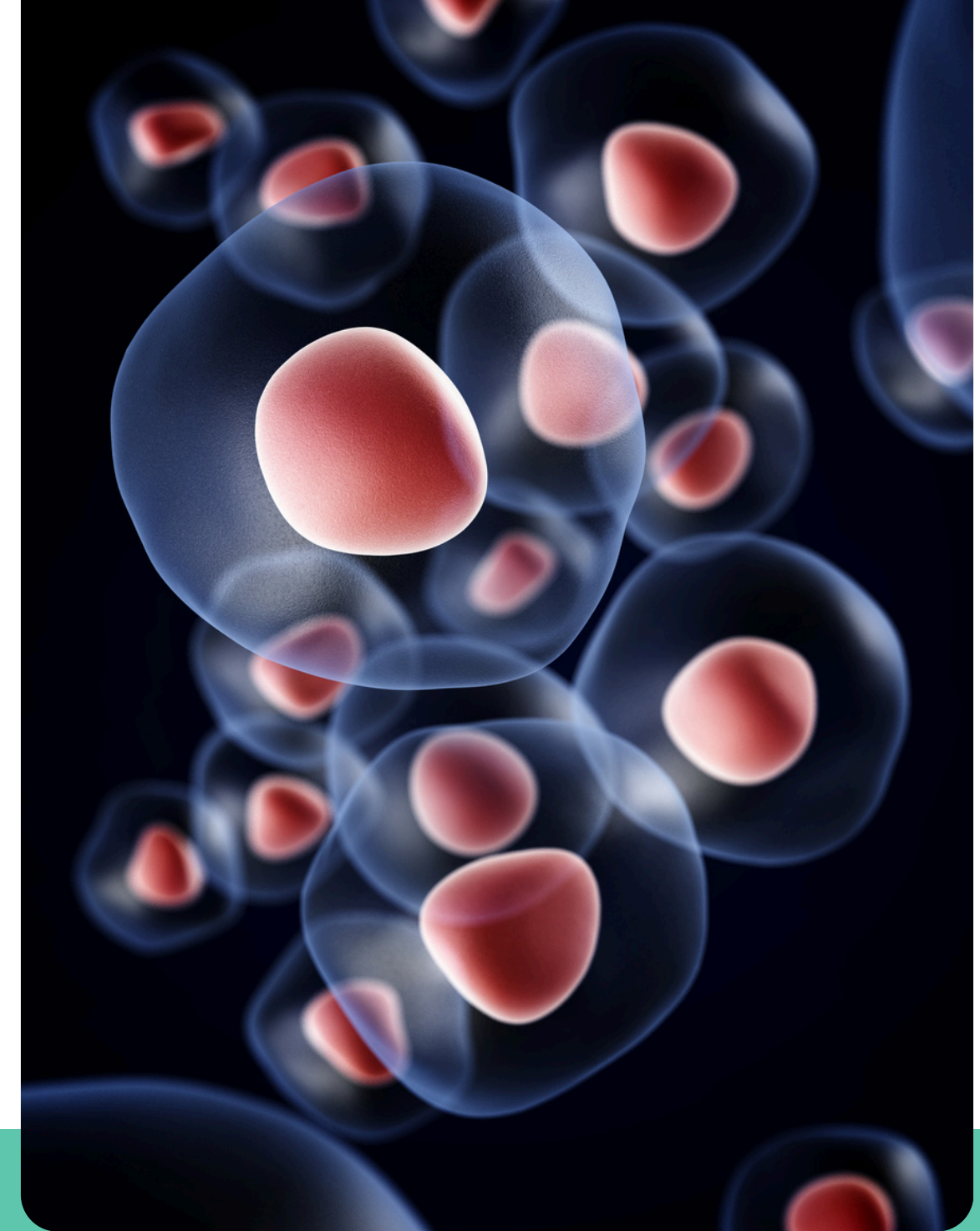


Transformación y selección

Metodología del ADN recombinante:
herramientas para la manipulación génica

Docente Mariela Escobar

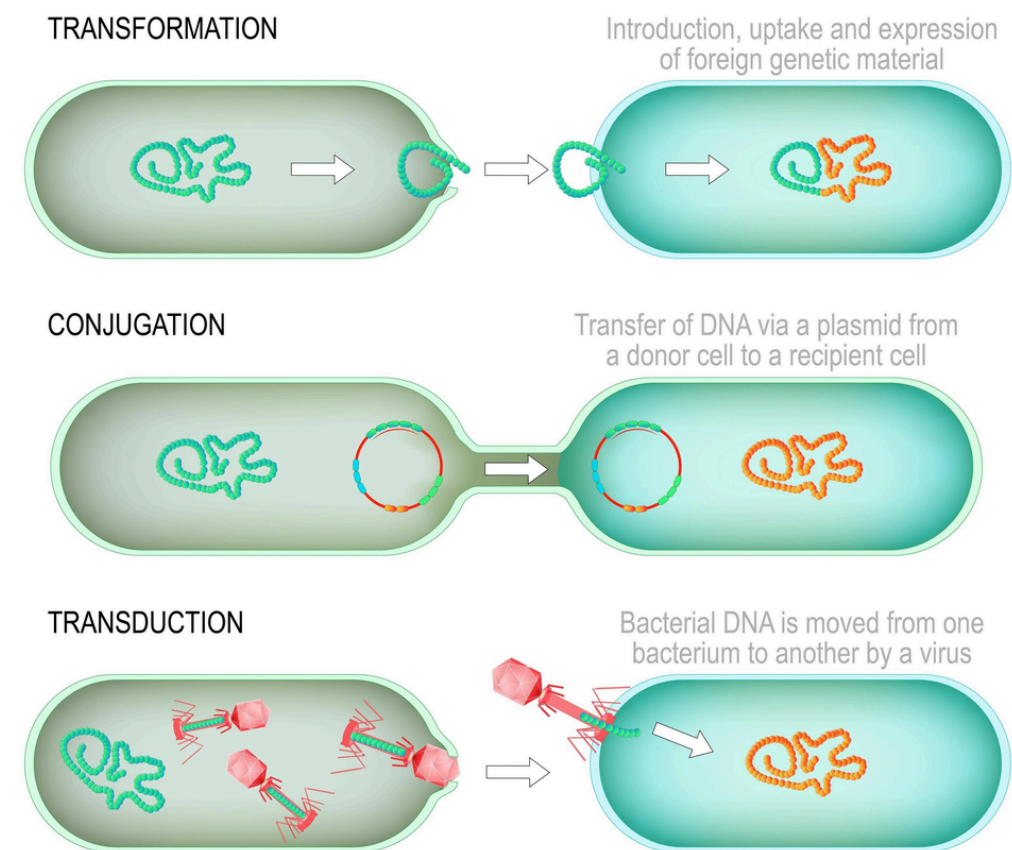


Transformación

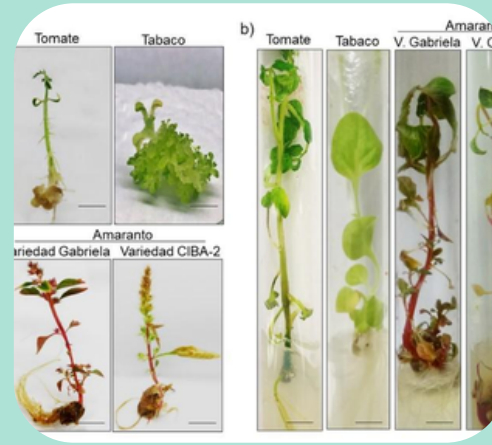
Incorporación de ADN desnudo en una célula.

- ➔ El ADN debe estar altamente purificado.
- ➔ Existe un punto de saturación en la concentración de ADN, agregar más no siempre da más colonias y puede ser tóxico para las células. Generalmente se usan 1–10 ng de plásmido para transformar células comerciales.
- ➔ El ADN transformado debe portar un gen de selección (resistencia a antibióticos) para establecerse, sino se pierde en las divisiones celulares siguientes.

Mechanisms of horizontal gene transfer



Organismos transformables y sus aplicaciones



Bacterias

Producción de proteínas recombinantes, enzimas industriales, vacunas comestibles, probióticos de diseño

Hongos y levaduras

Producción de vacunas (ej. Hepatitis B) y cerveza/pan mejorados

Plantas

Resistencia a herbicidas (glifosato) o plagas (Maíz Bt).

Algas

Producción de lípidos para biodiesel.
Producción de omega-3, astaxantina y pigmentos naturales

Animales

Producción de anticuerpos monoclonales para terapias.

Transformación en bacterias

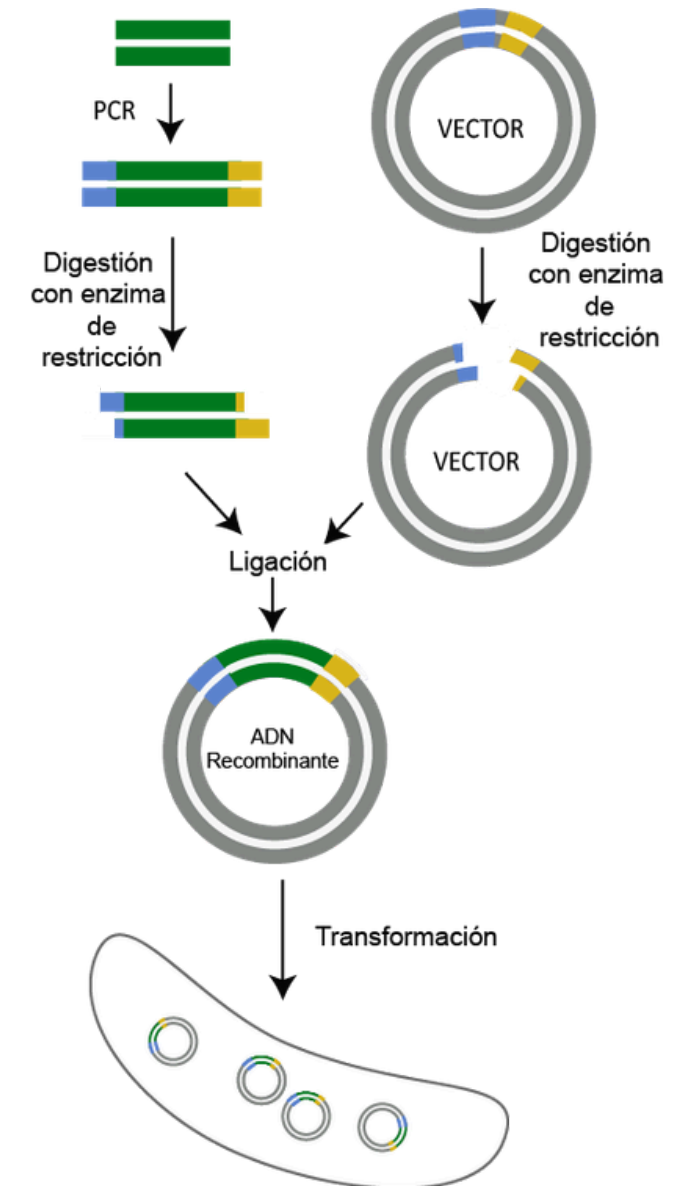
Debemos distinguir la transformación natural de la transformación artificial

Transformación natural

- Sucede en la naturaleza, con las bacterias en estado de competencia
- Competencia: es un estado fisiológico inducible regulado por genes cromosómicos (genes com), expresados coordinadamente por condiciones particulares (densidad del cultivo, temperatura, nutrientes, etc).
- Mecanismo que sirve a las bacterias para aumentar su pool de genes creando nuevas combinaciones (obtención de nutrientes, reparación del ADN)
- El ADN que ingresa se integra al cromosoma mediante recombinación homóloga.

Transformación artificial

- Procedimiento inducido en el laboratorio para objetivos de ingeniería genética.
- Competencia: no es natural; se induce mediante métodos físico-químicos (ej. CaCl_2 o pulsos eléctricos).
- Permite el clonado de ADN recombinante y propagación de plásmidos.
- La entrada del ADN es forzada a través de poros temporales en la membrana/pared celular.
- El ADN que ingresa generalmente se mantiene como un plásmido extracromosómico (autónomo), aunque puede integrarse si se busca estabilidad a largo plazo.
- Escherichia coli (Mandel e Higa, 1970), Salmonella, Pseudomonas.



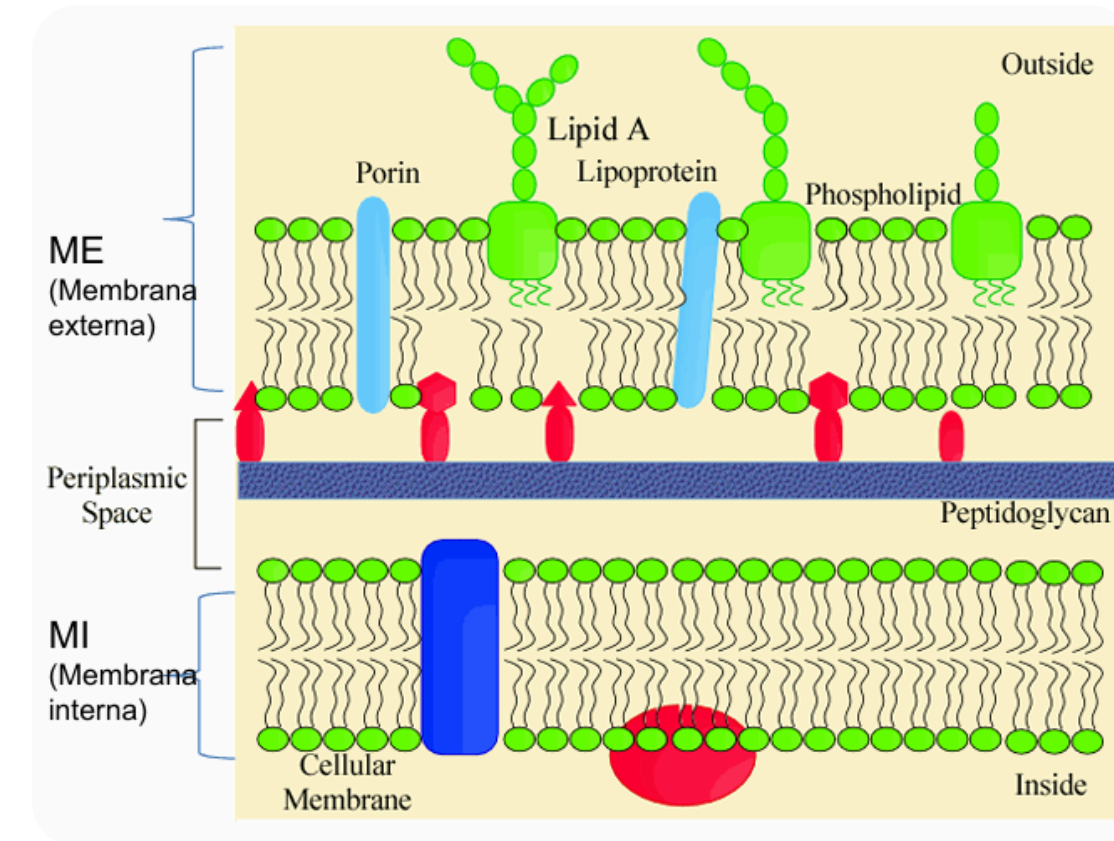
Bacterias usadas en transformación

Bacterias Gram Positivas (+)

- *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*.
- Utilizan un complejo de proteínas (pseudopilus) que atraviesa la gruesa capa de peptidoglicano.
- Se une a ADN de doble cadena (dsDNA) en la superficie, una hebra es degradada por nucleasas mientras la otra (ssDNA) ingresa al citoplasma.
- La hebra que ingresa es protegida por proteínas de unión a ssDNA para evitar su degradación antes de la recombinación.

