



Vaccimonitor

ISSN: 1025-0298

vaccimonitor@finlay.edu.cu

Instituto Finlay

Cuba

Camacho, Frank; Capo, Miriela; Toledo, Roberto; León, Joel de; Talavera, Arturo; Pérez, Ela M.

Transferencia de genes in vitro con polímeros catiónicos

Vaccimonitor, vol. 15, núm. 1, 2006, pp. 17-21

Instituto Finlay

Ciudad de la Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203414607003>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Transferencia de genes *in vitro* con polímeros catiónicos

Frank Camacho¹, Miriela Capo¹, Roberto Toledo², Joel de León³, Arturo Talavera¹, Ela M Pérez¹.

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600.
Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: fcamacho@finlay.edu.cu

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Calle 186 esq. 31, Cubanacán, Playa. A.P. 6162. Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Centro de Inmunología Molecular (CIM). Calle 215 esq. 216, Siboney, Playa. Ciudad de La Habana, Cuba.

La transferencia de genes representa una importante herramienta para el estudio, prevención y tratamiento de enfermedades genéticas y adquiridas así como para estudios relacionados con la función de proteínas de interés. El uso de moléculas catiónicas está ampliamente difundido, ya que su eficiencia en la transfección las convierte en un fuerte rival de otros métodos de transferencia de genes. En este trabajo se transfecionaron las líneas celulares COS-7 y BHK-21 con el plásmido psnEGFP que usó los polímeros catiónicos polietilenimina (PEI) y DEAE dextrana. Al medir la eficiencia de transfección se observó que la línea celular BHK-21 deviene en una excelente opción para la transfección con el método de la PEI y que los mejores resultados se obtienen al disolver PEI en NaCl 150 mM. Al centrifugar las placas después de añadidos los complejos ADN-PEI se obtiene cerca del 100% de células transfecionadas con bajas concentraciones de ADN.

Palabras clave: Transfección, polietilenimina, PEI, transferencia de genes, polímeros catiónicos.

Introducción

La transferencia de genes representa una importante herramienta para el estudio, prevención y tratamiento de enfermedades genéticas y adquiridas, así como para los estudios relacionados con la función de proteínas de interés (1-3).

En la actualidad existe una gran cantidad de metodologías para este fin, entre las que podemos citar la electroporación, microinyección directa, bombardeo de células y tejidos con microproyectiles, las transfecciones mediadas por virus, agregados químicos y polímeros catiónicos, entre otras.

La transfección mediada por virus y por polímeros catiónicos son, de estos métodos, los más utilizados en los experimentos con células en cultivo.

Los vectores virales constituyen un excelente vehículo para la transferencia de genes debido a su alta eficiencia (4-6), pero presentan algunas desventajas como la toxicidad de las partículas virales para el hospedero, limitaciones en la talla del gen a insertar, requerimientos de producción, además de elevados costos (7,8).

Los polímeros catiónicos a diferencia de los virus se unen fácilmente a segmentos portadores de genes de interés, no producen respuesta citotóxica, ni son una amenaza de infección. Su eficiencia en la transfección los convierte en un fuerte rival de la transferencia de genes mediadas por virus (9,10).

La hipótesis del mecanismo de acción de estas moléculas se basa en que una vez que ha ocurrido la neutralización de cargas y la consiguiente condensación del ADN polianiónico, se forman complejos compactos de plásmidos que serán transportados al interior de las células por endocitosis y liberados al citoplasma desde los endosomas, llegando finalmente al núcleo (11).

Actualmente existen gran variedad de polímeros comerciales para la transfección de genes, entre los que se encuentran el Transfectam y la Lipofectamina que resultan poco económicos.

El DEAE-dextrana y la PEI son polímeros catiónicos más baratos que son utilizados satisfactoriamente para la transferencia de genes a células en cultivo.

El DEAE-dextrana es una matriz de carbohidratos cargada positivamente, la cual interacciona con las cargas negativas de los grupos fosfatos del ADN formando agregados. La transfección mediada por DEAE-dextrana se utiliza para la expresión transiente y altamente eficiente de genes clonados. Este método ha demostrado ser muy efectivo en las líneas celulares COS-7, COS-1, en CV-1 y otras líneas celulares (12-14).

