



# Tlamati Sabiduría

## Estandarización de una técnica básica para la síntesis de liposomas y encapsulamiento de proteínas recombinantes

Héctor Javier Lasso-Ávila<sup>1</sup>  
Jonás Lomborg-García<sup>1</sup>  
Ruth A. Lezama-Palacios<sup>2</sup>  
Irene Castillo-Álvarez<sup>3</sup>  
Miguel Ángel Mendoza-Catalán<sup>1</sup>  
Guillermo Jesús Balboa-Bueno<sup>1</sup>  
Luis Fernando Carbajal-Romero<sup>1</sup>  
Carlos Ortuño-Pineda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas, s/n Ciudad Universitaria, 39070. Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>2</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Manuel Carpio s/n, Col. Plutarco Elías Calles, Delegación Miguel Hidalgo, 11350, Ciudad de México, México.

<sup>3</sup>Departamento de Física, Centro de Investigación de Estudios Avanzado. Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07360 Ciudad de México, México.

\*Autor de correspondencia  
[ortunoc@outlook.com](mailto:ortunoc@outlook.com)

### Resumen

Los liposomas están compuestos por fosfolípidos que se auto-ensamblan en bicapas formando un interior acuoso donde se pueden encapsular fármacos que pueden dirigirse a tejidos específicos a través de estrategias de orientación activa o pasiva. El uso de liposomas es una propuesta para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de pulmón. Sin embargo, poco se ha estudiado al respecto,

### Información del Artículo

#### Cómo citar el artículo:

Lasso-Avila H.J., Lomborg-García J., Lezama-Palacios R.A. Castillo-Álvarez I., Mendoza-Catalán M.A., Balboa-Bueno G. J., Carbajal-Romero L.F., Ortuño-Pineda C. (2023). Estandarización de una técnica básica para la síntesis de liposomas y encapsulamiento de proteínas recombinantes. *Tlamati Sabiduría*, 15, 140-110.

Editores Invitados: Dr. Carlos Ortuño-Pineda; Dra. Mayrut Osdely Urióstegui-Acosta

Recibido en la versión aceptada por los editores invitados: 19 de marzo 2023; Publicado: 26 de septiembre de 2023



debido a la carencia de blancos terapéuticos adecuados. Estudios recientes han revelado que la falta de actividad del factor transcripcional REST está relacionado con la adquisición del fenotipo neuroendocrino y la conversión oncogénica en cáncer de pulmón, por lo que puede ser propuesto como blanco terapéutico experimental. El objetivo de este trabajo fue estandarizar un método de purificación de lecitina, generación de liposomas y encapsulamiento de proteínas. Para ello se purificó lecitina de huevo utilizando una mezcla de éter:acetona (1:1) y lavados con etanol frío. La formación de las películas lipídicas se realizó por evaporación en frío en cloroformo:metanol (2:1). Finalmente, la formación de liposomas y encapsulamiento de proteínas se llevaron a cabo por resuspensión en buffer Tris (10 mM). Se obtuvo una mezcla de liposomas de alrededor de 0.22  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron teñidos con azul de metileno y visualizados a 100X. Las proteínas encapsuladas fueron analizadas por desnaturalización y visualización por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, obteniendo un rendimiento de 60%. En su conjunto, los resultados muestran que el método de generación de liposomas y encapsulamiento de proteínas estandarizado en este trabajo es sencillo y se requiere de mínima infraestructura.

