

Técnicas

Transferencia de genes en células de mamíferos

ANGEL AGUILERA

El empleo de las técnicas de transferencia de genes ha tomado un auge apreciable en los últimos años.

Es conocido que muchos aspectos importantes en Virología y otras especialidades, se han aclarado gracias al uso de distintas técnicas de transfección.

El desarrollo de la Ingeniería Genética permitió el clonaje y la manipulación de genes eucariotas en células procariotas. Por otro lado, se ha ido incrementando el interés de reintroducir genes eucariotas en células eucariotas, lo que facilitaría un análisis más adecuado de la expresión de dichos genes.

En las técnicas de transfección se utilizan, tanto moléculas de ADN de alto peso molecular provenientes de células de mamíferos, como genes eucariotas clonados en diferentes vectores. Entre las técnicas más empleadas se encuentran: precipitación con fosfato de calcio, precipitación con DEAE-Dextran, vectores virales, microinyección directa, el uso de liposomas y protoplastos, etcétera.

Comentaremos algunos aspectos prácticos de la técnica de coprecipitación con fosfato de calcio.

En esta técnica hay tres componentes importantes:

1. ADN exógeno.
2. Células receptoras.
3. Solución tamponada.

ADN exógeno

El ADN exógeno puede provenir de diferentes fuentes. Puede ser introducido a la célula como tal o en forma de genes clonados en diferentes vectores.

Como ejemplo, a continuación se describirá una de las técnicas reportadas en la literatura para obtener ADN de adenovirus, empleado en la transformación de células de mamíferos:

- a) El virus se purifica en gradiente de cloruro de cesio.
- b) Se dializa contra 200 volúmenes de Tris-HCl durante dos horas como mínimo, a 4°C.
- c) Se trata con papaína. El tratamiento con proteasa es necesario para eliminar las proteínas que se encuentran covalentemente unidas al ADN viral.

- d) Después de una hora a 37°C, se añade SDS, incubándose la solución a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- e) Se continúa el proceso de extracción con un volumen igual de fenol saturado, mediante rotación ligera para evitar la degradación del ADN. Este paso se realiza durante 15 minutos a 4°C.
- f) Se centrifuga, tomándose la fase acuosa superior, a la cual se le repite el tratamiento en otras dos ocasiones.
- g) La fase acuosa se trata tres veces con éter saturado y se dializa contra 200 volúmenes de Tris-HCl durante 24 horas.
- h) Por último, se determina a 250, 260 y 280 nm. La cantidad de ADN se calcula basándose en que una unidad A₂₆₀ equivale a 50 µg de ADN por ml.

Células receptoras

Se emplean líneas celulares de diferentes orígenes. En muchas de ellas aparecen focos de células transformadas. Es por ello que se recomienda el empleo de células recientemente descongeladas, ya que en ellas la aparición de focos espontáneos es mucho más baja.

Solución tamponada

Para lograr una adecuada transformación de las células se requiere una cuidadosa preparación de la solución tamponada de HEPES (STH). Esta comúnmente se prepara doble concentrada (50 mM de HEPES, 280 mM de cloruro de sodio y 1,5 mM de fosfato disódico). El pH se ajusta a $7,1 \pm 0,05$. Se filtra en placas de 0,22 µm y se congela a -70°C en tubos de polipropileno para asegurar una mayor estabilidad. Una vez descongelada y antes de comenzar la experiencia, se debe volver a medir el pH. La solución sobrante, una vez concluido el trabajo, se descarta.

La solución de cloruro de calcio se prepara a una concentración 250 mM (2x). Se recomienda su preservación a -20°C o utilizarse recién preparada.

Los pasos fundamentales de la técnica de precipitación con fosfato de calcio son:

1. El día anterior, se siembran las células a una concentración de $5 \cdot 10^5$ por placa de 60 mm de diámetro.
2. Al día siguiente, 4 ó 5 horas antes de comenzar la experiencia, se cambia el medio de cultivo a las placas. Las células deben estar semiconfluentes.
3. Se hace la dilución del ADN objeto de estudio en la solución de cloruro de calcio doble concentrada. Se mezcla suavemente. Muchos autores añaden a esta mezcla ADN de timo de ternero o de esperma de salmón. En general, se recomienda que en esta solución la concentración de ADN total no sea mayor de 20 µg por ml, ya que esto provoca una apreciable disminución de la eficiencia de la transformación.
4. El precipitado se forma añadiendo la mezcla cloruro de sodio-ADN a un tubo que contenga un volumen igual de STH 2x. Se aconseja que la mezcla sea añadida gota a gota, burbujeando con una pipeta la solución tamponada de HEPES.
5. Se deja formar el precipitado de fosfato de calcio-ADN, sin mover el tubo, por no más de 45 minutos a temperatura ambiente. El precipitado puede presentarse de varias formas. Su apariencia no parece estar correlacionada con la eficiencia de la transformación.
6. Mezclar suavemente el precipitado y añadir 0,4-0,5 ml del mismo a cada placa. En caso que se emplee ADN recombinante, se recomienda no añadir más de 1 µg a la placa, ya que esto afecta también la eficiencia de la transformación.

7. Incubar las placas 4 horas a 37°C. El tiempo mínimo de incubación es de tres horas y el máximo de cinco horas.
8. Después de lavar las células con medio de cultivo que contenga suero bovino fetal, se añade 1 ml de DMSO al 25% o glicerol al 15-25% en solución tamponada de HEPES 1x. Este paso es extremadamente crítico, ya que las células no deben estar en contacto con el DMSO o glicerol por más de cuatro minutos. El número de placas sembradas con células a emplear dependerá de la destreza del operador. El grado de toxicidad del DMSO varía de acuerdo con el tipo de célula empleada, por lo que recomendamos, previo a la experiencia, determinar la dosis menos tóxica.
9. Lavar las células con medio de cultivo que contenga suero bovino fetal al 10%.
10. Añadir a las placas medio de cultivo con suero bovino fetal al 10%. Algunos autores agregan dexametasona al medio de cultivo, la cual se emplea para lograr una mejor identificación de los focos de células transformadas, y en algunos casos aumenta la eficiencia de la transfección.
11. Generalmente los focos se desarrollan a las 2-3 semanas.
12. Finalmente, los focos son tripsinizados, y mediante la técnica de clonaje celular se obtiene la línea de células transformadas deseada.

Para comprobar que los focos representan células transformadas por el ADN exógeno, es necesario demostrar que éste está integrado a la célula, empleándose para ello diferentes técnicas, lo cual no será motivo de análisis en este trabajo.

En general, las técnicas de transferencia de genes a células de organismos superiores tienen la desventaja de que sólo un bajo porcentaje de ellas toman el ADN exógeno. Es por ello que frecuentemente se reportan en la literatura científica modificaciones en los procedimientos técnicos que permitan incrementar este porcentaje.

Una de estas modificaciones consiste en la transferencia directa de genes clonados en *E. coli*.

De forma resumida, este proceder consiste en convertir las bacterias en protoplastos, los cuales se añaden a las células crecidas en placas Petri, provocándose la fusión de las mismas mediante el empleo de la centrifugación y polietilenglicol. Las células se lavan y se les añade medio de cultivo. Los focos generalmente aparecen después de los 10 días.

La técnica antes referida permite la posibilidad de transferir ADN a un alto porcentaje de las células en el cultivo.

Las ventajas de esta técnica son obvias, aunque se reporta la desventaja de no poderse establecer líneas celulares estables portadoras del genoma de interés, requiriéndose repetir en cada experimento el proceso de transferencia de éste.

El lector interesado en el tema podrá encontrar más información en las publicaciones siguientes:

BOLLON, A. P. y S. J. SILVERSTEIN (1982). *Techniques of DNA-Mediated Gene transfer for Eukaryotic Cells*. En: *Techniques in Somatic Cell Genetics*, pág. 415, editado por J. W. Shay. Plenum Press, New York-London, USA.

GRAHAM, F. L. y A. J. VAN DER EB (1973). *A new technique for the assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 ADN*. *Virology* 52, 456-467.

GREEN, M. y S. M. WOLD (1979). *Human Adenovirus: Growth, Purification and Transfection Assay*. En: *Methods in Enzymology*, Vol. LVIII, pág. 425, editado por W. B. Jakoby e I. H. Pastan, Academic Press, USA.

- HOWARD, B. H. (1983). *Vectors for introducing genes into cells of higher eukaryotes*. TIBS, **8**, 209-212.
- KRONTIRIS, T. G. y G. M. COOPER (1981). *Transforming activity of human tumor DNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **78**, 1181-1184.
- RASSOULZADEGAN, M.; B. BINETRUY y F. CUZIN (1982). *High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells*. Nature, **295**, 257-259.
- SCANGOS, G. y F. H. RUDDLE (1981). *Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells- a review*. Gene **14**, 1-10.