La PEI es una macromolécula orgánica con un alto potencial de cargas positivas debido a que presenta un nitrógeno aminico cada tres unidades de polímero que pueden aceptar protones a cualquier pH. Esta propiedad le permite actuar como tampón dentro de los endosomas protegiendo al ADN de la degradación lisosomal. Es un polímero soluble en solventes polares que no forma agregados de sí mismo y presenta una cinética de formación de complejos muy rápida por lo que es menos sensible que otros polímeros como el Transfectam al efecto negativo de los medios de cultivo con suero que contienen ADN asas que pueden interferir en el proceso de transfección (15).

En este trabajo se investigaron las condiciones más favorables para la transfección con estos polímeros en las líneas celulares COS-7 y BHK-21 usando como gen reportero el gen de la proteína fluorescente verde y el gen de la β -galactosidasa.

Materiales y Métodos

Plásmidos

psnEGFP de 4300 pb que contiene el gen reportero de la proteína fluorescente verde con señal de localización nuclear bajo el promotor de citomegalovirus humano.

pCMV β gal de 6,4 Kb que contiene el gen reportero de la β -galactosidasa bajo el promotor de citomegalovirus humano.

Purificación de ADN

Una colonia de la cepa bacteriana *E. coli* XL-1 Blue transformada con el plásmido psnEGFP fue inoculada en 50 mL de medio LB con ampicillina 100 mg/mL y se dejó crecer durante 6 h para luego inocular 300 mL de medio de LB con ampicillina a la misma concentración dejándola crecer a 37 °C con agitación de 120 rpm durante toda la noche. Al siguiente día se centrifugó el cultivo y se purificó el ADN por lisis alcalina masiva (16).

Purificación de ADN plásmidico por cromatografía de exclusión molecular

El ARN contaminante y el exceso de sales de la purificación se eliminó mediante una cromatografía de exclusión molecular con Sephadryl S-1000. Una columna XK 16/20 se empaquetó con 30 mL de matriz Sephadryl S-1000 (Pharmacia) y se equilibró con PBS. Se añadió 1 mL de plásmido previamente purificado y se dejó correr por gravedad, el volumen correspondiente al volumen muerto de la columna se desechó, se colectaron fracciones de 1 mL. Las fracciones se chequearon por electroforesis en gel de agarosa 1% y se seleccionaron las que no contenían ARN. Estas fracciones se precipitaron por adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y se centrifugaron 10 min a 12000 rpm. Los precipitados se resuspendieron en agua estéril y se le determinó la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm.

Líneas celulares

- COS-7: ATCC CRL-165
- BHK-21: ATCC CRL-8544. Adaptadas al crecimiento en medio DMEM.

Ambas líneas celulares fueron propagadas en medio de cultivo MEM Dulbecco con 10% de suero fetal bovino y 100 µg de Sulfato de neomicina.

Transfección con DEAE-dextrana

Se lavaron las monocapas celulares dos veces con PBS y se mantuvieron en esta solución hasta preparar la mezcla de ADN-DEAE. Para cada pocillo se tomó 12,5 µL de solución de DEAE-dextrana (10 mg/mL en agua) y se resuspendió en 162 µL de PBS. La cantidad de ADN deseado para transfectar se disolvió en 12,5 µL de agua. El ADN se goteó a la solución de DEAE-dextrana agitando suavemente con vortex para facilitar la formación del complejo ADN-DEAE. Seguidamente se aspiró el PBS de la placa para añadirle la mezcla ADN-DEAE y dejar incubando 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo se le añadió a cada pocillo 625 µL de medio de cultivo DMEM y 8,75 µL de cloroquina y se incubó por 1 h a 37 °C. Se aspiró el sobrenadante de la placa y se adicionó 1 mL de PBS con DMSO al 10% incubando 2 min. Se lavó la monocapa dos veces con PBS antes de añadirle 1 mL de medio de cultivo DMEM con SFB 10%.

Transfección con PEI

Se realizaron dos diluentes diferentes para los complejos de ADN-PEI en este método de transfección.

Experimento 1: Utilización de NaCl 150 mM como diluente de la transfección.

Experimento 2: Utilización de glucosa 5% como diluente de la transfección.

Se depositaron las cantidades de PEI (80000 kDa) y de ADN en tubos por separado a razón de 3,3 µL de PEI (10 mM pH 6,85)/ µg de ADN (relación de N₂ de PEI / (PO₄)²⁻ de ADN (N/P 10)), completando cada tubo con el diluente específico para cada variante a realizar hasta alcanzar un volumen de 50 µL, luego de agitar vigorosamente se dejaron reposar durante 15 min. Se aspiró el medio de cultivo de las placas que contenían las células y se lavaron dos veces con PBS, con el fin de eliminar los restos de SFB del medio. Hasta el momento de aplicar la mezcla de transfección las células se mantuvieron en incubación sin SFB. Pasado este tiempo se añadieron al complejo 900 µL de DMEM. Se le retiró el PBS a la monocapa celular y se le adicionó gota a gota la mezcla transfectante dejando incubar durante 4 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa para luego añadirle el medio de mantenimiento (DMEM, SFB 20%) completando a 2 mL de volumen final.