**Palabras clave:** Liposoma, REST, Cáncer, Lecitina, Pulmón.

### Abstract

Liposomes are composed of phospholipids that self-assemble in bilayers forming an aqueous interior where drugs that can target specific tissues can be encapsulated through active or passive orientation strategies. The use of liposomes is a proposal for the treatment of different types of cancer, including lung cancer. However, little has been studied in this regard, due to the lack of suitable therapeutic targets. Recent studies have revealed that the lack of activity of the transcriptional factor REST is related to the acquisition of the neuroendocrine phenotype and oncogenic conversion in lung cancer, so it can be proposed as an experimental therapeutic target. Recent studies have revealed that the lack of activity of the transcriptional factor REST is related to the acquisition of the neuroendocrine phenotype and oncogenic conversion in lung cancer, so it can be proposed as an experimental therapeutic target. The objective of this work was to standardize a method of lecithin purification, liposome generation and protein encapsulation. To do this, egg lecithin was purified using a mixture of ether:acetone (1:1) and washed with cold ethanol. The formation of the lipid films was carried out by cold evaporation in chloroform:methanol (2:1). Finally, the formation of liposomes and encapsulation of proteins were carried out by re-suspension in Tris buffer (10 mM). A mixture of liposomes of about 0.22  $\mu\text{m}$  was obtained, which were dyed with methylene blue and visualized at 100X. The encapsulated proteins were analyzed by denaturation and visualization by electrophoresis in polyacrylamide gel dyed with silver nitrate, obtaining a yield of 60%. As a whole, the results show that the method of generating liposomes and encapsulating proteins standardized in this work is simple and easy to perform.

**Keywords:** Liposome, REST, Cancer, Lecithin, Lung.

### Introducción

El prefijo 'nano' se refiere a un prefijo griego que significa y representa una mil millonésima parte de un metro ( $10^{-9}\text{m}$ ). La nanotecnología, es una de las tecnologías más prometedoras del siglo

XXI y se refiere a la manipulación de la materia que permiten controlar la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a dicha escala con el propósito de usarla en múltiples aplicaciones para la producción de nuevas nanoestructuras,

nanodispositivos y nanosistemas con tamaños de 1 a 100 nm conocidas como nanopartículas (Taniguchi *et al.*, 1974; Martin, 2006; Bayda *et al.*, 2019; Contera *et al.*, 2020). Dentro de estas nanopartículas existen diversas alternativas como nanotubos de carbón, dendrímeros, nanopartículas metálicas de oro y plata, nanocristales de puntos cuánticos, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas y liposomas (Borm *et al.*, 2006; De Jong *et al.*, 2008; Bhatia, 2016). Debido a estas características, las nanopartículas son candidatos adecuados para diversas aplicaciones comerciales y domésticas, que incluyen catálisis, imágenes, aplicaciones médicas, investigación basada en energía y aplicaciones ambientales (Malam *et al.*, 2009; Khan, 2019; He *et al.*, 2019; Ijaz *et al.*, 2020).

Los liposomas son vesículas con un diámetro inferior a 100 nm compuestas por bicapas lipídicas muy similares en composición y estructura a las membranas biológicas. En el laboratorio, estos pueden ser preparados tras la rehidratación de películas lipídicas, permitiendo encapsular fármacos, proteínas y/o agentes quimioterapéuticos en general, sirviendo como nanoplataformas para dirigir dichas moléculas a órganos blanco específicos (Colletier *et al.*, 2002). El uso de técnicas de encapsulación de fármacos permite mejorar la solubilidad y estabilidad de estos, así como prolongar su vida media en el plasma sanguíneo, logrando minimizar los efectos adversos. Estas nanoplataformas han sido utilizadas para la administración de fármacos como Diclofenaco Sódico (Navarro *et al.*, 2008), Ibuprofeno, Ácido Acetilsalicílico (García-Couce, 2014) e inclusive Doxorubicina, utilizado principalmente como tratamiento del cáncer, la cual presenta una toxicidad a nivel cardiaco, que se ve disminuida al ser encapsulada en liposomas. Este sistema de acoplamiento ha sido aprobado por la FDA como tratamiento (Fortina, 2007). Sin embargo, no se han reportado antecedentes de encapsulación de proteínas que sean blancos terapéuticos para diversas enfermedades, es por ello que en el presente trabajo se propone la estandarización de una técnica para la generación de liposomas y el encapsulamiento de proteínas de interés terapéutico.

A diferencia de países como Argentina y Brasil, en México aún no existe un plan nacional sobre la nanotecnología, los grupos involucrados en el desarrollo de esta tecnología trabajan de manera aislada. Sin embargo, se ha creado una red nacional de investigadores, lo que afecta el financiamiento de esta área. No obstante, en 2006 el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Nacional (CONACYT) autorizó la creación de dos laboratorios nacionales (uno en Chihuahua, el CIMAV3 y otro en San Luis Potosí, el IPCyT4) con un presupuesto de 2 millones de dólares cada uno, y estableció proyectos en áreas estratégicas a través de financiación asignada a cinco instituciones por un importe de 10,000 dólares cada uno. Además, en noviembre de 2012 en la Ciudad de México se firmaron las directrices sobre la regulación de las nanotecnologías para fomentar competitividad y proteger el medio ambiente, el ser humano la salud y la seguridad de los consumidores (Delgado-Ramos, 2014).

