintetizó por el método de esterificación de aminoácidos polares, se obtuvo en forma de un polvo blanco, con un rendimiento de 20 a 25%., con un punto de fusión de 160°C (se pone traslúcido a 110°C), que es intermedio de los dos puntos de fusión de las materias primas (L-Lisina PF 210°C y 1-Octadecanol PF 80°C). Después de purificarlo por cromatografía en placa preparativa de silica gel, en la cromatografía analítica en placa fina, se observó una mancha con un Rf de 0.9 que correspondió al lípido puro estearil-lisina (Fig. 2).



FIGURA 2. CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA EN SILICA GEL DEL LÍPIDO ESTEARIL-DILISINA.

### 2. CARACTERIZACIÓN DEL LÍPIDO ESTEARIL-DILISINA.

#### **Espectroscopía de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .**

El lípido estearil-dilisina también se caracterizó por RMN. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (de protones), presentó una señal triple en 0.86 ppm que corresponde al grupo metilo ( $\text{CH}_3$ -) del 1-octadecanol, una señal múltiple entre 1.0 y 1.9 ppm que integra a los metilenos ( $\text{CH}_2$ -) del octadecanol y de la dilisina, además de un desplazamiento químico con señal simple en 2.8 ppm que corresponde al

metileno unido al grupo  $\epsilon$ -amino, otra en 4.0 ppm, que corresponde al CH del carbono alfa de las lisinas y la señal doble en 4.2 ppm, corresponde al enlace éster. Finalmente, la señal múltiple en 8.4, nos indica la presencia del grupo amino alfa ( $\text{NH}^{3+}$ ). Al integrar las señales del espectro, se determinó que había 51 átomos de hidrógeno, lo que coincidió con el número teórico calculado para el lípido catiónico (Fig.3A).

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (de carbono 13), presentó una señal en 168.96 ppm que corresponde al carbonilo del enlace éster, lo que confirmó la formación de la unión entre el grupo hidroxilo del octadecanol y el grupo carboxilo de la lisina. Una señal a 65.36 ppm, correspondiente al C 1 del octadecanol y otra señal a 60.49 ppm que corresponde al carbono  $\alpha$  de la lisina. La señal a 51.50 ppm corresponde al cloroformo deuterado ( $\text{CCL}_3\text{D}$ ) y las señales entre 21.00-40.34 ppm, corresponden a los metilenos de la lisina y el octadecanol, además del metilo del octadecanol (Fig. 3B).

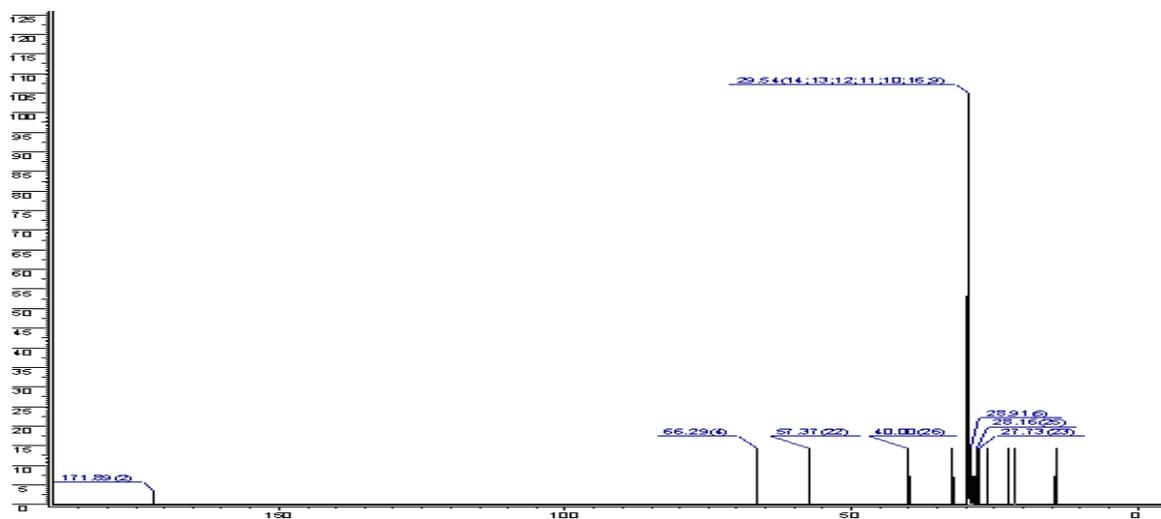
En ambos casos, los espectros obtenidos coincidieron con los modelos simulados obtenidos por el programa de informática de Predictor v.5.1 para espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Fig.4 A y B).

### **3. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO pRSV $\beta$ gal.**

Se utilizó el plásmido pRSV $\beta$ gal de 7,282 pb, que contiene el gen de resistencia a la ampicilina (Ampi R) y el origen para replicación en bacterias del plásmido pBR322 (pBR ORI); además, tiene clonados el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV LTR) para expresarse, pero no replicarse, en células de eucariontes (Thierry y Howely, 1991) y el gen Lac Z que codifica para la enzima  $\beta$  galactosidasa como gen reportero (Fig.5).



