

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL
RECOMBINANTE CON UN PROMOTOR SINTÉTICO DE
RESPUESTA A CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS**

Por:

M.B. L.B.G. HUMBERTO ANTONIO SALAZAR SESATTY

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

MAYO 2015

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL
RECOMBINANTE CON UN PROMOTOR SINTÉTICO DE
RESPUESTA A CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS**

COMITÉ DE TESIS

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Director Interno

Dr. Augusto Rojas
Director Externo

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr. Ricardo Gómez Flores
Vocal

Dra. Laura María Trejo Ávila
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Manuel Alcocer González Director de mi tesis y al Dr. Augusto Rojas el Asesor externo de mi tesis. Así como al Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, al Dr. Pablo Zapata Benavides, al Dr. Ricardo Gómez Flores y a la Dra. Laura María Trejo Ávila por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL y la Departamento de Inmunología y Virología de la FCB/UANL por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mi familia y esposa por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo en especial al Dr. Iván Marino, a la M.C. Gissela Borrego, al M.C. Alejandro Robles a la Ing. Fátima Alvarado y a la Técnica Cecilia Aguirre de la Unidad de Terapias Experimentales del CIDICS y del Dto. de Bioquímica de la FM/UANL, así como a la Dra. Itza Luna y a la M.C. Cynthia Alvizo, del laboratorio de Inmunología Molecular de la FCB/UANL.

También quiera agradecer el apoyo del Biol. Efraín Montes Villarreal y a mis compañeros que integran la Oficina de Bioseguridad del CIDICS/UANL por el apoyo y facilidades brindadas en el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a quienes aún pertenecen a un sueño pero que me motivan a superarme, así mismo está dedicado a mi esposa, a quien admiro y me permite imaginar un futuro, apoyándome en todo momento para alcanzarlo. Contigo, juntos, cualquier reto es superable y cualquier aventura es maravillosa. Un ciclo que tardó mucho en cerrar, pero que abre al más trascendente...

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
NOMENCLATURA.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
2.1 Terapia Génica.....	2
2.2 Vectores no virales.....	3
2.3 Vectores virales.....	3
2.4 Adenovirus.....	4
2.4.1 Estructura y organización genómica de la partícula adenoviral.....	4
2.4.2 Ventajas y desventajas de los vectores adenovirales para terapia génica.....	8
2.4.3 Aislamiento de la actividad transcripcional de las regiones ITR.....	9
2.5 Efectos biológicos de los CEM.....	10
2.5.1 Efectos de los CEM sobre la expresión génica de las HSP.....	12
2.5.2 Promotor CEM.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos particulares.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
6.1 Células competentes y líneas celulares.....	20
6.2 Plásmidos.....	20

6.3 Estrategia general.....	21
6.4 Diseño del fragmento pA-SMC-pA.....	22
6.5 Preparación de células calcio competentes.....	22
6.6 Clonación de los plásmidos pCEM, y pShuttle pA-CEM-Luc-pA.....	23
6.7 Protocolo de transformación y extracción de ADN plasmídico.....	23
6.8 Digestión del pShuttle pA-SMC-pA y liberación del fragmento CEM-Luc.....	24
6.9 Purificación y ligación de los fragmentos.....	25
6.10 Caracterización del vector pShuttle pA-CEM-Luc-pA.....	27
6.11 Construcción del pAd CEM-Luc.....	28
6.12 Clonación del pAd CEM-Luc en E. coli Top 10 y extracción por Midiprep.....	29
6.13 Liberación del genoma adenoviral.....	30
6.14 Transfección del pAdCEM-Luc en células HEK 293.....	31
6.15 Transducción con las partículas adenovirales en células HEK 293.....	31
6.16 Extracción de ADN viral por método de Hirt.....	32
6.17 Corroboración de adenovector por PCR.....	32
6.18 Ensayos de luminiscencia.....	34
6.19 Medición del efecto de la dosis de Ad CEM-Luc sobre la luminiscencia.....	34
6.20 Medición de la expresión según tiempos pre transducción y exposición a un CM.....	35
6.21 Medición de la luminiscencia a diferentes tiempos de exposición al CM.....	36
RESULTADOS.....	37
7.1 Construcción y caracterización del vector pShuttle pA CEM-Luc.....	37
7.2 Construcción del pAdCEM-Luc por recombinación homóloga.....	40
7.3 Transfección en células HEK 293.....	43
7.4 Transducción de AdCEM-Luc en células HEK 293.....	43
Efecto de la dosis de Ad CEM-Luc sobre la luminiscencia.....	44
7.6 Efecto de tiempos de transducción y exposición al CM.....	45
7.7 Medición de la luminiscencia a diferentes tiempos de exposición al CM.....	46
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	55
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Propiedades de los principales vectores de terapia génica.....	4
II. Reactivos utilizados para la doble digestión <i>XbaI</i>	25
III. Condiciones, controles y volúmenes de los reactivos necesarios para la ligación.....	26
IV. Iniciadores pShuttle comerciales.....	27
V. Reactivos y condiciones para realizar la PCR.....	27
VI. Digestión para digestión del pAdCEM-Luc con <i>PacI</i>	30
VII. Iniciadores quiméricos (Q) 5' y 3'.....	33
VIII. Reactivos y condiciones utilizados para amplificar la región quimérica.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la partícula adenoviral.....	5
2. Organización del genoma adenoviral.....	6
3. Ciclo de replicación adenoviral.....	8
4. Plásmidos base.....	20
5. Estrategia General.....	21
6. Construcción del vector acarreador pShuttle pA-CEM-Luc pA.....	25
7. Sitios de hibridación de los oligos comerciales pShuttle 5' y 3'.....	28
8. Generación del p AdCEM-Luc.....	28
9. Genoma adenoviral recombinante Ad CEM-Luc.....	30
10. Sitios de hibridación de los oligos quiméricos 5' y 3'.....	33
11. Bioensayo para determinar los niveles de luciferasa en las células transducidas.....	36
12. Diseño del fragmento pA-SMC-pA.....	37
13. Digestión doble de pShuttle pA SMC pA y Pcem.....	38
14. Ligación del fragmento CEM-Luc en el vector pShuttle pA CEM-Luc- pA y controles.....	39
15. Amplificación de colonias candidatas con oligos pShuttle comerciales.....	39
16. Corroboración por doble digestión.....	40
17. Retraso en el corrimiento del ADN plasmídico de colonias candidatas.....	41
18. Digestión de las candidatas.....	41

19. Caracterización del ADN plasmídico por doble digestión con las enzimas NheI y XbaI.....	42
20. Amplificación con oligos pShuttle del ADN plasmídico.....	42
21. Generación del adenovector AdCEM-Luc en células HEK 293	43
22. Células HEK293 transducidas con el adenovector AdCEM-Luc.....	43
23. Amplificación de la región quimérica Luc-Ad.....	44
24. Niveles de luminiscencia según la concentración de AdCEM-Luc a diferentes tiempos de transducción.....	45
25. Medición de la luminiscencia a diferentes tiempos de incubación pre transducción y exposición al CM.....	46
26. Niveles de luminiscencia a diferentes tiempos de exposición al CM.....	47

NOMECLATURA

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ad	Adenovirus
ARN	Ácido ribonucleico
AVV	Virus asociados a adenovirus
C°	Centígrados
CAR	Receptor adenoviral de Coxsackie
CEM	Campos electromagnéticos
CM	Campos magnéticos
ECP	Efecto citopático
g, mg, µg	Gramo, miligramo, microgramo
HEK	Riñón humano embrionario
Hz	Hertz
HSP	Proteínas de Choque Térmico
ITR	Repetición terminal invertida
Kp	Kilo pares de bases
L, mL, µL	Litro, mililitro, microlitro
min	Minuto
mQ	miliQ
nm	Nanómetros
pA	Poli adeninas
pb, kpb	Pares de bases, kilopares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pM	Picomoles
REM	Radiación electromagnética
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SMC	Sitio múltiple de clonación
SRE	Elementos de respuesta al suero
UV	Ultra violeta

RESUMEN

Los adenovirus recombinantes actualmente representan la opción más utilizada en terapia génica por su eficiencia de transducción, amplio tropismo celular y gran versatilidad en comparación con otros sistemas de transferencia de genes. De igual forma, el uso de un promotor sintético inducible por campos electromagnéticos (CEM) para la expresión del gen reportero de luciferasa ha sido utilizado como vacuna de ADN en ensayos *in vitro* e *in vivo* con resultados prometedores al momento de evaluar su respuesta ante la exposición a un campo magnético (CM). En el presente trabajo se sintetizó un fragmento poliA *in silico* para flanquear el promotor CEM y su gen reportero, aislándolo de la acción promotora e inhibitoria de las regiones ITR (Inverted Terminal Repeat) del genoma adenoviral. Este casete de expresión se introdujo en un plásmido acarreador que comparte regiones de recombinación homóloga con el plásmido poseedor del genoma adenoviral en el sistema comercial AdEasy. Las partículas adenovirales recombinantes AdCEM-Luc generadas fueron utilizadas para medir los niveles de luminiscencia a diferentes tiempos de transducción y de exposición al CM en células HEK 293. Los resultados obtenidos comprobaron la viabilidad del adenovector AdCEM-Luc para transducir células HEK 293, y además revelaron una correlación directa entre el tiempo de incubación y los niveles de luminiscencia. No obstante, no se encontró diferencia significativa en la luminiscencia obtenida ante la exposición o ausencia del CM, lo cual es atribuible a la permisividad en la expresión génica adenoviral de la línea celular HEK 293.

ABSTRACT

Recombinant adenovirus currently represent the most used option in gene therapy due to their transducing efficiency, large cell tropism and versatility, compared to other gene transfer systems. Likewise, the use of a synthetic promoter inducible by electromagnetic fields (EMF) for the expression of the reporter luciferase gene has been used as a DNA vaccine both in vitro and in vivo trails with promising results when their response to magnetic field (MF) exposure has been evaluated. In this work a polyA fragment was synthesized in silico to flank the EMF promoter and its reporter gene, isolating it from the transcriptional activity of adenoviral genome ITR (Inverted Terminal Repeat) regions. This expression cassette was introduced into a plasmid carrier that shares recombinant homologous regions with the adenoviral genome plasmid carrier in the trading system AdEasy. The generated AdCEM-Luc recombinant adenoviral particles were used to measure the luminescence levels at different transduction times and MF exposure in HEK 293 cells. The obtained results proved the AdCEM-Luc adenovector viability to transduce HEK 293 cells and they also revealed a direct correlation between the incubation time and the luminescence levels. Nonetheless, no significant difference was detected in the luminescence obtained with MF exposure or lack of it, which is attributable to the permissiveness in the gene expression of the adenoviral HEK 293 cell line.

INTRODUCCIÓN

La terapia génica es una modalidad terapéutica que se utiliza en un gran número de ensayos clínicos experimentales que tienen como fin ayudar en el tratamiento de distintas enfermedades que afectan a la salud humana globalmente, como el cáncer, la diabetes, las enfermedades congénitas, entre otras. Su objetivo general es restituir, potenciar o inhibir la función génica endógena que por algún motivo no se lleva a cabo de forma satisfactoria en el paciente. Esto al introducir transgenes terapéuticos en células blanco a través de diferentes tipos de vectores, entre los cuales destacan los adenovirales, por su alta eficiencia para la expresión del transgen, su amplio tropismo celular y la versatilidad para controlar su replicación, entre otras ventajas.

Por otro lado, el estudio de los campos electromagnéticos (CEM) en los sistemas biológicos a nivel celular, ha propiciado su uso como factor para la activación de elementos de expresión génica extrínseca a través de los resultados obtenidos del uso de un promotor de respuesta a CEM para activar el gene reportero de luciferasa en vacunas de ADN desnudo en estudios *in vitro* e *in vivo*, lo cual motiva a generar otros tipos de vectores, como el adenoviral, para hacer uso de las ventajas que presenta para su potencial uso en terapia génica.

En el presente trabajo se construyó un vector adenoviral recombinante con el promotor sintético CEM con la capacidad de expresar luminiscencia en la línea celular HEK293.

ANTECEDENTES

2.1. Terapia Génica

La terapia génica puede definirse como la modalidad terapéutica en la cual el material genético es introducido en la célula para modificar la función de la misma. Sus distintas estrategias se basan en la combinación de tres elementos clave: el material genético a transferir, el método de transferencia y el tipo celular que incorporará dicho material genético (Giannoukakis *et al.* 1999).

La transferencia de material génico puede realizarse empleando métodos diferentes, pero en la mayoría de los casos es necesario la utilización de un vehículo o vector que facilite la introducción de dicho material. Las propiedades del vector ideal pueden variar en función de las necesidades concretas pero en cualquier caso sus propiedades condicionarán enormemente el éxito del proceso de transferencia genética en cualquiera de sus etapas: 1) alcanzar la célula diana, 2) introducir y liberar el material genético en el interior celular y 3) conseguir la expresión del transgen (Mountain 2000).

Los vectores empleados en terapia génica pueden ser clasificados en dos grandes grupos debido a su naturaleza: a) vectores no virales, los cuales se basan en métodos físicos químicos y b) vectores virales que están basados en virus modificados genéticamente.

2.2. Vectores no virales

Los vectores no virales comparten propiedades como su simplicidad y facilidad de preparación, habilidad para transferir moléculas de gran tamaño, escasa inmunogenicidad, baja toxicidad y seguridad. Sin embargo, la eficacia de la transferencia génica alcanzada con los vectores no virales suele ser baja, al igual que su especificidad. Los medios físicos más empleados son los liposomas, la pistola génica, los polímeros catiónicos (policomplejos), complejos ADN-proteína, la electroporación, e incluso el ADN desnudo inyectado. A pesar de la baja eficiencia de la transferencia génica que ofrecen los procedimientos físicos y vectores no virales, éstos han dado buenos resultados en ensayos de vacunación y se están desarrollando nuevos vectores y procesos que auguran un futuro prometedor para estos enfoques (Akhtar 2006).

2.3. Vectores virales

Los métodos virales utilizan virus o sus derivados para la introducción de material genético hacia el interior de la célula; distintos tipos de virus han sido modificados para construir vectores para transferencia y terapia génicas, cada uno de ellos con sus propias propiedades bien determinadas (Tabla 1) (Kay *et al.* 2001).

El número de vectores virales disponibles es amplio y la elección del mismo dependerá del objetivo del procedimiento. Los retrovirus son vectores eficaces para la transferencia génica *ex vivo* y la expresión más prolongada del transgen. Si lo que se pretende es modificar células madre hematopoyéticas o leucocitos, la elección más acertada serán los lentivirus. En caso de un enfoque *in vivo* buscando la expresión prolongada del transgen, es preferible los virus asociados a adenovirus (AVV) o a esqueletos de adenovirus, dependiendo del tamaño del mismo. Los adenovirus de

primera generación son el vector viral más apropiado para protocolos de terapia génica del cáncer, donde se requieren altos niveles de expresión del transgen deseado y no se necesita la expresión prolongada del mismo (Giannoukakis *et al.* 1999, Hunt *et al.* 2002).

Tabla I.

Propiedades de los principales vectores de terapia génica.

Propiedades	Vectores				
	No virales	Retrovirus	Lentivirus	AVV*	Adenovirus
Tropismo celular	Amplio	Células en división	Amplio	Amplio	Amplio
Construcción/producción	Fácil	Moderada	Difícil	Difícil	Moderada
Títulos de producción	Muy altos	Bajos (10^5 - 10^7)	Bajos (10^2 - 10^{10})	Bajos (10^9 - 10^{13})	Bajos (10^{11} - 10^{14})
Duración de la expresión	<7-14 días	>7-14 días (integración)	>7-14 días (integración)	>7-14 días (integración)	7-14 días
Inmunogenicidad	Nula/muy baja	Baja	Baja	Baja	Muy alta
Seguridad	Muy alta	Baja	Baja	Baja	Alta

* Virus Asociados a Adenovirus (Kay *et al.* 2001).

2.4. Adenovirus

Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia *Adenoviridae*. Se conocen casi 50 serotipos distintos de adenovirus humanos divididos en 6 subgrupos (A-F) en función de sus características inmunológicas, biológicas y secuencias genómicas. Los Ad humanos mejor caracterizados y más utilizados en terapia génica son los Ad tipo 2 y tipo 5, ambos pertenecientes al subgrupo C (Chroboczek *et al.* 1992).

2.4.1. Estructura y Organización Genómica de la Partícula Adenoviral

Los adenovirus son virus de ADN cuyo genoma está encerrado en una cubierta proteica de geometría icosaédrica, denominada cápside, de 70-100 nm de diámetro y los cuales no tienen envoltura. La cápside está formada por tres proteínas principales:

el hexón, la base pentona y la fibra con una protuberancia terminal, además de otras proteínas menores (VI, VII, IX, IIIa e IVa2) (Figura 1). El núcleo del virion contiene cuatro proteínas básicas ricas en arginina y dos copias del genoma viral en forma de ADN codificante. Los polipéptidos V (368 aa), VII (174 aa) y la proteína μ (19 aa), son las tres proteínas que tienen contacto con el ADN. No se conoce la función de la proteína μ , pero el polipéptido VII es el mayor constituyente del núcleo y realiza una función análoga a la de las histonas, apareciendo como eje central alrededor del cual se enrolla el ADN. El polipéptido V se une a la base del pentón y funciona como punto de anclaje entre el núcleo y la cápside. La cuarta proteína, que es conocida como proteína terminal (PT), se encuentra al final del genoma y sirve como primer copia para la replicación.

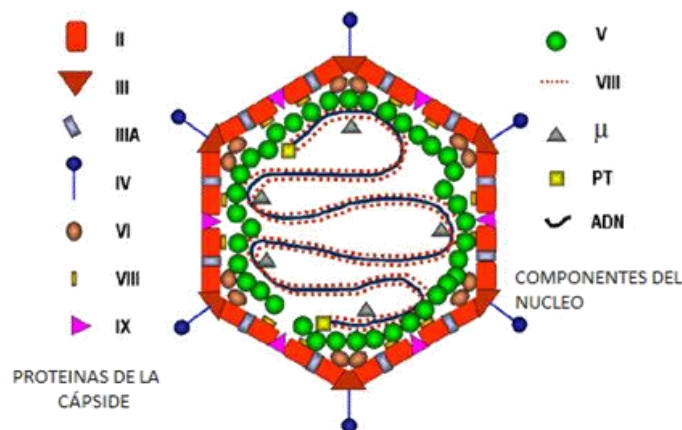


Figura 1. Estructura de la partícula adenoviral. Una sección estilizada de una partícula de adenovirus en base a los conocimientos actuales de su ADN y sus componentes polipeptídicos (Fields 1996).

El genoma viral es una molécula lineal de ADN de doble hebra de unas 36 Kb y tiene dos secuencias de repeticiones terminales invertidas de 100 a 140 pb. Las secuencias de repeticiones terminales invertidas ubicadas en sus extremos le confieren la capacidad para circularizarse durante la replicación.

Además, contiene secuencias en *cis* que son reconocidas por proteínas de empaquetamiento y que están localizadas a cientos de pares de bases del extremo terminal de la secuencia genómica. El cromosoma viral está constituido por:

- a) Cinco unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4).
- b) Dos unidades de transcripción tempranas retardadas (IX e IVA2)
- c) Una unidad de transcripción tardía o tardía principal, la cual es procesada para regenerar.
- d) Cinco familias de ARNs tardíos (L1 a L5). Estos ARNs son procesados principalmente por la ARN polimerasa III.
- e) También contiene uno o dos genes VA-RNA que codifican para ARNs asociados a virus y que son transcritos por la ARN polimerasa III.

Las secuencias de transcripción de genes en la cadena 5' a 3' inicia con el gen E1A, continua con E1B, IX y luego por la cadena derecha con la unidad ML tardío principal, seguida de los genes VA-RNA y para la cadena izquierda (3' a 5') con E4, E2, e IVA2 (Figura 2).

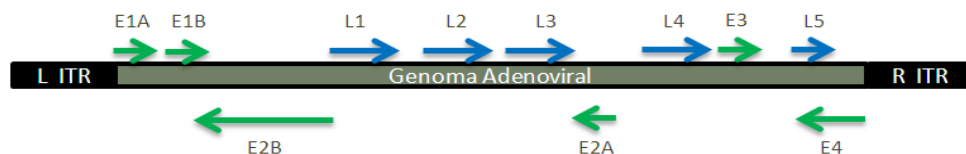


Figura 2. Organización del genoma adenoviral. Por medio de flechas se representa la dirección en la transcripción de genes 5'-3' y viceversa. Los genes en cajas pueden ser eliminados para la producción de virus con replicación defectuosa para los protocolos de terapia génica; ej. E1A debe ser removido para evitar la replicación del virus recombinante mientras que otros genes pueden ser eliminados para dejar más espacio para la inserción de los transgenes más grandes. Se ha reportado que la delección de E4 reduce significativamente la inmunogenicidad (Medicine).

Para que las partículas del adenovirus penetren en la célula es necesaria la presencia de un receptor en la membrana celular, siendo el más conocido y mejor caracterizado la proteína CAR (Coxsackie B virus and Adenovirus Receptor). Ésta se expresa a niveles variables en diferentes estadios del desarrollo y es la principal responsable de

la susceptibilidad a la infección por adenovirus; aunque también es importante la presencia de las llamadas integrinas.

Las integrinas son proteínas que facilitan la entrada de la partícula viral por un mecanismo de endocitosis mediado por el receptor, gracias a su interacción con las proteínas del virus referidas como pentón. De las integrinas, las mejor caracterizadas son $\alpha\upsilon\beta\varsigma$ y $\alpha\upsilon\beta\beta$. Los diferentes serotipos pueden utilizar diferentes receptores o integrinas. El adenovirus entra a la célula por endocitosis, accionada por la interacción pentón-integrina y escapa del endosoma antes de que éste se forme. El virión es transportado al núcleo a través de la red de microtúbulos. Durante este tiempo se va desensamblando y la proteína hexón se mantiene en el membrana nuclear mientras que el ADN es liberado dentro del núcleo y se mantiene de forma episomal (Contreras *et al.* 2004) (Figura 3).

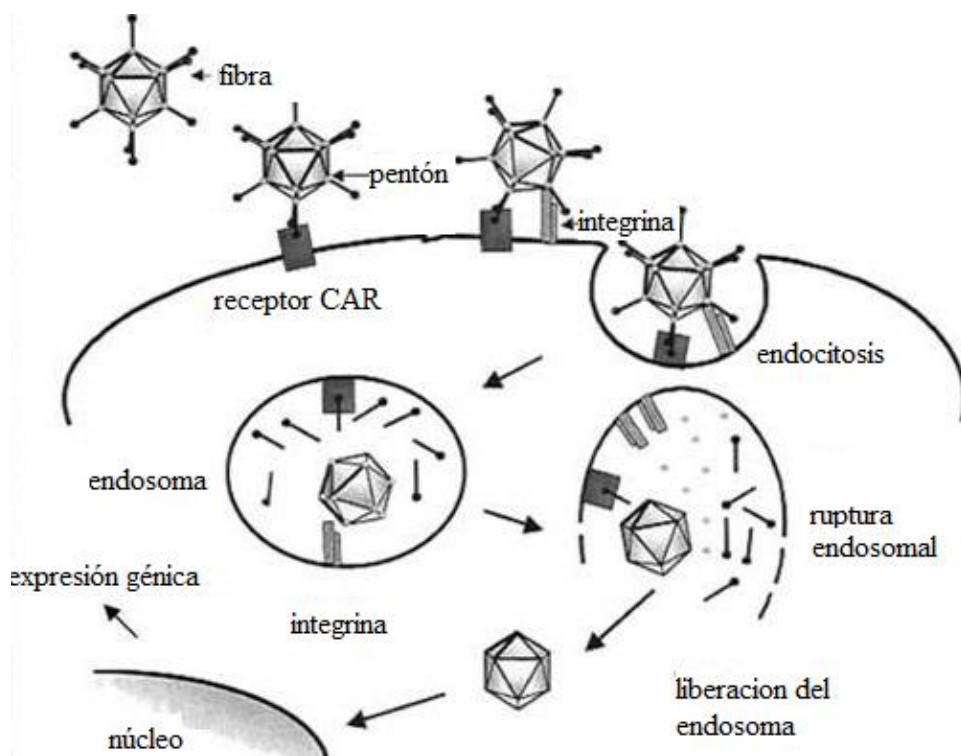


Figura 3. Ciclo de replicación adenoviral. Comienza con la unión de la proteína viral (fibra) al receptor CAR y la unión del pentón a una integrina celular. El virus entra a la célula por endocitosis mediada por receptor, escapa del endosoma y se interna en el núcleo. La expresión viral empieza con genes tempranos que comienzan la fase celular S, bloquean la apoptosis y el transporte de ARN del huésped, inhiben los mecanismos de reparación del ADN y comienzan la replicación viral. Después escapa, los genes tardíos son expresados produciendo proteínas de la cápside, el embalaje viral y la muerte celular.

Cuando el virus llega al núcleo celular, el grupo EI es el primero en expresarse y contiene las unidades de transcripción temprana E1A y E1B, las cuales codifican proteínas virales que inactivan a proteínas de las células huéspedes involucradas en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, tales como Rb y p53, lo cual induce a la célula a entrar a mitosis, se bloquea la apoptosis y se inicia el proceso de replicación del virus asegurando su perpetuidad (Boulanger *et al.* 1991). La región E3 codifica proteínas que permiten al virus evadir la respuesta inmune (Dimitrov *et al.* 1997).

2.4.2. Ventajas y Desventajas de los Vectores Adenovirales para Terapia Génica

El uso de vectores adenovirales ha presentado un crecimiento importante en los últimos años, debido a las múltiples ventajas que presentan comparados con otros sistemas de transferencia de genes y que se basan principalmente en las siguientes características:

- a) Un amplio tropismo celular que lleva a que casi todas las estirpes celulares puedan ser infectadas por este virus excepto las células hematopoyéticas.
- b) Capacidad infectiva en células quiescentes o en cualquier fase del ciclo celular
- c) Versatilidad para ser inducidos como replicativos o no replicativos.
- d) El tamaño del transgen puede ser de hasta 10 kb.
- e) Nula o baja frecuencia de recombinación en el genoma del huésped.
- f) Situación episomal del genoma.
- g) Expresión transitoria del gen de interés hasta por 60 días.
- h) Relativa facilidad de producción y titulación en el laboratorio.

El principal inconveniente para la utilización de adenovirus como vehículos para el envío de genes a órganos o tejidos específicos, es la vigorosa respuesta inmunológica

que despiertan, caracterizada por una intensa reacción inflamatoria, así como por activación de linfocitos T citotóxicos (Smith *et al.* 1998, Thomas *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2008). Las bases moleculares de esta respuesta inmune es en gran medida producto de las interacciones de un dominio del virus el cual forma un complejo de alta afinidad con las proteínas receptoras de las células hospederas, llamadas CAR por sus siglas en inglés. La eficiencia de transducción es altamente dependiente de los niveles de expresión de las CAR en la superficie de las células blanco (Bergelson *et al.* 1997, Leopold *et al.* 2007). Bajos niveles expresión de CAR resultan en concentraciones bajas de adenovirus en la superficie celular, lo cual disminuye su eficiencia de transducción. Al ser los CAR la principal ruta conocida de acceso para las células, son un factor que a su vez limita la versatilidad de los vectores adenovirales como vectores terapéuticos ya que solo transducen aquellos linajes que expresan CAR en su superficie (Fields 1996). Otro punto negativo es la necesidad de administrar inyecciones locales de manera constante durante el tratamiento. Como resultado se provoca de manera indirecta inflamación producida por la respuesta innata y adaptativa del sistema inmune del hospedero.

Por lo anterior existe una necesidad real para la búsqueda de métodos alternativos que disminuyan el tiempo de la infección e incrementen la versatilidad de los vectores adenovirales (Bhattarai *et al.* 2008).

2.4.3. Aislamiento de la Actividad Transcripcional de Regiones ITR

Como se describió anteriormente, las regiones ITR flanquean ambos lados del genoma adenoviral como una característica común en su composición genómica. Sin embargo juegan un papel importante en la expresión del ADN de adenovirus ya que poseen actividad transcripcional dentro de las secuencias ubicadas en los segmentos 1-103 pb, 1-190 y 1-342 (Yamamoto *et al.* 2003), así mismo en regiones río abajo de

la región de empaquetamiento/potenciador (pb 194-458) de las regiones ITR (Hearing *et al.* 1987, Shi *et al.* 1997, Rubinchik *et al.* 2001).

Esta característica es importante porque la actividad transcripcional derivada de los extremos del genoma del adenovirus puede influir en el rendimiento de un transgen insertado en el genoma del adenovector, aún bajo de promotores específicos de tejido altamente eficientes, los cuales muestran una actividad transcripcional alterada (Babiss *et al.* 1986, Hatfield *et al.* 1991, Imler *et al.* 1996, Shi *et al.* 1997)

Además, en el caso poco frecuente de la integración del genoma del vector en el ADN cromosómico del huésped; una región ITR transcripcionalmente activa puede forzar o reprimir la expresión de genes cercanos, incluso oncogenes (Harui *et al.* 1999, Stephen *et al.* 2008).

Rauschhuber y colaboradores en el 2011, investigaron si las regiones ITR del espectro completo de los subgrupos de los adenovirus mostraban actividad transcripcional, encontrando que las regiones ITR de los subgrupos A, C y F mostraban una actividad transcripcional robusta. Así mismo observaron que la mayoría de las regiones ITR colocadas río arriba de un promotor activo ubicuo reducía drásticamente la expresión del gen reportero, sugiriendo que estas regiones pueden reprimir la transcripción (Rauschhuber *et al.* 2011).

2.5. Efectos Biológicos de los CEM

La respuesta de un sistema biológico a un campo electromagnético depende de las propiedades intrínsecas del sistema, de las características del campo externo incidente (especialmente de su potencia radiante y su frecuencia) y del medio en el cual se produce el fenómeno (Lin *et al.* 1994). Los animales son complejos electroquímicos muy sensibles, que se comunican con su medio a través de impulsos eléctricos. En

ellos existen corrientes iónicas y diferencias de potencial eléctrico a través de las membranas celulares y de los fluidos corporales, tanto intra como extracelularmente (Heredia-Rojas 2003). Se sabe que los tiburones y rayas poseen mecanismos basados en la inducción electromagnética para orientarse y localizar a sus presas y que la intensidad del campo magnético puede ser un factor limitante en la capacidad de respuesta del sujeto. También se ha propuesto que las aves migratorias poseen un mecanismo de orientación para la navegación basado en la generación de potenciales eléctricos inducidos electromagnéticamente. Igualmente, se ha encontrado que algunos microorganismos, particularmente bacterias, tienen la propiedad de orientar su movimiento en respuesta a un campo magnético externo (magnetotaxismo), estas bacterias contienen una o dos cadenas intracelulares ricas en partículas de hierro (Lin *et al.* 1994).

Por otro lado una variedad de organismos muestran una clara magnetosensibilidad a la orientación en el campo magnético de la tierra. Entre estas se encuentran las magnetobacterias (*Aquaspirillum magnetotacticum*), los paramecios (*Paramecium sp*), las planarias (*Dugesia sp*), los caracoles, las abejas (*Apis mellifera*), las salamandras (*Eurycea lucifuga*), los tritones (*Notophthalmus viridescens*), los salmones (*Oncorhynchus nerka*) y aún el hombre (*Homo sapiens*). Consecuentemente, la magnetosensibilidad está ampliamente distribuida en el reino animal (Azanza *et al.* 1994).

Los CEM generados en las estructuras biológicas están caracterizados por determinadas frecuencias específicas, que pueden verse interferidas por la radiación electromagnética incidente, provocando una inducción y modificando su respuesta (Smith *et al.* 1989, Hyland 2000).

En el campo de investigación del bioelectromagnetismo, los experimentos se realizan con animales o tejidos vivos, que se someten a las radiaciones emitidas por

fuentes de radiación de microondas durante un cierto tiempo, tomando nota de los posibles efectos. Existen trabajos que reportan no haber encontrado efectos observables en los seres vivos, pero otros muchos estudios alertan del peligro de este tipo de radiación, ya que puede interferir con el sistema nervioso y alterar numerosos procesos biológicos (Hong 1995, Zhadin 2001). Existen estudios que muestran cómo los animales expuestos padecen un deterioro de su salud en la vecindad de las antenas emisoras y algunos de los efectos no térmicos de las microondas sobre las aves se conocen desde hace más de 35 años (Tanner 1966).

A nivel intracelular, en la literatura científica un gran número de trabajos prueban el efecto de los campos magnéticos sobre reacciones enzimáticas *in vivo* dando efectos cualitativos y cuantitativos diferentes, dependiendo de la reacción que se trate y de las características del campo. Se ha documentado que provocan efectos en las biomoléculas (Weisbrot *et al.* 2003, Barteri *et al.* 2005), en la proliferación celular (Velizarov *et al.* 1999), en los procesos inmunitarios (Novoselova *et al.* 1998), en la capacidad reproductiva (Dasdag *et al.* 1999), efectos genotóxicos (Garaj-Vrhovac 1991, Lai *et al.* 1995, Balode 1996), actúan sobre el sistema nervioso (Kolodynski *et al.* 1996, Beason *et al.* 2002, Kramarenko *et al.* 2003, Marino *et al.* 2003, Salford *et al.* 2003), sobre el sistema circulatorio (Szmigielski *et al.* 1998) y sobre un descenso en el número de nacimientos (Magras *et al.* 1997, Balmori 2003). Además son interesantes los estudios que muestran la modulación del flujo del calcio y otros iones a través de las membranas (Papatheofanis 1990, Walleczek 1992, Leone *et al.* 2014).

2.5.1. Efectos de los CEM Sobre la Expresión Génica de las HSP

A pesar de que en la actualidad es tema de debate (Robertson *et al.* 2007), se ha reportado que los CEM de extremada baja frecuencia tienen efectos sobre procesos

bioquímicos importantes en el humano, como la síntesis del ADN, ARN y proteínas, cambios en la producción de hormonas, modificación de la respuesta inmune celular y cambios en el grado de crecimiento y diferenciación celular (Blank *et al.* 2009). A la fecha la mayoría de los trabajos se enfocan en identificar marcadores sensibles de estrés inducido por CEM (Robertson *et al.* 2007).

Las proteínas de estrés también conocidas como proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) son un grupo de proteínas conocidas ampliamente por proteger a otras proteínas y citoesqueleto del daño producido por las emisiones electromagnéticas (Tokalov *et al.* 2004). Esto se observó en estudios en los cuales se expusieron moscas de la fruta *Drosophila melanogaster* a la radiación electromagnética (REM) de un teléfono móvil, obteniéndose una elevación de los niveles de las proteínas del estrés (HSP 70), así como un incremento en de la fosforilación del factor de transcripción nuclear ELK-1 y elementos de respuesta al suero (SRE) (Weisbrot *et al.* 2003).

Las HSP son una familia de proteínas chaperonas que se encuentran en todos los linajes celulares, son altamente conservadas y de abundante expresión debido a que realizan un gran número de funciones; en respuesta al frío, calor y otros cambios ambientales, de manera constitutiva. Las HSP incrementan la tolerancia al calor y llevan a cabo funciones esenciales para la sobrevivencia de la célula bajo condiciones de estrés al estabilizar proteínas en configuraciones anormales y jugar un rol en el plegamiento y desdoblamiento de las proteínas. Así mismo también participan como inmunógenos en muchas infecciones y enfermedades (Morimoto 1998).

La transcripción inducida por estrés de la HSP requiere la activación de factores de choque térmico (Lis *et al.* 1993, Morimoto 1993), que se unen con el promotor y

activan su actividad transcripcional. Debido a que estos factores pueden ser inducidos por una gran variedad de factores de estrés, las HSP son propuestos como biomarcadores de respuesta a la exposición a campos magnéticos (McNamee *et al.* 2009). La síntesis de estas proteínas de respuesta a estrés es un mecanismo de protección celular inducido por una variedad de estímulos adaptativos, por lo que la inducción de estas proteínas ante los campos magnéticos implica que son percibidos por los sistemas biológicos como un potencial peligro (Latchman 2001).

Diferentes estudios han mostrado que los CEM pueden elevar la expresión y actividad de las proteínas HSP 70 en cultivos celulares, demostrando un incremento significativo en la expresión de factor de choque térmico (HSF), el factor de transcripción que regula HSP 70 en células HL-60 y un incremento de HSP 70 en sí, siguiendo una exposición de 8 uT, 60 Hz (Lin *et al.* 1997, Lin *et al.* 1998, Tokalov *et al.* 2004). Este incremento también se observó en células HTB124 (Han *et al.* 1998) y células murinas H9c2 (Carmody *et al.* 2000). Sin embargo, existe una falta de replicación de los resultados por otros grupos de investigación (Balcer-Kubiczek *et al.* 2000, Morehouse *et al.* 2000, Shi *et al.* 2003). Aún así, en modelos animales se han observado efectos positivos más abundantemente; Junkerdorf y colaboradores en el 2000 encontraron un incremento en la expresión del gen reportero β Gal bajo el control del promotor HSP 70 de la mosca de la fruta en *C. elegans* (Junkersdorf *et al.* 2000). Así mismo, en estudios posteriores en embriones de pollos expuestos a luz UV, se observó una protección contra hipoxia conferida por una pre exposición al CEM, donde la HSP70 actuó como un agente protector potencial (Di Carlo *et al.* 2000, Di Carlo *et al.* 2002).

A pesar de que el mecanismo de interacción entre los CEM y los sistemas biológicos aún no está elucidada, el estudio de la inducción de la expresión de los genes de estrés

HSP70 por la exposición a campos magnéticos puede proveer claridad en cómo los CEM interactúan con las células y los tejidos, así mismo ofrece un modelo para el estudio y comparación de respuesta a estrés inducido por los CEM. Aun así, diferentes estudios muestran que los CEM interactúan a través del flujo de carga en el transporte de electrones con los electrones del ADN para estimular la biosíntesis, y también se ha propuesto que los CEM pueden detonar la transducción de señales de la membrana al núcleo a través de cascadas enzimáticas causando cambios en el ADN (Goodman *et al.* 2002).

2.5.2. Promotor CEM

En 1999 Lin y colaboradores identificaron secuencias en el promotor de HSP70 sensibles al estrés generado por campos magnéticos en un rango de 50-60 Hz con una densidad de flujo de microTesla a miliTesla (Lin *et al.* 1999). En su tesis doctoral Rodríguez de la Fuente en el 2006 construyó y evaluó el plásmido pCEM, el cual está constituido por un promotor mejorado y potenciado para responder a CEM, expresando luciferasa como gen reportero (Rodríguez de la Fuente 2006). Heredia y colaboradores en el 2010 utilizaron esta construcción para evaluar su efecto sobre las líneas celulares INER37, BMK16 y HeLa, detectando un aumento significativo en los niveles de expresión de luciferasa al exponer a los tratamientos con CEM en comparación con los controles negativos (Heredia-Rojas *et al.* 2010). En el 2012 este mismo grupo replicó estos experimentos *in vivo* en el modelo murino Balb/c y detectaron el mismo efecto del CEM sobre la luminiscencia (Rodríguez-De la Fuente *et al.* 2012). Con perspectiva de la aplicación del pCEM en terapia génica, Alvizo y colaboradores en el 2014 realizaron ensayos *in vitro* en células B16F10 e *in vivo* con ratones Balb/c al formar nanocomplejos integrados por el pCEM, quítosan y nanopartículas como un sistema de distribución selectivo de plásmidos dirigido a los

pulmones, encontrando valores de expresión superiores en los nanocomplejos expuestos al CEM en comparación con los controles (Alvizo Báez C.A. 2014).

JUSTIFICACIÓN

La versatilidad, eficiencia y altos niveles de transducción de los vectores adenovirales como potenciales agentes terapéuticos así como la capacidad del promotor sintético de respuesta a CEM para la activación de la expresión génica, promueven el diseño, construcción y evaluación de un vector adenoviral recombinante que posea el promotor de respuesta a CEM para posteriores estudios preclínicos en cultivo y modelos animales.

HIPÓTESIS

"El adenovector recombinante AdCEM-Luc es viable, transducible y contiene el promotor de respuesta a campos electromagnéticos y el gen marcador de luciferasa"

OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Construir un vector adenoviral recombinante que contenga el promotor de campo magnético sintético viable, con capacidad de transducir y expresar luciferasa como gene reportero en la línea celular HEK 293.

5.2. Objetivos Particulares

- 1.- Diseño *in silico* y síntesis del fragmento aislante pA-SMC-pA
- 2.- Construcción y caracterización del vector acarreador pShuttle pA-CEM-Luc
- 3.- Generación y caracterización del genoma adenoviral AdCEM-Luc.
- 4.- Generación del vector adenoviral AdCEM-Luc en células HEK 293.
- 5.- Transducción del vector adenoviral AdCEM-Luc en células HEK 293.
- 6.- Determinación de los niveles de luminiscencia de las transducciones a diferentes tiempos de exposición al CM en células HEK 293.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Células Competentes y Líneas Celulares

Se emplearon las bacterias *Escherichia coli* BJ5183 hiperecombinantes (Stratagene, La Jolla, CA), las cepas calcio (New England BioLabs, Ipswich) y Top 10 One Shot TOP10 (Thermo Fisher Scientific Inc, MA) y la línea celular HEK293 (ATCC riñón embrionario humano).

6.2. Plásmidos

En este trabajo se utilizó el plásmido pCEM que contiene el promotor de respuesta a campo electromagnético y el gen reportero luciferasa, el vector acarreador pShuttle y el vector adenoviral comercial pAdEasy-1 (Stratagene) (Figura 4).

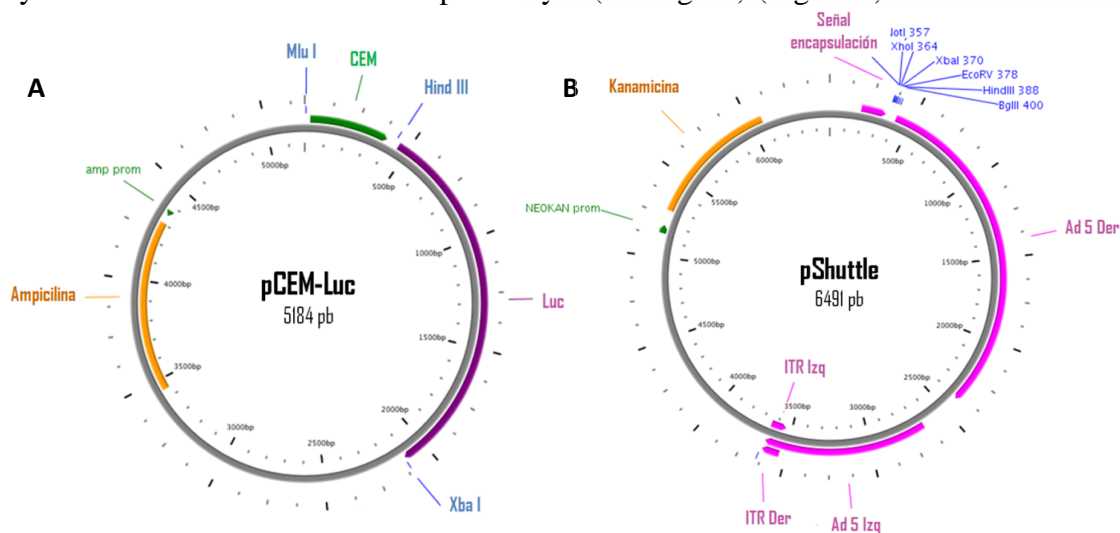


Figura 4. Plásmidos base. A) Mapa del pCEM-Luc. Se muestra la ubicación del promotor sintético de respuesta a CEM, del gen reportero codificante para luciferasa y de la ubicación del gen de resistencia a ampicilina, así como los sitios de corte *Mlu*I y *Xba*I para liberar el fragmento CEM-Luc. B) Mapa del plásmido Shuttle. Se muestra la ubicación de los brazos derecho e izquierdo para la recombinación, la regiones ITR, el SMC, y el gen de resistencia a kanamicina (Addgene, Rodríguez de la Fuente 2006).

6.3. Estrategia General

La generación del vector adenoviral recombinante AdCEM-Luc fue realizada en las siguientes etapas: 1) Diseño el fragmento aislante pA-SMC-pA, 2) Formación del pShuttle pA-CEM-Luc-pA, 3) Construcción del pAdCEM-Luc por recombinación homóloga, 4) Generación de partículas adenovirales por la transfección de células HEK 293, 5) Producción del adenovector AdCEM-Luc por transducción de células HEK 293, 6) Bioensayos de expresión de luminiscencia y 7) análisis de los resultados (Figura 5).

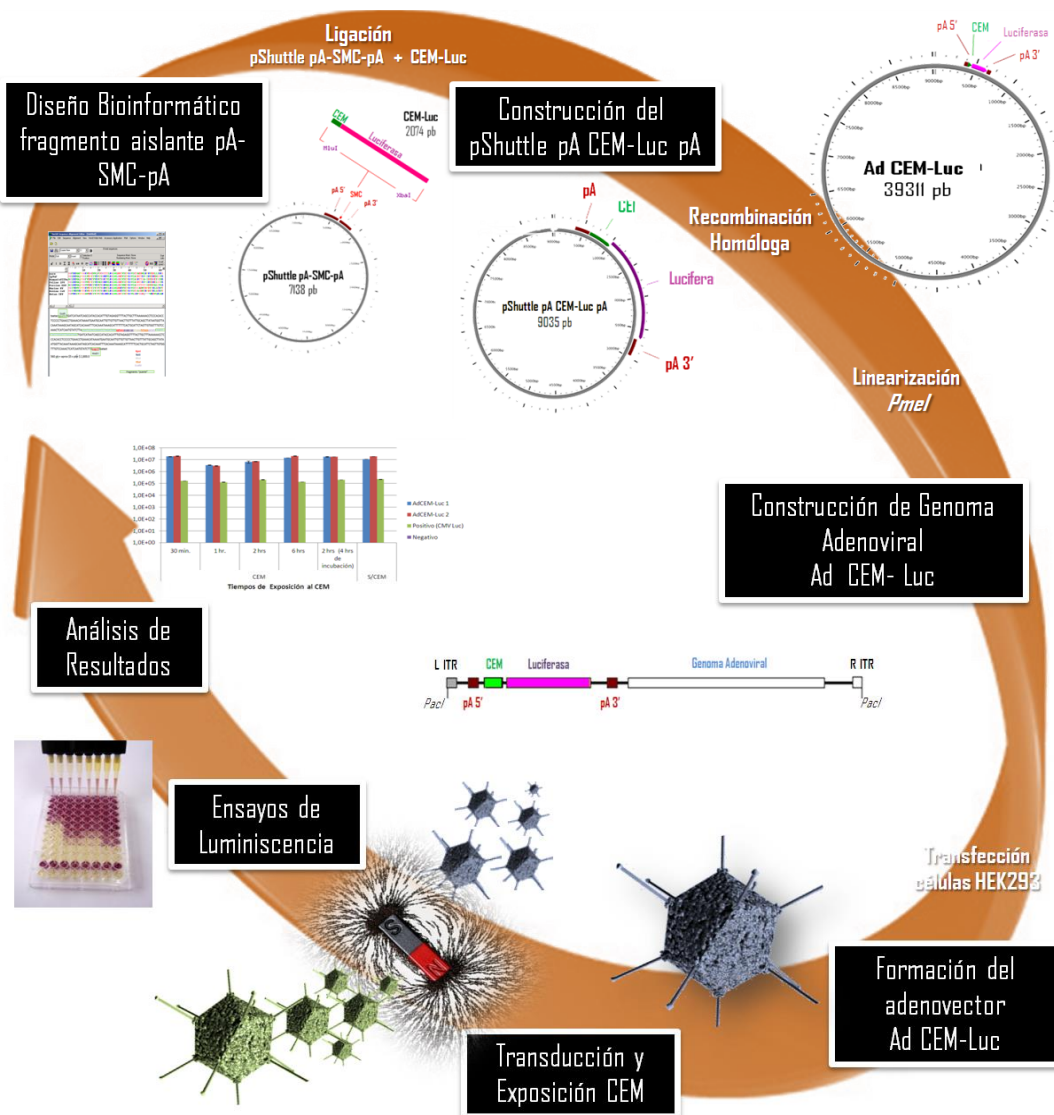


Figura 5. Estrategia General. Esquema de la estrategia general. Se muestran los pasos que se siguieron para el diseño y construcción del AdCEM-Luc.

6.4. Diseño del Fragmento pA-SMC-pA

Las secuencias para el diseño del fragmento, tanto del pShuttle, como de la secuencia poliA terminadora de la expresión, se obtuvieron de la página web Addgene (plásmidos 16402 y 16403) (Addgene, Benjie Chen 2004) haciendo uso del programa en línea NebCutter (New England BioLabs, Ipswich, RU) (Biolabs). Las enzimas de restricción seleccionadas para el sitio múltiple de clonación (SMC) fueron MluI, NheI, XhoI, SpeI, FseI y XbaI (New England BioLabs), comprobando que no tuvieran cortes indeseados tanto en pShuttle como en el pAdEasy.

Una vez realizado el análisis bioinformático se sintetizó el fragmento pA-SMC-pA dentro del SMC del pShuttle para obtener el pShuttle pA-SMC-pA en la empresa Genescript (New Jersey, EUA). El pShuttle es el plásmido acarreador utilizado en el sistema de producción adenoviral comercial AdEasy (Invitrogen, Carisbad, CA EUA).

6.5. Preparación de Células Calcio-Competentes

A partir de un cultivo en placa con LB (1g. de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 g. de NaCl y 1.5 g de agarosa por cada 100 mL de agua destilada) que ha sido incubada por 16-20 h a 37°C, se tomó una colonia bacteriana (2-3 mm de diámetro). Se inoculó la colonia en 100 mL de LB líquido, incubándola por 3 h a 37°C con agitación vigorosa, monitoreando el crecimiento del cultivo. Se transfirieron las células bacterianas a un tubo de 50 mL estéril, desechable y frío. Después se enfrió el cultivo a 4°C almacenando el tubo en hielo por 10 min. Se recuperaron las células por centrifugación a 4,100 rpm por 10 min a 4 °C, decantando el medio para resuspender el precipitado en 30 mL de solución fría de MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂, 20 CaCl₂ mM). Se recuperaron las células por centrifugación a 4,100 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente se decantó el medio del precipitado. Por último, se resuspendió cada

precipitado por agitación o con vórtex gentilmente en 2 mL de solución fría de 0.1M CaCl₂ por cada 50 mL del cultivo original. Se prepararon alícuotas de 250 µL en tubos de 2 mL y se utilizaron estas células directamente para su transformación con los plásmidos de interés.

6.6. Clonación de los Plásmidos pCEM, y pShuttle pA-CEM-Luc-pA

Para obtener el material nucleotídico necesario para la posterior ligación del fragmento del promotor CEM y su gen reportero provenientes del pCEM y el plásmido acarreador con la señal de poliadenilación sintetizada, se realizó la transformación bacteriana (*E. coli* Top 10) de los plásmidos de la siguiente forma.

6.7. Protocolo de Transformación y Extracción de ADN Plasmídico

Se utilizaron 50 µL de células calcio competentes por cada transformación en un tubo de 1.5 mL. Una vez obtenidas las células se pipetearon 2 µL de los vectores directamente en el vial de células calciocompetentes y se agitaron gentilmente. Posteriormente se incubaron los viales en hielo por 30 min, agitando cada preparación cada 5 min para que las células y los plásmidos estuvieran constantemente en suspensión.

Una vez transcurrido el tiempo, las células se sometieron a un choque térmico por 30 segundos a 42°C sin agitación. Inmediatamente se transfirió el vial a hielo. Después se añadieron 250 µL de medio LB a cada vial y se agitaron de manera horizontal a 37°C por 1 h a 250 rpm en un agitador. Posteriormente se inocularon 100 µL de cada vial de transformación en placas de agar LB que contengan 1 µg/mL de ampicilina para el pCEM y 1 µg/mL de kanamicina para el pShuttle pA-SMC-Pa

Así mismo se realizó la extracción de ADN plasmídico por miniprep de la siguiente forma: Las bacterias portadoras de los plásmidos de interés fueron incubadas en 100 mL de medio LB con los respectivos antibióticos durante 8 h a 37°C con agitación a 100 r.p.m. Después de este tiempo se empastillaron las células por centrifugación durante 5 min a 12,000 rpm cada pastilla se resuspendió en 200 µL de solución I de lisis (Glucosa, Tris-HCl 25 mM pH: 8, EDTA 10 mM y lisozima a 4 µg/mL) y posteriormente se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Enseguida, se transfirieron a tubos de 2 ml y se le agregaron 400 µL de solución II alcalina (NaOH 0.2 N y SDS al 1 %) y se mezcló por inversión vigorosa e incubó 10 min en hielo. Posteriormente se le agregaron 300 µL de solución III (acetato de amonio 7.5 M), se mezcló e incubó por 10 min en hielo. Luego se centrifugó a 13,000 r.p.m., se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a un tubo de 1.5 ml, al cual se le agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min, para después lavar la pastilla de ADN sin despegarla con 700 µL de etanol al 70% y se secó por desecación. Finalmente la pastilla se disolvió en 100 µL de agua destilada y 1 µL de ARNsa (1µg/mL) y se incubó por 15 min a 37°C.

6.8. Digestión del pShuttle pA-SMC-pA y Liberación del Fragmento CEM-Luc

Se realizó una digestión doble utilizando las enzimas de restricción *MluI* y *XbaI* (New England BioLabs), para liberar el fragmento de 2,700 pb que contiene el promotor CEM-Luciferasa del pCEM. De igual forma se realizó la misma digestión doble en el pShuttle pA-SMC-pA para la formación de los extremos cohesivos requeridos para ligar los fragmentos y generar el pShuttle pA CEM-Luc pA (Figura 6). En la Tabla 2 se muestra la relación de reactivos utilizados.

Tabla II

Reactivos utilizados para la doble digestión *MluI-XbaI*

Reactivo	Volumen (μL)
Nebuffer 10x	10
BSA 100x	1.0
<i>Mlu I</i> (5U)	1.5
<i>Xba I</i>	1.5
Agua libre de nucleasas	36
ADN	50
Volumen final	100

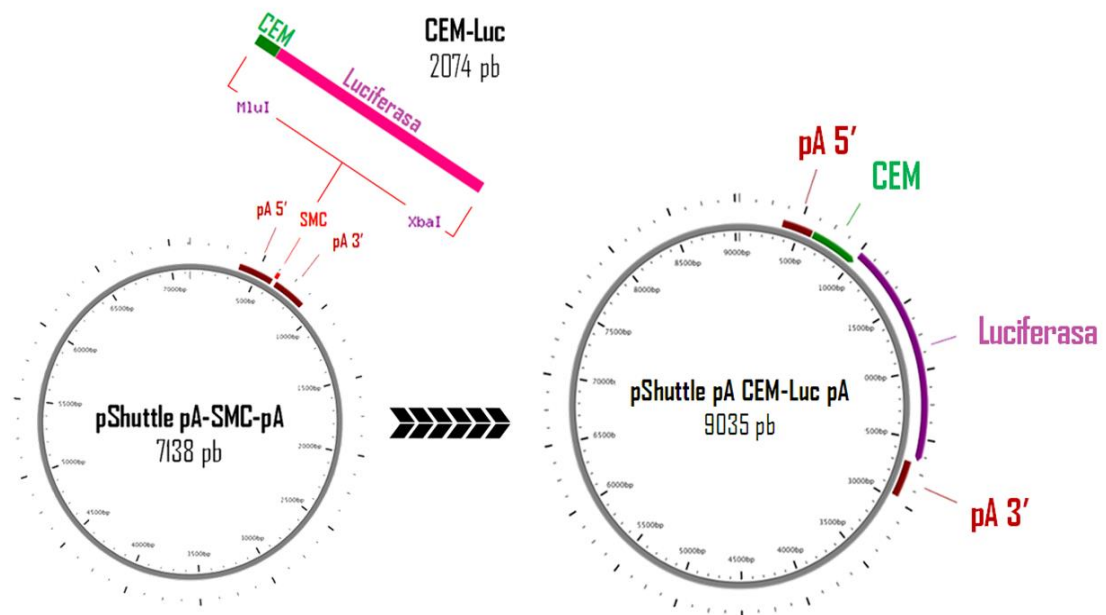


Figura 6. Construcción del vector acarreador pShuttle pA-CEM-Luc pA. La región promotora-Luciferasa fue obtenida del pCEM-Luc y ligada al pShuttle pA-SMC-pA sintetizado obteniendo una construcción pShuttle pA CEM-Luc pA.

6.9. Purificación y Ligación de los Fragmentos

Para hacer más eficiente la ligación se realizó una purificación de los fragmentos liberados se utilizó el kit comercial Wizard (Promega, Madison, WI) de la siguiente manera: Se insertó la minicolumna en el tubo de 2 mL proporcionado en el kit y se vació el producto de la amplificación en la misma, agregándose el mismo volumen de la solución de unión a la membrana, dejándose incubar a temperatura ambiente por 1

minuto para su posterior centrifugación por 1 minuto a 14,000 rpm. Se descartó el fluido del tubo y se agregaron 300 μL de la solución de lavado (agregándole etanol justo antes de usarla) para después centrifugar por 1 minuto a 14 000 rpm. Posteriormente se descartó el fluido del tubo y se volvieron a agregar 300 μL de solución de lavado y a centrifugar por 1 minuto, desechar el fluido del tubo y volver a centrifugar por 10 min más. Posteriormente se centrifugó de nueva cuenta por un espacio de 5 min para descartar cualquier residuo de etanol. Finalmente se colocó la minicolumna en un tubo de 1.5 mL y se añadieron 50 μL de agua libre de nucleasas. Acto seguido se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm obteniéndose los fragmentos de interés resuspendidos en agua libre de residuos de las reacciones anteriores.

Una vez liberados y purificados los genes híbridos, se ligó el fragmento CEM-Luc y el plásmido pShuttle pA-SMC-pA en una relación molar inserto-vector de 5:1, acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 3, para posteriormente dejarlas incubando a temperatura ambiente por 1 h y visualizar los resultados en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (BioRad, Berkeley, CA EUA).

Tabla III

Condiciones, controles y volúmenes de los reactivos necesarios para la ligación

	Plásmido -	Plásmido +	Fragmento -	Fragmento +	Vector/ Fragmento
Fragmento (μL)	-	-	5.0	5.0	5.0
Plásmido (μL)	5.0	5.0	-	-	5.0
Buffer de Ligación 10x (μL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Ligasa ADN T4 4u (μL)	-	0.5	-	0.5	0.5
Agua estéril (μL)	8.5	8.0	8.5	8.0	3.0
Volumen total (μL)			15		

6.10. Caracterización del Vector pShuttle pA-CEM-Luc-pA

La caracterización de ligación se realizó a través de enzimas de restricción *MluI* y *XbaI*, así como una PCR, haciendo uso del PCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin EUA) según la relación mostrada en la Tabla 4, haciendo uso de oligos pShuttle comerciales que amplifican la región colindante del SMC en el pShuttle en donde se encuentra el inserto (Tablas 4 y 5, Figura 7) (Techonlogies 20).

Tabla IV.
Iniciadores pShuttle comerciales

INICIADORES	SECUENCIA
pShuttle 5'	5' GAAGTGAAATCTGAATAATTTTGT -3'
pShuttle 3'	5'- CAAAACACTACATAAGACCCCCAC -3' *

* Reverso complementario

Tabla V
Reactivos y condiciones para realizar la PCR

Reactivos	Volumen (μL)	Concentración
Master Mix	5	1 x
Mezcla de Primers	1	20 pM
ADN 100ng/μL	1	100ng/μL
Agua mQ	3	
Volumen final	10	

Mezcla de Primers (iniciadores o cebadores)		
Reactivos	Volumen(μL)	Concentración
Primer 5'	5	100 pM
Primer 3'	5	100 pM
Agua mQ	15	
Volumen final	25	20 pM

Condiciones PCR		
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 min
2	95	30 seg.
3	60	45 seg.
4	72	1:30 min
5	(del 2 al 4)	30 ciclos
6	72	3 min
7		Fin



Figura 7. Sitios de hibridación de los oligos comerciales pShuttle 5' y 3'. Los oligos están diseñados para amplificar la región contigua al SMC presente en los vectores pShuttle, en donde se inserta el fragmento de interés.

6.11. Construcción del pA CEM-Luc-pA

El genoma adenoviral Ad-pA-CEM-Luc-pA se construyó por recombinación homóloga entre el plásmido acarreador pShuttle pA-CEM-Luc-pA y un plásmido que posee el resto del genoma adenoviral siguiendo el protocolo AdEasy comercial (Stratagene, La Jolla, CA EUA) de la siguiente manera: El plásmido acarreador pShuttle pA CEM-Luc-pA se linearizó con la enzima *PmeI* para después realizar una cotransformación con el plásmido AdEasy que contiene el resto del genoma adenoviral en células calciocompetentes hiperrecombinantes BJ5183 (Figura 8).

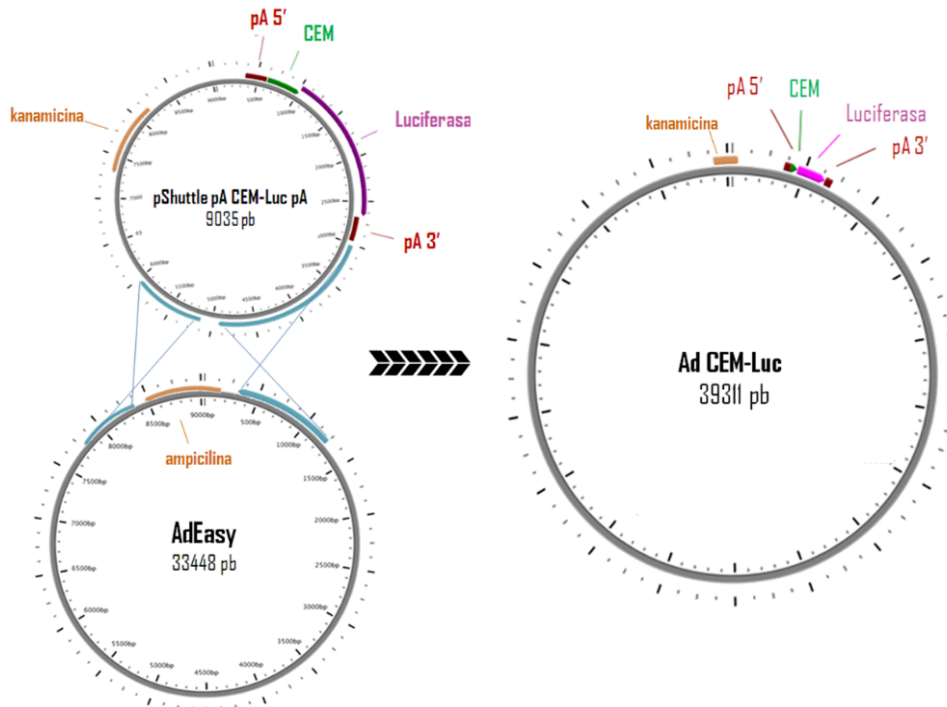


Figura 8. Generación del p AdCEM-Luc por recombinación homóloga. Se muestra los mapas del pShuttle Pa-CEM-Luc-pA y el pAdEasy, los sitios de recombinación homóloga y la ubicación de sus genes de resistencia. Así mismo se muestra el mapa del vector pAdCEM-Luc generado, la ubicación del fragmento de interés y la ubicación del gen de resistencia a kanamicina conservado después de la recombinación.

Las colonias candidatas se cultivaron en medio LB con el antibiótico kanamicina, para posteriormente realizar la extracción del ADN plasmídico. Aquellas colonias que mostraron el retraso en la migración fueron consideradas como candidatas de haber incorporado el fragmento por recombinación homóloga por lo que se les realizó una caracterización enzimática utilizando *PacI* y la doble digestión con *NheI* y *XbaI* (New England BioLabs), así mismo se utilizaron los oligos pShuttle para corroborar la presencia del amplicón esperado (Tabla 6, Figura 8).

6.12. Clonación del pAd CEM-Luc en *E. coli* Top 10 y Extracción por Midiprep

Se realizó la transformación de extracciones del pAd CEM-Luc en bacterias *E.coli* Top 10 para asegurar la estabilidad genética del plásmido conteniente del genoma adenoviral a través de la técnica de transformación de la manera antes mencionada, conservándolas a -80°C en crioviales con glicerol al 10%.

Las bacterias transformadas anteriormente se cultivaron en 100 ml de medio LB por 8 h para realizar la extracción de ADN plasmídico por midiprep utilizando el kit de extracción PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega), de la siguiente manera: Una vez obtenido el crecimiento bacteriano se colocó en un tubo de 50 ml y se centrifugó 10 min a 5 000 rpm, se desechó el medio y se obtuvo la pastilla, a la que se resuspendió en 3 ml de la solución de resuspensión celular dejándolo incubar a temperatura ambiente por 3 min, después se le agregaron 3 ml de la solución de lisis y mezclar suavemente por inversión de 3 a 5 veces, para después agregarle 5 ml de solución neutralizante, agitándolo por inversión. Posteriormente se ensambló la columna clarificante azul del kit en un tubo de 50 ml nuevo y se le agregó el lisado, dejándolo incubar por 2 min y se centrifugó 5 min a 1,500 rpm. Después se colocó el lisado filtrado dentro de la columna de unión blanca en un tubo nuevo para

centrifugarlo por 3 min a 1 500 rpm. Se procedió a la fase de lavado, agregándole 5 ml de la solución de lavado de endotoxinas en la misma columna y centrifugando 5 min a 1500 rpm. Posteriormente se añadieron 20 ml de solución de lavado a la misma columna y se centrifugó 5 min a 1500 rpm descartando el líquido que pasó a través de la columna, se reinsertó la columna en el tubo y se centrifugó 10 min a 1 500 rpm. Para obtener el ADN unido a la columna, se insertó la misma en un nuevo tubo y se le añadieron 600 µL de agua libre de nucleasas para centrifugarlo 5 min a 2 000 rpm. La suspensión de ADN se colectó en un tubo 1.5 ml.

6.13. Liberación del Genoma Adenoviral

Una vez obtenidas grandes cantidades de ADN plasmídico libre de endotoxinas se realizó una digestión con *PacI* al pAd CEM-Luc con las proporciones de la tabla 6 para liberar el fragmento correspondiente al genoma del adenovector AdCEM-Luc (Figura 9) y que será utilizado en las transfecciones posteriores.

Tabla VI.
Digestión para digestión del pAdCEM-Luc con *PacI*.

Reactivo	Volumen (µL)
Nebuffer 10x	10
BSA 100x	1.0
<i>PacI</i> (5U)	1.5
Agua libre de nucleasas	37.5
ADN	50
Volumen final	100

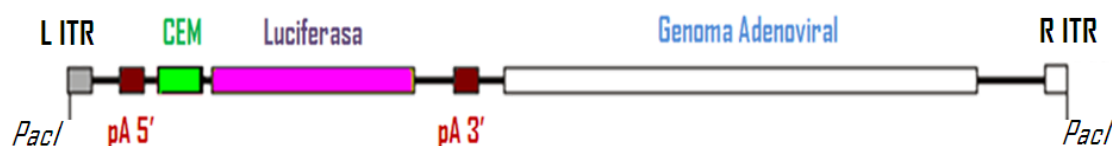


Figura 9. Genoma adenoviral recombinante Ad CEM-Luc. Se muestra la ubicación del inserto CEM-Luc flanqueado por las regiones aislantes pA, los sitios de corte de la enzima *PacI* que exponen las regiones ITR derecha e izquierda, así como el resto del genoma adenoviral.

6.14. Transfección del pAdCEM-Luc en Células HEK 293

La transfección se realizó haciendo uso de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carisbad, CA EUA), siguiendo el protocolo comercial: Se cultivaron células 7.5×10^5 células HEK 293 en medio DMEM con 1% SFB y 5% antibiótico/ fungicida hasta alcanzar una confluencia del 80% en una caja de cultivo de 6 pozos (3 ml de medio DMEM por pozo). Al momento de realizar la transfección se tomaron 150 μ L de DMEM sin antibiótico en un tubo de 1 ml y se le agregaron 10 μ L de lipofectamina, de igual forma se tomaron 150 μ L de DMEM en un tubo de 1 ml y se le agregaron 14 μ g de ADN purificado y linearizado. En un tubo nuevo de 1 ml se añadió lentamente la dilución de ADN en la dilución con lipofectamina en proporción 1:1, incubándose por 5 min. Una vez transcurrido este periodo se agregó 250 μ L del complejo ADN-Lipofectamina a las células HEK 293 por los bordes de los pozos, con agitación suave e incubándolas hasta detectar efecto citopático en los cultivos. Las células con efecto citopático se resuspendieron mecánicamente y se congelaron en crioviales a -80°C para posteriores ensayos.

6.15. Transducción con las Partículas Adenovirales en Células HEK 293

Se cultivaron células HEK 293 hasta alcanzar una confluencia del 80% en una botella de cultivo de 25 cm^3 . Las células transfectadas obtenidas anteriormente fueron lisadas por la acción de 3 ciclos de congelación/descongelación (cada ciclo consiste en 5 min a 37°C de descongelación en baño María, 30 segundos de agitación intensa y 20 min en ultracongelador de -80°C), para posteriormente centrifugarse 10 min a 15,000 rpm obteniendo el sobrenadante el cual se filtró a través de filtros millipore para partículas no mayores de 20 μm (Conrning, Costar City, NY EUA). A continuación, evitando despegar las células se retiró el medio de cultivo de la botella, añadiéndole

500 μ L del sobrenadante filtrado. Se realizaron movimientos en cruz para la correcta distribución de las partículas adenovirales en toda la monocapa celular y se incubó por 2 h para favorecer la transducción, después de lo cual se agregaron 2.5 ml de medio DMEM con 1% SFB y 5% de solución de antibiótico/fungicida e incubándolas para observar al microscopio invertido el efecto citopático a partir de las 12 h, hasta 72 h. Las células con efecto citopático se resuspendieron mecánicamente y se congelaron en crioviales a -80°C para posteriores ensayos.

6.16. Extracción de ADN Viral por Método de Hirt

Se colocaron 250 μ L de solución de lisis (SDS 0.8%, EDTA 10 mM, Proteinasa K 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TE), en 180 μ L de sobrenadante de cultivo, se incubó a 55°C de 2 a 3 h y se le agregaron 100 μ L de NaCl 5 M y se incubó 30 min a -20°C , para posteriormente centrifugarlo a 13,000 rpm durante 30 min, recuperando el sobrenadante al cual se le realizó extracción fenol-SEVAG (se le agregaron 500 μ L de fenol, se incubaron en hielo por 3 min, se le agregó 200 μ L SEVAG, se agitó vigorosamente en vórtex y y se le agregaron 150 μ L TE 1X, se centrifugó por 5 min a 15,000 rpm), precipitándolo con isopropanol y lavándolo con etanol 80% y finalmente resuspendiéndolo en 20 μ L de agua miliQ.

6.17. Corroboración de Adenovector por PCR

Se diseñaron oligos quiméricos específicos para corroborar la presencia del adenovector de manera definitiva en el programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogene 2014) que amplifican una región quimérica compuesta de la última fracción del gen reportero y la porción adyacente del genoma adenoviral (Tabla 7 y 8, Figura 10).

Tabla VII
Iniciadores quiméricos (Q) 5' y 3'

INICIADOR	SECUENCIA
ES	
Q 5'	5' CCAGGTATCAGGCAAGGATATG-3'
Q 3'	5'-GGTCTCGTAGGTCAAGGTAGTA-3' *

* Reverso complementario

Tabla VIII
Reactivos y condiciones utilizados para amplificar la región quimérica

Reactivos	Volumen (μL)	Concentración
Master Mix	5	1 x
Mezcla de Primers	1	20 pM
ADN 100ng/μL	1	100ng/μL
Agua mQ	3	
Volumen final	10	

Mezcla de Primers (iniciadores o cebadores)		
Reactivos	Volumen (μL)	Concentración
Primer 5'	5	100 pM
Primer 3'	5	100 pM
Agua mQ	15	
Volumen final	25	20 pM

Condiciones PCR		
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 minuto.
2	95	30 seg.
3	60	45 seg.
4	72	1:30 minuto.
5	(del 2 al 4)	30 ciclos
6	72	3 minuto
7		Fin



Figura 10. Sitios de hibridación de los oligos quiméricos 5' y 3'. Para corroborar la identidad del AdCEM-Luc se diseñaron oligos que amplifican la región interna del gen Luc y la región adyacente del genoma adenoviral.

6.18. Ensayos de Luminiscencia

Para medir la capacidad de expresión del vector AdCEM-Luc en las células HEK 293 transducidas en los siguientes experimentos se utilizó el protocolo del kit Dual Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, Wisconsin EUA) de la siguiente manera: Una vez cumplidos los tiempos de transducción de las células HEK 293 en placas de cultivo de 6 pozos, se descartó por los bordes 2.5 ml del DMEM de cada pozo evitando despegar la monocapa. Posteriormente se le agregó a cada pozo 500 μ L de reactivo de lisis/luciferina para obtener un volumen de 1 ml incubándolas por 10 min. Una vez lisadas las células transducidas se tomaron 100 μ L por pozo de una placa de 96 pozos especial de fondo blanco para su medición en el luminómetro GloMáx-Multi Detection System (Promega).

Para todos los experimentos de expresión se tomaron como control positivo y negativo células HEK 293 transfectadas con pGL3-CMV-Luc (100 ng/ μ L) y células HEK 293 sin tratamiento respectivamente. Así mismo, las mediciones fueron realizadas por triplicado para obtener datos estadísticamente representativos.

6.19. Medición del Efecto de la Dosis de Ad CEM-Luc Sobre la Luminiscencia por Dilución

Para evaluar la expresión del gen reportero es dependiente de la concentración del vector AdCEM-Luc se realizó la medición de la luminiscencia de células HEK293 con un periodo de incubación de 12, 24 y 36 h, siendo transducidas con el adenovector e incubadas 12 h. Una vez concluido este periodo se les realizó un ensayo para la detección de la luminiscencia y se realizó una titulación 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256 de la siguiente manera: Se agregó un volumen 100 μ L de medio

DMEM en 9 tubos de 0.5 ml. Para el tubo con la relación 1:1 se tomó un volumen de 200 μ L de la solución de lisis/luciferina, se resuspendió reiteradamente y del mismo tubo 1:1 se tomaron 100 μ L agregándoselos al tubo de la dilución 1:2, resuspendiéndolo al menos 30 veces para posteriormente tomar 100 μ L del tubo 1:2 y agregárselo a la dilución 1:4, repitiendo el proceso hasta cumplir con todas las diluciones de la titulación para posteriormente realizar la medición en una placa de 96 pozos.

6.20. Medición de la Expresión Según Tiempos de Transducción y Exposición a un CM

Para evaluar los niveles de expresión a diferentes tiempos de transducción, así como de la activación del promotor ante la exposición al CM (Campo magnético) se midió la luminiscencia de cultivos (HEK 293) transducidos con dos muestras diferentes de Ad CEM-Luc (M1 y M2) con un periodo de incubación pre transducción de 12, 24 y 36 h en placas de 6 pozos por duplicado.

Una vez cumplido el periodo de incubación postransducción las placas seleccionadas para la exposición al CM fueron expuestas 30 min a una placa magnética para magnetofección (OZ Biosciences, San Diego, EUA), realizando la medición de la luminiscencia 12 h después para favorecer la expresión del gen Luc, por lo que el tiempo total de transducción de los cultivos fue de 24, 36 y 48 h (Figura 11).

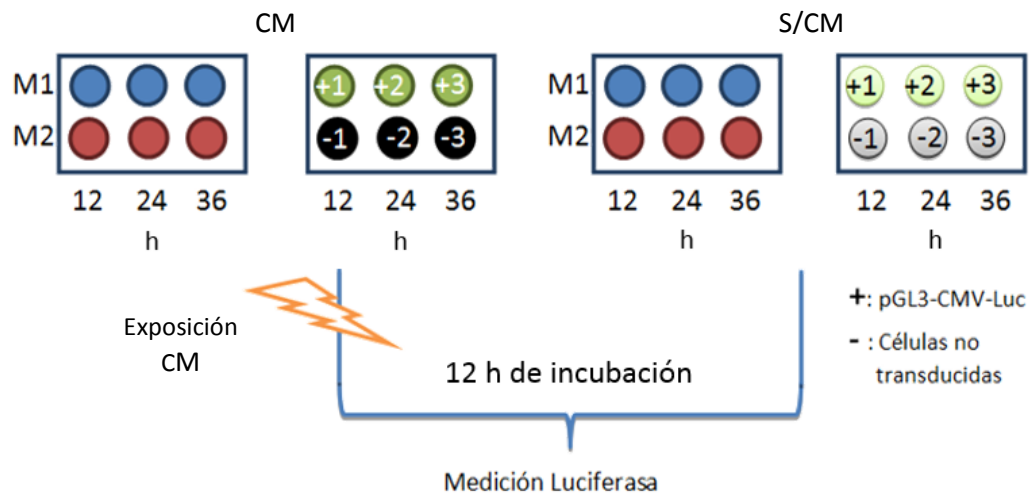


Figura 11. Bioensayo para determinar los niveles de luciferasa en las células transducidas. Las células fueron cultivadas por duplicado e incubadas por 12, 24 y 36 h en placas de 6, para después ser transducidas por triplicado con el AdCEM-Luc 1 y 2. Un grupo fue expuesto al CM por 30 min para evaluar la activación del promotor.

6.21. Medición Luminiscencia a Diferentes Tiempos de Exposición al CM

Se incubaron células HEK293 en placas de 6 pozos por 24 h para después ser transducidas con AdCEM-Luc. Posteriormente se expuso a los cultivos al CM por 30, 60, 120 min y 6 h respectivamente, para dejar incubando 4 y 12 h antes de la medición de la luminiscencia en placa de 96 pozos.

RESULTADOS

7.1. Construcción y Caracterización del Vector pShuttle pA CEM-Luc

Se diseñó un fragmento nucleotídico de 568 pb integrado por un sitio múltiple de clonación (SMC) con las enzimas necesarias para integrar el fragmento CEM-Luc, con una señal de poliadenilación en sus extremos obtenida del SV 40 (Figura 12), la cual funciona como un aislante transcripcional que bloquea la capacidad promotora de la región ITR (Addgene , Addgene).

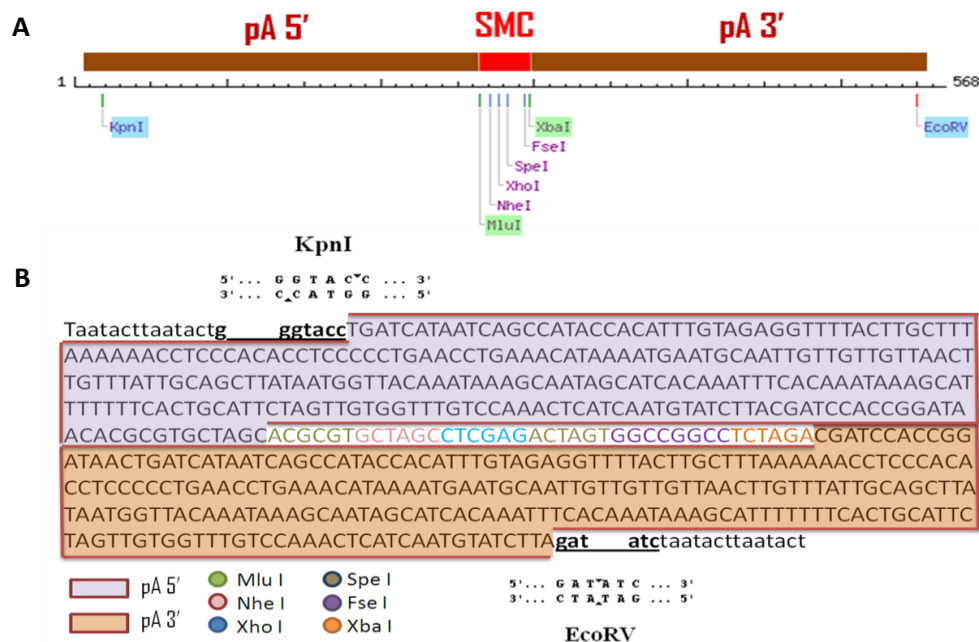


Figura 12. Diseño del fragmento pA-SMC-pA. A) Se muestra de manera esquematizada la ubicación de las regiones pA 5' y 3', el orden de las enzimas de restricción que componen el SMC, así como las enzimas que bordean el fragmento. B) Secuencia nucleotídica de los elementos que componen al fragmento.

Posteriormente se obtuvo el material genético de los plásmidos pShuttle pA SMC-pA y pCEM a través del proceso de transformación y extracción. En la Figura 13 se observa la digestión con las enzimas *MluI* y *XbaI* de ambos plásmidos para la corroboración de la acción enzimática (carriles 2 y 4) y la digestión doble (carril 5) para la posterior ligación de los fragmentos y generación del plásmido pShuttle pA CEM-Luc-pA.

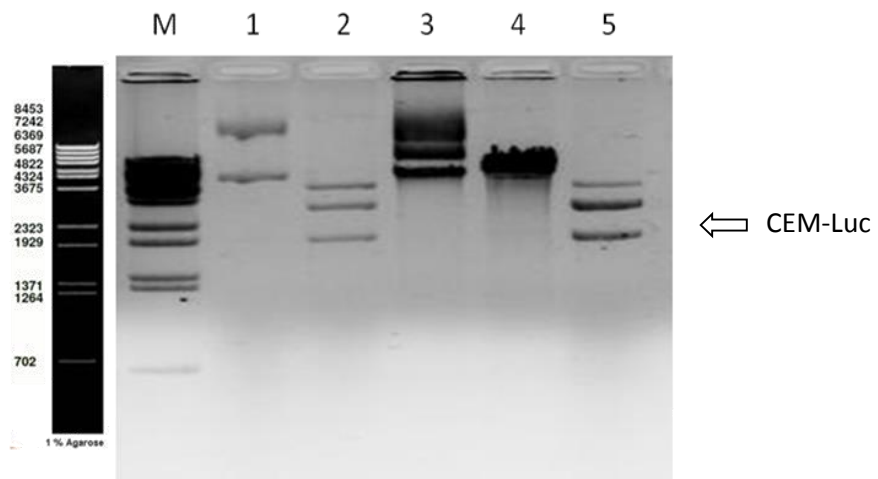


Figura 13. Digestión doble de pShuttle Pa-SMC-pA y pCEM con las enzimas *MluI* y *XbaI*. M: marcador, carril 1: pCEM sin digerir, carril 2; pCEM digerido, carril 3; pShuttle pA SMC pA sin digerir, carril 4; pShuttle pA SMC pA digerido, carril 5 positivo de digestión (pCEM original).

Una vez generado los fragmentos con los sitios cohesivos de interés, se procedió a realizar la ligación para generar la construcción pShuttle pA-CEM-Luc-pA. En la figura 14 se observan los controles de la ligación, pShuttle pA-SMC-pA sin (V-) y con ligasa (V+), CEM-Luc sin (F-) y con ligasa (F+) así como la reacción pShuttle pA-SMC-pA y CEM-Luc con ligasa (VF+).

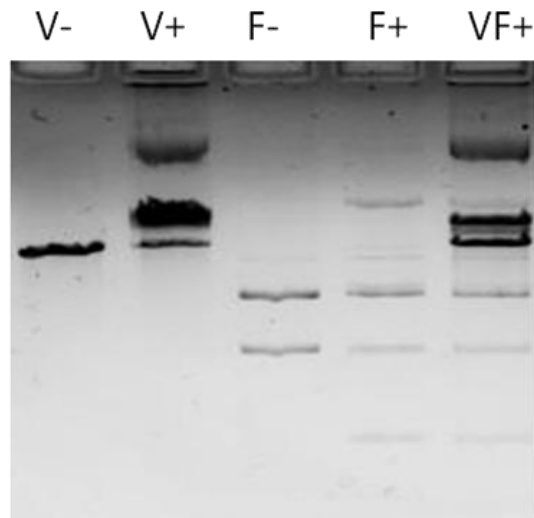


Figura 14. Ligación del fragmento CEM-Luc en el vector pShuttle pA-CEM-Luc-pA y controles.

Se encontraron tres colonias candidatas una vez que se realizó la amplificación de las colonias VF+, como muestra la figura 15 en los carriles 1, 2 y 8, con un tamaño de aproximadamente 2.6 kpb, acorde al fragmento CEM-Luc y las secuencias terminadoras pA que lo flanquean.

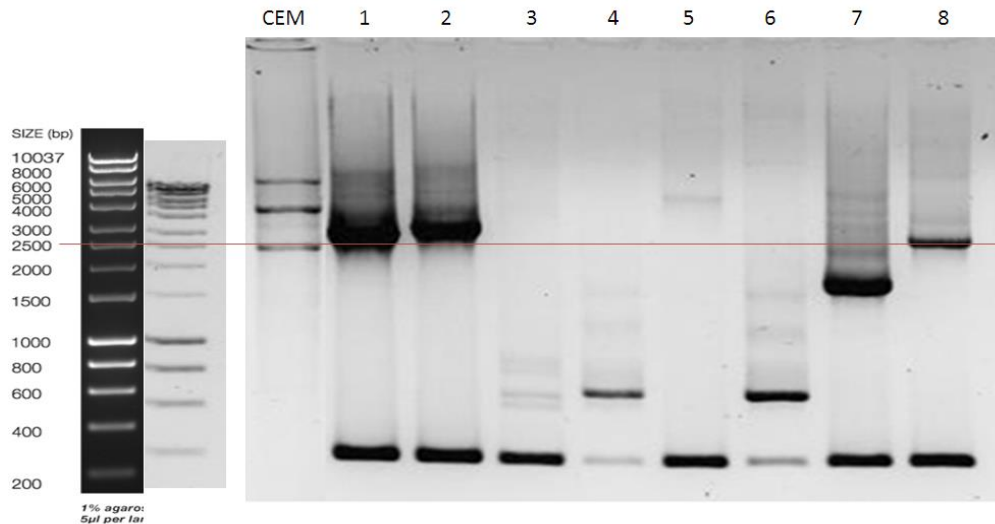


Figura 15. Amplificación de colonias candidatas con oligos pShuttle comerciales. CEM: digestión del ADN plasmídico de pCEM con *MluI* y *XbaI* como control de tamaño esperado; carril 1-8 amplificaciones de extracciones de colonias candidatas.

Así mismo, se corroboró la identidad del vector pShuttle Pa-CEM-Luc-pA de las tres candidatas, al realizarles una doble digestión con las enzimas *MluI* y *XbaI*, siendo la colonia 1 la única en liberar el fragmento de aproximadamente 2 kpb, correspondiente al CEM-Luc esperado (Figura 16).

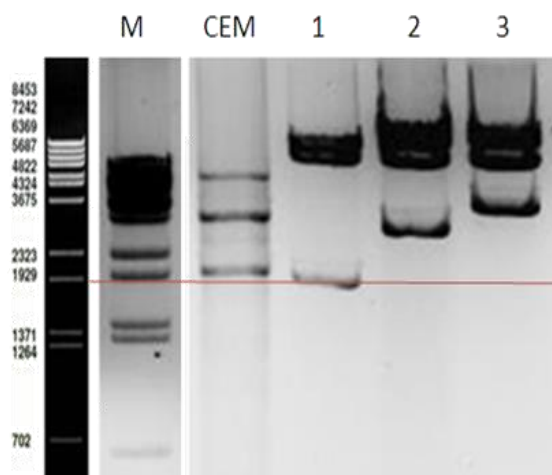


Figura 16. Corroboración por doble digestión. CEM: pCEM digerido con *MluI* y *XbaI* como control de tamaño esperado, se muestran también las digestiones de las muestras 1, 2 y 8 y la liberación de los fragmentos correspondientes.

7.2. Construcción del pAdCEM-Luc por Recombinación Homóloga

Como primer medida de exclusión, se realizó una prueba de retraso en un gel de agarosa al 1% para identificar aquellas colonias en donde el fragmento pA-CEM-Luc-pA se incorporó al plásmido pAdEasy a través de la recombinación homóloga con el vector pShuttle pA-CEM-Luc-pA linearizado, encontrando que solo las colonias 2 y 3 presentaron retraso en el tamaño del ADN plasmídico (Figura 17).

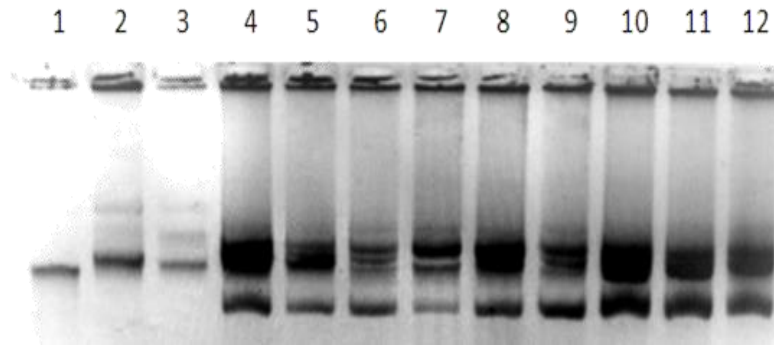


Figura 17. Retraso en el corrimiento del ADN plasmídico de colonias candidatas. Se observó que de entre las colonias transformadas, solo las colonias 2 y 3 mostraron el retraso esperado.

Así mismo, haciendo uso de *PacI* se liberó un fragmento de aproximadamente 3 kpb correspondiente al fragmento que contiene el gen de resistencia a ampicilina y otro de 35 kpb correspondiente al genoma adenoviral (Figura 18 A). De las dos candidatas, solo la colonia número 2 liberó un fragmento acorde al tamaño esperado (Figura 18 B).

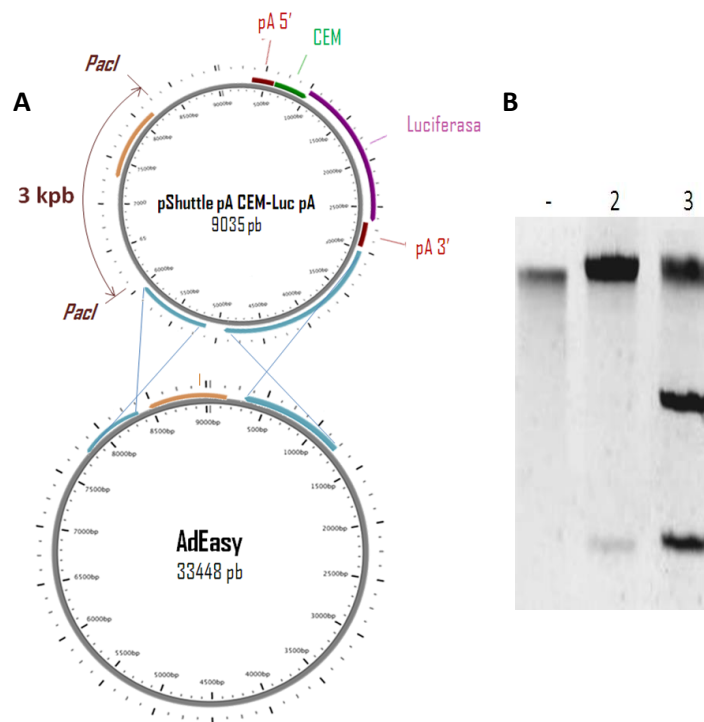


Figura 18. Digestión de las candidatas 2 y 3 con *PacI*. A) Se muestra de manera esquematizada la ubicación del fragmento a liberar de 3 kpb y los sitios de corte de la enzima. B) Gel de agarosa al 1%, con las muestras digeridas con *PacI* de las colonias 2 y 3.

La caracterización de la colonia 2 con las enzimas *NheI* y *XbaI* mostró el patrón esperado a la digestión de AdCEM-Luc *in silico* (Figura 19).

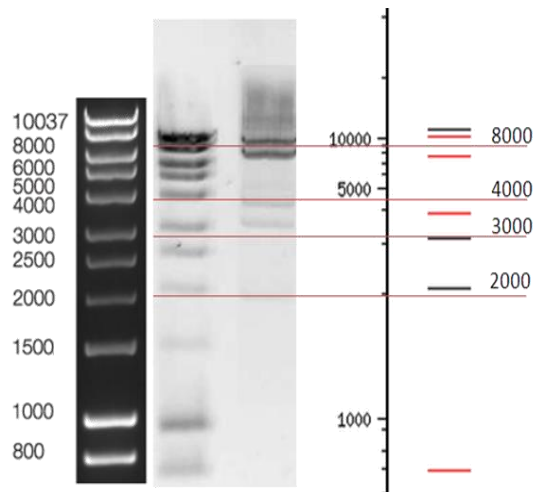


Figura 19. Caracterización del ADN plasmídico por doble digestión con las enzimas *NheI* y *XbaI*. Se hace referencia a la comparación con los resultados *in silico*.

Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 2.6 kpb (Figura 20), correspondientes a la región pA-CEM Luc-pA amplificada con los oligos pShuttle.

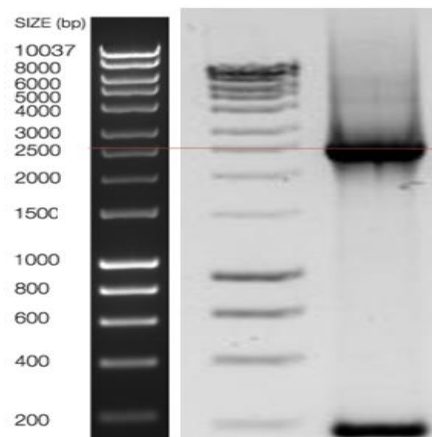


Figura 20. Amplificación con oligos pShuttle del ADN plasmídico. Amplificación de de la colonia 2 con los oligos comerciales para corroborar la presencia de un amplicón de 2.5 kpb.

7.3. Transfección en Células HEK 293

Al realizar la transfección se observó el efecto citopático esperado de las células a través del microscopio óptico invertido en un campo de 20X, aproximadamente a las 36 h, producto de la generación del adenovector en la línea celular (Figura 21 B).

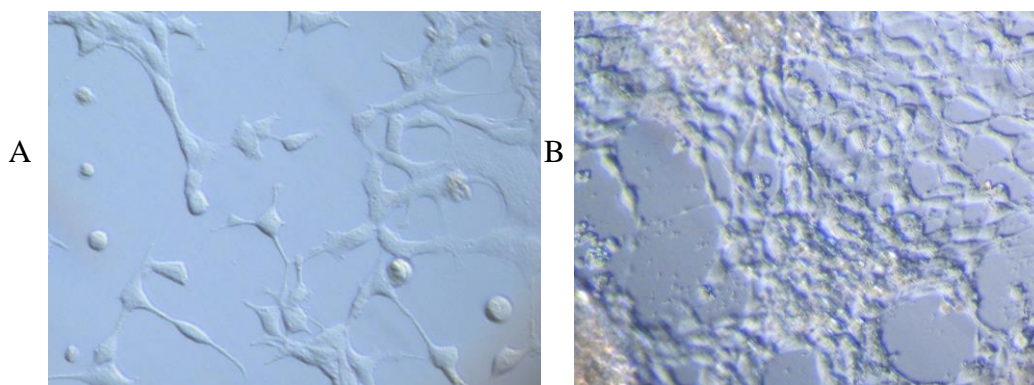


Figura 21. Generación del adenovector AdCEM-Luc en células HEK 293. A: Control negativo; células HEK293 sin tratamiento lipofectamina pAdCEM-Luc. B: Células HEK293 expuestas al tratamiento después de 36 h de incubación con el tratamiento lipofectamina-pAdCEM-Luc.

7.4. Transducción de AdCEM-Luc en Células HEK 293

Ya obtenidas las partículas adenovirales, se realizaron las transducciones siguiendo la metodología citada, obteniendo el efecto citopático a partir de las 24 h de incubación (Figura 22).

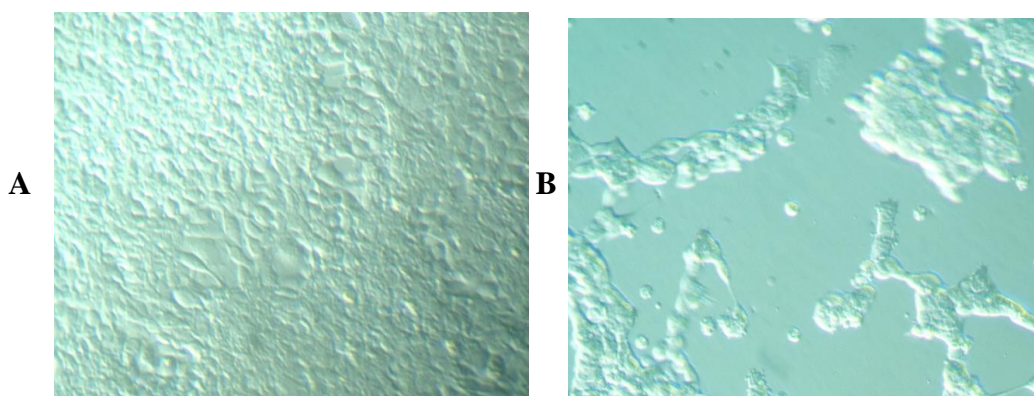


Figura 22. Células HEK293 transducidas con el adenovector AdCEM-Luc. A: Control negativo; células HEK293 sin exposición al vector. B: Células HEK293 expuestas al AdCEM-Luc.

La confirmación de la presencia del AdCEM-Luc se realizó a través del uso de los oligos quiméricos y el ADN viral extraído de las células HEK 293 transducidas, obteniendo amplicones esperados de aproximadamente 1.16 kpb (Figura 23).

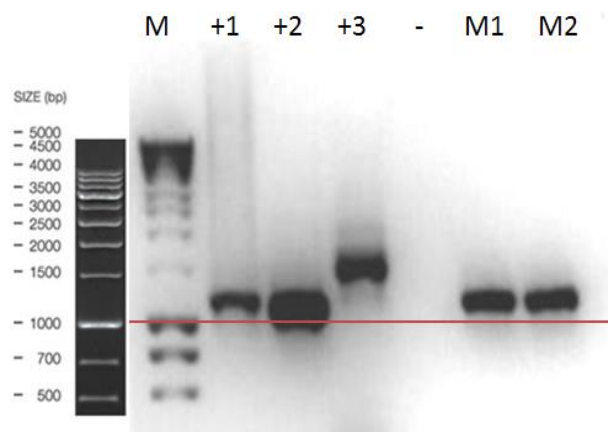


Figura 23. Amplificación de la región quimérica Luc-Ad. M: Marcador de peso molecular. +1 y +2: Controles positivos de extracciones del AdCEM-Luc que amplificaron anteriormente con oligos dirigidos a la región Luc (datos no mostrados). +3: control positivo PCR. - : control negativo PCR. M1 y M2: muestras de células HEK293 transducidas con dos AdCEM-Luc de transfecciones diferentes.

7.5. Efecto de la Dosis de Ad CEM-Luc Sobre la Luminiscencia

Se determinó que la concentración del adenovector es dependiente de la dosis y a los tiempos de incubación pre transducción, como se observa en la Figura 24 donde los niveles de luminiscencia aumentan en los cultivos que tenían mayor tiempo de incubación de la transducción, alcanzando niveles de luminiscencia de hasta 1×10^7 URL (Unidades Relativas de Luz) a las 36 h de incubación post transducción en comparación con los 1×10^6 y 1×10^4 URL presentes a las 24 y 12 h, encontrando valores de 1×10^3 URL en el control positivo. Así mismo se observa una disminución en los niveles de expresión uniforme a medida que la dilución aumenta.

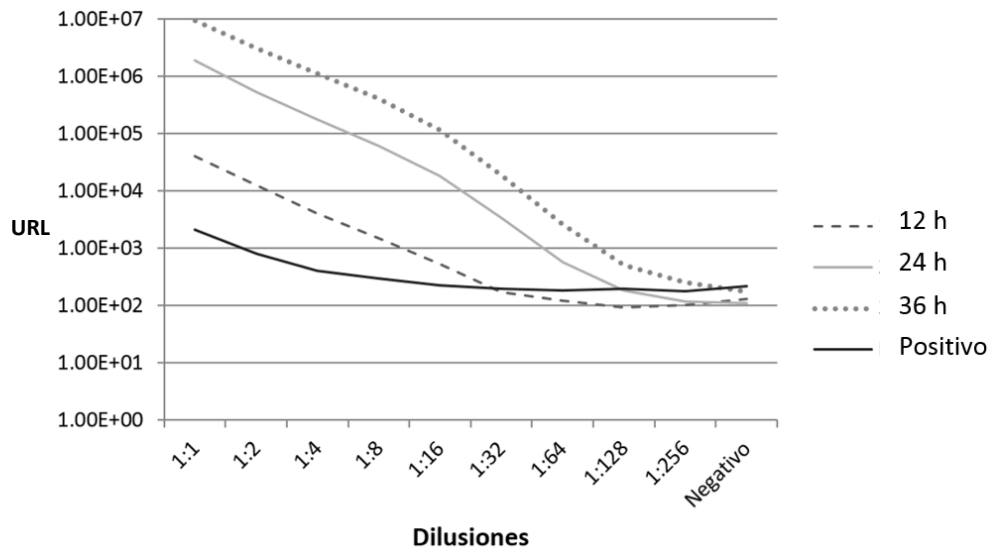


Figura 24. Niveles de luminiscencia según la concentración de AdCEM-Luc a diferentes tiempos de transducción. Control positivo se transfectaron células HEK293 con pGL3 CMV Luc comercial.

7.6. Efecto de Tiempos de Transducción y Exposición al CM

Se analizó la expresión de luminiscencia en línea celular HEK 293 de dos muestras de AdCEM-Luc a diferentes tiempos de incubación pre transducción así como ante la exposición a un CM. Los resultados en los niveles de luminiscencia presentados en la Figura 25, muestran valores en el orden de 1×10^4 URL a las 12 h, 1×10^6 URL a las 24 h y 1×10^7 URL a las 36 h, observando también un aumento en los niveles del control positivo de 1×10^3 , 1×10^4 y 1×10^5 URL. No observó una diferencia significativa entre los niveles de luminiscencia de las dos muestras de AdCEM-Luc utilizadas, así mismo no se observa una diferencia en la expresión entre los grupos expuestos al CM y los no expuestos.

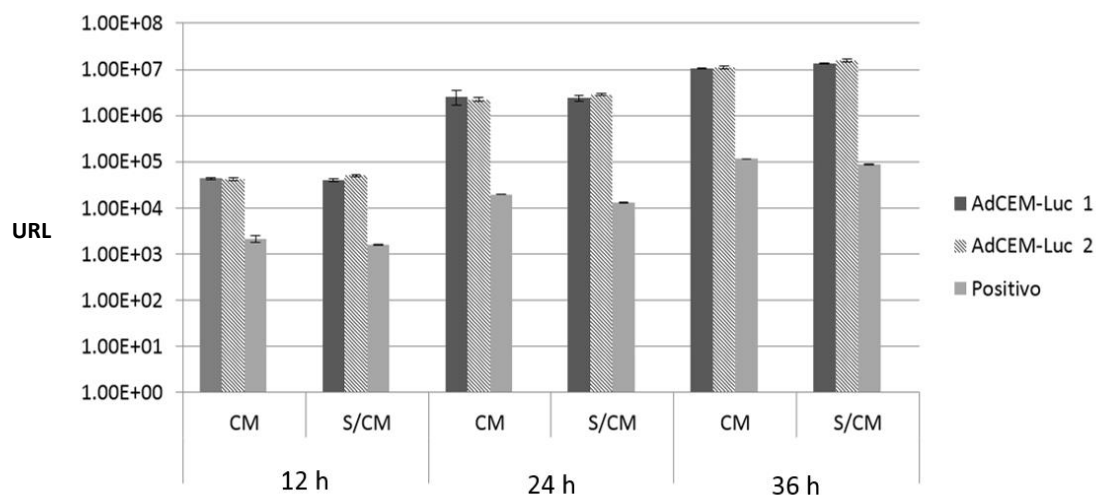


Figura 25. Medición de la luminiscencia a diferentes tiempos de incubación pre transducción y exposición al CM. Niveles de luminiscencia de dos muestras diferentes de AdCEM-Luc (1 y 2) de cultivos HEK293 con 12, 24 y 36 h de incubación pre transducción, así como su respuesta ante la ausencia (S/CM) o exposición al CM. El control positivo se transfectaron HEK293 con pGL3 CMV Luc comercial y como control negativo fueron células sin tratamiento.

7.7 Medición Luminiscencia a Diferentes Tiempos de Exposición al CM

Los resultados observados en la figura 26 muestran que el tiempo de exposición al CM no afecta la expresión de los niveles de luminiscencia. Los valores obtenidos ante la exposición de 30 min, 1, 2 y 6 h son similares a los obtenidos en el control negativo sin exposición. Así mismo no se observaron cambios en los niveles de luminiscencia al disminuir el tiempo de incubación postransducción de 12 a 4 h.

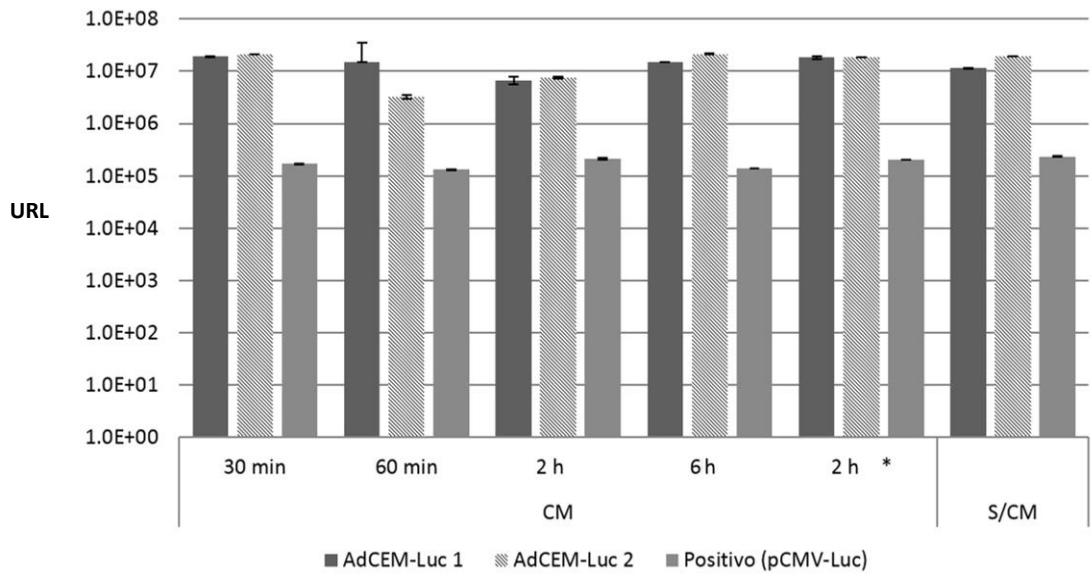


Figura 26. Niveles de luminiscencia a diferentes tiempos de exposición al CM. Se utilizaron dos muestras de AdCEM-Luc para transducir cultivos HEK293 con 24 h de incubación, exponiéndolos a 30 min, 1, 2 y 6 h al CM y dejándolas incubarse 4 h (*) y 12 h. Como control positivo se transfectaron células HEK293 con pGL3 CMV-Luc y como control negativo se utilizaron células sin exposición al AdCEM-Luc.

DISCUSIÓN

Uno de los elementos más importantes en este trabajo fue la previsión de la capacidad promotora de las regiones ITR del genoma adenoviral (Babiss *et al.* 1986, Hearing *et al.* 1987, Hatfield *et al.* 1991, Imler *et al.* 1996, Shi *et al.* 1997, Harui *et al.* 1999, Rubinchik *et al.* 2001, Yamamoto *et al.* 2003, Stephen *et al.* 2008, Rauschhuber *et al.* 2011) por lo que antes de realizar el trabajo experimental, se realizaron análisis bioinformáticos para el diseño del fragmento aislante. Se determinó utilizar como terminador la secuencia de 228 pb terminadora del SV40, la cual es utilizada en el plásmido comercial pShuttle CMV río abajo para detener la expresión de este promotor (AddGen 2014). De no haber tomado esta previsión, se podía correr el riesgo de interpretar los resultados obtenidos de una manera incorrecta al final del trabajo, ya que la acción promotora de las regiones ITR puede interferir la capacidad promotora del promotor CEM.

Para el diseño del pA-SMC-pA se tomaron en cuenta los sitios de corte *KpnI* y *EcoRV* para incorporarlo en el SMC propio del pShuttle (AddGen 2014). El SMC sintetizado entre las secuencias pA está constituido por las enzimas *MluI*, *NheI*, *XhoI*, *SpeI*, *FseI*, y *XbaI*. Los sitios *MluI* y *NheI* flanquean la región 5' del fragmento CEM-Luc, mientras *XbaI* se encuentra en la región 3' (Rodríguez de la Fuente 2008, Rodríguez-De la Fuente *et al.* 2012). Las otras enzimas presentes entre estos sitios, fueron incorporadas en el diseño como sitios de corte único en el sistema AdEasy para futuras aplicaciones del pA-SMC-pA.

Para la generación de los fragmentos CEM-Luc y el alineamiento del pShuttle se utilizó de manera inicial una doble digestión con las enzimas *NheI-XbaI*; sin embargo, después de reiterados fracasos en la ligación (resultados no mostrados), se observaron dos factores que podían disminuir la probabilidad de una ligación exitosa: 1) ambas enzimas generaban el mismo sitio de corte cohesivo (CTAG) favoreciendo una religación intrafragmentos y 2) la cepas de *E.coli* utilizadas para la transformación, metilaban el sitio de corte de la enzima *XbaI*, lo cual generaba digestiones parciales, disminuyendo el número de fragmentos a ligar. Por lo anterior, se optó por utilizar las enzimas *MluI* y *XbaI*, para la doble digestión las cuales generan sitios de corte cohesivos diferentes y se optó por usar para la transformación la cepa calcio competente *E. coli* dam-/dcm-. Después de realizar dichas modificaciones se obtuvieron las ligaciones candidatas en el primer ensayo.

Para caracterizar y corroborar la formación del pShuttle pA-CEM-Luc-pA se utilizaron los olígos comerciales que flanquean la región SMC del pShuttle. Los amplicones obtenidos mostraron un tamaño aproximado de 2.5 kpb, superior al fragmento de 2 kpb del CEM-Luc, correspondiente a las regiones pA incorporadas en el diseño. Así mismo se le realizó una digestión doble con las enzimas *MluI* y *XbaI* para liberar el fragmento CEM-Luc y así poder identificar la cepa con la ligación pShuttle pA-SMC-pA + CEM-Luc.

La recombinación homóloga en *E. coli* BJ5183 es un proceso azaroso que una vez logrado involucra un sobreesfuerzo en la replicación bacteriana debido al gran tamaño del pAdEasy (39.3 kpb); de tal modo que las colonias recombinantes candidatas son aquellas con el menor tamaño en la placa producto de la transformación, por lo que los tiempos de incubación para la producción de biomasa en el medio inoculado son superiores al de una cepa no recombinante con el pAdEasy, observándose indicios de

turbidez aproximadamente a las 8 h de incubación (Zeng *et al.* 2001). Un aspecto importante tomado en cuenta en este paso fue evitar una turbidez elevada, puesto que se corre el riesgo de que se presente el mecanismo de “curación plasmídica”, en el cual se elimina el plásmido extra cromosomal (Spengler *et al.* 2006).

Una vez corroborada la presencia de pAdCEM-Luc por digestiones y amplificaciones mostradas en los resultados, fue vital transformar en *E. coli Top 10* para asegurar que no ocurrieran nuevos mecanismos de recombinación asegurando la estabilidad genética para los pasos posteriores.

Los resultados mostraron que la construcción del genoma adenoviral es funcional al tener la capacidad de generar el efecto citopático en los cultivos transfectados. El efecto citopático (ECP) es un cambio en la morfología de la monocapa de las células HEK293 a causa de la infección adenoviral (Thomas Albrecht 1996), presentándose turgencia y focos de lisis producto de la generación de las partículas adenovirales. Este progreso es observable al microscopio óptico invertido en campo de 20X, culminando con la lisis celular el desprendimiento de la monocapa y la liberación del adenovector. En caso de no encontrar células a transfectar, el adenovector queda vulnerable a las condiciones extracelulares, disminuyendo considerablemente su viabilidad hasta su inactivación a través del tiempo (Zeng *et al.* 2001).

A pesar que mediante la metodología AdEasy el ECP puede observarse hasta 2 semanas (Techonlgies 20), las células transfectadas con el pAdCEM-Luc linearizado/lipofectamida presentaron ECP entre las primeras 24 y 48 h, y de 12 a 24 h a ser transducido, por lo que además de demostrar la viabilidad de la construcción, se observó cualitativamente una alta eficiencia a la hora de infectar a los cultivos HEK 293 para replicarse.

La comprobación de la identidad del AdCEM-Luc a través de la amplificación de un fragmento híbrido Luc-Ad se centró en el extremo 3' de la luciferasa debido a la presencia de regiones repetitivas tanto en el promotor CEM como en la región ITR izquierda del genoma adenoviral. Lo anterior dificultó de manera significativa el diseño de oligos que amplificaran dicha región.

Se decidió utilizar adenovectores AdCEM-Luc producto de la segunda transducción de las células empaquetadoras HEK293 para los ensayos de expresión, debido a que las células incrementarían los títulos del vector independientemente del MOI utilizado, asegurando que se pudiera evaluar la capacidad del AdCEM para expresar su gen reportero y su posterior detección de luminiscencia.

Los tiempos de incubación de 12, 24 y 36 h fueron seleccionados para generar una confluencia gradual en las células para su posterior transducción. La presencia de ECP mayor es indicativo de células transducidas con el adenovector, lo cual es directamente proporcional al número de adenovectores y la concentración de luciferasa en el medio. La capacidad de los AdCEM-Luc para expresar luciferasa fue corroborada al observar que los valores de luminiscencia se incrementaron a medida que el adenovector transdujo a un número mayor de células y fueron disminuyendo a medida que la dilución fue aumentando. Este efecto se observó de manera similar en el control positivo pGL3 CMV-Luc para la medición de luminiscencia.

Esto se podrá analizar cuantitativamente al estandarizar la MOI (Multiplicidad de infección) del AdCEM-Luc, al utilizar una línea celular no empaquetadora como HeLa, SiHa, CaSKi, etc. en futuros estudios.

A pesar de que la permisividad de la línea HEK 293 para la replicación adenoviral no la hace recomendable para evaluar la capacidad de expresión de un promotor

recombinante (Qbiogene), se realizó a la par de la evaluación de los niveles de luminiscencia a diferentes tiempos de transducción del AdCEM-Luc, un ensayo para divisar la funcionalidad del promotor CEM ante su exposición ante los CM por 30 min. Los resultados mostraron que los niveles de luminiscencia obtenidos fueron similares en todos los tiempos pos transducción, independientemente de la exposición al CM.

Los resultados anteriores fueron corroborados al exponer a las transfecciones de 24 h de transducción a diferentes tiempos (30 min, 1, 2 y 6 h) bajo la acción del CM, obteniendo los mismos niveles de luminiscencia que el control negativo sin exposición al CM.

La respuesta obtenida del promotor CEM en este bioensayo pareciera ser contradictoria a los resultados reportados (Heredia-Rojas *et al.* 2010, Rodríguez-De la Fuente *et al.* 2012, Alvizo Báez C.A. 2014); sin embargo no pueden ser concluyentes ya que la actividad replicativa del adenovector impulsada por esta línea celular pudo haber enmascarado la acción del CM, imposibilitando observar una diferencia en los niveles de expresión.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conjunto los resultados generados en este trabajo permitieron cumplir con el objetivo general de construir un vector adenoviral recombinante que contenga el promotor de campo magnético sintético viable, con capacidad de transducir y expresar luciferasa como gene reportero en la línea celular HEK 293; se comprobó el correcto diseño bioinformático del fragmento pA-SMC-pA y la construcción del plásmido acarreador recombinante pShuttle pA-CEM-Luc-pA (objetivo 1 y 2), así mismo se logró la generación y clonación del genoma adenoviral AdCEM-Luc en una línea de *E. coli* estable (objetivo 3) con la capacidad de producir adenovectores recombinantes viables en la línea celular HEK293 (objetivo 4), con la capacidad de transducir su gen reportero (objetivo 5), lo cual quedo corroborado al medir la expresión de luminiscencia (objetivo 6) a pesar de no obtener una diferencia significativa en la expresión ante la exposición o ausencia de un CM. Esto justifica la inversión de recursos humanos y económicos para llevar a cabo la producción en escalamiento del adenovector recombinante AdCEM-Luc, para continuar con los ensayos preclínicos (*in vitro* e *in vivo*) que demuestren la utilidad de este vector para la expresión de genes terapéuticos inducidos por la actividad de un CM.

Por lo anterior, se proponen las siguientes recomendaciones:

- Realizar la producción en escalamiento del vector adenoviral.
- Determinar el título del vector en unidades formadoras de placas (PFU) para posteriores estudios cuantitativos.

-
- Estandarizar las concentraciones infectivas (MOI) en células susceptibles no empaquetadoras (HeLa, SiHa, Caski, etc.).
 - Estandarizar los tiempos e intensidades de exposición para la activación del promotor de respuesta al CEM en el AdCEM-Luc.
 - Formar nanocomplejos quitosan, nanopartículas y AdCEM-Luc.
 - Realizar las transducciones de los nanocomplejos en líneas celulares *in vitro*.
 - Realizar las transducciones de los nanocomplejos en modelos animales *in vivo*.
 - Utilizar este modelo en terapia génica al intercambiar el gen reportero por un gen terapéutico.