## **Materiales y métodos**

### *Obtención de REST recombinante (rREST)*

La cepa *E. coli* BL21 transformada con el constructo pET28a-DBD8 que expresa rREST fue inoculada en 3 mL de medio SOB suplementado con IPTG (1mM) y Kanamicina (75 ng/μL) e incubadas durante 2 horas a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 6,000 rpm durante 5 minutos, recuperando el *pellet* únicamente, este fue lavado dos veces con PBS (pH 7.0). El *pellet* fue tratado con 100 μL de *buffer* B (Anexo 1) y se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación a -20 °C y temperatura ambiente. Finalmente, éste fue centrifugado a 15,000 rpm durante 15 minutos, separando los restos membranales y el sobrenadante para su posterior análisis mediante SDS-PAGE (12 %).

### *Ensayo de Cross-Linking*

Se utilizó formaldehído (1%) como agente entrecruzador. Se tomaron dos muestras de 5 μL de las fracciones dializadas, una de estas fue tratada con formaldehído e incubada en hielo durante 30 minutos. Posteriormente ambas muestras fueron sometidas a desnaturalización

por calor durante ocho minutos, para su análisis mediante SDS-PAGE (12%).

#### *Purificación y renaturalización de rREST expresada en E. coli BL21*

La purificación de rREST fue realizada por medio del método modificado de dos pasos de desnaturalización y uno de re-plegamiento (Yang *et al.*, 2011). Las células fueron centrifugadas a 6,000 rpm durante 5 minutos y posteriormente lisadas en buffer B a temperatura ambiente durante 60 minutos, el lisado fue centrifugado a 15,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante del lisado fue incubado con 2 ml de resina agarosa Ni-NTA (Qiagen, Germany) previamente equilibrada con buffer B, el complejo Ni-NTA-6His rREST fue eluido 8 veces en gradiente de pH y dializado en buffer de con gradiente de urea (4 M de urea 2 horas, 2 M de urea 2 horas, 1 M de urea 1 hora y 0 M de urea diálisis toda la noche), posteriormente las eluciones seleccionadas fueron nuevamente desnaturalizadas con buffer B y finalmente replegadas por diálisis fraccionadas con 40 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, glicerol 20%, 10 mM β-mercaptoethanol, pH 7.3, bajando la concentración de urea, 5 M, 3 M, 1 M por 2 horas cada uno y 0 M durante toda la noche.

#### *Extracción de lecitina de huevo*

La lecitina fue extraída a partir de la yema del huevo, para ello, la yema fue tratada con 20 mL de éter etílico y un volumen de acetona igual al del éter. La mezcla fue filtrada en papel filtro, recuperando la fase retenida por el papel, esta fase fue lavada dos veces con 25 mL de alcohol frío, filtrando la mezcla y recuperando la fase acuosa que contiene lecitina de manera soluble. La lecitina recuperada fue colocada en un horno a 50°C para la evaporación total del solvente.

#### *Generación de liposomas y encapsulamiento de rREST*

Para la formación del *film* lipídico se pesaron 0.09 g de lecitina, que fueron resuspendidos en 10 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1) en una concentración final de 0.017 μM. Posteriormente, se realizaron alícuotas en

volúmenes de 100 μL, dejando evaporar dos veces a temperatura ambiente y una tercera vez a -20°C. El *film* lipídico formado por la lecitina fue resuspendido en 150 μL de *buffer* con proteína disuelta. Esta preparación fue sometida a tres ciclos en *vortex* con intervalos de un minuto de agitación por un minuto de descanso en hielo. Posteriormente se colocó 10 μL de las muestras en un portaobjetos y fue teñida con 1 μL de azul de metileno, las preparaciones fueron observadas en un microscopio con los objetivos de 40X y 100X.

