

USO DE QUITOSANO PARA LA RECUPERACIÓN DE ADN

M. Helena Jahuira-Arias^{1,3,*}, Alejandra Pando¹, Janet Acosta¹, Edith Arocutipa¹, Hilda Solis³, José Cconislla², Ily Maza², Christian Jacinto², Ana Valderrama², Holger Mayta¹

1. Departamento de Ciencias. Laboratorio de Investigación y Desarrollo. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Avenida Honorio Delgado # 430, San Martín de Porres, +51, Lima, Perú. Correo electrónico: jahuirah@gmail.com
2. Departamento de Química. Universidad Nacional de Ingeniería. Avenida Tupac Amaru s/n, San Martín de Porres. Lima, Perú
3. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Universitaria/Calle Germán Amézcaga s/n. Lima-Perú.

Recibido: Septiembre 2016; Aceptado: Febrero 2017

RESUMEN

El quitosano es un biopolímero lineal derivado de la desacetilación de la quitina que es ampliamente usado como agente potencial en aplicaciones biomédicas debido a su carga catiónica, biodegradabilidad y biocompatibilidad. La modificación química permite incrementar sus propiedades. El quitosano puede presentar complejos con el ADN a través de interacciones electrostáticas entre las unidades de glucosamina protonada del quitosano y la carga negativa de los grupos fosfatos del ADN. Por ello, en este estudio se propuso como objetivo modificar el quitosano para mejorar sus propiedades de interacción con el ADN sintetizando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%. Para demostrar la captura de ADN se evaluó factores como el pH y la concentración, la evaluación se realizó mediante PCR en tiempo real, empleando ADN plasmídico.

Los resultados de caracterización demostraron que logró la modificación química del quitosano confirmado mediante espectrofotometría Infrarroja (FTIR). La mayor capacidad de adsorción de ADN se logró en medio a pH 6,9, la concentración óptima de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% fue de 6 mg/mL y el límite de detección fue de 10 copias/ul de ADN plasmídico.

Palabras claves: Quitosano, micropartículas, adsorción, interacciones electrostáticas, DNA, espectroscopia

ABSTRACT

Chitosan is a linear biopolymer derived from deacetylation of chitin which is widely used as a potential agent in biomedical applications due to their cationic charge, biodegradability and biocompatibility. Chemical modification can increase their properties. Chitosan can present complex with DNA through electrostatic interactions between protonated glucosamine units of the chitosan and the negatively charged phosphate groups of DNA. Therefore, in this study set out to modify the chitosan to improve its properties of interaction with DNA using cross-linked chitosan microparticles with 1% glutaraldehyde. To demonstrate DNA capture factors as pH and concentration was evaluated, the evaluation was performed by real-time PCR using plasmid DNA.

The characterization results achieved showed that chemical modification of chitosan, which was confirmed by infrared spectrophotometry (FTIR). The DNA absorption maximum was achieved at medium at pH 6.9, the optimum concentration of cross-linked chitosan microparticles with 1% glutaraldehyde was 6 mg/mL and the detection limit was 10 copies/ul plasmid DNA.

Keywords: Chitosan, microparticles, absorption, electrostatic interactions, DNA, Spectroscopy

INTRODUCCIÓN

El quitosano es obtenido de la desacetilación de la quitina que normalmente se encuentra en los exoesqueleto de crustáceos (cangrejos, camarones, langostas, sepia) y paredes celulares de los hongos, es un biopolímero catiónico biodegradable en comparación a los biopolímeros aniónicos,

los catiónicos se estudian ampliamente por formar complejos electrostáticos con biomoléculas aniónicas como ácidos nucleicos y proteínas [1–3]. El quitosano consiste de unidades repetidas de D–glucosamina y N–acetil–D–glucosamina, unidas por puentes glucosídicos, la unidad de D–glucosamina tiene un valor de pKa de aproximadamente 6,5, lo que conduce a la protonación de los grupos amina libres en medio ácido y/o pH neutro [4,5]. Debido a su carga catiónica, el quitosano puede formar complejos a escala nanométrica con ácidos nucleicos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas y de ese modo proporcionar una protección eficaz de los complejos con ácidos nucleicos. A través del tiempo numerosas modificaciones químicas del quitosano se han desarrollado con el fin de mejorar su eficiencia, generalmente modificaciones hidrófobas, hidrófilas, anfifílicas, etc. [6]. El interés de la modificación de quitosano con glutaraldehído se ha incrementado recientemente, la reacción de glutaraldehído con los grupos amina primaria produce la reticulación covalente con glutaraldehído, esta modificación es explorada en muchas circunstancias con el fin de detectar la presencia de funciones orgánicas amina libre [7].

En este artículo, usamos micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%) mediante análisis en PCR en tiempo real, se evaluaron factores como el pH y la concentración de micropartículas para mejorar la capacidad de adsorción.

Los hallazgos de este estudio podrían proveer importante información para futuras aplicaciones en el campo del diagnóstico molecular.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. Quitosano de mediano peso molecular (75–85% desacetilación), glutaraldehído de grado I, 25%, fenol–clorofórmol–alcohol isoamílico 25:24:1, ácido 2 morfolino–ácido etanosulfónico (MES), Tris–KCl, fueron obtenidos de *Sigma–Aldrich*. Ácido acético (99,9%), etanol de grado molecular de *Merck*, tampón fosfato salino (*Life Technologies*), agua ultra pura (*Milipore*).

El ADN obtenido del plásmido recombinante pZErO que contenía un fragmento de ADN genómico de 195 pb de *Arabidopsis thaliana*–IAC (Internal amplification control).

Equipos. Se utilizó una balanza analítica (*Ohaus*) con sensibilidad $\pm 0,0001$ g, las reacciones se llevaron a cabo en plancha de calentamiento con agitación magnética (*Velp Scientifica*), tamices (*W.S. Tyler*) No 100, estufa (*Fisher Scientific*), liofilizador (*Lobconco*). Para la caracterización físico–química se utilizó: Espectrómetro FTIR 1800 (*Shimadzu*). Para la evaluación de la calidad y cantidad de ADN se utilizó *Nanodrop (Thermo Scientific)* y para el PCR en tiempo real el termociclador *Light Cycler® 96 System (Roche, LifeScience)*.

Metodología. Síntesis de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído

al 1%. Para la síntesis se disolvieron 2 gramos de quitosano de peso molecular medio (*Sigma Aldrich*) en 150 mL de ácido acético al 2% (*Merck*), el entrecruzamiento se logró agregando glutaraldehído (*Sigma Aldrich*) a una concentración final de 1% (v/v). La mezcla se mantuvo bajo agitación constante en una plancha con control de temperatura (*Velp Scientifica*) hasta que se observó la formación de un gel (> 8 horas). Posteriormente, se filtro y lavó con abundante agua ultra pura (*Milipore*) para remover el entrecruzante que no reacciono, posteriormente el quitosano se seco en una incubadora (*Fisher Scientific*), a la temperatura de 60°C. Por último, se liofilizó durante 48 horas y finalmente se procedió a moler mecánicamente y reducir el tamaño de la muestra obtenida mediante un tamiz con una malla de No. 100 (*W.S.Tyler*).

Caracterización del quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%. Espectroscopia FTIR. Los espectros infrarrojos fueron realizados en espectrofotómetro infrarrojo con transformada de *Fourier*. Se prepararon películas del mismo disolviendo 250 mg de quitosano en 50 mL de ácido acético al 6% (v/v) formándose un gel transparente y viscoso, este gel se colocó en moldes plásticos con un área de 13 cm de diámetro y a continuación se secaron a temperatura ambiente en ausencia de luz hasta la obtención de la película.

Las muestras fueron analizadas y los espectros obtenidos de múltiples escaneos. La resolución espectral fue de 4 cm^{-1} en un intervalo de las regiones $400\text{--}4.000\text{ cm}^{-1}$.

Factores de unión entre el micropartículas de Quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%) con ADN. El efecto del pH para la formación de complejos quitosano–ADN fue evaluado mediante el uso de tres diferentes tampones: ácido 2,morfolino–etanosulfónico (MES, 20 mM, pH 5), ácido 2,morfolino–etanosulfónico (MES, 20 mM, pH 6), Tampón fosfato salino (PBS, 20 mM, pH 6,9), adicionando 5 mg/mL de micropartículas y ADN (50 ng) en cada uno de estos tampones. La suspensión permaneció en un constante movimiento rotativo durante 60 minutos. Posteriormente las micropartículas fueron separadas mediante centrifugación a máxima velocidad (21.000 g). El sobrenadante fue transferido a un tubo de 1,5 mL para su posterior evaluación. El ADN fue separado del complejo micropartícula de quitosano–ADN mediante la extracción con una mezcla de fenol y cloroformo. El ADN purificado fue guardado a -20°C , hasta su evaluación.

Posteriormente, se evaluó la cantidad necesaria de micropartículas de quitosano entrecruzado (1%) en intervalos de 2 a 8 mg/mL, siguiendo la metodología anterior. Todos los ensayos fueron realizados como mínimo por duplicado.

