

TRANSFECCIÓN DE ADN A CÉLULAS DE MAMÍFEROS

✉ Fidel Ovidio Castro y Yangtsé Portelles

División de Genética de Células de Organismos Superiores. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162. La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 8070; teléfono: (53-7) 21 8008 ext. 1592; E-mail: transg@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Transfection of foreign DNA into living cells *in vitro* is a powerful research tool in both molecular and cell biology. By means of the different transfection techniques available at present, one can stably change the genetic make-up of a cell as to produce recombinant proteins from it, or test the strength of a gene promoter coupled to a reporter gene, among many other applications. In this review are discussed the most important transfection techniques with special emphasis in advantages and disadvantages of each one. Reporter gene systems for use in eukaryotic cells are also presented and discussed. As an important conclusion, it is noted that any given transfection protocol needs to be optimized for a given cell line.

Key words: transfection, GFP, polyethilenimine, mammalian cells, transgenesis

Biotecnología Aplicada 1997;14:149-161

RESUMEN

La transfección o introducción de material genético exógeno a células en cultivo es una eficaz herramienta en los estudios de biología molecular y celular. Mediante las diferentes técnicas de transfección se puede alterar establemente el genoma de una célula para que produzca una proteína recombinante o evaluar de forma rápida y transitoria la fortaleza de un promotor acoplado a un gen reportero, entre otras muchas aplicaciones. Las distintas técnicas de transfección empleadas para células de mamíferos son discutidas en esta revisión, sobre la base de sus atributos y desventajas. También son abordados los sistemas de genes reporteros más utilizados en transfecciones transientes. Se concluye que cada método de transfección debe ser optimizado para una línea celular dada.

Palabras claves: transfección, GFP, polietilenimina, células de mamíferos, transgénesis

Aspectos generales

La posibilidad de introducir ADN en células en cultivo ha permitido estudiar más profundamente las funciones y el control de la expresión de los genes de mamíferos. Existen diferentes métodos para la introducción de ADN foráneo en células de cultivo. Algunos de estos métodos se basan en producir un ambiente químico adecuado que provoca la adhesión del ADN a la superficie de las células de donde es endocitado por mecanismos aún no claramente establecidos; otros implican el uso de un campo eléctrico para abrir poros en las células, a través de los cuales presumiblemente pasa el ADN al interior de la célula y en los últimos años se han generalizado métodos que aprovechan, por una parte, la capacidad de los polímeros de condensar sobre sí al ADN y por otra la de los liposomas de proteger esta unión de la degradación lisosomal y elevar la capacidad fusogénica de estos complejos. Otras técnicas como el microbombardeo con partículas cubiertas con ADN, la microinyección de genes en los núcleos de células y algunas menos comunes se han utilizado para introducir genes en células no sólo de mamíferos sino en organismos superiores de forma general.

El empleo de uno u otro método depende en gran medida de la línea celular que se emplee, el objetivo

de la transfección, el gen a introducir, la economía del laboratorio y la disponibilidad de equipamiento adecuado. Cada método, además, debe ser optimizado para cada línea celular antes de ser empleado de forma rutinaria en las transfecciones. La vía más simple para optimizar los parámetros de las transfecciones es utilizar un gen "reportero", o sea aquel cuyo producto sea fácilmente detectable por métodos analíticos no complejos y poco costosos. Los genes reporteros permiten una cuantificación indirecta de la fortaleza de los promotores, así como de la eficiencia de los sistemas de transfección.

El procedimiento que brinde los resultados mejores en una línea celular dada no necesariamente va a ser óptimo para otra, por lo que deben ser ensayados varios y escoger aquel que mayor eficiencia ofrezca. En la Tabla I se ofrece una comparación simplificada de los beneficios de cada método de transfección. Como se aprecia no existe un método que reúna en sí todos los atributos óptimos tales como: útil para transfecciones estables y transientes, fácil de realizar, de bajo costo y lo suficientemente versátil como para transfectar cualquier tipo de célula.

El advenimiento de la tecnología de los liposomas y más recientemente el uso de polietilenimina como agente de transfección, han representado

✉ Autor de correspondencia

Tabla 1. Métodos de transfección de células de mamíferos.

Método	Utilidad	Costo	Facilidad ^a	Versatilidad ^b	Referencias
Fosfato de calcio	Transiente y estable	+	+	++	1-4; 7-10
DEAE-dextrana	Transiente	+	+	++	19-21
Electroporación	Transiente y estable	+++	+	+++	47-66
Microinyección	Estable	++++	+++	+	67
Bombardeo de ADN	Transiente y estable	+++	++	+	78-87
PEI	Transiente, estable?	+	+	?	32
Lipofección	Transiente y estable	++	+	+++	35-46

^aFacilidad, se refiere a la complejidad de la técnica; mayor número de cruces implica mayor complejidad

^bVersatilidad, se refiere a la aplicabilidad de la técnica para distintos tipos de células en cultivo; mayor número de cruces indica mayor versatilidad

PEI, polietiliminina

avances hacia el reactivo universal de transfección, pero aún quedan problemas por resolver, como es el costo en el caso de los sistemas comerciales de liposomas y verificar la versatilidad de la polietiliminina para transfecciones estables en una amplia gama de células.

De forma general los métodos para introducir ADN en células de mamíferos se pueden dividir en tres grupos:

1. Transfección mediada por agregados inorgánicos (precipitación con fosfato de calcio).
2. Transfección mediada por polímeros catiónicos acoplados o no a grupos lipídicos (DEAE-dextrana, liposomas, polietiliminina y otros).
3. Transfección mediada por efectos físicos o mecánicos (fusión de protoplastos, electroporación, microinyección, bombardeo de microproyectiles recubiertos con ADN).

En este trabajo de revisión se abordarán los principales métodos de introducción de ADN en células de mamíferos. Se discutirán también la utilidad de los sistemas de genes reporteros, desde la óptica del ensayo de las construcciones genéticas en células antes de ser empleadas para la generación de animales transgénicos en diferentes especies.

Transfección mediada por agregados inorgánicos (fosfato de calcio)

Los coprecipitados de fosfato de calcio (hidroxiapatita) y de ADN purificado se han empleado por más de 20 años para la transferencia y expresión de información genética en células de mamíferos en cultivo. Esta técnica fue descrita por vez primera para introducir ADN de adenovirus en células de mamíferos por Graham y van der Eb en

1973 (1). Posteriormente se demostró que era posible integrar este ADN exógeno a los cromosomas (2). Esta técnica ha devenido una de las más populares para la transfección estable o transiente de células de mamíferos y ha sido estudiada en detalle por varios grupos en el mundo (3-8).

La precipitación por fosfato de calcio se ha empleado para el análisis de la replicación del ADN y la funcionabilidad de los promotores en experimentos transientes en los cuales las células son procesadas 48 a 60 h después de la transfección. Es además la técnica más difundida para la producción de líneas celulares establemente transformadas. Su superioridad en ese sentido con respecto a la transfección mediada por DEAE-dextrana es reconocida. Se cree que una célula transfectada por fosfato de calcio captura más ADN que una transfectada por DEAE-dextrana (9).

El principio de precipitación del ADN por el fosfato de calcio es simple, pero la formación de un coprecipitado óptimo de ADN y fosfato de calcio es difícil de repetir debido fundamentalmente a una serie de parámetros que afectan la solubilidad del calcio y del fosfato. La mayoría de los autores ha encontrado gran variabilidad en la eficiencia con la cual distintas líneas celulares toman el ADN mediante la precipitación con fosfato de calcio (8) y normalmente recomiendan "protocolos optimizados". Sin embargo se ha estudiado poco la naturaleza de las complejas relaciones entre los distintos componentes que originan la formación del estado sobresaturado imprescindible para la precipitación del ADN.

Factores que afectan la formación del precipitado calcio-fosfato-ADN

Según Jordan y colaboradores (8) hay tres aspectos esenciales que afectan la formación del precipitado,

a saber, la concentración de ADN, la temperatura y el tiempo de la reacción de precipitación.

Un exceso de ADN soluble en la solución sobresaturada de calcio y fosfato puede prolongar el período durante el cual se forma el precipitado. Se ha demostrado que a altas concentraciones, el ADN puede incluso evitar la formación de dicho precipitado (8). Es por esto que reviste especial importancia la preparación del ADN que se transfectará, ya que errores en la determinación de la concentración de los plásmidos o contaminantes presentes en la preparación, que absorban a 260 nm, van a influir sustancialmente en la naturaleza del precipitado. Es de vital importancia por ende el disponer de una preparación de ADN de alta pureza y con concentración minuciosamente corroborada para las transfecciones.

La solubilidad de la hidroxiapatita es mayor a bajas temperaturas y este parámetro influyó decisivamente en la eficiencia de la transfección de células de mosquito según los autores (8). A pesar de que la hidroxiapatita es considerada insoluble en agua, se ha notado la ausencia de precipitado en soluciones estándares a temperaturas cercanas a los 0 °C (7). La mayoría de los protocolos sugieren trabajar a temperatura ambiente, pero la práctica ha demostrado que es imprescindible un estricto control sobre la temperatura de la reacción.

En este sentido son de gran importancia los experimentos de Jordan y colaboradores (8). Este grupo desarrolló una metodología para evaluar la formación del precipitado ADN-fosfato de calcio. Esto permite optimizar los parámetros y comprobar las soluciones antes de realizar las transfecciones. La esencia del método consiste en incubar el ADN con el calcio y el fosfato durante los períodos de tiempo y a temperaturas prefijadas y posteriormente medir la absorbancia de la solución a 320 nm (en esta longitud de onda absorbe el ADN unido a la hidroxiapatita). A continuación, se precipita la hidroxiapatita y el ADN por centrifuga rápida. El sobrenadante es leído a 260 nm y en principio sólo el ADN no acoplado debe quedar en éste.

Esta sencilla metodología se convierte de hecho en una poderosa herramienta para optimizar las transfecciones mediadas por fosfato de calcio, ya que una vez caracterizadas las nuevas soluciones, incluidos los nuevos lotes de plásmidos, se pueden realizar series de transfecciones bajo las mismas condiciones sin necesidad de reoptimización.

La formación del precipitado es un proceso dinámico que concluye con la transferencia de éste al medio de cultivo con las células, donde es diluido varias veces. El tiempo durante el cual se permite la formación del precipitado es un parámetro clave. En los protocolos originales (1), se sugiere un tiempo de 30 min para la formación de un precipitado óptimo. Chen y Okayama (3, 4) publicaron la primera optimización profunda de los métodos originales

y sugieren 20 min. Sin embargo los estudios recientes llevados a cabo en la Universidad de Melbourne (7, 10) demostraron que, por el contrario, la asociación óptima del ADN con el fosfato y el calcio ocurría en una ventana de tiempo extremadamente estrecha entre 0,5 y 1 min. El fundamento racional para disminuir tan drásticamente los tiempos de reacción se basa en el hecho de que con el tiempo, los precipitados tienden a crecer. El precipitado formado en un minuto tiene la apariencia de un polvillo compuesto por múltiples partículas pequeñas, muy fino y cubre homogéneamente las células, a los cinco minutos se observan menos partículas pero más grandes y a los 40 min, el precipitado es grosero y mayor incluso que la propia célula (8, Castro, F.O. observaciones no publicadas). Estos autores obtuvieron hasta 100 % de eficiencia de transfección empleando esos tiempos de formación del precipitado en células de hepatoma humano HuH7.

Semejante eficiencia absoluta es indudablemente un fenómeno raro, que bien pudiera estar relacionado más con la estirpe celular que con el método en sí, ya que sólo otro reporte había sido descrito con anterioridad con semejante eficiencia, para otra línea de hepatomas humanos; HepG2 (11), utilizando los protocolos tradicionales (1). En general se asume que eficiencias de entre 60-70 % son los valores a alcanzar con protocolos óptimos, basados en los alcanzados para células de riñón de mono verde africano (COS-7; 70 %, 12).

Jordan y colaboradores (8) han confirmado los hallazgos de O'Mahoney y Adams, (7) y reportan hasta un 60 % de eficiencia de expresión del gen lacZ en células de ovario de hamster chino carentes del gen de la dehidrofolato reductasa (CHO DHFR) y hasta 38 % para células HEK-293 de riñón embrionario humano, empleando un minuto como tiempo de formación del precipitado.

En resumen, el ajuste de la concentración del ADN, la temperatura de la reacción y el tiempo de duración de ésta, son parámetros que han de ser fijados independientemente para cada línea celular.

Factores que afectan la eficiencia de la transfección en las células

Asumiendo la formación de un precipitado óptimo, aún quedan otros parámetros de vital importancia para una eficiente transfección, aquellos relacionados con el comportamiento de las células y las condiciones de incubación de éstas con el precipitado.

La causa más común de fallos en las transfecciones se cree está en la estabilidad del pH de la solución de sales. El rango de pH óptimo para la transfección es de entre 7,02-7,1 (1). Sin embargo otros autores (7) sugieren pH entre 6,96 y 7,02. El ajuste del pH en rangos tan estrechos cae prácticamente dentro de los límites de error de la mayoría de los equipos de determinación de pH disponibles comer-

cialmente. Por ello como criterio último de eficiencia debe establecerse el de la formación de un fino precipitado sobre las células en un tiempo de aproximadamente 20 min (7, 8). Nuestra experiencia de trabajo con células epiteliales de glándula mamaria (HC-11, 13), confirman los hallazgos descritos anteriormente y por ello es precisamente la formación del precipitado la que ha de ser controlada cuidadosamente sin fijar ventanas de tiempo para ello.

Un segundo problema comúnmente encontrado es que el medio celular se torna en extremo ácido inmediatamente que se añade el coctel de la transfección, esto pudiera conllevar a la formación de un precipitado muy grosero y a la muerte celular. Es este el caso para las transfecciones realizadas en medio RPMI-1640, la mayoría de los grupos ha encontrado que es imprescindible cambiar las células a medios menos ácidos como el DMEM- α antes de la transfección, lo cual garantiza la sobrevivencia de las mismas (14).

El tiempo que las células son incubadas con el precipitado varía de acuerdo con la línea celular, así por ejemplo, células HeLa, NIH 3T3, CHO son transfectadas rutinariamente dejando el precipitado actuar por 16 h; otras células como COS-7 no pueden sobrevivir tan largos tiempos de exposición (15). Las células epiteliales mamarias HC-11 pueden ser incubadas hasta 20 h con el precipitado sin detrimento para su viabilidad (Portelles, Y., remitido para su publicación).

Chen y Okayama (4) y Sambrook y colaboradores (16) han publicado variantes de los protocolos originales para células que son crecidas en monocapa, pero tripsinizadas durante la transfección. Estas variantes incluyen la formación del precipitado durante una incubación prolongada (15-24 h) posterior a la siembra de las células. La ventaja de este método radica en que permite transfectar células polarizadas (células epiteliales secretoras), las cuales de modo general no son fáciles de transfectar debido a que la superficie apical es la única que tiene acceso al ADN y esta superficie en dichas células está altamente especializada para secretar, por lo cual se supone que sea la causa de la baja eficiencia de transfección que normalmente se obtiene en ellas (16).

La eficiencia de transfección puede ser aumentada si se emplea el procedimiento de shock osmótico de las células con DMSO o glicerol (17). Sin embargo eso es válido sólo para algunas líneas celulares como CHO, DUKX, BII, las cuales aumentan dramáticamente su capacidad de transfectarse cuando son sometidas a esos procedimientos, mientras que otras líneas como COS-7, HeLa no responden a los shocks con incremento de la frecuencia de transfección (18). En células HC-11 no se logra un aumento de la eficiencia mediante el uso de shocks con crioprotectores (Portelles, Y, remitido para su publicación).

Transfección mediada por polímeros catiónicos

Transfección por DEAE-dextrana

El diethyl aminoethyl dextrana (DEAE-dextrana) fue empleado originalmente para facilitar la entrada de ARN de poliovirus a células (19) y posteriormente para introducir ADN de virus SV40 y poliovirus (20, 21). El método, sujeto a modificaciones menores, se emplea aún en la actualidad para la transfección de genomas virales y plásmidos a células eucariotas.