#### *Monitoreo de liposomas*

Los liposomas fueron filtrados cargando 100 μL de la preparación en un tubo capilar (Corning), colocando un filtro con un poro de 0.22 μm de diámetro en un extremo del tubo capilar (Millipore, número de catálogo GVWP 013 00), y debajo de esto se colocaron toallas de papel absorbente. Los filtros fueron recuperados y lavados con 15 μL de agua MQ. Su análisis se realizó en SDS-PAGE (12%) teñido con nitrato de plata.

## **Resultados**

#### *Análisis in silico de la hidrofobicidad, expresión y purificación de REST recombinante*

Primero realizamos un análisis *in silico* con el software ProtParam de la secuencia aminoacídica de la proteína para conocer las características bioquímicas de la misma, principalmente los patrones de hidrofobicidad. Los resultados obtenidos mostraron que rREST está compuesta por 308 aminoácidos (100%), conteniendo en su mayoría Lisina (12%), el cual tiene una naturaleza hidrofílica y posee una carga positiva. Sin embargo, el 25% total de los aminoácidos que componen a rREST son de naturaleza hidrofóbica. Entre los aminoácidos hidrofóbicos con mayor presencia se encuentran la Valina (5.5%), Alanina (4.9%) y Prolina (4.9%), localizados sobre toda la estructura polipeptídica (Fig. 1A). Esto es importante ya que los métodos de purificación y renaturalización de una proteína dependen de las características de su secuencia de aminoácidos, además, del correcto plegamiento

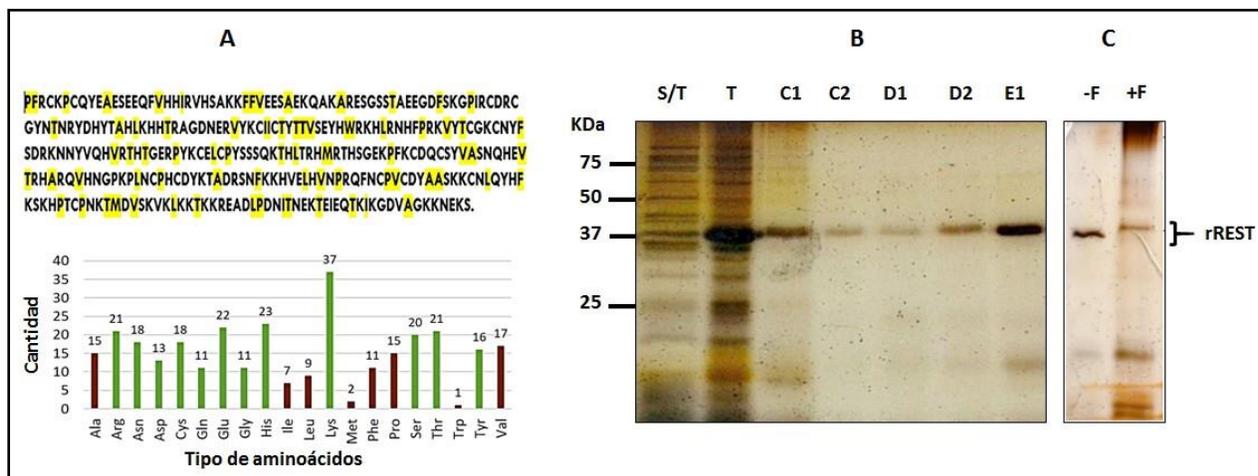


Figura 1. Composición bioquímica y purificación del DBD recombinante de REST. A) Secuencia de aminoácidos que conforman a rREST, se resaltan en color amarillo los aminoácidos de naturaleza hidrofóbica (arriba). Composición aminoacídica con relación a la cantidad de estos presentes en rREST. En color café se visualizan los aminoácidos hidrofóbicos que representan el 25% y en color verde, los aminoácidos hidrofílicos que representan el 75% restante (abajo); B) Monitoreo de las fracciones representativas del proceso de purificación de rREST. S/T: Lisado total de *E. coli* sin transformar, T: lisado total de *E. coli* transformada, C-E: lavados con gradientes de pH, E1 fracción correspondiente a la proteína eluida de la resina de purificación. c) Monitoreo del ensayo de Cross-Linking con 1% de formaldehído.

depende su solubilidad en el buffer de encapsulamiento en los liposomas.

Para la expresión de rREST las cepas de *E. coli* BL21 transformadas con el constructo pET28a-DBD8 fueron inducidas con IPTG (1mM) e incubadas 2 horas a 37 °C. Las colonias fueron lisadas y separadas en fracciones citoplasmáticas y fracciones membranales. El monitoreo de la expresión y purificación de rREST se muestra en la Figura 1B. Para descartar la presencia de agregados macromoleculares de rREST debidos a un mal plegamiento de la proteína durante el proceso de renaturalización, se realizó un entrecruzamiento con 1% de formaldehído en condiciones nativas. Aunque se observó dimerización de la proteína purificada, la mayor proporción de la proteína se encontró en forma de monómeros (Fig. 1).

#### Formación de liposomas y encapsulamiento de REST

Una vez obtenida la proteína recombinante se purificó la lecitina de huevo, la cual fue

rehidratada con 150  $\mu$ L de la solución de resuspensión conteniendo una concentración de 20  $\mu$ g/ $\mu$ L de REST recombinante. La formación de liposomas se observó a 100X, en la cual se identificaron poblaciones de liposomas unilamelares de diferentes tamaños, estos se clasificaron en pequeños (SUV) y grandes (LUV), con un rango de diámetro de 0.22-2.0  $\mu$ m, obteniendo un promedio de 126 por campo. La preparación fue cargada en un tubo capilar, el cual contenía un filtro de 0.22  $\mu$ m en un extremo. La filtración se realizó por gravedad y los liposomas fueron recuperados del filtro usando agua MQ, obteniendo un promedio de 77 liposomas por campo. Recuperando aproximadamente el 50 % de los liposomas formados. La eficacia de encapsulación de la proteína en los liposomas mostró un rendimiento del 58%, lo cual representa un total de 11.6  $\mu$ g de una concentración inicial de 20  $\mu$ g (Fig. 2).

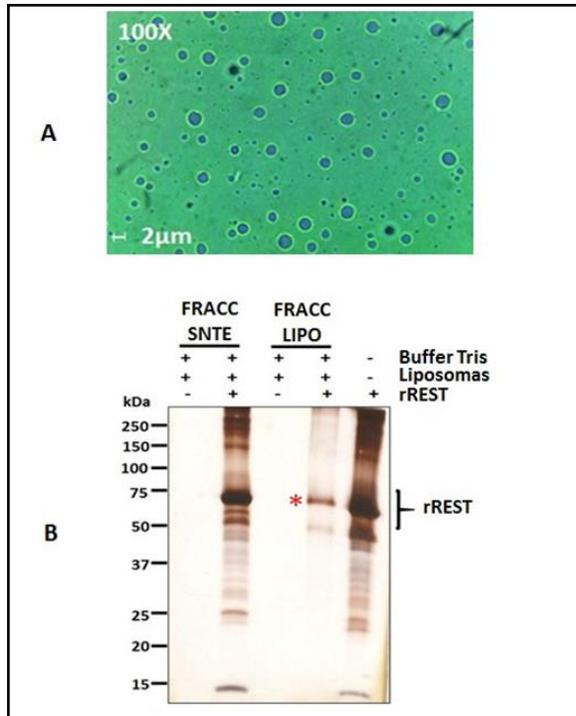


Figura 2. Encapsulamiento de rREST en los liposomas y monitoreo de la proteína encapsulada. A) Vista al microscopio de las preparaciones de liposomas. B) Monitoreo de las proteínas encapsuladas en los liposomas. Se muestra el monitoreo del sobrenadante y la fracción liposomal. La banda marcada con asterisco corresponde a la proteína encapsulada y recuperada por desnaturalización de los liposomas.