LITERATURA CITADA

- AddGen. (2014). "Analyze Sequence: pShuttle." Retrieved 5 Noviembre 2014, from <https://www.addgene.org/browse/sequence/8507/>.
- AddGen. (2014). "Analyze Sequence: pShuttle-CMV." Retrieved 4 Noviembre 2014, from <http://www.addgene.org/browse/sequence/8508/#>.
- Addgene. "pShuttle." from <http://www.addgene.org/16402/>.
- Addgene. "SV 40 Terminator." from <http://www.addgene.org/browse/sequence/8508/>.
- Akhtar, S. (2006). "Non-viral cancer gene therapy: beyond delivery." *Gene Ther* **13**(9): 739-740.
- Alvizo Báez C.A., L. C. I. E., Rodríguez Padilla M.C., and Alcocer González J.M. (2014). "Magnetic Nanoparticles of Chitosan for Targeted Delivery System of Plasmids to the Lungs." *Journal of Nanotechnology* **Volume 2014**,: 5 pages.
- Azanza, M. J. and A. del Moral (1994). "Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism." *Prog Neurobiol* **44**(6): 517-601.
- Babiss, L. E., A. Bennett, J. M. Friedman and J. E. Darnell, Jr. (1986). "DNase I-hypersensitive sites in the 5'-flanking region of the rat serum albumin gene: correlation between chromatin structure and transcriptional activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6504-6508.
- Balcer-Kubiczek, E. K., G. H. Harrison, C. C. Davis, M. L. Haas and B. H. Koffman (2000). "Expression analysis of human HL60 cells exposed to 60 Hz square- or sine-wave magnetic fields." *Radiat Res* **153**(5 Pt 2): 670-678.
- Balmori, A. (2003). "Aves y telefonía móvil. Resultados preliminares de los efectos de las ondas electromagnéticas sobre la fauna urbana." *El Ecologista* **36**: 40-42.
- Balode, S. (1996). "Assessment of radio-frequency electromagnetic radiation by the micronucleus test in bovine peripheral erythrocytes." *Science of the Total Environment*, **180**: 81-85.
- Barteri, M., A. Pala and S. Rotella (2005). "Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity." *Biophys Chem* **113**(3): 245-253.
- Beason, R. C. and P. Semm (2002). "Responses of neurons to an amplitude modulated microwave stimulus." *Neurosci Lett* **333**(3): 175-178.
- Benjie Chen, K. F., Melina Fan. (2004). "Addgene." 2013, from <https://www.addgene.org/16403/>.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell and R. W. Finberg (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." *Science* **275**(5304): 1320-1323.
- Bhattarai, S. R., S. Y. Kim, K. Y. Jang, K. C. Lee, H. K. Yi, D. Y. Lee, H. Y. Kim and P. H. Hwang (2008). "Laboratory formulated magnetic nanoparticles for enhancement of viral gene expression in suspension cell line." *J Virol Methods* **147**(2): 213-218.
- Biolabs, N. E. "NEBcutter V2.0." 2014, from <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.

Blank, M. and R. Goodman (2009). "Electromagnetic fields stress living cells." Pathophysiology **16**(2-3): 71-78.

Boulanger, P. A. and G. E. Blair (1991). "Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins." Biochem J **275** (Pt 2): 281-299.

Carmody, S., X. L. Wu, H. Lin, M. Blank, H. Skopicki and R. Goodman (2000). "Cytoprotection by electromagnetic field-induced hsp70: a model for clinical application." J Cell Biochem **79**(3): 453-459.

Contreras, J. L., C. A. Smyth, D. T. Curiel and D. E. Eckhoff (2004). "Nonhuman primate models in type 1 diabetes research." ILAR J **45**(3): 334-342.

Chroboczek, J., F. Bieber and B. Jacrot (1992). "The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2." Virology **186**(1): 280-285.

Dasdag, S., M. A. Ketani, Z. Akdag, A. R. Ersay, I. Sari, O. C. Demirtas and M. S. Celik (1999). "Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats." Urol Res **27**(3): 219-223.

Di Carlo, A., N. White, F. Guo, P. Garrett and T. Litovitz (2002). "Chronic electromagnetic field exposure decreases HSP70 levels and lowers cytoprotection." J Cell Biochem **84**(3): 447-454.

Di Carlo, A. L., J. M. Mullins and T. A. Litovitz (2000). "Thresholds for electromagnetic field-induced hypoxia protection: evidence for a primary electric field effect." Bioelectrochemistry **52**(1): 9-16.

Dimitrov, T., P. Krajcsi, T. W. Hermiston, A. E. Tollefson, M. Hannink and W. S. Wold (1997). "Adenovirus E3-10.4K/14.5K protein complex inhibits tumor necrosis factor-induced translocation of cytosolic phospholipase A2 to membranes." J Virol **71**(4): 2830-2837.

Fields, B. N. (1996). Adeno Viruses: the viruses and their replication. Philadelphia, Lippincott-Raven

Garaj-Vrhovac, V., Horvat, D. and Koren, Z. (1991). "The relationship between colony-forming ability, chromosome aberrations and incidence of micronuclei in V79 Chinese hamster cells exposed to microwave radiation " Mutation Research **263**: 143-149.

Giannoukakis, N., W. A. Rudert, P. D. Robbins and M. Trucco (1999). "Targeting autoimmune diabetes with gene therapy." Diabetes **48**(11): 2107-2121.

Giannoukakis, N., A. Thomson and P. Robbins (1999). "Gene therapy in transplantation." Gene Ther **6**(9): 1499-1511.

Goodman, R. and M. Blank (2002). "Insights into electromagnetic interaction mechanisms." J Cell Physiol **192**(1): 16-22.

Han, L., H. Lin, M. Head, M. Jin, M. Blank and R. Goodman (1998). "Application of magnetic field-induced heat shock protein 70 for presurgical cytoprotection." J Cell Biochem **71**(4): 577-583.

Harui, A., S. Suzuki, S. Kochanek and K. Mitani (1999). "Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors." J Virol **73**(7): 6141-6146.

Hatfield, L. and P. Hearing (1991). "Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo." Virology **184**(1): 265-276.

Hearing, P., R. J. Samulski, W. L. Wishart and T. Shenk (1987). "Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome." J Virol **61**(8): 2555-2558.

Heredia-Rojas, J. A., A. O. Rodriguez de la Fuente, J. M. Alcocer Gonzalez, L. E. Rodriguez-Flores, C. Rodriguez-Padilla, M. A. Santoyo-Stephano, E. Castaneda-

- Garza and R. S. Tamez-Guerra (2010). "Effect of 60 Hz magnetic fields on the activation of hsp70 promoter in cultured INER-37 and RMA E7 cells." In Vitro Cell Dev Biol Anim **46**(9): 758-763.
- Heredia-Rojas, L., Rodríguez-Flores, M., Santoyo-Stephano, E., Castañeda-Garza, A. y Rodríguez-de la Fuente, A. (2003). "Los campos electromagnéticos: ¿Un problema de salud pública?." Respyn **4**: 1-10.
- Hong, F. T. (1995). "Magnetic field effects on biomolecules, cells, and living organisms." Biosystems **36**(3): 187-229.
- Hunt, K. K. and S. A. Vorburger (2002). "Tech.Sight. Gene therapy. Hurdles and hopes for cancer treatment." Science **297**(5580): 415-416.
- Hyland, G. J. (2000). "Physics and biology of mobile telephony." Lancet **356**(9244): 1833-1836.
- Imler, J. L., F. Dupuit, C. Chartier, N. Accart, A. Dieterle, H. Schultz, E. Puchelle and A. Pavirani (1996). "Targeting cell-specific gene expression with an adenovirus vector containing the lacZ gene under the control of the CFTR promoter." Gene Ther **3**(1): 49-58.
- Invitrogene. (2014). "Custom Primers - OligoPerfect™ Designer." from <https://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716&icid=fr-oligo-6?CID=fl-oligoperfect>.
- Junkersdorf, B., H. Bauer and H. O. Gutzeit (2000). "Electromagnetic fields enhance the stress response at elevated temperatures in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Bioelectromagnetics **21**(2): 100-106.
- Kay, M. A., J. C. Glorioso and L. Naldini (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med **7**(1): 33-40.
- Kolodynski, A. A. and V. V. Kolodynska (1996). "Motor and psychological functions of school children living in the area of the Skrunda Radio Location Station in Latvia." Sci Total Environ **180**(1): 87-93.
- Kramarenko, A. V. and U. Tan (2003). "Effects of high-frequency electromagnetic fields on human EEG: a brain mapping study." Int J Neurosci **113**(7): 1007-1019.
- Lai, H. and N. P. Singh (1995). "Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells." Bioelectromagnetics **16**(3): 207-210.
- Latchman, D. S. (2001). "Heat shock proteins and cardiac protection." Cardiovasc Res **51**(4): 637-646.
- Leone, L., S. Fusco, A. Mastrodonato, R. Piacentini, S. A. Barbati, S. Zaffina, G. Pani, M. V. Podda and C. Grassi (2014). "Epigenetic modulation of adult hippocampal neurogenesis by extremely low-frequency electromagnetic fields." Mol Neurobiol **49**(3): 1472-1486.
- Leopold, P. L. and R. G. Crystal (2007). "Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends." Adv Drug Deliv Rev **59**(8): 810-821.
- Lin, H., M. Blank and R. Goodman (1999). "A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter." J Cell Biochem **75**(1): 170-176.
- Lin, H., R. Goodman and A. Shirley-Henderson (1994). "Specific region of the c-myc promoter is responsive to electric and magnetic fields." J Cell Biochem **54**(3): 281-288.
- Lin, H., M. Head, M. Blank, L. Han, M. Jin and R. Goodman (1998). "Myc-mediated transactivation of HSP70 expression following exposure to magnetic fields." J Cell Biochem **69**(2): 181-188.
- Lin, H., M. Opler, M. Head, M. Blank and R. Goodman (1997). "Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells." J Cell Biochem **66**(4): 482-488.

Lis, J. and C. Wu (1993). "Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along." *Cell* **74**(1): 1-4.

Magras, I. N. and T. D. Xenos (1997). "RF radiation-induced changes in the prenatal development of mice." *Bioelectromagnetics* **18**(6): 455-461.

Marino, A. A., E. Nilsen and C. Frilot (2003). "Nonlinear changes in brain electrical activity due to cell phone radiation." *Bioelectromagnetics* **24**(5): 339-346.

McNamee, J. P. and V. Chauhan (2009). "Radiofrequency radiation and gene/protein expression: a review." *Radiat Res* **172**(3): 265-287.

Medicine, E. R. i. M. Representative map of the genome of adenovirus. *Cambridge University Press University of Cambridge School of Clinical Medicine*.

Morehouse, C. A. and R. D. Owen (2000). "Exposure to low-frequency electromagnetic fields does not alter HSP70 expression or HSF-HSE binding in HL60 cells." *Radiat Res* **153**(5 Pt 2): 658-662.

Morimoto, R. I. (1993). "Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes." *Science* **259**(5100): 1409-1410.

Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators." *Genes Dev* **12**(24): 3788-3796.

Mountain, A. (2000). "Gene therapy: the first decade." *Trends Biotechnol* **18**(3): 119-128.

Novoselova, E. T. and E. E. Fesenko (1998). "[Stimulation of production of tumor necrosis factor by murine macrophages when exposed in vivo and in vitro to weak electromagnetic waves in the centimeter range]." *Biofizika* **43**(6): 1132-1133.

Papatheofanis, F. J. (1990). "Use of calcium channel antagonists as magnetoprotective agents." *Radiat Res* **122**(1): 24-28.

Obiogene, I. "AdEasy Vector System. Application Manual Version 1.4." from <http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/endocrinology/research/m-adeasy.pdf>.

Rauschhuber, C., A. Wolf and A. Ehrhardt (2011). "Transcriptional activity of inverted terminal repeats of various human adenovirus serotypes." *J Gen Virol* **92**(Pt 3): 669-674.

Robertson, J. A., A. W. Thomas, Y. Bureau and F. S. Prato (2007). "The influence of extremely low frequency magnetic fields on cytoprotection and repair." *Bioelectromagnetics* **28**(1): 16-30.

Rodriguez-De la Fuente, A. O., J. M. Alcocer-Gonzalez, J. A. Heredia-Rojas, C. Rodriguez-Padilla, L. E. Rodriguez-Flores, M. A. Santoyo-Stephano, E. Castaneda-Garza and R. S. Tamez-Guerra (2012). "Effect of 60 Hz electromagnetic fields on the activity of hsp70 promoter: an in vivo study." *Cell Biol Int Rep* (2010) **19**(1): e00014.

Rodriguez de la Fuente, A. O. (2006). Aplicacion de un promotor inducible por campos electromagneticos para manipular la expresion de luciferasa como gene reportero. Doctado en Ciencias con acentuación en Microbiología, Universidad Autonoma de Nuevo León.

Rodriguez de la Fuente, A. O. (2008). Aplicación de un promotor inducible por Campos Electro Magneticos para manipular la expresión de luciferasa como gene reportero, Universidad Autonoma de Nuevo León.

Rubinichik, S., S. Lowe, Z. Jia, J. Norris and J. Dong (2001). "Creation of a new transgene cloning site near the right ITR of Ad5 results in reduced enhancer interference with tissue-specific and regulatable promoters." *Gene Ther* **8**(3): 247-253.

Salford, L. G., A. E. Brun, J. L. Eberhardt, L. Malmgren and B. R. Persson (2003). "Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones." Environ Health Perspect **111**(7): 881-883; discussion A408.

Shi, B., R. R. Isseroff and R. Nuccitelli (2003). "Power line frequency electromagnetic fields do not increase the rate of protein synthesis in human skin fibroblasts as previously reported." Bioelectromagnetics **24**(7): 465-472.

Shi, Q., Y. Wang and R. Worton (1997). "Modulation of the specificity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector." Hum Gene Ther **8**(4): 403-410.

Smith, C. A., L. S. Woodruff, C. Rooney and G. R. Kitchingman (1998). "Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells." Hum Gene Ther **9**(10): 1419-1427.

Smith, C. W. and S. Best (1989). Electromagnetic man : health and hazard in the electrical environment. New York, St. Martin's Press.

Spengler, G., A. Molnar, Z. Schelz, L. Amaral, D. Sharples and J. Molnar (2006). "The mechanism of plasmid curing in bacteria." Curr Drug Targets **7**(7): 823-841.

Stephen, S. L., V. G. Sivanandam and S. Kochanek (2008). "Homologous and heterologous recombination between adenovirus vector DNA and chromosomal DNA." J Gene Med **10**(11): 1176-1189.

Suzuki, K., K. Mitsui, E. Aizawa, K. Hasegawa, E. Kawase, T. Yamagishi, Y. Shimizu, H. Suemori, N. Nakatsuji and K. Mitani (2008). "Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 13781-13786.

Szmigielski, S., A. Bortkiewicz, E. Gadzicka, M. Zmyslony and R. Kubacki (1998). "Alteration of diurnal rhythms of blood pressure and heart rate to workers exposed to radiofrequency electromagnetic fields." Blood Press Monit **3**(6): 323-330.

Tanner, J. A. (1966). "Effect of microwave radiation on birds." Nature **210**(5036): 636.

Techonologies, A. (20). AdEasy™ Adenoviral Vector System. Instruction Manual. C: 39.

Techonologies, A. (20). AdEasy™ Adenoviral Vector System. Instruction Manual. C: 39.

Thomas Albrecht, M. F., Istvan Boldogh, and Alan S. Rabson. (1996). Medical Microbiology. Medical Microbiology. Baron S, University of Texas Medical Branch at Galveston.

Thomas, C. E., A. Ehrhardt and M. A. Kay (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." Nat Rev Genet **4**(5): 346-358.

Tokalov, S. V. and H. O. Gutzeit (2004). "Weak electromagnetic fields (50 Hz) elicit a stress response in human cells." Environ Res **94**(2): 145-151.

Velizarov, S., P. Raskmark and S. Kwee (1999). "The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal." Bioelectrochem Bioenerg **48**(1): 177-180.

Walleczek, J. (1992). "Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling." FASEB J **6**(13): 3177-3185.

Weisbrot, D., H. Lin, L. Ye, M. Blank and R. Goodman (2003). "Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*." J Cell Biochem **89**(1): 48-55.

Yamamoto, M., J. Davydova, K. Takayama, R. Alemany and D. T. Curiel (2003). "Transcription initiation activity of adenovirus left-end sequence in adenovirus vectors with e1 deleted." J Virol **77**(2): 1633-1637.

Zeng, M., S. K. Smith, F. Siegel, Z. Shi, K. R. Van Kampen, C. A. Elmetts and D. C. Tang (2001). "AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination." Biotechniques **31**(2): 260-262.

Zhadin, M. N. (2001). "Review of russian literature on biological action of DC and low-frequency AC magnetic fields." Bioelectromagnetics **22**(1): 27-45.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Humberto Antonio Salazar Sesatty

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE CON UN PROMOTOR SINTÉTICO DE RESPUESTA A CAMPO ELECTROMAGNÉTICO

Campo de Estudio: Biología Molecular, Bioinformática, Genómica

Datos Personales: Nacido en Nueva Rosita, Coahuila el 11 de agosto de 1985, hijo de Humberto Salazar Orihuela y Rosalba Sesatty de Hoyos

Educación: Egresado de Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Lic. en Biotecnología Genómica en el 2009

Experiencia Profesional: Profesional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde el 2010.