Obtención de ADN plasmídico. Células que contenían el IAC que contiene una secuencia de *Arabidopsis thaliana*, se purificó usando el método de extracción basado *QIA prep Spin miniprep* (*Qiagen*), posteriormente se cuantificó mediante el espectrofotómetro (*Nanodrop, Thermo*

Scientific) para obtener una concentración deseada para los experimentos. El ADN fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Límite de detección del ADN empleando con micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído 1%. Se realizaron ensayos “*in vitro*” para determinar el límite de detección en muestras infectadas con ADN con y sin micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, se determinó el límite de detección a partir de ADN del plásmido IAC. Para ello se realizaron diluciones seriadas del plásmido 10^6 copias/ul hasta 10^0 copias/ul.

Cuantificación del ADN absorbido. Para cuantificar la cantidad de ADN capturado, se analizó los respectivos sobrenadantes y complejos micropartículas-ADN mediante PCR en tiempo real (qPCR) usando el termociclador *Light Cycler® 96System* (Roche Life Science) con el siguiente programa de amplificación: 2 minutos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 40 ciclos de 15 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1 minuto a $58\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La mezcla de reacción consistió usando (frase confusa) *Fast Star Universal Probe Master Mix* (Roche Diagnostics GmbH Corp, Mannheim, Germany) en un volumen final de 20 ul, se emplearon los cebadores IAC Fw a concentración 0,5 uM (5' ACCGTCATGGAACAGCACGTA 3') e IAC Rva concentración 0,5 uM (5' CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT 3') (Invitrogen, Life Sciences) y la sonda IAC Tq (Invitrogen, Life Sciences), marcada con VIC y 5 ul de ADN purificado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier. Se logró sintetizar el quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% a partir de quitosano de peso molecular medio. En la Figura 1 se pueden observar los espectros FTIR del quitosano y las micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%). Se pueden observar las bandas características de los grupos funcionales del quitosano que corresponden a la vibración de los grupos $-\text{NH}_2$ a 3.364 cm^{-1} , grupo $-\text{OH}$ a 3.292 cm^{-1} , grupos N-H de una amida primaria a 1.659 cm^{-1} , en 1.379 cm^{-1} corresponde al $-\text{CH}_3$ y deformación del C- CH_3 , a 2.919 y 2.876 cm^{-1} corresponde a las tensiones del grupo C-H, a 1.033 y 1.091 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del esqueleto propias de su estructura y finalmente a 884 cm^{-1} la tensión C-H de los grupos anoméricos, todos ellos resultan acordes a las características planteado por Hidalgo et al. [8]. Respecto a las micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído al 1% se evidencia que el contenido de los grupos de carbonos e hidrógenos se incrementan, sin embargo el contenido del nitrógeno se reduce, al final de la reacción

a 1.635 cm^{-1} se observa el grupo imino que se forma al entrecruzar el quitosano con glutaraldehído comprobándose la modificación química, también reportada por Oryton et al. [7].

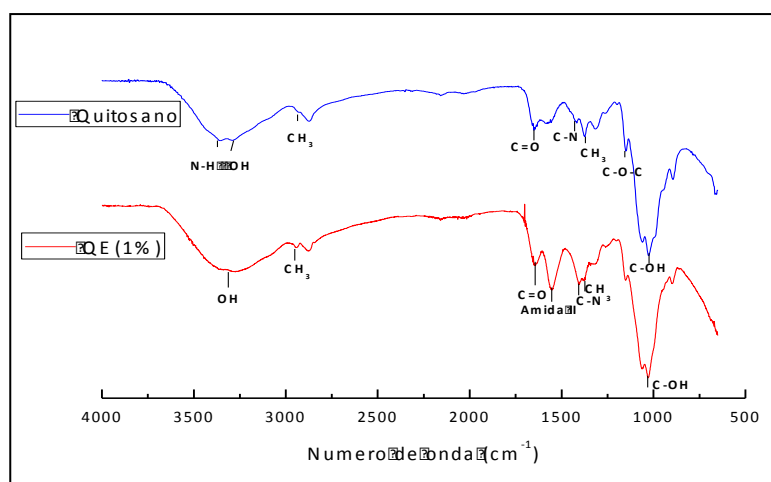


Figura 1. Comparación de los espectros FTIR del quitosano y micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%.