## Discusión

La presencia de rREST en las fracciones membranales de las células transformadas, indica la formación de Cuerpos de Inclusión (CI), que se forman cuando la proteína recombinante es expresada en mayor concentración y ésta no puede ser tolerada como proteína soluble en el citoplasma celular. La proteína rREST forma CI al ser expresada en *E. coli* BL21, debido a que esta proteína es extremadamente insoluble. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos obtenidos por Yang y colaboradores, quienes expresaron REST en *E. coli*. Estos CI fueron anteriormente descritos por Rogl y colaboradores y que la formación de CI se da al expresar algunas proteínas recombinantes extremadamente insolubles o con una gran diferencia filogenética

entre los genes expresados y la célula hospedera *E. coli* (Rogl *et al.*, 1998). Aunque los CI, a menudo han sido considerados indeseables, su formación puede ser una ventaja ya que su aislamiento de los homogenados es conveniente para la purificación.

El método de rehidratación permite la encapsulación eficiente de proteínas sin que estas se desnaturalicen. Por lo tanto, la rehidratación de las películas lipídicas da lugar, en primera instancia a la formación de vesículas multilaminares no homogéneas, sin embargo, la sustitución de métodos como la sonicación y la extrusión por aplicación de los ciclos en *vortex* es adecuado para la formación de liposomas tipos *small unilamellar vesicle* (SUV) y *large unilamellar vesicle* (LUV) como se muestra en los resultados obtenidos. Por otro lado, el método de filtración por capilar propuesto en este trabajo permite la recuperación de los liposomas de volúmenes extremadamente pequeños. Las muestras sometidas a esta técnica se observaron al microscopio, donde se encontró una disminución en las poblaciones de liposomas, debido a que el tamaño del poro del filtro utilizado es de un diámetro de 0.22  $\mu\text{m}$ , lo cual sugiere que la mayoría de la población de liposomas es del tipo SUV con un tamaño de diámetro promedio de 0.22  $\mu\text{m}$ .

## Conclusión

La lecitina de huevo utilizada en este trabajo como materia prima para la generación de liposomas permite una alta eficiencia en la encapsulación de proteínas, pues permite la formación de vesículas de diversos tipos y tamaños. Además, esta materia prima tiene un impacto económico de bajo costo en comparación con otros sistemas disponibles en el mercado.

## Referencias

- Bhatia, S. (2016). Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *In* Bathia, S. (Ed). Natural Polymer Drug Delivery Systems. Springer, 33-93.
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience

- and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 25, 112.
- Borm, P.J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, 3, 11.
- Contera, S., Bernardino de la Serna, J., Tetley, T.D. (2020). Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4, 551-554.
- Colletier, J.P., Chaize, B., Winterhalter, M., Fournier, D. (2002). Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnology*, May 10;2:9.  
[doi: 10.1186/1472-6750-2-9](https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-9).
- Delgado-Ramos, G.C. (2014). Nanotechnology in Mexico: global trends and national implications for policy and regulatory issues. *Technology in Society*, 37, 4-15.
- De Jong, W.H., Borm, P.J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3, 133-149.
- Fortina, P., Kricka, L.J., Graves, D.J., Park, J., Hyslop, T., Tam, F., Halas, N., Surrey, S., Waldman, S.A. (2007). Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer. *Trends in Biotechnology*, 25, 145-152.
- García-Couce, J., Bada-Rivero, N., López-Hernández, O.D., Nogueira-Mendoza, A., Caracciolo, P.C., Abraham, G.A., Ramón-Hernández, J.Á., Peniche-Covas, C. (2014). Recubrimiento de microesferas de quitosana-ibuprofeno con un complejo interpolimérico pH dependiente. *Revista Cubana de Farmacia*, 48, 646-657.
- He, X., Deng, H., Hwang, H.M. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27, 1-21.
- Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13, 223-245.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 908-931.
- Malam, Y., Loizidou, M., Seifalian, A.M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 592-599.
- Martin, C.R. (2006). Welcome to nanomedicine. *Nanomedicine*, 1, 5-5.
- Navarro, G., Cabral, P., Malanga, A., Sabio, E. (2008). Diseño de liposomas para el transporte de diclofenac sódico. *Revista Colombiana de Ciencia y Química Farmaceutica*, 37, 212-223.
- Rogl, H., Kosemund, K., Ku, W., Collinson, I.Y. (1998). Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FBS Letters*, 432, 21-26.
- Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nanotechnology. *Proceeding of the International Conference on Production Engineering*, Tokyo, 18-23.CPE.
- Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., Wang, X. (2011). Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a Two-Step-Denaturing and refolding method. *Plos One*, 6, 1-8.