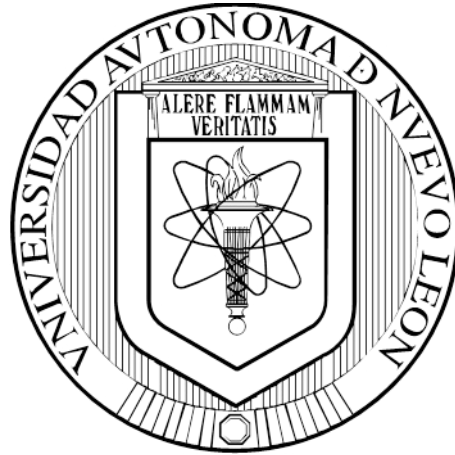


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**GENERACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL PARA MARCAJE
FLUORESCENTE SELECTIVO DE CÉLULAS TUMORALES**

**POR
I.B.T. ALEJANDRO ROBLES ZAMORA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

NOVIEMBRE, 2013

Generación de un Vector Adenoviral para Marcaje Fluorescente Selectivo de Células Tumorales.

Aprobación de Tesis:



**Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Director de Tesis**



**Dra. C. Rocío Ortiz López
Co-Director de Tesis**



**Dr. C. Iván Alberto Marino Martínez
Miembro de Tesis**



**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Terapia Génica y Celular del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la co-dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y el Dr. Iván Marino Martínez. Se contó además con la colaboración del Dr. Daniel Cervantes García.

Dr. Augusto Rojas Martínez

Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Dr. Augusto Rojas por haberme aceptado en su grupo de trabajo desde aquel septiembre de 2010, y por supuesto al Dr. Elías García por haberme vinculado desde el CIBO en 2009. Gracias por la confianza depositada y por todo su apoyo. Pienso que mi rumbo habría sido distinto sin su ayuda.

A la comisión de tesis: la Dra. Rocío Ortiz por permitirme utilizar equipo de su laboratorio, y al Dr. Iván Marino, de quien he aprendido mucho. Agradezco su paciencia y disponibilidad para ayudar siempre.

A la Dra. María Loera por su ayuda incondicional cuando los experimentos se estancaban. Muchas gracias por su amabilidad y tiempo.

A la M.C. Gissela Borrego, quien siempre escuchó pacientemente mis historias cargadas de frustración con los experimentos fallidos. Gracias por todas las recomendaciones, por tenerme paciencia, iniciarme en el arte del cultivo celular, por hacerme recordar mi hogar al platicar de lo mucho que hay en común entre Sonora y Sinaloa, pero sobre todo por su amistad.

A mis compañeros de TG: Marcela, Manuel, Adelina, Ulrich, Humberto y Nidia.

A Ariana Pérez, Paulina Cázares y Cecilia Aguirre, cuya participación y ayuda en alguna parte de este proyecto fue muy importante. Demostraron trabajar de manera responsable y ser muy buenas amigas.

A Fátima Monroy, con quien pude contar siempre en el laboratorio, o cuando necesitaba que alguien me escuchara. Muchas gracias Fátima.

A Daniel Arellanos y Ángel Merino, por su amistad y compartir “el pan y la sal” a la hora de la comida.

A mis amigos de generación 2011-2013, Geovanna Calvo y Lizeth Martínez por esos momentos en los que estudiábamos desesperadamente en los cubículos y molestábamos a los demás. A Mónica Yáñez, Yessica Sánchez, Carlos Villarreal, Paola Bocanegra y Erick Pereira por formar parte de esta experiencia.

A mi “trío de tres”, Mariel Oyervides y Kame Galán, por ser mis compañeros de estudio, de fiesta, de comida, estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, ser mis confidentes y mi Ka-tet de maestría. Gracias por su amistad, y por hacer de esta aventura una experiencia inolvidable.

Al personal de Bioquímica, especialmente a Juany, Ariadna, Normita, Lulú, Angélica y don Lalo.

Gracias a mis padres por todo su apoyo y por creer en mí. Por toda la confianza que me han tenido siempre y por recibirme en casa con el gusto y amor que solo los padres saben demostrar. A mis hermanos Ángel y Anahí por su cariño y apoyo. A mis sobrinos Angelito y Alondra por cargarme de energía cuando me visitaban, y por contar los días que faltaban para que su tío llegara a casa en vacaciones.

A mis amigos de Mazatlán: Nubia, José Luis, Carmen, Biviana, Mario, Antonio y Cythia por comprender que mi ausencia en sus graduaciones era por motivos profesionales. A Eucidaris y José Carlos por hacerme olvidar mis penas con sus bromas y hacer “la ruta de la comida” cada vez que volvía de visita. A Ismael por buscarme siempre que llegaba a la ciudad. A Yanin, Yuriana, Betty, y Alfredo por su amistad. A Martha por esperarme siempre y a Fanny López por echarme porras desde lejos. Gracias a todos. A pesar de que pasa mucho tiempo para vernos, cuando nos reencontramos pareciera que nunca dejamos de convivir.

Sin afán de sonar religioso (porque no lo soy), doy gracias a Dios por haberme mostrado el camino, y haberme servido de consuelo cuando las cosas no iban bien. Sin su intervención nada habría sido posible.

DEDICATORIA

A mis padres, mis maestros favoritos.

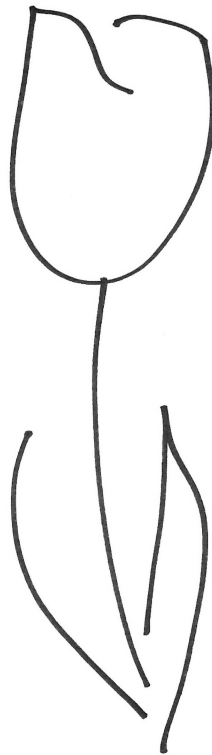


TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Células Tumorales Circulantes (CTC)	2
1.1.1 Características de las CTC	2
1.1.2 Mecanismo molecular de la transición epitelial-mesenquimal (EMT)	4
1.1.3 Metástasis	6
1.1.4 EpCAM como marcador de superficie celular para la detección de CTC	7
1.2 La vía de señalización Wnt y su relación con hTERT	8
1.3 Promotores tejido-específicos	11
1.4 Proteínas fluorescentes	14
1.4.1 Proteína roja fluorescente DsRed	18
1.4.2 Aplicaciones de proteínas fluorescentes en el laboratorio	19
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. OBJETIVOS	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Material biológico	23
4.1.1 Bacterias competentes	23
4.1.2 Líneas celulares	23
4.1.3 Secuencia	23
4.1.4 Plásmidos	24
4.1.5 Iniciadores	24
4.2 Materiales y reactivos	25
4.3 Estrategia general	27
4.4 Diseño del vector adenoviral recombinante Ad-hTERT-RFP	27
4.5 Construcción del plásmido pShuttle-hTERT-RFP	28
4.6 Construcción del genoma adenoviral recomb. pAd-hTERT-RFP	29
4.7 Generación de vector adenoviral pAd-hTERT-RFP	31
V. RESULTADOS	34
5.1 Construcción del plásmido pShuttle-hTERT-RFP	34
5.2 Construcción del genoma adenoviral recomb. pAd-hTERT-RFP	38
5.3 Generación de vector adenoviral pAd-hTERT-RFP	41

VI. DISCUSIÓN	46
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

I.B.T. Alejandro Robles Zamora.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 60.

Título del estudio: “**GENERACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL PARA MARCAJE FLUORESCENTE SELECTIVO DE CÉLULAS TUMORALES**”.

Introducción: Las células tumorales circulantes (CTC) son células que se originan de tumores primarios o de eventos metastásicos y que circulan libremente en el torrente sanguíneo de pacientes. Una de sus características más relevante es su capacidad ilimitada de división o inmortalidad. La expresión del gen de la transcriptasa reversa de telomerasa humana (hTERT), la enzima que mantiene la longitud de los telómeros, está desregulada en el 85-90% de las células tumorales. El uso de promotores tejido-específicos restringe la expresión génica o replicación viral a tejidos específicos. En este caso, el promotor de hTERT, altamente activo en la mayoría de las células tumorales, particularmente de cáncer colorrectal (CCR) como se mencionó previamente pero inactivo en células somáticas normales, resulta un candidato de promotor tejido-específico óptimo, por lo que su uso acoplado con proteínas fluorescentes mediante un vector adenoviral permitiría la detección selectiva de CTC.

Objetivo: Generar un vector adenoviral diseñado para inducir la expresión selectiva de la proteína roja fluorescente (RFP) en células tumorales mediante la transducción con el gen RFP bajo el control del promotor hTERT. **Materiales**

y métodos: Plásmidos: pUC57-hTERT-RFP, pShuttle, AdEasy-1. Cepas bacterianas: *E. coli* TOP10F', BJ5183. Línea celular: HEK293. Se construyó el genoma del vector adenoviral a partir de la secuencia comercial hTERT-RFP clonada en pUC57. Dicha secuencia fue subclonada en el plásmido acarreador pShuttle. Luego éste se recombinó con el plásmido AdEasy. Se caracterizó y transfectó en células HEK293 para producir las partículas virales Ad-hTERT-RFP. El vector adenoviral se caracterizó por inmunohistoquímica, PCR y microscopía de fluorescencia. **Resultados:** Se observó el efecto citopático característico de la infección por adenovirus en células HEK293 y mediante microscopía de fluorescencia se pudo observar la expresión de la RFP en su citoplasma. **Conclusiones:** Se diseñó, construyó, generó y caracterizó un vector adenoviral portador del promotor hTERT que induce la expresión de RFP en células que expresan altos niveles de telomerasa.

Dr. Augusto Rojas Martínez

Director de tesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Los procesos de EMT y MET.	4
Figura 2. CTC y su papel en el proceso de metástasis.	7
Figura 3. Vía de señalización Wnt.	11
Figura 4. Estructura de la proteína verde fluorescente (GFP).	16
Figura 5. Esquema de secuencia hTERT-RFP sintetizada por GenScript.	23
Figura 6. Plásmidos pShuttle y AdEasy.	24
Figura 7. Amplificación <i>in silico</i> utilizando iniciadores para caracterización.	25
Figura 8. Estrategia general para construcción del vector Ad-hTERT-RFP.	27
Figura 9. Esquema de pShuttle-hTERT-RFP construido.	29
Figura 10. Esquemas de plásmidos AdEasy y pAd-hTERT-RFP.	31
Figura 11. Caracterización del plásmido pUC57-hTERT-RFP.	34
Figura 12. Reacción de restricción de pUC57-hTERT-RFP para ligación.	35
Figura 13. Verificación de fragmento hTERT-RFP digerido y purificado para ligación.	35
Figura 14. Verificación visual de la ligación de hTERT-RFP con pShuttle.	36
Figura 15. PCR de transformación del producto de ligación.	37
Figura 16. Caracterización por restricción del plásmido pShuttle-hTERT-RFP.	37
Figura 17. Caracterización del plásmido AdEasy.	38
Figura 18. Tamizaje de presuntas clonas recombinantes por retraso en gel de agarosa.	39
Figura 19. Caracterización de presuntas colonias recombinantes.	40
Figura 20. Caracterización por PCR de colonias candidatas.	40
Figura 21. Caracterización por restricción del plásmido pAd-hTERT-RFP.	41
Figura 22. Generación del vector Ad-hTERT-RFP.	42
Figura 23. Inmunohistoquímica de células infectadas con el vector Ad-hTERT-RFP.	43
Figura 24. Caracterización por PCR del vector Ad-hTERT-RFP.	44
Figura 25. Microscopía de fluorescencia de HEK293 infectadas con Ad-hTERT-RFP.	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes implicados en la carcinogénesis colorrectal.	8
Tabla 2. Iniciadores utilizados para caracterizar pShuttle-hTERT-RFP.	24
Tabla 3. Iniciadores utilizados para caracterizar genoma adenoviral recombinante.	25
Tabla 4. Condiciones de PCR para caracterización de pShuttle-hTERT-RFP.	29
Tabla 5. Condiciones de PCR para caracterización de pAd-hTERT-RFP.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
AdEasy	Plásmido que contiene la mayor parte del genoma adenoviral
APC	Molécula supresora de tumores “Poliposis adematosa coli”
Bj5183	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada en recombinación
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados centígrados
CAR	Receptor coxsackievirus y adenovirus
CCR	Cáncer colorrectal
CD45	Cúmulo de diferenciación (marcador de superficie de leucocitos)
c-Myc	Factor de transcripción oncogénico c-Myc
cm ²	Centímetros cuadrados
CTC	Células tumorales circulantes
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (del inglés)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSH	Proteína Dishevelled
DsRed	Proteína roja fluorescente aislada del coral <i>Discosoma</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
EpCAM	Moléculas de adhesión celular-epitelial
g	Gramo
GBP	Proteína de unión glucógeno-sintasa-quinasa-3
GFP	Proteína verde fluorescente
GSK3β	Glucógeno-sintasa-quinasa-3 beta
h	Hora
HEK293	Línea celular embrionaria de riñón humano
H ₂ O	Agua
hTERC	Subunidad de RNA
hTERT	Transcriptasa reversa de la telomerasa humana
ITR	Repetición terminal invertida
Kbp	Kilo pares de bases
kDa	Kilodaltones
LB	Caldo de lisogenia (del inglés “Lysogeny Broth”).
LEF/TCF	Factor de desarrollo linfoide/Factor de células T
MCS	Sitio múltiple de clonación
MET	Transición mesenquimal-epitelial
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitro
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MOI	Múltiplos de infección
mQ	Mili Q (Agua ultrapura)

NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés Open Reading Frame)
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
pShuttle	Plásmido acarreador con resistencia a kanamicina
RFP	Proteína roja fluorescente
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TE	Buffer Tris-HCl/EDTA
TOP10F'	Cepa de bacterias calciocompetentes <i>E. coli</i>
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
UTR	Región no traducida de los genes
Wnt	Vía de señalización Wnt

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las células tumorales circulantes (CTC) se definen como células que se originan ya sea de tumores primarios o de eventos metastásicos, y que circulan libremente en el torrente sanguíneo de pacientes [1]. Se caracterizan por carecer del marcador de superficie CD45 (exclusivo de leucocitos) y expresan características de células epiteliales; es decir, presentan marcadores de superficie exclusivos de células del epitelio tales como las moléculas de adhesión celular-epitelial (EpCAM) y citoqueratina [2].

Una de las características más relevante de las células tumorales es su capacidad ilimitada de división o inmortalidad. En cultivo, las células normales sufren un proceso de crisis o senescencia siguiendo un número dado de divisiones celulares que provocan el acortamiento del DNA telomérico. Los telómeros son las secuencias repetitivas que se encuentran al final de los cromosomas eucariotas y señalan la senescencia o crisis cuando alcanzan una longitud corta crítica, proceso conocido como límite de Hayflick [3,4]. La expresión del gen de la transcriptasa reversa de telomerasa humana (hTERT), la enzima que mantiene la longitud de los telómeros, va decreciendo durante la senescencia celular y limita la proliferación celular. El gen hTERT está desregulado en el 85-90% de las células tumorales, por lo que es un objeto de estudio atractivo para los estudios de la biología molecular y la terapia del cáncer. hTERT está particularmente sobreexpresado en el cáncer colorrectal (CCR) por un mecanismo vinculado con c-Myc en la vía de señalización Wnt [5,6].

El uso de promotores tejido-específicos restringe la expresión génica o replicación viral en tejidos específicos. En este caso, el promotor de hTERT es altamente activo en la mayoría de las células tumorales, particularmente de CCR como se mencionó previamente, pero inactivo en células somáticas normales, por lo que su uso acoplado con proteínas fluorescentes permitiría la detección selectiva de CTC [7].

1.1 Células Tumorales Circulantes (CTC)

1.1.1 Características de las CTC

Las CTC se encuentran en poblaciones heterogéneas con diferencias pronunciadas en su potencial metastásico. Algunas poblaciones de CTC experimentan un proceso de transformación conocido como Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT), que inicia cuando las células epiteliales de un carcinoma en estado avanzado son sometidas a cambios fenotípicos y genotípicos que las transforman en células mesenquimales, lo que facilita su escape de la estructura compacta de los tejidos y les permite infiltrarse en el tejido circundante [8]. En este proceso, las células epiteliales pierden su adhesión celular mediante la desregulación de la expresión de E-cadherina, cuyas modificaciones y cambios transcripcionales promueven también la pérdida de la polaridad celular, lo que les permite adquirir una nueva forma que incrementa su movilidad y capacidad de invasión [9]. Hay varios factores de transcripción que inducen la EMT, tal es el caso de Snail y Slug cuya expresión es capaz de reprimir a E-cadherina [10]. El potencial invasivo es mejorado además por la expresión de integrinas y la activación de diversas metaloproteinasas [9].

Algunas citocinas derivadas del tumor y factores de crecimiento pueden estimular la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, lo que facilita el proceso de intravasación, en el cual las células que experimentan EMT adquieren características propias de las células madre cancerosas (células madre mesenquimales), incluyendo la capacidad de autorenovación, re-diferenciación, latencia, reparación activa de DNA, quimioresistencia y resistencia a la apoptosis y por consiguiente a los agentes terapéuticos. Estas células mesenquimales entran al torrente sanguíneo mediante los capilares que recubren el tumor y viajan a través del cuerpo. Algunas de las CTC que se encuentran migrando son sometidas a apoptosis, mientras que otras continúan existiendo como células tumorales latentes. Se cree que el ciclo celular de las

CTC en solitario permanece latente, lo que resulta en una ausencia de proliferación [8].

Posteriormente, las CTC pueden salir del torrente sanguíneo y regresar a su forma de células epiteliales carcinogénicas para formar un segundo tumor en cualquier parte del cuerpo. Esto se lleva a cabo por un proceso conocido como extravasación (Figura 1), en el cual se cree que las células son sometidas a un evento inverso: Transición Mesenquimal–Epitelial (MET), lo que les confiere la capacidad de adherirse al nuevo entorno y desarrollarse en una metástasis, ya que al mismo tiempo recuperan su capacidad proliferativa, adquiriendo nuevamente propiedades invasivas a través de la diseminación en médula ósea y órganos distantes [9].

Los modelos metastásicos han sugerido que diariamente entran al torrente sanguíneo alrededor de 1×10^6 células tumorales por cada gramo de tumor. Sin embargo, las CTC tienen tasas muy bajas de supervivencia en sangre periférica: alrededor del 85% desaparecen dentro de los primeros 5 minutos. Experimentos en modelos animales han reportado que el 2.5% de las CTC causan micrometástasis y solamente el 0.01% proliferan y forman metástasis macroscópica. Debido a que la mayoría de las CTC que entran a la circulación experimentan apoptosis y a que la angiogénesis no es promovida por micrometástasis en órganos distantes, la proporción de CTC que causan metástasis macroscópica no es necesariamente alta. De hecho, pueden permanecer latentes por varios años debido al cese del ciclo celular en la micrometástasis [8].

