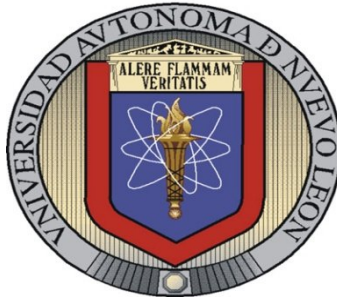


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CD133: BLANCO TERAPÉUTICO EN CÁNCER

Presenta

M. en B.E. Marisol Blancas Mosqueda

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Julio 2012

CD133: BLANCO TERAPÉUTICO EN CÁNCER.

COMITÉ DE TESIS

Dra. Cristina Rodríguez Padilla.
PRESIDENTE

Dr. Pablo Zapata Benavides.
SECRETARIO

Dr. Moisés Armides Franco Molina.
VOCAL 1

Dra. Laura María Trejo Ávila.
VOCAL 2

Dr. Edgar Mendoza Gamboa.
VOCAL 3

Dra. María del Carmen Mondragón de la Peña.
ASESOR EXTERNO

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, a la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Inmunología y Virología por su apoyo en la realización de este Doctorado, en especial a la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Pablo Zapata Benavidez**, por brindarme su confianza y apoyo.

A la **Universidad Autónoma de Zacatecas**, a la Unidad Académica de Biología Experimental y al laboratorio de Biología de la conservación por su apoyo, en especial al Sr. Rector: **M. en C. Francisco Javier Domínguez Garay y a la Dra. Carmen Mondragón de la Peña** por su apoyo incondicional en la realización de este Doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el apoyo económico recibido, sin lo cual no hubiera podido realizar esta meta.

A todos **mis maestros** que con su experiencia, supieron orientarme:

Maestra Herlinda Bielman

Dra. Lidia Guadalupe Rivera

Dra. Diana Reséndez Pérez

Dra. Laura Trejo Ávila

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Maestro José Luis Méndez Vázquez

Dra. Marisa Mercado Reyes

A todos **mis compañeros** que con su ayuda y paciencia hicieron posible alcanzar mi meta.

Diana Cárdenas Chaves por sus útiles consejos y sobre todo por su invaluable amistad.

Paola Janet García Jacobo, por su valiosa ayuda en citometría.

Santiago Saavedra Alonso por sus sabios consejos.

Claudio Moreno Rocha, por su amable atención y ayuda.

Erick Blancas por su invaluable ayuda en biotecnología genómica.

Alan Roberto Hernández Llamas por cooperar con su tiempo, en mis papeleos académicos.

Y a todos mis compañeros que compartieron conmigo esta estancia en la UANL

Manuela Citlali Chacón Cardosa

Jannet Edith Salinas Hernández

Regina Elizondo Gonzales

Edgar Manilla Muños

Karina Chávez de Saavedra

Teo Cavazos Vallejo

Itza Luna Cruz

Diana Fabiola Miranda Hernández

Crystel Aleyvick Sierra Rivera

A Ismael Malagón por su valioso apoyo en el análisis estadístico.

A las secretarias que con su amable servicio, facilitaron mi estancia.

Betty Lomas Huizar

Anita Puente

Laura

Perita

Catarino

Evita.

¡MIL GRACIAS!

DEDICATORIAS

Este esfuerzo te lo dedico a ti, mi princesa, mi tesoro más grande en la vida,
Gracias porque me sigues queriendo, a pesar de que robe tu tiempo para cumplir
mis sueños,

Gracias a Dios por ponerte en mi camino e iluminarlo con tu sonrisa y no
satisfecho con eso y por su misericordia infinita, me abrió las puertas a mi
superación personal.

Por ti y para ti **Mariana.**

LISTA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. HIPÓTESIS.....	20
3. OBJETIVO GENERAL.....	20
4. OBJETIVOS PARTICULARES	20
5. IMPORTANCIA.....	21
6. JUSTIFICACIÓN.....	22
7. ANTECEDENTES.....	23
7.1. CÁNCER	23
7.2. CÉLULAS MADRE.....	23
7.3. CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER.....	24

7.4. LA MOLÉCULA CD 133.....	26
7.5. ASOCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER CON LA MOLÉCULA CD133.....	27
7.6. CD133 EN CONDICIONES DE HIPOXIA.....	28
7.7. VALOR PRONÓSTICO DE CD133.....	30
7.8. TERAPIA GÉNICA:	32
7.8.1. TERAPIA ANTISENTIDO.....	32
7.8.2. Los oligonucleótidos antisentido (ASO)	33
7.8.3. RNA antisentido.....	33
7.8.4. El RNA de interferencia (iRNA) y pequeño RNA horquilla.....	34
7.8.5. Ribozimas (RZ)	34
7.9. GENES BLANCO PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL CÁNCER.....	35
7.9.1. p53, blanco en apoptosis	36
7.9.2. TNFα, blanco antitumoral.....	36
7.9.3. Peroxiredoxinas, blancos en estrés oxidativo.....	36
7.9.4. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), blanco en proliferación.....	37

7.10.	VECTORES DE TRANSFECCIÓN	37
8.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
8.1.	CULTIVO DE LINEAS CELULARES DE CÁNCER.....	39
8.2.	OBTENCIÓN DEL RNA.....	39
8.2.1.	SÍNTESIS DEL cDNA.....	40
8.2.2.	RT-PCR	40
8.3.	EXTRACCIÓN DE PROTEINAS.....	41
8.4.	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS Y WESTERN BLOT.....	42
8.5.	INMUNOFLUORESCENCIA	43
8.6.	INMUNOCITOQUÍMICA.....	43
8.7.	CITOMETRIA DE FLUJO.....	44
8.8.	AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD133+ POR MEDIO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	45
8.9.	PRUEBA DE QUIMIORESISTENCIA.....	45
8.10.	DISEÑO DE UN RNA ANTISENTIDO (As-CD133)	46
8.10.1.	REACCIÓN DE DIGESTIÓN.....	47
8.10.2.	PURIFICACIÓN EN GEL DEL PRODUCTO DE PCR.....	47
8.10.3.	LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTIÓN	48

8.10.4. PREPARACIÓN DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> DH5 α	48
8.10.5. TRANSFORMACIÓN DEL PRODUCTO DE LIGACIÓN.....	49
8.10.6. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO (MIDI).....	49
8.10.7. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CLONAS SELECCIONADAS.....	50
8.11. TRANFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.....	51
8.11.1. Solución As-CD133-PEI	51
8.12. ANALISIS DE MTT PARA VIABILIDAD CELULAR.....	51
8.13. TINCIÓN CON NARANJA DE ACRIDINA PARA IDENTIFICAR APOPTÓISIS.....	52
8.14. PCR MÚLTIPLE PARA GENES APOPTÓTICOS.....	52
8.15. EFECTO COMBINADO DEL AS-CD133 Y CISPLATINO	53
8.15.1. Tratamiento 1	54
8.15.2. Tratamiento 2	54
8.15.2.1. Solución A.....	54
8.15.2.2. Solución B.....	54
9. ESTADÍSTICA	54

10.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	55
11.	RESULTADOS	
11.1.	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CD133 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES.....	56
11.2.	AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD133+ DE LAS LÍNEAS B16F10.....	58
11.3.	AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD133+ DE LAS LÍNEAS MCF7 E INER 51.....	60
11.4.	QUIMIORESISTENCIA DE CÉLULAS CD133+.....	62
11.5.	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN RNA ANTISENTIDO CONTRA LA MOLÉCULA CD133 (As-CD133).	64
11.6.	ANÁLISIS DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL As-CD133 CONTRA LAS LÍNEAS CELULARES.....	66
	11.6.1.1. Disminución de la proteína y el mRNA de CD133 en células B16F10 transfectadas con el As-CD133.....	68
	11.6.1.2. Identificación del mecanismo de muerte provocado por el As- CD133 en la línea B16F10	70
11.7.	EFFECTO DE COMBINACIÓN DE AS-CD133 Y CISPLATINO EN LAS LÍNEAS B16F10, MCF7 E INER 51.....	72

12. DISCUSIÓN.....	74
13. CONCLUSIONES.....	79
14. PERSPECTIVAS.....	80
15. LITERATURA CITADA.....	81
16. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Programa para la amplificación de las regiones CD133-1 y CD133-2	44
II. Primers CD133-1 y CD133-2.....	51
III. Programa para la amplificación del MPCR para genes apoptóticos.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura.	Página
Figura 1. Determinación de la expresión de CD133 en líneas celulares de cáncer.....	63
Figura 2. Aislamiento de células CD133+ de la línea B16F10.....	64
Figura 3. Aislamiento de células CD133+ de las líneas MCF7 e INER 51.....	66
Figura 4. Prueba de quimioresistencia de las células CD133+ y CD133-.....	68
Figura 5. Diseño y construcción de As-CD133.....	70
Figura 6. Transfección de las líneas celulares con el As-CD133.....	72
Figura 7. Análisis de viabilidad celular de las células Transfectadas con el As-CD133.....	73
Figura 8. Disminución de la expresión de CD133 por medio del As-CD133 en la línea B16F10.....	74
Figura 9. Mecanismo de muerte provocado por el As-CD133 en la línea B16F10.....	75
Figura 10. Efecto de la combinación de As-CD133 y cisplatino.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

A427	Línea celular de cáncer de pulmón
ABCG	Cassette de unión a ATP, sub-familia G
cDNA	Cadena complementaria de ácido desoxirribonucleico
As-CD133	Antisentido de CD133
ATP	Adenosin trifosfato
B16F10	Línea celular de melanoma murino
B27	Marcador de células madre
BamHI	Enzima de restricción obtenida de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Bcl2	Proteína anti-apoptótica de leucemia linfocítica de células B
BCL-XL	proteína de linfoma de células B extra larga
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos b
C57BL/6	Cepa de ratones
CCL15	Ligando de quimiocina (motivo C-C) 15
CD133	Grupo de diferenciación 133 de células madre
CD133-	Población de células que carecen de este marcador CD133
CD133+	Población de células que expresan el marcador CD133
CD24	Grupo de diferenciación 24 de células hematopoyéticas y neurales inmaduras
CD44	Grupo de diferenciación 44 también llamada glicoproteína fagocítica 1, molécula de adhesión que se sobre-expresa en cáncer de diferentes tejidos, relacionados con migración y progresión del tumor
CXCL12	Quimiocina, también llamada factor derivado estromal 1 (SDF-1),
CXCL6	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6

CXCR4	Receptor de quimiocinas de superficie celular
CXCR4 (CD184)	Receptor de superficie acoplado al dominio de transmembrana 7 de la proteína G
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EcoRI	Enzima de restricción obtenida de E. coli
EDG5	Gen de diferenciación endotelial 5
EGF	Factor de crecimiento endotelial
ERBB2	Homólogo del oncogén viral de leucemia eritroblástica 2
EREG	Epiregulina
ERK1/2	Señal extracelular regulada por cinasa 1
FGF3	Factor de crecimiento de fibroblastos 3
FGFBP1	Factor de crecimiento de fibroblastos unido a proteína 1
FHF2	Homólogo del factor de crecimiento de fibroblastos 2
FLIP	Proteína inhibidora de fas ligando
FRAP1	Proteína asociada a rapamicina 1
GDF15	Factor de crecimiento y diferenciación 15
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
Gli1	Oncogén homólogo asociado a glioma 1
HIF-1 alfa	Factor inducible de hipoxia-1 alfa
IHCC	Colangiocarcinoma intrahepático
IL12A	Interleucina 12A
IL-6	Interleucina 6
INER 51	Línea celular de cáncer de pulmón

L1CAM	Molécula de adhesión neural L1
L5178YR	Línea celular de linfoblastoma murino
LB medio	Medio Luria-Bertoni
MCF7	Línea celular de cáncer de mama
MGMT	O6-metilguanina-DNA- metiltransferasa
3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazolium bromuro	
mTOR	Marcadores de rapamicina en mamíferos
NGFR	Receptor del factor de crecimiento neural
Notch	Proteínas ligadas al receptor transmembranal activado involucrado en la selección de células grasas a través del desarrollo
Notch2	Proteína homóloga al locus neurogénico notch 2
NRG1	Neuregulina 1
Oct4	Proteína 4 de unión a Octámero
P3X63Ag8.653	Línea celular de mieloma murino
PBS 1X	Buffer de fosfatos 1:10
PCRM	PCR múltiple
PDGFB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad B
PDGFB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad B
pEGFP-N3	Vector con proteína verde fluorescente N terminal
PI3K- Akt	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PSA	Persulfato de amonio
PTN	Pleiotrofina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Retrotranscriptasa, reacción en cadena de la polimerasa
STAB1	Stabilina-1
TIMP2	Inhibidor de metalopeptidasa 2

VEGF-C

Factor de crecimiento endotelial y vascular C

XIAP

Proteína X inhibidora de apoptosis

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, por lo cual una línea de investigación en este campo, está enfocada en encontrar nuevas y eficaces formas de tratamiento, una de ellas es la terapia génica, la cual entre su amplia gama de herramientas utiliza los RNA antisentidos para bloquear moléculas relacionadas con procesos carcinogénicos, como lo es la molécula CD133, que es una glicoproteína de membrana que se sobre-expresa en células malignas con características similares a células madre en varios tumores y que está relacionada con malignidad y progresión del tumor. El objetivo de este trabajo fue bloquear la expresión de la molécula CD133 en líneas celulares de cáncer. Material y métodos: Se utilizaron líneas celulares de cáncer B16F10, MCF7, INER51, A427, L5178YR y P3X63Ag8, y por medio de RT-PCR, Western Blot, Inmunocitoquímica e Inmunofluorescencia se identificó la molécula CD133. Se aislaron células CD133+ por medio de Partículas Magnéticas y Citometría de flujo, Además se diseñó y construyó un RNA antisentido (As-CD133) contra la molécula CD133 y análisis del efecto de la combinación del As-CD133 y cisplatino. Los resultados obtenidos fueron: 1) la identificación de la expresión del mRNA de la molécula CD133 en todas las líneas celulares antes mencionadas, en base a este resultado se seleccionaron las líneas celulares B16F10, MCF7 e INER51 para continuar los análisis, debido a su facilidad de cultivo y transfección. La expresión de la proteína en las líneas celulares fue alta, detectando un 70% de células CD133+, notándose un patrón de expresión difuso y marcado en las células B16F10 y MCF7 y un patrón de expresión localizado en las células INER 51. 2) En el aislamiento de células CD133+ por medio de Partículas Magnéticas se encontró un alto porcentaje en las líneas celulares B16F10 (24%), MCF7 (16%) e INER51 (6%) y por Citometría de Flujo se encontró el 6% de células CD133+ en la línea B16F10. 3) Posteriormente en los ensayos de transfección con el AS-CD133 se observó una disminución de la expresión de la proteína CD133, además de cambios morfológicos y disminución de la viabilidad celular en las líneas B16F10 (42%) ($p < 0.05$), MCF7 (48%) ($p < 0.05$) e INER 51 (71%) a las 48hrs posteriores a la transfección, el daño causado a las células fue dependiente de dosis ($\rho = -0.4$). 4) Se determinó que el tipo de muerte provocado fue por la vía de apoptosis, y que el tratamiento con el As-CD133, en combinación con cisplatino es capaz de disminuir significativamente ($p < 0.05$) la viabilidad de las células de la línea B16F10 (3.1%) comparado con los tratamientos por separado (48% con 0.4 μ g de As-CD133 y 25% con 5ng/ μ L cisplatino). Con los anteriores resultados concluimos que existen dentro de las líneas celulares de cáncer células madre con el fenotipo CD133+ y que esta molécula es de importancia para la viabilidad de las células, pudiendo ser un blanco terapéutico contra células madre de cáncer que expresen el fenotipo CD133+.

ABSTRACT

The cancer is one of the main causes of death in the developed countries, a line of investigation in this field, is focused in finding new and effective treatments, one of them is the gene therapy, which by its wide range of tools uses the mRNA antisense to block molecules related to carcinogenic processes, like the CD133 protein, that is a membrane glycoprotein, expressed on hematopoietic, neural, endothelial and epithelial stem cells. CD133 has been overexpressed on malignant cells with characteristics similar to stem cells in several tumors and it is related to malignant and progression of the tumor. The aim of this work is inhibit the CD133 protein expression to determine the biologic effect on different cancer cell lines (B-16F10, MCF-7, INER51, A427, L5178YR and P3X63Ag8.653, by design and construction of an mRNA antisense (As-CD133). The CD133 protein expression was very high (70% positive cells) in all the cancer cell lines tested and determined by RT-PCR, Western Blot, immunocytochemistry, immunofluorescence and flow cytometry assays; and the As-CD133 effect on different cancer cell lines was evaluated by MTT assay. The isolation of CD133+ cells using magnetic particles was: B16F10 (24%), MCF7 (16%) and INER51 (6%) cell line; 6% of CD133+ cells in B16F10 cell line by flow cytometry. The CD133+ and CD133- cells from all the cancer cell lines tested were sensitive to cisplatin, shown a not significant difference. The transfection assays using As-CD133, decreased the CD133 protein expression, changed the morphology and decreased the cell viability of B16F10 (RCV=42%), MCF7 (RCV=48%) and INNER 51 (RCV=71%) cell line. The As-CD133 effect on all the cancer cell lines treated was through apoptosis and it was dose dependent effect. The treatment with As-CD133 in combination with cisplatin was able to decrease significantly the cell viability of B-16F10 (RCV=3,1%) cell line compared to the treatments by separate (48% RCV with 0.4 μ g of As-CD133 and 25% RCV with 5ng/ μ L of cisplatin, respectively). Our results demonstrated that stem cells (phenotype CD133+) may exist within the cancer cells and this molecule is important for cell proliferation, being able to be a therapeutic target against cancer stem cells that express phenotype CD133+.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la alteración morfológica y funcional seguida de la proliferación descontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen otros tejidos sanos del organismo. Las muertes por cáncer están aumentando, se estima que a lo largo del siglo XXI, el cáncer será la primera causa de muerte en los países desarrollados, por lo que grupos de investigación en todo el mundo, están enfocados en encontrar nuevas alternativas de tratamiento para este padecimiento, una de las estrategias es la creación de terapia génica, como lo son los RNA antisentido, dirigidos contra marcadores moleculares que son sobre-expresados en cáncer y relacionados con proliferación, tomándolos como blancos terapéuticos, pudiendo contribuir a detener el cáncer. Se han estudiado varias moléculas que están involucradas con proliferación y metástasis, como lo es la molécula CD133, que es una glicoproteína de membrana, que se expresa en células progenitoras y células madre hematopoyéticas, neurales, endoteliales y epiteliales, sin embargo, CD133 es un marcador de células madre de cáncer, sobre-expresado en la membrana celular de varios carcinomas, como por ejemplo: glioblastoma, retinoblastoma, cáncer de pulmón, carcinoma renal y en algunas leucemias, por lo que creemos que el estudio de este marcador, sería de interés científico para generar terapias en contra del cáncer.

2. HIPÓTESIS

El biomarcador CD133 es esencial para la viabilidad de las células tumorales y puede ser un blanco terapéutico en líneas celulares de cáncer CD133+.