A.



B.

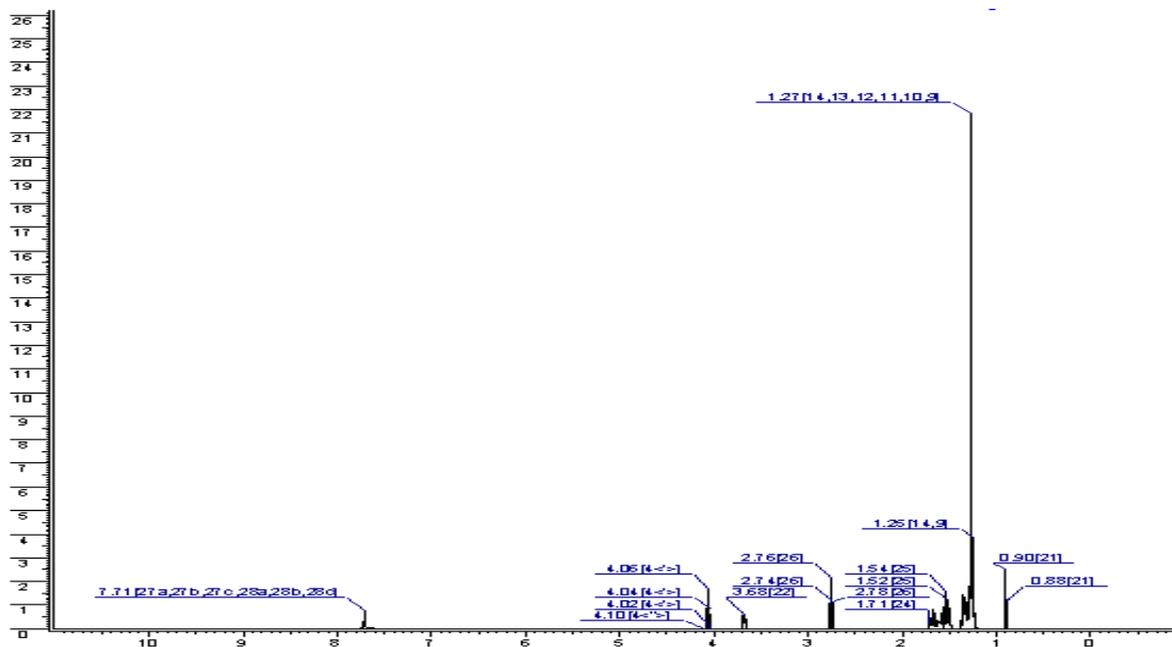
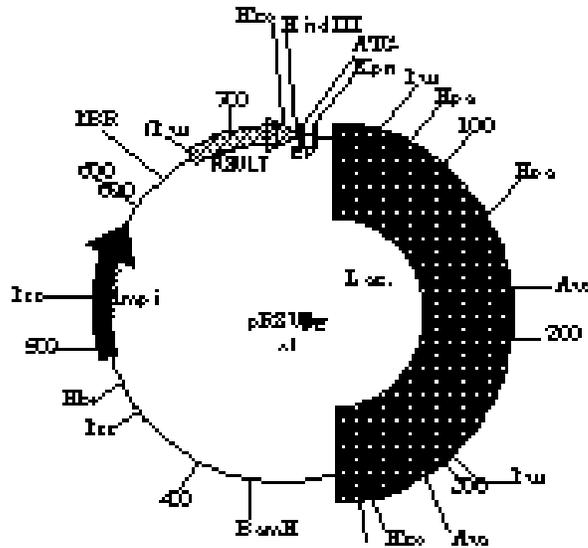


FIGURA 4. ESPECTROSCOPIA DE MNR SIMULADA POR EL PROGRAMA INFORMATICO PREDICTOR (v. 5.11). A) RMN  $^1\text{H}$  y B) RMN  $^{13}\text{C}$ . Ambos coinciden con los espectros obtenidos del lípido catiónico estearil-lisina.



**FIGURA 5. MAPA DEL PLÁSMIDO pRSVβgal.** Se indican el origen de replicación de pBR322 (pBR ORI), la región que codifica para la resistencia a la ampicilina (Amp<sup>R</sup>), el promotor del virus del sarcoma de Rous para eucariontes (RSV-LTR), el gen Lac Z que codifica para la enzima β-galactosidasa, así como los sitios de corte de las enzimas de restricción.

El DNA purificado se analizó por su perfil electroforético en geles de agarosa al 1%, observándose la isoforma I o súperenrollada siempre en mayor proporción hasta en un 70%, en comparación con la isoforma II o circular relajada (30%) y no se observó la isoforma III o lineal. Estas son las principales formas moleculares que adoptan los DNAs circulares, siendo la isoforma I la que presenta la mayor actividad biológica (Fig. 6).