De forma general esta técnica difiere de la de fosfato de calcio en tres aspectos: 1) se emplea sólo para la transfección transiente de células, 2) trabaja de forma eficiente para algunas líneas celulares tales como BSC-1, CV-1 y COS-7 (16), pero no para otras, debido a su toxicidad y 3) se emplean menores cantidades de ADN.

Han transcurrido más de 30 años desde los primeros reportes del uso de esta metodología, sin embargo poco ha variado la misma, si bien existen protocolos alternativos en los cuales las células son preincubadas con el DEAE-dextrana varias horas antes de ser añadido el ADN (22), o se varía el tiempo de exposición al DEAE-dextrana en dependencia de su concentración (16).

El mecanismo por el cual el DEAE-dextrana permite la entrada del ADN a la célula y su transporte hasta el núcleo es poco conocido. Convencionalmente se asume que grandes complejos que contienen tanto ADN como DEAE-dextrana se adhieren a la superficie de la célula y de alguna forma entran mediante endocitosis (23). A pesar del poco conocimiento existente sobre este mecanismo, está probado que las transfecciones por este método son más reproducibles que aquellas con fosfato de calcio y que son además un instrumento eficaz en el estudio de la expresión génica de varios tipos de células.

La gran desventaja de esta metodología comparada con las de fosfato de calcio y como se verá más adelante también con el resto de los métodos, radica en que con DEAE-dextrana sólo se logran transfecciones transientes del ADN en la célula huésped (12). No está claro por qué esa diferencia en el destino final del ADN introducido a las células por métodos distintos.

Sussman y Milman (24) demostraron que hasta el 80 % de fibroblastos Ltk⁻ de ratón (deficientes en la enzima timidina kinasa) expresaban dicha enzima después de la transfección con el gen tk del virus Herpes simple, empleando DEAE-dextrana como vector. Por otra parte, se determinó (25) que una vez dentro de la célula, el ADN añadido por DEAE-dextrana se ensamblaba rápidamente en los nucleosomas y que prácticamente todo el ADN exógeno quedaba atrapado en esas estructuras a diferencia

del mismo ADN introducido por el método de fosfato de calcio, donde se encontraba que al menos parte del ADN estaba en forma de agregados o precipitados.

Lopata y colaboradores (26) mejoraron los protocolos existentes de transfección por DEAE-dextrana mediante la adición de DMSO o glicerol después de la transfección. Estos autores también demostraron que la citotoxicidad del DEAE-dextrana debe ser tomada en cuenta, por lo cual deben optimizarse bien las concentraciones a las que será usado así como los tiempos de exposición al mismo para cada línea celular.

Fujita y colaboradores (27) lograron optimizar los protocolos existentes al combinar el shock de DMSO o glicerol y una incubación con cloroquina o butarato de sodio. Los mecanismos de acción no están del todo establecidos aún, pero al parecer la cloroquina se une al ADN e inhibe la degradación intracelular por las hidrolasas lisosomales (28). Por su parte el butarato de sodio pudiera influir en la formación de una heterocromatina más activa para la expresión de los genes introducidos (29).

Otros policationes se han empleado para la transfección de células eucariotas, entre ellos el más popular es el polibreno. Este polication se ha empleado para facilitar la transfección en células con demostrada resistencia a la transformación por métodos convencionales, fundamentalmente por fosfato de calcio (30, 31). Por ejemplo, en células CHO, se logra hasta 15 veces mayor eficiencia en transfecciones estables utilizando polibreno que con fosfato de calcio (16).

Liposomas, policationes lipídicos comerciales y polietilénimina

El desarrollo de las técnicas de terapia génica en animales se ha basado tradicionalmente en el uso de vectores virales para portar el ADN de interés (32). Las técnicas no virales están aún a varios órdenes de magnitud de alcanzar la eficacia de aquellas virales. A pesar de esta limitación, la terapia génica mediada por plásmidos es estudiada y empleada debido a que no introduce elementos de riesgo virales para la salud del hombre. Es por ello que se ha dedicado mucho esfuerzo en los últimos años a la búsqueda de vectores no virales. En realidad el advenimiento de la terapia génica basada en vectores no virales ha significado una notable mejoría para la optimización de los métodos clásicos de transfección, tales como fosfato de calcio y DEAE-dextrana y más aún, ha despertado el interés por la búsqueda de nuevos vectores sintéticos u orgánicos.

Entre estos destacan el diseño de estructuras catiónicas de carga neta altamente positiva para que interactúen con el esqueleto fosforado de la molécula de ADN. De los polímeros catiónicos empleados en la actualidad, los que mejores resultados ofrecen en términos de transfecciones eficientes y

estables son: los polímeros de la cascada de las poliamidoaminas y las lipopoliaminas (33, 34). Estas familias de polímeros, aunque muy distintas en su estructura química, conservan una similitud adicional a su alta eficiencia de transferencia de ADN a las células: ambas contienen residuos protonables aun a pH fisiológico. Esta propiedad es clave pues permite el control de pH en el endosoma y en teoría puede proteger al ADN de la acción de degradación del sistema lisosomal.

- Liposomas. Desde su descripción en 1981, los liposomas han sido propuestos como vehículos para portar agentes farmacológicos activos (35), o información genética (36, 37). Comercialmente existen varios tipos de liposomas que se emplean en la transfección de células de mamíferos. Los más conocidos son: Lipofectin™ (Gibco-BRL., Bethesda, MD, USA), y Tfx™-50 y Transfectam®, ambos de Promega Corp., Woods Hole, Mass, USA).

- Lipofectin™. Lipofectin™ es una preparación de liposomas catiónicos compuesta por un nuevo lípido cargado positivamente; DOTMA (N[1-(2-3-dioleiloil)propil]-N,N,N-trimetilamonio y DOPE (L-dioleoil phosphatidilethanolamina, 38).

DOTMA fue diseñado mediante la aplicación de principios químicos relacionados con la forma e hidrofobicidad (39) para formar bicapas catiónicas estables. Las vesículas contenedoras de DOTMA interactúan rápida y espontáneamente con polianiones (ADN, ARN); ello origina complejos liposoma/polinucleótido con el 100 % de los polinucleótidos capturados (38, 40). Los complejos policatiónicos resultantes son capturados por la superficie celular (aniónica) con una eficiencia de 10 a 100 veces mayor que los liposomas aniónicos o neutrales (38).

Este comportamiento fusogénico de DOTMA provoca una efectiva entrega intracelular de los polinucleótidos, de modo que se obvian las enzimas degradativas presentes en el compartimento lisosomal (41, 42).

Todos estos atributos contribuyen a una transfección en extremo sencilla, repetible y eficiente en una amplia variedad de células y para un amplio rango de moléculas tales como ADN, ARN, ARN de doble cadena y oligonucleótidos (43).

- Tfx™-50 y Transfectam®. A la par de la tecnología de los liposomas, se han desarrollado en el mundo otros polímeros de propiedades similares basados en la combinación de lípidos sintéticos con DOPE. De esta manera en el mercado existen dos sistemas muy eficientes para transfecciones de células de mamíferos:

1. Tfx™-50 es la mezcla de una molécula lipídica catiónica sintética yoduro de (N',N',N',N'-tetrametil-N,N',-bis(2-hidroxiethyl)-2,3,-dioleoiloxil,4-butanediamonio y DOPE. El componente de

carga positiva está unido al esqueleto lipídico por enlaces estéricos. Las cargas positivas se unen a las negativas en el ADN o ARN y como resultado se forman vesículas multilaminales. Estas vesículas se supone que facilitan la transferencia de los ácidos nucleicos al interior de la células mediante la interacción con los lípidos de la membrana celular (42).

Este sistema ha sido probado y ha funcionado con alta eficiencia para una amplia variedad de células en transfecciones con suero o sin éste. Así por ejemplo, las líneas HeLa, HepG2, DU 145, HK-293, A431, COS-7, NIH/3T3 y BHK son transfectables con alta eficiencia mediante Tfx™-50; sin embargo, el propio fabricante ha encontrado que CV-1, CHO y PC-12, a pesar de ser transfectables también por el polímero anterior, lo son con mayor eficiencia cuando se emplea Transfectam® (44).

Las ventajas más importantes de Tfx™-50 sobre otros sistemas lipídicos existentes incluido el de Lipofectin™, son su sencillez, ya que se requiere sólo un tubo de cultivo para todas las reacciones y no emplea solución tamponada especial. Las transfecciones se pueden realizar de modo óptimo en un tiempo de sólo dos horas, lo que le confiere otra ventaja sobre los métodos usuales, que toman entre 4 y 20 h.

2. Transfectam® es un reactivo que permite alta eficiencia de transfección tanto estable como transiente en células eucariotas. Su estructura está compuesta por un catión lipídico sintético ligado con moléculas de espermina. La espermina interactúa directamente con el ADN y lo cubre con la capa lipídica catiónica, lo que facilita la unión a la membrana celular y su pase al interior de las células (45).

El atributo fundamental de Transfectam® es su gran afinidad por el ADN (dada por los grupos de espermina) y su alta eficiencia en la transfección de células recalcitrantes a la transfección. Entre las líneas que se han transfectado con este reactivo se encuentran: HeLa, HepG2, CHO, XC1, IM9, MRC5, COS-7, NIH/3T3, AtT20, PC12, 3T3 (46).

El precio de estos polímeros si bien no es en extremo alto (oscila entre los 150-220 dólares para aproximadamente 50-100 transfecciones), no es asequible para trabajo rutinario en muchos laboratorios.

- Polietilenimina. Tomando como base la capacidad de los policationes de capturar ADN en suspensión, condensarlo sobre sí y mantener las propiedades de tampón en un ambiente fisiológico, recientemente se publicó el hallazgo de un policatione que reunía todas esas condiciones: la polietilenimina (PEI). Como ventaja adicional, la PEI tiene la posibilidad de ser usada para la terapia humana debido a su inocuidad y a su eficiencia y ya ha sido probada *in vitro* e *in vivo* (32, Portelles, Y, remitido para su publicación).

La elección de PEI entre otros compuestos químicos descansó sobre la hipótesis de que existe una relación causal entre la reserva protonable de una molécula a pH bajo y su eficiencia de transfección. Esta misma relación puede ser utilizada para el diseño de otras moléculas que combinen características tales como alta reserva protonable y capas lipídicas que ayuden a la difusión transmembrana.

Estructuralmente la PEI es el polímero orgánico de mayor carga positiva que existe debido a que, cada dos átomos de carbono hay un nitrógeno de tipo amino secundario, el cual puede ser protonado. Esto provoca la unión del polímero a los grupos fosfato del ADN, quedando aún grupos positivos capaces de unirse a la membrana celular. La estructura química de la PEI protonada es la siguiente:



La PEI mantiene la capacidad de conservar esa estructura incluso a pH fisiológico, se piensa que esta simple propiedad molecular de tampón a cualquier pH le confiere al PEI su eficiencia en las transfecciones.

Boussif y colaboradores (32) demostraron que en 1 µL de una solución stock de 10 mM de PEI existen 10 nmol de nitrógeno aminados, mientras que 1 µg de ADN posee 3 nmol de fosfato. El exceso molar de aminos protonables con respecto a fósforo inorgánico en el ADN, fue empleado como medida de optimización de la transfección. Se emplearon proporciones desde 3 hasta 135 veces de exceso de PEI con respecto al ADN y resultó óptima la proporción de alrededor de 10 veces. Nuestros resultados empleando células epiteliales murinas HC-11 y CID-9, así como COS-7 y CHO coinciden con lo reportado (32). La proporción óptima de PEI:ADN fue 9:1. Cuando se elevó ésta al doble (18:1), la eficiencia se disminuyó drásticamente (Portelles, Y., remitido para su publicación, Castro, FO, observaciones no publicadas).

El uso de la polietilenimina es aún incipiente. Boussif y colaboradores (32) transfectaron diferentes líneas celulares y en todos los casos se obtuvieron resultados positivos. Las líneas en cuestión fueron: 3T3, HepG2, COS-7, HeLa y MRC-5. Además se logró, empleando PEI como vector, la expresión *in vivo* en cerebro de ratones neonatos, de un gen reportero y de pequeños fragmentos de oligonucleótidos. Este último resultado es muy importante ya que ofrece la posibilidad de usar PEI como vector universal para transferencia de genes *in vivo* e *in vitro*.

Electroporación de células de mamíferos

La electroporación es una técnica de introducción de ADN a células en cultivo y se lleva a cabo mediante la aplicación de pulsos eléctricos a las células, lo que provoca la apertura de poros en la membrana de

éstas con la consiguiente penetración del ADN presente en el medio de electroporación. El pulso eléctrico puede ser de caída exponencial o cuadrado, sin que al parecer existan ventajas obvias de una u otra forma de pulso con respecto a la eficiencia de la transfección (47). La mayoría de los estudios se ha basado en pulsos exponenciales o cuadrados únicos (47). Recientemente se publicó el uso de tandems de pulsos cuadrados para cultivos de alta densidad de células CHO en suspensión, con una elevada eficiencia. Hasta el 60 % de las células resultaron transfectadas luego de recibir 10 pulsos cuadrados de 5 ms de duración y con una intensidad de 0,6 kV/cm. Los autores diseñaron un sistema de flujo para la transfección de grandes volúmenes celulares, que alcanzaron una eficiencia de hasta el 25 % de transfección.

La electroporación se ha empleado para introducir ADN en una amplia variedad de células animales (47, 49-53), de plantas (54) y también en bacterias y levaduras (55). La electroporación puede ser usada indistintamente para expresión transiente o estable. La eficiencia de la transfección por electroporación está influida por una serie de factores, entre los cuales destacan:

1. Magnitud del campo eléctrico aplicado. A bajos voltajes, la membrana plasmática de las células en cultivo no es afectada lo suficiente, como para permitir el paso de moléculas de ADN al interior de las células. A altos voltajes las células pueden ser irreversiblemente dañadas. Para la mayoría de las células los mayores niveles de expresión transiente (medida por expresión de actividad de CAT) se alcanzan con voltajes entre 250 y 750 V/cm. Bajo estas condiciones entre un 20 y un 50 % de las células sobreviven a la electroporación (56, 57).
2. Duración del pulso eléctrico. Normalmente se deja pasar un pulso único a través de la suspensión celular. En el caso de los pulsos cuadrados, se ha hallado que la descarga de varias réplicas de éstos aumenta la eficiencia de transfección para algunas líneas celulares. Entre 0,2-10 ms está el tiempo óptimo de electroporación (58-60).
3. Temperatura. Algunos autores reportan que los niveles máximos de transfección se logran cuando las células son mantenidas a temperatura ambiente durante la electroporación (61); otros indican que es mejor mantener las células a 0 °C (59). Esas discrepancias pueden resultar de las diferencias en la respuesta de distintas líneas celulares al paso de la corriente, o en la cantidad de calor generado durante la electroporación con altos valores de voltaje (> 1 000 V/cm) y/o tiempos superiores a los 100 ms.
4. Concentración y tipo de ADN. Si bien se puede transfectar mediante electroporación tanto ADN circular como lineal, los mayores niveles de ex-

presión tanto transientes como estables, se obtienen cuando se usa ADN lineal (47, 50, 52). La concentración óptima de ADN para las transfecciones se encuentra en el rango de 1 a 40 µg/mL.

5. Composición iónica del medio. La constante de tiempo de pulso (τ) es afectada dramáticamente por la composición del medio de electroporación, así las células resuspendidas en soluciones salinas tamponadas tales como: PBS, Buffer-Hepes salino, o medios de cultivo celulares permiten una menor duración del pulso eléctrico. El empleo de sustancias no iónicas (manitol, sacarosa, etc.) en soluciones tamponadas aumenta la constante de tiempo de pulso (57).

La optimización de estos parámetros es un requisito necesario para cada línea celular y hace de la electroporación una técnica de gran versatilidad para la mayoría de las líneas celulares con una ventaja obvia sobre el resto de los procedimientos: permite la transfección de líneas celulares recalcitrantes a otros métodos. No obstante no todas las líneas celulares son fácilmente transfectables mediante la electroporación; por ejemplo las células epiteliales son en algunos casos especialmente reacias a la electroporación, concretamente las células HC-11 se mostraron absolutamente refractarias a la electroporación (Portelles, Y, remitido para su publicación).

A diferencia de la transfección por fosfato de calcio o de la fusión de protoplastos (ver más adelante), la electroporación por lo general conlleva a la formación de líneas celulares establemente transformadas con la integración de una sola copia del ADN foráneo (62-64).

La electroporación se ha usado también para transferir ADN foráneo a espermatozoides bovinos para su uso en transgénesis mediada por inseminación artificial (65). A partir de 1986, la electroporación se ha empleado como el método de elección para la transfección de células embrionarias totipotentes (*embryonic stem cells*) tanto en experimentos de *gene knock-out*, como de reemplazamiento alélico y recombinación de homólogos (66).

En términos generales la mayor desventaja de la electroporación es su costo, ya que la mayoría de los equipos comercialmente disponibles son caros, en el orden de los miles de dólares, además de los accesorios como cubetas y adaptadores que también lo son (67).

Microinyección directa de ADN en el núcleo de células

Este método fue desarrollado por Capecchi (68) y si bien tiene la ventaja de no exponer los polinucleótidos a compartimentos celulares tales como el endosoma de bajo pH, no puede ser empleado de forma rutinaria para introducir ADN a un gran número de células como para permitir después análisis bioquímicos. Por ello, la microinyección es usada básica-

mente como un método para establecer líneas que lleven copias integradas del ADN de interés.

Esta técnica requiere de infraestructura, equipamiento y personal altamente entrenado para realizarla, por lo que su costo es relativamente alto. Las tecnologías desarrolladas por Capecchi (68) para células fueron adaptadas exitosamente a embriones de una gran cantidad de especies, para abrir paso a la modificación genética de animales o transgénesis (69).

La microinyección de embriones de especies de mamíferos, anfibios y peces ha devenido una forma útil de probar construcciones genéticas directamente en los embriones y en algunas estirpes celulares derivadas de ellos (70). En nuestro laboratorio se ha desarrollado con especial interés esta tecnología para la producción de animales transgénicos. De gran utilidad ha sido el empleo de embriones de tilapia y carpas para el ensayo transiente de distintos promotores unidos a genes reporteros. Estos sistemas permitieron evaluar de forma rápida las distintas construcciones obviando el uso de células de peces, que son más complejas de mantener y de transfectar que las células de mamíferos (71).

Por otra parte embriones de conejos microinyectados con el plásmido pCH110 que contiene el gen bacteriano lacZ fueron empleados como células transientemente transfectadas para determinar el tiempo óptimo de microinyección en experimentos de generación de conejos transgénicos con expresión de genes en la glándula mamaria (72). De la Fuente y colaboradores (manuscrito enviado para su publicación) han utilizado el sistema de embriones murinos para el ensayo transiente de promotores de genes de interferones humanos.

Fusión de protoplastos

Desarrollado por Schaffner en 1980 (73) y perfeccionado por Rassoulzadegan en 1982 (74), el método consiste en obtener protoplastos de bacterias que llevan alto número de copias del plásmido de interés y fundirlos directamente con las células de mamíferos en cultivo. Para ello, el plásmido de interés se multiplica en la bacteria, en presencia de cloranfenicol para amplificar el ADN; posteriormente se rompe la pared celular bacteriana con lisozima. Los protoplastos resultantes son centrifugados sobre una monocapa de células superiores y tratados con un agente de fusión (comúnmente se emplea el polietileno glicol; PEG). Como resultado del proceso de fusión de las membranas celulares, el contenido de las bacterias es depositado en el citoplasma de la célula superior y el ADN plasmídico es transferido al núcleo de ésta. El PEG es retirado y las células tratadas con kanamicina para inhibir el crecimiento de posibles bacterias sobrevivientes.

La fusión de protoplastos, a pesar de no ser de los métodos más eficientes para las líneas celulares normalmente usadas en los laboratorios, se ha utili-

zado tanto en transfecciones transientes como estables, fundamentalmente para aquellas líneas celulares en las cuales el proceso de endocitosis ocurre de forma ineficiente. Así Gillies y colaboradores (75) introdujeron de forma estable, genes de inmunoglobulinas en células B murinas y genes de globina en células eritroleucémicas de ratón fueron introducidos por Charnay y colaboradores (76).

Para estos tipos de células, la fusión de protoplastos puede llegar a ser de altísima eficiencia. Schaffner (73) reportó hasta 6 % de células transientemente expresando un gen, empleando para ello una proporción de 10 000 bacterias por célula de mamífero. Mientras que Rassoulzadegan y colaboradores (74), obtuvieron 100 % de transfectantes transientes y 0,02 % de transfectantes estables empleando otra bacteria hospedera y la misma proporción que Schaffner (73).

La gran ventaja del método radica en su eficiencia para ciertos tipos celulares, mientras que su desventaja es la gran cantidad de manipulaciones que conlleva, el tiempo de trabajo y que normalmente no son posibles las cotransfecciones, por lo que el gen de interés tiene que estar siempre contenido en un plásmido junto con el marcador de selección (16).

Como resultado de la fusión, por lo general se obtienen múltiples copias del plásmido integradas en forma de tandems repetitivos en el cromosoma huésped (77).

Bombardeo de células y tejidos con microproyectiles

En 1984, Sandford y colaboradores desarrollaron un equipo destinado a la introducción de ADN en células y tejidos de distintas especies de plantas. En 1987 se publica el primer reporte del uso de microproyectiles en transferencia de genes (78). Los primeros experimentos se realizaron acelerando en una bolsa de aire, partículas de tungsteno cubiertas con ADN. Sin embargo la bolsa de aire era mortal para las células y esto conllevó al diseño de nuevos equipos que permitían otras formas de descarga de las partículas (79). La expresión transiente del ARN del virus del mosaico del tabaco y del gen de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en células de cebolla, demostraron que el ADN permanecía activo después del bombardeo (79- 80). La biobalística, como se le ha denominado a esta tecnología, ha logrado espectaculares avances en la transgénesis de plantas, no así en mamíferos (81, 82) y su uso es aún limitado.

Dos equipos comercialmente disponibles (Biolistic® y Accell®) a través de compra o alquiler en Bio-Rad (Hercules, CA, USA) han sido modificados para su uso en bombardeo de células de mamíferos (83).

El primer reporte de transformación de células de mamíferos empleando microproyectiles fue publica-

do en 1989 (84). Este grupo introdujo el gen de la resistencia a neomicina en fibroblastos NIH/3T3. Otros reportes han aparecido en los últimos años que incluyen la transformación de ovocitos de peces (85), células humanas, fibroblastos de pollo, miotúbulos esqueléticos, células epiteliales y miocardiocitos (86). En algunos casos, la eficiencia de transformación ha excedido a las que se obtienen por los métodos tradicionales (82, 87). El rango de eficiencia varió desde 6×10^{-4} hasta $1,7 \times 10^{-3}$ (87). Recientemente también se adaptó la metodología para células en suspensión, y se ha logrado transfectar células linfoides humanas (88).

No obstante estos avances, la biobalística dista mucho de ser una técnica de uso rutinario, por su carestía, dificultades técnicas y por la existencia de otros métodos mucho más simples y costeables. Esta metodología pudiera ser de gran utilidad en el estudio de la regulación de la expresión de los genes de leche, si se lograra la introducción de ADN en explantes de glándula mamaria de las especies de interés económico.

Transfección: la elección de un método

Como se aprecia, el uso de uno u otro método de transfección para una línea celular dada no es una cuestión trivial. En la Tabla 2, aparecen resumidos los resultados de nuestro laboratorio en la optimización de la transfección de células epiteliales mamarias murinas HC-11 (13), gentilmente cedidas por el Dr. Bernd Groner, (University of Freiburg, Germany). Estas células fueron transfectadas con el gen lacZ de *E. coli* por 5 métodos distintos, incluido una modificación del protocolo tradicional de calcio fosfato, referida anteriormente como "método acelerado" de Jordan y colaboradores (8).

Las células HC-11 resultaron ser totalmente refractarias a la transfección por el método acelerado de Jordan y colaboradores, electroporación y a la transfección por DEAE-dextrana. El uso de la metodología de fosfato de calcio tradicional arrojó una baja eficiencia de transfección en células HC-11, mientras que PEI permitió obtener buenos resultados en las transfecciones realizadas. De los resulta-

dos alcanzados, podemos concluir que en nuestras condiciones y para células HC-11 en el mismo pase e igual fase de crecimiento, el método tradicional de fosfato de calcio puede ser empleado con su eficiencia actual para transfecciones estables, ya que rinde al menos 1 000 células transfectadas por placa de 60 mm. PEI puede ser usada para transfecciones transientes y se han alcanzado ya transfectantes estables tanto de células HC-11 como de CHO (Fernández y colaboradores, manuscrito en preparación).

Los genes reporteros en las transfecciones de células de mamíferos

Como se ha venido discutiendo hasta ahora, los métodos de introducción de ADN foráneo en células de mamíferos son variados y la elección de uno u otro depende de múltiples factores, entre los cuales se destaca el objetivo de la transfección. De este modo en ocasiones se necesita generar una línea celular con un carácter nuevo incorporado (transfección estable), y a veces se persigue otro objetivo experimental que no requiere la integración del ADN transfectado al genoma celular. A este tipo de transfección se le conoce con el nombre de transfección transitiva o transitoria y es ampliamente empleada en los laboratorios de biología celular y molecular.

De especial interés es el ensayo de construcciones genéticas en transfecciones transientes. Esto permite: 1) conocer el correcto funcionamiento de una construcción, antes de emprender un proyecto mayor con ella (transgénesis, transfección estable, etc.); 2) ensayar varias construcciones y seleccionar la mejor, expresada en términos de calidad y cantidad del ARN mensajero deseado, niveles de expresión del transgén, actividad biológica de la proteína secretada, etc. y 3) economizar recursos por los datos que aportan los puntos 1 y 2 anteriormente descritos.

En las transfecciones transientes, se emplean de forma rutinaria los genes reporteros. Los reporteros más utilizados han sido el gen lacZ de *E. coli* que codifica para la β -galactosidasa bacteriana (89), el gen de la cloranfenicol acetil transferasa de bacte-

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos con los diferentes métodos de transfección empleados en células HC-11 y valor de uso de los mismos para dichas células.

Método	Resultados	Uso recomendado	Observaciones
Fosfato de calcio tradicional	≈ 0,1 % eficiencia	Transfección estable	Ensayar con células en suspensión
Fosfato de calcio "acelerado"	0 %	Ninguno	Estudiar variantes
DEAE-dextrana	≈ 0,1 % eficiencia	Ninguno	
PEI	≈ 3-5 % eficiencia	Transfección transiente	Valorar en transfecciones estables
Electroporación	0 %	Ninguno	Estudiar variantes de optimización

rias, la hormona de crecimiento humano (71), el gen de la luciferasa de las luciérnagas (90) y más recientemente los genes que codifican para las proteínas fluorescentes verdes (GFP) y azul (BFP, (91) siglas en inglés en ambos casos) de la medusa (*Aequorea victoria*).

En la Tabla 3 se resumen las ventajas y desventajas en el uso de los genes reporteros anteriormente mencionados. Como se aprecia, cada gen reportero, con su método específico de detección, presenta ventajas y desventajas en su aplicación, por lo que no se debe recomendar el uso de uno u otro *a priori*, sin antes analizar minuciosamente los objetivos y posibilidades reales de cada laboratorio.

En nuestro laboratorio se emplea rutinariamente el gen lacZ para el ensayo transiente de promotores de expresión en glándula mamaria o como control interno de transfecciones con otros objetivos. Se han empleado otros reporteros como hGH, antígeno de superficie del virus B de la hepatitis y CAT (71). En la actualidad se trabaja también con GFP en embriones murinos y de peces, así como en células de mamíferos.

Los genes lacZ, CAT, luc y hGH han sido empleados como reporteros desde mediados de la década de los 80, por lo que no serán analizados en detalle en esta revisión. De especial interés resulta, sin embargo, el auge que ha ido teniendo en los últimos años el empleo como reporteros de genes de proteínas fluorescentes de la medusa (91-93) lo cual

se ha denominado "revolución verde".

La proteína verde fluorescente monomérica (GFP) consiste en 238 aminoácidos y posee un peso molecular de 27 KDa (94) y no requiere de ninguna otra proteína del hospedero, sustrato o cofactores para fluorecer. Esta característica la hace superior como reportero a otras enzimas de *E. coli* como la β -galactosidasa que precisa del transporte a través de la membrana del sustrato fluorogénico (95).

En su forma nativa, GFP emite luz verde brillante a una longitud de onda de 508 nm cuando es excitada con luz ultravioleta de hasta 395 nm, o fluoresce levemente cuando es excitada con luz azul de hasta 470 nm de longitud de onda. La fluorescencia con luz ultravioleta es intensa pero desaparece rápidamente, mientras que con luz azul es tenue pero sostenida (95). Los microscopios ópticos de rutina en los laboratorios contienen filtros destinados a excitar la fluoresceína o sus derivados a aproximadamente 480 nm; con ello se logran emisiones en verde alrededor de los 530 nm. Por otra parte, los equipos de citometría de flujo de un solo rayo láser iónico de argón excitan a 488 nm, por lo que de modo general tanto microscopios convencionales como citómetros de flujo resultan subóptimos para el estudio de la GFP como reportero.

Todos estos elementos llevaron a la búsqueda de mutantes de GFP con picos de excitación de alrededor de los 490 nm y con picos de emisión entre los 505-511 nm. Se han generado ya mutantes *red-*

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los genes reporteros más empleados y sus sistemas de detección en transfecciones transientes de células de mamíferos

Gen (fuente)	Método de detección	Ventajas	Desventajas	Referencia
lacZ (<i>E. coli</i>)	Histoquímico <i>in situ</i>	-Visualización de localización celular	-Semicuantitativo -No viable para la célula -Inespecificidad	88
lacZ (<i>E. coli</i>)	Colorimétrico en extractos celulares	-Cuantitativo	-No viable para la célula -Inespecificidad -No visualización	88
CAT (<i>E. coli</i>)	Autorradiográfico en extractos celulares	-Alta especificidad y sensibilidad -Cuantitativo	-No viable para la célula -No visualización -Radiactivo	70
luc (<i>Photynus pyralis</i>)	Luminiscencia	-Alta especificidad y sensibilidad	-Costoso equipamiento -No viable para la célula	89
hGH (<i>Homo sapiens</i>)	Inmunoquímico	-proteína secretada -viable para la célula	-limitada especificidad -no visualización	70
FPs (<i>Aequorea victoria</i>)	Fluorescencia	-visualización de localización celular -no requiere sustrato -viable para la célula	-semicuantitativo -relativamente baja sensibilidad -fondo de fluorescencia en algunas líneas	90-95

Abreviaturas igual que en la Tabla 1
 CAT: cloranfenicol acetil transferasa
 hGH: hormona de crecimiento humana
 FPs: proteínas fluorescentes

shifted y *blue-shifted*, con hasta 24 veces más intensidad de emisión que la variante natural (95, 96) que en combinación con la GFP natural ofrecen una amplia gama de posibilidades combinatorias no sólo ya para ensayos en células, sino también para terapia génica.

Recientemente se han introducido otras mejoras en los sistemas de GFP, tales como cambio en el uso de codones hacia aquellos más utilizados por las células de mamíferos. Esto permitió obtener líneas celulares transfectadas con una sola copia del transgén y la activación simultánea de dos elementos transcripcionales distintos de GFP en una misma línea celular (95, 96).

La principal desventaja del uso de GFP y sus mutantes radica en su límite de sensibilidad y el fondo de fluorescencia que normalmente presentan algunas líneas de células de mamíferos. Mientras que la proteína β -galactosidasa tetramérica cataliza en 1 h $> 10^5$ moléculas de sustrato, la expresión de una copia de GFP por célula es apenas detectable en un microscopio de fluorescencia convencional (93).

Recientemente se ha publicado el uso de una variante de GFP que porta codones de uso preferencial en células de mamíferos como gen reportero en ratones transgénicos; la detección del transgén es en extremo sencilla, mediante la iluminación breve de un dedo o un fragmento de cola de los ratones a ensayar con luz ultravioleta (97).