Bacterias Gram Negativas (-)

- *Haemophilus*, *Neisseria*, *Acinetobacter*.
- (Barrera adicional), el ADN debe atravesar primero la membrana externa para llegar al periplasma.
- El dsDNA entra al periplasma a través de estructuras tipo poro.
- Luego una hebra se degrada y la restante ingresa al citoplasma.

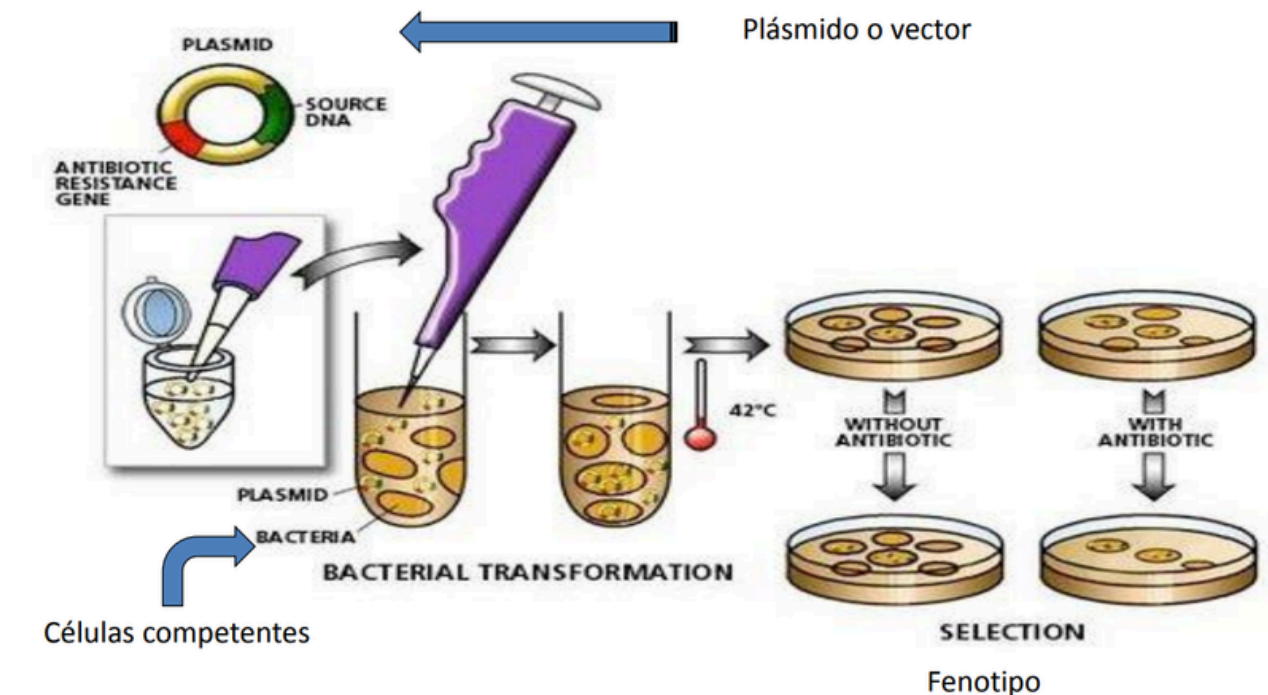


Escherichia coli

- Muy usada en técnicas del ADN recombinante, mantiene los plásmidos de forma estable y es de rápida división.
- No posee los genes de competencia (genes com) expresados de forma activa, no se considera naturalmente competente.
- En 1970, Mandel e Higa descubrieron que tratando a *E. coli* con cloruro de calcio (CaCl_2) y dándole un choque térmico, se volvía competente.

Flujo general de la transformación bacteriana

- 1** Cultivo: cultivo de bacterias (ej. *E. coli*) en fase exponencial temprana, donde las células están metabólicamente activas y sanas.
- 2** Obtención de células competentes: las bacterias se someten a un tratamiento (químico o físico) que altera sus membranas para permitir la entrada de ADN externo.
- 3** Incubación con ADN recombinante: se mezcla el ADN (plásmido conteniendo gen de resistencia a antibiótico) con las células competentes. Aquí ocurre la unión física del ADN a la superficie celular.
- 4** Inducción de la entrada (pulso): se aplica un estímulo (choque térmico o pulso eléctrico) para que el ADN atraviese la pared y las membranas celulares.
- 5** Recuperación: se incuban las bacterias en medio líquido sin antibiótico a 37°C. Esto permite que la bacteria se recupere del estrés y comience a expresar los genes de resistencia del plásmido.
- 6** Siembra y selección: las bacterias se siembran en placas de agar con el antibiótico correspondiente. Sólo aquellas que incorporaron y mantienen el plásmido podrán crecer y formar colonias.



Métodos de transformación (artificial)

1. Se parte de un cultivo de E. coli crecido hasta fase exponencial de crecimiento.

Método químico (CaCl₂ + choque térmico)

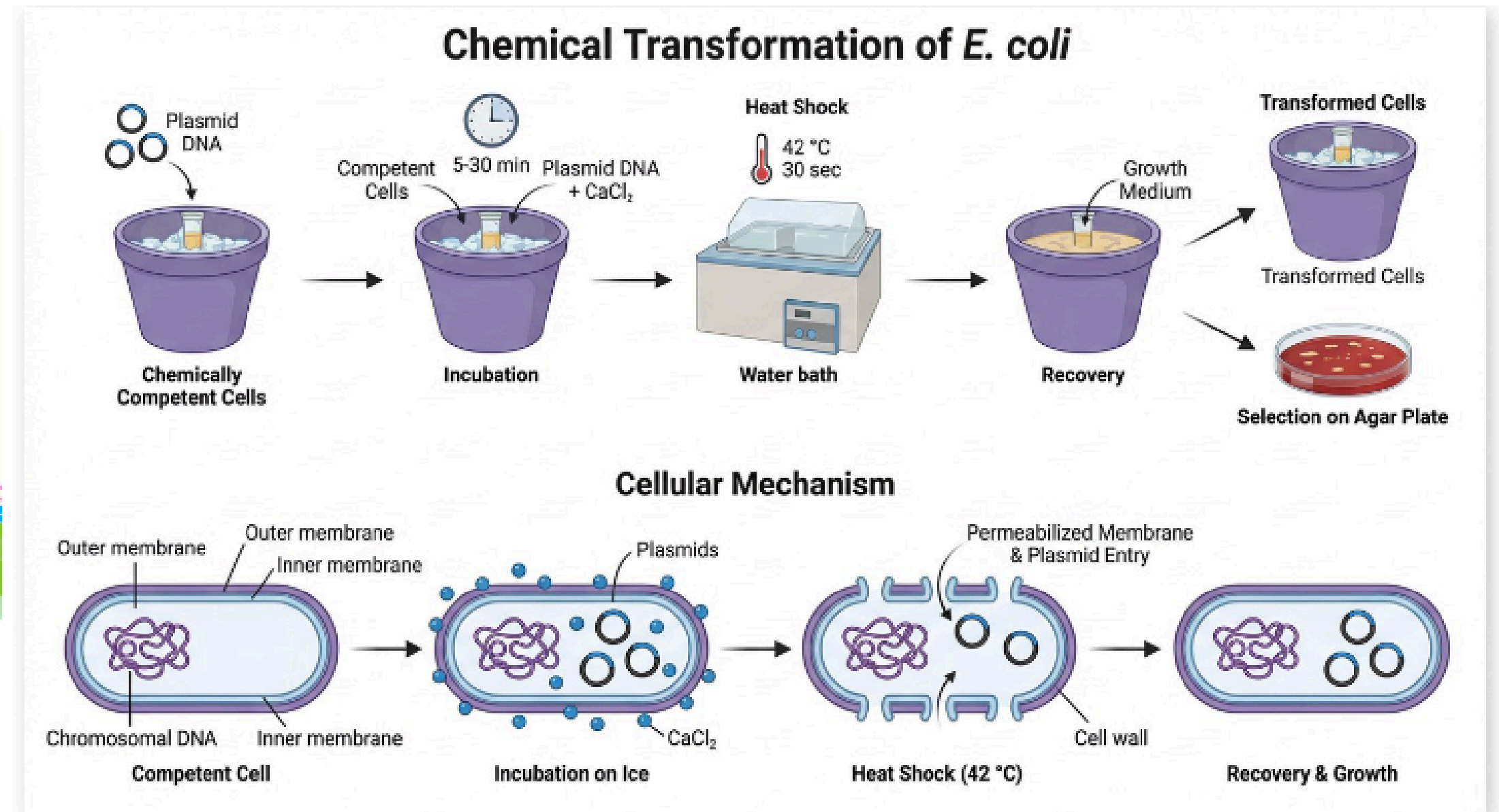
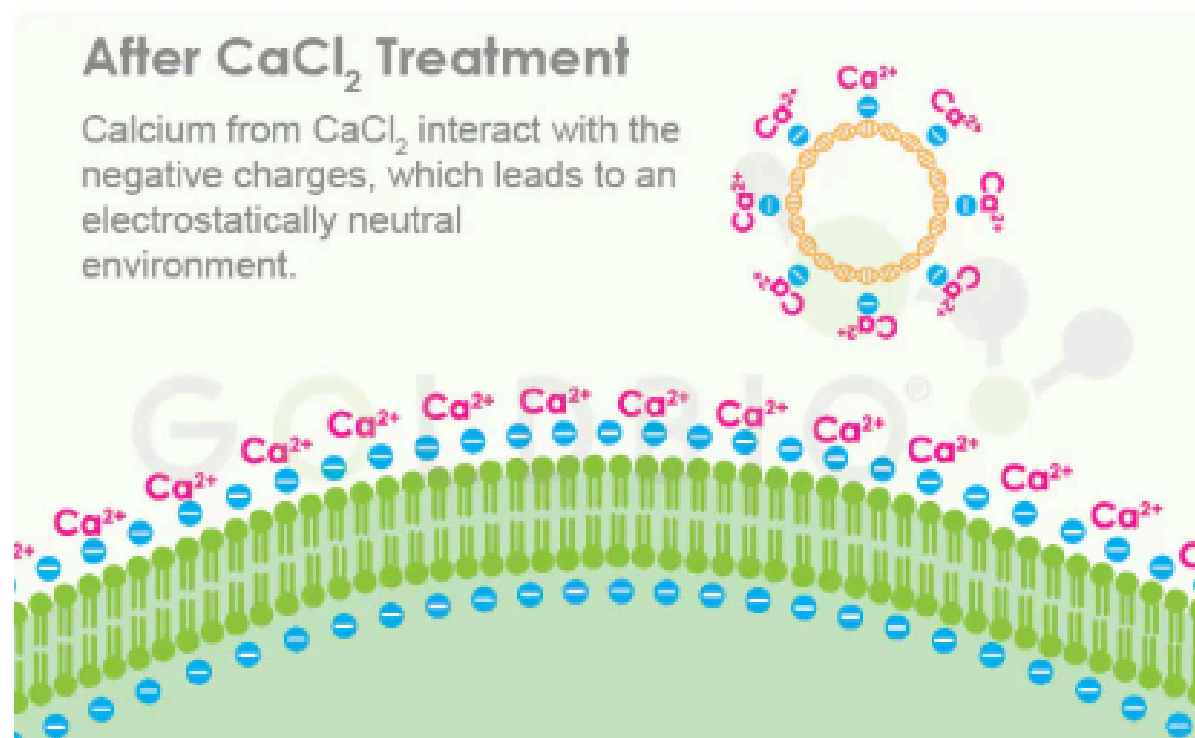
2. Centrifugación del cultivo y lavados **con cloruro de calcio 0.1M**.
3. Bacterias en cloruro de calcio 0.1 M **se incuban con el ADN plasmídico en hielo**. Los iones Ca²⁺ neutralizan las cargas negativas de los fosfatos del ADN y los fosfolípidos de la membrana, facilitando el acercamiento.
4. **Choque térmico (heat shock)**: despolariza la membrana, libera lípidos y forma poros. Disminuye el potencial de membrana a un valor muy bajo. El ADN pasa a través de los puntos de contacto entre ME y MI. 0°C → 42°C 90 seg → 0°C
5. **Volver a 0°C** restablece el potencial de membrana a su valor inicial (breve incubación en hielo).

Electroporación (método físico)

2. Centrifugación del cultivo y lavados con **agua destilada estéril o soluciones de glicerol al 10%** (crioprotector) muy frías (0°C).
3. Se busca **eliminar todas las sales y electrolitos** del medio (como el LB). Si quedan sales, al aplicar el pulso eléctrico en el paso se produce un arco voltaico (un chispazo) que mata las bacterias.
4. Se aplican **pulsos eléctricos de alto voltaje (kV)** durante milisegundos a la mezcla de células y ADN en un medio de baja conductividad.
5. El campo eléctrico desestabiliza la bicapa lipídica, creando microporos transitorios por donde entra el ADN.

6. Luego del pulso, se agrega medio de cultivo a la mezcla, incubación a 37°C para que las bacterias se dupliquen y el plásmido se replique.
7. Siembra en placas con antibiótico para seleccionar las bacterias transformadas.