Para estos experimentos las cantidades de plásmidos valoradas fueron 1 µg, 2 µg y 3 µg.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado para su posterior procesamiento estadístico.

Experimento 3: Transfección con PEI disuelto en glucosa 5% donde se introduce un paso de centrifugación a 2500 rpm durante 5 min inmediatamente después de añadir los complejos de ADN-PEI. En este experimento las cantidades de plásmidos utilizadas fueron 5, 10, 15, 20 y 30 µg.

Cuantificación de la eficiencia de la transfección

Pasadas 48 h después de la transfección las células se lavaron con PBS, se desprendieron con solución tripsina-versene, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 300 µL en solución de corrida (FACS flow). El conteo de las células se realizó por citometría de flujo FACScan BECTON DICKINSON con filtro FL1 (490-590 nm), empleando el programa CELL Quest para el análisis de los resultados

Tinción *in situ* para determinar la actividad de la β galactosidasa

Después de 48 h de realizada la transfección se lavaron las placas dos veces con PBS. Se adicionó la solución de fijación (glutaraldehído 0,5% en PBS) hasta cubrir la monocapa celular y se dejó incubando a 4 °C durante 45 min. Pasado este tiempo se lavó dos veces con PBS y se le adicionó una 200 µL de solución de tinción (Na₂PO₄ 10 mM pH 7, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM, K₄Fe(CN)₆ 3,3 mM, X-Gal 1 µg/mL) que cubriera todo el pocillo, se incubó 18 h en una cámara húmeda. El grado de tinción (por ciento de la monocapa teñido) sirvió para estimar la eficiencia de la transfección. En todos estos ensayos los controles fueron células que se sometieron al mismo tratamiento de las demás pero sin añadirles los complejos de ADN-policación.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS plus 5,0. Se aplicó la prueba de Bartlett y el coeficiente de Skewness para comprobar la igualdad de varianza y la distribución normal de los datos, respectivamente. Se le realizó análisis de varianza y la prueba LSD (Less significant different) de rangos múltiples para comparar los grupos que cumplieron con la primera prueba. Para los datos que no cumplieron con la primera prueba se le aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y el método gráfico de Box y Whisker.

Resultados y Discusión

Uno de los principales objetivos de la transfección de construcciones genéticas es demostrar la funcionalidad de las mismas, así como estudiar la fortaleza de los posibles promotores a utilizar (4,16), por lo que para estos ensayos no es necesario obtener una transfección estable, sino expresar el gen heterólogo de forma transiente.

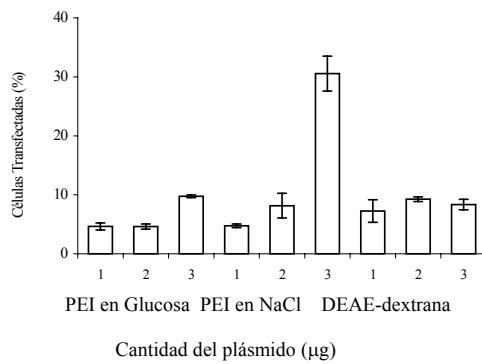


Figura 1. Resultados de la transfección en la línea celular COS-7 de diferentes concentraciones de plásmido (1,2,3 µg/µL) utilizando diferentes agentes transfectantes. La barra sobre las columnas indica la desviación estandar. Diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$). Los resultados del análisis estadístico se muestran en el texto.

Para el método de transfección mediado por PEI en NaCl, se observa en la Figura 1 un aumento del por ciento de transfección a medida que aumentan las concentraciones evaluadas del plásmido en estudio. Para 1 µg/µL se aprecia un $4.75\% \pm 0.30$ de transfección, mientras que para la mayor concentración probada (3 µg/µL) se demuestra un marcado incremento del por ciento de transfección que alcanza un $30.55\% \pm 2.94$. Al realizar una comparación con la variante de la glucosa no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el por ciento de trasfección para la concentración de 1 µg/µL. Para la concentración de 2 µg/µL se muestra un aumento con la variante que utiliza el NaCl. El aumento observado para la concentración de 2 µg/µL con el NaCl se evidencia de forma marcada al evaluar la concentración de 3 µg/µL, por lo que se considera esta variante la de mejor eficiencia para transfectar la línea celular COS-7 de las variables evaluadas.