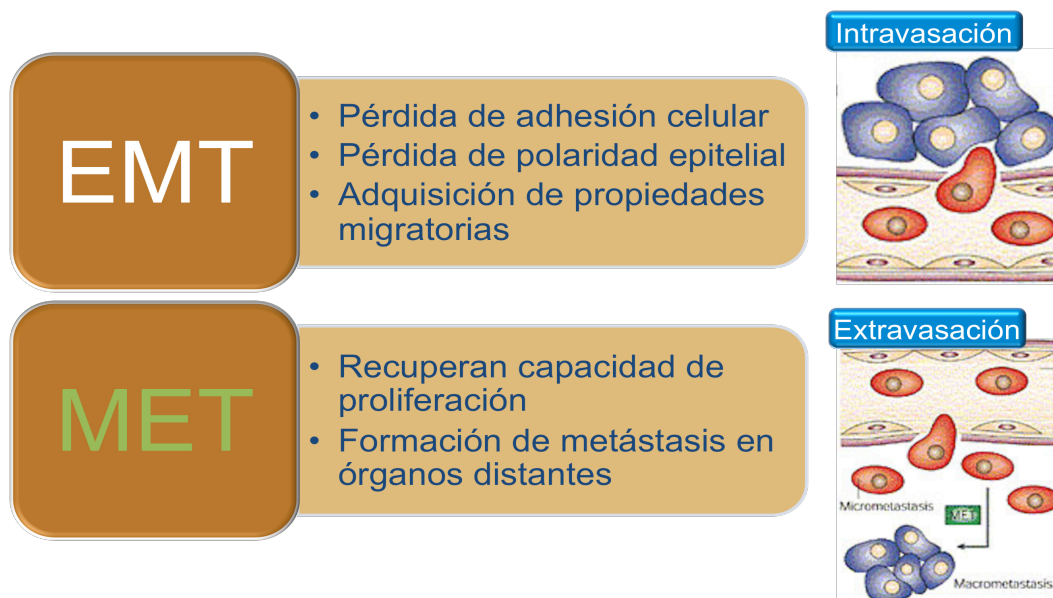


Figura 1. Los procesos de EMT y MET. Modificada de: Kirton, L., Cox, S. (2010). "Analysis of miRNA and mRNA associated with Epithelial Mesenchymal Transition". The Art of the PFUG.

1.1.2 Mecanismo molecular de la transición epitelial-mesenquimal (EMT)

La EMT facilita la migración e invasión de células tumorales a través de las siguientes tres estrategias: debilitamiento de la cohesión célula-célula, aumento de la capacidad para degradar la matriz extracelular y la modificación del citoesqueleto celular. Durante el proceso EMT se reorganizan los tres tipos principales de uniones intercelulares: uniones de adherencia, uniones estrechas y desmosomas [11]. La EMT está relacionada con factores de transcripción tales como Snail, Slug, Twist1, dEF1, SIP1, FOXC2 y las rutas de señalización TGF- β , notch y Wnt, por lo que fomenta la represión en la expresión de complejos moleculares que intervienen en la adhesión célula-célula, tales como E-cadherina, claudina y ocludina [12]. Los factores de transcripción ZEB y Snail desregulan la expresión de diferentes metaloproteinasas de matriz (MMP) y de elementos del sistema plasminógeno-plasmina, por lo que se aumenta la degradación de matriz extracelular en tumores primarios [13].

El esqueleto de las células epiteliales se compone de citoqueratinas, mientras que en el esqueleto de las células mesenquimales predomina la vimentina. Las

citoqueratinas son reprimidas y la vimentina es sobreexpresada durante el proceso EMT [14]. La morfología de la célula es controlada por la fuerza de expansión de los microtúbulos y la fuerza contra-expansión de la actina, alcanzándose un balance para estabilizar la forma de la célula [15]. La expresión de vimentina inducida por EMT promueve la estabilización de los microtúbulos y la despolimerización de actina propiciando la formación de “microtentáculos”, confiriendo a las CTC algunas de sus cualidades más agresivas, como son la deformabilidad, desplazamiento, capacidad de agregación homo y heterotípica y una retención intravascular más eficiente [2,16].

Los procesos de angiogénesis e intravasación son aspectos cruciales que influyen en la generación de CTC. Los factores de transcripción Snail y Slug modulan la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la regulación de factores proangiogénicos [17,18], mientras que Zeb-1 y Twist, reguladores de la EMT, mejoran las acciones de intravasación de las células cancerosas al manipular sus interacciones con las células endoteliales [2,19,20].

Asimismo, la EMT es capaz de potenciar la resistencia de las células tumorales a señales apoptóticas, contribuyendo con la supervivencia de las CTC en el torrente sanguíneo. Snail desregula a las caspasas, lo que incrementa la resistencia de las células tumorales a la muerte celular [21]; SIP1 impide la apoptosis en células tumorales al protegerlas del daño en el DNA [22]; Twist confiere resistencia a las células cancerosas al antagonizar el efecto pro-apoptótico mediado por Myc [23] y participando en la supresión de anoikis [24]; Zeb1 suprime a anoikis. Anoikis es el proceso de apoptosis inducido por la interacción inadecuada entre célula y matriz extracelular propiciado por la ausencia de un anclaje correcto [99]. Por otra parte, las células tumorales sometidas a EMT se han asociado al desarrollo de resistencia a las terapias anticancerígenas convencionales [14,25]. Las líneas celulares de carcinoma de colon y ovario que presentan un fenotipo de transición epitelial-mesenquimal son resistentes a oxaliplatino y paclitaxel, respectivamente [26,27]. Snail y Twist

median la radioresistencia y quimioresistencia en varias células cancerosas humanas [2,28,29].

1.1.3 Metástasis

Se considera a la metástasis como el indicador de progresión clínica más importante del cáncer. Más del 90% de las muertes asociadas con cáncer son atribuidas directamente a metástasis. La liberación de células cancerosas del tumor primario puede ocurrir en etapas tempranas de la enfermedad, siendo ésta la base para el posterior desarrollo de la metástasis. Se han encontrado CTC en pacientes con diferentes tipos de cáncer, tales como mama, pulmón, páncreas, próstata, hígado y colon [30].

No todos los tumores invasivos conducen a la formación de metástasis. El conocimiento respecto a cómo y cuáles tumores pueden dar lugar a metástasis ha incrementado durante la última década, pero aún es inespecífico. El primer paso que marca la cascada metastásica es la invasión del tejido vecino por células tumorales, ya sea en grupos o de manera individual [32]. Para migrar, las células del carcinoma tienen que perder varias características epiteliales que propician su unión a las células circundantes y la membrana basal. Se provocan cambios en la adhesión celular, activación de proteólisis y la adquisición de propiedades de movimiento. Después de la invasión local, el siguiente paso en la cascada metastásica es la entrada hacia el sistema linfático o el torrente sanguíneo (intravasación) mediante EMT y posteriormente la extravasación por MET [31].

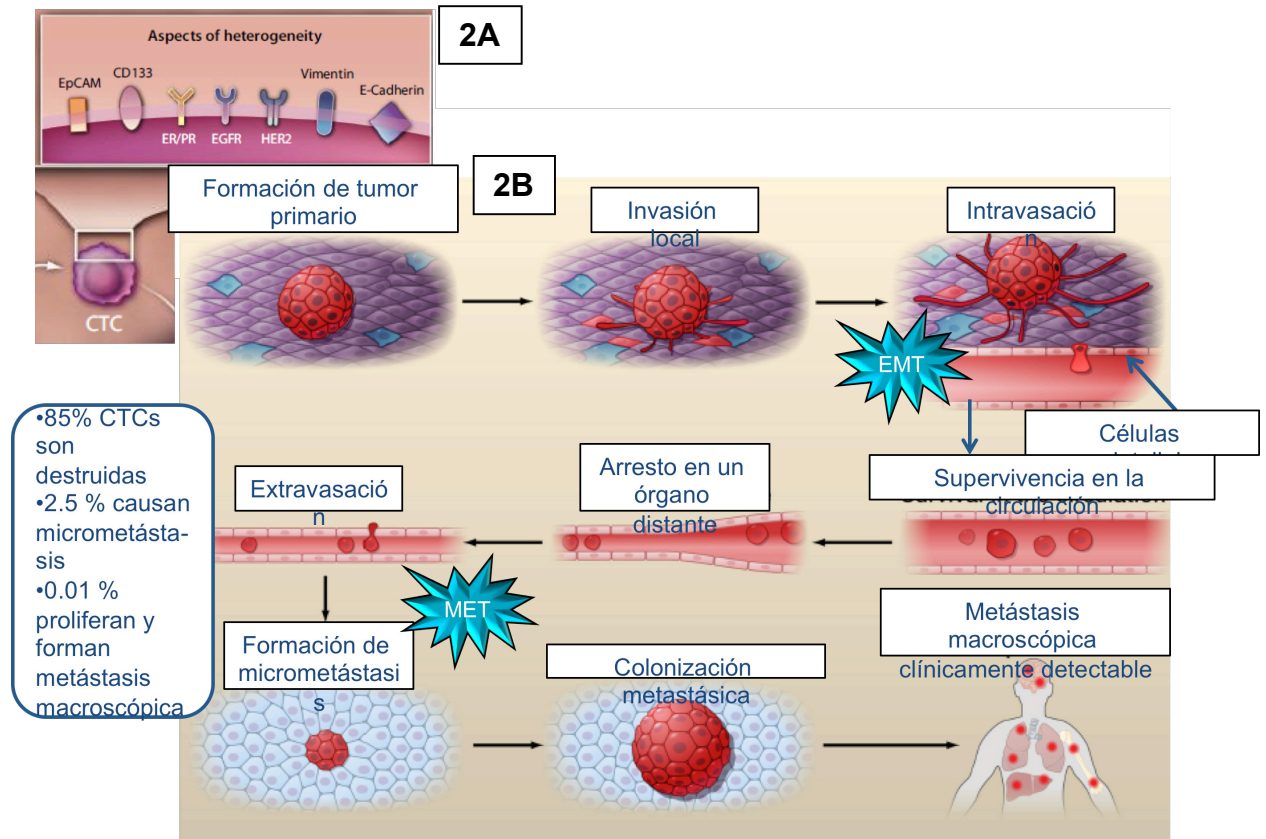


Figura 2. CTC y su papel en el proceso de metástasis. A) Diferentes marcadores de superficie asociados a las CTC. B) Esquema de la EMT y MET de un tumor que deriva en metástasis.

1.1.4 EpCAM como marcador de superficie celular para la detección de CTC

La molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) se expresa en la mayoría de las células epiteliales de individuos sanos, lo que la convierte en el marcador de superficie epitelial mejor conocido (Figura 2A). Esta proteína es capaz de mediar las interacciones homofílicas adhesivas y por consiguiente prevenir la dispersión celular. La desregulación de EpCAM es necesaria para la invasión en cáncer de mama, ocurriendo la EMT [34]. Sin embargo, contradictorio a esto es que las células de cáncer pancreático que expresan EpCAM tienen un potencial tumorigénico mayor comparado con las células de cáncer pancreático negativas a EpCAM. En otros tipos de cáncer, la expresión de EpCAM puede estar relacionada con la supresión del tumor oncogénico, lo que sugiere que el papel de EpCAM en la promoción de tumores depende del tipo de tumor y/o el

entorno metastásico y que se requiere un método de enriquecimiento para CTC más sofisticado y posiblemente independiente de EpCAM [31].

De todos los tipos de células epiteliales, en el colon es donde se encuentran los niveles más altos de expresión de EpCAM. De hecho, EpCAM fue inicialmente descubierto en un carcinoma de colon. Según Fearon y Vogelstein [35] se requieren al menos siete alteraciones para que se desarrolle un tumor maligno de colon. El CCR en particular ha sido ampliamente estudiado debido a que permite identificar las diferentes etapas de desarrollo del cáncer a la vez. El concepto actual de carcinogénesis colorrectal implica una cascada de lesiones genéticas que afectan a genes reparadores del DNA, oncogenes y genes supresores de tumores (Tabla 1). La acumulación de estas alteraciones genéticas en el epitelio colónico requiere años, normalmente décadas, lo que coincide con la edad media de los pacientes diagnosticados de CCR (alrededor de 65-70 años).

Tabla 1. Genes implicados en la carcinogénesis colorrectal.

Gen	Cromosoma	%	Tipo de gen	Función	Comentarios
K-ras	12p12	30-40	Oncogen	Trasducción de señales	Mutaciones puntuales
Ciclinas	Varios	4	Oncogen	Regular ciclo celular	Sobreexpresión
Neu/her2	17	4	Oncogen	Receptor factor de crecimiento	Amplificación
Myc	8	60	Oncogen	Regular ciclo celular	Sobreexpresión
Nm23H1	17	--	Supresor	Inhibe metástasis	Sobreexpresión
Nm23H2	17	--	Supresor	Inhibe metástasis	Sobreexpresión
APC	5q21	60	Supresor	Adhesión celular	Pérdida
DCC	18q21	70	Supresor	Adhesión celular	heterocigosidad
P53	17p13.1	70	Supresor	Parar ciclo celular en G1	Pérdida
P27	--	--	Supresor	Regular ciclo celular	Mutación germinal
Bax	19q13	50	Apoptosis	Inducir apoptosis	Pérdida expresión
TGF-BRII	3p22	15	Supresor	Trasducción de señales	Mutaciones
hMSH2	2p22	60	Susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutaciones
HMLH1	13p21	30	Susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutación germinal
HPMS1	2q31-33	0-5	Susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutación germinal
hPMS2	7p22	0-5	Susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutación germinal

1.2 La vía de señalización Wnt y su relación con hTERT

La señalización por la familia Wnt es uno de los mecanismos fundamentales que regulan la proliferación celular, la polaridad celular y la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario y la homeostasis de tejido [36].

Las anomalías en la vía de señalización Wnt promueven el desarrollo de cáncer [37,38,39]. β -catenina es un efector central en la vía de señalización Wnt y está involucrado en diversos procesos celulares como la adhesión, crecimiento y diferenciación celular, así como en la transcripción de genes respuesta de Wnt.

Cuando no hay señalización por el ligando Wnt hacia los receptores Frizzled, β -catenina es correctamente regulada por un complejo de degradación multiproteico (que se compone de la molécula supresora de tumores "APC" o poliposis adenomatosa coli y la proteína axin) en el cual β -catenina es fosforilado por GSK3 β (Glucógeno-sintasa-quinasa-3 beta), que conduce a su degradación vía ubiquitin-proteosoma (Figura 3A). Esta eliminación continua de β -catenina evita que alcance el núcleo y por consecuencia los genes diana de Wnt son reprimidos por los factores de transcripción unidos al LEF (Factor de desarrollo linfocitario/Factor de células T, "LEF/TCF") [39,40].

La señalización por el ligando Wnt hacia los receptores Frizzled conduce a la fosforilación de la proteína DSH (Dishevelled), la cual inhibe la fosforilación de β -catenina por GSK3 β . De igual forma, la actividad de GSK3 β puede ser inhibida por la interacción directa con la proteína de unión GBP (glucógeno-sintasa-quinasa-3), por lo que al no ser fosforilado β -catenina es desacoplado del complejo de degradación multiproteico y evita su destrucción, translocándose al núcleo de las células para formar heterodímeros con los factores de transcripción LEF-TCF, activando de esta manera la expresión de los genes diana Wnt. La desregulación de β -catenina conduce a la formación de complejos β -catenina/TCF y altera la expresión de oncogenes, tales como c-Myc, cyclin D1, Nos2, que pueden contribuir con el desarrollo de cáncer (Figura 3B) [39,40].

La mayoría de los casos de CCR se caracterizan por una desregulación en la vía de señalización canónica que conduce a la desestabilización y consecuente incremento y acumulación celular de β -catenina. Después de translocarse al núcleo, actúa como un factor de transcripción resultando en la expresión de

genes diana de β -catenina. Esto se asemeja a la mayoría de los sellos del cáncer, a excepción de la inmortalidad celular. El mediador central de este sello es hTERT (transcriptasa reversa de la telomerasa humana). El gen hTERT es regulado, entre otros, por el factor de transcripción c-Myc e indirectamente por β -catenina, debido a que c-Myc es un gen diana de β -catenina. Los patrones de expresión de hTERT y β -catenina (pero no de c-Myc) coinciden en parte, probablemente debido a que c-Myc no se encuentra únicamente regulado por β -catenina, sino también por muchos otros factores de transcripción y vías de señalización. Por lo tanto, se cree que hTERT podría ser un gen diana directo de β -catenina. Hay evidencia de que β -catenina regula directamente la expresión del gen hTERT [41].

Se ha identificado también a FH535 como un inhibidor de la vía de señalización de Wnt (complejo inhibidor β -catenina/TFC), el cual inhibió significativamente la actividad de la telomerasa en todas las líneas celulares utilizadas en el estudio de *Zhang y cols.*, lo que sugiere que la vía Wnt juega un papel crítico en la regulación de la telomerasa en las células cancerosas [39].

La activación de la telomerasa es un evento crítico de la carcinogénesis humana debido al mantenimiento de los telómeros, pero aún permanecen poco claros sus mecanismos de activación. Se ha demostrado que el promotor del gen hTERT promueve su expresión selectivamente en células tumorales pero no en células normales. Se ha reportado que la desregulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina se encuentra asociada con la carcinogénesis humana. Sin embargo, aún se desconoce si la vía Wnt/ β -catenina se encuentra involucrada en activar de manera específica la transcripción de hTERT e inducir la actividad de la telomerasa [39].

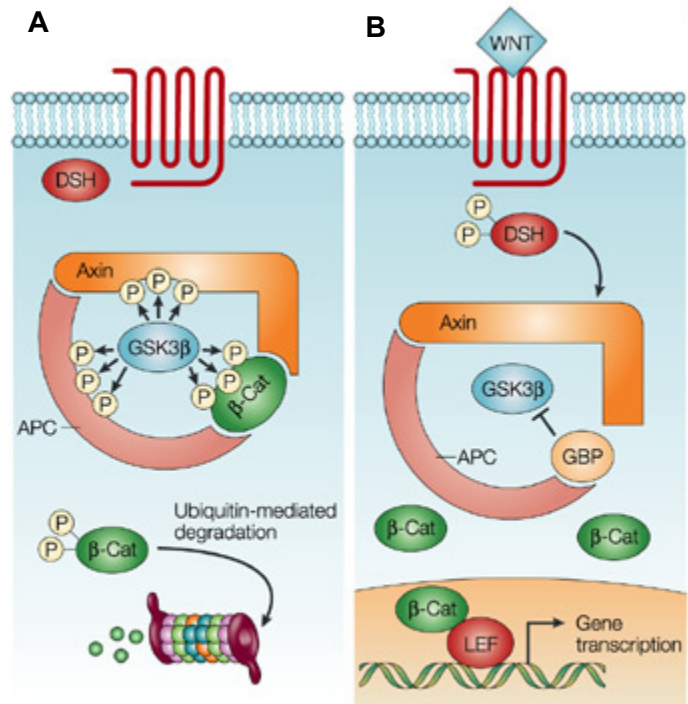


Figura 3. Vía de señalización Wnt. A) Señalización en ausencia del ligando Wnt. B) Señalización en presencia del ligando Wnt, que permite la expresión de oncogenes tales como c-Myc, cyclin D1 y Nos2.

1.3 Promotores tejido-específicos

Los adenovirus son virus no envueltos cuyo genoma consiste en una doble cadena lineal de DNA de 36 Kbp [42], con tropismo por muchos tejidos humanos tales como epitelio bronquial, hepatocitos y neuronas. Además, son capaces de transducir células quiescentes y pueden producirse en títulos altos. Los vectores adenovirales son utilizados ampliamente en la investigación de terapia génica contra el cáncer [45]. Este tipo de vectores muestra una alta transducción de tejidos epiteliales, incluyendo a los tumores derivados de estas células, y una limitada transducción de las células de origen hematopoyético debida a la limitada expresión de los receptores particulares para este tipo de virus, como el receptor CAR y las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ [45,46].

En las células de mamífero cada gen tiene su propio promotor y algunos de éstos solamente se pueden activar en un tipo específico de células. El promotor es la región genética específica en la que se lleva a cabo la unión de una RNA

polimerasa para poder iniciar el proceso de transcripción y se encuentra localizado hacia la zona 5' del sitio de inicio de la transcripción [43]. Las características del promotor influyen en la eficiencia de la transcripción. Esta región incluye las secuencias de unión a factores de transcripción y a otros elementos que participan en la transcripción. Los promotores de organismos eucariotes son regiones conservadas del DNA con características especiales que determinan el punto en el que la RNA polimerasa comienza a transcribir un gen. Dependiendo de la RNA polimerasa que los reconozca, estarán formados por unos elementos u otros. Los promotores marcan el inicio del gen que se va a transcribir así como la eficiencia de la transcripción. Cada RNA polimerasa reconoce promotores diferentes, lo que permite una transcripción selectiva.

En el núcleo de las células eucariotas se encuentran tres RNA polimerasas: RNA Polimerasa I, II y III. La RNA polimerasa II se encarga de la transcripción de la mayoría de los genes; sin embargo, en células eucariotas no puede ser capaz de iniciar la transcripción en un DNA templado, requiere para el proceso muchas proteínas nucleares llamadas factores generales de transcripción, designados como factores de transcripción para polimerasa II (TFII) incluyendo TFIIA, TFIIB, etc., para unir la RNA polimerasa II a la región promotora y así iniciar la transcripción [43,48]. Existe una secuencia de DNA en las regiones promotoras de la mayoría de los genes llamada caja TATA, cuya labor es señalar el inicio de la transcripción. Se localiza aproximadamente 25 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción. TFIID reconoce y se une a la caja TATA causando que otros factores generales de transcripción se unan al promotor, además de ayudar a posicionar a la RNA polimerasa II correctamente en el promotor [48]. La caja TATA está involucrada directamente en la regulación de la transcripción génica [43].

El inicio de la transcripción en organismos eucariotes es un proceso complejo que utiliza muchas proteínas reguladoras. Además, algunas de estas proteínas se pueden unir al DNA a una distancia de miles de nucleótidos del promotor, lo que significa que un solo promotor puede estar controlado por un número casi

ilimitado de secuencias reguladoras dispersas a lo largo del DNA. Normalmente cada proteína reguladora contribuye con el control de muchos genes [48]. A pesar de que algunas proteínas reguladoras de genes son bastante específicas y solamente se expresan en un solo tipo o pocos tipos de células, la mayoría se encuentran en gran variedad de tipos celulares, en muchos tejidos y en determinados momentos durante el desarrollo. Este tipo de control combinatorio de genes hace posible generar un sistema biológicamente complejo con un número relativamente definido de moléculas reguladoras [48].

La región promotora en genes de organismos eucariotas es comúnmente un fragmento de DNA relativamente grande. La mayoría de los vectores utilizados en terapia génica tienen una limitación de tamaño en cuanto a la capacidad de un cassette de expresión; en consecuencia, solo la parte esencial de un promotor puede ser utilizada. Por lo tanto, cualquier uso de un promotor tejido-específico requiere una cuidadosa evaluación previa en sistemas de expresión determinados. Esto ayuda a minimizar la toxicidad, propiciar y maximizar una expresión genética eficiente en las células y tejidos blanco deseados, y a optimizar el vector [43].

Los promotores tejido-específico son activos únicamente en un tipo específico de células o tejidos, tales como células B, monocitos, leucocitos, macrófagos, células endoteliales, etc. y se encuentran disponibles ya sea como promotores nativos o compuestos [47]:

- Promotores nativos, también llamados promotores mínimos, consisten en un fragmento mínimo de la región 5' de un gen determinado. Cada uno de estos promotores comprende un promotor central y su región UTR 5' natural. En algunos casos la región UTR 5' contiene un intrón. Es la secuencia de ADN mínima requerida para que se inicie una transcripción correcta *in vivo* [47].

- Los promotores compuestos combinan los elementos de promotores de origen distinto, o son construidos a partir del ensamblaje de potenciadores distales con un promotor mínimo del mismo origen [47].

El uso de promotores tejido-específicos restringe la expresión génica o replicación viral a tejidos específicos. Se ha utilizado una gran variedad de este tipo de promotores para aplicaciones en terapia génica. Adicionalmente, algunos se activan selectivamente en células tumorales y se constituyen en promotores tumor-específicos. Para resolver el problema de inespecificidad de las células cancerosas como blanco, *Gu y cols.* [49,50] desarrollaron un sistema utilizando el promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT) en lugar del promotor CMV. El promotor hTERT, un determinante para la actividad de la telomerasa [51,52], es altamente activo en la mayoría de las células tumorales, pero inactivo en células somáticas normales [44,53,54,55,56]. Previos estudios de terapia génica antineoplásica ya han demostrado la utilidad de este promotor en CCR [45].

Una de las modificaciones posibles es la introducción de genes marcadores que expresan proteínas fluorescentes para el rastreo de las células tumorales. Estos genes se pueden transducir de manera eficiente empleando vectores virales como los adenovirus. Esto con el objetivo de realizar estudios de biología molecular del cáncer. Mediante esta metodología sería posible pues transducir las proteínas fluorescentes de manera selectiva en células de CCR.

1.4 Proteínas Fluorescentes

Las proteínas fluorescentes pertenecen a una clase de proteínas estructuralmente homólogas que comparten la propiedad única de ser autosuficientes para formar un cromóforo de longitud de onda visible a partir de una secuencia de tres aminoácidos dentro de su propia secuencia polipeptídica [57]. La estructura y el entorno molecular del cromóforo maduro, además del color resultante, están determinados por la secuencia de la proteína. Los ecosistemas de arrecife de coral se caracterizan por poseer una gran variedad

de colores, pero tanto las raíces evolutivas como su rol funcional se encuentran aún sin explicación. Se debe considerar a la duplicación génica como un mecanismo importante que propició la diversidad de colores actuales, ya que hallazgos recientes afirman que este tipo de alteraciones comenzaron antes de la separación de las familias de corales, ya en el periodo Jurásico [58]. La proteína verde fluorescente (GFP) y sus formas alélicas mutadas: azul, cian y amarillo fluorescente son usadas para construir proteínas quiméricas fluorescentes que pueden ser expresadas en células vivas, tejidos y organismos enteros, después de ser transfectados con vectores modificados genéticamente. La proteína roja fluorescente (RFP) ha sido aislada de otras especies, incluyendo organismos de arrecife de coral, y son utilizados de manera similar. El uso de proteínas fluorescentes evita el problema de purificación, etiquetado e introducción de proteínas marcadas dentro de las células, o la tarea de producir anticuerpos específicos de superficie o para antígenos internos [57].

Independientemente de su origen o del grado de manipulación genética, todas las proteínas fluorescentes tienen un tamaño de aproximadamente 25 kDa, que es grande comparado con fluoróforos orgánicos (tales como fluoresceína o Texas Red) cuyo tamaño promedio es de alrededor de 1 kDa. A pesar de su gran tamaño, las proteínas fluorescentes son útiles por sus muchas aplicaciones, en particular por la capacidad de brindar imágenes de células y del organismo completo. Las proteínas fluorescentes son herramientas de marcaje o etiquetado genético y pueden ser “construidos” utilizando herramientas de biología molecular. Dichas etiquetas son sintetizadas dentro de las células mismas y no hay necesidad de utilizar agentes exógenos o los procedimientos de fijación y permeabilización rutinarios para inmunofluorescencia. Las proteínas fluorescentes pueden también estar fusionadas a sus proteínas blanco, de manera que se expresan en razón 1:1 con la molécula blanco, lo que resulta ideal para fines cuantitativos [59,74].

Uno de los puntos más importantes con respecto a las proteínas fluorescentes es que su estructura es esencial para el desarrollo y conservación de su

fluorescencia [75]. La estructura de las proteínas fluorescentes consiste en un barril- β extremadamente rígido que comprime 11 láminas- β que rodean una hélice- α central [76]. En todas las proteínas fluorescentes provenientes de medusas y corales estudiadas hasta el momento, el cromóforo principal se deriva de unos pocos aminoácidos cruciales que se localizan cerca del centro del barril- β (Figura 4). Sin embargo, a diferencia de los aminoácidos de la mayoría de las proteínas solubles, muchos de los aminoácidos internos de las proteínas fluorescentes tienen carga o son polares. Estos unen numerosas moléculas de agua y las atrapan dentro de conformaciones rígidas dentro de la proteína. En el contexto de este entorno específico, ocurre una reacción entre aminoácidos clave para formar un anillo de imidazol con conjugación extendida [77]. La fluorescencia de estas proteínas es altamente dependiente del entorno químico único que rodea al cromóforo, que es evidenciado por el hecho de que los análogos de cromóforos sintéticos carecen de fluorescencia [59,78].

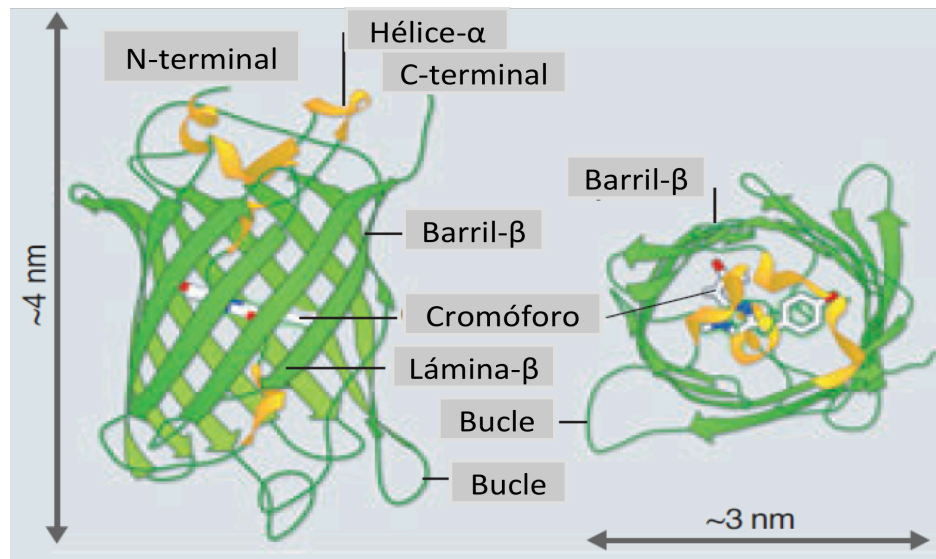


Figura 4. Estructura de la proteína verde fluorescente (GFP).

Los cambios en el entorno local del cromóforo pueden producir variaciones notables en características espectrales, fotoestabilidad, resistencia a la acidez y otras propiedades físicas [59].

Se cree que el mecanismo de formación del cromóforo es similar para todas las proteínas fluorescentes, independientemente del origen [75]. El análisis de secuencias aminoacídicas de más de 100 variantes naturales de cromóforos de muchas especies revelaron que sólo cuatro residuos se encuentran absolutamente conservados [75]. El primer residuo es G67, el cual es crucial para la ciclación del cromóforo por medio de un ataque nucleofílico; consecuentemente, cualquier mutación de este aminoácido evita completamente la formación del cromóforo. El segundo residuo conservado es Y66, que también se encuentra involucrado en la formación del cromóforo. Sin embargo, estudios de mutagénesis demuestran que cualquier residuo aromático puede remplazar a Y66 [79], por lo que resulta desconcertante por qué este aminoácido se encuentra tan altamente conservado en la naturaleza [59].

Los últimos dos residuos aminoacídicos conservados son R96 y E222, los cuales son residuos catalíticos posicionados cerca del cromóforo y que son esenciales para el proceso de maduración. Muchos otros residuos cercanos al cromóforo, tales como G20, G33, G191 y F130 también se encuentran conservados en las proteínas fluorescentes y se cree que también están involucrados en la formación del cromóforo. Como la mayoría de los otros residuos no se encuentran conservados, las proteínas fluorescentes pueden albergar un gran número de modificaciones para crear proteínas con diferentes propiedades físicas [80,81,82]. De hecho, debido al pliegue único del barril- β en las proteínas fluorescentes, las mutaciones de residuos a lo largo de la proteína completa tienen el potencial de cambiar significativamente sus propiedades fluorescentes. Para poder utilizar en mamíferos GFP derivadas de medusas se tuvieron que modificar muchas de las propiedades de la proteína original. Tales cambios se encuentran ahora en todas las variantes comúnmente utilizadas. Primeramente, la maduración de la fluorescencia fue optimizada para usarse a 37°C [59]. La maduración del cromóforo de la GFP silvestre es eficiente a temperaturas menores a 28°C, pero incrementando la temperatura hasta 37°C se reduce substancialmente la tasa de maduración y la fluorescencia disminuye [74]. Una sola mutación en F64L [83] da lugar a una mejora significativa en la

maduración de la fluorescencia a 37°C. A pesar de que esta mutación se encuentra presente en la mayoría de las variedades de proteínas fluorescentes derivadas de *Aequorea victoria*, se han encontrado mutaciones en residuos adicionales para mejorar el plegamiento de la proteína y la eficiencia en la formación del cromóforo [77]. Otras mutaciones importantes incluyen S30R para un ritmo más rápido de plegamiento [84], Q69M para mejorar la fotoestabilidad y la resistencia al cloro y pH bajo [85], S72A, que mejora el plegamiento y la estabilidad [86], S147P para una maduración más rápida [87], N149K para mejorar la velocidad de plegamiento [86], V163A, capaz de reducir la hidrofobicidad y mejorar el plegamiento [88], y finalmente I167T para termosensibilidad reducida [79]. Además de mejorar las propiedades físicas de las proteínas, la inducción de mutaciones silenciosas en la secuencia codificante permite optimizar la expresión de proteínas en el organismo hospedero y por consiguiente, mejorar el uso de las proteínas fluorescentes [59,89].

1.4.1 Proteína roja fluorescente DsRed

DsRed es una proteína roja fluorescente aislada del coral *Discosoma* [63,64,65]. Los espectros de excitación y emisión de esta proteína se encuentran en la región roja del espectro, siendo una propiedad atractiva para aplicaciones *in vivo* debido a la baja autofluorescencia celular en esta región del espectro [66,67,68]. Los espectros de excitación y emisión tienen sus máximos a 551.5 y 583 nm, (con un pico pequeño a 494 nm y un pico importante debido al triptofano a 280 nm). DsRed es un tetrámero de origen natural en su estado nativo. El cromóforo de DsRed está compuesto por tres aminoácidos: Gln66, Tyr67 y Gly68 [69]. Dicho cromóforo se forma mediante una reacción de tres pasos, que incluye una reacción de ciclación catalítica y dos deshidrogenaciones posteriores [70,71]. La ciclación y deshidrogenación inicial crean un cromóforo GFP efímero e inestable [72]. Se cree que la segunda reacción de deshidrogenación es la responsable de la emisión de fluorescencia roja de la proteína DsRed [60, 73].

1.4.2 Aplicaciones de proteínas fluorescentes en el laboratorio

Las proteínas fluorescentes son muy versátiles y han sido empleadas en muchas disciplinas de la biología. Estas sondas han sido usadas como reporteros para estudios de expresión génica en cultivos celulares y de tejido, así como también en organismos vivos. En células, las proteínas fluorescentes son empleadas más comúnmente para el rastreo de la localización y dinámica de proteínas, organelos y otros compartimentos celulares. Se ha desarrollado una variedad de técnicas para construir productos de fusión a proteínas y para mejorar su expresión en mamíferos y otros sistemas. Los vehículos primarios para introducir secuencias de proteínas fluorescentes con genes quiméricos dentro de las células son los vectores virales y los plásmidos bacterianos genéticamente modificados. Los genes producto de fusión con proteínas fluorescentes pueden ser introducidos en mamíferos y otras células, usando el vector apropiado (usualmente un plásmido o virus) ya sea de manera transitoria o estable. Cuando se trata de un proceso transitorio o temporal, en los experimentos de transferencia génica (con frecuencia conocidos como transfección transitoria) el plásmido o DNA viral introducido en el organismo hospedador no se integra necesariamente en su genoma pero puede ser expresado en el citoplasma por un periodo de tiempo corto. La expresión de los genes producto de fusión son fácilmente monitoreados ya que pueden ser observados por la fluorescencia que emiten usando un juego de filtros compatible con la proteína fluorescente, por lo general se lleva a cabo durante un periodo de varias horas después de la transfección y continúa por 72-96 h después de la introducción del DNA plasmídico en las células de mamífero. En algunos casos, el DNA plasmídico puede incorporarse al genoma de manera permanente para formar líneas celulares transformadas estables. La elección de una transfección transitoria o estable depende de los objetivos de la investigación [61].

La configuración básica de un vector plasmídico útil en experimentos de transferencia de genes que codifican para proteínas de fluorescencia tiene varios componentes necesarios. El plásmido debe contener la secuencia de nucleótidos procariontes que codifica para un origen de replicación bacteriano de DNA y un gen de resistencia a algún antibiótico. Estos elementos, con frecuencia llamados secuencias “shuttle”, permiten la propagación y selección del plásmido dentro de un hospedador bacteriano para generar cantidades suficientes del vector para transfecciones. Además, el plásmido debe contener uno o más elementos genéticos eucariotes que controlen la iniciación de la transcripción del RNAm, una señal de poliadenilación de mamífero, un intrón (opcional) y un gen para la co-selección en células. Los elementos de transcripción son necesarios en el hospedador para expresar los genes de interés y la selección del gen es usualmente mediante un antibiótico que confiere resistencia a las células que contienen el plásmido [61].

Es raro para las proteínas fluorescentes tener efectos tóxicos en la mayoría de los cultivos celulares, pero siempre se debe tener cuidado y hacer los controles apropiados cuando se exploran nuevas líneas celulares o tejidos. Actualmente, existen disponibles nuevas proteínas fluorescentes, sin embargo se desconoce si algunas pueden llegar a ser sustancialmente más tóxicas para las células que las derivadas de *Aequorea victoria* [62].

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

Los métodos actuales para la detección de CTC se basan en el reconocimiento y captura de las mismas utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de membrana propias de las células epiteliales, como EpCAM y citoqueratina. Mientras que esta metodología resulta eficiente para detectar poblaciones no hematopoyéticas escasas circulantes, no es muy selectiva (discriminatoria) para poblaciones tumorales.

En el presente trabajo se pretende diseñar y generar un vector adenoviral que exprese la RFP bajo el control del promotor hTERT, un promotor que se sabe que es preferencialmente activo en células transformadas, de manera que será capaz de inducir la expresión selectiva de RFP en células tumorales. Este vector será útil para el diseño e implementación de nuevas tecnologías para la detección de CTC *in vitro*.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Generar un vector adenoviral diseñado para expresar RFP selectivamente en células tumorales mediante la transducción del gen RFP bajo el control del promotor hTERT.

3.2 Objetivos específicos

1. Diseñar y construir el genoma adenoviral recombinante en bacterias *E. coli* BJ5183
2. Generar y producir el Ad-hTERT-RFP en células HEK293.
3. Caracterizar el vector adenoviral Ad-hTERT-RFP.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Bacterias competentes

Se utilizaron bacterias calciocompetentes *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA) y bacterias BJ5183 (Stratagene, La Jolla, CA).

4.1.2 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular HEK293 (ATCC, Manassas, VA).

4.1.3 Secuencia

Se mandó sintetizar la secuencia que posee el promotor hTERT y el gen de la proteína roja fluorescente, cuya longitud es de 1,543 pb. Fue clonada en un plásmido pUC57 (GenScript, Piscataway, NJ), como se ilustra en la Figura 5.

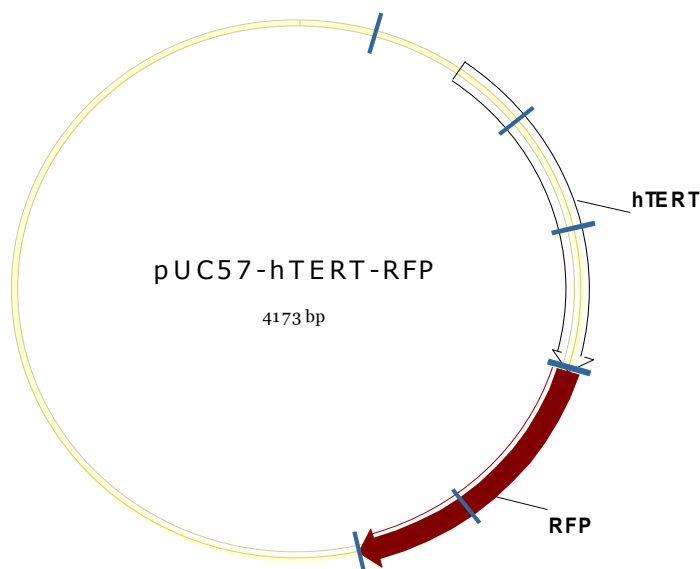


Figura 5. Esquema de secuencia hTERT-RFP sintetizada por GenScript, proporcionada en un vector pUC57.

4.1.4 Plásmidos

Se utilizaron los plásmidos pShuttle (AES1020) y AdEasy-1 (AES1010) (QBIogene, Carlsbad, CA). Ambos se ejemplifican en la Figura 6.

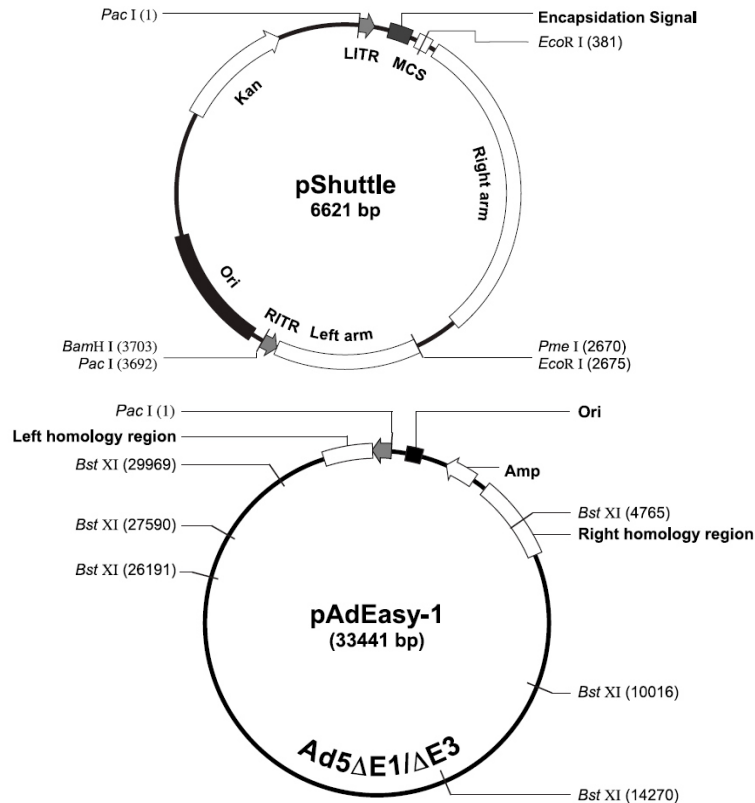


Figura 6. Plásmidos pShuttle y AdEasy utilizados para construcción de vector adenoviral.

4.1.5 Iniciadores

En la Tabla 2 se enlistan y mencionan los iniciadores empleados para la caracterización del pShuttle-hTERT-RFP. Amplifican un fragmento de 1526 pb.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para caracterizar pShuttle-hTERT-RFP.

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm (°C)
Sentido	5'-GAAGTGAAATCTGAATAATTTTGT-3'	21	62
Antisentido	5'-CAAACACTACATAAGACCCCCAC-3'	22	62

En la Tabla 3 se enlistan y mencionan los iniciadores empleados para la caracterización del genoma adenoviral recombinante. Amplifican un fragmento de 971 pb. En la Figura 7 se observa la amplificación *in silico*.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para caracterizar el genoma adenoviral recombinante

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)	T _m (°C)
Sentido	5'-ATTTGGGCGTAACCGAGTAAG-3'	21	62
Antisentido	5'-GTCTTCGGAGGAAGCCATTA-3'	22	62

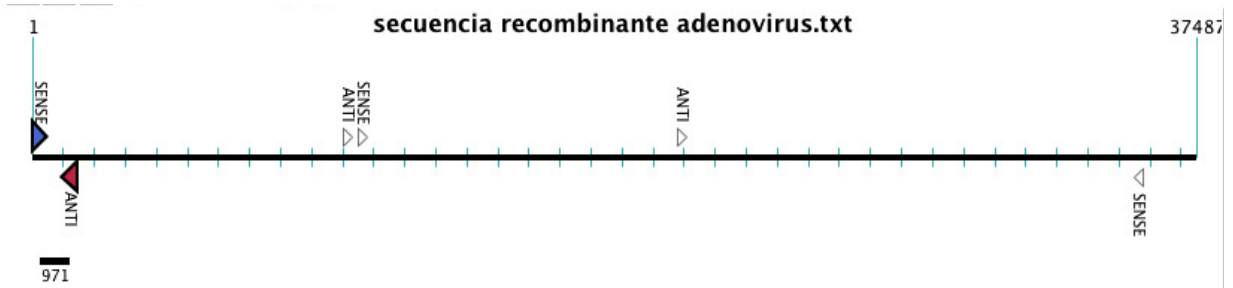


Figura 7. Amplificación *in silico* utilizando iniciadores para caracterizar genoma adenoviral recombinante en el programa Amplify 3.

4.2 Materiales y reactivos

Para cultivo celular se utilizó el medio de cultivo Advanced Dubecco's Modified Eagle (Invitrogen), suero fetal bovino (Invitrogen), tripsina 0.25% (Invitrogen), ampicilina/estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA), L-glutamina (Gibco), pastillas para preparar PBS 1X (Amresco, Solon, OH) y Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El material desechable para cultivo celular consistió en pipetas serológicas desechables de 5, 10 y 25 mL (Corning Inc., Corning, NY), tubos de 15 y 50 mL (Corning), scrappers (Corning), cajas Petri de 100 mm (Corning), tubos para microcentrífuga de 0.6, 1.5 y 2 mL (Corning), placas para cultivo celular de 6 pozos y botellas de cultivo celular de 25, 75 y 150 cm² (Corning). Se utilizaron también puntas para micropipeta 0.2-10, 2-20 y 100-1000 µL.

Para la construcción del vector adenoviral se empleó la enzima T4 DNA ligasa (PROMEGA, Madison, WI), Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (PROMEGA) y agarosa ultrapura (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO). Para su caracterización se emplearon las enzimas de restricción *Pme* I, *Pac* I, *Blg* II, *Not* I, *Hind* III (New England Biolabs, Ipswich, MA) y el reactivo PCR Master Mix (Promega). Se

emplearon también los marcadores de peso molecular 1 kb DNA Ladder, 100 pb DNA Ladder, 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kpb) de New England.

Para el cultivo de bacterias se usó cloruro de sodio (NaCl, Amresco), triptona de caseína (Amresco), extracto de levadura (Amresco), agar bacteriológico (Amresco), tris grado ultrapuro (Amresco), EDTA disodio dihidratado (Amresco), sulfato de kanamicina (Amresco), ampicilina y glicerol anhídrido (J.T. Baker, Center Valley, PA).

Para la extracción de DNA adenoviral por el método de Hirt se utilizó dodecil sulfato de sodio (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO), proteinasa K (MN, Macherey-Nagel, Alemania), fenol (SIGMA-ALDRICH), cloroformo (SIGMA-ALDRICH), isopropanol (SIGMA-ALDRICH), etanol grado biología molecular (SIGMA-ALDRICH).

Para la caracterización del vector adenoviral mediante inmunohistoquímica se empleó el reactivo R.T.U. VECTASTAIN® UNIVERSAL (Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG) ABC KIT (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA) con número de catálogo PK-7200, el substrato DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE con número de catálogo SK-410 y un anticuerpo anti-hexón (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) como anticuerpo primario. Se utilizó el microscopio LEICA DM1000 con un filtro N:1 y una fuente de poder modelo mbq 52 ac (Zeiss, Oberkochen, Alemania) para observar la fluorescencia roja de las células.

4.3 Estrategia general

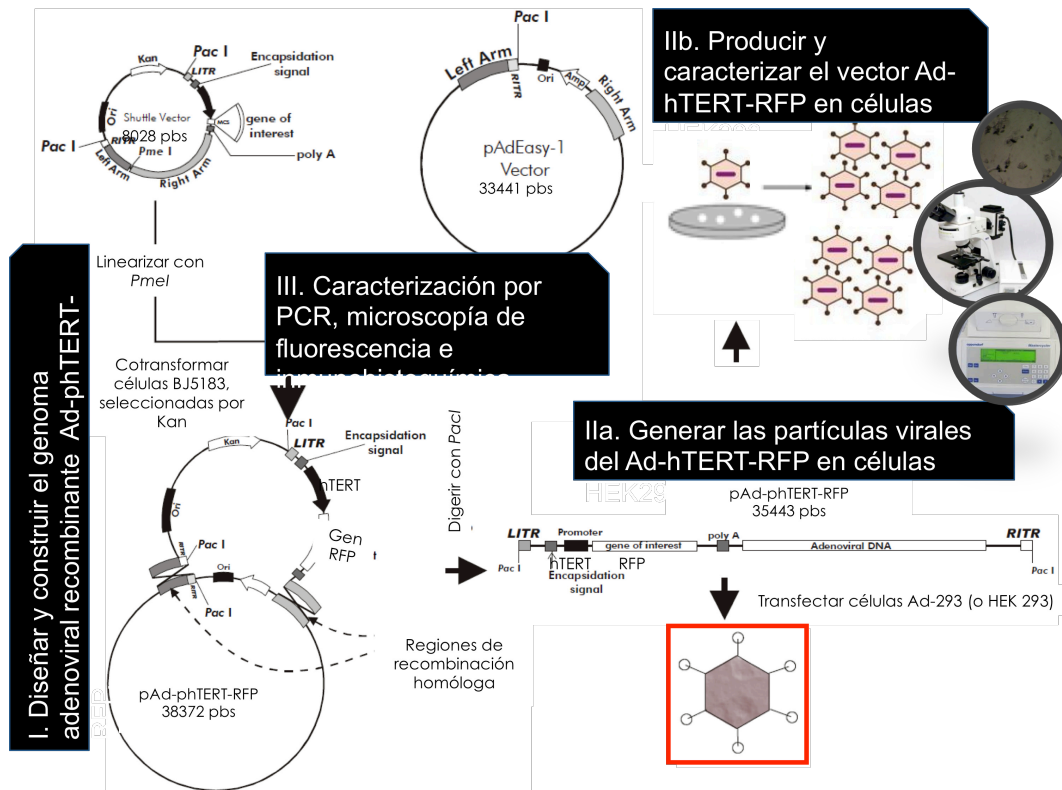


Figura 8. Estrategia general para construcción del vector Ad-hTERT-RFP.

4.4 Diseño del vector adenoviral recombinante Ad-hTERT-RFP

Se planeó utilizar una región promotora de hTERT de acuerdo a la información reportada por *McMurray y cols.* [6], donde se reporta la activación de hTERT por E6 de VPH16. Por su parte, el gen que codifica la expresión de RFP fue seleccionado con base en proyectos realizados previamente en el Laboratorio de Terapia Génica.

Se colocó un sitio de corte con la enzima *Not I* y posteriormente la región correspondiente al promotor hTERT. Se colocó además, inmediatamente después de la región hTERT y antes de RFP, una parte de la secuencia del sitio múltiple de clonación (MCS) que incluye los sitios de corte de *Hind III* y *Xho I*, esto como herramienta para futuras sustituciones del marco abierto de lectura (ORF) en el pShuttle-TERT-RFP que se genere. Después se decidió colocar la

secuencia del marco de lectura de la proteína roja fluorescente, para finalizar con los sitios de corte del MCS *Sal* I y *Bgl* II.

4.5 Construcción del plásmido pShuttle-hTERT-RFP

Se mandó sintetizar la secuencia que comprende las regiones hTERT-RFP y fue recibida en un plásmido pUC57 de la casa comercial GenScript. Se procedió a transformar bacterias calciocompetentes TOP10F' con el plásmido recién obtenido. De aquí se extrajo el DNA plasmídico y se caracterizó mediante reacciones de restricción con las enzimas *Not* I y *Bgl* II durante 2 horas a 37 °C. Estas digestiones fueron analizadas en un gel de agarosa al 1% y permitieron observar al fragmento hTERT-RFP liberado del resto del plásmido. Posteriormente se repitió la reacción de restricción en un volumen de reacción final de 100 µL y se corrió en un gel de agarosa al 1.5%. Enseguida se purificó la banda correspondiente al fragmento hTERT-RFP, cuya longitud es de 1,543 pb, con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se corroboró nuevamente la presencia del fragmento en un gel de agarosa al 1%.

De manera simultánea se realizó la reacción de restricción del plásmido pShuttle con las enzimas *Not* I y *Bgl* II y se procedió a ligarlo durante 1 hora a temperatura ambiente con el fragmento hTERT-RFP en proporción 4:1 de fragmento y plásmido, respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa de Promega. Se corroboró la ligación en un gel de agarosa al 1% y luego el producto de ligación se transformó en bacterias *E. coli* TOP10F'. Posteriormente se obtuvieron colonias que fueron removidas del medio sólido y cultivadas en medio líquido LB. Se realizó extracción de DNA plasmídico por la técnica de minipreparación alcalina de DNA [98] y se tamizaron colonias mediante PCR, amplificando el fragmento hTERT-RFP. Se utilizaron los iniciadores de la Tabla 2. Se trabajó bajo las condiciones de la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de PCR para caracterización de pShuttle-hTERT-RFP

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (Min)
1	95	3
2	95	0.5
3	60	0.5
4	72	1.5
5	Ir al paso 2, 30 veces	
6	72	3
Fin		

Una vez identificadas las colonias por PCR, se procedió a caracterizar el vector pShuttle-hTERT-RFP con las enzimas *Not* I y *Bgl* II. El esquema de la Figura 9 ejemplifica al plásmido pShuttle-hTERT-RFP construido.

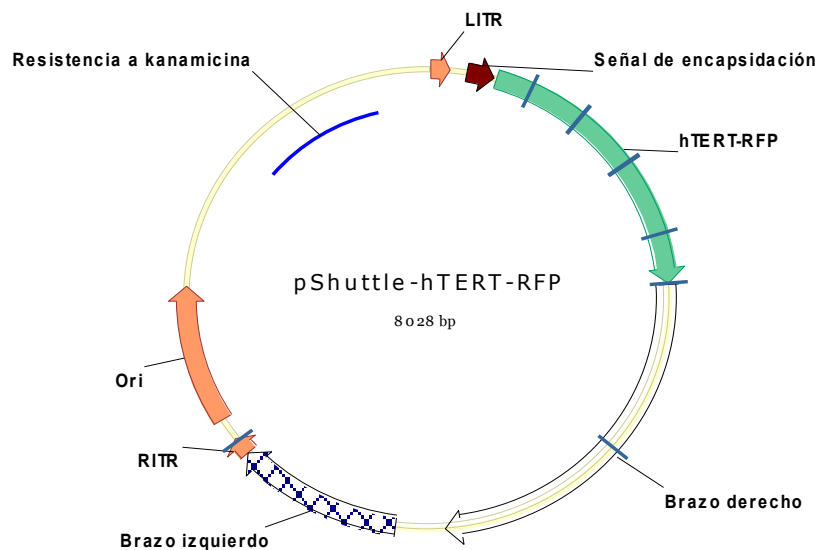


Figura 9. Esquema de pShuttle-hTERT-RFP construido.

4.6 Construcción del genoma adenoviral recombinante pAd-hTERT-RFP

Se transformó el plásmido AdEasy (Figura 10A) en bacterias BJ5183 utilizando placas con medio LB con ampicilina. Se caracterizó con la enzima *Hind* III y se verificó en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente, el plásmido pShuttle-

hTERT-RFP previamente linearizado con la enzima *Pme* I en un volumen final de 50 μ L durante 3 horas a 37°C y precipitado con fenol-cloroformo se co-transformó en bacterias BJ5183 con el plásmido AdEasy. Las bacterias transformadas se crecieron en placas con medio LB y las clonas recombinantes fueron seleccionadas por su resistencia a kanamicina (100 μ g/mL). Se emplearon controles de transformación y un control negativo que carecía del plásmido AdEasy. Las clonas crecidas se tamizaron inicialmente mediante retardo de migración en gel de agarosa al 0.8%. Después fueron caracterizadas por reacciones de restricción con la enzima *Pac* I y mediante PCR, utilizando los iniciadores de la Tabla 3 y bajo las condiciones de la Tabla 5. El plásmido recombinante pAd-hTERT-RFP (Figura 10B) se creció a mediana escala y se realizó extracción de DNA con el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System.

Tabla 5. Condiciones de PCR para caracterización de genoma adenoviral recombinante (Ad-hTERT-RFP).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (Min)
1	95	5
2	95	1
3	53	0.5
4	72	1
5	Ir al paso 2, 30 veces	
6	72	7
Fin		

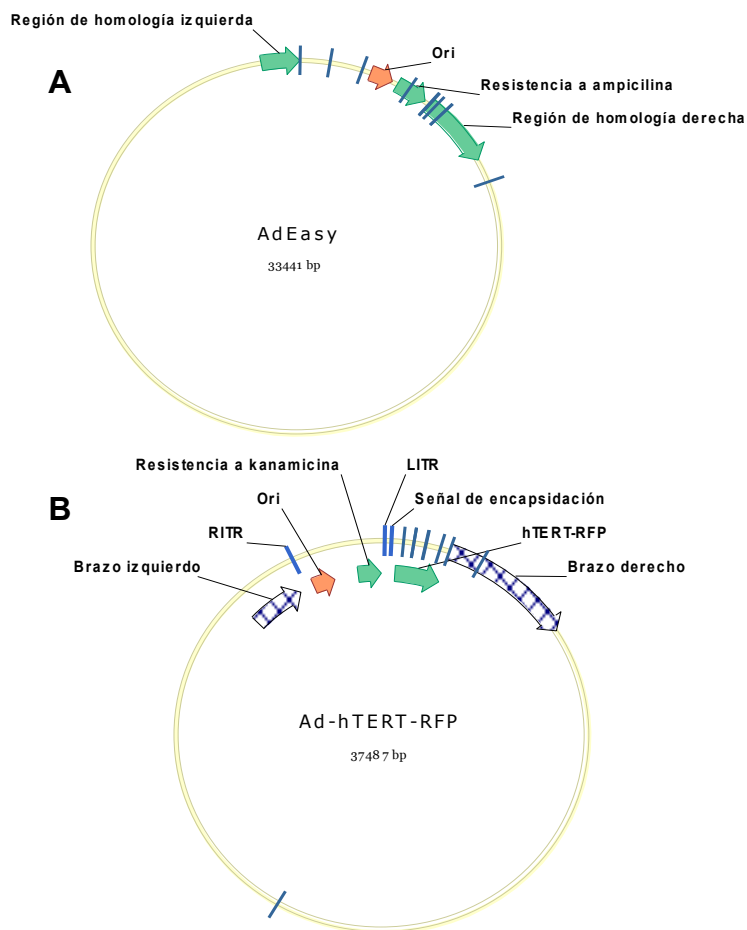


Figura 10. Esquemas de plásmido AdEasy y Ad-hTERT-RFP. A) Plásmido AdEasy que se recombina con pShuttle. B) Plásmido correspondiente al genoma adenoviral recombinante.

4.7 Generación de vector adenoviral pAd-hTERT-RFP

El plásmido recombinante pAd-hTERT-RFP se utilizó para transfectar células HEK293. Se sembraron 700,000 células por pozo en cajas de 6 pozos, 24 horas antes de la transfección. El DNA se cuantificó por Nanodrop y se sometió a restricción con la enzima *Pac I* por 60 minutos, en reacciones de 100 μ L como volumen final. El DNA digerido se precipitó con etanol en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. La transfección se realizó con Lipofectamina 2000, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las células transfectadas se dejaron incubando a 37°C y 5% de CO₂ hasta que se observó efecto citopático en el 80% de las células. Fueron cosechadas y lisadas con ciclos de congelación y descongelación de -70°C y 37°C, respectivamente,

y con los lisados se infectaron células HEK293 en 2 cajas de cultivo T-25. Luego de observar el efecto citopático se infectó 1 caja de cultivo T-75 y al obtener el lisado se infectaron 3 cajas de cultivo T-75. Una parte del lisado se empleó para infectar 1 caja T-75, mientras que otra parte se utilizó para observar la presencia de la RFP mediante microscopía de fluorescencia y para determinar la presencia del vector adenoviral por inmunohistoquímica y PCR.

El vector se caracterizó por PCR utilizando iniciadores específicos de una región que abarca la zona previa al promotor y comprende parte de éste (Tabla 3, Figura 10B). Para ello fue necesario extraer el DNA adenoviral utilizando el método de Hirt. En un tubo de 1.5 mL se prepararon 250 μ L de solución de lisis (SDS 0.8%, EDTA 10 mM, proteinasa K 50 mg/mL y se completó con TE 1X). A dicha solución se agregaron 180 μ L del extracto celular lisado mediante ciclos de congelación y descongelación y se incubó durante 2-3 h a 55°C.

Posteriormente se añadieron 100 μ L de NaCl 5 M y se incubó durante 30 min a -20°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 min y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 287 μ L de fenol y 287 de SEVAG y se mezcló en vortex durante 3 min. Nuevamente se centrifugó a 14 000 rpm durante 8 min. Posteriormente se separó la fase acuosa en un nuevo tubo eppendorf y se agregaron 700 μ L de isopropanol. Se mezcló vigorosamente y se dejó incubar 5 min a -20°C. Luego se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol al 80%. Se dejó secar a temperatura ambiente y cuando ya no se detectó la presencia de etanol, se procedió a resuspender en 20 μ L de agua libre de nucleasas. Posteriormente se cuantificó por Nanodrop y se realizaron las reacciones de PCR con el reactivo MasterMix de PROMEGA, utilizando 100 ng/ μ L de DNA por reacción bajo las condiciones descritas en la Tabla 5.

Para realizar los ensayos de inmunohistoquímica indirecta, primeramente se sembraron 700,000 células por pozo en una caja de 6 pozos. Al día siguiente se infectaron con el vector adenoviral durante 2 h y se completó con medio DMEM al 1%, para posteriormente incubar durante 3 días hasta observar efecto

citopático. Después se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con metanol. En un paso posterior se bloqueó con BSA al 1%. Se agregó el anticuerpo primario (anti-hexón) y se incubó 1 h para realizar luego 3 lavados con PBS. Después se agregó el reactivo R.T.U. VECTASTAIN® UNIVERSAL (Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG) ABC KIT siguiendo las especificaciones de la casa comercial y se incubó por 1 h para realizar después 2 lavados con PBS. Luego se añadió el sustrato durante 5 min y se hizo otro lavado con PBS. Finalmente se observa al microscopio.

Finalmente, para observar bajo microscopía de fluorescencia fue necesario sembrar 700,000 células HEK293 en cajas de 6 pozos. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se incubó con 500 µL del lisado celular durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se añadieron 2.5 mL de medio DMEM con SFB al 1% y se esperó que se presentara el efecto citopático para observar en el microscopio de fluorescencia LEICA DM1000.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Construcción del plásmido pShuttle-hTERT-RFP

El plásmido pUC57-hTERT-RFP fue propagado mediante transformación en bacterias calciocompetentes *E. coli* TOP10F', obteniéndose 6 colonias candidatas que fueron debidamente caracterizadas utilizando las enzimas de restricción *Not* I y *Bgl* II, como lo indica la siguiente imagen (Figura 11).

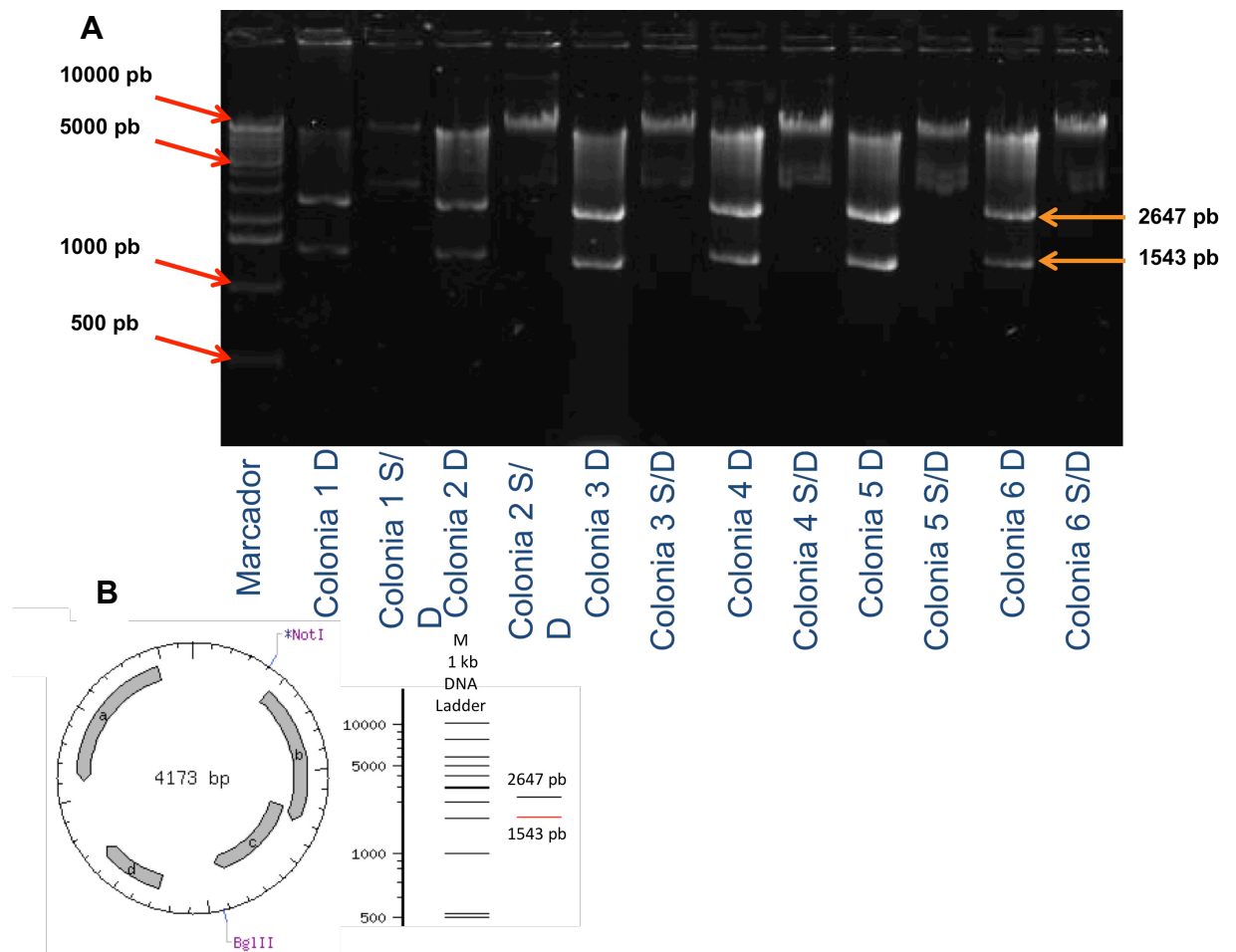


Figura 11. Caracterización del plásmido pUC57-hTERT-RFP. A) Digestión con *Not* I y *Bgl* II. Marcador de peso molecular: 1Kb DNA Ladder. Colonia 1D= Colonia digerida. Colonia 1S/D= Colonia sin digerir. 6 colonias analizadas. B) Esquema de cortes en el plásmido.

En la Figura 11A se puede apreciar la liberación del fragmento hTERT-RFP que comprende 1,543 pb, utilizado en los experimentos posteriores.

Después se procedió a repetir la reacción de restricción en un volumen mayor como se muestra en la Figura 12, luego se precipitó y purificó para poder llevar a cabo la ligación. Simultáneamente se realizó el mismo procedimiento con el plásmido pShuttle.

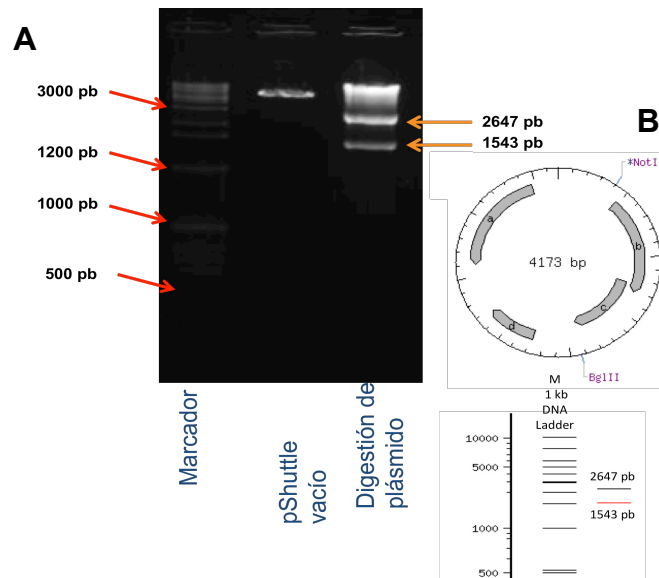


Figura 12. Reacción de restricción de pUC57-hTERT-RFP para ligación. A) Digestión con *Not* I y *Bgl* II. Marcador de peso molecular: 2-Log DNA Ladder. B) Esquema de cortes en el plásmido.

Tras la purificación del fragmento, se corrió nuevamente un gel de agarosa al 1%. Esto permitió corroborar la presencia del fragmento hTERT-RFP previo a su ligación, como se observa en la Figura 13.

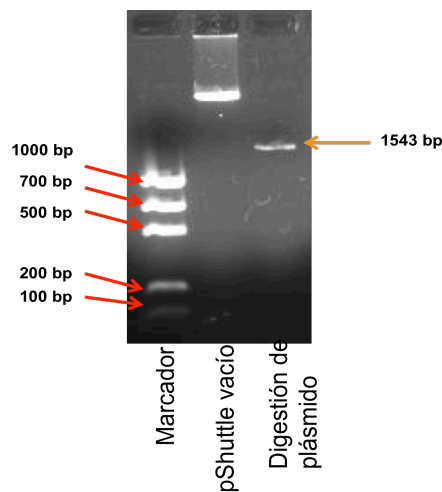


Figura 13. Verificación de fragmento hTERT-RFP digerido y purificado para ligación. Marcador de peso molecular: EZ-LOAD Molecular Mass Standard.

En un paso posterior, se realizó la reacción de ligación de los fragmentos purificados y el plásmido pShuttle vacío con enzima T4 DNA Ligasa y se transformó en bacterias calciocompetentes, esperando obtener como resultado un plásmido de 8028 pb, que fue nombrado pShuttle-hTERT-RFP. La escalera de ligación característica se aprecia en el siguiente gel de agarosa al 1% (Figura 14).

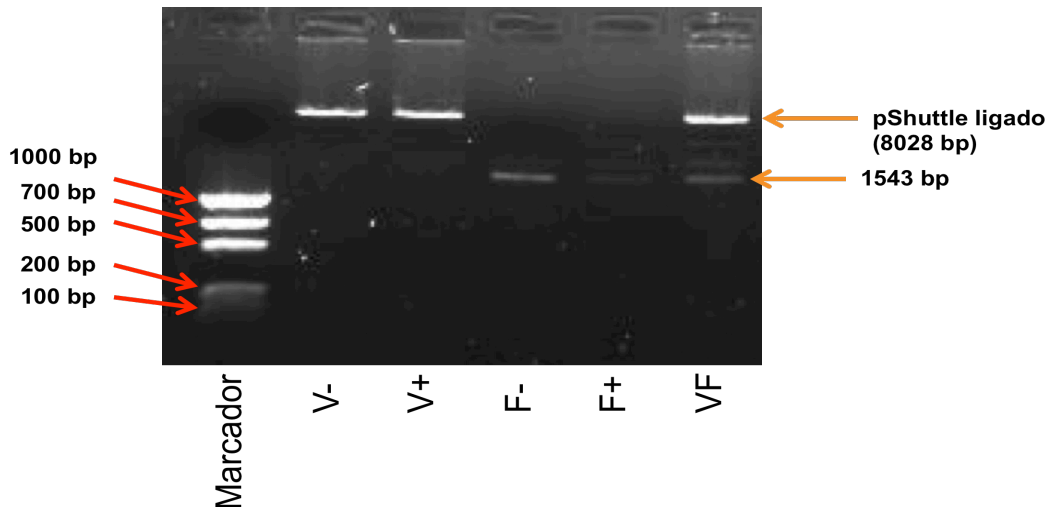


Figura 14. Verificación visual de la ligación de hTERT-RFP con pShuttle. Marcador de peso molecular: EZ-LOAD Molecular Mass Standard. V⁻= Plásmido pShuttle vacío. V⁺= Plásmido pShuttle vacío con enzima T4 DNA Ligasa. F⁻= Fragmento hTERT-RFP. F⁺= Fragmento hTERT-RFP con enzima T4 DNA Ligasa. VF= Vector+Fragmento ligados con enzima T4 DNA Ligasa.

Se obtuvieron 7 colonias de la transformación del producto de ligación en bacterias *E. coli* TOP10F' y fueron caracterizadas en 2 grupos mediante PCR, utilizando los iniciadores de la Tabla 2 bajo las condiciones de la Tabla 4. Los resultados se establecen en el gel de agarosa al 1% de la Figura 15:

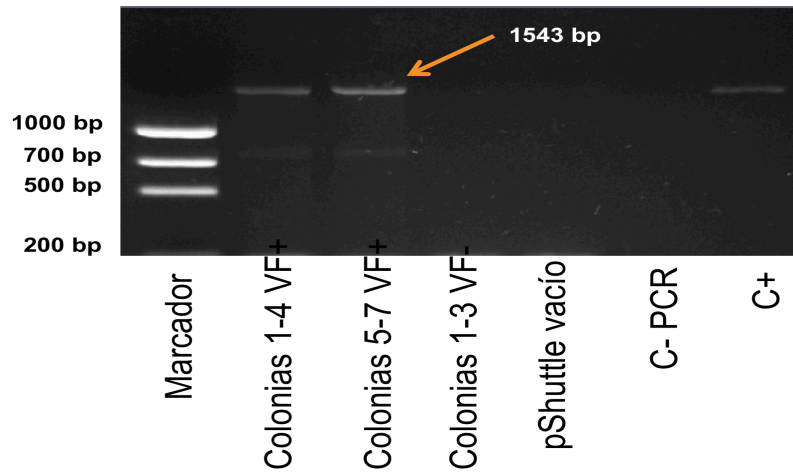


Figura 15. PCR de colonias obtenidas tras transformación del producto de ligación en bacterias *E. coli* TOP10F'. Marcador de peso molecular: EZ-LOAD Molecular Mass Standard. Colonias 1-4 VF⁺= PCR de cuatro colonias obtenidas en la ligación. Colonias 5-7 VF⁺= PCR de tres colonias obtenidas en la ligación. Colonias 1-3 VF⁻= PCR de 3 colonias obtenidas en mezcla de fragmento y vector sin enzima ligasa (control negativo de ligación). pShuttle vacío= Plásmido sin fragmento. C-PCR= Control negativo de PCR. C⁺= DNA de fragmento hTERT-RFP de 1,543 pb como referencia.