Método químico (CaCl_2 + choque térmico)



Electroporación (método físico)

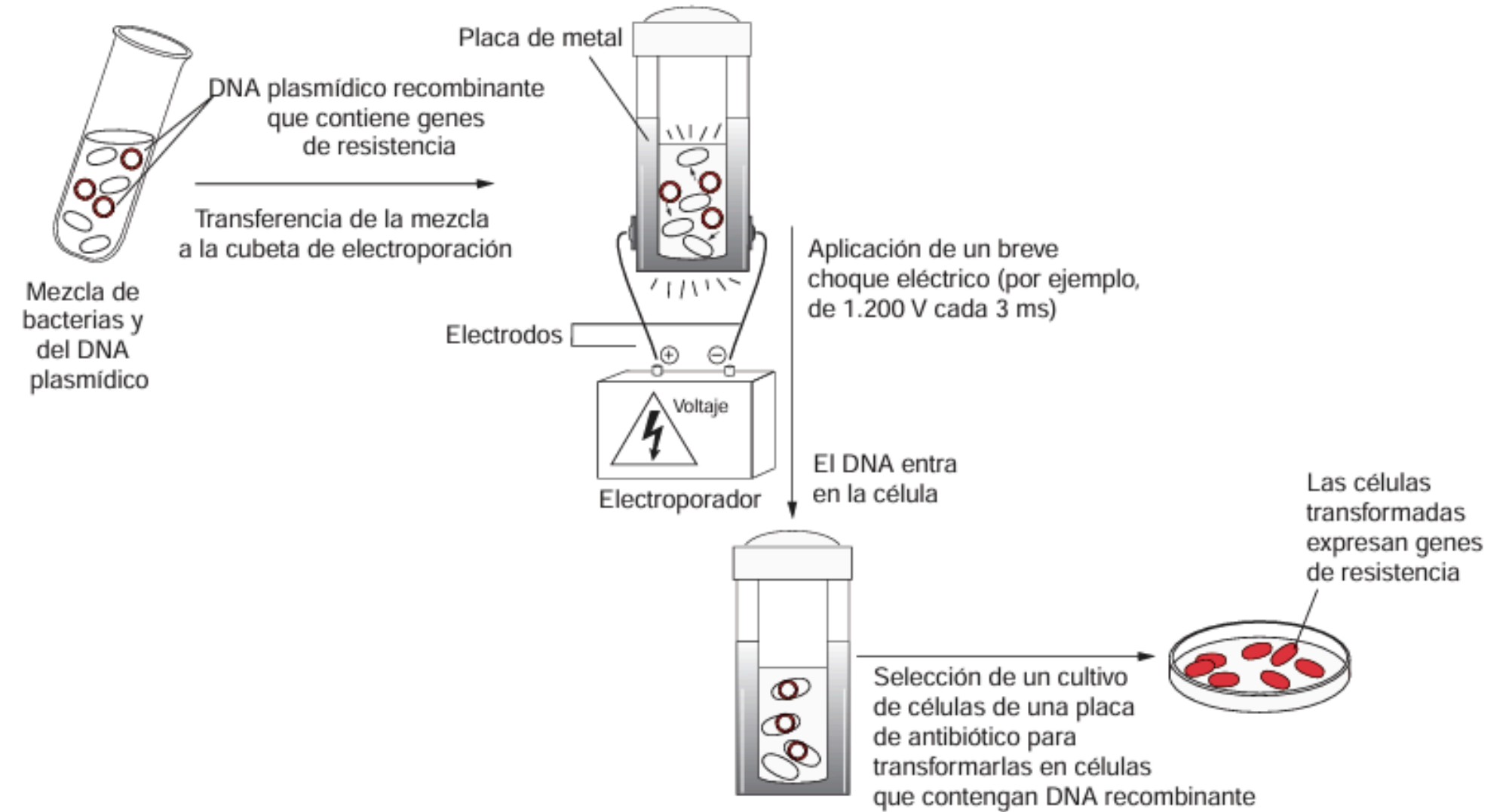
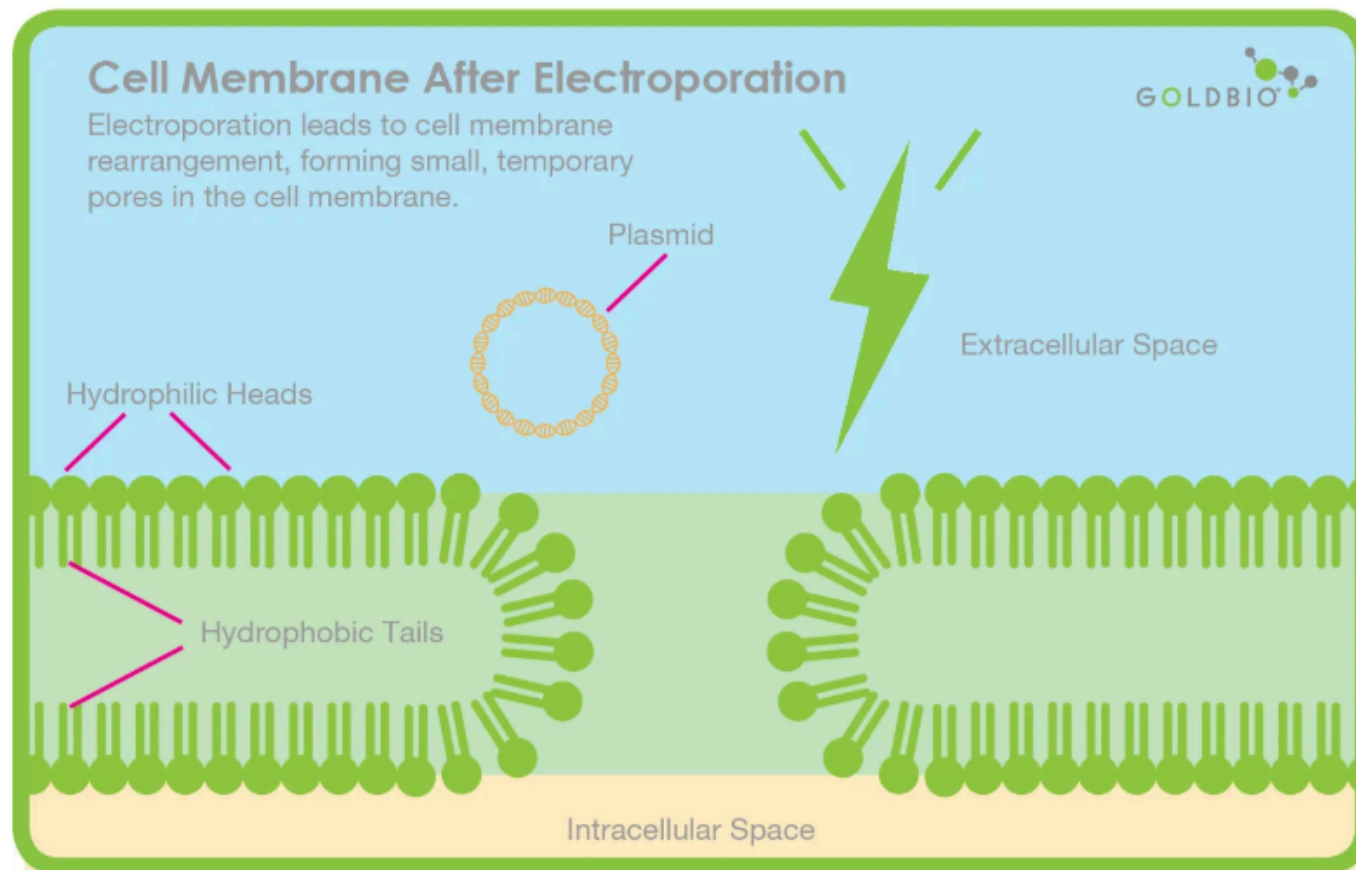


Figura 5.4 La electroporación es una técnica rápida y eficaz para transformar bacterias Durante la electroporación se coloca una mezcla de bacterias y DNA plasmídico en una cubeta. Gracias a la aplicación de un breve choque eléctrico a la cubeta el DNA se introduce rápidamente en la célula. Las células que contienen DNA recombinante pueden ser seleccionadas entonces para ser cultivadas en agar-agar que contenga un antibiótico u otro componente de selección.

Estructura del ADN y cepas para transformar

ADN plasmídico: circular (superenrollado o relajado).

- El ADN superenrollado (miniprep) transforma con mayor eficiencia que el relajado o el que ha sido cortado y religado.
- Relación tamaño/eficiencia: a mayor tamaño del plásmido, menor es la eficiencia de transformación. Plásmidos muy grandes (>15–20 kb) suelen requerir electroporación.
- Replicación autónoma (múltiples copias por célula). Se produce la replicación a partir de su propio ori.

Cepa receptora:

- hsdR–: mutante en el sistema de restricción, evita que la bacteria digiera el ADN entrante
- recA–: mutante en la proteína de recombinación A, fundamental para que el plásmido no se integre al cromosoma ni sufra reordenamientos (episoma estable).
- Células ultra competentes: existen cepas comerciales preparadas para máxima eficiencia (ej. DH5alpha, TOP10), vienen con los genotipos hsdR y recA optimizados para clonado de rutina.

ADN Lineal: fragmentos lineales (ej. productos de PCR).

Cepa receptora:

- recBCD– y sbcB–: mutantes en Exonucleasa V y I, no degrada el ADN lineal detectado.
- recA+: recombinación activa para que el fragmento se integre al genoma.
- Integración por recombinación homóloga.

Tecnología del ADN recombinante, visión general

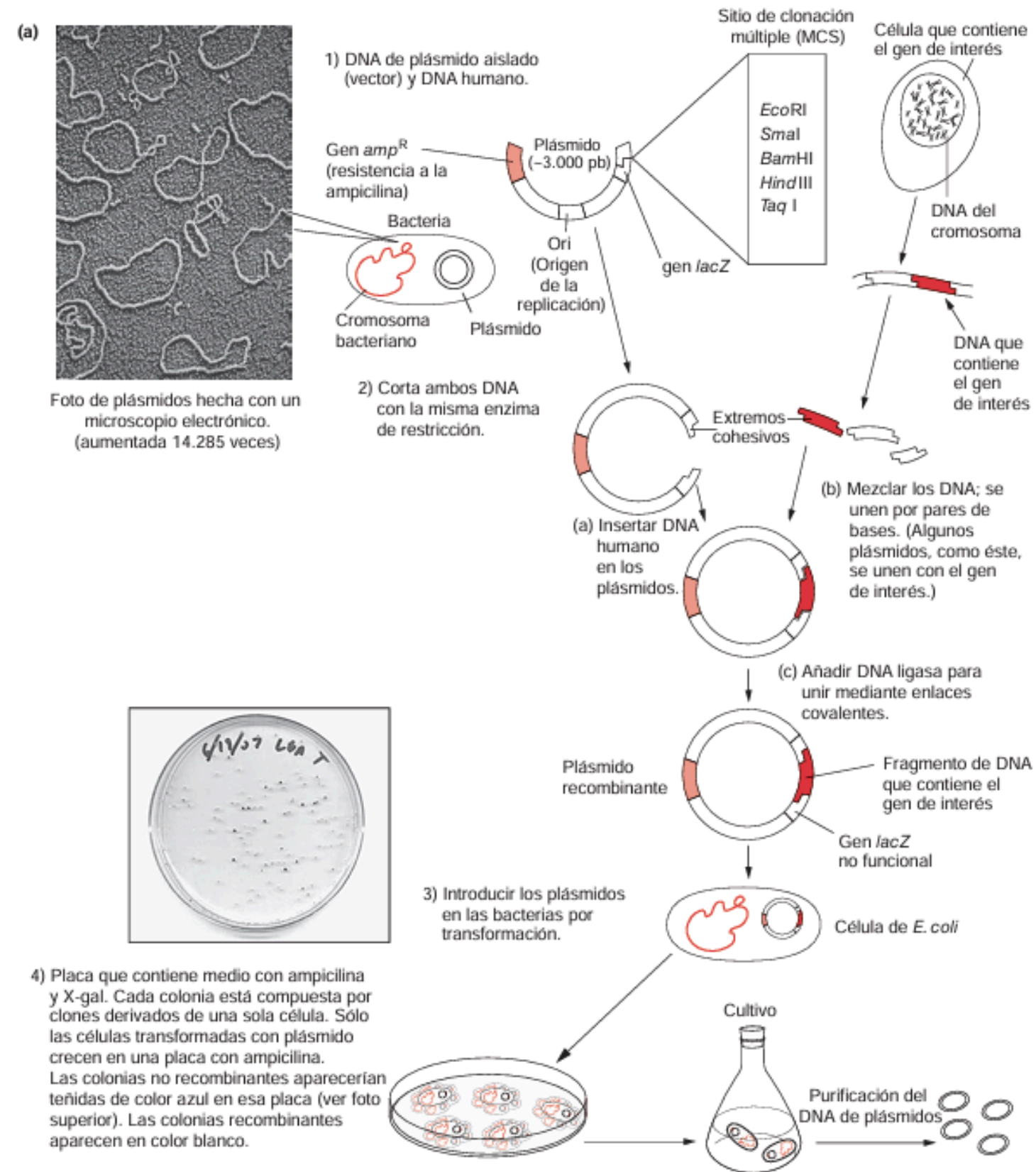
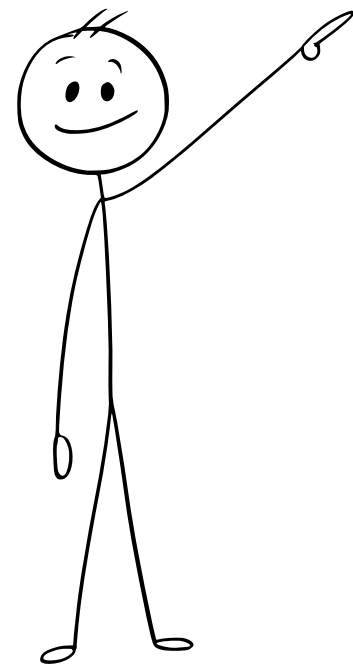


Figura 3.3 Clonación de un gen en un plásmido con selección azul-blanca.

Eficiencia de transformación



Número de bacterias transformadas por microgramo de ADN.

Químico

$10^6 - 10^8$ UFC/ug de ADN

- 10-12% bacterias se vuelven competentes
- 0,1-1% de moléculas del plásmido dan lugar a una transformante

Electroporación

$10^9 - 10^{10}$ UFC/ug de ADN

- 90% bacterias competentes
- 10% de moléculas de plásmido dan una transformante

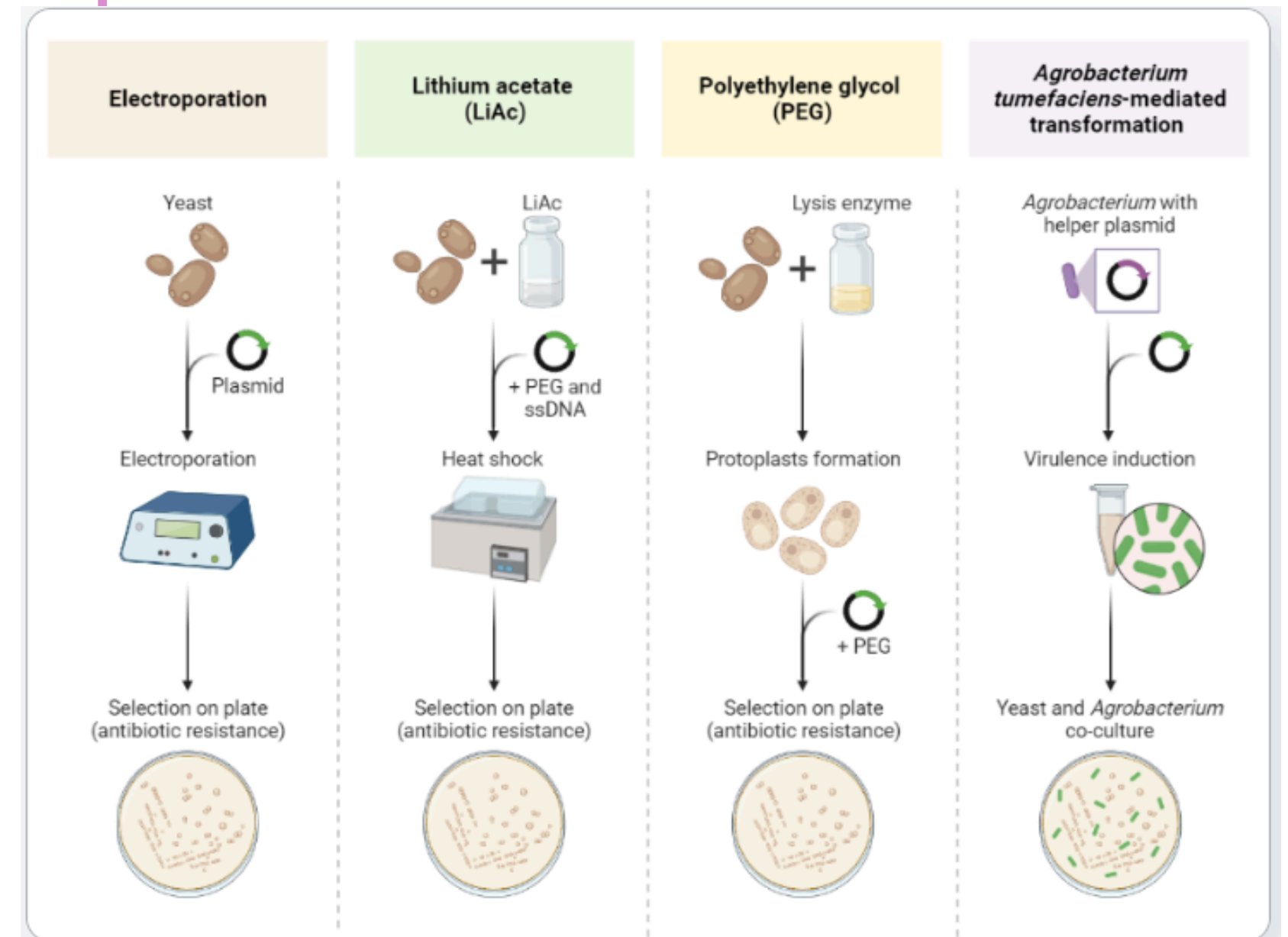
Transformación en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*)

¿Por qué usar levaduras?

- Sistema eucariota: permiten el plegamiento correcto de proteínas complejas.
- Modificaciones postraduccionales: glicosilación, formación de puentes disulfuro.
- Sistema secretorio: facilidad para purificar proteínas si se secretan al medio de cultivo.

Métodos de transformación

- Químico (LiAc/PEG): uso de acetato de litio o cesio y PEG (polietilenglicol) seguido de choque térmico. El LiAc permeabiliza la pared y el PEG facilita la adhesión del ADN.
- Electroporación: muy eficiente, similar al protocolo bacteriano pero ajustando voltajes para la pared fúngica.
- Esferoplastos: eliminación enzimática de la pared celular (usando p. ej. zimolasa). Método laborioso, requiere regenerar la pared post-transformación.



Plásmidos de levaduras (Y = yeast)

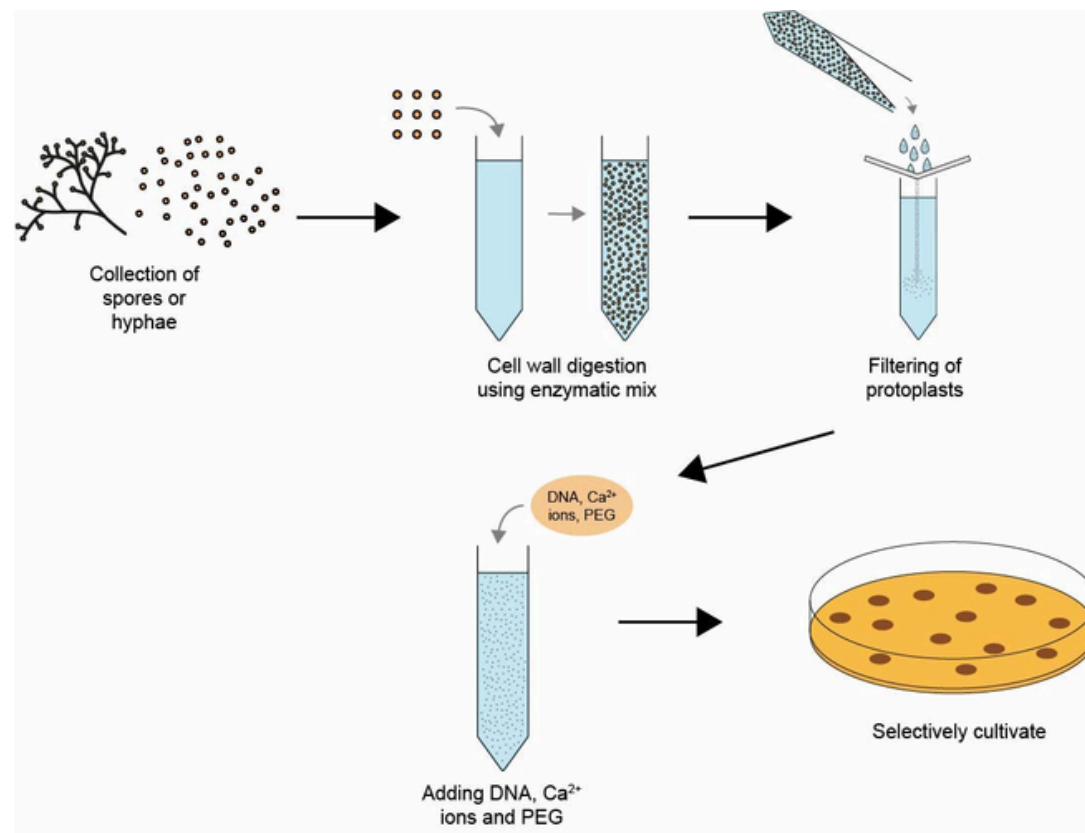
Son vectores híbridos porque tienen secuencias bacterianas para propagarlos en *E. coli* y secuencias de levaduras.

- YIp (**integrativo**) tienen secuencias de levaduras para integrarse en el genoma por recombinación homóloga, no se replica. Propósito: introducir un gen de interés o provocar deleciones en un gen sustituyendo por una versión delecionada o mutagenizada. Estable. Generalmente una copia.
- YRp (**replicativo**): tiene secuencias ARS (Autonomously Replicating Sequence) para su replicación. Es inestable, se pierde porque no segrega equitativamente en la mitosis. Múltiples copias.
- YCp (**centromérico**): contiene secuencias de centrómero (CEN) y secuencias ARS. Es más estable y se mantiene en bajo número de copias, mejor segregación mitótica.
- YEp (**episomales**) tienen secuencias del plásmido de 2 μ (plásmido natural de levaduras), se mantiene como episoma de alto número de copias. Suele tener promotores inducibles (GAL1, GAL10, PGK).
- YACS (**cromosoma artificial**): imitan a los cromosomas normales, poseen secuencias ARS, CEN y TEL (teloméricas) que le permiten propagarse a células hijas. Vectores para clonar fragmentos de hasta 2 Mb.

Selección nutricional vs. antibiótica:

a diferencia de las bacterias, en levaduras se suelen usar marcadores de **auxotrofía** (ej. genes URA3, HIS3, LEU2). Se transforman cepas mutantes que no pueden sintetizar un aminoácido y solo crecen en medio mínimo si incorporaron el plásmido.

Transformación en hongos filamentosos



¿Por qué transformar hongos filamentosos?

- Producción de metabolitos: son fábricas naturales de enzimas, ácidos orgánicos y pigmentos.
- Microma: utilizan edición ingeniería genética para que hongos filamentosos produzcan colorantes naturales (como rojos y naranjas).
- Secreción masiva: son muy buenos secretando proteínas al medio, facilitando el procesamiento downstream.

Métodos de transformación

- Protoplastos: se utiliza una mezcla de enzimas para digerir la pared celular de quitina. Los protoplastos resultantes son células desnudas muy frágiles que se transforman mediante PEG + CaCl₂.
- Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (ATMT): esta bacteria que infecta plantas también puede transferir ADN (el T-DNA) a hongos. Es muy eficiente para hongos con paredes difíciles.
- Biolística: disparo de micropartículas de oro con ADN directamente sobre el micelio.

Transformación en algas

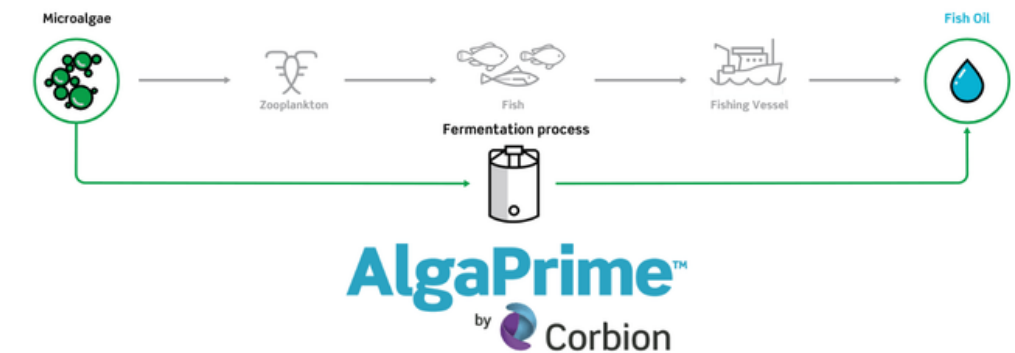
¿Por qué transformar algas?

- Crecimiento en biorreactores, no compiten con la tierra cultivable.
- Son muy eficientes fijando carbono (fotosíntesis)
- Se puede transformar el núcleo, el cloroplasto o la mitocondria, cada uno expresa proteínas de forma distinta.
- Producción de lípidos (biocombustibles), Omega-3 (DHA).

Métodos de transformación

A diferencia de las bacterias, las paredes celulares de las algas exigen métodos físicos.

- Agitación con perlas de vidrio (Glass Bead Transformation): es el método más barato y simple. Se agitan las algas con el ADN y perlas de vidrio, la fricción crea microfisuras por donde entra el plásmido.
- Biobalística: imprescindible para transformar el cloroplasto. Se disparan micropartículas de oro o tungsteno recubiertas de ADN.
- Electroporación: muy usada en *Chlamydomonas* (modelo estándar).



Marcadores de selección:
Resistencia a antibióticos
(zeocina, higromicina), o
rescate metabólico

Transformación en plantas

Mejoramiento genético:

- clásico
- transformación

Clásico: basado en la variabilidad genética para los caracteres que se desean mejorar.

Limitación: reproducción sexual para la incorporación de los mismos (existen barreras de especies) y el tiempo para estabilizar la nueva variedad (10-20 años o más).

Soja de 4 semillas



Transformación genética:

Permite introducir genes por métodos no sexuales (no existen barreras de especies) y aporta variabilidad genética sin alterar el background (se pueden agregar características favorables sin perder las mejoras logradas anteriormente)

Planta transgénica: aquella en la cual se ha incorporado un gen por una técnica no sexual.

Usos:

- Introducción de nuevos rasgos, genes de otras especies vegetales, genes de especies alejadas evolutivamente (hongos, bacterias, virus).
- Silenciamiento: se usa tecnología antisentido, RNAi para apagar o disminuir la expresión de ciertos genes (ej. para que un fruto no madure rápido).
- Sobreexpresión de genes endógenos de interés
- Molecular farming.

Conceptos importantes en transformación vegetal



Totipotencia: capacidad de regenerar una planta completa a partir de una única célula (condición indeterminada: células meristemáticas, células de la corteza, callos, de proliferación rápida)

Transformación estable vs. transitoria:

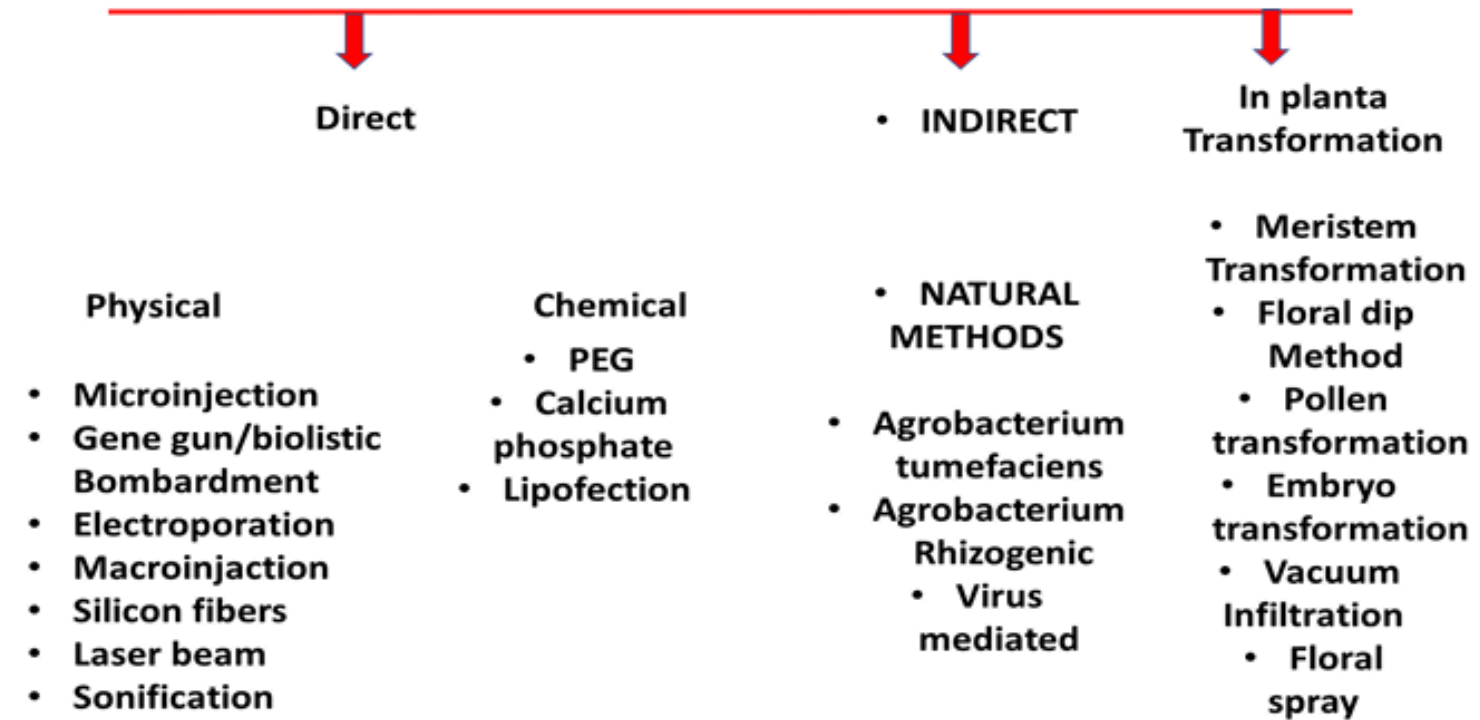
- Estable: el ADN se integra al genoma. El rasgo es permanente y se hereda a la progenie (semillas). Es la base para crear variedades comerciales y cultivos biotecnológicos (GMOs).
- Transitoria: expresión rápida sin integración, ideal para screening de fármacos o probar si un promotor funciona.

