

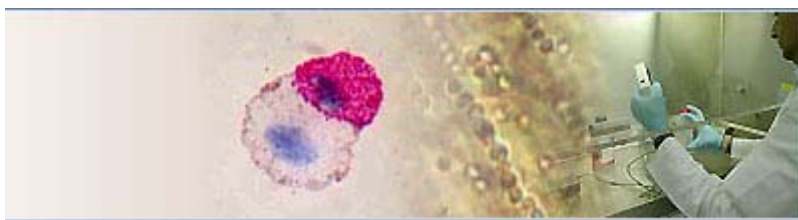
TRANSFECCIÓN

Las técnicas de transfección celular, que se han desarrollado fundamentalmente para permitir la introducción de ácidos nucleicos en el interior de las células, han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. Actualmente se emplean en gran número de aproximaciones experimentales, en la generación de animales transgénicos, en la selección de líneas celulares modificadas, etc...

La introducción de una construcción de DNA recombinante en la que se ha situado el CDS (secuencia codificante) de un gen reportero (luciferasa, 'green fluorescent protein', beta-galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa -CAT-, etc..) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales.

Por el contrario, la introducción de un plásmido que contienen la secuencia codificante (CDS) de una proteína de interés bajo el control de un promotor (constitutivo, regulado, etc...) permite la producción de la proteína deseada que puede estar o no etiquetada ('tagged'). En este caso se emplea la célula como una factoría de síntesis de proteínas a la que se le introduce en forma de plásmido la información de la proteína que se desea sintetice.

Tanto en el primero como en el segundo caso puede ser importante seleccionar las células que han adquirido el plásmido. Para facilitararlo se incluyen en éstos genes de resistencia a drogas que permiten a las células que los han adquirido sobrevivir en medios selectivos. Uno de los sistemas de selección más empleado es el de la resistencia a G418 (resistencia a neomicina) que permite seleccionar clones celulares de expresión estable. Así diferenciaremos entre la transfección temporal o transiente y la transfección estable o de larga duración.



Las técnicas de transfección actuales se pueden clasificar en:

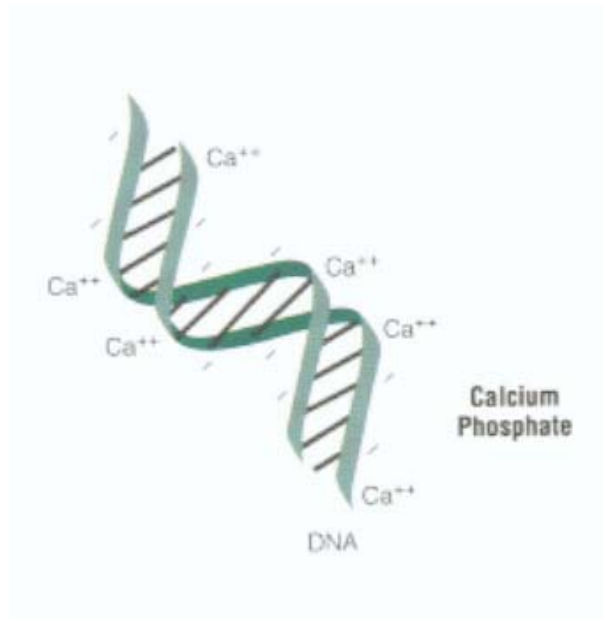
MÉTODOS QUÍMICOS.

Basados en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica (fosfato cálcico, DEAE dextrano) o a las membranas (lipofección).

- **MÉTODO DEL FOSFATO CÁLCICO.**

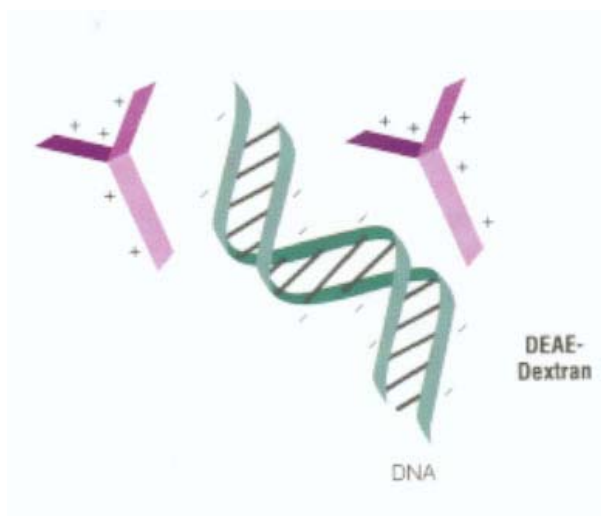
Basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-

precipitan formando unos agregados que son endocitados/fagocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al DNA de la degradación por las nucleasas celulares. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso, que se ve afectado por factores tales como pequeños cambios en el pH de la solución, etc...