Los resultados correspondientes al método de transfección mediado por DEAE-dextrana reflejan similares valores de por ciento de células transfectadas para las tres concentraciones evaluadas (7,25 % $\pm 1,92$, 9,26 % $\pm 0,4$ y 8,35 % $\pm 0,88$ para concentraciones de 1, 2 y 3 µg/µL respectivamente).

Otros autores (21) realizaron transfecciones mediadas por DEAE-dextrana en la línea celular COS-7 con variaciones de las condiciones de transfección en comparación con nuestras condiciones como: menor concentración de DEAE-dextrana utilizada, mayor concentración de plásmido y mayor tiempo de exposición a la cloroquina y obtuvieron un mayor por ciento de

Las variantes de disolver los complejos de ADN-PEI en glucosa o en NaCl se realizaron para probar el efecto de los iones en el empaquetamiento del complejo de ADN y los resultados de las mismas para la línea celular COS-7 y BHK-21 se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente, como porcentaje de células transfectadas determinadas por citometría de flujo.

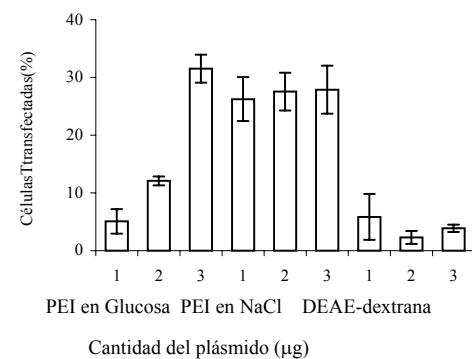


Figura 2. Resultados de la transfección en línea celular BHK-21 de diferentes concentraciones de plásmido (1,2,3 µg/µL) utilizando diferentes agentes transfectantes. Barra sobre las columnas indica la desviación estandar. Diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$). Los resultados del análisis estadístico se muestran en el texto.

células transfectadas.(50-60%). Por lo que se hace necesario tener en cuenta estas diferencias para trabajos futuros.

En la Figura 2 se evidencia que en el método de transfección mediado por la PEI en glucosa se muestra un aumento del por ciento de células transfectadas en correspondencia con el aumento de la concentración de plásmido evaluada ($5.06\% \pm 2.13$; $12.08\% \pm 0.76$; $31.52\% \pm 2.43$ para 1, 2 y 3 µg/µL, respectivamente), existiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados correspondiente al método de la PEI en NaCl muestran una alta eficiencia y presentan un comportamiento muy similar entre ellos: $26.24\% \pm 3.81$, $27.54\% \pm 3.28$ y $27.88\% \pm 4.15$. No existiendo diferencias significativas entre ellos. Comparando los métodos de transfección por PEI en glucosa y NaCl se demuestra que entre las concentraciones de 1 y 2 µg/µL los valores de eficiencia de transfección utilizando NaCl son mayores que con glucosa, y que para la concentración de 3 µg/µL se comportaron de forma semejante.

Los valores de por ciento de transfección obtenidos por el método de la DEAE-dextrana son muy bajos. Tienen su mayor valor para la concentración de 1 µg/µL ($5.83\% \pm 3.96$).

La glucosa se utilizó con el objetivo de lograr complejos de ADN-polícatión de menor tamaño (17), los complejos formados con NaCl son de mayor tamaño y menos compactos que los formados en glucosa, la existencia de fuerza iónica en la solución afecta la talla en la formación de los complejos modificando la eficiencia de transfección (10).

En experimentos de cada método para ambas líneas celulares hay una tendencia al aumento proporcional de las células transfectadas a medida que se aumenta la cantidad de ADN plasmídico, como cabe de esperar un evento de endocitosis mediado por receptores de membranas celulares (18-20), aunque en ambas líneas celulares usando como diluente NaCl el por ciento de células transfectadas satisfactoriamente para 1 μ g y 2 μ g de plásmido es mayor que cuando la PEI se disuelve en glucosa, con diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$).

Otros autores reportan que en transfecciones realizadas en células COS-7 con PEI de peso molecular de 80000 Da en NaCl y con una N/P de 10 (15) alcanzan valores de por ciento de eficiencia del 50-60%. Nuestra metodología solo varió en que ellos inmediatamente después de añadirle a las células los complejos de ADN-PEI centrifugan las placas de cultivo que contienen las células a 1500 rpm, durante 5 min, por lo que aumenta la probabilidad de contacto entre los complejos PEI-ADN y las membranas celulares.

Con respecto a la glucosa al ser más compactos los complejos, el ADN no se puede liberar fácilmente de la PEI impidiendo la expresión del gen. De este tipo de experimento solo tenemos referencias de trabajos *in vivo* y con PEI de 22000 Da (8). En nuestros experimentos comparamos estas variantes *in vitro* y con un PEI de mayor talla.

En la Figura 3 se muestra una fotografía de una tinción de la transfección con el plásmido pCMV β gal por el método del PEI en NaCl centrifugando las placas 2500 rpm 5 min utilizando concentraciones mayores que las utilizadas anteriormente. En la misma se puede observar, como en los experimentos anteriores, el aumento del número de células transfectadas con el aumento de la cantidad de plásmido portador del gen reportero, de 5 μ g a 10 μ g se observa un aumento aproximado del 80% del color azul. Para la cantidad de 5 μ g ya se puede observar una alta eficiencia de transfección, lo que concuerda con los resultados de otros autores (15). De 10 μ g hasta 30 μ g se alcanzan el 100% de las células transfectadas, aunque no se detecta un cambio de coloración apreciable entre ellos por lo que parece haberse saturado el sistema. El control de este experimento fue un pocillo donde las células fueron transfectadas con el gen reportero de la proteína fluorescente verde que fue verificado por microscopía de fluorescencia.

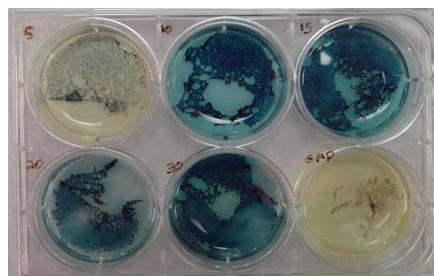


Figura 3. Tinción de células BHK-21 transfectadas por el método del PEI utilizando como disolvente de los complejos NaCl 150 mM a las cantidades de 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g, 20 μ g y 30 μ g del plásmido pCMV β gal y utilizando como control de la transfección células transfectadas con el plásmido pCMVEGFP.

En los experimentos con DEAE-dextrana la eficiencia de transfección para la línea celular BHK-21 es menor que con respecto a la línea celular COS-7 esto puede deberse a que en el caso del DEAE-dextran utilizamos la cloroquina y el dimetil sulfóxido como agentes potenciadores de la transfección, que pueden haber resultado más tóxicos para la línea celular BHK-21 (21).

La línea celular COS-7 manifiesta altos porcentajes de transfección con la DEAE dextrana, similares a los obtenidos con el método del PEI para esta misma línea celular a bajas concentraciones del plásmido. Esta metodología también puede ser utilizada con otras líneas celulares con muy buenos rendimientos (21).

La línea celular BHK-21 deviene en una excelente opción con el método de la PEI ya que con ella se obtienen muy buenos índices de transfección de plásmidos que a su vez pueden mejorar, si se introduce un paso de centrifugación de las células con los complejos de ADN-PEI, que aumenta la probabilidad de contacto entre las células y los complejos de transfección, sin el uso de sustancias que pueden ser tóxicas.

La transfección con PEI no necesita sustancias adicionales que además de ser tóxicas son fuentes de contaminación exógena, para obtener buenos resultados (15, 22), lo que resulta ser una ventaja sobre el método de la DEAE-dextrana.

Estos resultados son de gran interés en el campo de la terapéutica y vacunas de ADN para probar la funcionalidad de los diferentes diseños de una manera rápida y económica.

Referencias

1. Motsch I, et al. Lamins A and C are differentially dysfunctional in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Cell Biol* 2005; 84: 765-81.
2. Horl G, Kroisel PM, Wagner E, Tiran B, Petek E, Steyrer E. Compound heterozygosity (G71R/R140H) in the lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) gene results in an intermediate phenotype between LCAT-deficiency and fish-eye disease. *Atherosclerosis*. 2005 Oct 7.
3. Ito S. High frequency of Hermansky-Pudlak syndrome type 1 (HPS1) among Japanese albinism patients and functional analysis of HPS1 mutant protein. *J Invest Dermatol* 2005; 125:715-20.
4. Toledo JR, Sánchez O, Montesino R, Fernández Y, Rodríguez MP y Cremata JA. Differential *in vitro* and *in vivo* glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys Acta* 2005; 1726:48-56.
5. Sanchez O, Toledo JR, Rodríguez MP, Castro FO. Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *J Biotechnol* 2004;114:89-9.
6. Hellebrand E, Mautner J, Reisbach G, Nimmerjahn F, Hallek M, Mocikat R, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus vector-mediated gene transfer into human B cells: potential for antitumor vaccination. *Gene Ther* 2006; 13:150-62.
7. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E y Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91:4407-4411.