La secuencia transformada debe contener:

- Promotor de plantas:
 - Constitutivo: CaMV 35S (el más usado, de activación continua).
 - Inducible: se activa en ciertas condiciones, estrés, luz o químicos (Estradiol).
 - Tejido-específico: solo se expresa en la semilla o el fruto.
- Señales eucariotas: poliadenilación (terminador).
- Genes de selección (como nptII de resistencia a kanamicina) y reporte (como GUS, da un color azul, o GFP, de fluorescencia). La selección permite que solo crezcan las plantas transformadas, y el reportero permite ver si entró en la célula.

Métodos de transformación en plantas

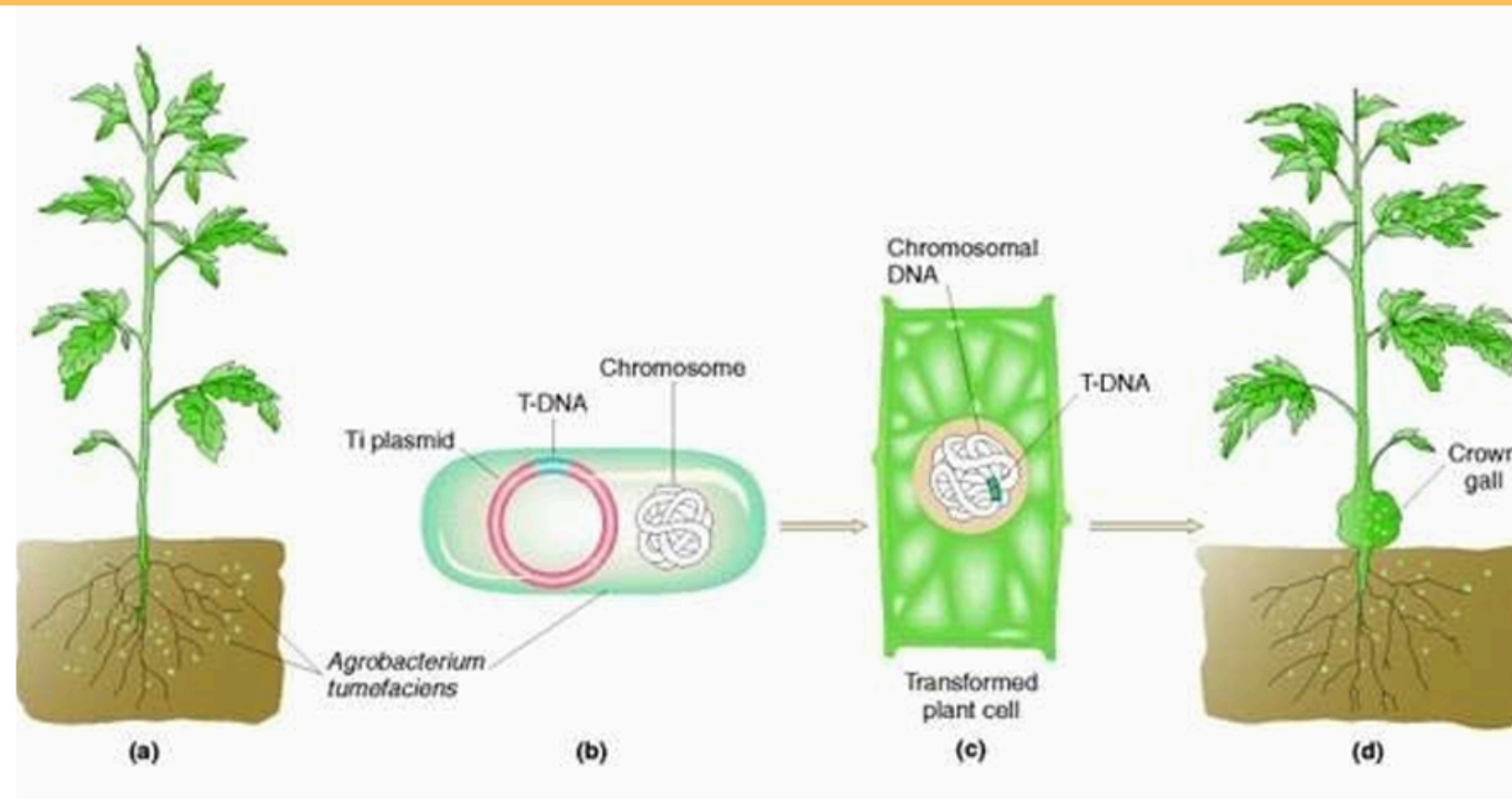
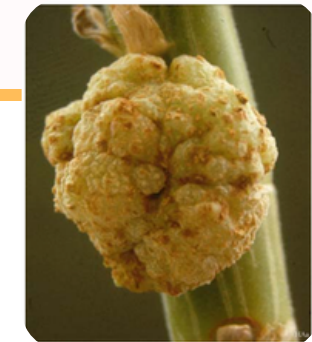
- ➔ Agrobacterium tumefaciens
- ➔ Biobalística



Estas tecnologías de transferencia de ADN son herramientas fundamentales para dos grandes estrategias biotecnológicas: la transformación convencional (para insertar transgenes de forma estable y al azar en el genoma, GMO) y la edición génica por CRISPR/Cas9 (ediciones dirigidas y precisas, el T-DNA exógeno es eliminado luego por cruzamiento, no GMO).

Método de transformación biológico (*Agrobacterium tumefaciens*)

Agrobacterium es un fitopatógeno que infecta heridas, transfiere genes propios a la planta y produce una colonización genética. Alberga el plásmido inductor de tumores (Ti), induciendo agallas en las raíces y coronas de numerosas especies de angiospermas dicotiledóneas y algunas gimnospermas. El crecimiento celular neoplásico, similar a un tumor, se induce mediante la expresión de los oncogenes que residen en el ADN transferido (ADN-T) transportado desde estas bacterias al núcleo de la planta y que se integra en su genoma.



Número de copias: bajo (1 a 3).
Integridad del ADN: muy alta (se integra exactamente lo que está entre LB y RB).

Plásmido Ti (tumor Inducing)

en la naturaleza 200-800 Kb, T-DNA: 10-30 Kb. Definido por LB y RB (secuencias homólogas de 24-25 pb en orientación directa)

La transformación requiere de la presencia de dos componentes genéticos ubicados en el plásmido Ti bacteriano:

1 El T-DNA: es lo que se transfiere a la planta.

tms1y tms2: codifican enzimas que establecen una nueva ruta biosintética de auxina (hormona vegetal) a partir de triptofano.

tmr: síntesis de citoquininas (hormona vegetal) genes moduladores de la actividad de las hormonas. Auxina y citoquininas se producen en forma descontrolada generando un tumor.

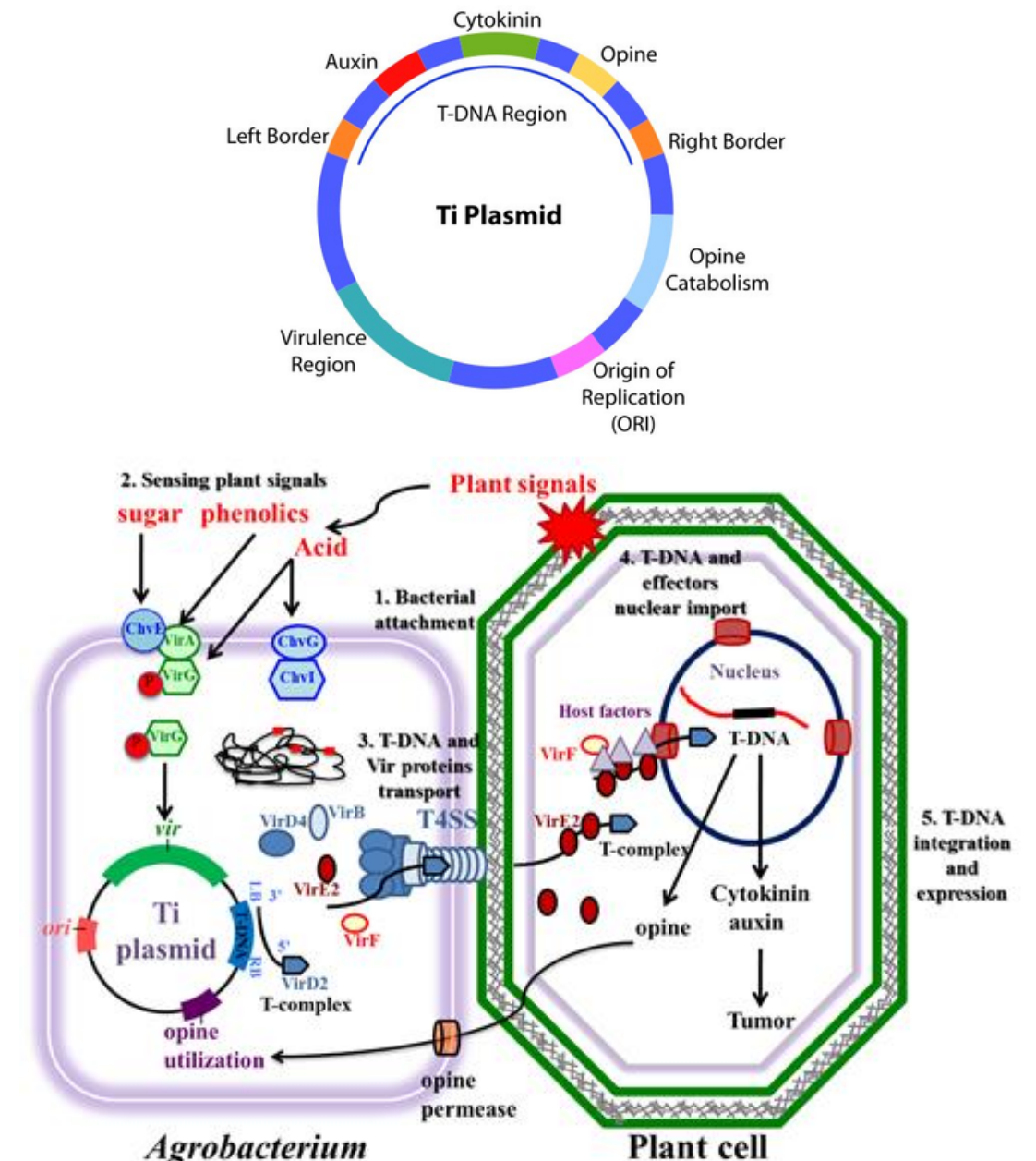
Genes de opinas (nopalina, octopina, etc)

2 Región de virulencia (vir):

Genes Vir: operones A-H, 25 genes, codifican componentes de la maquinaria proteica bacteriana que media el procesamiento y la transferencia del ADN-T, su expresión es inducida por compuestos fenólicos (como la acetosiringona) liberados por **plantas heridas**.

VirA: es una proteína quinasa transmembrana ubicada en la membrana interna de la bacteria. Funciona como un receptor que censa compuestos fenólicos y ciertos azúcares. Al activarse, VirA se autofosforila y luego transfiere ese grupo fosfato a VirG.

VirG: es el regulador de respuesta. Una vez fosforilado por VirA, actúa como un factor de transcripción que se une a secuencias específicas (cajas vir) en los promotores de todos los demás operones vir, activando su expresión masiva.



Plásmido Ti (tumor Inducing)

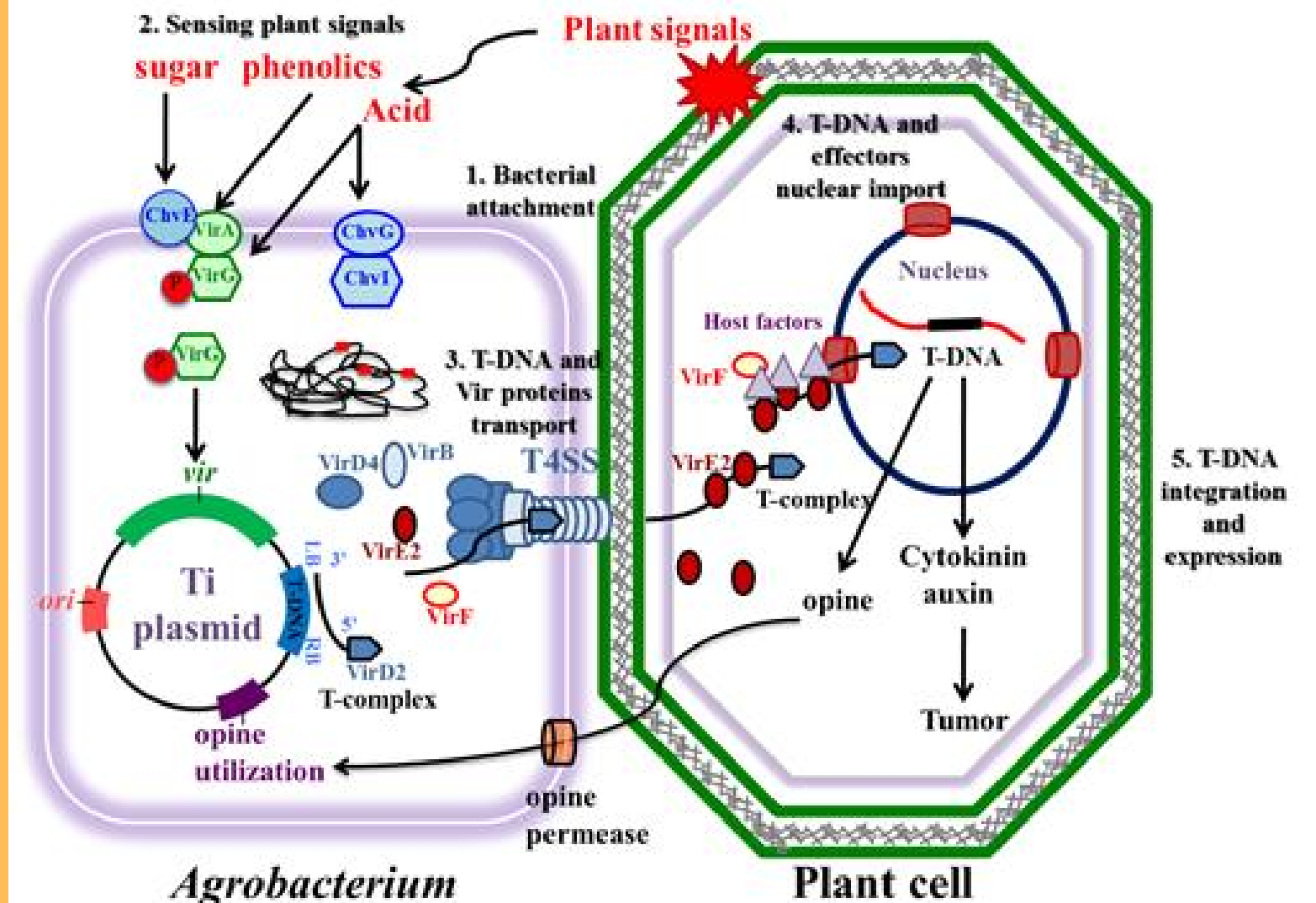
VirD1: actúa como una topoisomerasa/helicasa desenrollando el ADN y permitiendo que VirD2 reconozca las secuencias de los bordes (LB y RB). Prepara el ADN para el corte.