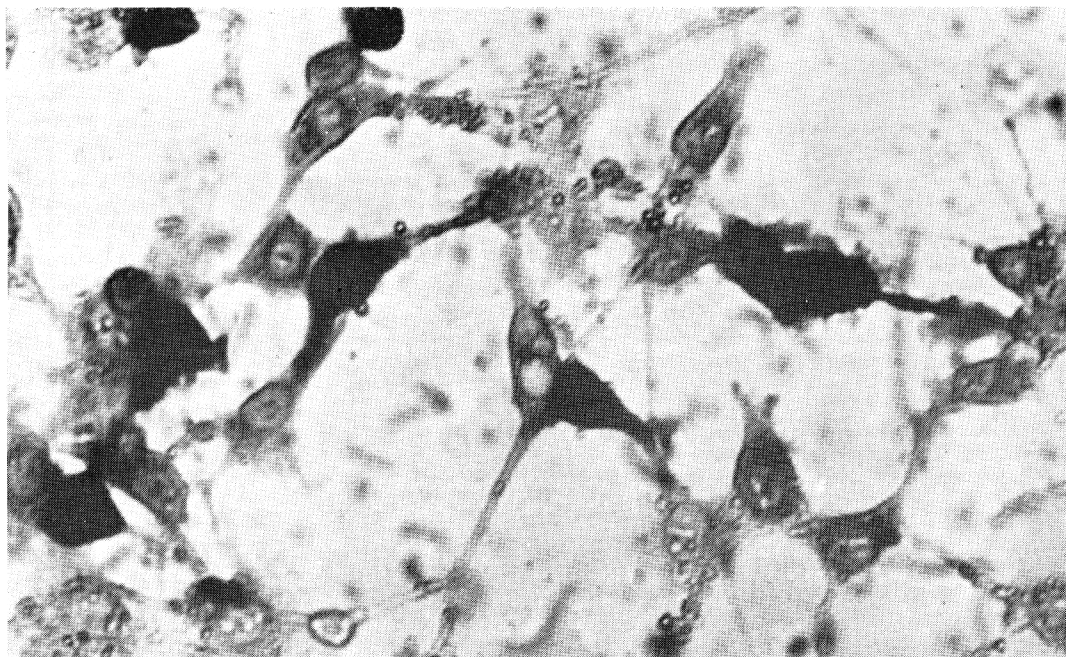
El uso de GFP como reportero en experimentos de generación de pez-cebra y ratones transgénicos está siendo explotado intensamente en nuestro laboratorio en la actualidad (Morales, R, comunicaciones personales; Castro, FO, no publicado).

Otro grupo de marcadores o reporteros para trans-

ferencia génica en células de mamíferos son aquellos que codifican a la resistencia a una droga. Mediante la selección de colonias resistentes a dicha droga, se logran aislar clones independientes que han integrado este marcador de selección. Si bien estos marcadores permiten seleccionar aquellas células vivas que expresan el transgén, es preciso que la célula sobreviva en un ambiente tóxico por un periodo de tiempo generalmente largo. Por ello estos marcadores son empleados sólo para transfecciones estables. Los más comúnmente usados son: resistencia a neomicina (GPT) y resistencia a higromicina (HigroB). Para algunas líneas celulares carentes de alguna enzima específica (CHO DHFR⁻ por ejemplo), se emplea medio de cultivo sin nucleósidos para seleccionar las líneas que posteriormente son amplificadas con la droga metotrexate.

Conclusiones

La optimización de los sistemas actuales de transfección de células de mamíferos, unida a la búsqueda de nuevos vectores y al mejoramiento de los genes reporteros, permitirá un sustancial avance en los métodos de estudio de la expresión de genes *in vitro*. Notables avances se prevén también en el área de la introducción de material genético exógeno a explantes, organoides y grupos de tejidos *ex vivo*, así como directamente a animales *in vivo* mediante técnicas de terapia génica. Es indudable que la transfección de ADN en células de mamíferos a pesar de sus grandes avances en las dos últimas décadas, aún espera por perfeccionamiento y depara sorpresas para los próximos años.



Microfotografía que muestra la expresión del gen *lacZ* en células epiteliales mamarias murinas HC-11 transfectadas por el método de PEI. Magnificación 250x. La presencia de células azules en el campo es indicativa de la expresión de dicho gen codificado en el plásmido pCH110.

1. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973;52:456-461.
2. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 1978;14:725-732.
3. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells plasmid DNA. *Mol. Cell Biol* 1987;7:2745-2752.
4. Chen C, Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* 1988;6:632.
5. Alam J, Cook JL. Reporter genes: Application to the study of the mammalian cells transcription. *Anal Biochem* 1990;188:245-254.
6. Farr A, Roman A. A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Res* 1992;20:920.
7. O'Mahoney JV, Adams TE. Optimization of experimental variables influencing reporter gene expression in hepatoma cells following calcium phosphate transfection. *DNA and Cell Biol* 1994;13:1227-1232.
8. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nud Acids Res* 1996;24:596-601.
9. Kingston J, editor. *Current Protocols in Molecular Biology*. Oxford: Currents Protocols Ltd, 1987.
10. O'Mahoney JV, Brandon MR, Adams TE. Identification of a liver-specific promoter for the ovine growth hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1994;101:129-139.
11. Aden DT, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979;282:615-616.
12. Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981;23:175-182.
13. Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, Groner B. Prolactin regulation of β -casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J* 1988;7:2089-2095.
14. Burdon TG, Maitland KA, Clark AJ, Wallace R, Watson CJ. Regulation of the sheep β -lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon- γ activation site-related element. *Mol Endocrinology* 1994;8:1528-1536.
15. Selden R. DNA Transfection. In: Kingston J, editor. *Current Protocols in Molecular Biology*. Oxford: Currents Protocols Ltd, 1987.
16. Sambrook J, Fritsch D, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Press, 1989.
17. Parker BA, Stark GR. Regulation of simian virus 40 transcription: Sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. *J Virol* 1979;31:360.
18. Selden R. *Promega Protocols and Applications Guide*, Second edition, 1991.
19. Vaheri A, Pagano JS. Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay. *Virology* 1965;27:434.
20. McCutchan JH, Pagano JS. Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethyl aminoethyl-dextran. *J Natl Cancer Inst* 1968;41:351-359.
21. Warden D, and Thorne HV. Infectivity of polyoma virus DNA for mouse embryo cells in presence of diethylaminoethyl-dextran. *J Gen Virol* 1968;3:371-375.
22. *Eukaryotic Gene Regulation. In: Promega Protocols and Applications Guide*, Second edition, 1991:282-310.
23. Selden RF, Burke-Howie K, Rowe ME, Goodman MM, Moore DD. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol* 1986;6:3173-3179.
24. Sussman DJ, Milman G. Short-term, high-efficiency expression of transfected ADN. *Mol Cell Biol* 1984;4:1641-1647.
25. Reeves R, Gorman C, Howard B. Minichromosome assembly of nonintegrated plasmid DNA transfected into mammalian cells. *Nud Acids Res* 1985;13:3599-3607.
26. Lopata MA, Cleveland DW, Sollnerweb B. High level of a chloramphenicol acetyltransferase gene by DEAE-dextran-mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nud Acids Res* 1984;12:5707.
27. Fujita T, Shubiyu H, Ohashi T, Yamashiki K, Taniguchi T. Regulation of human interleukin-2 gene: Functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell* 1986;46:401-407.
28. Luthman H, Magnusson G. High efficiency DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nud Acids Res* 1983;11:1295.
29. Reeves G. DNA Expression. In: Kingston J, editor. *Current Protocols in Molecular Biology*. Oxford: Currents Protocols Ltd, 1987:9.4.1-9.4.3.
30. Kawai S, Nishizawa M. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol* 1984;4:1172-1177.
31. Chaney WG, Howard DR, Pollard A, Sallustio S, Stanley P. High-frequency transfection of CHO cells using Polybrene. *Somatic Cell Mol Genet* 1986;12:237-247.
32. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7297-7301.
33. Behr JP, Loeffler JP, Demeneix B, Pérez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6982-6986.
34. Felgner PL. In: *Methods in Molecular Biology, Vol 7: Gene Transfer and Expression Protocols*. Murray EJ, editor Clifton, New Jersey. The Human Press Inc, 1991.
35. Bangham AD. Introduction. In: Knight G, editor. *Liposomes from Physical Structure to Therapeutic Application*. North-Holland, New York: Elsevier, 1981.
36. Straubinger RM, Papahadjopoulos D. Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. *Methods Enzymol* 1983;101:512-527.
37. Cudd A, Nicolau C. Entrapment of recombinant DNA in liposomes and its transfer and expression of eukaryotic cells. *Liposome Technology vol. II*. Boca Raton: CRC, 1984:207-221.
38. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenzel M et al. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7413-7417.
39. Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1977;470:185-201.
40. Felgner PL, Holm M. Cationic liposome-mediated transfection. *Focus* 1989;11:21-25.
41. Düzgünes N, Goldstein JA, Friend DS, Felgner PL. Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid N[1-(2,3-Dioleoyloxy) Propyl]-N,N,N-Trimethylammonium: Induction by multivalent anions and asymmetric fusions with acidic phospholipid vesicles. *Biochem* 1989;28:9179-9184.
42. Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 1989;337:387-388.
43. Malone R, Felgner PL, Verma I. Lipofectin-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6077-6081.
44. Promega Corporation. *Technical Bulletin* 1995;216: 53.
45. Promega Notes 1995;56:58.
46. Promega Corporation. *Reporter and transfection systems*, 1995:193.
47. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse myoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982;1:841-849.
48. Rols MP, Coulet D, Teissie J. Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur J Biochem* 1992;206:115-121.
49. Wong TK, Neumann E. Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys Res Commun* 1982;107:584-587.
50. Potter H, Weir L, Leder P. Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7161-7168.
51. Sugden B, Marsh K, Yates J. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblast transformed by Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol* 1985;5:410-419.
52. Toneguzzo F, Hayday AC, Keating A. Electric field-mediated DNA transfer: Transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells *Mol Cell Biol* 1986;6:703-713.
53. Tur-Kaspa R, Teicher L, Levine BJ, Skoultchi AJ, Shafritz DA. Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes. *Mol Cell Biol* 1986;6:716-728.
54. Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5824-5831.
55. Andreason GL, Evans GA. Introduction