8. Yang Y, Su Q y Wilson JM. Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J Virol* 1996; 70: 7209-7212.
9. Zabner J, Fasbender J, Moninger T, Poellinger A, Welsh M. Cellular and Molecular Barriers to gene transfer by cationic lipid. *J Biol Cell* 1995; 272:18997-19007.
10. Dunlap D, Maggi A, Soria RM, Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acid Res* 1997; 25:3095-3101.
11. Labat-Moleur et al. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.* 1996; 11:1010-7.
12. Myres MP, Stampe P. A point mutation in the maxi-K clone dSlo forms a high affinity site for charybdotoxin. *Neuropharmacology*. 2000; 39:11-20.
13. Fujino T, Kang M, Minekura H, Susuki H, Yamamoto T. Alternative translation initiations generates Acyl-CoA synthetase 3 isoforms with heterogeneous amino termini. *J Biochem* 1997; 122:212-216.
14. Castelli Ch, et al. Novel HLA-Cw8 restricted T cells epitopes derived from Tyrosinase related protein 2 and Gp 100 melanoma antigens. *J of Immunol* 1998; 162:1739-1744.
15. Boussif O, Zanta MA, Behr JP. Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther.* 1996; 3:1074-80.
16. Sambrook J, Fritsch D, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Press. 1984.
17. Goula D, Remy JS, Erbacher P, Wasowicz M, Levi G, Abdallah B, Demeneix BA. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther* 1998; 5:712-7.
18. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:5177-81.
19. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*. 1999; 60:149-60.
20. Remy-Kristensen A, Clamme JP, Vuilleumier C, Kuhry JG, Mely Y. Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1514:21-32.
21. Portelles Y. Optimización de la transfección de células epiteliales mamarias murinas. Tesis de diploma. Universidad de la Habana. Facultad de Biología, Ciudad de La Habana. 1995.
22. Bikales M, Overberger, M. *Encyclopedia of polymer Science and Engineering*. 1985.

In vitro gene transfer using cationic polymers

Abstract

Gene transfer represents an important tool for the study, prevention and treatment of genetic and acquired diseases, as well as for protein function studies. Because of their efficiency, the use of cationic molecules has become a strong competitor to other gene transfer methods. In this study, COS-7 and BHK-21 cell lines were transfected with the plasmid psnEGFP using the cationic polymers polyethylene imine (PEI) and DEAE-dextran. When transfection efficiency was measured, it was observed that the cell line BHK-21 is an excellent option for transfection with the PEI method. The best results were obtained when PEI was dissolved in NaCl 150 mM. When plates were centrifuged after addition of the PEI-DNA complexes, nearly 100% of transfected cells with low DNA concentrations were obtained.

Keywords: Transfection, polyethylene imine, PEI, gene transfer, cationic polymers

ADJUVANT 2006



CUBA – CELEBRAN 3er. TALLER INTERNACIONAL DE VACUNAS, ADJUVANTES Y GLICOCONJUGADOS

Por Noel González Gotera

El “3er. Taller Internacional de Vacunas Adjuvantes y Glicoconjungados – Adjuvant 2006”, se desarrolló entre el 16 y el 20 de abril del 2006, en las instalaciones del *Club Amigo*, Varadero, provincia de Matanzas, con exitosas sesiones científicas y encuentros bilaterales entre profesionales que nos visitaron procedentes de 12 países de Europa, Asia y América. Se presentaron 29 conferencias por parte de investigadores cubanos y extranjeros distribuidas en 6 simposios, así como una sesión de carteles con 24 trabajos. La presencia foránea fue variada y de gran importancia en el campo de la investigación internacional en Vacunas y Adyuvantes: seis compañías extranjeras representadas, 3 universidades, seis instituciones de investigación de alto prestigio, así como la presencia de la OMS.

[Colaboración del Dr. Oliver Pérez Martín, Vicepresidencia de Investigaciones, Instituto Finlay, Presidente del Comité Organizador del Taller y de la Sociedad Cubana de Inmunología.]