Factores de adsorción de ADN usando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%). La evaluación mediante qPCR demostró la capacidad de adsorción del ADN plasmídico. Los resultados a diferentes valores de pH entre 5 y 6,9, nos muestra que los sobrenadantes no liberan ADN, siendo negativos a la presencia de ADN plasmídico a excepción del pH 5, por lo que podemos afirmar que existe la formación de complejos de micropartículas de quitosano con el ADN, al evaluar estos complejos, se observa que la unión es más eficiente a pH 6,9 (Figura 2). Algunos estudios reportan la capacidad de unión del quitosano con el ADN en medios ácidos, esto debido a la interacción electrostática entre la carga positiva del quitosano y la carga negativa del grupo fosfato del ADN [2], sin embargo se ha reportado que la unidad de D-glucosamina del quitosano tiene un valor pK_a de $\sim 6,5$, lo que conduce a la protonación de los grupos amino libres a pH ácido y/o pH neutro [3,4]. De acuerdo a nuestros resultados la máxima capacidad de adsorción se presenta a pH 6,9, por lo que al realizar la modificación del quitosano a micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, la capacidad de interacción debido al pK se mantiene, pero además se adiciona otro mecanismo de unión física, es así, que Fukushima et al. [9] reporta que la porosidad en conjugados entre el quitosano y el ADN se reduce en medio PBS cercano a 7, esto podría explicar un tipo de unión más estable que permite reforzar la unión de enlaces fosfodiéster, así también Krajewska et al. [10] demostraron el radio del tamaño del poro formado en membranas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído es aproximadamente 1 nm, según Pandit et al. [11] los grupos amino pueden encontrarse aún ionizados a pH por encima del pK_a del quitosano cuando interactúa con pequeñas moléculas aniónicas, demostrando la

combinación de interacciones electrostáticas e interacciones estéricas, reafirmando nuestros resultados que micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído adsorben mayor cantidad de ADN a un pH óptimo 6,9 (por encima del pK_a del quitosano).

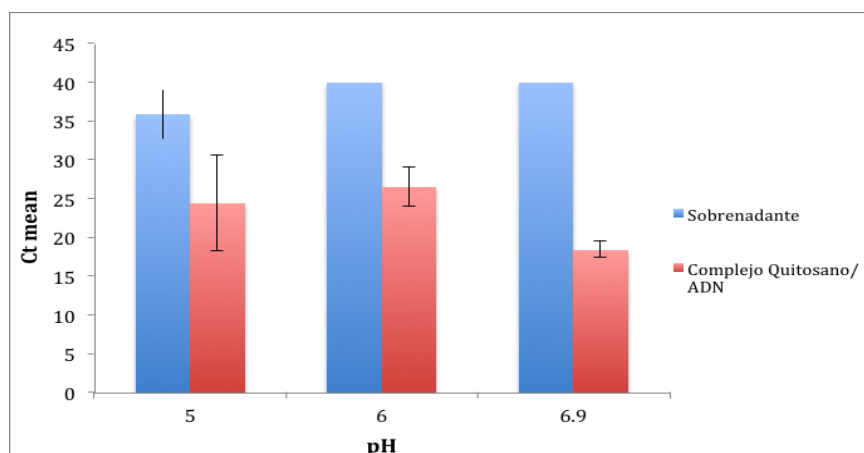


Figura 2. Evaluación de la adsorción de ADN usando micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído al 1% mediante qPCR

La evaluación de las diferentes concentraciones de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% en un intervalo de 2 a 8 mg/mL, muestran que la concentración 6 mg/mL presenta mayor capacidad de adsorción del ADN plasmídico, los sobrenadantes fueron también evaluados y solo a partir de 6 mg/mL no presento liberación de ADN (Figura 3), por estas razones la concentración de 6 mg/mL es la óptima. Otros estudios con micropartículas de hidrogel han reportado concentraciones de 7,2 mg/mL para la adsorción de proteínas [12].

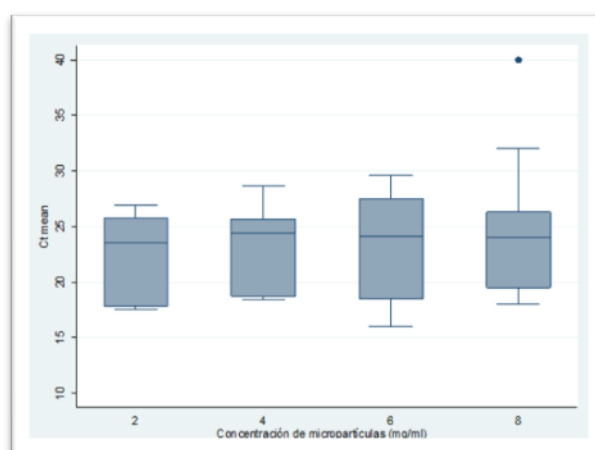


Figura 3. Adsorción del ADN a diferentes concentraciones de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%.

Límite de detección del ADN en micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído 1%.