3. OBJETIVO GENERAL

Bloquear la expresión de la molécula CD133 en las líneas celulares de cáncer por medio de un RNA antisentido.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la expresión de la molécula CD133 en las líneas celulares B16F10, MCF7, INER 51, A427, L5178YR y P3X63Ag8.653.
2. Aislamiento y determinación del porcentaje de células CD133+ en las líneas celulares de cáncer por medio de citometría de flujo y partículas magnéticas.
3. Diseño y construcción de un RNA antisentido (As-CD133) para bloquear la expresión de la molécula CD133 y evaluar su efecto en proliferación celular.
4. Determinación del mecanismo de muerte celular provocado por el As-CD133.
5. Determinar el efecto de la combinación del As-CD133 con cisplatino sobre las líneas celulares de cáncer.

5. IMPORTANCIA

El cáncer es la alteración morfológica y funcional seguida de la proliferación descontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen otros tejidos sanos del organismo. El cáncer es la segunda causa de muerte. Sin embargo las muertes por cáncer están aumentando. Se estima que a lo largo del siglo XXI, el cáncer sea la primera causa de muerte en los países desarrollados, diferentes grupos de investigación están enfocados en encontrar nuevas alternativas de tratamiento para este tipo de padecimiento, por lo que la creación de terapias que ayuden a detener la proliferación, metástasis y recurrencias del cáncer es de suma importancia.

6. JUSTIFICACIÓN

CD133 que es una glicoproteína de membrana que está siendo utilizada como un marcador de células cancerosas, se ha visto que se sobre-expresa en células madre de cáncer por lo que encontrar un mecanismo por el cual se induzca la apoptosis de células madre CD133+ relacionadas con procesos carcinogénicos, ayudaría en el tratamiento de varios tipos de enfermedades cancerosas. Por lo que se propone que el bloqueo de la actividad biológica de la molécula CD133 por medio de un RNA antisentido podría contribuir al entendimiento de las células madre de cáncer CD133+ y el inicio de una posible terapia génica, la cual podría evitar: periodos prolongados de quimioterapias o radioterapias, deterioro de la salud de los pacientes y recurrencias de cáncer.

7. ANTECEDENTES

7.1. CÁNCER

El cáncer es una enfermedad ocasionada por células del organismo que pierden sus mecanismos normales de control y presentan un crecimiento desordenado. Estas células pueden desarrollarse a partir de cualquier tejido u órgano, y a medida que crecen y se multiplican, invaden órganos adyacentes hasta propagarse por todo el cuerpo. Su extensión en otras zonas se debe a un efecto de metástasis, es decir, la diseminación de células cancerosas a través de la sangre o del sistema linfático (Greenwald y Dunn, 2009). Las células cancerosas surgen como consecuencia de daños en el DNA, ocasionado por múltiples factores tales como: fumar, alcoholismo, infecciones virales, herencia genética, condiciones ambientales (Grandics, 2006; Greenwald y Dunn, 2009). Según la organización mundial de la salud, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, se le atribuyen 7,9 millones de defunciones (aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales) ocurridas en el 2007. Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual son los siguientes: pulmón (1,4 millones de defunciones), estómago (866,000 defunciones), hígado (653,000 defunciones), colon (677,000 defunciones) y mama (548 999 defunciones). Aproximadamente el 72% de las defunciones por cáncer ocurridas en el 2007 se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en el 2030 (OMS, 2010). Se ha visto que las células cancerosas tienen características parecidas a las células madre, lo que hace a este tipo de enfermedades más resistentes a los tratamientos.

7.2. CÉLULAS MADRE

Las células madre se pueden definir como células que pueden auto-renovarse y diferenciarse en una variedad de tipos celulares. La auto-renovación da lugar a una copia exacta de la célula madre si se divide simétricamente o a una célula con capacidad de

diferenciación si se divide asimétricamente (Cogle *et al.*, 2003). Según sus potenciales de diferenciación, las células madre se pueden dividir en células totipotentes, pluripotentes y multipotentes. En las etapas del desarrollo embrionario, cada célula del blastómero se puede considerar como una célula madre totipotente, con enorme capacidad de auto-renovación y diferenciación y con la capacidad de formar un organismo vivo entero. La masa interna del blastocisto, de donde se pueden aislar las células madre embrionarias pluripotentes que son capaces de formar los tejidos de las tres capas germinales, pero incapaces de formar a un ser vivo entero.

En algunos tejidos u órganos de adultos, también se encuentran pequeños grupos de células que tengan las características de las células madre, estas células se llaman células madre adultas, o células madre multipotentes, su capacidad de diferenciación se limita a las líneas del tejido u órgano-específicas (Liu *et al.*, 2005). Fisiológicamente, las células madre adultas son muy importantes en el mantenimiento de la homeostasis. Cada día, se sacrifican muchos tipos de células, tales como granulocitos, queratinocitos, hepatocitos y eritrocitos que mantienen la homeostasis del organismo. Para que un individuo prospere, las células perdidas deben ser substituidas constantemente, las células madre tiene la capacidad para reparar y regenerar incluso en los órganos como los islotes pancreáticos y el cerebro (Sharpless y DePinho 2004). El estudio de las células madre adultas, abre nuevas vías para la investigación biológica básica usando las células madre adultas como alternativa en el tratamiento de enfermedades degenerativas y a la reparación de órganos dañados (Liu *et al.*, 2005).

7.3. CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

En 1855 Virchow propone la hipótesis de los residuos embrionarios para la formación del tumor, basado en las similitudes histológicas entre los tumores y el tejido embrionario (Wagner, 1999), posteriormente Julius Conheim sugirió que los tumores se desarrollan a partir de remanentes embrionarios durante la organogénesis (Kucia y Ratajczak, 2006). Posteriormente estudios en leucemia mielocítica aguda, mostraron que

una pequeña población de células CD134+CD138-, al ser transplantada en ratones inmunodeficientes, dieron origen a la leucemia y conservaron el inmunofenotipo característico de células madre hematopoyéticas normales. También se encontró este tipo de células en tumores sólidos incluyendo glioblastoma, cáncer de mama y próstata (Diehn *et al.*, 2006). Las células madre normales dan origen a células progenitoras multipotentes, y células maduras diferenciadas, si se generan mutaciones en su desarrollo, se formarían células madre con proliferación aberrante, resultando una lesión premaligna. Algunas hipótesis indican que las mutaciones adicionales de una célula madre lleva a la adquisición de una descontrolada **proliferación**, **evasión** del sistema inmune y **expansión** de las células madre aberrantes, características típicas de las células tumorales malignas (Dou *et al.*, 2007, Nurcombe y Cool, 2007). En base a todo esto se postuló la siguiente hipótesis a finales de los 70's, la teoría de **LAS CÉLULAS MADRE DE CÁNCER**, que implica que una minoría de células dentro del tumor poseen propiedades de células madre como lo son: la autorenovación, la capacidad de dar origen a una progenie diferenciada, de larga sobrevivencia, y crecer en estructuras tridimensionales en la ausencia de adhesión (Wright *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006, Gal *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2005), además de la habilidad para controlar la **división celular**, resistencia a **apoptosis** expresando altos niveles de supresores de apoptosis (Bcl2, FLIP, BCL-XL) y varios inhibidores de proteínas apoptóticas (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP) (Dell, 2008; Liu *et al.*, 2006), activación de varios de los caminos de señalización molecular asociados con el **desarrollo** de las células madre normales: (Wnt, Shh, Notch) que también son activos en el desarrollo de cáncer y también la presencia de cassette transportadores unidos a ATP pertenecientes a la familia de ABC, (MDR-1, MRP-1, ABCA2, ABCA3 y ABCG2) los cuales ayudan a la **remoción de drogas** de las células, haciéndolas más resistentes a las quimioterapias (Sims *et al.*, 2005, Wright *et al.*, 2008, Dell, 2008; Liu *et al.*, 2006).

Las células madre de cáncer son la fuente de iniciación, progresión y recurrencia de muchos tumores (Abbott, 2006; Maeda *et al.*, 2008, Smith *et al.*, 2008; Gal *et al.*, 2007; Dou *et al.*, 2007), por otra parte también se ha visto que varias líneas celulares de cáncer humanas y murinas contienen una pequeña fracción de células que tienen la propiedad

de células madre de cáncer, estas células son drogo resistentes, expresan genes relacionados con células madre normales y tienen alta capacidad para reconstituir los tumores in vivo (Wright *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Gal *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006).

7.4. LA MOLECULA CD 133

Esta molécula denominada Prominin 1, AC133 o CD133 es una glicoproteína de membrana perteneciente a la familia “multipases”, de 865 aa (120 kDa) en humanos y 858 aa (115 kDa) en ratón (Shmelkov *et al.*, 2005), CD133 tiene una estructura única, consistiendo de un dominio extracelular amino terminal, 5 dominios transmembrana, dos grandes azas extracelulares, y una cola citoplásmica, tiene 8 sitios potenciales de N-glicosilación: cinco en el primer aza y tres en la segunda (Shmelkov *et al.*, 2004). La molécula CD133 es el producto del gen del cromosoma 4 (4p15.23) en humanos o cromosoma 5 (5B3) en ratones, ambos tienen organización genómica similar, consistiendo al menos de 37 (humanos) y 34 (ratones) exones aproximadamente de 160 kb. El tamaño del transcripto es de 4.4 kb en ambas especies (Shmelkov *et al.*, 2005).

La expresión de la molécula CD133 ha sido implicada en la polaridad celular, la cual es requerida para el movimiento celular lo cual es crucial para los procesos de quimiotaxis, desarrollo embrionario, crecimiento invasivo y metástasis. La polaridad celular también es importante para la división celular asimétrica, una característica de las células madre (Immervoll *et al.*, 2008). La función biológica de la molécula CD133 es la protrusión de la membrana plasmática, la cual involucra un micro dominio que se relaciona con colesterol. Implicada en la formación de la cola del espermatozoide y en la formación de discos foto receptores de las células de la retina, los cuales son ricos en colesterol. Se ha reportado que una simple mutación en el nucleótido 1864 previene el transporte de la molécula CD133 a la superficie celular, provocando degeneración retiniana (Fargeas *et al.*, 2004). La molécula CD133 se ha visto expresada en la membrana apical, en la división asimétrica de la célula, durante el desarrollo del sistema nervioso y en la división simétrica de las células neuroepiteliales, estos estudios ligan al dominio de la

membrana plasmática en los cuales está presente la molécula CD133 (Immervoll *et al.*, 2008). Chang *et al.*, (2007) propusieron la participación de CD133 en el metabolismo de la glucosa y la alteración del citoesqueleto.

7.5. ASOCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER CON LA MOLÉCULA CD133

La molécula CD133 se sobre-expresa en células madre de cáncer en varios tipos de tumores malignos, como lo son: glioblastoma (Beier *et al.*, 2007), pulmón (Hilbe *et al.*, 2004), riñón (Bruno *et al.*, 2006), melanoma (Mackie *et al.*, 2009), ovario (Torne *et al.*, 2006), hígado (Lotersztajn *et al.* 2005), colon (Shmelkov *et al.*, 2008), retinoblastoma (Fargeas *et al.*, 2004) leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda (Toren *et al.*, 2005) siendo identificadas en todos los casos como CD133+ (Gal *et al.*, 2007) además de relacionarse con la proliferación y angiogénesis en estos tipos de tumores (Sims *et al.*, 2005, Wright *et al.*, 2008, Dou *et al.*, 2007).

Se ha visto que el trasplante de células de glioblastoma humano CD133+ y CD133- muestra un comportamiento totalmente diferente, por ejemplo, al transplantar 100 células de glioblastoma CD133+, formaron tumor en ratones inmunodeficientes, mientras que el trasplante de 1×10^5 de células CD133- no formaron tumor en los ratones, por lo que se concluye que la molécula CD133 tiene un papel importante en las características tumorigénicas de las células (Beier *et al.*, 2007).

Las células madre de cáncer CD133+/ ABCG2+ son capaces de activar una serie de mecanismos responsables del crecimiento del tumor y recurrencia tales como la activación de varios transportadores de drogas ABC, activación de puntos de control en el ciclo celular para la detección de algún daño al DNA, activación de sistemas de reparación de DNA, alta expresión de proteínas inhibitoras de apoptosis y supresoras de apoptosis, expresión de elevados niveles de CXCR4 (receptor de quimiocinas de superficie celular) relacionada a alto potencial invasivo, además de que se a correlacionado con la sobre-expresión de una proteína denominada “Nestin” indicando

que las células tumorales están en un estadio diferenciado, con una motilidad celular elevada la cual se correlaciona con invasividad y malignidad (Dell, 2008; Liu *et al.*, 2006, Maeda *et al.*, 2008).

El aislamiento de células madre de cáncer CD133+ de tumores de glioblastoma tuvieron la capacidad para auto renovarse, potencial clonogénico y sostener la expresión del marcador CD133 al ponerlo en medio libre de suero y factores de crecimiento y se observó que estas células manejan la progresión de tumor (Liu *et al.*, 2006; Gal *et al.*, 2007).

7.6. CD133 EN CONDICIONES DE HIPOXIA.

Se ha visto que la expresión de la molécula CD133 se ve afectada por factores del microambiente celular como lo es la disminución de los niveles de oxígeno, como lo muestran los siguientes estudios:

Pistollato *et al.*, (2010) observaron que imágenes de las áreas intra-tumorales de glioblastoma, muestran heterogeneidad celular, correlacionada con el gradiente de tensión de oxígeno dentro del tumor, indicando que las células más indiferenciadas están localizadas en la parte interna e intermedia de la masa tumoral, mientras que las células diferenciadas, están distribuidas a lo largo del área periférica y neo-vascularizada del tumor. Por otra parte, las células madre de glioblastoma CD133+, expresaron altos niveles de la proteína O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT), que interviene en la reparación del DNA y está implicada en la resistencia a quimioterapia, cuya expresión es más alta en la base interna de la masa tumoral.

Las condiciones de hipoxia/normoxia han demostrado ser un regulador del equilibrio entre el estado diferenciado e indiferenciado de las células. Después de someter a las células CD133+ derivadas de medula ósea con capacidad de generar células hematopoyéticas y endoteliales (ECs), a periodos hipóxicos, se observó que incrementaron su capacidad de crecimiento en unidades formadoras de colonias EC a

las 24 h (143.2 +/- 8.0%), y el análisis de RT-PCR e inmunotinción demostraron que estas células disminuyeron sus marcadores de célula madre y adquirieron los marcadores del fenotipo diferenciado hematopoyético y endotelial, por otra parte el análisis de genes por microarreglos, reveló que un grupo de 232 genes, entre ellos los inhibidores de la angiogénesis IL12A, MLLT7, STAB1, y TIMP2, muestran baja expresión, mientras que un grupo de 498 genes, entre ellos el factor de crecimiento angiogénicos, citocinas, quimiocinas y genes angiogénicos incluyendo FGF1, PDGFB, CCL15, CXCL12, CXCL6, IL-6, PTN, EREG, ERBB2, EDG5, FGF3, FHF2, GDF15, JUN, L1CAM, NRG1, NGFR, y PDGFB se encuentran sobre-expresados en las células tratadas con 24h bajo hipoxia. Concluyendo con estos resultados que el pre condicionamiento hipóxico/normóxico puede llevar a la diferenciación de las células CD133+ hacia el linaje endotelial (Ong *et al.*, 2010).

Soeda *et al* (2009), determinaron que la generación de un ambiente hipóxico del 1% de oxígeno promueve la capacidad de auto-renovación de las células madre de cáncer CD133+ derivadas de gliomas humanos además de conservar el fenotipo no diferenciado mientras que las células madre de cáncer (CMC) cultivadas en normoxia no lo hicieron. El incremento de la auto-renovación de las CMC CD133+ en hipoxia fue precedida por la sobre-expresión de HIF-1alfa. Estos resultados sugieren que la respuesta a la hipoxia de las CMC implica la activación de HIF-1alfa para incrementar la actividad de auto-renovación de las células de CD133+ y para inhibir la inducción de diferenciación de las CMC. Este estudio ilustra la importancia del microambiente del tumor en la determinación del comportamiento celular.

McCord *et al.*, (2009) en sus investigaciones *in vitro* con CMC aisladas de pacientes con glioblastoma crecidas bajo condiciones de oxígeno del 20% y 7%. Observaron que las células CD133+ crecidas con 7% de oxígeno, redujeron su tiempo de duplicación y aumentaron el potencial de auto-renovación evaluado por su capacidad de replicación, además, los cultivos exhibieron un incremento en la capacidad para diferenciarse a los linajes glial o neuronal, dando lugar a un aumento en los niveles de la expresión de los marcadores de células madre, como CD133 y Nestin, así como los marcadores Oct4 y Sox2. Mientras que la expresión del HIF-1alfa no fue afectada en las células CD133+

bajo estas condiciones, mientras que el HIF-2 alfa fue expresado cuando las células permanecieron en niveles más altos al 20% del oxígeno. Indicando que el crecimiento en el nivel mínimo fisiológico de oxígeno 7%, realza el fenotipo de células madre CD133+ de glioblastoma.

7.7. VALOR PRONÓSTICO DE CD133

La molécula CD133 se considera como un factor de valor pronóstico en diferentes tipos de cáncer, como por ejemplo:

El marcador de células madre CD133, se expresa en hígado fetal pero no en hígado adulto normal y se re-expresa en hígados cancerosos, este patrón de expresión es similar a la alfa-fetoproteína que es un indicativo de hepatocarcinomas en adultos, sugiriendo que CD133 juega un papel oncogénico en carcinoma hepatocelular. También se encontró que el incremento de la expresión de CD133 se correlaciona con un tumor de alto grado de malignidad e histología altamente diferenciada en carcinoma hepatocelular, considerando la sobre-expresión del CD133 como un factor de pobre pronóstico (Song *et al.*, 2008).

Maeda *et al.*, (2008) correlacionaron la expresión de CD133 con parámetros de invasión y metástasis de nódulos linfáticos en cáncer de páncreas, además de que observaron una asociación significativa entre la expresión de la molécula CD133 y el factor de crecimiento vascular y endotelial C, además observaron la correlación entre el pronóstico de pacientes con cáncer de páncreas y el porcentaje de células CD133+, observando que el índice de supervivencia a 5 años, de pacientes con tumores CD133- fue mayor (23.5%) que los pacientes con el 5% de células CD133+ (3.4% de supervivencia), y que los pacientes con más del 5% de CD133+ (0.0% de supervivencia).

Smith *et al.* (2008) mencionan que la expresión de la molécula CD133 en tumores puede variar, de una pequeña subpoblación de células a una significativa proporción de células

cancerosas (>25%) dentro del tumor, las cuales son supuestas células madre de cáncer, pero no todas las células que expresan la molécula CD133 presentan las propiedades de células madre.

Dell *et al.* (2008) observó que las células CD133+ son caracterizadas por una resistencia intrínseca a agentes quimioterapéuticos tales como temozolomida, carboplatino, paclitaxel y etoposida lo que complica el pronóstico de sobrevivencia de los pacientes.

Las células B16F10 con fenotipos de CD133+, CD44+, CD133+CD44+ y CD44+CD133+CD24+ presentaron fuerte potencial tumorigénico después de ser inoculadas en ratones C57BL/6 en comparación con los fenotipos CD133-, CD44-, CD44+CD133-, CD2+CD133+CD24-, cuyo volumen de tumor fue menor (0.55cm^3) que los positivos (1.8cm^3) (Dou *et al.*, 2007).