**FIGURA 6. PERFIL ELECTROFORÉTICO DEL PLASMIDO pRSVβgal.** Perfil electroforético en gel de agarosa al 1%. Se observan las bandas de las isoformas moleculares del DNA: súperenrollada (I) y circular relajada (II).

#### **4. MICROSCOPIA ÓPTICA DE LOS LIPOSOMAS.**

Todas las preparaciones de lipocomplejos se hicieron con el lípido catiónico estearil-lisina mezclado con el colesterol como lípido ayudador, siempre en proporción 1:1 p/p y se observaron en un microscopio invertido de contraste de fases Nikon. Los liposomas preparados con el lípido estearil-lisina:colesterol, sin DNA, se observaron como vesículas redondas, aisladas y además se observaron agregados amorfos, con un diámetro entre 2 y 4  $\mu\text{m}$ . Cuando estos complejos contenían DNA de pRSB $\beta$ gal, se observó una disminución en su tamaño y ya no se presentaron agregados amorfos.

#### **5. TRANSFECCIÓN GENÉTICA.**

Para llevar a cabo la transfección genética, se empleó la línea de células de cáncer Cerviño-uterino C33, crecidas al 80% de confluencia. Se prepararon liposomas con el lípido catiónico estearil-lisina, mezclado con el lípido ayudador colesterol en proporción 1:1 (p/p) y se agregaron diferentes cantidades de DNA de pRSV $\beta$ gal. A las 48 horas postransfección, la expresión del gen *Lac Z* del plásmido, se puso de manifiesto al determinar la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa *in situ*, con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol-D-galactopiranosido (X-gal). Este sustrato es incoloro y permeable a las células fijadas con glutaraldehído, pero cuando es hidrolizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se libera la galactosa y el 5-bromo-4-cloro-3-indoil adquiere un color azul en presencia de ferro y ferricianuro de potasio, el cual es impermeable a las células fijadas, de tal forma que las células transfectadas se tiñen de azul y no pueden teñir a las células vecinas.

En la Tabla 1, se indican las mezclas de lípidos que se usaron para formar los lipocomplejos, así como los porcentajes de transfección obtenidos en cada caso. Los lipocomplejos formados solamente con el lípido estearil-lisina y DNA plasmídico, prácticamente no transfectaron a las células C33, pero cuando se

utilizó el colesterol como lípido ayudador, la transfección genética se incrementó significativamente, obteniéndose una máxima eficiencia de transfección hasta de 30% (Fig. 7 B-C). En cambio, cuando se llevó a cabo la transfección genética con la lipofectamina, que es el sistema comercial de liposomas catiónicos que más se utiliza, se obtuvo una eficiencia de transfección de 10% (Fig. 7D).

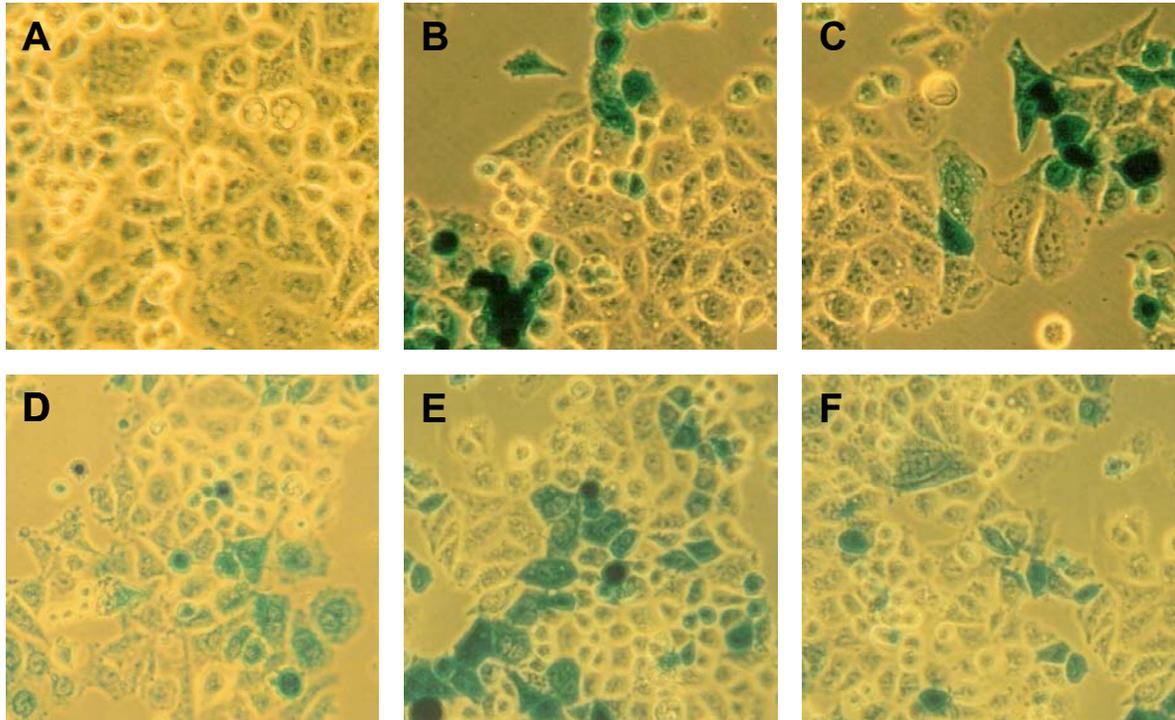
## 6. CITOTOXICIDAD DE LOS LIPOSOMAS CATIONICOS.

Para evaluar la citotoxicidad del lípido catiónico estearil-lisina y compararla con la de la lipofectamina, se utilizó el colorante vital azul tripán, el cual tiñe de azul a las células dañadas o muertas. Las pruebas se hicieron 2 h después de haber completado el tiempo de incubación de la transfección. La transfección genética se realizó utilizando lipocomplejos formados con diferentes cantidades de estearil-lisina y del lípido ayudador colesterol, en proporción 1:1 (p/p), además del DNA plasmídico. En la figura 15 se muestran las pruebas de citotoxicidad en donde se observa que las células tratadas con lipocomplejos que contenían el lípido catiónico estearil-lisina, aparentemente no sufrieron ningún daño, aún usando cantidades hasta de 50  $\mu\text{g}/7/10^5$  células (Fig. 8 B y C). En cambio, cuando la transfección se realizó con la lipofectamina, se observó daño en el cultivo celular, el cual se manifiesta por un mayor desprendimiento de las células de la monocapa celular (Fig. 8 D).

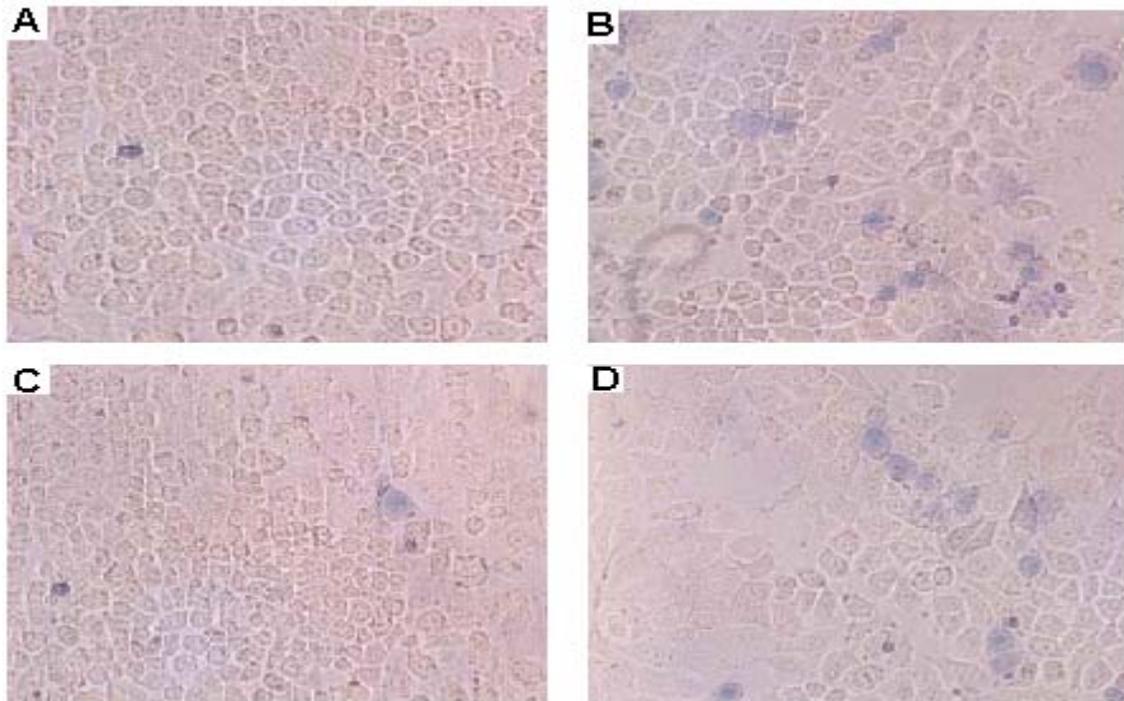
**TABLA 1. Porcentaje de transfección en la línea celular C33 con liposomas catiónicos.**

Cantidad de lípido catiónico ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad de colesterol ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad de DNA ( $\mu\text{g}$ )	Porcentaje de transfección celular
40	0	20	2
35	0	15	1
30	0	10	1
25	25	5	5
25	25	10	8
25	25	15	15

30	20	20	30
35	15	20	30
40	10	20	20
Lipofectamina			10



**FIGURA 7. CELULAS C33 TRANSFECTADAS CON LIPOCOMPLEJOS FORMADOS CON ESTEARIL-DILISINA:COLESTEROL Y DNA DE pRSVβGAL.** A) Células no transfectadas (control). B-E) Células transfectadas con 25 µg de estearil-dilisina, 25 µg de colesterol y 15 µg de DNA plasmídico. F) 4 µg de lipofectamina y 3 µg de DNA plasmídico. El aumento es de 200 veces en todos los páneles