- and expression of DNA molecules in eukariotic cell by electroporation. *BioTechniques* 1988;6:50-53.
56. Patterson MK Jr. Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods Enzimol* 1979;58:141-149.
57. Rabussay D, Uher L, Bates G, Piastuch A. Electroporation of mammalian and plant cells. *Bethesda Res Lab Focus* 1987;9:1.
58. Chu G, Hayakawa H, Berg P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* 1987;15:1311-1313.
59. Reiss M, Jastraboff MM, Bertino JR, Narayanan R. DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;137:244-248.
60. Boggs SS, Gregg RG, Borenstein N, Smithies O. Efficient transformation and frequent single-site, single-copy insertion of DNA can be obtained in mouse erythro-leukemia cells transformed by electroporation. *Exp Hematol* 1986;14:988.
61. Hama-Inaba H, Takahashi M, Kasai M, Shiomi T, Ito A, Manaoka F, Sato K. Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to mammalian cells in suspension. *Cell Struct Funct* 1987;12:173.
62. Wolf H, Rols M, Boldt P, Neumann E, Teissie J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 1994;66:524-531.
63. Kubiniec RT, Liang H, Hui SW. Effects of pulse length and strength on transfection by electroporation. *BioTechniques* 1990;8:1-3.
64. Ray FA. Electroporation of plasmid DNA into normal human fibroblasts. In: Nickoloff JA, editor. *Animal Cell Electroporation and electrofusion protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol. 48. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1995:133-140.
65. Gagné M, Pothier F, Sirard H. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Molec Reprod Develop* 1991;29:6-15.
66. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kenler R. Transgenesis by means of blastocysts-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9065-9069.
67. Nickoloff JA. Animal Cell Electroporation and electrofusion protocols. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 48. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1995:133-140.
68. Capecci MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 1980;22:249-260.
69. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7380-7384.
70. Castro FO, de la Fuente J. Animales transgénicos. Posibilidades biotecnológicas. *Interferón y Biotecnología* 1988;5:210-223.
71. Uleonart R, Martínez R, García del Barco D, Hernández O, Castro FO, de la Fuente J. Reporter genes for *in vivo* transient gene expression studies in tilapia (*Oreochromis aureus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) one celled embryos [abstract]. *Theriogenology* 1994;41:240.
72. Ramos B, de Armas R, de la Fuente J, Castro FO. Activity of simian virus 40 early promoter in rabbit embryos [abstract]. *Theriogenology* 1994;41:281.
73. Schaffner W. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2163-2168.
74. Rassoulzadegan M, Binetruy B, Cuzin F. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells. *Nature* 1982;295:257-259.
75. Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa T. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 1983;33:717-724.
76. Chamay P, Treisman R, Mellon P, Chao M, Axel R, Maniatis T. Differences in human α - and β -globin gene expression in mouse erythro-leukemia cells: The role of intragenic sequences. *Cell* 1984;38:251-257.
77. Robert de Saint Vincent B, Delbruck S, Eckhart W, Meinkoth J, Vitto L, Wahl G. The cloning and reintroduction into animal cells of a functional CAD gene, a dominant amplifiable genetic marker. *Cell* 1981;27:267-275.
78. Sandford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J Part Sci Technol* 1987;5:27-37.
79. Sandford JC. The biolistic process. *TIBTECH* 1988;6:299-302.
80. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 1987;327:70-73.
81. Yang N-S, Christou P. Particle bombardment technology for gene transfer. *UWBC Biotechnical Resource Series*. Oxford University Press, 1994.
82. Batty NP, Evans JM. Biological ballistics-no longer a shot in the dark. *Transgenic Research* 1992;1:107-113.
83. Yang N-S, Ziegler PR. The particle bombardment system for mammalian transfer. In: Yang N-S, Christou P, editors. *Particle bombardment technology for gene transfer*. *UWBC Biotechnical Resource Series*. Oxford University Press, 1994:117-142.
84. Zelenin AV, Titomirov AV, Kolesnikov VA. Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection. *FEBS Lett* 1989;244:65-66.
85. Kolesnikov VA, Alimov AA, Barmintsev VA, Benyumov AO, Zelenina IA, Kraasnov AM, Dzhabur R, Zelenin AV. High velocity mechanical injection for foreign DNA into fish eggs. *Genetika (Moskva)* 1990;26:2122-2126.
86. Johnston SA. Biolistic transformation: microbes to mice. *Nature* 1990;346:776-777.
87. Yang N-S, Burkhelberg J, Roberts B, Martinell B, McCahe D. *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9568-9572.
88. Li C-Ch, Ruscetti FW, Rice NR, Chen E, Yang N-S, Mikovits J, Longo DL. Differential expression of Rel family members in human T-cell leukemia type-1 infected cells. *J Virol* 1993;67:4205-4213.
89. Sanes JR, Rubinstein JLR, Nicolas JF. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 1986;5:3133-3142.
90. de Went JR, Wood KV, de Luca M, Melinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:725-737.
91. Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, Hawley R. Use of variants of the green fluorescent protein to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology* 1996;14:606-609.
92. Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry* 1993;32:1212-1218.
93. Delagrave S, Hawtin RE, Silva CM, Yang MM, Youvan DC. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Biotechnology* 1995;13:151-154.
94. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995;373:663-664.
95. Anderson MT, Tjive IM, Lorincz MC, Parks DR, Herzenberg LA, Nolan GP, Herzenberg LA. Simultaneous fluorescence-activated cell sorter analysis of two distinct transcriptional elements within a single cell using engineered green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8508-8511.
96. Levy JP, Muldon RR, Zolotukhin S, Link Jr, CJ. Retroviral transfer and expression of a humanized red-shifted green fluorescent protein gene into human tumor cells. *Nature Biotechnology* 1996;14:610-614.
97. Ikama M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y, Okabe M. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice. *Develop Growth Differ* 1995;37:455-459.

Recibido en enero de 1997. Aprobado en abril de 1997.