El límite de detección de la curva preparada con diluciones de ADN plasmídico (IAC) a

diferentes concentraciones con micropartículas de quitosano entrecruzado ó sin ellas es similar en ambos (Figura 4) , por lo que puede afirmarse que el límite de detección es 10 copias/ul de ADN plasmídico (IAC). Los valores de Ct mayores son considerados negativos que representan a 1 copia/ul (Log 10⁰). El análisis de la curva del ADN plasmídico IAC presentan un R² = 0,985 y la curva de ADN plasmídico usando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% fue de R² = 0,993.

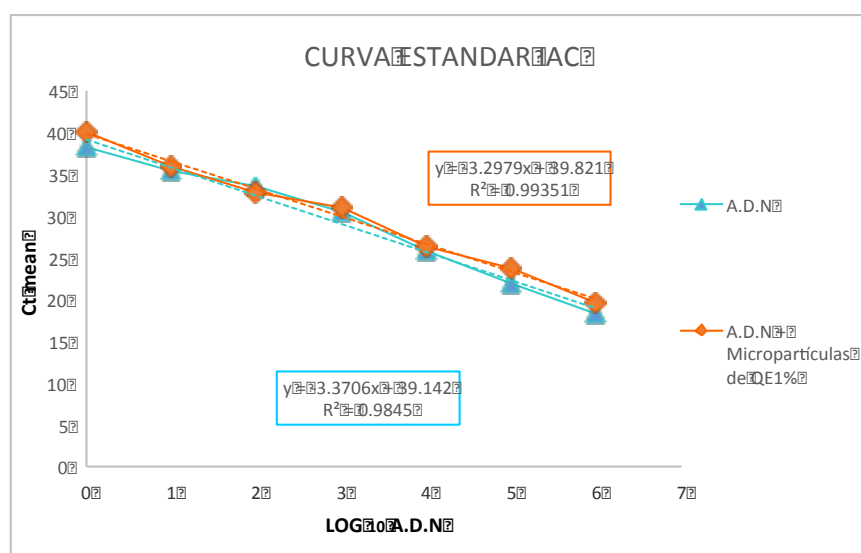


Figura 4. Comparación de curva estándar de ADN plasmídico (IAC) usando micropartículas de quitosano entrecruzado.

CONCLUSIONES

Se logró sintetizar micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, el pH óptimo para la adsorción de ADN es de 6,9, la concentración óptima de micropartículas para adsorber 50 ng de ADN plasmídico (IAC) es de 6 mg/mL. Finalmente el límite de detección usando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% es de 10 copias/ul de ADN.

Agradecimientos. Queremos agradecer la colaboración del *Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ing. Química de la Universidad Nacional de Ingeniería y Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Esta investigación ha sido financiada por *Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad–Innovate Perú (FINCyT N° 118–PNICP–PIAP–2015)*.

BILIOGRAFÍA

1. H. Onishi, Y. Machida. "Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan on in mice", *Biomaterials*, **20**, 175 (1999)
2. Cao W, Easley CJ, Ferrance JP, Landers JP, *System Analytical Chemistry*, **78**, 7222 (2006)

3. Samal SK, Dash M, Van Vlierberghe S, Kaplan DL, Chiellini E, van Blitterswijk C, Moroni L, Dubruel P, *Chem. Soc. Rev.*, **41(21)**, 7147 (2012)
4. Anthonsen MW, Smidsrød O, *Carbohydr. Polym.*, **26**, 303 (1995)
5. Domard A, *PH .Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, 98 (1987)
6. Layek B, Lipp L, Singh J, *Int. J. Mol. Sci.*, **16(12)**, 28912 (2015)
7. Oyrton AC, Monteiro Jr, Claudio Airoidi, *Intern. J. Biological Macromolecules*, **26**, 119 (1999)
8. Hidalgo C, Fernández M, Nieto O, Paneque A, Fernández G, Llopiz J, *Rev. Iberoam. Polímeros*, **10(1)** (2009)
9. Fukushima T, Hayakawa T, Kawaguchi M, Ogura R, Inque Y, Morishita K, K. Miyazaki, *Dental Material J.*, **24(3)**, 414 (2006)
10. Krajewska B, Olech A, *Polym. Gels Networks*, **1**, 33 (1996)
11. Pandit K, Nanayakkara I, Cao W, Raghavan S, White IM, *Analytical chemistry*, **87**, 21 (2015)
12. Castro-Sesquen Y, Gilman RH, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Sánchez G, Valencia E, Liotta L, Bern C, Luchini A "The working group on Chagas diseases in Bolivia y Perú", *PLoS One. PLoSNegl Trop. Dis.* **8(10)** (2014)