**FIGURA 8. MICROFOTOGRAFÍAS DE LAS PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD EN LAS CELULAS C33 CAUSADA POR LA TRANSFECCION CON EL LIPIDO ESTEARIL-DILISINA.** Las células dañadas o muertas se tiñeron con el colorante vital azul tripán. A) Células C33 sin transfectar (control negativo). B) Células C33 tratadas con cianuro y anión fluoruro (control positivo). C) Células C33 transfectadas con el lipocomplejo estearil-lisina:colesterol y DNA plasmídico. D) Lipofectamina y DNA plasmídico. En todos los casos se adicionaron 50  $\mu\text{g}$  totales de lípidos y 15  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico, excepto la lipofectamina que fue de 6  $\mu\text{g}$  con 2  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico.

## VI. DISCUSIÓN.

La transferencia de genes a células eucariontes en cultivo, seguida por la determinación de la expresión biológica del DNA transferido, se ha aplicado ampliamente para el estudio de la regulación de la expresión genética. Además, la transferencia de genes a células en cultivo, constituye una etapa fundamental en la terapia génica, la cual abre cada vez más expectativas en el área de la salud pública. Los protocolos iniciales de terapia génica se diseñaron para tratar de curar enfermedades hereditarias, como la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchenne y la enfermedad de Gaucher, pero últimamente se ha ido enfocando más en el tratamiento contra el cáncer y enfermedades infecciosas como el SIDA (Eliot 2003).

Aunque en la actualidad casi el 85% de los ensayos clínicos se hacen con vehículos genéticos virales, no se ha logrado un gran avance en la seguridad y eficacia de estos. Por esta razón, el desarrollo de vehículos no virales, como los liposomas catiónicos, es una alternativa muy interesante para su utilización en ensayos clínicos, ya que al no tener efectos secundarios importantes, podrían llegar a ser más seguros. Sin embargo, la eficiencia de transfección que se ha logrado hasta ahora es baja y los lípidos catiónicos utilizados presentan cierta toxicidad, por lo que la búsqueda de nuevos lípidos catiónicos constituye un interés actual para poderlos utilizar con éxito en los ensayos clínicos (Kostarelos and Miller, 2005).

En este trabajo se diseñó y sintetizó un lípido catiónico derivado de la dilisina y el ácido esteárico, este lípido se sintetizó por el método de esterificación de aminoácidos polares, luego de reducir el ácido esteárico a 1-octadecanol. Este método fue el más sencillo y práctico ya que la transesterificación y otros varios ensayos no permitían una adecuada formación del enlace éster ni su posterior purificación. Si bien el rendimiento que se obtuvo de aproximadamente 20% es

bajo, el costo de la síntesis y purificación es barato, ya que no se precisaron muchos reactivos ni equipo sofisticado y se realiza en poco tiempo. Este lípido se caracterizó por su punto de fusión que fue de 160°, que es intermedio al que tienen las sustancias precursoras; el ácido esteárico (80°C) y la dilisina (210°C). Por cromatografía en capa fina de silica gel, se observó una sola mancha con un Rf de 0.9, lo que indica la pureza del compuesto y al migrar en el sistema de corrimiento utilizado, para lípidos polares, nos indica la presencia de un compuesto anfipático que contiene grupos aminos libres, por reaccionar con la ninhidrina y dar el compuesto colorido que se observa en la cromatopla. Por lo que estas evidencias indican la formación del lípido estearil-dilisina.

Por espectroscopía de RMN, se demostró la presencia del enlace éster en el compuesto sintetizado, lo que indica fuertemente la unión del grupo OH del octadecanol con el grupo carboxilo de la lisina, con lo que también se comprobó la formación del lípido catiónico estearil-lisina.

Con este nuevo lípido catiónico y el colesterol (como lípido ayudador), se formaron liposomas catiónicos, los que se emplearon como vehículos para transportar el plásmido pRSV $\beta$ gal a la línea celular C33. Estos lipocomplejos pueden transfectar eficientemente células en cultivo, obteniéndose una buena expresión genética del DNA, que se puso de manifiesto al determinar la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, en donde se determinó una expresión del gen reportero de hasta 30 %. Esto sugiere que el lípido estearil-lisina favorece la condensación del DNA plasmídico, protegiéndolo de la degradación enzimática en el citoplasma, con lo que se asegura su llegada al núcleo. El enlace éster del lípido puede ser hidrolizado fácilmente y, tanto la lisina como el ácido esteárico, pueden ser utilizados en los procesos metabólicos de la célula transfectada .

La interacción del plásmido pRSV $\beta$ gal con los liposomas que contenían el estearil-dilisina y el lípido ayudador, impidió que las DNAsas celulares hidrolizaran al DNA plasmídico, debido posiblemente a la condensación de este con la lisina,

dejando de ser sustrato para las enzimas. Esto sugiere que después de ser endocitado el lipocomplejo al interior de la célula, este resistirá la acción hidrolítica de las DNAsas presentes en el citoplasma, teniendo una mayor probabilidad de llegar íntegro al núcleo y expresar allí su información genética (Ewert *et al.*, 2005).