La expresión de CD133 en oligodendrogliomas de grado IV es un indicador de mal pronóstico, siendo empleado para definir las diferencias biológicas entre el grado III y IV de la clasificación de los tumores cerebrales, además se observó, que éstas células son capaces de formar esferas y proliferar *in vitro* (Beier *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006).

Shimada *et al.*, (2010), evaluó el índice de supervivencia a cinco años de 29 pacientes con IHCC (colangiocarcinoma intrahepático), encontrando que los pacientes cuyas muestras hepáticas, analizadas por medio de inmunohistoquímica, 14 presentaron células CD133+, mostrando un índice de supervivencia del 8%, mientras que los otros 15, que presentaron células CD133- presentaron un índice de supervivencia del 57%, lo mismo sucedió con la incidencia de metástasis intrahepática y la expresión del factor inducible hipoxia-1alpha (FIH-1alfa) siendo mayor en los pacientes cuyas muestras hepáticas presentaron células CD133+. Concluyendo que la expresión CD133 es un indicador de mal pronóstico en IHCC.

7.8. TERAPIA GÉNICA:

La cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y combinaciones entre estas, son sin duda, las terapias más utilizadas en el manejo del cáncer (Zitelli *et al.*, 1997), la búsqueda y desarrollo de diversas modalidades de tratamiento para los carcinomas a llevado a realizar numerosos esfuerzos por encontrar nuevas estrategias, ensayando combinaciones con terapias existentes, sin embargo, no se ha logrado incrementar la sobrevivencia de los pacientes en forma significativa.

La terapia génica es una modalidad emergente y muy prometedora para el tratamiento del cáncer, la cual se define como la transferencia de nuevo material genético dentro de una célula para obtener un beneficio terapéutico, esto mediante: a) reemplazo o inactivación de genes disfuncionales, b) reemplazo o adición de genes funcionales, o c) inserción de un gen dentro de una célula para inducir una respuesta inmune o citotóxica (Mulherkar *et al.*, 2001).

7.8.1. TERAPIA ANTISENTIDO

Los elementos antisentidos son secuencias complementarias al mRNA del gen que se desea reprimir y su acción es específica sobre los genes blancos. En la actualidad existen grandes avances en este tipo de terapias, dirigidas contra el cáncer ya sea suprimiendo la acción de los genes involucrados en el proceso neoplásico, así como apoptosis, progresión tumoral, angiogénesis entre otros. Se han logrado significativos progresos en esta área, sin embargo, se requiere seguir trabajando en la mejora de la terapia antisentido y los agentes de liberación, para mejorar su eficacia, en el combate contra el cáncer (Mahato *et al.*, 2005; Pain y Clawson, 2006; Popescu, Popescu, 2007).

Las herramientas de terapia génica más utilizados son: oligonucleótidos antisentido, RNA de interferencia (iRNA) y ribozimas (RZ).

7.8.2. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) son polímeros sintéticos cortos (15-25 nucleótidos), de una sola cadena de ácidos nucleicos, que inducen la inhibición de la expresión de genes blanco, al unirse al mRNA. Los mecanismos de acción de los ASO son tres: 1) la interacción de los ASO y el mRNA a través del apareamiento de bases nitrogenadas, impidiendo que los ribosomas lleven a cabo los procesos de traducción para la síntesis de proteínas, 2) activando la RNasa H, que se encarga de degradar al mRNA complementario 3) formación de una triple hélice incluyendo a los ASO y el DNA de doble cadena, impidiendo la replicación del DNA, todos estos mecanismos, previenen la síntesis de proteínas específicas (Chan *et al.*, 2006; Ulanova y Schreiber, 2006; Ferrari *et al.*, 2006).

Los ASO de primera generación tienen una modificación en su estructura, una sustitución de los átomos de oxígeno de las uniones fosfodiéster por sulfuros, dando como resultado fosforotioato, los cuales incrementan la resistencia a nucleasas de los ASO, sin embargo estos ASO fosforotioatos tienen la desventaja de unirse al factor de crecimiento de fibroblastos, impidiendo su unión a los receptores celulares, lo que provocaría efectos adversos al ser administrados por vía sistémica, además de causar hepatotoxicidad, debido a la presencia de dinucleótidos CpG, ya que pueden estimular al sistema inmune, estimulando a los receptores Toll like receptor 9, de varios tipos celulares, las cuales secretan citocinas pro-inflamatorias. Se ha observado que la aplicación local de los ASO es más efectiva, evitando los efectos adversos y mejorando los resultados de inhibición génica (Singh *et al.*, 2010)

La segunda generación de ASO contiene nucleótidos con modificaciones alquil en la posición 2' de la ribosa, la cual incrementa la afinidad de unión al mRNA y la resistencia a la degradación y poco riesgo de activar al sistema inmune. La tercera generación de ASO, contiene ácidos nucleicos-peptídicos como lo son los morfolino-oligonucleótidos. Debido a la baja penetrabilidad de los ASO de segunda y tercera generación a las células, la primera generación es la que comúnmente se utiliza (Singh *et al.*, 2010; Popescu y Popescu, 2007).

7.8.3. RNA antisentido, Es un mecanismo de silenciamiento de genes a nivel postranscripcional, específica de secuencia, consiste de una molécula de RNA de cadena

única, la cual es transcrita a partir de un plásmido de expresión, clonado con una secuencia antisentido, la cual al expresarse en la célula transfectada, va a generar el RNA antisentido que se va a unir a su mRNA blanco formando un RNA de doble cadena la cual va a ser procesada por una actividad de corte de la enzima RNasa H, evitando así la traducción (Xu *et al.*, 2009).

7.8.4. El RNA de interferencia (iRNA) y pequeño RNA horquilla (shRNA), son las herramientas de terapia génica más poderosas y ampliamente usadas en el tratamiento del cáncer. Es un mecanismo que silencia genes a nivel postranscripcional específica de secuencia, una molécula de RNA de doble cadena de origen endógeno o exógeno presente en las células, es procesada por una actividad de corte de la enzima DICER (ribonucleasa tipo III) en fragmentos nucleotídicos pequeños de 21 a 23 pb llamado RNA de interferencia pequeño (siRNA), estos son incorporados en un complejo celular de multiproteínas nucleasas llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA), la cadena dúplex de siRNA es separada por una RNA helicasa, este complejo se activa por la cadena sencilla del siRNA y lo guía a su mRNA complementario blanco, el siRNA se une con el mRNA y el complejo RISC cataliza el corte endonucleotídico del mRNA blanco, resultando en extremos de RNA no protegidos que rápidamente son degradados (Soutschek *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2006; Dutreix *et al.*, 2010; Mello y Conte 2004).

7.8.5. Ribozimas (RZ) son moléculas sintéticas de RNA, catalíticamente activas, capaces de degradar el mRNA blanco, con una alta especificidad de la secuencia, las RZ-cabeza de martillo (RZ hammerhead), presentan una base catalítica que se une a cualquier triplete de nucleótidos-NUH (donde N puede ser cualquier ribonucleótido y H puede ser cualquier ribonucleótido excepto guanósina) y dos hélices que se unen al mRNA blanco. La horquilla RZ se une generalmente después de una secuencia BNGUC (donde B puede ser cualquier nucleótido excepto la adenosina, N puede ser cualquier ribonucleótido, G guanina, U uracilo, y C citocina) (Vorobjeva *et al.*, 2006). La terapia antisentido es un nuevo enfoque en el empleo de tratamientos más útiles y eficaces contra un amplio rango de enfermedades. Comprende desde las infecciosas víricas

(incluyendo al SIDA), a otras de tipo neurodegenerativo (tales como el Alzheimer o el Parkinson), pasando por otras cuyos principales componentes sean genéticos o inmunológicos, situando en éstas a las muy diversas formas de cáncer (Popescu y Popescu, 2007; Morán y Domínguez, 2005). Por lo que las estrategias terapéuticas antisentido diseñadas, tienen el potencial para satisfacer necesidades incumplidas en el tratamiento contra el cáncer, actuando a nivel molecular, por lo cual es de vital importancia encontrar blancos moleculares involucrados en procesos vitales para las células cancerosas (Popescu 2005; Popescu y Popescu, 2007, Bindi *et al.*, 2007).

7.9. GENES BLANCO PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL CÁNCER

Los estudios biomédicos extensos han demostrado que los factores de riesgo, clínicos y ambientales pueden no tener suficiente poder predictivo para el pronóstico y tratamiento del cáncer. El desarrollo de tecnologías permite la examinación del genoma y la búsqueda de marcadores con alto poder predictivo (Ma *et al.*, 2010).

Hay varias razones en el aumento del uso de biomarcadores en el combate contra el cáncer: (i) la identificación de nuevos agentes carcinogénicos, (ii) la mayor comprensión de mecanismos carcinogénicos y (iii) progresos técnicos en biología molecular y genéticas. Los biomarcadores miden tempranamente acontecimientos biológicos que ocurren entre la exposición a agentes carcinogénicos y el desarrollo del cáncer, éstos incluyen toxicidad celular o del tejido, alteraciones cromosómicas, cambios en el DNA o RNA y la expresión y alteración de proteínas en las funciones relevantes a la carcinogénesis (reparación del DNA, respuesta inmunológica, etc.) (Boffetta, 2010), además de que cada año se incrementa el número de nuevos hallazgos que revelan proteínas o vías involucradas en la supervivencia y proliferación celular que podrían ser prometedores blancos de terapia génica contra el cáncer (Dutreix *et al.*, 2010), como por ejemplo: el gen p53, TNF α , peroxiredoxinas, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

7.9.1. p53, blanco en apoptosis

Factores relacionados al microambiente del tumor han emergido como determinantes críticos de la multi-resistencia a drogas. Al crecer la masa tumoral, se crean limitaciones en la difusión de nutrientes y oxígeno. En la privación de oxígeno las células inician una respuesta adaptativa centrada en deshabilitar uno o más pasos en la vía de la apoptosis, que puede ayudar a las células tumorales a superar otros daños incluso daño al DNA causados por la radioterapia. La inactivación del supresor de tumor p53, es uno de los más frecuentes eventos observados en el cáncer humano y predictor de resistencia a terapia. La restauración de la actividad de p53 por la expresión del gen clonado en un vector ad5, incrementa significativamente la sensibilidad a radiación de las células tumorales (Dutreix *et al.*, 2010).

7.9.2. TNF α , blanco antitumoral

El daño producido por el TNF α puede aumentar el daño celular producido por la radiación ionizante. Varias pruebas clonogénicas *in vitro* sugieren que una interacción aditiva puede ocurrir entre el TNF- α y la radiación ionizante, así como un incremento en los efectos antitumorales. La adición de un vector clonado con el gen de TNF- α (conteniendo un promotor inducible por radiación) y la radioterapia aumentó el índice terapéutico en pacientes con cáncer pancreático avanzado o cáncer de esófago (Weichselbaum *et al.*, 2009).

7.9.3. Peroxiredoxinas, blancos en estrés oxidativo.

Las peroxiredoxinas (PRDXs) es una familia de proteínas involucradas en la protección contra el estrés oxidativo a través de la detoxificación de los peróxidos celulares. La PRDX1 reduce los niveles de especies de oxígeno reactivo inducido por radioterapia, esta molécula se ha visto sobre-expresada en cáncer de pulmón. Se observó que en xenotrasplantes de adenocarcinoma de colon inyectados con un vector expresando un siRNA contra PRDX y posteriormente irradiadas, inhibía el crecimiento del tumor (Zhang *et al.*, 2008).

7.9.4. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), blanco en proliferación

Es bien conocido que los tumores grandes que contienen un número más elevado de células, necesitan altas dosis de radiación para alcanzar el control local que los tumores más pequeños, por lo que la Inhibición de la proliferación de las células cancerosas disminuyendo el EGFR puede disminuir el volumen tumoral. La administración de plásmidos que expresan un RNA antisentido contra EGFR, indujo la regresión parcial del tumor en pacientes con carcinoma humano de células escamosas de cuello y cabeza (SCCHN) refractario a las terapias estándar, incluyendo cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, (Lai et al., 2009).

7.10. VECTORES DE TRANSFECCIÓN

Otro factor importante en la terapia génica son los **vectores de transfección**, que son agentes que ayudan a introducir material genético a las células, protegiéndolo de la degradación. Se dividen en virales y no virales, los vectores no-virales basados en el uso de lípidos o de polímeros catiónicos, tienen un potencial prometedor, ya que suplen los problemas de seguridad encontrados con los vectores virales (Morille et al 2008). Dentro de los polímeros catiónicos, actualmente se utiliza el polímero catiónico polietilenimina (PEI) el cual forma complejos con el DNA que se quiera introducir a las células.

La **PEI** ha demostrado ser un potente agente de transfección de DNA en una gran variedad de líneas celulares y animales. De hecho la PEI ha sido capaz de liberar moléculas de DNA de hasta 2.3Mb de cromosomas artificiales de levadura, así como plásmidos y pequeños oligonucleótidos, en células de mamífero *in vitro* e *in vivo*. Existe la teoría del protón-esponja que explica su capacidad de liberación dentro de la célula. Cada tercer átomo de PEI es un nitrógeno protonable, el nivel total de protonación debe elevarse cuando el pH al interior del compartimiento lisosomal cae a pH=5, llevando a

la afluencia de los iones cloruro y por lo tanto, a la hinchazón osmótica y a la ruptura del lisosoma. El escape temprano del complejo de la DNA-PEI del lisosoma, evita su degradación, presentándose el efecto del protón esponja, siendo la causa de la alta eficacia de la transfección por PEIs (Thomas y Klibanov, 2002).

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer B16F10 de melanoma murino, MCF7 de cáncer de mama, A427 e INER 51 de cáncer de pulmón y L5178YR de linfoblastoma murino y P3X63Ag8.653 de mieloma murino. Las líneas celulares B16F10, MCF7, A427 e INER fueron cultivadas y mantenidas en el medio Dubelco's modified Eagle's (DMEMF-12), y las líneas celulares L5178YR y P3X63Ag8.653, con medio RPMI, siendo suplementadas todas, con suero fetal bovino (FBS) al 10%, e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

8.2. OBTENCIÓN DEL RNA

Para identificar las líneas celulares que expresaran el marcador CD133, se hizo la extracción del RNA, para la posterior amplificación del mRNA de la molécula CD133 por medio de RT-PCR, con los primer CD133-1 y CD133-2 de la tabla I, siguiendo el protocolo de TRIzol, el cual brevemente se describe: a 3×10^6 células de las líneas celulares de cáncer MCF7, B16F10, INER 51, A427, P3X63Ag8.653, se les agregó 0.5 mL de reactivo TRIzol (Gibco, Grand Island, NY, USA), se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se agregó 0.125 mL de cloroformo para separar las fases RNA-proteínas posteriormente se incubó 3 min a temperatura ambiente; la muestra se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4° C; después se separó la fase acuosa de la muestra, se transfirió a un tubo nuevo, y se precipitó el RNA, con 0.250 mL de isopropanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente, y se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 10 min a 4° C; se descartó el sobrenadante, se agregó 0.1 mL de etanol al 75% en agua-DEPC para eliminar sales, se mezcló la muestra y se centrifugó a 7,500 x g por 10 min a 4° C; se descartó el sobrenadante, y se dejó secar parcialmente, se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC y se cuantificó con espectrofotómetro a 260 nm; el producto final fue almacenado a -70° C.

8.2.1. SÍNTESIS DEL cDNA.

Una vez obtenido el RNA se sintetizó el cDNA mezclando 5 µg de RNA total, 1 µL de Oligo (dt) (500 µg/mL) (Invitrogen, California, USA), 1 µL de la mezcla de dNTPs 10 mM (Bioline, Randolph, MA, USA), y agua-DEPC a un volumen de 12 µL, la mezcla se incubó 5 min a 65° C e inmediatamente después se colocó en hielo para desnaturalización y unión del oligonucleótido respectivamente; a la mezcla se adicionó 4 µL de regulador de reacción 5X (Invitrogen, California, USA), 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de inhibidor de RNasas (40 unidades/µL, Invitrogen, California, USA); el contenido se mezcló e incubó a 42° C por 2 min; finalmente se adicionó 1 µL de la enzima transcriptasa reversa SUPERSRIPT II (200 u/µl) (Invitrogen, California, USA), la mezcla fue sujeta a un ciclo de 50 min a 42° C para obtener la cadena complementaria, y 15 min a 70° C para inactivar la enzima; el producto final fue almacenado a -70° C hasta su uso.

8.2.2. RT-PCR

Una vez obtenido el cDNA se amplificaron las secuencias de CD133 con los primer CD133-1 ó CD133-2, haciendo la siguiente mezcla: 2 µL de cDNA, 2.5 µL de regulador de reacción 10X (provisto por la enzima), 0.75 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µL de la mezcla de dNTPs 2.5 mM, 20 pM de cada primer, 0.25 µL de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, California, USA), y agua mQ estéril hasta un volumen de 25 µL; las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Pleier thermal cycler PTC-200, Watertown, MA, USA), bajo los programas que se describen en la tabla 2, se analizaron las secuencias amplificadas en geles de agarosa al 1% en buffer de sulfatos (SB) pH 8.0, el corrimiento se hizo a 100 Volts, 45min y la tinción con bromuro de etidio (0.625 mg/mL).

Tabla II. Programas para la amplificación de las regiones CD133-1 y CD133-2.

CD133-1		C133-2	
1 ciclo	95° C, 5 min	1 ciclo	95°C, 4 min
30 ciclos	94° C, 15 seg. 60° C, 15 seg. 72° C, 90 seg	30 ciclos	95°C, 1min. 58.1°C, 1min. 72°C, 1min
1 ciclo	72° C, 10 min	1 ciclo	72°C, 10 min.

Para corroborar los resultados de RT-PCR se hizo la identificación de la proteína CD133 en las líneas B16F10, MCF7 e INER51, por medio de las técnicas de Western Blot, Inmunocitoquímica e Inmunofluorescencia, se seleccionaron estas tres líneas ya que fueron las líneas con más fácil manejo y cultivo.

8.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para hacer la técnica de electroforesis y Western Blot se realizó la extracción de proteínas de las células con el siguiente protocolo: se dejaron crecer las células en cajas de cultivo celular de 25cm², hasta su confluencia, se retiró el medio de cultivo y se disgregó la monocapa con tripsina a temperatura ambiente (Gibco, Grand Island, NY, USA). Se centrifugaron las células y se realizó un lavado con PBS 1X. A los pellet colectados se les agregó 0.1 mL de buffer de lisis (tritón 1%, Nacl 150mM, Tris 1M, pH 7.6), y se incubó en hielo 20 min. Se centrifugó el lisado de las células a 10,000 rpm por 10 minutos a 4° C, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, y se almacenó a -70°C hasta su uso.

8.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Se prepararon mini geles de poliacrilamida al 12% acrilamida/bis acrilamida de 1 mm de grosor; para el gel separador mezclando los siguientes componentes: 1.7 mL de agua bidestilada, 2.0 mL de mezcla de acrilamida (29 g de acrilamida [Gibco, Grand Island, NY, USA] y 1 g de bis acrilamida [Gibco, Grand Island, NY, USA] aforado a 100 mL de agua bidestilada), 1.3 ml de Tris base (Sigma, USA) 1.5 M, 50 μ L de SDS 10%, 50 μ L de persulfato de amonio (PSA) (ICN Biomedicals) 10%, y 2 μ L de TEMED (ICN Biomedicals); la mezcla se depositó en el cartucho de vidrio dejando un espacio para el gel separador, inmediatamente después de depositar la mezcla, se agregó 1 mL de agua bidestilada y se incubó por 15 min a temperatura ambiente; una vez que ocurre la polimerización, el agua se retiró con papel filtro. Se preparó la mezcla del gel concentrador con los siguientes componentes: 1.4 mL de agua bidestilada, 0.33 mL de mezcla de acrilamida, 0.26 mL de Tris base 0.5 M, 20 μ L de SDS 10%, 20 μ L de PSA 10%, y 2 μ L de TEMED; se agregó al cartucho, se colocó el molde para formar los carriles y se incubó 15 min a temperatura ambiente; el cartucho se colocó en la cámara vertical para electroforesis (E-C 120 Apparatus, NY, USA) y se agregó solución de corrida Tris-glicina 1X hasta dejar inmerso el cartucho; el molde para los carriles fue retirado cuidadosamente y se eliminaron restos del gel que pudieran interferir en la deposición de las muestras; las muestras fueron preparadas mezclando vigorosamente 10 μ L de muestra y 10 μ L de solución de carga 1X y se incubaron en agua hirviendo por 5 min, se depositaron en los pozos del gel y se corrieron a 50 Volts durante tres horas, (fuente de poder, Bio-rad 3000Xi, CA, USA), posteriormente se retiró cuidadosamente el gel, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 25 volts por 2 hrs a temperatura ambiente, la membrana se sacó y se bloqueó con una solución de TBS-tween- leche (31.5g tris HCl, 80g NaCl, 0.5 %Tween, 5% leche descremada) 1 h a temperatura ambiente, se lava tres veces con TBS tween, 10min, y se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti CD133(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a una dilución 1:500, se lavó tres veces con TBS tween 10 min, y se incubó a temperatura ambiente 2hr con el anticuerpo secundario, anti conejo (Amersham Biosciences, Suecia) a una dilución

1:5000, se lavó tres veces con TBS tween 10 min cada uno, por medio de el kit Quimilab (Roche, IN, USA) y films (Kodak, CANADA INC) se reveló la membrana, utilizando solución reveladora y fijadora (Kodak, CANADA INC).

8.5. INMUNOFLUORESCENCIA

Se plaquearon las células B16F10 , I51 y MCF7, a una densidad de 1×10^5 células por pozo en una placa de 6 pozos (Nunclon surface, NUNCTm) con cubreobjetos, 24 hrs después se transfectaron con 4 μg de As-CD133, después de 48 hrs de transfección, se les retiró el medio y se le hicieron lavados con PBS 1X, las células fueron fijadas con una solución de methanol-acetona 1:1, 5 minutos a 20°C , posteriormente se retiró la solución, se hicieron lavados con PBS 1X 5 min, se almacenaron a -20°C hasta ser utilizadas. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (CD133, Santa Cruz) 1:200, con PBS IX 1 hr a temperatura ambiente, en agitación, se hicieron dos lavados de 10 min con PBS 1X 0.5% Tween, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (Alexa flúor, anti conejo, Invitrogen, California, USA.) 1:5000, 1 hr a temperatura ambiente, se hicieron otros dos lavados con PBS 1X 5% tween, y se observó al microscopio de fluorescencia (TE-Eclipse 300, Nikon).

8.6. INMUNOCITOQUÍMICA

Se plaquearon 1×10^5 células por pozo en una placa de 6 pozos (Nunclon surface, NUNCTm) con cubreobjetos, se transfectaron con $4 \mu\text{g}$ de As-CD133, después de 48 hrs de transfección, se les retiró el medio y se le hicieron lavados con PBS 1X, y posteriormente se fijaron con una solución de metanol-acetona 1:1 frio incubándose 5 min a -20°C , después se le hicieron lavados con PBS 1X y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Se utilizó el Kit DAKO para inmunocitoquímica: se descongelaron y se pasaron por varias soluciones de alcohol absoluto al 80, 70 y 50% 5 min en cada una, posteriormente se puso en la solución de antígeno retrieval (DAKO) previamente calentada a 90°C en baño maría, y se incubó a esta temperatura 20 min, se dejó enfriar 5 min a temperatura ambiente y se hicieron dos lavados con solución de lavado (TBS), se le agregó peróxido de hidrógeno al 3% 4 min a temperatura ambiente, y se hicieron otros dos lavados, posteriormente se le agregó bloqueador de proteína, se incubó 20 min a temperatura ambiente en agitación, se hicieron dos lavados con solución de lavado, se dejó incubando con el anticuerpo primario 1:200 (CD133, Santa Cruz, CA, USA) toda la noche a 4°C, posteriormente se hicieron dos lavados y se incubó con el anticuerpo secundario universal 1:2000, a temperatura ambiente y en agitación, 2hrs, haciendo dos lavados con solución de lavado, se incubó con el complejo biotina-avidina (DAKO) 1 hr a temperatura ambiente, se hicieron dos lavados y posteriormente se le agregó solución de diaminobencidina (DAKO) 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se tiñeron con hematoxilina eosina (DAKO) 10 segundos, se hicieron varios lavados con agua corriente y se incubó 5 min en cada una de las soluciones de alcohol al 70%, 80% y absoluto. Se dejaron secar y se fijaron con resina en un portaobjetos, y se observó al microscopio.

8.7. CITOMETRIA DE FLUJO

Se realizó el análisis de la línea celular B16F10 por medio de citometría de flujo, para identificar el porcentaje de células CD133+, siguiendo el protocolo especificado por el proveedor del Ac primario contra CD133 humano el cual se describe brevemente: las células B16F10 fueron cultivadas en una caja de 25 cm² con 5-mL DMEMF-12 suplementado con 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Posteriormente estas fueron disgregadas con tripsina y centrifugadas a 4,000 rpm 4 min, fueron suspendidas en solución de PBS IX, posteriormente se les adicionó 10µL de anticuerpo Anti CD133 marcado con PE (Macs, Miltenyi Biotec, inc. Gladbach, Alemania), se mezcló e incubó

40 min a 4-8°C, se lavó con 1-2mL de buffer PBS IX, se centrifugó a 300xg 10 min, se aspiró el buffer completamente y el pellet celular se resuspendió en buffer PBS IX, y fueron contadas en el citómetro (Beckman Coulter, Inc.), 10, 000 células por lectura, en base a estas se sacó el porcentaje de CD133+.

8.8. AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD133+ POR MEDIO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

Para identificar el porcentaje de células CD133+ en las líneas celulares B16F10, MCF7 e INER 51, se siguió el protocolo de separación por medio de partículas magnéticas, de la siguiente forma: las células fueron cultivadas en una caja de 25 cm² con 5-mL DMEMF-12 suplementado con 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Posteriormente estas fueron recolectadas y centrifugadas a 4,000 rpm 4 min, resuspendidas en medio libre de suero e incubadas con 1µg de anticuerpo CD133 (Santa cruz) 1 hr a 4°C en agitación suave, al término de este periodo fueron centrifugadas 4,000 rpm 4 min, resuspendidas en medio libre de suero e incubadas con anticuerpo universal biotinilado (Dako, Denmark A/S) 1hr a temperatura ambiente y agitación lenta, posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en medio libre de suero, se incubaron con 200 µL de partículas magnéticas unidas a streptavidina (Promega) 30 min a temperatura ambiente, agitación suave. Se hizo la separación de las células CD133+ con un imán, unido a la pared del tubo, y se extrajeron todas aquellas células que no fueron atraídas por el imán, ambas poblaciones fueron contadas en una cámara de Neubauer.

PRUEBA DE QUIMIORESISTENCIA

Una vez que se separaron las dos poblaciones celulares CD133+ y CD133- se procedió a hacer pruebas de quimioresistencia, para corroborar que nuestras células CD133+ tuvieran esta característica de células madre de cáncer, para lo cual se hizo el siguiente protocolo: se plaquearon las células CD133+ o CD133- en placas de 96 pozos, 3000 células por pozo se incubaron a 37°C, 5% CO₂, 24h, posteriormente se les agregó

diferentes concentraciones de cisplatino (0-12ng/ μ L) diluido en medio DMEM 10% SFB, después de 48h se le agregó la solución de MTT, (0.025gr de MTT con 5mL de buffer de fosfatos, PBS, 1X estéril) 20 μ L por pozo e incubaron a 37°C por una hora, se retiró la solución de MTT y se le agregó 100 μ L de dimetilsulfoxido por 10 min, se leyeron las placas a una D.O. de 570nm.

8.9. DISEÑO DE UN RNA ANTISENTIDO (As-CD133)

Se realizó el diseño de dos primers del mRNA de la molécula CD133 reportadas en el GenBank con el número de acceso para la secuencia de la especie *Mus musculus* NM_008935 y con el número de acceso para la secuencia de la especie *Homo sapiens* NM_006017 (NCBI, Nucleotide), con los programas primer3, NEB CUTER, BLAST y se les denominó primers CD 133-1, los cuales amplifican la secuencia desde el nucleótido 164 al nucleótido 346 del RNAm de la especie *Mus musculus*, como este par de primers serían utilizados para la construcción del RNA antisentido, se agregaron los adaptadores para las enzimas de restricción, EcoRI y BamHI para dirigir su orientación a la hora de clonarlos en el plásmido pEGFP-N3 (Clontech) (Tabla I).

De la misma forma se hizo el diseño de otro par de primers a los cuales se les denominaron CD133-2, que amplifican la secuencia del nucleótido 459 al nucleótido 622 del mRNA del gen CD133 y a los cuales no se les agregó ningún adaptador para enzimas (Tabla I).

Tabla II. Primers CD133-1 y CD133-2

	PRIMER	Tamaño del producto de PCR	Adaptadores para las enzimas de restricción
CD133-1 Forward	5' GGATCC GCTTGAGAGATCAGGCCAAC 3'	200pb	BamHI GGATCC
CD133-1 Reverse	5' GAATTC ACAATCCCAGCATTGAAGG 3'		EcoRI GAATTC
CD133-2 Forward	5' TCCAAGGAGATTGCCCTCTA 3'	201pb	-
CD133-2 Reverse	5' CATGGTGCATTCTGCTTCTG 3'		-

8.9.1. REACCIÓN DE DIGESTIÓN.

El producto de PCR de los primers CD133-1 y el plásmido pEGFP-N3, se sometieron cada uno a una reacción de digestión con las enzimas Eco RI y Bam HI, haciendo la siguiente mezcla: 2 µg de vector o 1µg de producto de PCR, 1µl de buffer10X, 0.5 µL de *BamH* I y 0.5µL de EcoRI (10u/µl) (Promega), y agua mQ estéril hasta un volumen final de 10 µL; se mezcló suavemente y se centrifugó brevemente; se incubó a 37° C por 2 h y a 70° C por 10 min para inactivar la enzima y continuar con el proceso de purificación.

8.9.2. PURIFICACIÓN EN GEL DEL PRODUCTO DE PCR.

Una vez que fueron cortados con las enzimas de restricción el producto de PCR de los primers CD133-1 y el plásmido pEGFP-N3, fueron purificados para su clonación, la reacción se realizó de la siguiente forma, el producto de PCR de los primers CD133-1 y el plásmido pEGFP-N3 se corrió en geles de agarosa al 1% y las bandas fueron observadas en un transiluminador de luz ultravioleta; la banda de interés fue cortada con

un bisturí y pesada; los fragmentos de gel fueron mezclados con solución de guanidina caotráfica (MP Biomedicals, Irving, CA, USA) a una relación de 100 μ L de solución por cada 0.1g de gel; la mezcla se incubó en agitación a 60° C hasta que el gel se fundió completamente; la solución se pasó a través de una columna adaptada para microcentrífuga (MP Biomedicals, CA, USA) y fue centrifugada durante 30 seg, el líquido filtrado en esta etapa fue descartado; el filtro fue lavado con 500 μ L de solución de lavado (MP Biomedicals, CA, USA) centrifugado durante 30 seg, el líquido filtrado fue descartado; se centrifugó adicionalmente durante 4 min a 16,000 para remover cualquier residuo de la solución de lavado; la columna fue colocada en un tubo para microcentrífuga nuevo y estéril y se recuperó el DNA, empleando solución de separación (MP Biomedicals, CA, USA), incubando 5 min a temperatura ambiente y centrifugando 1 min, una vez que fueron purificados tanto el producto de RT-PCR y el plásmido, se procedió a su ligación.

8.9.3. LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTIÓN

Los productos de RT-PCR junto con el vector, fueron ligados con la enzima T4 ligasa, haciendo la siguiente mezcla: 115 ng del vector pEGFP-N3 digerido y purificado, 150 ng del producto de PCR de traslape, digerido y purificado, 2 μ L de buffer 10X, 1 μ L de T4 ligasa (Promega, WI, USA) y agua mQ estéril hasta un volumen final de 20 μ L; se mezcló suavemente y se centrifugó 30 seg e incubó 3h a 20-25° C, teniendo como resultado el antisentido de CD133 (As-CD133).

8.9.4. PREPARACIÓN DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES DE *E. COLI* DH5 α .

Las bacterias DH5 α fueron crecidas en un volumen de 5 mL de medio líquido LB (Invitrogen, California, USA), conteniendo 10 μ g/mL de kanamicina, incubadas a 37°C a 250 rpm toda una noche hasta alcanzar una densidad óptica de 0.55 ± 0.05 a 600 nm en el espectrofotómetro (Smart Spect Plus, Bio Rad, CA, USA); se centrifugaron a 4,000 x

g por 10 min y se descartó el medio; la pastilla se suspendió en 0.4 mL de CaCl₂ frío y estéril; se repitió una etapa más de centrifugación/suspensión bajo las mismas condiciones y una vez disuelta la pastilla, se incubaron en hielo por 30 min; se centrifugó nuevamente a 4,000 x g por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 0.2 mL de CaCl₂ más 0.2 mL de glicerol estéril al 50% preparado en agua mQ. 0.1mL de esta suspensión fue adicionada en tubos eppendorf estériles y se almacenaron a -70° C hasta su empleo.

8.9.5. TRANSFORMACIÓN DEL PRODUCTO DE LIGACIÓN.

Una vez que las bacterias E. coli DH5 α calcio competentes estuvieron listas, 30 μ L de esta solución fue mezclada con 1 μ L del producto de ligación e incubados 1 h en hielo; posteriormente se incubaron a 42° C por 2 min; inmediatamente después, fueron transferidas al hielo 20 min; 1 mL de medio LB precalentado a 37°C se agregó a la mezcla y se incubó con agitación a 37° C por 1 h. Se sembraron en cajas de petri conteniendo agar LB, kanamicina y se incubaron una noche a 37° C; al día siguiente se cuantificaron las colonias visualmente, y se seleccionaron al azar algunas colonias para hacer la extracción del plásmido clonado.

8.9.6. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO (MIDI).

El DNA plasmídico fue purificado empleando el sistema Plasmid purification Midiprep Kit (Quiagen, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, la cual brevemente se describe. 50 ml de medio líquido LB estéril (UsBiological, MA, USA), conteniendo 1 μ L/mL de kanamicina (50mg/ml), se inoculó con la cepa de E. coli DH5 α transformadas e incubó a 37° C a 250 rpm toda una noche; el cultivo se transfirió a un frasco para centrifuga (Nalgene, NY, USA) y las bacterias se cosecharon a 4,000 x g por 10 min a 4° C; el medio fue descartado; la pastilla procesada por medio de un kit de purificación de DNA plasmídico (Pure Link Hipure Plasmid DNA, Purification Kit, Invitrogen, California, USA) de acuerdo al fabricante, el cual se describe brevemente: la pastilla de

bacterias fue disuelta en 4 mL de solución P1, se agregó 4 mL de solución de lisis P2 y se agitó cuidadosamente invirtiendo el frasco hasta obtener una mezcla homogénea; se agregó 4 mL de solución de precipitación P3 y se mezcló inmediatamente invirtiendo el frasco hasta obtener una mezcla homogénea; el frasco fue centrifugado a 12,000 x g por 10 min a 4° C; se recuperó el sobrenadante y se descartó la pastilla; todo el sobrenadante fue cargado en la columna de intercambio iónico, provista por el kit, previamente equilibrada con 30 mL de solución adaptadora, una vez que todo el sobrenadante pasó a través de la columna, se hicieron pasar 10 mL de solución de lavado, a través de la misma, posteriormente se agregaron 5 mL de solución de elución y el DNA fue recuperado por goteo en un tubo de 50 ml para centrífuga conteniendo 3.5mL de isopropanol; una vez que pasó todo el líquido, el tubo se cerró y el contenido se agitó vigorosamente por unos segundos para posteriormente centrifugar a 15,000 x g por 30 min a 4° C; se descartó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con etanol al 70%; posteriormente se centrifugó nuevamente a 15,000 x g por 30 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente por 10 min; la pastilla fue suspendida en 50 µL de agua mQ estéril, se cuantificó con un nodrop (Thermo Scientific,) a 260 y 230 nm y se almacenó a -70° C.

8.9.7. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS CLONAS SELECCIONADAS.

Una vez que el plásmido es recuperado, se procedió a su caracterización, siguiendo las instrucciones del fabricante, se adicionaron en un tubo eppendorf 100 ng de DNA plasmídico (5µL), 1 µL de regulador de reacción 10X, 0.5 µl de *EcoR* I y *Bam*HI (10u/µL) y agua mQ estéril hasta un volumen final de 10 µL; a continuación se mezcló suavemente y se centrifugó 30 seg; se incubó a 37° C por 2 h y a 70° C por 10 min para inactivar la enzima, los productos fueron analizados en geles de agarosa al 1%.

8.10. TRANFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

Una vez obtenido el As-CD133, se procedió a la transfección de las líneas celulares B16F10, MCF7 e INER 51, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera, se cultivaron 3000 células en placas de 96 pozos incubadas a 37°C, 5% CO₂, con medio DMEMF-12 suplementado con 10% FBS, 24 hrs después se transfectaron con 20 µL por pozo de la solución **As-CD133-PEI** que se describe más adelante y se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂, a 37°C, durante 48 hrs y fueron analizadas por medio de la técnica de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia (anteriormente descritas) para corroborar la disminución de la proteína CD133, y por medio de RT-PCR (anteriormente descrita) para ver el decremento del mRNA de la molécula CD133 y por la técnica de MTT para detectar viabilidad celular.

8.10.1. Solución As-CD133-PEI: 0.1 a 0.6µg de As-CD133 es disuelto en 10 µL cloruro de sodio al 150 µM, mas una solución de 0.01- 0.06 µL de polyethylenimina (PEI, Sigma Aldrich, USA) disuelta en 10 µL de cloruro de sodio 150µM, se mezclan ambas soluciones agregando el PEI al DNA, y se incuba por 30 min a temperatura ambiente. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

8.11. ANÁLISIS DE MTT PARA DETERMINAR VIABILIDAD CELULAR

Para corroborar el efecto citotóxico del As-CD133 sobre las líneas celulares de cáncer B16F10, MCF7 e INER 51, se llevó a cabo la técnica de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazolium bromide) (Research Organic, Cleveland, OH, USA) con el siguiente protocolo: se plaquearon 3,000 células por pozo en placas de 96 pozos, incubadas a 37°C, 5% CO₂, con medio DMEMF-12 suplementado con 10% FBS, 24hs después se transfectaron con diferentes concentraciones de As-CD133, incubadas en las mismas condiciones, 48 hrs después, se les agregó 20 µLpor pozo de la solución de MTT (5mg/ml, 0.025gr de MTT con 5mL de PBS 1X estéril) e incubaron a 37°C por una hora, se retiró la solución de MTT y se le agregó 100µL de dimetilsulfoxido por 10

min, se leyeron las placas en un lector de micro placas (Biotec Instruments) a una D.O. de 570nm.

8.12. FORMACIÓN DE CUERPOS APOPTÓTICOS.

Para determinar el mecanismo de muerte provocado por el As-CD133, se realizó la técnica de naranja de acridina para observar las células entrando en apoptosis, con el siguiente protocolo, se plaquearon 3,000 células por pozo en una placa de 96 pozos, incubadas a 37°C, 5% CO₂, con medio DMEMF-12 suplementado con 10% FBS, 24hs después se transfectaron con diferentes concentraciones de As-CD133 (1-6µg), después de 48 hrs de transfección, las células fueron teñidas con 2µL de solución de PBS-bromuro de etidio 100 µg/mL y naranja de acridina (4 mg/mL) e incubadas 5 min a temperatura ambiente en oscuridad y después fueron lavadas dos veces con PBS 1X y se observó al microscopio de fluorescencia (Olimpus IX70).

8.13. PCR MULTIPLE PARA GENES APOPTÓTICOS

Para identificar algunos genes apoptóticos que pudieran estar involucrados en la apoptosis de las células transfectadas con el As-CD133, se corrió el siguiente Kit de PCR Múltiple para genes apoptóticos (Maxim Biotech inc., MD, USA) ajustándonos a lo descrito por el fabricante, el cual se describe brevemente, células de la línea B16F10 fueron cultivadas en una caja de 25 cm² incubadas a 37°C, 5% CO₂, con 5-mL DMEMF-12 suplementado con 10% FBS. Posteriormente estas fueron recolectadas y depositadas en una placa de 96 pozos, 3000 células por pozo, se transfectaron con diferentes concentraciones de As-CD133 (1-6µg), después de 48 hrs de transfección las células fueron recolectadas y fue extraído el RNA total usando 1mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para el RT-PCR (reverse transcripción-PCR), se produjo cDNA con 5 µg of RNA total usando RT (retro transcriptasa, Invitrogen, California, USA) y un oligo (dT) (Invitrogen, California, USA). El cDNA fue amplificado usando un Kit MPCR for mouse apoptotic gene set-

1(Maxim Biotech inc. MD, USA) para los genes ICE (658 pb), CMYC (371 pb), BCL2 (233 pb), P53 (204 pb) y G3PDH, (550 pb), la amplificación se llevó a cabo en un PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc., Massachusetts, USA) de acuerdo a las instrucciones del producto (Tabla III). Las amplificaciones fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Todos los productos fueron visualizados con bromuro de etidio (Anco and Rhenium Industries Ltd, Jerusalén, Israel).

Tabla III. Programa para la amplificación del MPCR.

PCR múltiple	
1 ciclo	95°C, 4 min
30 ciclos	95°C, 1min. 58.1°C, 1min. 72°C, 1min
1 ciclo	72°C, 10 min.

8.14. EFECTO COMBINADO DEL AS-CD133 Y CISPLATINO

Para verificar si el As-CD133 podría tener un efecto combinado con cisplatino en las líneas celulares de cáncer B16F10, MCF7 e INER 51, se realizó el siguiente ensayo: se depositaron 3000 células por pozo en dos placas de 96 pozos, se incubaron con medio DMEMF-12 suplementado con 10% FBS a 37°C, 5% CO₂, durante 24h, posteriormente se agregaron los tratamientos para cada placa (**tratamiento 1 y 2**) y las células fueron incubadas, 37°C, 5% CO₂, 48 hs, después se les agrego la solución de MTT, (0.025gr de MTT con 5mL de PBS 1X estéril) 20 µL por pozo e incubaron a 37°C por una hora, se retiró la solución de MTT y se le agregó 100µL de dimetilsulfoxido por 10 min, se leyeron las placas en un lector de micro placas (Biotech Instruments) a una D.O. de 570nm.

8.14.1. Tratamiento 1, diferentes concentraciones de cisplatino (0-12ng/ μ l) diluidas en 10 μ L de medio DMEMF-12 suplementado con 10% FBS, posteriormente se aplican los 10 μ L a cada pozo.

8.14.2. Tratamiento 2: la combinación de las soluciones del As-CD133(A) y de Cisplatino (B)

8.14.2.1. Solución A: 0.4 μ g de As-CD133 disuelto en 10 μ L cloruro de sodio al 150 μ M, mas una solución de 0.04 μ l polyethylenimina (PEI, Sigma Aldrich, USA) disuelta en 10 μ L de cloruro de sodio 150mM, se mezclan ambas soluciones agregando el PEI al DNA, y se incuba por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se aplican 20 μ L por pozo, seguido de la aplicación de la solución B.

8.14.2.2. Solución B: 0-12ng/ μ L cisplatino diluido en 10 μ L de medio DMEM suplementado con 10% FBS, posteriormente se aplican los 10 μ L a cada pozo.

9. ESTADÍSTICA.

Los datos fueron analizados estadísticamente con las pruebas de ANOVA simple, coeficiente de correlación de Pearson, coeficiente de correlación de Spearman, prueba de Dunnet y prueba de Tukey utilizando los programas estadísticos SPSS statistics 17.0 y JMP statistical discovery 7.0 del SAS.

10. DISEÑO EXPERIMENTAL

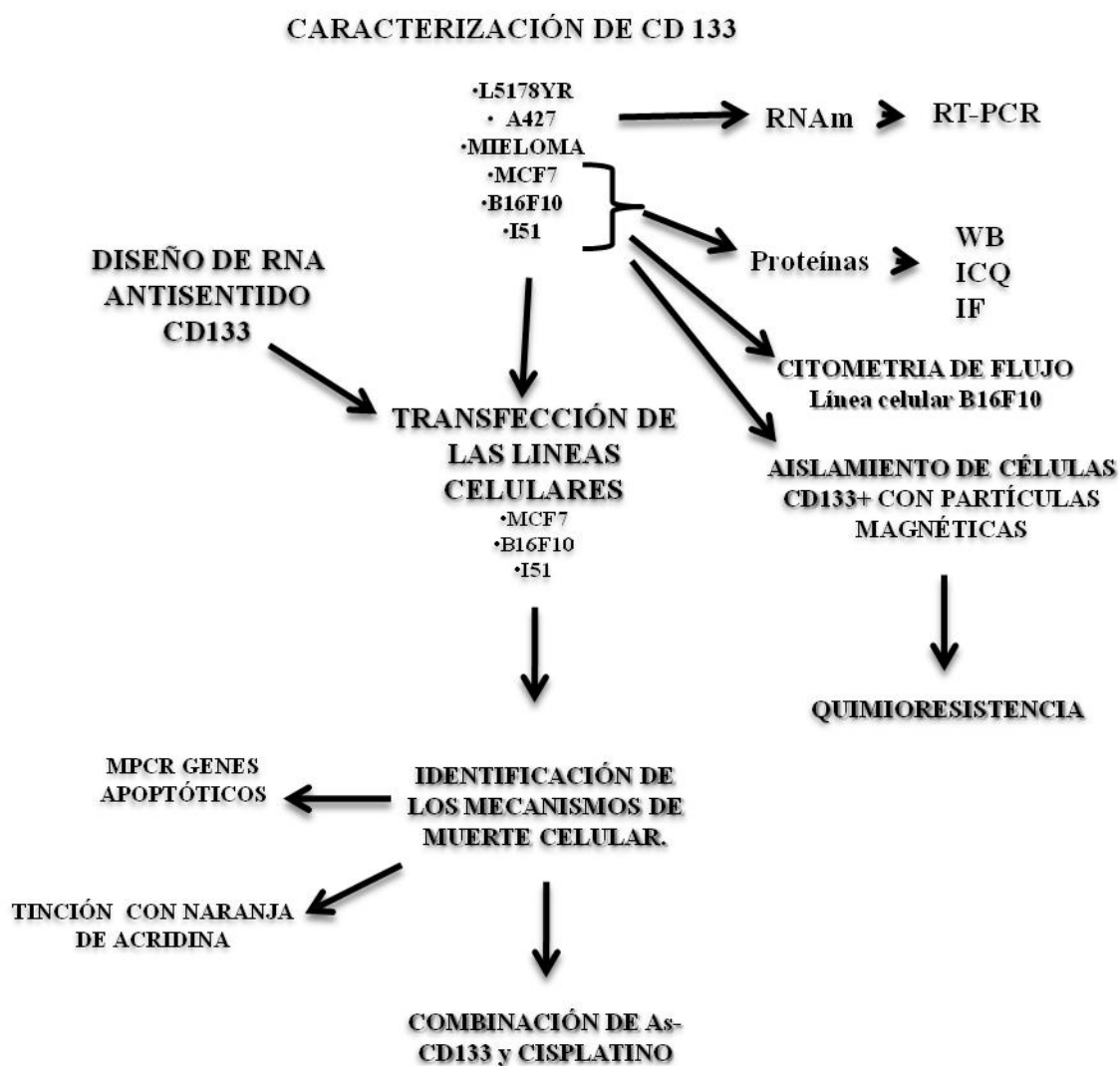


Diagrama 1.- Diseño experimental. Para cumplir con los objetivos planteados se realizó la siguiente estrategia experimental. Se hizo la caracterización de la molécula CD133 por medio de RTPCR en las líneas celulares de cáncer B16F10, MCF7, INER 51, A427, L5178YR y mieloma, en base a esto se seleccionaron las líneas B16F10, MCF7, INER 51 para posteriores análisis. Se hizo la identificación de la proteína CD133 por medio de la técnica de Western.Blot., inmunocitoquímica e inmunofluorescencia, se determinó el porcentaje de células CD133+ por medio de las técnicas de citometría de flujo, y partículas magnéticas, y se realizaron pruebas de quimioresistencia a las poblaciones celulares CD133+ y CD133- con cisplatino. Por otra parte se hizo el diseño y construcción de un RNA antisentido, el cual se utilizó para la transfección de las líneas celulares de cáncer B16F10, MCF7, INER 51, a las cuales se le hicieron análisis de la viabilidad celular, identificación del mecanismo de muerte celular (PCR múltiple para varios genes apoptóticos y tinción con naranja de acridina), además del análisis de combinación del RNA antisentido con cisplatino.

11. RESULTADOS

11.1. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CD133 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES.

Se detectó gran expresión del mRNA de la molécula CD133 en las líneas celulares B16F10, MCF7, INER 51, A427, L5178YR y P3X63Ag8.653, utilizando la técnica de RT-PCR, (fig. 1A), debido a que todas amplificaron exitosamente, se seleccionaron las líneas B16F10, MCF7 e INER51 debido a su facilidad de manejo y cultivo, para los siguientes estudios. Se detectó la expresión de la proteína CD133 mediante inmunocitoquímica e inmunofluorescencia encontrando que la expresión de la proteína fue muy alta en las tres líneas celulares, el 70% de las células presentaron tinción (+) (fig. 1B y C), notando que el patrón de expresión de la proteína es diferente en las tres líneas celulares, las líneas B16F10 y MCF7 presentan una expresión en toda la membrana celular, mientras que la línea INER 51 tiene una expresión más localizada como se muestra en la fig. 1B. Por medio de la técnica de western blot se observó que la expresión de la proteína detectada en la línea B16F10 es más baja en comparación con la línea MCF7 (fig. 1D).

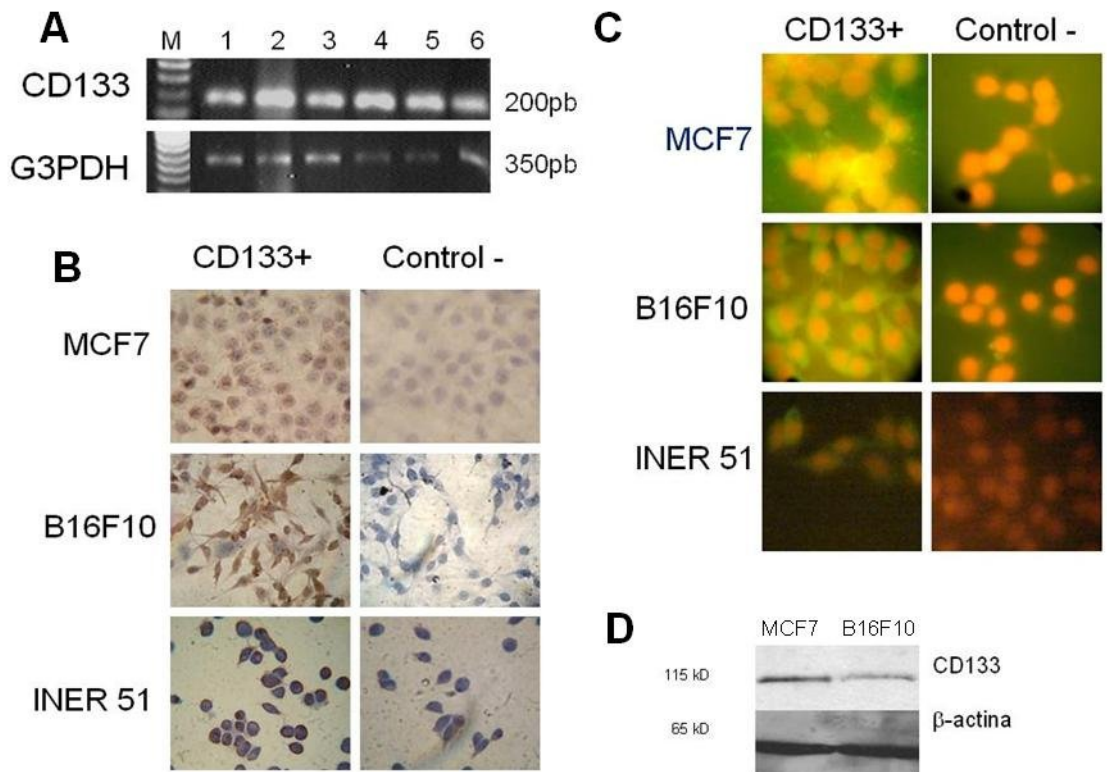


Figura 1. Expresión de CD133 en líneas celulares de cáncer. **A)** Identificación de la expresión de la molécula CD133 y G3PDH por medio de la técnica de RT-PCR: M) Marcador de peso molecular. Líneas celulares: **1)** B16F10, **2)** L5178YR, **3)** A427, **4)** P3X63Ag8.653, **5)** INER 51, **6)** MCF7. Identificación de la proteína CD133 por medio de la técnica de **B)** inmunocitoquímica y **C)** inmunofluorescencia en las líneas celulares MCF7, B16F10 e INER 51, **CD133+** células con el anticuerpo primario, **control -)** células sin el anticuerpo primario. **D)** Determinación de la expresión de la proteína CD133 por medio de la técnica de Western Blot en las líneas celulares de cáncer MCF7 y B16F10.

11.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD133+ DE LAS LÍNEAS B16F10.

Se aislaron las células CD133+ y se determinó su porcentaje en la línea B16F10. Por medio de la técnica de citometría de flujo se obtuvo un 6% de células CD133+ de un total de 10,000 células (Fig. 2A.3). Por otra parte se realizó la separación de células CD133+, por medio de partículas magnéticas, en donde se separaron un 24.15% de células CD133+ de un total de tres millones de células (Fig. 2B), en donde se observa que las células expresan un alto porcentaje de la proteína CD133 como lo muestra la figura 2C, visto por la cantidad de partículas magnéticas unidas a su membrana (partículas de color café).

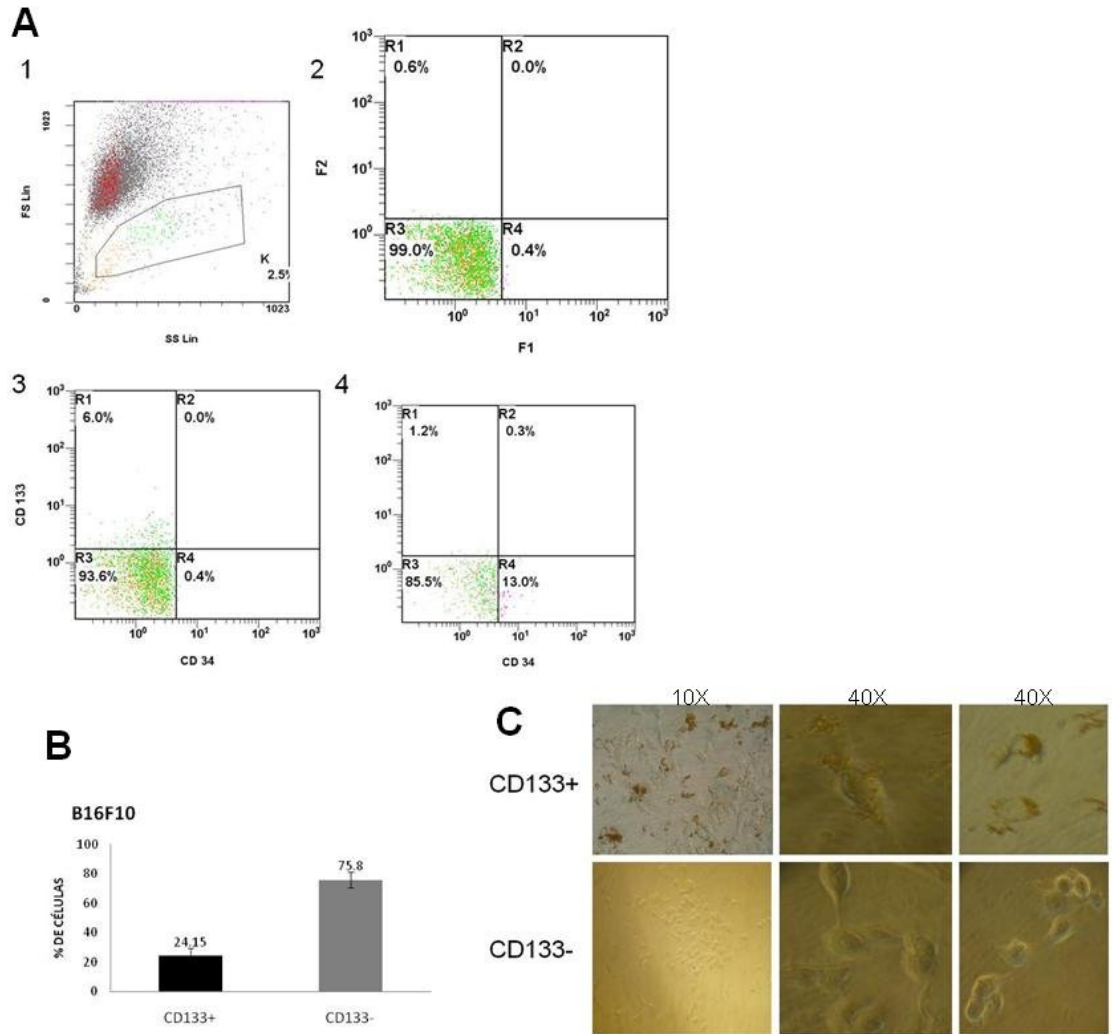


Figura 2. Aislamiento de células CD133+ de la línea B16F10. A) Citometría de flujo de células B16F10, **1)** separación de las células por tamaño, **2)** control negativo, F1(cuadrante CD133+), F2 (cuadrante CD34+), **3)** porcentaje de células CD133+, **4)** control CD34+, **B)** Separación de células CD133+ por medio de partículas magnéticas. **C)** Fotografías de las células B16F10 CD133+ y CD133- separadas por medio de partículas magnéticas visualizadas en un microscopio invertido a 10X y 40X.

11.3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD133+ DE LAS LÍNEAS MCF7 E INER 51.

Se aislaron las células CD133+ y se determinó su porcentaje en las líneas MCF7 e INER51 por medio de partículas magnéticas, en donde se separaron un 16.54% de células CD133+ para la línea MCF7 (Fig. 3A), y un 6.49% para la línea INER 51 (Fig. 3C), de un total de tres millones de células, en donde se observó que las células expresan un alto porcentaje de la proteína como lo muestra las figuras 3B y D visto por la cantidad de partículas magnéticas unidas a la membrana celular.

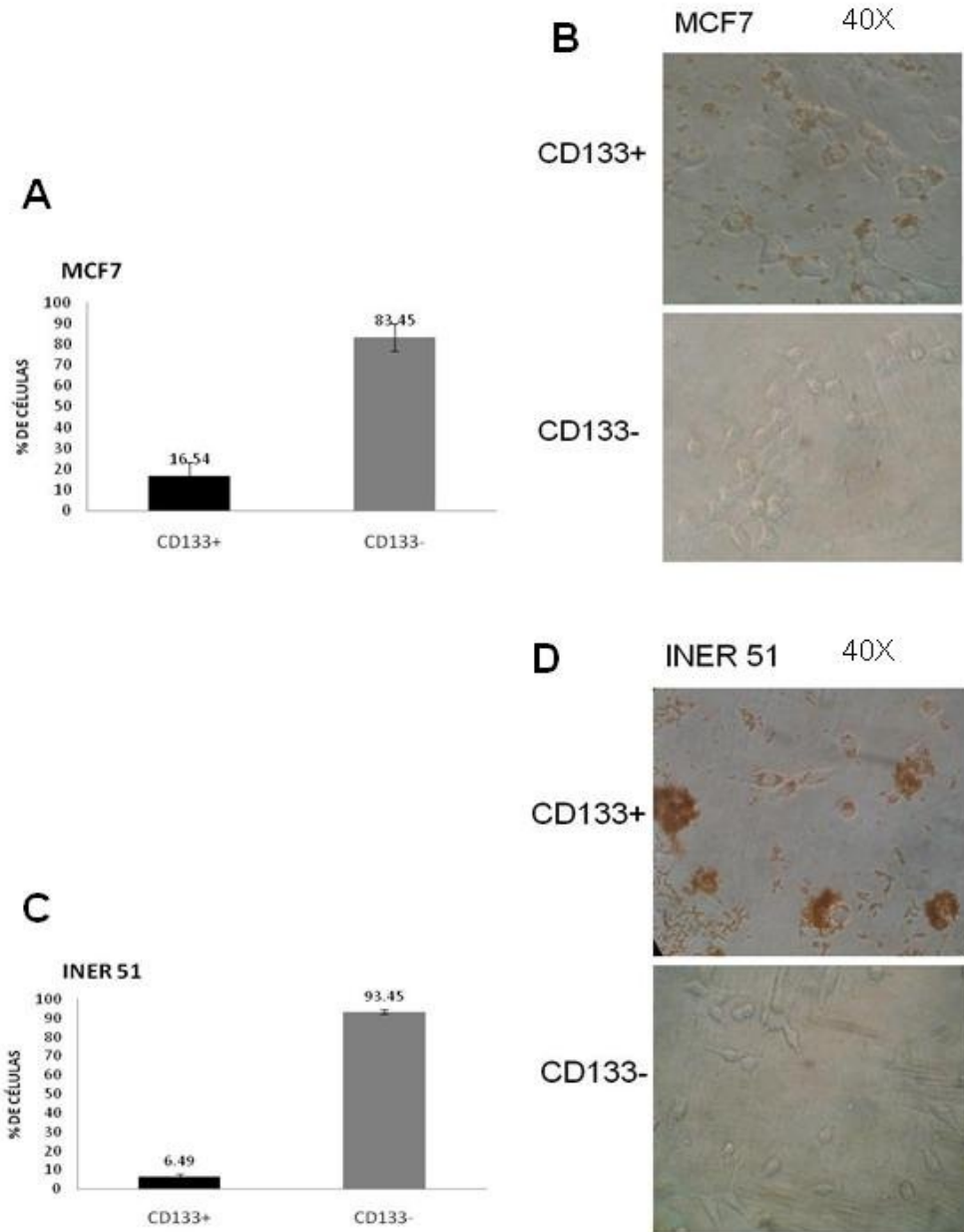


Figura 3. Aislamiento de células CD133+ de las líneas MCF7 e INER 51 por medio de partículas magnéticas. A) porcentaje de células CD133+ de la línea MCF7, B) fotografías de células CD133+ y CD133- de la línea MCF7 visualizadas en un microscopio invertido a 40X, C) porcentaje de células CD133+ de la línea INER 51, D) imagen de células CD133+ y CD133- de la línea INER 51 visualizadas en un microscopio invertido a 40X.

11.4. QUIMIORESISTENCIA DE CÉLULAS CD133+.

Para confirmar la propiedad de quimioresistencia de las células madre, las poblaciones celulares CD133+ y CD133- de las líneas celulares B16F10, MCF7 e INER 51, separadas por medio de partículas magnéticas, fueron sometidas a diferentes concentraciones de cisplatino, 0-12 ng/ μ L para B16F10 y MCF7 y 0-5 ng/ μ L para INER (por ser más susceptible a la droga), después de 48 hrs fueron analizadas para observar su viabilidad celular por medio de la técnica de MTT, observando que no existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) a la susceptibilidad con cisplatino entre las dos poblaciones de células CD133+ y CD133-, en las tres líneas celulares estudiadas (Fig. 4, A, B y C).

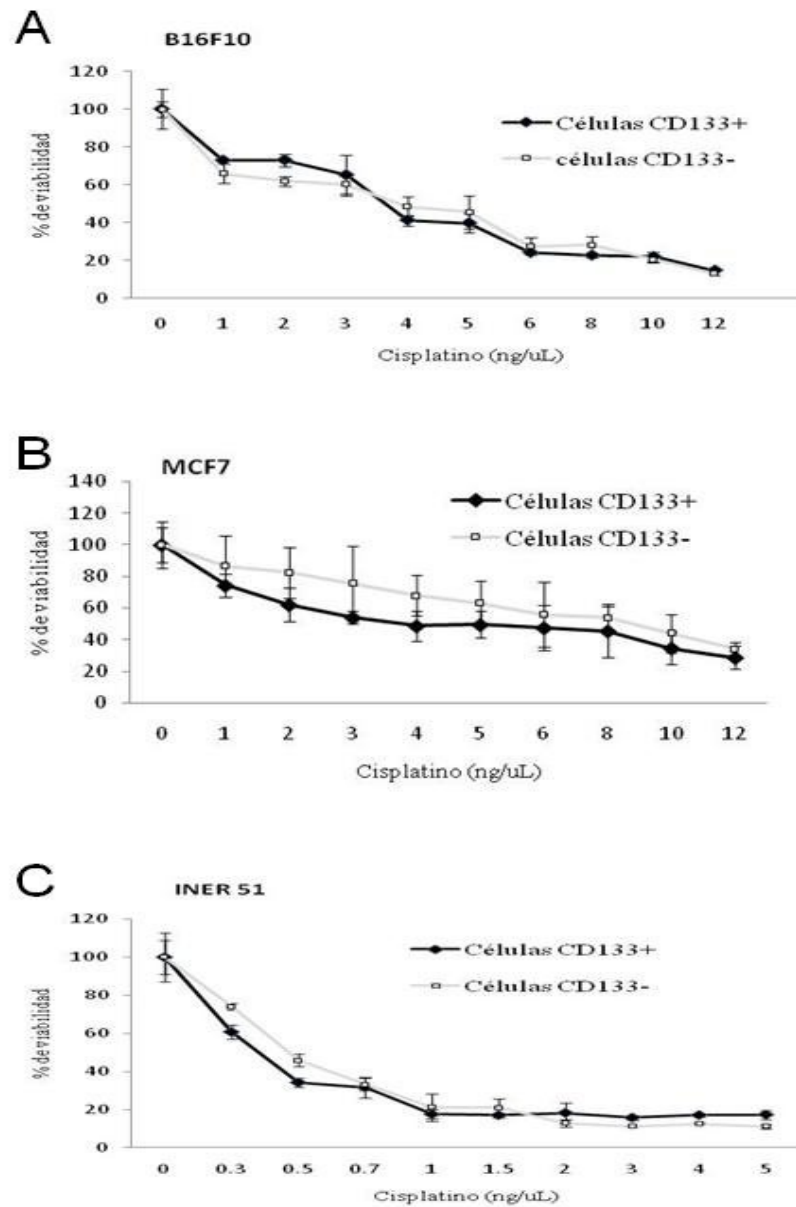


Figura 4. Prueba de quimioresistencia de la células CD133+ y CD133-. Se analizó la viabilidad celular de las células CD133+ y CD133- de las líneas **A)** B16F10, **B)** MCF7 y **C)** INER 51 por medio de la técnica de MTT, 48hrs después de aplicar el tratamiento con diferentes dosis de cisplatino. Los valores se representan como el promedio de la viabilidad celular por grupo de tres experimentos independientes +/- el error estándar, (* $p < 0.05$).

11.5. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN RNA ANTISENTIDO CONTRA LA MOLÉCULA CD133 (AS-CD133).

Una vez diseñados los primers CD133-1, por medio de la técnica de RT-PCR, se obtuvo el amplificado de 200 pb (Fig. 5A) y por medio de las enzimas de restricción se generó el corte y ligación de los productos de PCR en el plásmido pEGFP (Fig. 5B). Posteriormente se logró la transformación en bacterias DH5 α calcio competentes, obteniendo 6 clonas, las cuales fueron caracterizadas por medio de las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Fig. 5C). Posteriormente se hizo la producción y purificación del DNA plasmídico el cual se empleo para la transfección de las líneas celulares de cáncer.

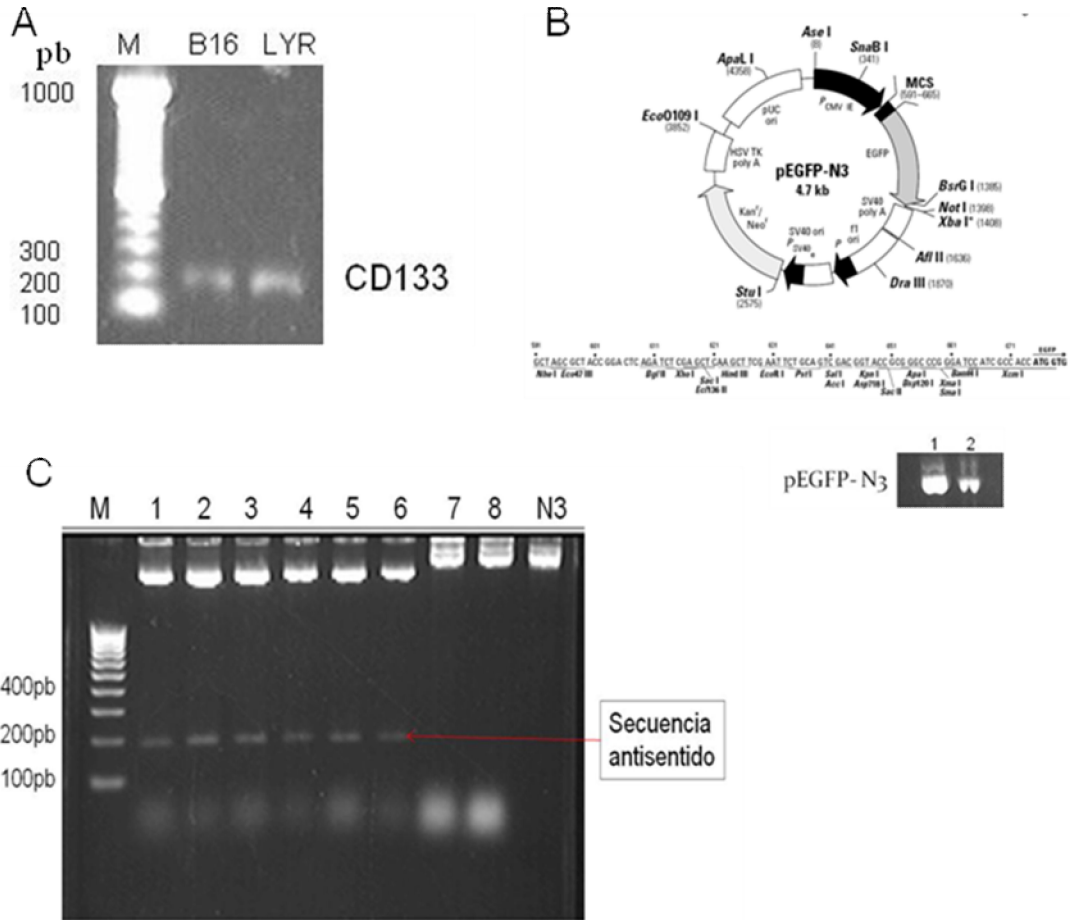


Figura 5. Diseño y construcción de As-CD133. A) Producto de RT-PCR de un fragmento de CD133 de 200pb, de la línea celular B16F10, B) Plásmido pEGFP-N3 utilizado en la clonación de la secuencia antisentido 1 y 2) Corrimiento del plásmido pEGFP-N3. C) Digestión enzimática de clonas +, M) Marcador de peso molecular, 1-6) Digestión con Eco RI y Bam HI de seis clonas de As-CD133, liberando los fragmentos de 200pb, 7-8) Clonas As-CD133 no digeridas, N3) Plásmido pEGFP-N3.

11.6. ANÁLISIS DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL As-CD133 CONTRA LAS LÍNEAS CELULARES.

Para determinar el efecto biológico que provocaría la inhibición de la expresión de la proteína CD133, se realizaron los ensayos de transfección en las líneas celulares MCF7, B16F10 e INER 51 con el As-CD133.

Se estandarizó el método de transfección para las líneas celulares, estableciéndose que la polyethylenimina fue el mejor método. Para corroborar la transfección de las células, se observó la proteína verde fluorescente del plásmido en un microscopio de fluorescencia y en base a esto se determinaron los porcentajes de transfección.

En la línea B16F10 se observó un 70-80% de células transfectadas, mientras que para las líneas MCF7 e INER51 solo se observó un 20-30% de transfección (Fig. 6A). Con otros métodos probados como lipofectamina y GenPorter, se obtuvo el mismo porcentaje de transfección en las líneas MCF7 e INER51 (datos no mostrados) optándose por transfectar todas con polyethylenimina por su fácil manejo.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: se observó una marcada disminución de la proliferación celular y un cambio en la morfología de las células transfectadas con 6 μ g del As-CD133 (Fig. 6B) en comparación con los controles, estos efectos fueron dependiente de dosis ($\rho = -0.4$), observándose que a concentraciones más altas de AS-CD133 se hacía más evidente el daño en las células a las 48 horas pos-transfección en las tres líneas celulares (Fig. 7), la línea B16F10 presentó solo un 42% de viabilidad celular en comparación con los controles, mientras que la línea MCF7 presentó un 48% y la línea INER 51 un 71% de viabilidad celular en comparación con los controles sin transfectar (Fig. 7), observando que existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y la dosis de 0.6 μ g en las líneas B16F10 y MCF 7 (Fig. 7).

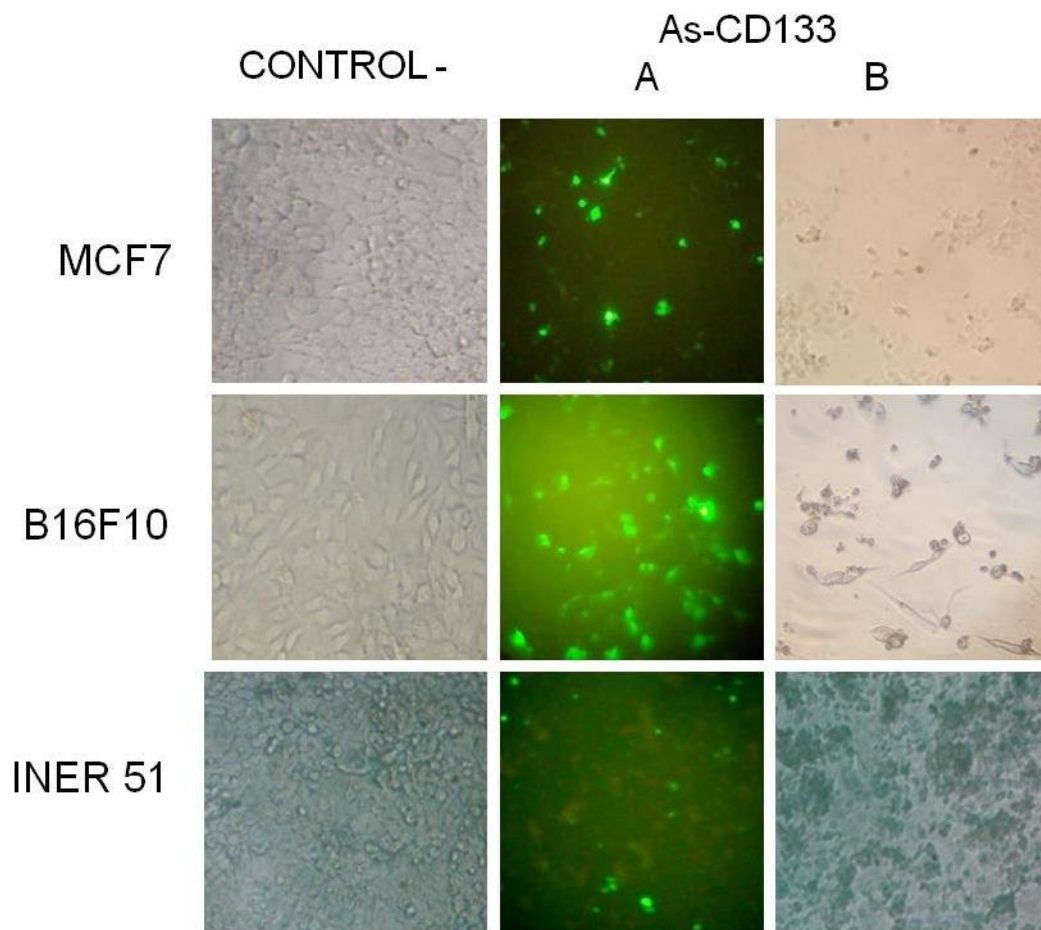


Figura 6. Transfección de las líneas celulares con el As-CD133. control -) células no transfectadas, **A)** células transfectadas vistas con un microscopio de fluorescencia a 40X, **B)** células transfectadas vistas con luz visible a 40X.

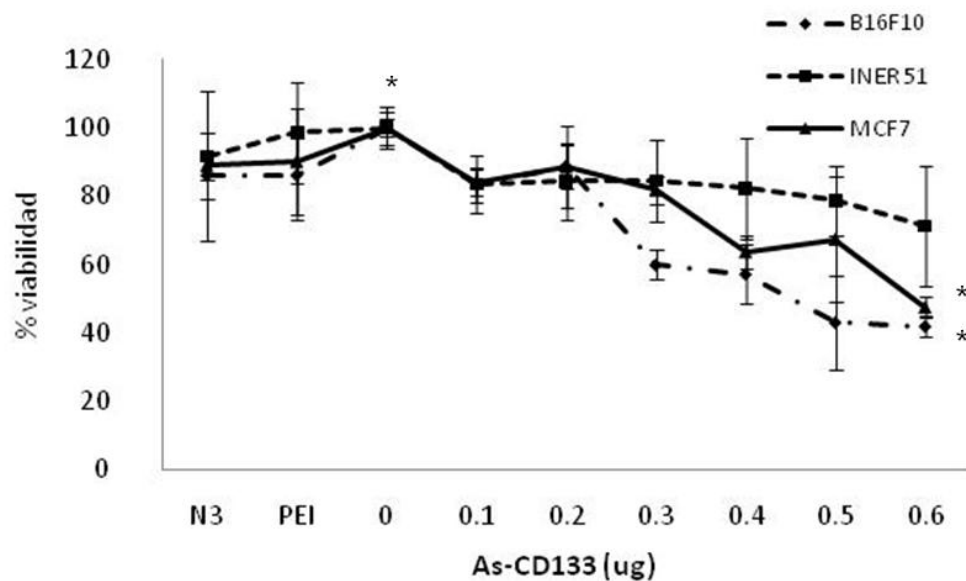


Figura7. Análisis de viabilidad celular de las células transfectadas con el As-CD133 por la prueba de MTT. N3) células transfectadas con el vector pEGFP-N3, FT) células transfectadas con la dosis máxima de polyethylenimina. Dosis 0.0 a 0.6) células transfectadas con 0.0 a 0.6 µg de As-CD133, las barras indican el error estándar, (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

11.7. DISMINUCIÓN DE LA PROTEÍNA Y EL RNAm DE CD133 EN CÉLULAS B16F10 TRANSFECTADAS CON EL As-CD133.

Se corroboró la disminución de la expresión de la proteína CD133 en las células transfectadas de la línea B16F10, por medio de las técnicas de Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia, notándose una marcada disminución de la expresión de la proteína CD133 en la membrana celular (fig. 8Ay B).

Para confirmar el efecto del As-CD133 sobre la expresión del RNA mensajero de la molécula CD133, se amplificaron los cDNA de las células transfectadas con los primers

CD133-2, que amplifican una región totalmente diferente a los CD133-1, observándose que el mRNA de la molécula CD133 disminuye drásticamente en las células transfectadas en comparación con las no transfectadas (Fig.8C CD133-2).

Para corroborar la expresión de la secuencia antisentido en las células transfectadas se amplificaron los cDNA con los primers CD133-1, observándose un gran incremento en la expresión del RNA antisentido (As-CD133) en las células transfectadas en comparación con las no transfectadas (Fig. 8C CD133-1).

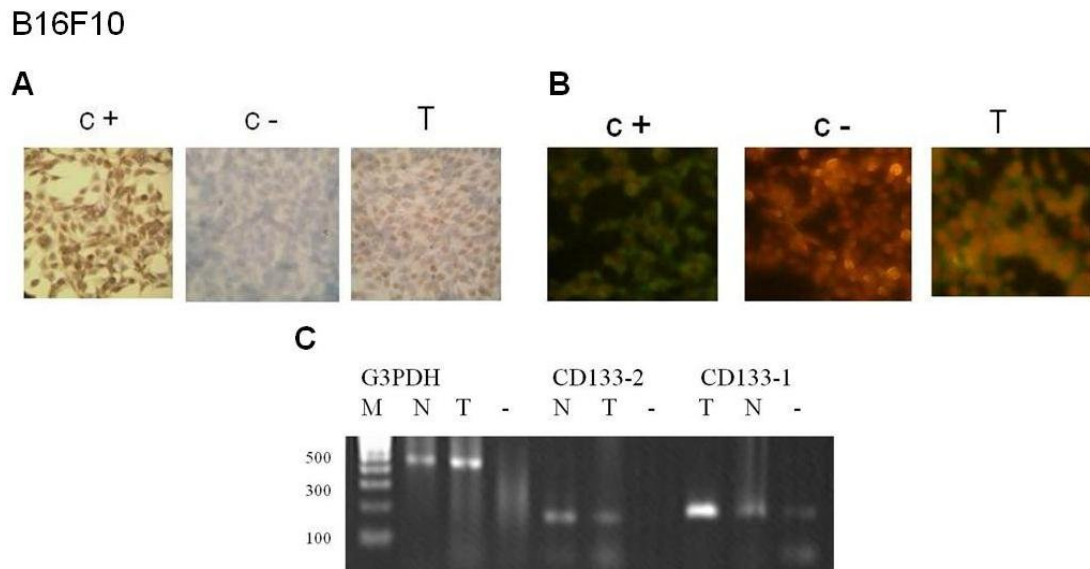


Figura 8. Disminución de la expresión de CD133 por medio del As-CD133 en la línea B16F10. Identificación de la proteína por medio de **A)** Inmunocitoquímica y **B)** inmunofluorescencia en células transfectadas. **c+)** control de células B16F10 sin transfectar, con el anticuerpo anti CD133, **c-)** control con células B16F10 sin transfectar y sin el anticuerpo primario, **T)** Células B16F10 transfectadas y con el anticuerpo primario, **C)** Determinación de los mRNA de la molécula CD133 en las células B16F10 transfectadas, **M)** marcador de peso molecular, **N)** células sin transfectar, **T)** células B16F10 transfectadas con el As-CD133, **-)** control negativo, **CD133-2)** RT-PCR con los primers CD133-2, **CD133-1)** RT-PCR con los primer CD133-1.

11.8. IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO DE MUERTE PROVOCADO POR EL As- CD133 EN LA LÍNEA B16F10.

Para determinar el mecanismo de muerte que presentaron las células transfectadas provocado por la disminución de la proteína, se realizó una tinción con naranja de acridina, que se une a las cadenas sencillas de DNA, dando una coloración anaranjada, revelando las células con DNA degradado. Observándose que un alto porcentaje de células transfectadas con el As-CD133 presentan una tinción naranja, lo cual nos indica que entran en apoptosis, en comparación con el control y este efecto es dependiente de dosis, a mayor concentración de As-CD133, mayor porcentaje de células en apoptosis (fig. 9A). También se analizó la expresión de genes pro-apoptóticos: ICE, CMYC, P53, y antiapoptóticos: BCL2, por medio de un kit de PCR múltiple, detectando que el gen P53, presentó una sobreexpresión en células transfectadas con el As-CD133 (fig. 9B).

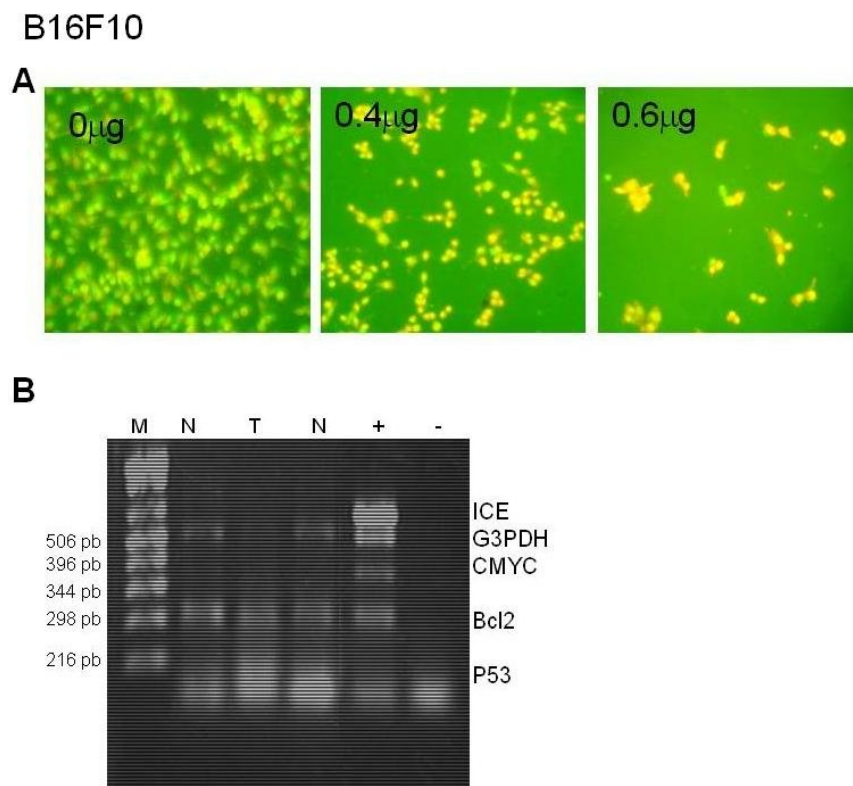


Figura 9. Mecanismo de muerte provocado por el As-CD133 en la línea B16F10. **A)** Determinación de la viabilidad celular por medio de la tinción con naranja de acridina, **0 μg**) Células sin transfectar, **0.4 y 0.6 μg**) Células transfectadas con 0.4 μg y 0.6 μg de As-CD133, **B)** RT-PCR múltiple, análisis de la expresión de genes apoptóticos ICE (658 pb), CMYC (371 pb), P53 (204 pb) y antiapoptóticos BCL2 (233 pb), en la línea B16F10 transfectadas, (G3PDH, 550 pb como gen constitutivo). **M)** Marcador de peso molecular, **N)** Células B16F10, **T)** Células B16F10 Transfectadas, **+**) Control positivo, proporcionado por el kit, **-)** Control sin cDNA.

11.9. EFECTO DE COMBINACIÓN DE As-CD133 Y CISPLATINO EN LAS LÍNEAS B16F10, MCF7 E INER 51.

Los resultados de la combinación de tratamientos con As-CD133 y cisplatino, en las líneas celulares B16F10, MCF7 e INER 51, muestran una disminución significativa ($p < 0.05$) de la viabilidad celular en la línea B16F10, sobre todo a las concentraciones de 2, 3, 4 y 5 ng/ μ l, llegando hasta un 3.1%, con una combinación de 0.4 μ g del As-CD133 más 5ng/ μ l de cisplatino, en comparación con los tratamientos por separado (48% con 0.4 μ g de As-CD133 y 25% con 5ng/ μ L cisplatino) (fig. 10A), sin embargo en las líneas MCF7 e INER51 no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (Fig. 10B y C). Se encontró una correlación negativa entre la dosis de los tratamientos y la viabilidad celular en las líneas B16F10 ($\rho^2 = -0.625$), MCF7 ($\rho^2 = -0.979$) e INER 51 ($\rho^2 = -0.717$) (Fig. 10).

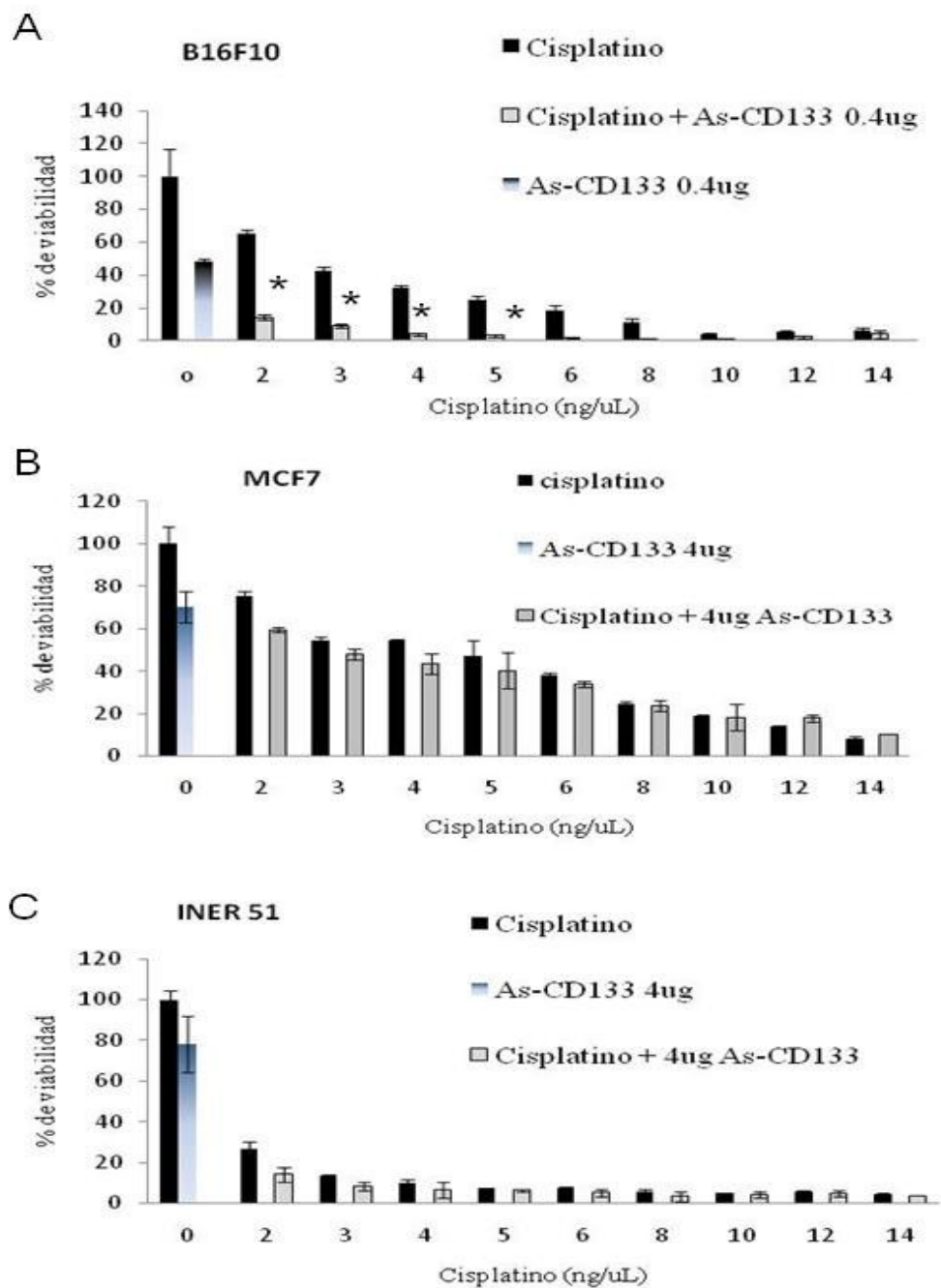


Figura 10. Efecto de la combinación de As-CD133 y cisplatino. Análisis de viabilidad celular por medio de la técnica de MTT en las líneas celulares **A)** B16F10, **B)** MCF7 y **C)** INER51 con diferentes dosis de cisplatino (2-14ng/μl) y 0.4μg del As-CD133, las barras indican la desviación estándar, (*) indica las diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

12. DISCUSIÓN

Las células madres expresan una serie de proteínas que sirven como biomarcadores, permitiendo su identificación y purificación. Estas proteínas tienen funciones biológicas relevantes que están involucradas en proliferación celular y apoptosis (importantes para la viabilidad celular) que pueden servir como blancos terapéuticos en células madre de cáncer. La proteína CD133 se ha identificado como un marcador de células madre (Pessina *et al.*, 2010; Taïeb *et al.*, 2009), y se le ha relacionado con procesos carcinogénicos (Shimada *et al.*, 2010) en donde se ha asociado con progresión, angiogénesis, metástasis (Qiang *et al.*, 2009; Kohga *et al.*, 2010) y mal pronóstico de los tumores (Pine *et al.*, 2010), por lo que esta proteína puede ser un blanco terapéutico en procesos carcinogénicos. Debido a lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue bloquear la expresión de la molécula CD133, para observar su efecto biológico en líneas celulares de cáncer.

Diferentes estudios han demostrado que líneas celulares de cáncer expresan el marcador CD133, sugiriendo que estos cultivos celulares contienen células madre de cáncer (Qiang *et al.*, 2009). En este estudio, nosotros encontramos que las líneas celulares B16F10, MCF7, INER51, A427, L5178YR Y P3X63Ag8.653, expresan la molécula CD133, además se observó que las líneas celulares B16F10, MCF7 e INER51 presentan un alto porcentaje de células CD133+ (70% detectado por medio de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia). Otros autores han publicado resultados similares en varias líneas celulares, por ejemplo Qiang *et al.*, (2009) observaron en la líneas celular de glioblastoma humano: U251, un mayor porcentaje de células CD133+ en comparación con las otras líneas celulares de glioblastoma U87MG y A172, mientras que Liu *et al.*, (2006) reportaron una alto porcentaje de células CD133+ en tres cultivos primarios de Glioblastoma, no. 1049 (10.2%), no. 377 (69.7%) y no. 66 (27.5%), por citometría de flujo.

La separación de las células CD133+ de la línea B16F10 con partículas magnéticas fue de 24.15%, mientras que con Citometría de Flujo la línea B16F10 presentó un 6% de células CD133+. Mientras que Dou *et al.*, (2007) reportaron un

3.40% de células CD133+ en la línea celular B16F10, por medio de la técnica de MACS (Magnetic-Activated Cell Separation) y citometría de flujo. La diferencia en el porcentaje de las células separadas puede deberse a la diferencia del anticuerpos, ya que nosotros utilizamos un anticuerpo policlonal para la separación por medio de partículas magnéticas mientras que para la citometría se utilizó un anticuerpo monoclonal. Por otro lado Wright *et al.* (2008) reportaron un bajo porcentaje de células CD133+ en la línea celular RP.1 de cáncer de mama, que varía entre el 2% - 5.9% por citometría del flujo.

Algunos autores han reportado que la variación en la expresión de la proteína CD133 detectada por las diferentes técnicas, puede deberse a varios factores que podrían repercutir en la identificación de la proteína como son: la glicosilación de la proteína, la especificidad de tejido, la localización de la proteína (en membrana o citoplásmica) e incluso a las enzimas utilizadas para disgregar las células. Smelkov *et al.* (2008) han reportado que la expresión del CD133 puede ser limitada a células madre órgano específicas, sin embargo la diferencia de patrones de reconocimiento órgano específicos de varios anticuerpos (13A4, AC133, ahE2) anti CD133, ha sido explicada por su diferencia de afinidad a varias formas glicosiladas del CD133. Smelkov *et al.*, (2008) reporta que las células CD133+ no son localizadas exclusivamente como nichos de células madre, que se puede tener subestimada su expresión en el tejido adulto, sugiriendo que la expresión de CD133 no es específica de células madre epiteliales órgano específicas, por el contrario es expresada en epitelio diferenciado mientras que Immervol *et al.*, (2008) sugieren que la expresión de CD133 en células pancreáticas, incluye al menos a dos subpoblaciones, una de ellas expresa la proteína CD133 en la superficie celular que representa un estado de diferenciación celular, la segunda población tiene una tinción citoplásmica y representa menos del 1% de células en adenocarcinoma ductal y en páncreas normal. Sugiriendo que las formas no glicosiladas pueden escapar de la detección, ya que hay un gran número de isoformas de CD133 y no se puede esperar que un anticuerpo cubra todas las isoformas que pueden ser producidas, además de que los mecanismos enzimáticos, necesarios para hacer la suspensión de las células, afectan el microambiente celular y puede alterar la expresión de la proteína extra e intracelular, influenciando la selección de las poblaciones celulares

para ser usadas en otros experimentos. Recientemente se ha visto que el micro-ambiente tumoral puede modificar la expresión de la proteína, como lo es el caso de la hipoxia que sufren las células tumorales en las zonas internas del tumor, donde la vascularización es muy escasa y requiere mayor demanda de oxígeno. McCord *et al.*, (2009) observó que en células madre de tumor, aisladas de pacientes con Glioblastoma (GB) bajo condiciones de hipoxia (7% de oxígeno, O₂), incremento los niveles de la expresión de la CD133 y de Nestin así como los marcadores Oct4 y Sox2, genes asociados a las células madre de tumor en GB. Indicando que el crecimiento en el nivel mínimo fisiológico de oxígeno (7%), realza el fenotipo de célula madre CD133+ de GB. quedando claro que las condiciones de hipoxia influyen la expresión de marcadores relacionados con la sobrevivencia de los tumores. Concluyendo que no todos los linajes celulares tienen la misma expresión de la molécula CD133, y que esta puede variar aún en la misma línea celular, ya que esta expresión depende de muchos factores, tanto de las técnicas empleadas como del microambiente en el que se encuentren las células (McCord *et al.*, 2009).

Por otra parte, al evaluar la característica de células Madre de droga resistencia en las poblaciones CD133+ y CD133- separadas por medio de la técnica de partículas magnéticas en las tres líneas celulares (B16F10, MCF7 e INER 51) no se encontraron diferencias significativas en la respuesta a cisplatino por parte de las dos poblaciones celulares CD133+ y CD133-, probablemente el bloqueo de la molécula con los anticuerpos, pudo haber afectado la respuesta de las células CD133+ a la droga, ya que se menciona que la molécula está relacionada con la expresión de moléculas transportadoras de drogas, como lo sugiere Rappa *et al.*, (2008) en un estudio de citotoxicidad con anticuerpos monoclonales contra CD133, observaron que las líneas celulares FEMX-I de melanoma y Weri-RB-1 de Retinoblastoma, tratadas con diferentes concentraciones de los anticuerpos monoclonales AC133, AC141, and W6B3C1, dirigidos contra diferentes epítopes de la molécula CD133, presentaban citotoxicidad, siendo la dosis de 2µg/mL la más tóxica a las 72hrs con más de 90% de mortalidad, por el contrario, el crecimiento de la línea celular MA-11 de cáncer de mama humano que no expresa la molécula CD133, no fue afectada (Rappa *et al.*, 2008).

Se ha observado que el patrón de expresión de la proteína CD133 en la membrana, tiene correlación con la agresividad de los tumores y el pobre pronóstico de los pacientes (Beier *et al.*, 2008; Liu *et al.* 2006; Shimada *et al.*, 2010). En este estudio nosotros observamos diferencias en el patrón de expresión de la proteína CD133 en las líneas celulares de cáncer INER51 (en donde el patrón de expresión fue localizado), MCF7 y B16F10 (en donde el patrón de expresión fue más marcado y difuso) sugiriéndonos que probablemente las líneas MCF7 y B16F10 pudieran ser más agresivas, como lo dejan ver Klein *et al.*, (2007) quienes observaron que en pacientes con melanoma maligno, la expresión de la proteína CD133 en nevus melanocíticos (12/71) fue focal y moderada, mientras que en melanomas primarios (28/71) y melanomas metastásicos (39/84) fue difusa, de moderada a fuerte, con lo que comprueba que el patrón de expresión de la proteína CD133 puede ser un indicador de malignidad y de mal pronóstico de los tumores. Liao *et al.*, (2010) demostraron que la habilidad clonogénica de células con alta expresión de CD133, refleja la característica de una fuerte auto-renovación, resultados *in vivo* muestran que las células con alta expresión de CD133 crecen más rápido (alto índice de crecimiento *in vivo*) que las células con una expresión media o baja de la proteína CD133, sin embargo las células con una baja expresión de CD133 no pierden su capacidad tumorigénico en ratones, pero su crecimiento es más lento, concluyendo que el patrón de expresión de la proteína CD133, es determinante en la progresión tumoral.

La proteína CD133 tiene un papel muy importante en la proliferación celular, en este trabajo se observó que al disminuir la expresión de la molécula CD133 con un As-CD133, induce una disminución de la viabilidad celular y es dependiente de la dosis. Rappa *et al.*, (2008) observan que la disminución de la expresión de CD133 con un hRNA, da lugar a un crecimiento más lento, una reducción de la movilidad celular y disminución de la capacidad de formar esferoides bajo condiciones de crecimiento de célula Madre. Immervoll *et al.*, (2008) indican que CD133 ha sido implicada en la polaridad celular, que se requiere para el movimiento celular y los procesos de quimiotaxis, del desarrollo embrionario, del crecimiento invasor y de la metástasis.

En este trabajo al suprimir la expresión de la proteína CD133 se observó una disminución en la viabilidad celular y al hacer el análisis del mecanismo de muerte en estas células transfectadas, se determinó que la apoptosis de las células podría deberse a la activación de P53, ya que presentó una sobreexpresión en las células transfectadas, una probable vía de activación de p53 podría ser por medio de un cierto miembro de las cinasas MAP (Mitogen-activated protein) que responden a varios tipos de estrés, como por ejemplo, el daño a la membrana, que acciona la sobre-expresión de p53 llevando a apoptosis a las células transfectadas, sin embargo no ha sido probado y este podría ser un objeto de estudios futuros (Guo *et al.*, 2010).

La combinación de tratamientos anti-cancerígenos, con el objetivo de inducir un efecto aditivo, sinérgico o bien de sensibilización en las células cancerosas tratadas con quimioterapia o radioterapia para reducir al mínimo sus efectos secundarios y hacer más eficaces sus resultados con dosis mínimas, es un objetivo por alcanzar en la terapéutica contra el cáncer. En este trabajo la combinación del As-CD133 con cisplatino dio una drástica disminución de la viabilidad celular en la línea celular B16F10 en comparación con los tratamientos por separado, ésta podría ser una buena alternativa en la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos contra cáncer CD133+, puesto que se menciona que las células CD133+ son resistentes a drogas (Tirino *et al.*, 2008; Dell, 2008; Liu *et al.*, 2006). Concluyendo que el As-CD133 podría ser una propuesta prometedora en el tratamiento contra el cáncer ya que al unir los tratamientos se incrementaría la respuesta y se disminuiría drásticamente las dosis y por lo tanto los efectos secundarios en los pacientes.

13. CONCLUSIONES

- 1.- En este estudio se encontró una alta expresión de la proteína y del RNA mensajero de CD133 en diferentes líneas celulares de cáncer cultivadas comúnmente en el laboratorio.
- 2.- Se logró separar un alto porcentaje de células CD133+ en las 3 líneas celulares B16F10, MCF7 e INER51.
- 3.- Las prueba de quimioresistencia de las poblaciones CD133+ y CD133-, no mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones.
- 4.- El diseño y construcción del As-CD133, fue exitoso ya que inhibió eficazmente la expresión del RNAm de la molécula CD133 en las células transfectadas.
- 5.- Se observó que la disminución de la expresión de la proteína CD133 por medio del As-CD133, disminuyó la viabilidad celular de las líneas B16F10, MCF7 e INER 51.
- 6.- El efecto biológico del As-CD133 en las líneas B16F10, MCF7 e INER 51 fue dependiente de dosis y que el mecanismo fue apoptosis.
- 7.- La disminución de la proteína CD133 contribuye a la sensibilización de las células B16F10 al cisplatino.

El **CD133** es de vital importancia para la células cancerosas, pudiendo ser un blanco de terapia contra las células madre de cáncer, principalmente en la línea B16F10 de melanoma murino, y que el **As-CD133** se podría utilizar como una **terapia complementaria** contra cáncer derivado de las células madre de cáncer CD133+ haciendo **más eficaz** la quimioterapia, con dosis **más bajas**.

14. PERSPECTIVAS

- a. Los resultados en la inhibición de la proteína CD133 *in vitro* fueron prometedores, el siguiente paso sería comprobar la hipótesis en modelos *in vivo*, abarcando varios tipos de cáncer de los cuales se tenga reportado que son CD133+, para comparar su eficacia en cada uno de ellos.
- b. Mejorar el método de bloqueo, con un RNA de interferencia, ya que se menciona que es más eficaz que los RNA antisentido.
- c. Corroborar la sensibilización generada por el As-CD133 a drogas, en los modelos *in vivo*.
- d. Buscar el efecto biológico de las células CD133+ con respecto a otros biomarcadores de células madre.

15. LITERATURA CITADA

1. Abbott A. 2006. The root of the problem. *Nature*. 442:742-3.
2. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawaski A, Bogdahn U, Beier CP. 2007 . CD133- Glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 67: 4010-4015.
3. Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, Hau P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. 2008. CD133 expression and cancer stem cell predict prognosis in high grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol* 18: 370-377.
4. Bhindi R, Fahmy RG, Lowe HC, Chesterman CN, Dass CR, Cairns MJ, Saravolac EG, Sun L, Khachigian LM. 2007. Review Brothers in Arms DNA Enzymes, Short Interfering RNA, and the Emerging Wave of Small-Molecule Nucleic Acid-Based Gene-Silencing Strategies *Am J Pathol* 2007, 171:1079–1088.
5. Boffetta P. 2010. Biomarkers in cancer epidemiology: an integrative approach. *Carcinogenesis*. 31: 121-126.
6. Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, Efrem GM, Fernando U, and Camussi G. 2006. CD133+ renal progenitor cell contribute to tumor angiogenesis *Am J Pathol*. 169: 2223-2236.
7. Chan JH, Lim S, Wong WS. 2006. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 33: 533–40.
8. Chang Y, Yanli Y, Nishith G, Xiaojun L, Aibin H, Lizhong L, Jin Z, Yongsheng C, Fude F. 2007. Pentaspan membrane glycoprotein, prominin 1, is involved in glucose metabolism and cytoskeleton alteration. *Biochemistry*. 72: 854-862.
9. Cogle CR, Guthrie SM, Sanders RC, Allen WL, Scott EW, Petersen BE. 2003. An overview of stem cell research and regulatory issues. *Clin Proc*. 78: 993–1003
10. Dell AP. 2008. Stem cell marker in gliomas. *Neurochem Res*. 33: 2407.2415.
11. Diehn M, Clarke MF. 2006. Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J Natl Cancer Inst*. 98: 1755-1757.

12. Dou J, Pan M, Wen P, LI Y, Tang Q, Chu L, Zhao F, Jiang C, Hu W, Hu K, Gu N. 2007. Isolation and identification of cancer stem like cell from murine melanoma cell lines. *Cell Mol Immunol.* 4:467-472.
13. Dutreix M, Cosset JM, Sun JS. 2010. Molecular therapy in support to radiotherapy. *Mutat Res.* 704:182-189.
14. Fargeas CA, Joester A, Missol KE, Hellwing A, Huttner WB, Corbeil D. 2004. Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *J Cell Sci.* 117: 4301-4311.
15. Ferrari N, Bergeron D, Tedeschi AL. 2006. Characterization of antisense oligonucleotides comprising 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA): specificity, potency, and duration of activity. *Ann NY Acad Sci,* 1082:91–102.
16. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature,* 6669:806–11.
17. Gal H, Makovitzki A, Amariglio N, Rechavi G, Ram Z, Givol D. 2007. A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 358: 908-913.
18. Greenwald P and Dunn BK. 2009. Landmarks in the History of Cancer Epidemiology. *Cancer Res.* 69: 2151–2162
19. Guo F, Li Y, Liu Y, Wang J, Li G. 2010. ARL6IP1 mediates cisplatin-induced apoptosis in CaSki cervical cancer cells. *Oncol Rep.* 23:1449-1455.
20. Grandis P. 2006. The cancer stem cell: evidence for its origin as an injured autoreactive T cell. *Mol Cancer.* 5: 6.
21. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, Wöl E, Kähler CM. 2004. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 57:965-969.
22. Immervoll H, Hoem D, Sakariassen PO, Steffensen OJ, Molven A. 2008. Expression of stem cell marker CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer.* 8: 1-14.

23. Klein M W 1, Zhao Shuping Wu P Bryan, Wu Hong, Klein-Szantos JPA, Tahan R S. 2007. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 20:102–107.
24. Kohga K, Tatsumi T, Takehara T, Tsunematsu H, Shimizu S, Yamamoto M, Sasakawa A, Miyagi T, Hayashi N. 2010. Expression of CD133 confers malignant potential by regulating metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 24 marzo. En línea.
25. Kucia M, Ratajczak MZ. 2006. J. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol.* 57: 5-16.
26. Lai SY, Koppikar P, Thomas SM, Childs EE, Egloff AM, Seethala RR, Branstetter BF, Gooding WE, Muthukrishnan A, Mountz JM, Lui VW, Shin DM, SS Agarwala, R Johnson, LA Couture, EN Myers, JT Johnson, G Mills, A Argiris, JR Grandis, 2009. Intratumoral epidermal growth factor receptor antisense DNA therapy in head and neck cancer: first human application and potential antitumor mechanisms, *J. Clin. Oncol.* 27: 1235–1242.
27. Liao Y, Xiaotong Hu, Huang, X and He C. 2010. Quantitative Analyses of CD133 Expression Facilitate Researches on Tumor Stem Cells. *Biol Pharm Bull.* 33: 738-742.
28. Liu BB, Qin LX, Liu YK. 2005. Adult stem cells and cancer stem cells: tie in or tear apart?. *J Cancer Res Clin Oncol.* 131: 631–638.
29. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cell in glioblastoma. *Mol Cancer.* 5: 67.
30. Lotersztajn S, Julien B, Texeira CF, Grenard Pascale and Mallat A. 2005. Hepatic fibrosis molecular mechanism and drug targets. *Annu rev pharmacol. Toxicol* 45: 605-628.
31. Ma S, Shi M, Li Y, Yi D, Shia BC. 2010. Incorporating gene co-expression network in identification of cancer prognosis markers. *BMC Bioinformatics.* 11: 271. En línea

32. Mahato RI, Cheng K, Guntaka RV. 2005. Modulation of gene expression by antisense and antigene oligodeoxynucleotides and small interfering RNA. *Expert Opin Drug Deliv*, 2: 3–28.
33. Maeda S, Shinchu H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. 2008. CD133 expression is correlated with Lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 98: 1389-1397.
34. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. 2009, Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 20: 1-7.
35. McCord AM, Jamal M, Shankavaram UT, Lang FF, Camphausen K, Tofilon PJ. 2009. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res*. 7: 489-497.
36. Mello CC, Conte D Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431: 338–42.
37. Morán G. D., Domínguez G. A. 2005. RNA antisentido. *Farmacia hospitalaria: órgano oficial de expresión científica de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*, 29: 269-283.
38. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. 2008. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*. 29:3477-96.
39. Mulherkar R. 2001. Gene therapy for cancer. *Current Science*. 81: 555-560.
40. Nurcombe V, Cool SM. Heparan sulfate control of proliferation and differentiation in the stem cell niche. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 17:159-171.
41. Ong LL, Li W, Oldigs JK, Kaminski A, Gerstmayer B, Piechaczek C, Wagner W, Li RK, Ma N, Steinhoff G. 2010. Hypoxic/Normoxic Preconditioning Increases Endothelial Differentiation Potential of Human Bone Marrow CD133+ Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 6 de abril. En línea.
42. OMS. 2010. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
43. Pain WH, Clawson GA. 2006. Antisense applications for biological control. *J Cell Biochem*. 98:14–35.

44. Pessina A, Bonomi A, Sisto F, Baglio C, Cavicchini L, Ciusani E, Coccè V, Gribaldo L. 2010. CD45+/CD133+ positive cells expanded from umbilical cord blood expressing PDX-1 and markers of pluripotency. *Cell Biol Int*. 16 abril. En línea.
45. Pine SR, Ryan BM, Varticovski L, Robles AI, Harris CC. 2010. Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 2195-2200.
46. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Puppa AD, Frasson C, Sarto E, Scienza R, D'Avella D, Basso G. 2010. Intratumoral Hypoxic Gradient Drives Stem Cells Distribution and MGMT Expression in Glioblastoma. *Stem Cells*. 28: 851-862.
47. Popescu FD. 2005. Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy. *J Cell Mol Med*. 9: 840–853.
48. Popescu FD Popescu F. 2007. A review of antisense therapeutic interventions for molecular biological targets in asthma. *Biologics*. 1: 271–283.
49. Qiang L, Yang Y, Ma YJ, Chen FH, Zhang LB, Liu W, Qi Q, Lu N, Tao L, Wang XT, You QD, Guo QL. 2009. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 279: 13-21.
50. Rappa G, Fodstad O, and Lorico A. 2008. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a Molecular Therapeutic Target for Metastatic Melanoma. *Stem Cells*. 26: 3008-3017.
51. Sharpless NE, DePinho RA. 2004. Telomeres, stem cells, senescence and cancer. *J Clin Invest* 113: 160–168.
52. Shimada M, Sugimoto K, Iwahashi S, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T. 2010. CD133 expression is a potential prognostic indicator in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol*. 9 abril. En línea.
53. Sims AH, Howell A, Howell SJ, Clarke RB. 2007. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol*. 4: 516-525.
54. Singh Y, Murat P, Defrancq E. 2010. Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem Soc Rev*. Apr 14. En línea.
55. Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, Zabinski RF, Sutherland MK, Gerber HP, Van Orden KL, Moore PA, Ruben SM, Carter PJ. 2008.

- CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody- drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer*. 99: 100-109.
- 56.** Smelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, Clair RS, Baljevic M, white I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopolous GD, D'Angelica M, Kemeny , Lyden D, Rafii S. 2008. CD133 expression is not restricted to stem cell, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J clin invest*. 118: 2111-2120.
- 57.** Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. 2005. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 37: 715-9.
- 58.** Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, Costa C, Zhang F, Guo X, Rafii S. 2004. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood*. 103: 2055-61.
- 59.** Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF, Park DM. 2009. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*. 28: 3949-3959.
- 60.** Song W, Li H, Song Z, Zhao Q, Zhang F, Duo K. 2008. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Pract*. 62: 1212-1218.
- 61.** Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432:173–178.
- 62.** Taïeb N, Maresca M, Guo XJ, Garmy N, Fantini J, Yahi N. 2009. The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett*. 278: 164-73.
- 63.** Thomas M, Klivanov AM. 2002. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:14640-14645.
- 64.** Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Galderisi U, Cavaliere C, De Rosa A, Papaccio G. 2008. Detection and Characterization of CD133+ Cancer Stem Cells in Human Solid Tumours. *PLoS One*. 3(10): e3469.

65. Toren A, Bielora B, Jacob-Hirsch J, Fisher T, