

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LA TRANSGÉNESIS DE VECTORES ADENOVIRALES QUE EXPRESAN CASPASA 3 EN CÉLULAS MCF-7 CON USO POTENCIAL EN TERAPIA GÉNICA CONTRA CÁNCER

Carlos Alberto Tavira Montalvan, Angélica Meneses Acosta.

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209

E-mail: angelica_meneses@uaem.mx

Palabras clave: adenovirus, PCR, caspasa 3.

Introducción. El cáncer es un término usado para definir un conjunto de enfermedades en el que las células se caracterizan por tener: potencial ilimitado para replicarse, resistencia a la apoptosis, evasión inmune y reprogramación metabólica¹. El estudio de la resistencia hacia generar muerte celular programada (apoptosis) ha permitido el establecimiento de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de varios tipos de cáncer². La línea celular MCF7 es un ejemplo de modelo *in vitro* de cáncer de mama en el que se ha observado que el gen de caspasa-3 no se encuentra expresado. Por ello, dicho linaje celular servirá para comprobar el restablecimiento de la función de esta proteína por medio de una transgénesis terapéutica³. Así, el objetivo de este trabajo presentar la caracterización de adenovirus de primera generación que expresan caspasa 3 (Ad5-Casp3) en la célula de cáncer de mama MCF-7 para inducir muerte celular programada, con la finalidad de considerar su uso como potencial biofármaco para terapia génica⁴.

Metodología. La construcción del vector Ad5-Casp3 se realizó con el kit Adeno-X™ Expression System 1 (CLONTECH) (Cat.631513). El gen *Casp3* fue amplificado por PCR a partir del plásmido de expresión pcDNA3-Casp3-myc (Addgen #11813), el gen *Casp3* fue clonado en los plásmidos pshuttle2 y pAdeno-X del Adeno-X™ Expression System 1. La cepa competente de *E. coli DH5α* fue transformada con cada plásmido y la selección de los clones positivos fue hecha por PCR, patrón de digestión y secuenciación. Posteriormente el plásmido fue purificado por miniPrep (THERMOSCIENTIFIC). Las células HEK293 fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 (INVITROGEN) y el pAdeno-Casp3 para generar la primera generación de adenovirus recombinantes que expresan *Casp3* (Ad5-Casp3) amplificados por subcultivos subsecuentes hasta el pase 6. Se midió la viabilidad de cultivos de células MCF-7 transducidos con el vector Ad5-Casp3 por el método colorimétrico MTS (PROMEGA) y la muerte celular apoptótica por citometría de flujo, fragmentación de ADN y microscopía de epifluorescencia.

Resultados. Por PCR se amplificó el gen *Casp3* en colonias positivas de *E. coli DH5α* correspondientes a las construcciones moleculares pShuttle-Casp3 (4.9 kb) y pAdeno-Casp3 (32 kb) (Fig. 1). La transfección en células HEK293 permitió generar y amplificar el vector Ad5-Casp3. La medición de muerte celular apoptótica por citometría de flujo demostró que la transducción de células MCF-7 con el vector Ad5-Casp3 tuvo un efecto sobre la viabilidad de estos cultivos (Figura 1).

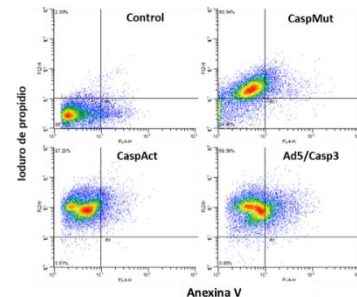


Fig. 1. Citometría de flujo. Ensayo de Anexina V de cultivos de células MCF-7 transfectados con los plásmidos pcDNA3-Casp3-myc y pcDNA3-Casp3 C163A-myc y transducidos con Ad5/casp3 a las 72 h.

Conclusiones. La construcción molecular del pShuttle-Casp3 y posteriormente el pAdeno-Casp3 permitió generar el vector Ad5-Casp3 con la capacidad de inducir muerte celular en cultivos transducidos de células MCF-7.

Agradecimientos. Este trabajo fue apoyado por la beca de posgrado CONACyT con No. De becario: 668180. El financiamiento del proyecto fue realizado a través de los recursos autogenerados por la Dra. Angélica Meneses-Acosta dentro de la Facultad de Farmacia (UAEM) y el proyecto de INFR-2014 No. 226271.

Bibliografía.

1. Tiwari M, Sharma LK, Godbole MM. (2014). *Enhancement of Cell Death in High-Grade Glioma Cells*. Vol 1. Elsevier Inc.1: 235-250
2. Arya R, White K. (2015).. *Semin Cell Dev Biol*. Fe35(14): 1252-1260
3. Leong S, McKay MJ, Christopherson RI, Baxter RC. (2012). Biomarkers of breast cancer apoptosis induced by chemotherapy and TRAIL. *J Proteome Res*. 11(2): 1240-1250
4. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, et al. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis*. 4(2):43-63.