El DNA que se obtuvo presentó una relación de absorbancia 259/228 nm de 2 y presentó un perfil electroforético característico de los plásmidos. Esto indica que los procedimientos utilizados en su aislamiento y purificación, fueron adecuados para eliminar el RNA y las proteínas bacterianas contaminantes, sin causar daño al DNA. En donde se obtuvo una mayor proporción de la isoforma molecular I (superenrollada) (mayor del 60%, mientras que la isoforma III (lineal), que es la indicativa del rompimiento del DNA, se obtuvo en una proporción muy baja.

La mayor eficiencia de transfección genética, en los cultivos celulares, por lipofección, posiblemente se deba a la mayor fluidez que les confiere el colesterol a dichos lipocomplejos. El núcleo esteroidal del colesterol disminuye el empaquetamiento ordenado de las cadenas de hidrocarburo del ácido esteárico, porque al insertarse entre estas cadenas, las separa y disminuye su interacción, con lo cual hace más fluida la bicapa lipídica de los liposomas (Baeza *et al.*, 1998). Esta mayor fluidez puede facilitar el proceso de fusión con la membrana celular y la endocitosis de los lipocomplejos, las cuales son las vías más comunes de penetración de los liposomas al interior de la célula (Zabner *et al.*, 1995; Spagnou *et al.*, 2004). Además, el colesterol presenta una estructura semejante a los lípidos de forma molecular cónica, al tener un área de la región polar (OH) más pequeña que el área transversal de la región no polar, lo que posiblemente le permite interactuar con el lípido estearil-lisina, para que este no forme micelas y por lo tanto se forme la bicapa lipídica característica de los liposomas y pueda favorecer la captación de la célula por endocitosis (Hui *et al.*, 1996; Mardv *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2005). Por lo tanto, las células captan una mayor cantidad de DNA y como consecuencia se produce una mayor expresión del gen introducido.

La relación molecular entre el lípido estearil-lisina y el DNA, es un paso clave para poder obtener mejores eficiencia de transfección, ya que el exceso de cargas positivas interactuarían con mayor fuerza con el DNA impidiendo que se libere en el interior de la célula para poder expresarse. En cambio, si hay pocas cargas positivas, el DNA interacciona más laxamente y podría liberarse fácilmente en el citoplasma, por lo que podría ser degradado antes de llegar al núcleo. Por lo tanto, la relación DNA/lípido catiónico, que ha resultado mejor para la transferencia del material genético es de 1µg de DNA/5 µg de lípido catiónico. Además, la relación más adecuada de lípidos fue de 1:1 (p/p), entre el estearil-lisina y el colesterol como lípido ayudador.

Se cree que la interacción y la mezcla de los lípidos catiónicos con los lípidos aniónicos presentes en las membranas de los organelos celulares, como la mitocondria, podrían producir toxicidad por la formación de un par iónico. En la mitocondria, la cardiolipina está en mayor proporción y la formación de un par iónico entre esta y un lípido catiónico, pudiera explicar la toxicidad asociada con la trasfección con liposomas catiónicos, con activación de procesos inflamatorios: formación y liberación de complemento, activación y síntesis de interferón y de factores de la coagulación (Griesenbach *et al.*, 2004).

El diseño y síntesis del lípido estearil-lisina se basó en la utilización de compuestos que se encuentran de manera natural en las células de mamíferos, por lo que probablemente fueron degradados fácilmente por las células en el proceso de transfección y al parecer no se formó un par iónico con los lípidos aniónicos, presentes en las membranas celulares, por lo tanto carecieron de toxicidad hasta una concentración de 50 µg de lípido/7X10<sup>5</sup> células. Por lo tanto, este lípido podrá ser utilizado como un vehículo eficiente y seguro para la transferencia de genes, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Con base en lo anterior y después de demostrar la efectividad del lípido estearil-lisina, en la transfección de células C33, se requiere hacer estudios de su

efectividad en la transfección en diferentes líneas celulares, así como de cultivos primarios y de animales de experimentación. También, determinar las mezclas lipídicas que den lugar a una mayor transfección celular, utilizar diferentes medios de cultivo y plásmidos, para establecer las condiciones más adecuadas para poder obtener una transfección celular altamente eficiente en animales de experimentación.

## VII. CONCLUSIONES.

- Se llevó a cabo el diseño y síntesis del lípido catiónico estearil-dilisina.
- El método más apropiado para sintetizar el lípido catiónico fue el de la esterificación de aminoácidos polares.
- El lípido estearil-dilisina se purificó y caracterizó por su punto de fusión, cromatografía en capa fina y espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear, con lo que se comprobó la presencia del enlace éster que se formó entre el 1-octadecanol y la dilisina.
- Con este lípido catiónico se formaron liposomas con el colesterol como lípido ayudador y en presencia del DNA plasmídico se formaron los lipocomplejos.
- Estos nuevos lipocomplejos llevan a cabo la transferencia de genes en células en cultivo de la línea C33, con una eficiencia de hasta 30% y no presentaron citotoxicidad.

