



COMPARACIÓN DE DOS SISTEMAS DE ENTREGA DE GENES A EN CÉLULAS CHO

Carolina Gómez, Octavio Tonatiuh Ramírez y Laura A. Palomares. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, CP 62210. gomezc@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: CHO, transfección, transducción.

Introducción. Las células CHO son ampliamente utilizadas en la industria biofarmacéutica debido a sus características deseables, como la producción de proteínas con glicosilaciones complejas (1). Por ello es importante encontrar la manera más eficiente de expresar proteína recombinante en estas células. En el presente proyecto nos enfocamos en comparar dos métodos de expresión: la transducción por baculovirus, que aunque es utilizada generalmente para infectar células de insecto, se ha reportado que las células de mamífero internalizan estas partículas y son capaces de expresar proteínas bajo un promotor de mamífero (BacMam) (2); y la transfección por liposomas catiónicos. Utilizamos a la proteína verde fluorescente (EGFP) como reportero para comparar la eficiencia de transducción o de transfección. Encontramos que la expresión de EGFP fue muy baja para la transducción; en la transfección se obtuvo una eficiencia baja pero un orden de magnitud mayor que la obtenida en la transducción.

El objetivo fue comparar dos formas de entregar genes a células CHO: transducción por baculovirus y transfección por liposomas catiónicos.

Metodología. El baculovirus utilizado posee el gen de EGFP bajo el promotor constitutivo del citomegalovirus (CMV). Para la transducción se siguió la metodología llevada a cabo por Coundrey et al. (2). Las células se sembraron en placas de 6 pozos con 2.5×10^5 células por pozo. Posteriormente se removió el medio de cultivo y se agregó el baculovirus a una MOI de 5 unidades formadoras de placa/célula. Se incubó por 4 horas a 37°C y en seguida se agregó medio fresco, incubando a 37°C y 8% de CO_2 por 48 horas. La transfección se realizó siguiendo el protocolo incluido en el kit Invitrogen Freedom CHO, con los reactivos Freestyle Max y OptiPRO SFM y el plásmido pCHO 1.0 que incluye un cassette de expresión para mamífero con el promotor CMV/E1, bajo el cual se insertó el fragmento correspondiente al gen EGFP. Se cultivaron 5×10^5 células/mL en un matraz Erlenmeyer con 30 mL de medio de cultivo y se incubaron a 37°C , 8% de CO_2 y una agitación constante de 130 rpm. A las 24 horas se llevó a cabo la transfección como se menciona en el protocolo, utilizando $50 \mu\text{g}$ de DNA plasmídico y $50 \mu\text{L}$ del reactivo Freestyle Max. Se cuantificaron las células transducidas/transfectadas por microscopía de fluorescencia.

Resultados. Pese haber sido reportado que las células de mamífero son eficientemente transducidas por

baculovirus, solo se obtuvo una eficiencia de transducción del 3% a las 48h p.t., a una MOI de 5 ufp/cél. Sería necesario agregar butirato de sodio para aumentar la expresión de la proteína, como lo indica la literatura (1). La transfección con el reactivo FreeStyle Max resultó en una eficiencia mayor, de aproximadamente 30%, pero baja, en comparación con la reportada por Liu et al. (3) de 70% utilizando el mismo reactivo pero a distintas concentraciones.

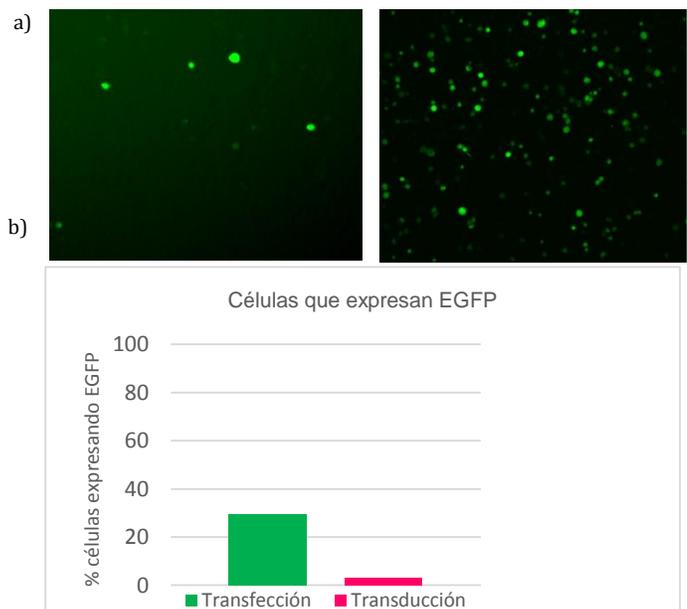


Fig. 1 a) Microscopía de fluorescencia de células transducidas (izq.) y transfectadas (der.). b) Gráfico comparativo del porcentaje de células que expresan EGFP en cada caso.

Conclusiones. La transducción por baculovirus, en nuestro caso, no fue eficiente para esta línea celular. También se requiere mejorar el método de transfección por liposomas catiónicos.

Agradecimientos. A PAPIIT UNAM por el financiamiento de los proyectos IT201214 e IT200314, a CONACYT por la beca otorgada y al apoyo de V. Hernández, R. Pastor y R. Román.

Bibliografía.

1. Jayapal K, Wlaschin K, Hu W, Yap M. (2007) *Chem. Eng. Prog.* 103: 40–47.
2. Condreay J, Witherspoon S, William C, Kost T. (1999) *Cell Biology.* 96: 127–132.
3. Liu C, Dalby B, Chen W, Kilzer J, Chiou H. (2008) *Molecular Biotechnology*, 39: 141–153.