VirD2: es una endonucleasa crítica, participa en la integración del T-DNA en la planta. Realiza un corte preciso en la cadena inferior (bottom strand) entre los nt 3-4 del RB y LB del T-DNA. Tras el corte, VirD2 queda unida covalentemente al extremo 5' de la cadena sencilla de ADN (ssDNA). Posee señales de localización nuclear (NLS) que guían al ADN dentro del núcleo de la planta y protege el extremo 5' de la degradación por exonucleasas.

VirE2: proteína de unión a ADN simple hebra, recubre toda la longitud del T-DNA de forma no específica. Tiene NLS, protege el DNA de la degradación.

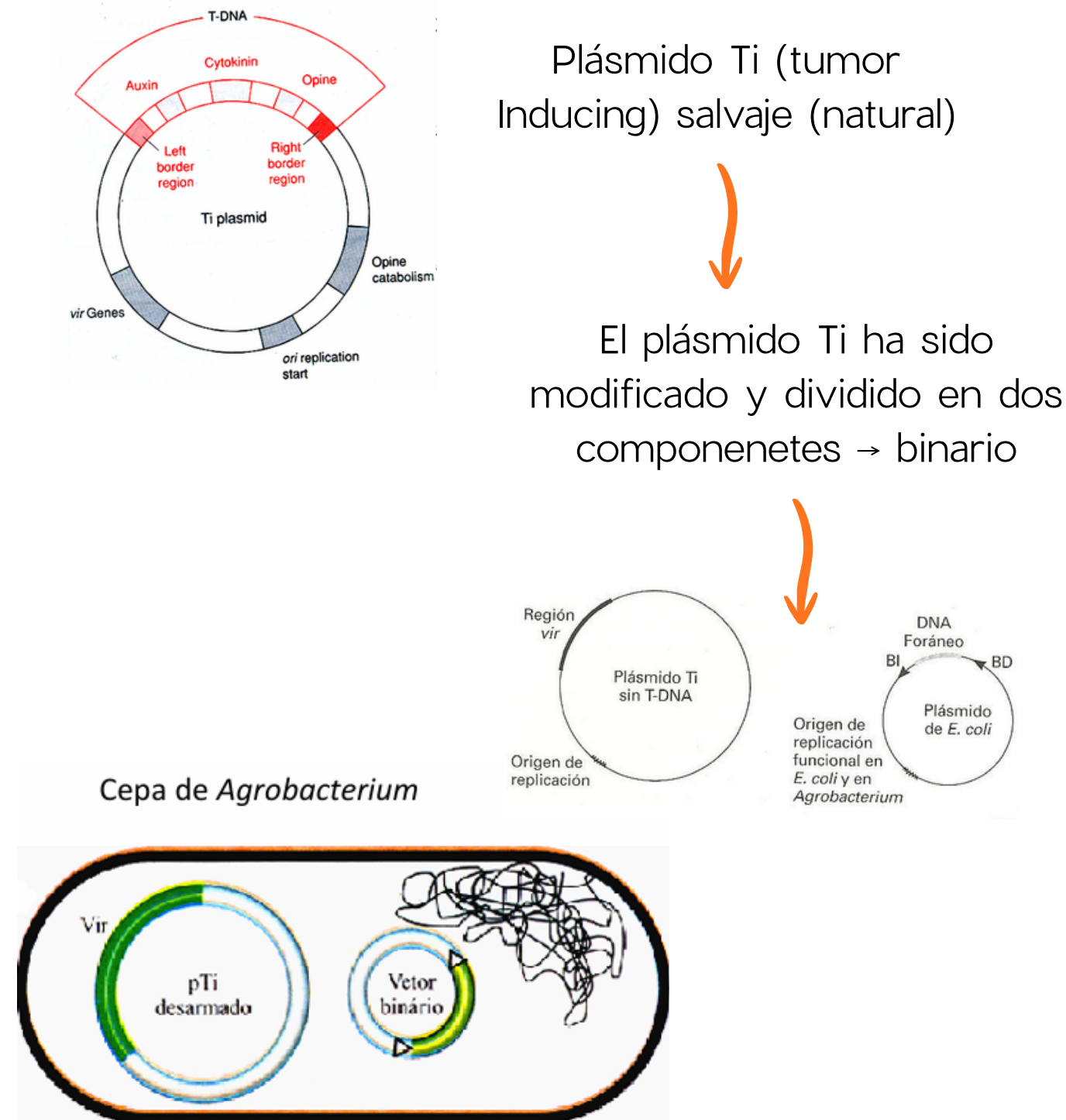
VirB: (11 proteínas conforman el aparato de secreción de tipo IV), este complejo forma el canal físico (pili) a través del cual viaja el complejo T-DNA/Proteína. VirB4, VirB11 son ATPasas que proveen energía. VirB1 es secretada y produce hidrólisis del peptidoglicano. VirB2, VirB5, Vir6 y VirB7 son componentes estructurales del T-pilus (filamento flexible ≈10 nm). VirD4 actúa como proteína acopladora.

VirF: permite liberar el T-DNA de sus proteínas protectoras (VirE2 y VirD2) una vez que llega al núcleo, permitiendo que el ADN se integre al genoma. Lo hace marcando estas proteínas para su degradación mediante el sistema de ubiquitina-proteasoma del huésped.



Sistema de vector binario

Plásmido Ti al ser tan grande es casi imposible de manipularlo y poco eficiente en transformaciones.



Vector de clonado (o plásmido binario):

- Bordes (LB y RB): secuencias homologas necesarias para que el ADN se transfiera. Cualquier secuencia entre LB y RB entrará a la planta (antes allí se encontraban los genes del tumor)
- El gen de interés se clona entre LB y RB.
- Origen de replicación dual: para replicación en *E. coli* y en *Agrobacterium*.
- NO tiene los genes vir, por sí sólo este plásmido es inerte, no puede saltar a la planta.

El Plásmido helper (ayudante)

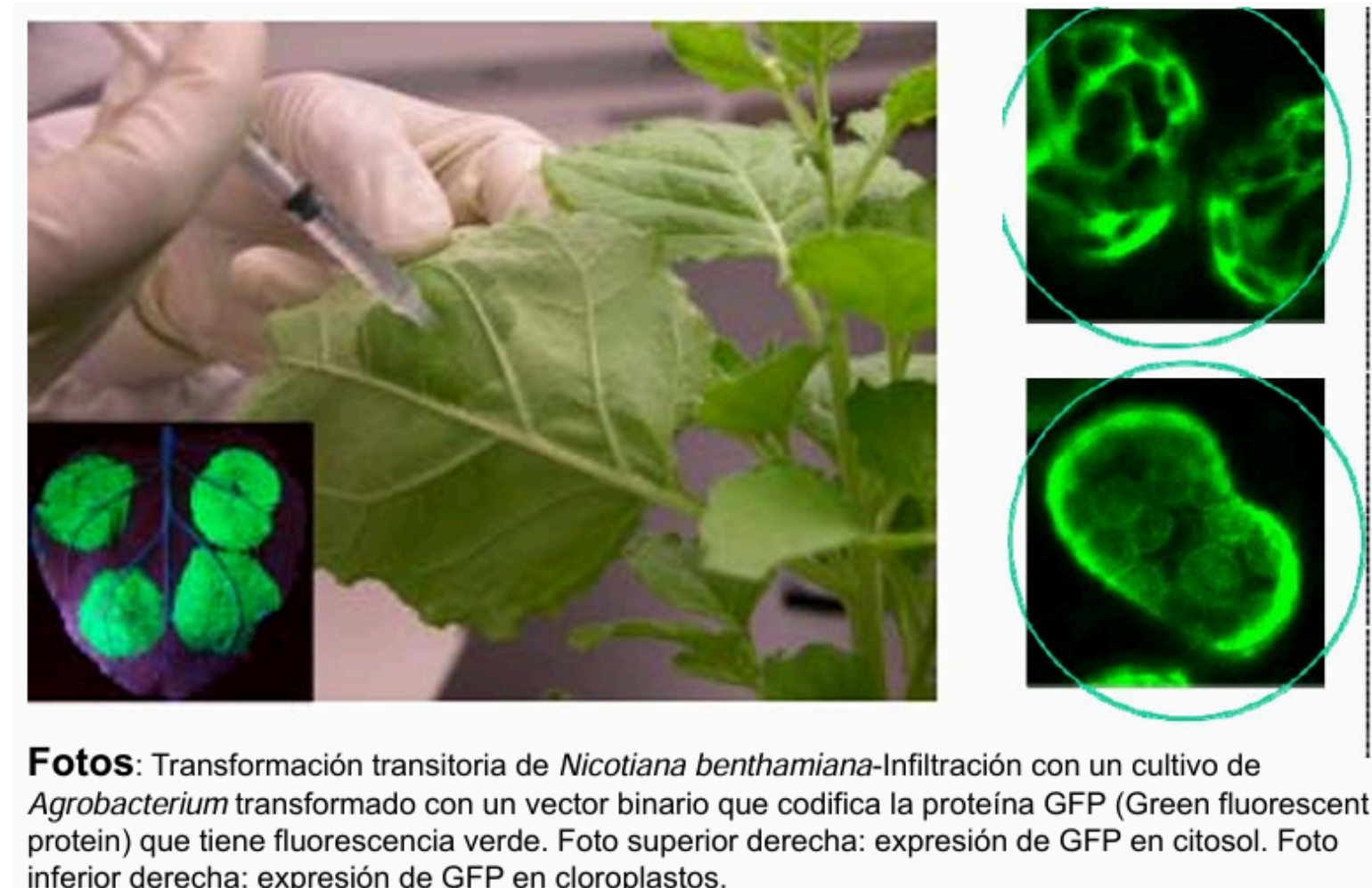
- Plásmido Ti (modificado), residente en la cepa de *Agrobacterium* que usamos en el laboratorio.
- Tiene la maquinaria de inyección (genes Vir).
- Se le han borrado los bordes (LB/RB) y los genes del tumor (tms1, tms2, tmr). A esto se le llama un plásmido "desarmado" (disarmed).
- Provee las proteínas para mover el ADN que está en el otro plásmido.

Transformación estable y transitoria con *Agrobacterium*



Transformación estable:

Se transforman células totipotentes. Mediante cultivo de tejidos y selección, se regenera una planta completa donde todas sus células portan la modificación.



Fotos: Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*-Infiltración con un cultivo de *Agrobacterium* transformado con un vector binario que codifica la proteína GFP (Green fluorescent protein) que tiene fluorescencia verde. Foto superior derecha: expresión de GFP en citosol. Foto inferior derecha: expresión de GFP en cloroplastos.

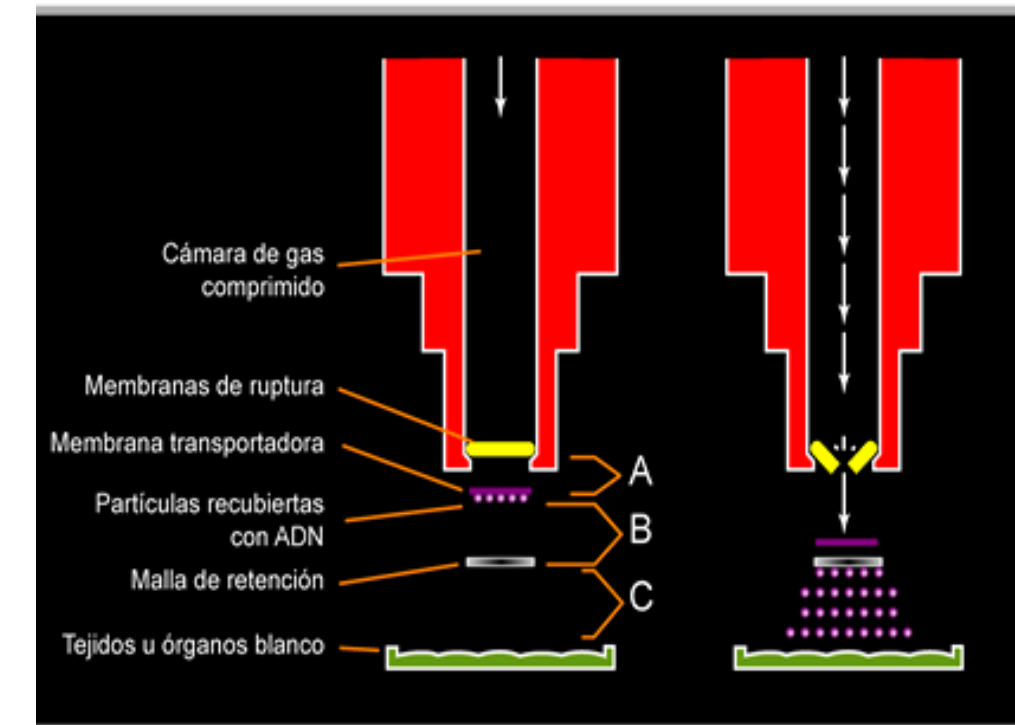
Transformación transitoria (transient):

La infiltración es una forma rápida y transitoria de expresar genes en plantas. Aunque el transgén no esté integrado en el genoma puede ser expresado, y podemos detectarlo. Luego no se prosigue con el cultivo para regenerar una planta completa.

Bombardeo de partículas por 'gene gun' o biobalística

- Introduce ADN en el núcleo de células y organelas (cloroplastos y mitocondrias) por medio de microproyectiles disparados a alta velocidad.
- Se disparan plásmidos enteros o incluso fragmentos lineales. Los plásmidos sólo requieren origen de replicación de E. coli para el clonado. No se necesita tener bordes (LB/RB) ni genes vir.
- Se requiere promotores vegetales y marcadores de selección.
- El ADN purificado se mezcla y precipita en micropartículas de oro o tungsteno. Al dispararse, la partícula atraviesa la pared celular por velocidad. Una vez adentro, el ADN se disocia y migra al núcleo.
- El ADN se integra al genoma mediante mecanismos de reparación de roturas de doble hebra (NHEJ) causadas por el mismo impacto. Se producen micro-heridas y roturas físicas en el ADN genómico de la planta.
- Es el único método efectivo para transformar cloroplastos.