## IX. REFERENCIAS.

- Aguilera A. (2002). Diseño y síntesis de un lípido catiónico para su uso en transferencia de genes; *Tesis de Maestría, E.N.C.B. – I.P.N.*
- Avery O.T., McLeod C.M., McCarty M. (1995). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *Mol Med. May;1(4):344-65.*
- Baeza I., Aguilar L., Ibañez M. and Wong C. (1998). Papel estructural y funcional de los lípidos en las membranas biológicas. *Mensaje Bioquímico. 23, 51-77.*
- Bangham, A. (1968). Membrane models with fosfolipids. *Progr. Biophys. Mol Biol. 18:29-35.*
- Boulaiz H., Marchal JA., Prados J., Melguizo C., Aranega A. (2005). Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol. Sep 2;51(1):3-22.*
- Castro F., Portelles Y. (1997). Transfección de ADN a células de mamíferos. *Biotecnología Aplicada Volumen 14 No. 3, pp. 149-161*
- Conwell C.C., Huang L. (2005). Recent Advances in Non-viral Gene Delivery. *Adv Genet. 53 PA:1-18.*
- Chesnoy S., and Huang L.. (2000). Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 27-47.*
- Dagleish A.G. (1997). Why gene therapy?. *Gene Ther. 4:629-630.*

- Feng B., Sandig. V., and Lieber A. (2005). Development and Assessment of Human Adenovirus Type 11 as a Gene Transfer Vector. *J. Nanosci. Nanotechnol. Aug;5(8):1199-203.*
- Dittmar K.M., Xie J., Hunter F., Trimble C., Bur M., Frenkel V., and Li K. C. P. (2005). Pulsed High-Intensity Focused Ultrasound Enhances Systemic Administration of Naked DNA in Squamous Cell Carcinoma Model: Initial experience. *Radiology 235:541-546.*
- Dokka S., Toledo D., Shi X., Ye J., and Rojanasakul Y. (2000). High efficiency gene transfection of macrophages by lipoplexes. *Int. J. Pharm. 206, 97-104.*
- Dropulic B. (1998). Novel lentiviral vectors for human gene therapy. *Expert Opin Investig Drugs. Jun;7(6):997-1001.*
- Durviz, L. (1997). Terapia Génica. *Divulgación científica. Universidad de Valencia, España. 12: 125-140.*
- Eliot M, (2003). Gene therapy on trial. *Science. 288: 951-957.*
- Ewert K., Evans H.M., Ahmad A., Slack N.L., Lin A.J., Martin-Herranz A., Safinya C.R. (2005). Lipoplex Structures and Their Distinct Cellular Pathways. *Adv. Genet. 53PA:119-155.*
- Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., and Felgner P.L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem. 269, 2550-2561.*

- Ferrari M.E., Rusalov D., Enas J., and Wheeler C.J. (2002). Synergy between cationic lipid and co-lipid determines the macroscopic structure and transfection activity of lipoplexes. *Nucleic Acids Res.* 30, 1808-1816.
- Ferber D. (2001). Gene therapy: safer and virus free? *Science* 23 November Vol. 294. no. 5547, pp. 1638 – 1642.
- Fewell J.G., Matar M., Slobodkin G., Han S.O., Rice J., Hovanes B., Lewis D.H., Anwer K. (2005). Synthesis and application of a non-viral gene delivery system for immunogene therapy of cancer. *J. Control Release*.
- Fillion M. C: and Phillips N. C. (1997). Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1329: 345-356.
- Fritz J.D., Herweijwr H., Zhang G. And Wolf J.A. (1996). Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 7, 1395-1404.
- Graham, F. and Prevac (1991). Manipulation of adenovirus vectors. In *Methods in Molecular Biology: Gene transfer and expression protocols. 7: 109-128. The human press. Clifton, NJ.*
- Griesenbach U, Geddes D.M, Alton E.W. (2004). Advances in cystic fibrosis gene therapy. *Curr. Opin. Pulm. Med.* Nov. 10(6):542-6.
- Harris, J. and Lemone, N. (1996). Strategies for targeted gene therapy. *Tech. Focus.* 12: 89-95.

- Heller LC, Ugen K, Heller R. (2005). Electroporation for targeted gene transfer. *Expert Opin Drug Deliv. Mar;2(2):255-68.*
- Huber, B. E. (1994). Gene Therapy for neoplastic diseases. *Ann. Acad. Sci. 716: 2-23.*
- Hui S.W., Langner M., Zhao Y., Ross P., Hurley E. And Chan K. (1996). The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophysica. J. 71: 590-599.*
- Ibañez M., Garilio P., Rangel L., Chávez. P., Wong C., y Baeza I. (1991). La tecnología del liposoma en la transferencia de genes en eucariontes. *Ann. Esc. Nac. Cien. Biol. Mex. 36: 123-138.*
- Iliés M.A. nad Balaban A.T. (2001). Recent developments in cationic-lipid mediated delivery and gene therapy. *Expert Opin. Ther. Patents 11, 1729-1752.*
- Kaneda Y., Yamamoto S., Nakajima T. (2005). Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. *Adv Genet.;53:307-32.*
- Keown L. (1990). Methods for introducing DNA into mammalian cells. *Meth. Enzimol. 185:527-537.*
- Kostarelos K., Miller A.D. (2005). What Role Can Chemistry Play in Cationic Liposome-Based Gene Therapy Research Today? *Adv Genet. 2005;53PA:69-118.*
- Kumar J, Shukla S.M, Bhat V, Gupta S, Gupta M.G. (2005). In Vitro Plant Regeneration and Genetic Transformation of *Dichanthium annulatum*. *DNA Cell. Biol. Nov;24(11):670-9.*