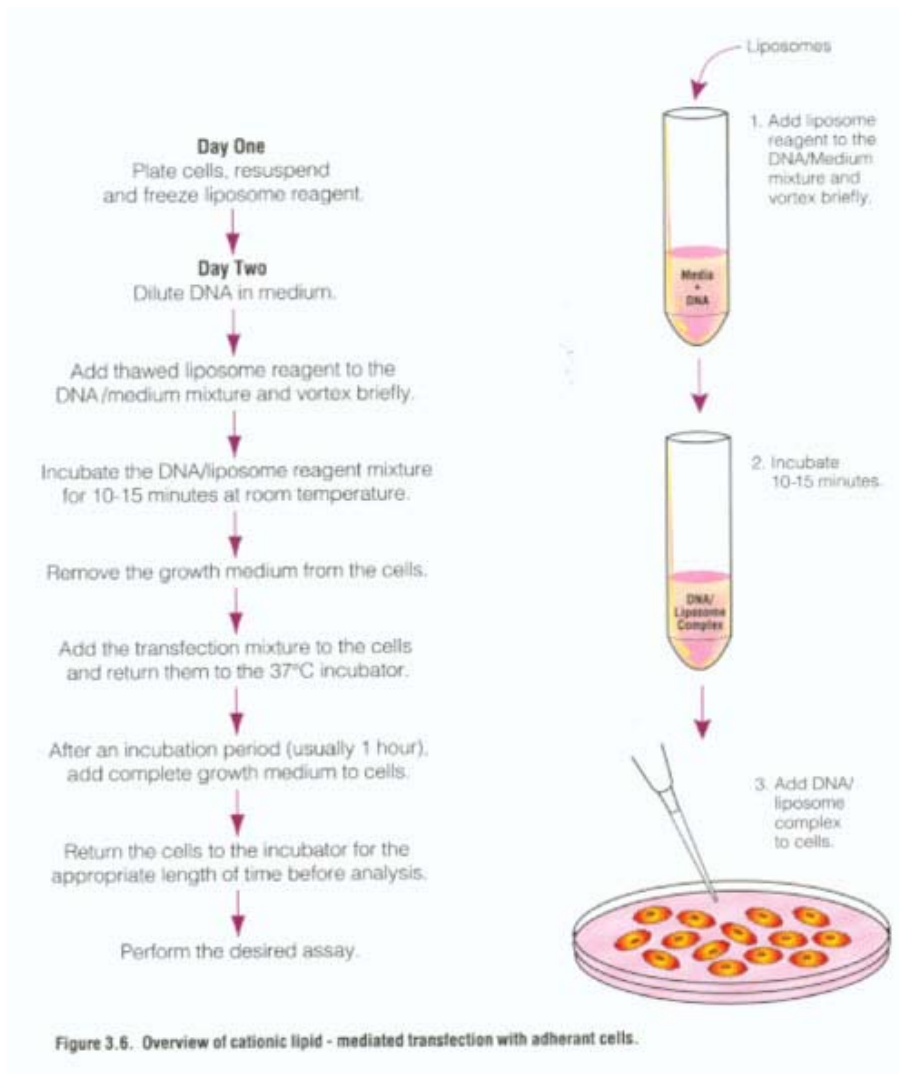
○ **MÉTODO DEL DEAE DEXTRANO.**

Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el DNA. Los polímeros de DEAE dextrano o polybreno tienen una carga que les permite unirse a las muy negativamente cargadas moléculas de DNA. El DNA acompañado se introduce en las células mediante choque osmótico mediante DMSO o glicerol. El uso de DEAE dextrano se limita a las transfecciones transientes.



○ **MÉTODO DE LIPOFECCIÓN.**

Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del DNA en el citosol. Una de las posibles vías es la incorporación de liposomas a la membrana y la entrada flip-flap. Existen un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, aunque existe una estructura consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado muchas variantes (por ej. DOPE). Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias, que suelen ser en buenas condiciones de entre el 70 y el 90% de las células de la placa. Las desventajas del método es, aparte del elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y DNA (relación de cargas), la cantidad de DNA empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero. Tienes una buena revisión en la página de la Universidad Vanderbilt dedicada a los lípidos catiónicos.



MÉTODOS FÍSICOS.

Basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula.

- **MICROINYECCIÓN DIRECTA.**
 - Es una técnica muy efectiva aunque laboriosa. Es el método que se emplea en la introducción del DNA recombinante en las células embrionarias en el proceso de obtención de animales transgénicos.
- **ELECTROPORACIÓN.**
 - 'biolistic particle delivery'. Introducción del DNA adherido a micropartículas que se disparan sobre las células.

Una vez introducida la molécula de DNA recombinante en el interior de las células producirá su efecto permitiendo, por ejemplo :

- seleccionar células que hayan incorporado el DNA. Este sería el caso del aislamiento de clones celulares que presentaran expresión de un determinado producto. Es posible por la incorporación en el propio vector de marcadores de selección, típicamente la resistencia de G418 (neomicina), ...
- a las pocas horas o días detectar la presencia de la proteína codificada por el plásmido.