Posteriormente, al observar la amplificación esperada de 1,543 pb por PCR en ambos grupos, las 7 colonias se caracterizaron de manera individual mediante restricción con las enzimas *Not* I y *Bgl* II. Los resultados se muestran en la Figura 16:

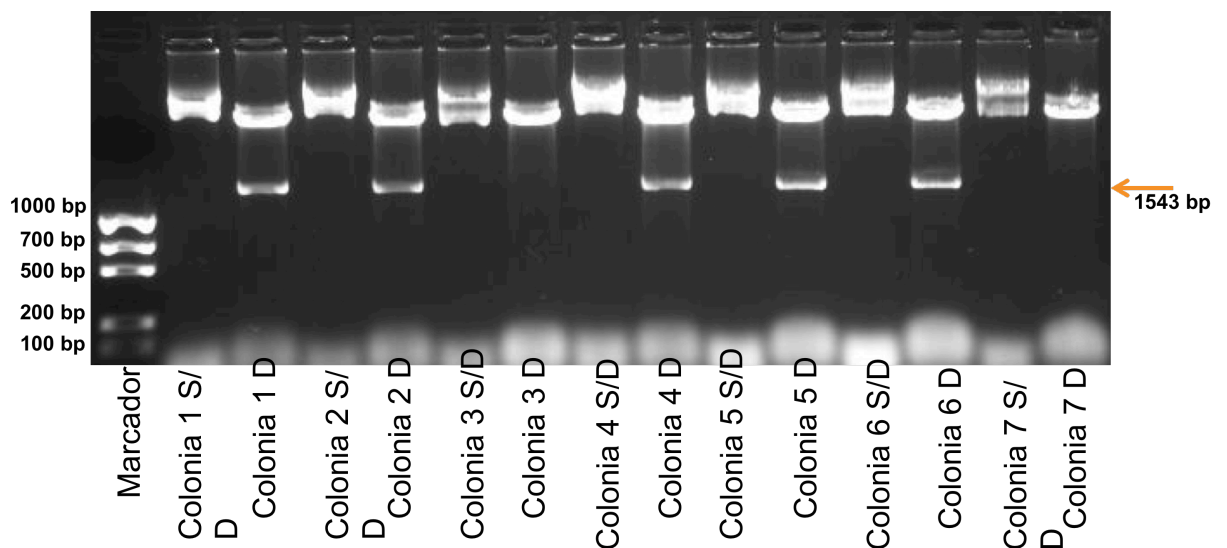


Figura 16. Caracterización por restricción del plásmido pShuttle-hTERT-RFP mediante las enzimas *Not* I y *Bgl* II. Marcador de peso molecular: EZ-LOAD Molecular Mass Standard. Colonia 1 S/D= Colonia 1 sin digerir. Colonia 1D= Colonia 1 digerida. 7 colonias analizadas.

Se encontró que 5 de las 7 colonias liberaron el fragmento esperado de 1,543 pb, específicamente las colonias 1 y 2 del primer grupo y las colonias 4, 5 y 6 del segundo. Eso explica por qué ambos grupos resultaron positivos mediante PCR. Con lo anterior se comprueba que el plásmido pShuttle-hTERT-RFP se ha construido satisfactoriamente.

5.2 Construcción del genoma adenoviral recombinante pAd-hTERT-RFP

Para construir el genoma adenoviral recombinante fue necesario caracterizar inicialmente el plásmido AdEasy, que es el vector que contiene la mayor parte del genoma del adenovirus. El siguiente gel muestra el patrón obtenido al realizar las reacciones de restricción utilizando la enzima *Hind* III (Figura 17):

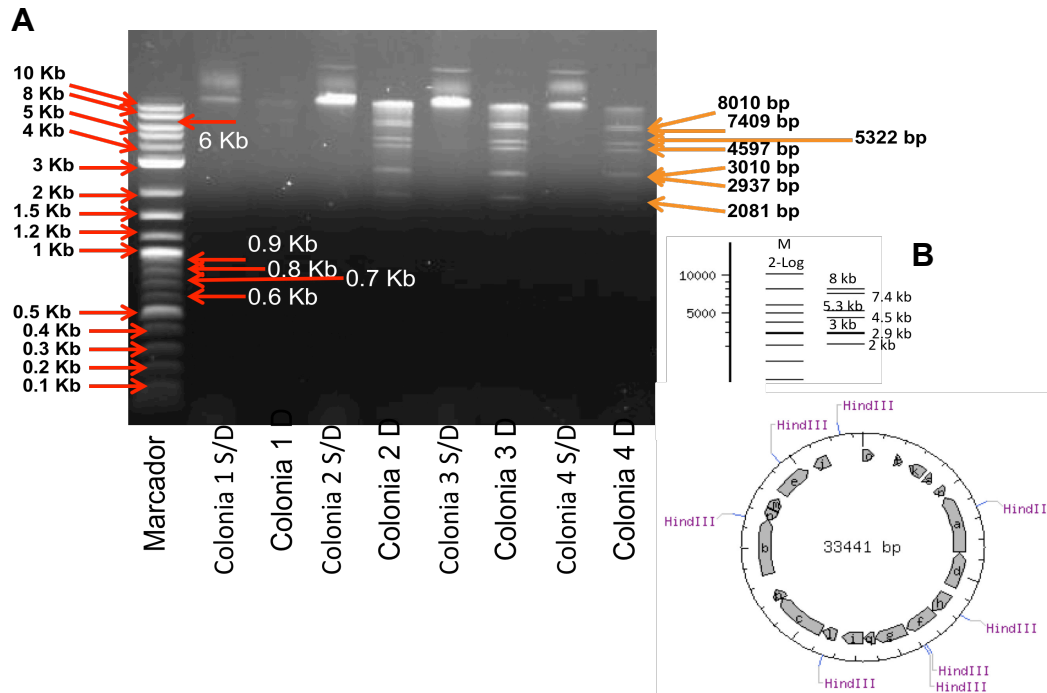


Figura 17. Caracterización del plásmido AdEasy. A) Digestión con enzima *Hind* III. Marcador de peso molecular: 0.1-10 kbp. Colonia 1 S/D= Colonia sin digerir. Colonia 1D= Colonia digerida. 4 colonias analizadas. B) Esquema de cortes en el plásmido.

Posteriormente se realizó la co-transformación del plásmido pShuttle-hTERT-RFP previamente linearizado en bacterias BJ5183 con el plásmido AdEasy. Las clonas recombinantes seleccionadas por su resistencia a kanamicina fueron tamizadas mediante retardo de migración en gel de agarosa, como aparece en la Figura 18:

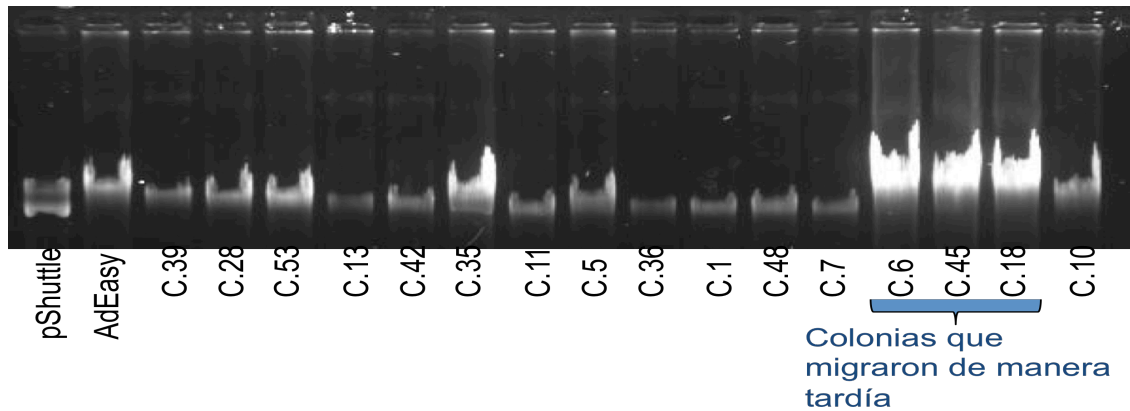


Figura 18. Tamizaje de presuntas clonas recombinantes por retraso en gel de agarosa.

Se eligieron las clonas número 6, 45 y 18 debido a su retraso evidente, como se aprecia en la Figura 18. Dichas clonas fueron producidas a mayor escala para posteriormente ser caracterizadas por reacciones de restricción con la enzima *Pac I*, debido a que con esta enzima se obtienen usualmente 2 fragmentos: uno de 30kb y otro más pequeño de 3-4.5 kpb según el protocolo de AdEasy Vector System de QBIogene, gracias a la posibilidad de recombinación ya sea entre los brazos izquierdos o entre los orígenes de replicación respectivamente. En este caso se esperaba un fragmento de 4.5 kpb según la caracterización *in silico* y se obtuvo en las 3 clonas candidatas, como aparece en la Figura 19:

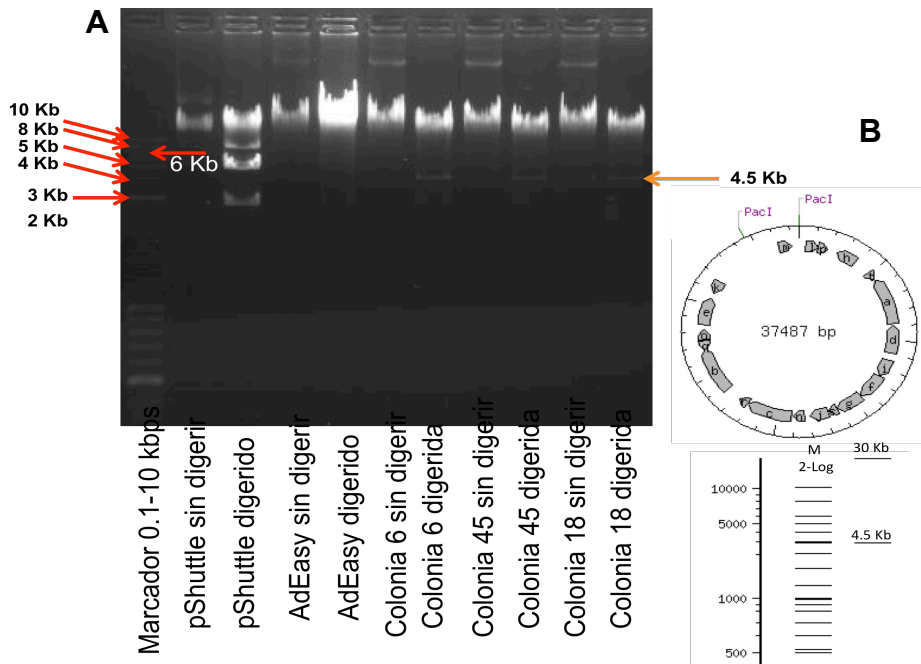


Figura 19. Caracterización de presuntas colonias recombinantes. A) Digestión con enzima *Pac* I. Marcador de peso molecular: 0.1-10 kbp. pShuttle, AdEasy y colonias 6, 45 y 18 digeridas y sin digerir presentes en los carriles del gel. B) Esquema de cortes en el genoma recombinante.

Sin embargo, en una segunda etapa de caracterización mediante PCR solamente una de las 3 clonas candidatas amplificó el fragmento hTERT-RFP de 1,543 pb, como se observa en la Figura 20:

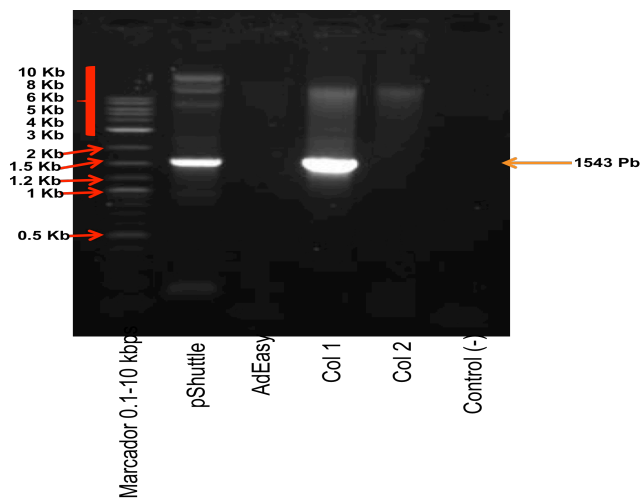


Figura 20. Caracterización por PCR de colonias candidatas. Marcador de peso molecular: 0.1-10 kbp.

Una vez que se verificó la construcción del plásmido recombinante pAd-hTERT-RFP con lo esperado *in silico*, el plásmido recombinante pAd-hTERT-RFP se creció a mediana escala y se realizó extracción de DNA con el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System. Se caracterizó nuevamente con *Pac* I como se ve en la Figura 21:

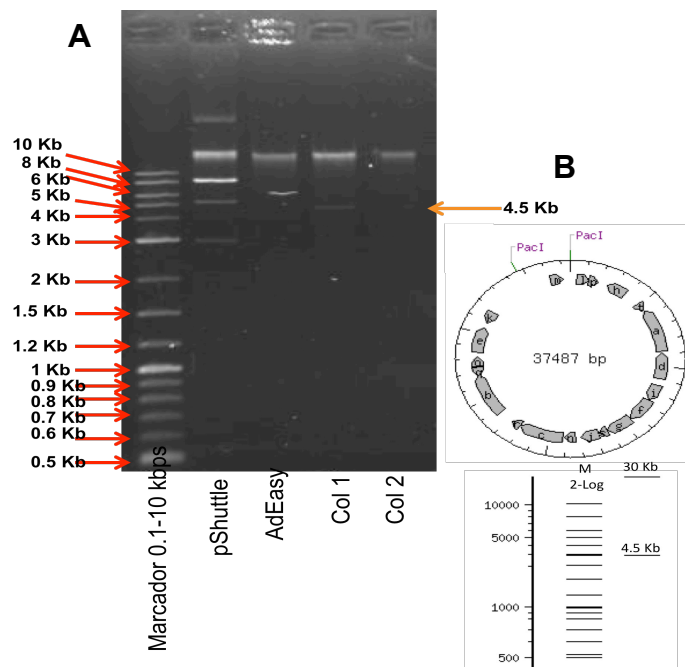


Figura 21. Caracterización de genoma adenoviral recombinante cultivado a mediana escala. A) Digestión con enzima *Pac* I. Marcador de peso molecular: 0.1-10 kbp. pShuttle, AdEasy y colonias 1 y 2 digeridas presentes en los carriles del gel. B) Esquema de cortes en el genoma recombinante.

5.3 Generación de vector adenoviral pAd-hTERT-RFP

Una vez obtenido y caracterizado, el plásmido pAd-hTERT-RFP se linearizó con la enzima *Pac* I para liberar los ITRs del genoma adenoviral de manera que la replicación de DNA viral puede iniciar de manera efectiva por acción de la proteína adenoviral de unión terminal.

Las imágenes de la Figura 22 corresponden a los cultivos de células HEK293 transfectados con el plásmido pAd-hTERT-RFP, en los cuales se hace evidente la presencia del efecto citopático a los 7 días de la transfección con el DNA adenoviral recombinante, indicando que se ha generado la partícula adenoviral.

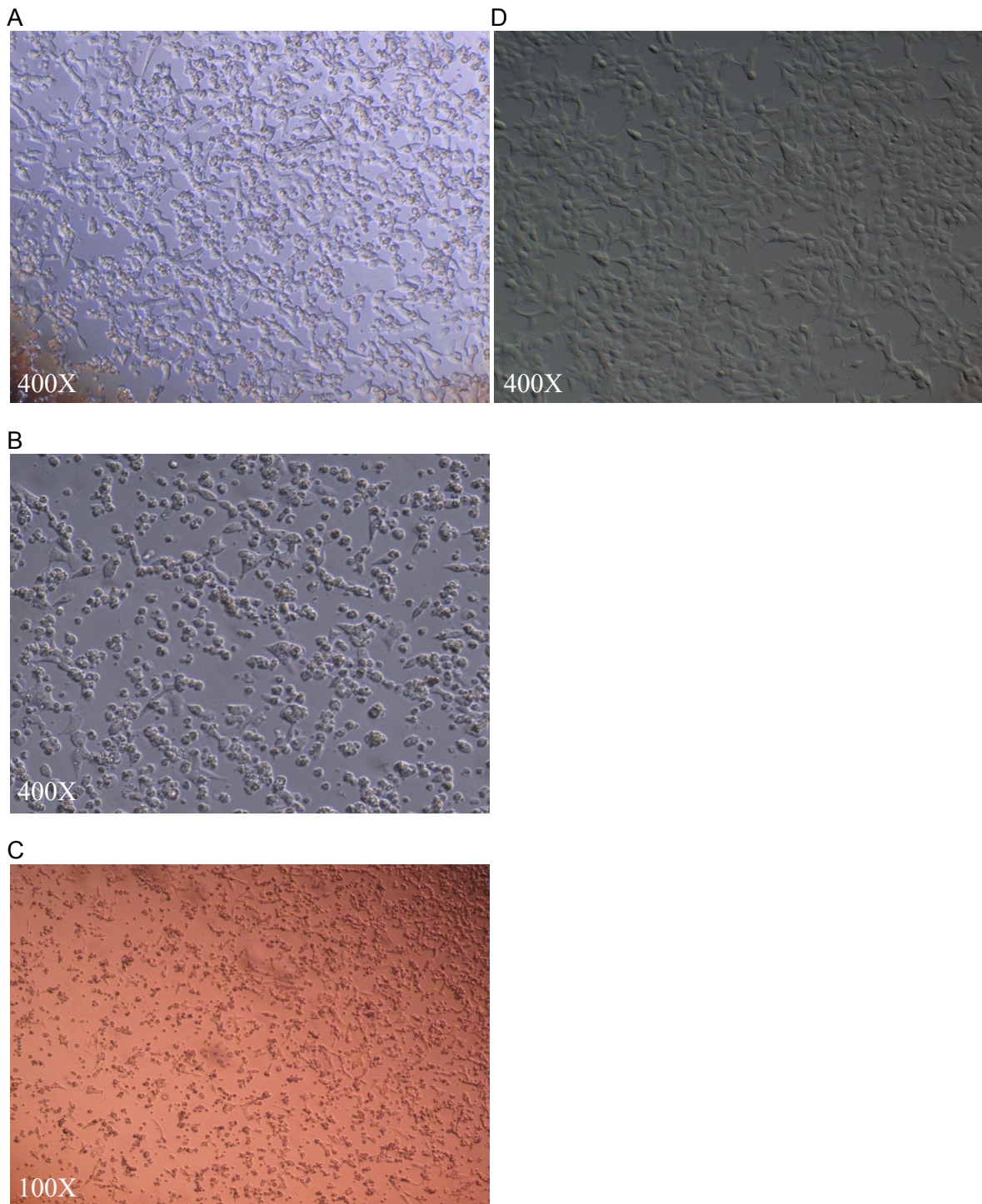
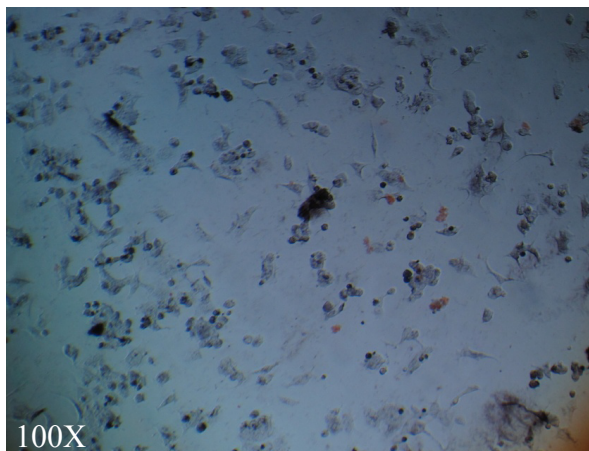


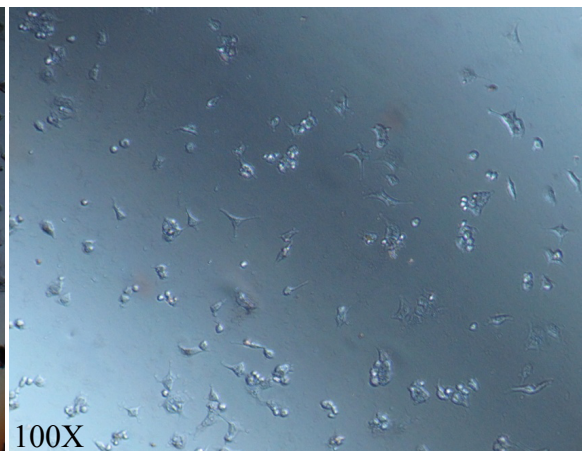
Figura 22. Generación del vector Ad-hTERT-RFP. Efecto citopático en células HEK293 debido a la generación de partículas virales. A-C) Micrografías de células transfectadas con el DNA recombinante, Lipofectamina 2000 y DMEM al 1%, con 400 y 100X de aumento. D) Micrografía de células que solo recibieron como tratamiento DMEM al 1% de SFB (Control negativo). Aumento 400X.

Transcurridos los 7 días de transfección, las células con efecto citopático fueron cosechadas y sometidas a ciclos de congelación y descongelación para ser lisadas y de esta manera liberar las partículas virales. El lisado se empleó para infectar 1 caja de 25 cm², luego 3 y posteriormente 2 de 75 cm². Parte de este nuevo lisado se utilizó para infectar cajas de 6 pozos, en una de las cuales se llevaron a cabo los ensayos de inmunohistoquímica, cuyos resultados se observan en la Figura 23. De igual forma, a los lisados y sobrenadantes se les extrajo el DNA adenoviral mediante el método de Hirt para realizar PCR utilizando los iniciadores de la Tabla 3 y bajo las condiciones de la Tabla 5, obteniéndose amplificaciones de 971 pb como lo demuestra el gel de agarosa al 1% de la Figura 24.

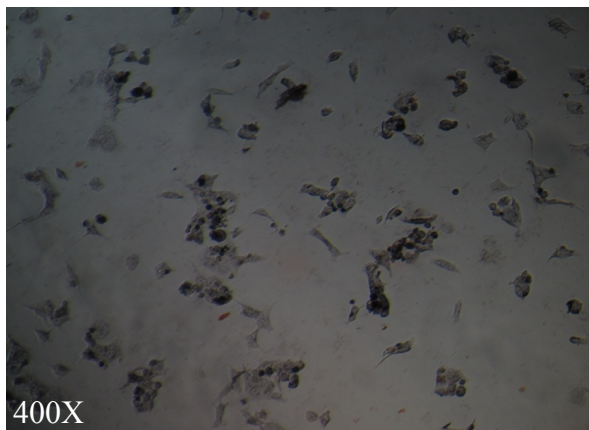
A



D



B



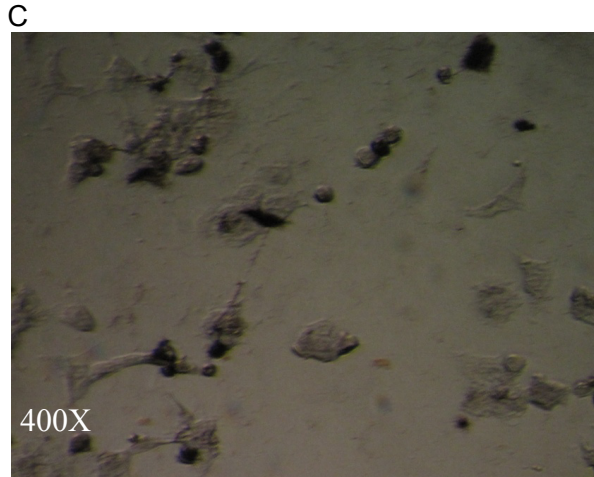


Figura 23. Inmunohistoquímica indirecta de células HEK293 infectadas con el vector Ad-hTERT-RFP. A-C) Micrografías de células infectadas con el vector adenoviral. Aumento 400 y 100X. D) Micrografía de células sanas, sin infección de vector adenoviral. Aumento 100X.

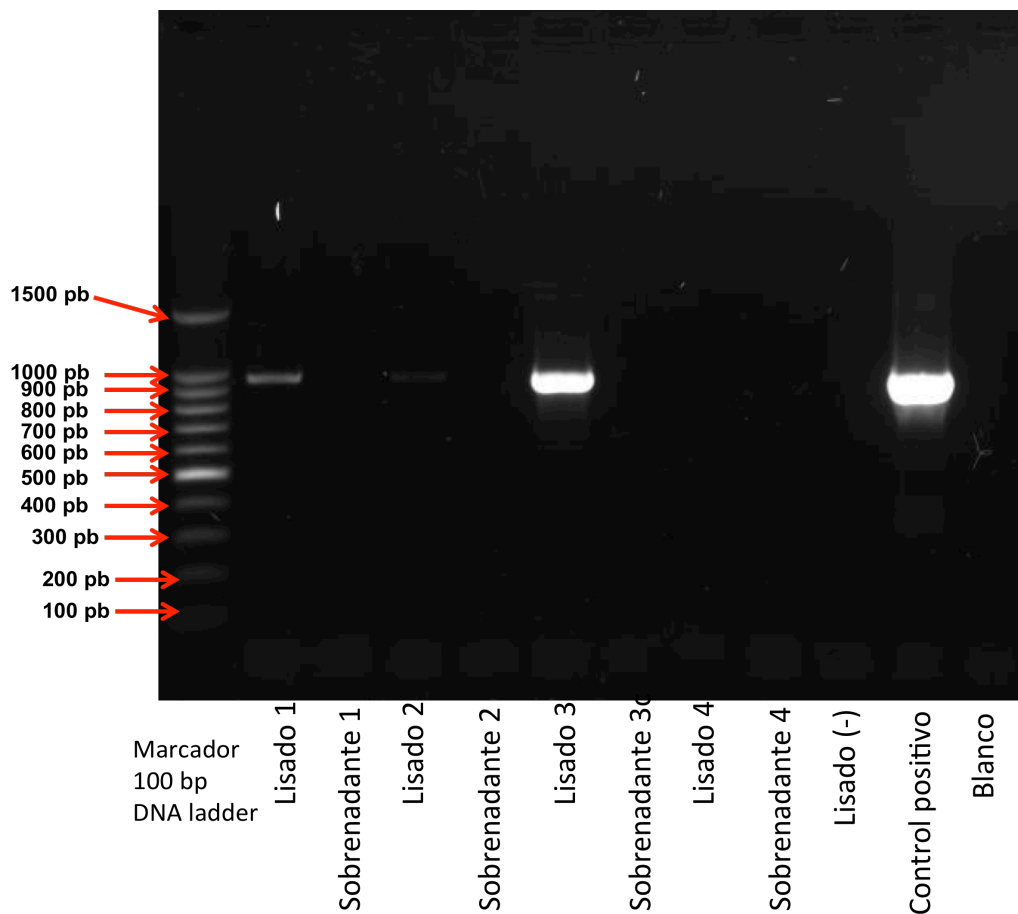


Figura 24. Caracterización por PCR del vector adenoviral Ad-hTERT-RFP en cultivo celular. Marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder. PCR de lisados y sus respectivos sobrenadantes.

Otra parte de los lisados se empleó en infecciones de células HEK293 que se dejaron incubando 120 h, para posteriormente ser observados bajo microscopía de fluorescencia con el filtro que permitiera observar la expresión de la RFP. Las imágenes correspondientes son las de la Figura 25.

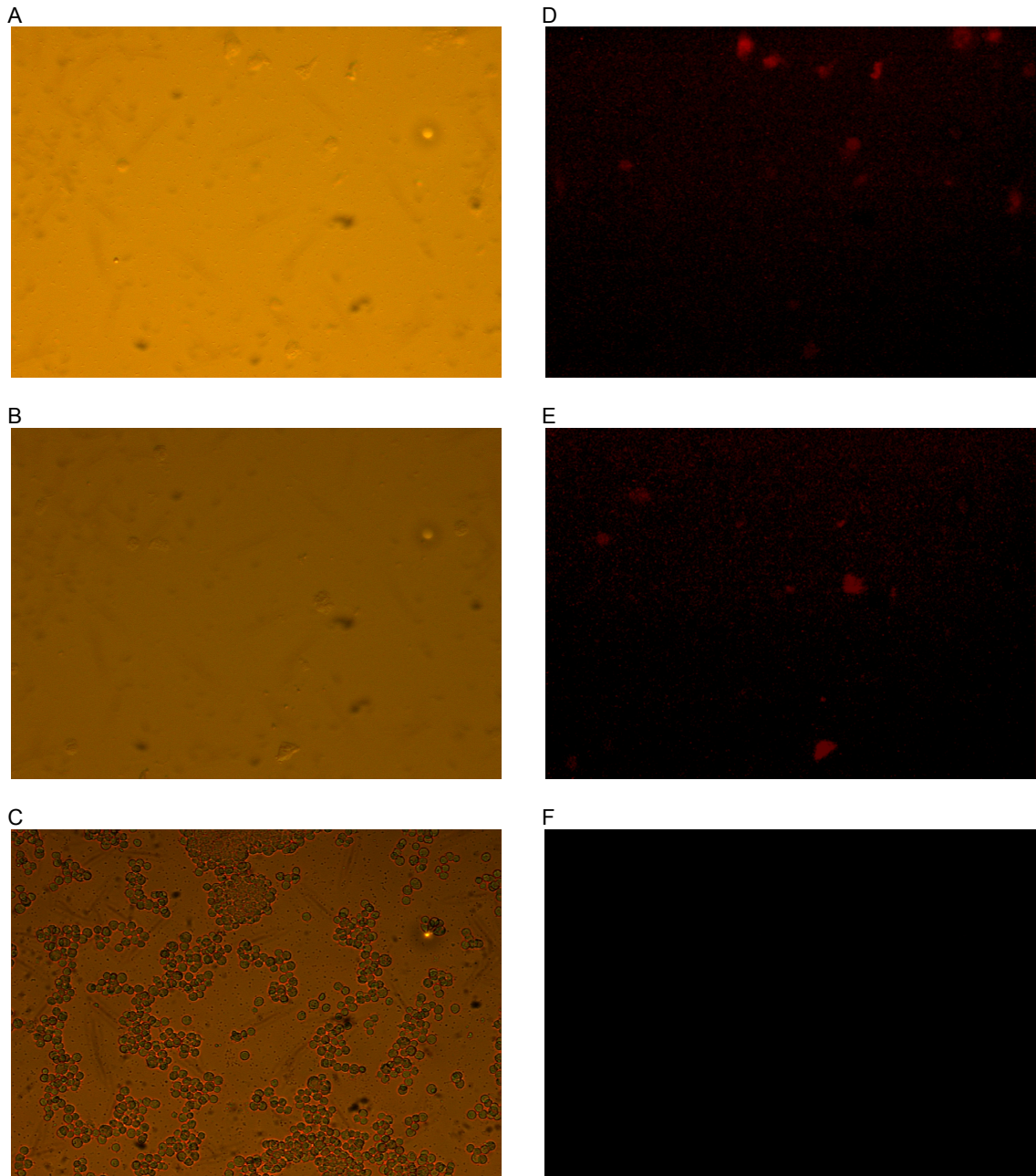


Figura 25. Microscopía de fluorescencia de células HEK293 infectadas con el vector adenoviral Ad-hTERT-RFP. A-B) Enfoque sin fluorescencia, aumento 400X, D-E) Mismo campo que A y B, pero bajo fluorescencia. Aumento 400X C-F) Células HEK293 sin infectar con vector, mismo campo con y sin fluorescencia. Aumento 400X.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

La mayoría de los sistemas de detección de CTC disponibles actualmente dependen de reconocimiento inmunológico de células marcadores de superficie celular epitelial-específicos, como EpCAM y citoqueratina. Esto implica un reto debido a que las tecnologías disponibles poseen desventajas como la limitada especificidad y la presencia de falsos positivos debido a la expresión de los mismo antígenos tanto en CTC como en células no tumorales, por lo que no hay garantía de que las células detectadas sean en realidad células cancerosas; podrían ser simplemente epitelio sano circulando en la sangre. La meta es aislar y caracterizar una célula tumoral en un volumen de 1 mL, en el cual estarían presentes alrededor de 1,000 millones de eritrocitos, 10 millones de leucocitos y 100 millones de plaquetas. También es importante mencionar que en este volumen también será posible encontrar un número de células epiteliales no tumorales posiblemente superior al de CTC, por lo que la técnica empleada requerirá, además de un instrumento potente para detectar células en fluido (citometría de flujo), una caracterización molecular que defina la naturaleza maligna de la célula en estudio [99].

Los vectores adenovirales muestran una alta transducción de tejidos epiteliales, incluyendo a los tumores derivados de estas células, y una limitada transducción de las células de origen hematopoyético, debida a la limitada expresión de los receptores particulares para este tipo de virus, como el receptor CAR y las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ [46,90].

Una de las modificaciones posibles es la introducción de genes marcadores que expresan proteínas fluorescentes para el rastreo de las células manipuladas. Estos genes se pueden transducir de manera eficiente empleando vectores virales como los adenovirus, de manera que se pueda llevar a cabo la expresión de proteínas fluorescentes en células tumorales transducidas [45].

El uso de promotores tejido-específicos restringe la expresión génica o replicación viral en tejidos específicos. Algunos promotores se activan selectivamente en células tumorales y se constituyen en promotores tumor-específicos, los cuales inducirían la expresión de proteínas fluorescentes de manera selectiva en células de CCR. En este caso, el promotor hTERT es altamente activo en la mayoría de las células tumorales, particularmente de CCR como se mencionó previamente, pero inactivo en células somáticas normales [7]. La actividad de telomerasa en las células mononucleares de sangre periférica es muy baja [91,92]. Previos estudios de terapia génica como el desarrollado por *Takakura y cols.* en 2012 [93] demuestran la utilidad de este promotor, donde detectaron CTC en muestras sanguíneas de pacientes con cáncer ginecológico utilizando un vector adenoviral oncolítico replicativo portador del promotor hTERT y el gen que expresa la proteína verde fluorescente.

En el presente trabajo se construyó un vector adenoviral portador del promotor tejido-específico hTERT y un gen que codifica la expresión de RFP. Con el promotor hTERT, el vector adenoviral es capaz de hacer que las células que poseen altos niveles de telomerasa (células cancerosas) expresen en su citoplasma la RFP de manera selectiva, por lo que mediante microscopía de fluorescencia es posible observar de color rojo a las células cancerosas.

Los múltiplos de infección (MOI) empleados en el trabajo de *Takakura y cols.* fueron bajos por tratarse de un vector adenoviral replicativo. Utilizaron una MOI de 10 y observaron una razón de expresión de GFP que variaba entre líneas celulares, pero al utilizar concentraciones virales más altas (100 MOI en adelante), la mayoría de las células cancerosas expresaron GFP independientemente del tipo de célula. Los datos de efecto citopático no fueron mostrados [93]. Mediante la construcción realizada en este trabajo es posible trabajar con MOI mayores, debido a que el efecto citopático ocasionado por un vector no replicativo es menor.

El uso de las proteínas fluorescentes evita el problema de purificación, etiquetado e introducción de proteínas marcadas dentro de las células, o la tarea de producir anticuerpos específicos de superficie o para antígenos internos [59]. Dichas etiquetas son sintetizadas dentro de las células mismas y no hay necesidad de utilizar agentes exógenos o los procedimientos de fijación y permeabilización rutinarios para inmunofluorescencia [59]. Además, en el caso específico de las RFP, los espectros de excitación y emisión se encuentran en la región roja del espectro, siendo una propiedad atractiva para aplicaciones *in vivo*, debido a la baja autofluorescencia celular en esta región del espectro [60].^{10,11,12} En un experimento realizado por *McGown y cols.* [94], en el cual utilizaron tres líneas celulares transfectadas con diferentes proteínas fluorescentes (una de ellas RFP) y un control sin transfectar, tras un escaneo en el espectro de emisión entre 575 y 600 nm se encontró un pico máximo en el rango 587-588 para las células transfectadas con RFP, mientras que en las células no transfectadas no se encontró fluorescencia alguna. El ruido de fondo fue menor en las longitudes de onda de la RFP debido a que de manera natural no hay autofluorescencia roja en esta línea celular, sin embargo recalcan que el medio DMEM posee una señal significativa de fluorescencia roja. Es raro para las proteínas fluorescentes tener efectos tóxicos en la mayoría de los cultivos celulares, pero siempre se debe tener cuidado y hacer los controles apropiados cuando se exploran nuevas líneas celulares o tejidos [62].