- Li Z., Zhu S., Gan K., Zhang Q., Zeng Z., Zhou Y., Liu H., Xiong W., Li X., Li G. (2005). Poly-L-lysine-Modified silica nanoparticles: a potential oral gene delivery system. *Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, P R. China.*
- Lima M.C., da Cruz M.T., Cardoso A.L., Simoes S., de Almeida L.P. (2005). Liposomal and viral vectors for gene therapy of the central nervous system. *Curr. Drug. Targets CNS Neurol- Disord. Aug;4(4):453-65.*
- Lo H.W., Day C.P., Hung M.C. (2005). Cancer-specific gene therapy. *Adv. Genet. 54:235-55.*
- Lundstrom K. (2005). Biology and application of alphaviruses in gene therapy. *J. Virol. April; 79(8): 5090–5104.*
- Mahato R.I., Smith L.D., and Rolland A. (1999). Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy. *Adv. Genet. 41: 95-156.*
- Mang Y., Poeschla E. and Flossie W. S. (2002). *Gene Therapy 1: 13-26.*
- Mardv, H., Reszka, R., Bohlender, J. abn Wagner, J. (2001). Efficacy of cationic liposome-mediated gene transfer to mesangial cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Mol. Med. 79: 184-189.*
- Miller, A.D. (1992). Retroviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Inmunol. 158:1-24.*
- Miller, A.D. (1998). Cationic liposome systems in gene therapy. *Curr. Res. Mol. 1:494-503.*

- Mohr, L., Yoo, S. K., Eastman, S.J., Chu, Q., (2001). Cationic liposome-mediated gene delivery to the liver and to hepatocellular carcinomas in mice. *Biochem. Biophys. Acta.* 12: 799-809.
- Nabel, G.J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Fox B. A. (1993). Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity and lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11307-11311.
- Nicolazzi C., Garinot M., Mignet M., Scherman D., and Bessodes M. (2003). Cationic lipids for transfection. *Curr. Med. Chem.* 10, 1263-1277.
- Palmer L., Jeffs L.B., Chan K.P., McKlintock K., Giesbrecht C., Heyes J., Lee A.C.H., and MacLachlan I. (2004)..Systemic delivery and tumor gene expression using polycation-precondensed DNA prepared as stable plasmid lipid particles. *Mol. Ther.* 9, 979.
- Pavlin M, Kanduser M, Rebersek M, Pucihar G, Hart G.X, Magjarevic R, and Miklavcic R. (2005). Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension. *Biophys. J.* 88: 4378-4390.
- Pislaru S., Janssens S. P., Gersh B. J., Simar R. D. (2002). Defining Gene Transfer Before Expecting Gene Therapy: *Circulation* 106: 631-636
- Selden R. (1987). DNA Transfection. *In: Kingston J, editor. Current Protocols in Molecular Biology. Oxford: Currents Protocols Ltd.*
- Smith K.C, Neu J.C, Krassowska W. (2004). Model of creation and evolution of stable electropores for DNA delivery. *Biophys J.* May;86(5):2813-26.

- Sokol, D., L. Andf Gewirtz, M. 1996). Gene Therapy: Basic concepts and recent advances. *Eukary. Gene Express.* 6: 29-57.
- Spgnou S., Miller A.D., and Keller M. (2004). Lipid carriers of siRNA: Diferences in the formulation, cellular uptake and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* 43, 13348-13356.
- Tagawa T., Manvell N., Brown N., Keller M.,Perouzel E., Murray K.D., (2002). Characterisation of LMD virus-like nanoparticles self-assembled from cationic liposomes, adenovirus core peptide mu and plasmid DNA. *Gene Ther.* 9, 564-576.
- Tuting T. (1999). The immunology of cutaneous DNA immunization. *Curr Opin Mol Ther. Apr;1(2):216-25.*
- Graham F. And Van der Eb A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology.* 1973 Jan;51(1):11-23.
- Verma IM, Weitzman MD. (2005). Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.;74:711-38. Review.*
- Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T. Poellinger P.A., and Welsh M.J. (1995). Celular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 270, 18997\_19007.
- Zhang J.S, Liu F, Conwell C.C, Tan Y, Huang L. (2005). Mechanistic studies of sequential injection of cationic liposome and plasmid DNA. *Mol Ther.* Oct 18