Número de copias: alto (múltiples copias y arreglos).
Integridad del ADN: variable (el plásmido puede integrarse roto o truncado).



Transformación estable y transitoria con biobalística

Transformación estable: tejidos totipotentes

- Callos embriogénicos: masas de células indiferenciadas crecidas en una placa de petri. Se les dispara y luego se seleccionan las células que sobreviven con el antibiótico.
- Embriones inmaduros: común en cereales (maíz, trigo). Se extrae el embrión de la semilla y se le dispara directamente a las células del escutelo (totipotentes).
- Ápices meristemáticos: se le dispara al meristema para que las nuevas ramas salgan transformadas.

Transformación transitoria: hojas o plantas enteras

- Hojas: se le dispara a una hoja joven. A los 2 o 3 días, la hoja expresará el gen.
- Es un test rápido, si el gen no se expresa como se busca, no se intenta la transformación estable, que toma más tiempo.

Desventajas:

- ! El daño celular. al ser un método físico, muchas células mueren por el impacto. Hay que encontrar el balance entre poca presión (no entra el ADN) y mucha presión (daño al tejido).
- ! Multicopia y arreglos: es común que se integren muchas copias juntas, una detrás de otra (tándem), o que el ADN se rompa antes de entrar.
- ! Sitios al azar: si cae en una zona de heterocromatina, el gen no se expresará.
- ! Silenciamiento: al haber tantas copias integradas de forma desordenada, la planta suele detectar esto como una anomalía (o un ataque viral) y activa el silenciamiento génico.

Identificación y caracterización de plantas transformadas

Marcadores de selección: genes que permiten que solo la célula transformada sobreviva en un medio de cultivo específico.

- Resistencia a antibióticos: el más usado es nptII (resistencia a kanamicina).
- Resistencia a herbicidas: permiten que la planta crezca en presencia de compuestos como el glifosato o glufosinato de amonio.
- Selección positiva (sustratos): genes como la fosfomanosa isomerasa.

Genes reporteros (visualización): permiten ver la localización.

- GUS (uidA): ensayo histoquímico, al agregar un sustrato (X-Gluc), las células transformadas se tiñen de azul intenso, es destructivo.
- GFP: se observa bajo luz UV, no es destructivo.

Estudio de promotores en *A. thaliana* (GUS)

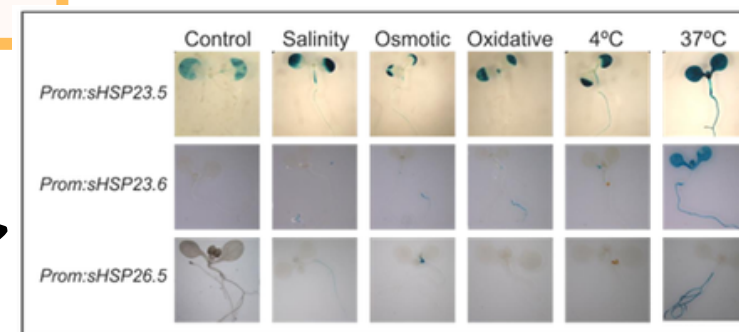


Figure 4.9. Histochemical analysis of GUS activity in *A. thaliana* seedlings. Plants were grown for

Presencia del gen: inserción y cigosis

- PCR: nos dice si el gen está. La qPCR permite estimar el número de copias.
- Southern Blot: confirma la integración física en el genoma y cuántas copias reales hay (evita falsos positivos de la PCR).

Expresión del gen:

- Nivel de ARN: Northern Blot o RT-qPCR.
- Nivel de proteína: Western Blot (detección con anticuerpos) o ensayos de actividad enzimática.
- Efecto fenotípico: evaluación de los efectos, por ej resistencia a sequía.

Lineas de tomate con un gen de resistencia al chilling silenciado (ARNm)

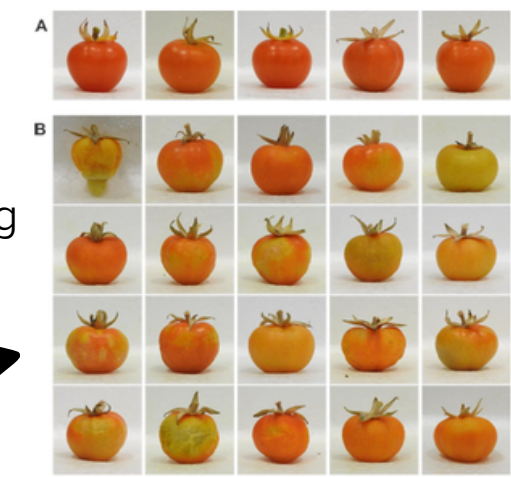


Figure 4.33. Fruit of WT and amiR23.8 plants after chilling treatment. Fruit was harvested at the

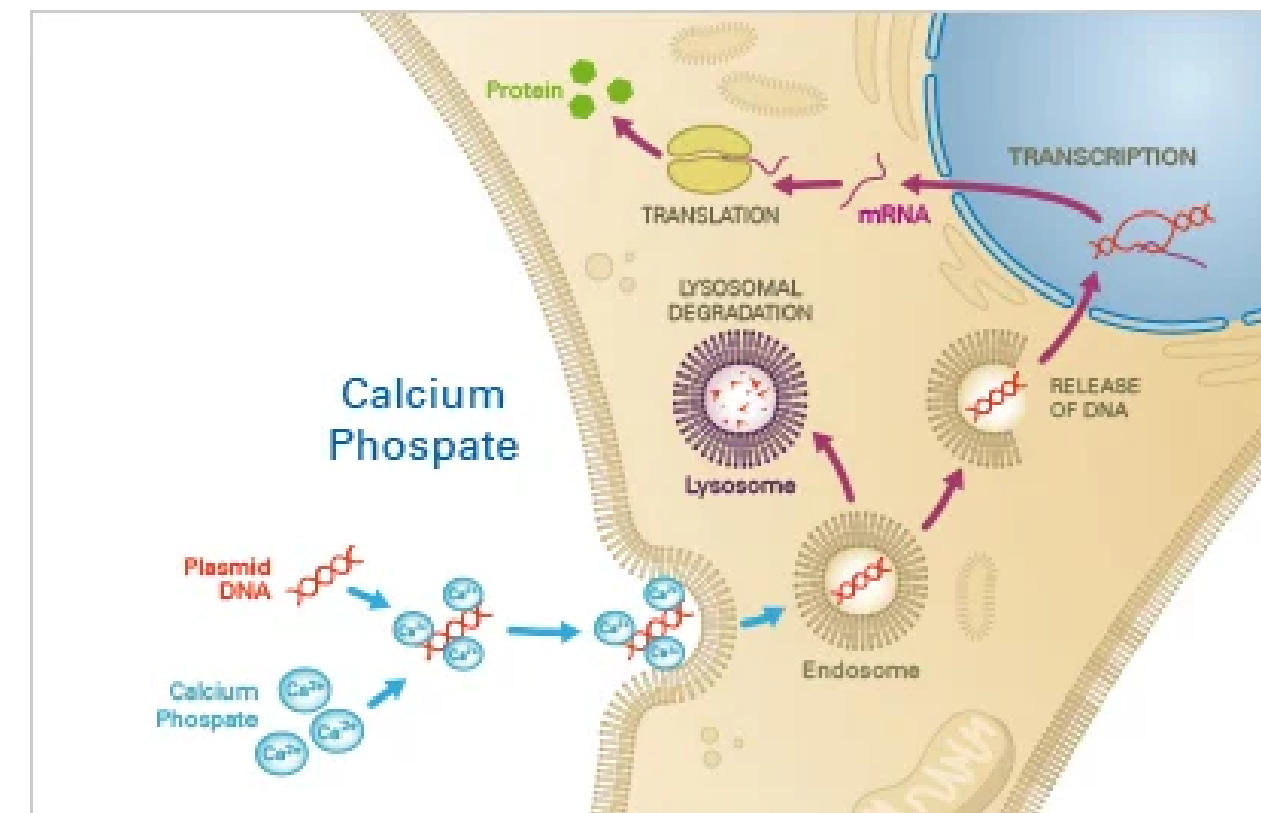
Introducción de genes en células de mamífero

En animales: la palabra "transformación" se refiere al cambio fenotípico de una célula hacia un estado neoplásico (tumoral). **Transfección** es el término correcto cuando usamos métodos físicos o químicos para introducir ácidos nucleicos (ADN o ARN) en células de mamífero. **Transducción** es el término cuando el transporte es mediado por un vector viral.

Aplicaciones:

Producción de proteínas complejas (con modificaciones post-traduccionales que las bacterias no hacen), terapia génica y estudio de enfermedades.

- Nivel celular (cultivo de células in vitro)
 - Nivel de organismo (animales transgénicos)
 - Nivel terapéutico (terapia génica individual)
- Se pueden introducir plásmidos, fragmentos lineales, genoma viral (transducción).
 - Vectores shuttle, con origen de replicación para E. coli y promotores de mamíferos.
 - Cuando es estable, el ADN se integra por recombinación no homóloga (NHEJ), al azar, en cualquier rotura accidental del genoma (excepto tecnologías dirigidas como CRISPR)



Métodos de **transfección** en células de mamíferos

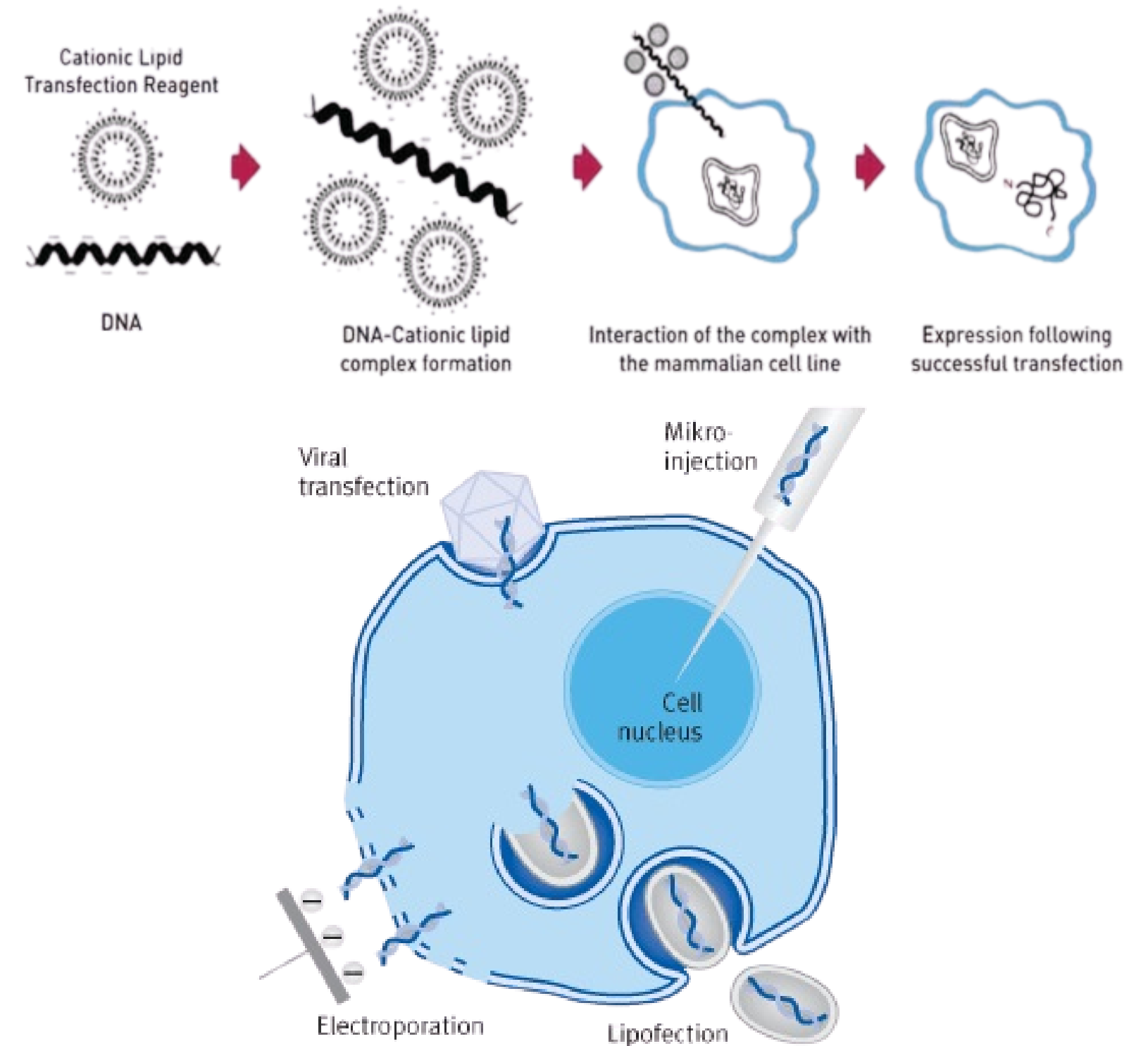
Métodos químicos (endocitosis): el agente químico forma un complejo que facilita la entrada del ADN en la célula.

- Lípidos catiónicos: método más usado. La carga (+) del lípido se une al ADN (-). Este complejo entra por endocitosis, elude al endosoma y libera el ADN hacia el núcleo.
- Fosfato de calcio: método clásico y económico donde el ADN precipita sobre las células.

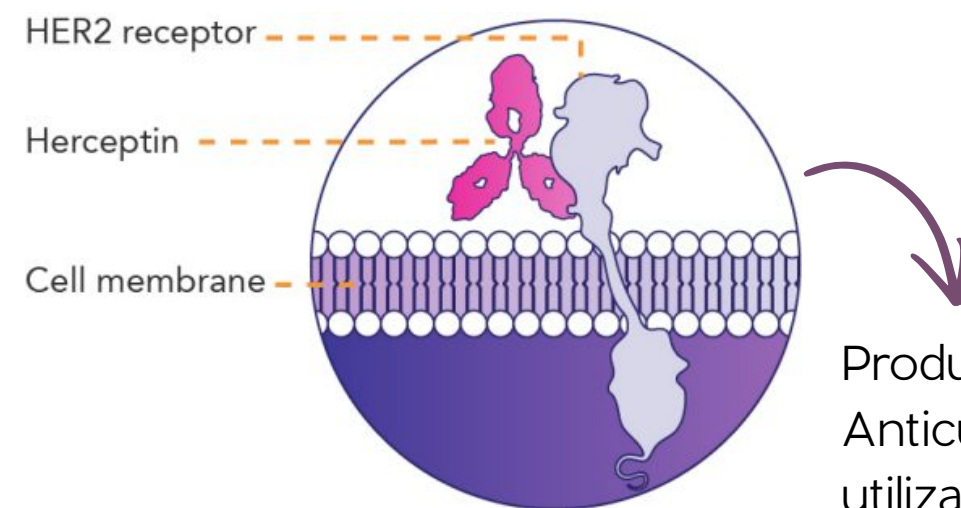
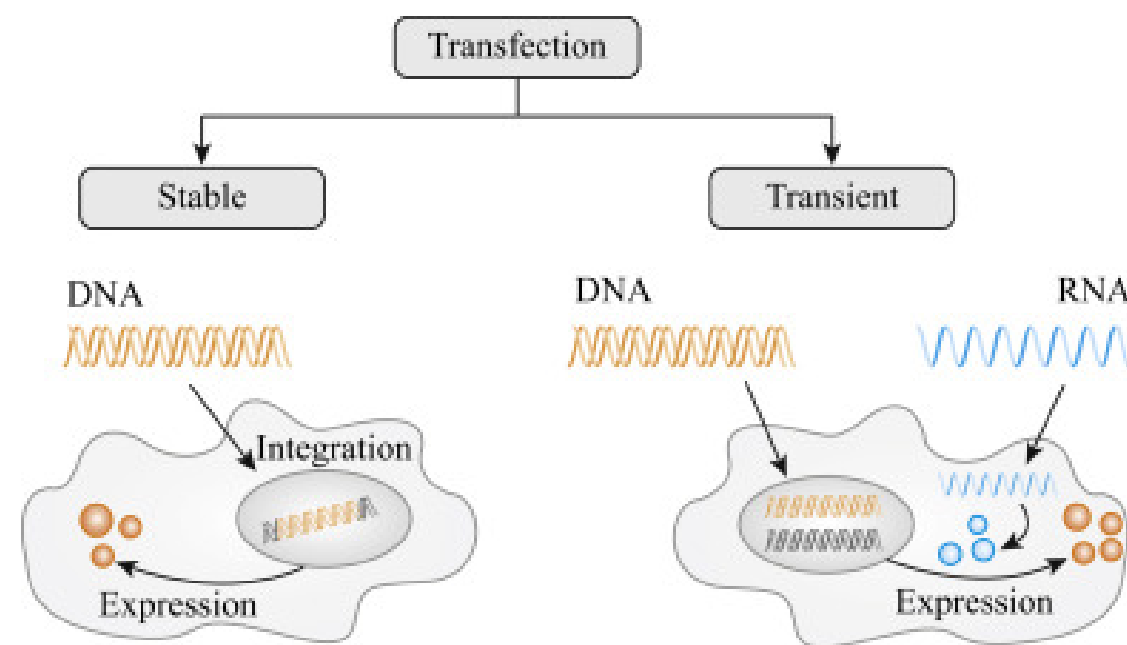
Métodos físicos:

- Electroporación: pulsos eléctricos para crear poros.
- Microinyección: para casos de alta precisión (inyectar directamente al núcleo).

El ADN entra por endocitosis, llega al núcleo y se puede transcribir. Si es ARN se traduce en el citoplasma y se pueden estudiar las proteínas.



Transfección estable o transitoria



Producción de Trastuzumab (Herceptin)

Anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1), transfección estable en células CHO. Se utiliza para tratar pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan la proteína HER2).

Transitoria:

El ADN se mantiene en el núcleo en forma extracromosómica (episomal), persiste por un corto tiempo hasta que se degrada.

1. Vector que no se replique: no tiene un ori funcional en el huésped, 1-4 días activo, después de la transfección aumenta RNAm y proteínas codificadas por el transgén, finalmente se degradan y se diluyen con la división celular.
2. Vector que se replique: tiene un origen de replicación derivado de un virus (SV40 y polyoma virus murino) pueden alcanzar alto N° de copias, y necesitan la polimerasa del virus (antígeno T) que puede estar en el vector o en el genoma de la célula huésped. Se obtiene alta expresión del transgén. Células COS/MOP-8: son líneas celulares optimizadas que ya tienen el antígeno T para replicar estos plásmidos.

Estable:

El ADN se integra al azar en el genoma (pequeño % de éxito).

- Requiere selección con fármacos (como Neomicina/G418 o Higromicina) para identificar a las células que lo integraron. El rasgo se hereda a todas las células hijas.

Transferencia de genes por **Transducción**

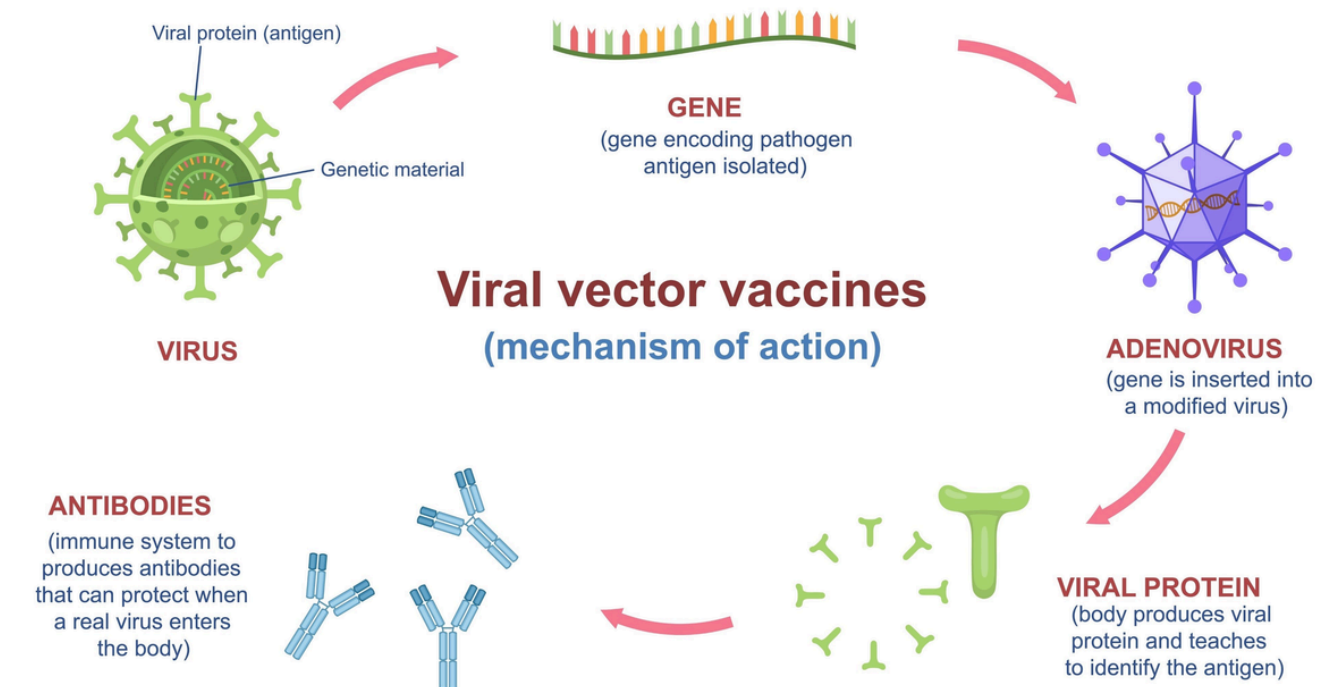
Introducción de genes en células animales (mamíferos e insectos) explotando la habilidad que tienen los virus para entrar a la célula (células en cultivo y animales vivos).

El transgén puede reemplazar parte del genoma viral no esencial o agregarse al genoma por corte y ligación (muy laborioso!).

Virus más usados: adenovirus, retrovirus, baculovirus, lentivirus, AAV.

Sistema Baculovirus: producción industrial de proteínas

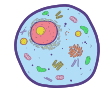
- Producen gran cantidad de polyhedrina, no esencial y se puede reemplazar por ADN exógeno. El gen introducido queda bajo el control del promotor de la polyhedrina que es fuerte.
- Obtención de proteínas con modificaciones post-traduccionales y en cantidad.



Vacunas de AstraZeneca o Sputnik V.

Se utiliza un Adenovirus, dentro del virus se coloca el gen que codifica la proteína Spike del coronavirus. Las partículas virales entran en contacto con las células musculares. El virus inyecta su ADN (el gen de la proteína Spike) en el núcleo de las células. La maquinaria celular propia lee ese ADN y produce la proteína Spike. El sistema inmune detecta la proteína, la reconoce como "enemiga" y crea anticuerpos y células de memoria.

Tipos de células



Líneas celulares inmortalizadas

Células que han sido modificadas para dividirse indefinidamente en una placa de Petri. Células CHO, HEK293, HeLa, COS. Producción de biofármacos a gran escala.



Según su forma de crecimiento:

- Células adherentes: crecen pegadas al fondo del frasco (formando una monocapa). Son típicas de tejidos sólidos (epitelio, fibroblastos). Para transfectarlas, se cambia el medio de cultivo por uno que tenga los liposomas.
- Células en suspensión: Crecen flotando en el líquido (típico de células de la sangre o linfocitos). Son más difíciles de transfectar con químicos, por lo que se suele usar electroporación.



Células madre (Stem Cells): medicina regenerativa.



Células primarias:

No inmortales, se extraen de un paciente (linfocitos T, medula osea), se modifican en el laboratorio y se vuelven a inyectar las células al paciente (Ex Vivo). O, no se extraen células sino que se administra el vector (generalmente un virus) directamente al paciente, el vector modifica las células blanco (In Vivo).
Terapia génica y medicina regenerativa (caso JK).

The New York Times

Un bebé es curado con el primer tratamiento personalizado de edición de genes

El niño de 9 meses y medio con una enfermedad genética rara recibió una infusión hecha solo para él y diseñada para corregir su mutación exacta



Terapia génica In Vivo: caso de estudio (2025)

- Paciente: bebé con deficiencia de CPS1 (ciclo de la urea).
- Edición génica dirigida con CRISPR/Cas9.
- **Transducción** mediante vector viral (AAV).

El hígado recuperó la capacidad de procesar el amoníaco, permitiendo al bebé llevar una dieta normal y evitar el trasplante de hígado.

Selección y marcadores en mamíferos

En transfección estable (integración al genoma)

- Marcadores de selección (antibióticos): se usan genes de resistencia a fármacos que matan células de mamífero. Solo las células que integraron el plásmido en su genoma forman "colonias" que luego se pueden expandir. G418 (geneticina), higromicina B, puromicina, blasticidina, zeocina.

En transfección transitoria (expresión rápida)

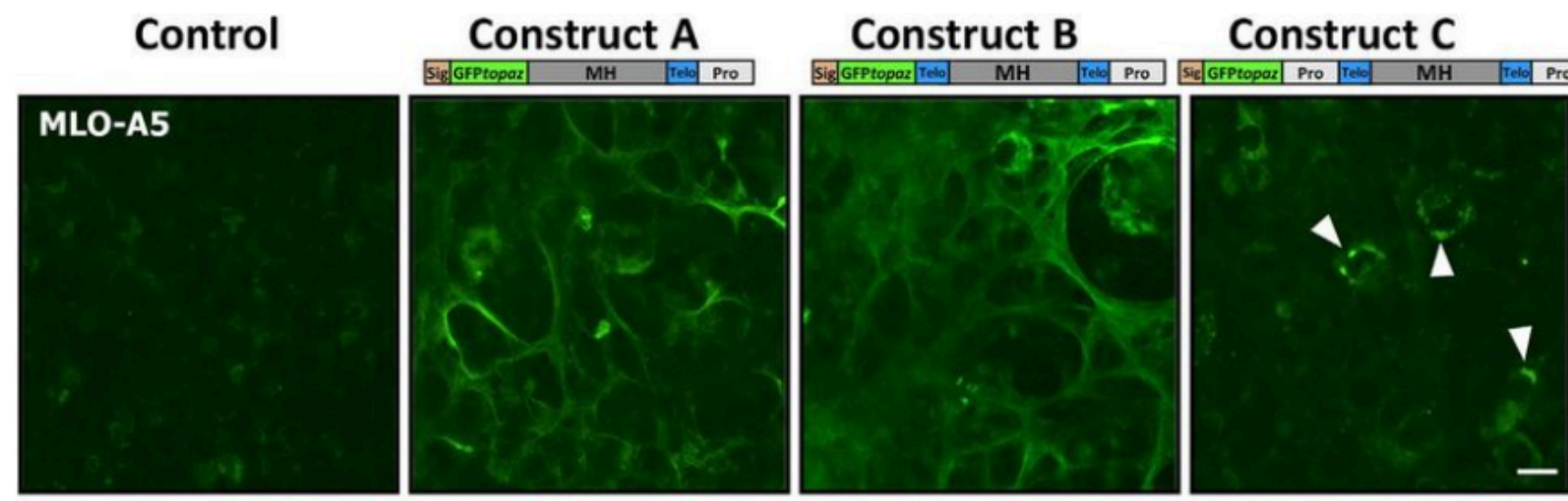
- Genes reporteros: como GFP (fluorescencia verde).
- Selección por FACS (sorting): citometría de flujo para recuento y clasificación.

En transducción (vectores virales)

Mismos métodos de selección que en transfección.

Los virus son muy eficientes (pueden infectar casi al 100% de las células), a veces no hace falta selección.

Si el título viral (la concentración de virus) es alto, se asume que casi todas las células recibieron el gen.

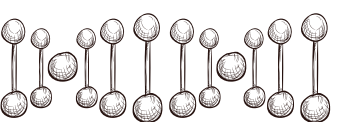


Lu et al. (2018).

Colágeno marcado con GFP (fluorescencia) para estudio de dinámica celular.

En **A** y **B** la proteína híbrida (colágeno + GFP) se comportó normal, se sintetizó y secretó, formando fibras extracelulares,

En **C** falló la secreción, se observan intracelular, esta construcción impide que el colágeno salga de la célula.

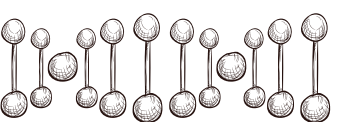


Bibliografía

- Lodish, H., et al. (2019). Biología Celular y Molecular (7a ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Lodish, H., et al. (2012). Molecular Cell Biology (7th ed.). W. H. Freeman & Co.
- Lewin, B. (2000). Genes VII. Oxford University Press.
- Watson, J. D., et al. (2005). Biología Molecular del Gen (5a ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Luque, J., & Herráez, A. (2006). Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ed. Elsevier/Harcourt.
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2010). Introducción a la Biotecnología. Pearson Educación.
- Salazar Montes, A. M., & Sandoval Rodríguez, A. S. (2013). Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw-Hill.



[Drive Bibliografía temas Enzimas para manip. de AN y Transformación](#)



Transformación y selección

Gracias!

Docente Mariela Escobar