Los resultados muestran que las células HEK293 presentan fluorescencia roja al ser observadas al microscopio después de haber sido infectadas con el vector adenoviral Ad-hTERT-RFP. La línea celular HEK293 es de morfología epitelial, característica que facilita la infección por el adenovirus. La expresión de la RFP en las células HEK293 se debe a que es una línea celular de tipo tumorigénica, es decir, es una línea celular transformada y es considerada positiva para actividad de telomerasa [95].

La disfunción de los telómeros y la activación de la telomerasa son eventos implicados en la progresión de cáncer. Los altos niveles de actividad de

telomerasa (TA) son detectados en aproximadamente 90% de los tipos de cáncer humanos, mientras que la mayoría de las células somáticas no muestran actividad de telomerasa o la expresan solamente a niveles muy bajos de una manera dependiente del ciclo celular [39]. La subunidad catalítica TERT produce la actividad enzimática de la telomerasa. Es el componente limitante de la enzima y por consiguiente de la actividad de la telomerasa humana, además de ser un indicador sensible de su función y actividad. Su expresión juega un papel fundamental en la activación de la telomerasa en cáncer. Numerosos estudios sugieren que la actividad de la telomerasa y la expresión de sus componentes se encuentran regulados a distintos niveles, incluyendo transcripcional y postranscripcional, el nivel de expresión de hTERT se encuentra bajo control transcripcional [39]. Sin embargo, aún se desconoce como hTERT es inactivado durante el desarrollo y cómo es reactivado durante la carcinogénesis. Dado que la mayoría de las células cancerosas exhiben altos niveles de actividad de telomerasa, se cree que ciertos tipos de cáncer con rutas de señalización activadas específicamente juegan un papel crítico en la activación de la telomerasa [39].

A pesar de que la subunidad de RNA (hTERC) presente en el complejo de la telomerasa humana se encuentra constitutivamente expresada tanto en tejidos tumorales como en tejidos somáticos normales, la expresión de la subunidad catalítica hTERT se correlaciona con la actividad de la telomerasa durante la diferenciación celular y la transformación neoplásica. Se ha observado una fuerte correlación entre la expresión de mRNA de hTERT y la actividad de la telomerasa en una variedad de cánceres epiteliales, incluyendo cervical, de mama, colon, ovario y carcinomas renales. Además, la expresión ectópica del gen hTERT en células humanas normales negativas para actividad de telomerasa es suficiente para reconstituir la actividad enzimática y entender el tiempo de vida celular. Por consiguiente, la expresión de hTERT parece representar un paso limitante regulador de la actividad de la telomerasa total [96].

El proto-oncogén c-Myc es un factor de transcripción involucrado en el control de la diferenciación y proliferación celular. Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de c-Myc activa al promotor hTERT e incrementa la transcripción del mRNA de hTERT y la actividad de la telomerasa en líneas celulares normales y tumorales. C-Myc ha establecido una conexión entre la actividad de β -catenina y la regulación de la expresión del gen hTERT. Mientras c-Myc se expresa en todas las células tumorales, se ha demostrado que hTERT se expresa solamente en las células de algunos tumores, mayormente en los casos invasivos de cáncer colorrectal, por lo que refleja el patrón de expresión de β -catenina. Es importante recalcar que c-Myc no se encuentra regulado únicamente por β -catenina, sino también por otras rutas de señalización. *Jaitney y cols.* [5] demostraron que β -catenina regula directamente la expresión del gen hTERT en cáncer colorrectal humano, además de su ya conocido efecto indirecto via c-Myc. Utilizando células madre embrionarias y adultas, así como líneas celulares de cáncer colorrectal, demostraron que el patrón de expresión de hTERT en casos invasivos de cáncer colorrectal se refleja en los patrones de expresión de β -catenina pero no de c-Myc, ya que este último se expresa en todas las células tumorales. Además, la diminuta fracción de células tumorales con presencia de β -catenina en el núcleo muestra generalmente una diferenciación mesenquimal hacia EMT, junto con la expresión de genes indicadores mesenquimales como fibronectina o vimentina, los cuales son también genes blanco de β -catenina [5].

Por otra parte, el efecto citopático en las células HEK293 fue evidente a los 5 o 6 días después de la infección. Esto se debe a que las partículas virales recién replicadas y ensambladas son liberadas mediante lisis celular [97]. Dicha propagación es lenta en comparación con otros virus, ya que existen por ejemplo virus de RNA corto capaces de llevar a cabo la replicación en el citoplasma, lo que confiere una ventaja clara sobre aquellos virus de DNA largo que se replican en el núcleo, como el adenovirus [97]. Un ciclo de vida rápido produce un efecto citopático acelerado en cultivos en monocapa. El ciclo de vida del adenovirus es de aproximadamente 40 horas [97]. El curso de tiempo

para la producción de vectores adenovirales en células HEK293 consiste en una curva sigmoide con una fase lag de 6 h y una fase estacionaria de 36 h.

En resumen, en el presente proyecto se logró generar el vector adenoviral Ad-hTERT-RFP, el cual demostró ser capaz de inducir fluorescencia roja en la línea celular tumorigénica HEK293. Se requieren más experimentos para definir la especificidad y sensibilidad del vector para la captura de CTC y definir la viabilidad de las células transducidas para posteriores análisis de biología molecular tumoral.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

1. La secuencia hTERT-RFP diseñada es funcional.
2. Se construyó un vector adenoviral diseñado para infectar células con altos niveles de telomerasa mediante la transducción con RFP bajo el control del promotor hTERT.
3. La línea celular HEK293 expresó la proteína roja fluorescente al ser transducida con el vector adenoviral Ad-hTERT-RFP.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFIA

1. Allard, W. J., J. Matera, et al. (2004). "Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases." Clin Cancer Res **10**(20): 6897-6904.
2. Sun, Y. F., X. R. Yang, et al. (2011). "Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance." J Cancer Res Clin Oncol **137**(8): 1151-1173.
3. Shay, J. W. and W. E. Wright (2000). "Hayflick, his limit, and cellular ageing." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 72-76.
4. Shay, J. W. and W. E. Wright (2006). "Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions." Nat Rev Drug Discov **5**(7): 577-584.
5. Jaitner, S., J. A. Reiche, et al. (2012). "Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of beta-catenin in human colorectal tumors." Cell Cycle **11**(17): 3331-3338.
6. McMurray, H. R. and D. J. McCance (2003). "Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression." J Virol **77**(18): 9852-9861.
7. Yao, X., Y. Yoshioka, et al. (2007). "TERT promoter-driven adenovirus vector for cancer gene therapy via systemic injection." Biochem Biophys Res Commun **362**(2): 419-424.
8. Park, Y., T. Kitahara, et al. (2011). "Expected clinical applications of circulating tumor cells in breast cancer." World J Clin Oncol **2**(8): 303-310.
9. Dotan, E., S. J. Cohen, et al. (2009). "Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges." Oncologist **14**(11): 1070-1082.
10. Kirton, L. (2010). "Analysis of miRNA and mRNA associated with Epithelial Mesenchymal Transition". Version 1.2: Nov 22, 2010 9:29 am -0600 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>
11. Thiery JP, Acloque H et al (2009) "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5):871–890.
12. Yang J, Weinberg RA (2008) "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." Dev Cell **14**(6):818–829.

13. Ota I, Li XY et al (2009) "Induction of a MT1-MMP and MT2-MMPdependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1." Proc Natl Acad Sci USA **106**(48): 20318–20323.
14. Sabbah M, Emami S et al (2008) "Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers." Drug Resist Updat **11**(4–5):123–151.
15. Ingber DE (2003) Tensegrity I. "Cell structure and hierarchical systems biology." J Cell Sci **116**(Pt 7):1157–1173.
16. Matrone MA, Whipple RA et al (2010) "Microtentacles tip the balance of cytoskeletal forces in circulating tumor cells." Cancer Res **70**(20):7737–7741.
17. Peinado H, Marin F et al (2004) "Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo." J Cell Sci **117**(Pt 13):2827–2839.
18. Shih JY, Tsai MF et al (2005) "Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma." Clin Cancer Res **11**(22):8070–8078.
19. Drake JM, Strohbahn G et al (2009) "ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells." Mol Biol Cell **20**(8):2207–2217.
20. Sun T, Zhao N et al (2010) "Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry." Hepatology **51**(2):545–556.
21. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. Development **132**(14):3151–3161
22. Sayan AE, Griffiths TR et al (2009) "SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer." Proc Natl Acad Sci USA **106**(35): 14884–14889.
23. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S (2006) "Cancer cells escape from failsafe programs in a simple Twist." Bull Cancer **93**(3):251–256.
24. Smit MA, Geiger TR et al (2009) "A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis." Mol Cell Biol **29**(13): 3722–3737.
25. Monteiro J, Fodde R (2010) "Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives." Eur J Cancer **46**(7):1198–1203.

26. Yang AD, Fan F et al (2006) "Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines." Clin Cancer Res **12**(14 Pt 1):4147–4153.
27. Kajiyama H, Shibata K et al (2007) "Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells." Int J Oncol **31**(2):277–283.
28. Kajita M, McClinic KN et al (2004) "Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress." Mol Cell Biol **24**(17):7559–7566
29. Cheng GZ, Chan J et al (2007) "Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel." Cancer Res **67**(5): 1979–1987.
30. Zhao, M., P. G. Schiro, et al. (2013). "An automated high-throughput counting method for screening circulating tumor cells in peripheral blood." Anal Chem **85**(4): 2465-2471.
31. Joosse, S. A. and K. Pantel (2013). "Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells." Cancer Res **73**(1): 8-11.
32. Chambers AF, et al. (2002) "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**:563–72.
33. Kim MY, Oskarsson T, et al. (2009) "Tumor self-seeding by circulating cancer cells." Cell **139**: 1315–26.
34. Taube JH, Herschkowitz JI, et al. (2010) "Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome geneexpression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes." Proc Natl Acad SciUS **107**:15449–54.
35. Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- 36 Logan, C. Y., and Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **20**, 781–810.
37. Clevers, H. (2006) "Wnt/ β -catenin signaling in development and disease." Cell **127**, 469–480
38. Barker, N., and Clevers, H. (2006) Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. Nat. Rev. Drug Discov. **5**, 997–1014

39. Zhang, Y., L. Toh, et al. (2012). "Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in human cancer." *J Biol Chem* **287**(39): 32494-32511.
40. Freddy Radtke & Kenneth Raj. (2003). "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?". *Nature Reviews Cancer* **3**, 756-767.
41. Jaitner, S., J. A. Reiche, et al. (2012). "Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of beta-catenin in human colorectal tumors." *Cell Cycle* **11**(17): 3331-3338.
42. Alemany Ramon. (2009). Chapter 2: Designing Adenoviral Vectors for Tumor-Specific Targeting. *Methods in Molecular Biology, Gene Therapy of Cancer, vol. 542* © Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC.
43. Manuscript, A. *Gene Therapy Protocols*. 1–13 (2008). doi:10.1007/978-1-60327-248-3.
44. Fukazawa, T. *et al.* Development of a Cancer-Targeted Tissue-Specific Promoter System Development of a Cancer-Targeted Tissue-Specific Promoter System. 363–369 (2004).
45. Rojas-Martínez A, et al. "Genetic therapy of cancer." *Rev Invest Clin* **54**:57-67. 2002.
46. Huang S, et al. "Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery." *J Virol* **69**: 2257–2263. 1995.
47. Tissue-specific promoters, <http://www.invivogen.com/tissue-specific-promoter> (revisado el 18 de noviembre de 2013).
48. Alberts, B.; Johnson, A.; et al. (2002). "Molecular Biology of the Cell." Garland Science; New York, NY.
49. Gu, J., Kagawa, S., et al. (2000). "Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers." *Cancer Res.*, **60**: 5359–5364.
50. Gu, J., Zhang, L., et al. (2002) "A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific Bax gene expression and cell killing in vitro and in vivo." *Oncogene*, **21**: 4757–4764.
51. Greider, C. W. (1991). "Chromosome first aid." *Cell*, **67**: 645–647.

52. Kyo, S., Kanaya, T., et al. (1999). "Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues." Int. J. Cancer, **80**: 60–63.
53. Blasco, M. A., Funk, W. D., et al. (1995). "Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA." Science (Wash. DC), **269**: 1267–1270.
54. Ito, H., Kyo, S., et al. (1998). "Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer." Clin. Cancer Res., **4**: 1603–1608.
55. Kanaya, T., Kyo, S., et al. (1998). "hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma." Int. J. Cancer, **78**: 539–543.
56. Wright, W., Tesmer, V. M., et al. (1997). "Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end." Genes Dev., **21**: 2801–2809.
57. Campbell, Robert E. (2008). "Fluorescent proteins". Scholarpedia, 3(7):5410. http://www.scholarpedia.org/article/Fluorescent_proteins (revisado el 18 de noviembre de 2013).
58. Kelmanson, I. V & Matz, M. V. (2003). "Molecular basis and evolutionary origins of color diversity in great star coral *Montastraea cavernosa* (Scleractinia: Faviida)." Mol. Biol. Evol. **20**, 1125–33.
59. Kremers, G.-J., Gilbert, S. G., Piston, D. W. (2011). "Fluorescent proteins at a glance." J. Cell Sci. **124**, 2676–2676.
60. Goulding, A., Shrestha, S., et al. (2008). "Red fluorescent protein variants with incorporated non-natural amino acid analogues." Protein Eng. Des. Sel. **21**, 101–6.
61. Piston, D., Patterson, G., Lippincott, J., et al. "Introduction to Fluorescent Proteins." <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html> (revisado el 18 de noviembre de 2013).
62. Ve, P. I. (2005). PERSPECTIVE: A guide to choosing fluorescent proteins.
63. Matz, M.V., Fradkov, A.F., et al. (1999a) Nat. Biotechnol., **17**, 969–973.
64. Matz, M.V., Shagin, D., Bogdanova, E., et al. (1999b) Nucleic Acids Res., **27**, 1558–1560.
65. Shrestha, S., Deo, S.K. (2006) Anal. Bioanal. Chem., **386**, 515–524.

66. Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y. (2000) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **97**, 11984–11989.
67. Heikal, A.A., Hess, S.T., Baird, G.S., Webb, W.W. (2000) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **97**, 11996–12001.
68. Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Remington, S.J. (2001) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **98**, 462–467.
69. Tubbs, J.L., Tainer, J.A., Getzoff, E.D. (2005) Biochemistry, **44**, 9833–9840.
70. Verkhusha, V.V., Lukyanov, K.A. (2004) Nat. Biotechnol., **22**, 289–296.
71. Pakhomov, A.A., Pletneva, N.V., Balashova, T.A., Martynov, V.I. (2006) Biochemistry, **45**, 7256–7264.
72. Cotlet, M., Hofkens, J., et al. (2001). Proc. Natl Acad. Sci. USA, **98**, 14398–14403.
73. Wall, M.A., Socolich, M., Ranganathan, R. (2000). Nat. Struct. Biol., **7**, 1133–1138.
74. Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., Piston, D. W. (1997). “Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy.” Biophys. J. **73**, 2782-2790.
75. Remington, S. J. (2006). “Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics.” Curr. Opin. Struct. Biol. **16**, 714-721.
76. Ormo, M., Cubitt, A. B., Remington, S. J. et al. (1996). “Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.” Science **273**, 1392-1395.
77. Tsien, R. Y. (1998). “The green fluorescent protein.” Annu. Rev. Biochem. **67**, 509-544.
78. Follenius-Wund, A., Bourotte, M., et al. (2003). “Fluorescent derivatives of the GFP chromophore give a new insight into the GFP fluorescence process.” Biophys. J. **85**, 1839-1850.
79. Heim, R., Prasher, D. C., Tsien, R. Y. (1994). “Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 12501-12504.
80. Davidson, M. W., Campbell, R. E. (2009). “Engineered fluorescent proteins: innovations and applications.” Nat. Methods **6**, 713-717.

81. Day, R. N., Davidson, M. W. (2009). "The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging." Chem. Soc. Rev. **38**, 2887-2921.
82. Shaner, N. C., Patterson, G. H., Davidson, M. W. (2007). "Advances in fluorescent protein technology." J. Cell Sci. **120**, 4247-4260.
83. Cormack, B. P., Valdivia, R. H., Falkow, S. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." Gene **173**, 33-38.
84. Pedelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., et al. (2006). "Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein." Nat. Biotechnol. **24**, 79-88.
85. Griesbeck, O., Baird, G. S., et al. (2001). "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications." J. Biol. Chem. **276**, 29188-29194.
86. Cubitt, A. B., Woollenweber, L. A., et al. (1998). "Understanding structure-function relationships in the aequorea victoria green fluorescent protein." Methods Cell Biol. **58**, 19-30.
87. Kimata, Y., Iwaki, M., Lim, C. R., et al. (1997). "A novel mutation which enhances the fluorescence of green fluorescent protein at high temperatures." Biochem. Biophys. Res. Commun. **232**, 69-73.
88. Cramer, A., Whitehorn, E. A., et al. (1996). "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling." Nat. Biotech. **14**, 315-319.
89. Yang, T. T., Kain, S. R., Kitts, P., et al. (1996). "Dual color microscopic imagery of cells expressing the green fluorescent protein and a red-shifted variant." Gene **173**, 19-23.
90. Mentel, R., et al. (1997). "Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes." J Med Virol **51**, 252-257.
91. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T et al (1996). Telomerase activity in human breast tumors. J Natl Cancer Inst **88**:116–122
92. Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki J et al (1998). Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. Hum Genet **102**:397–402
93. Takakura, M., et al. (2012). "Circulating tumour cells detected by a novel adenovirus-mediated system may be a potent therapeutic marker in gynaecological cancers." Br J Cancer **107**, 448-454.

94. Mcgown, E., *et al.* "Noninvasive measurement of fluorescent proteins in live cells in Molecular Devices microplate." Molecular Devices Corporation, 1311 Orleans Dr., Sunnyvale, CA 94089.
95. Braunstein, I, *et al.* (2001). "Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Regulation in Normal and Malignant Human Ovarian Epithelial Cells." Cancer Res **61**:5529-5536.
96. Sharma, N, *et al.* (2002). "Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria." Nucleic Acids Research, Vol. 40, No. 2, 712–725.
97. Alemany Ramon (2009). Chapter 2: Designing Adenoviral Vectors for Tumor-Specific Targeting. *Methods in Molecular Biology, Gene Therapy of Cancer, vol. 542* © Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC.
98. Sambrook J, Russell DW, editors (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Third Edition ed. New York, USA. 1.31-31.38 p.
99. Lang, J., *et al.* (2012). "Circulating Tumor Cells: Getting More from Less." Sci Transl Med. Vol. **4** no. 141 pp. 141ps13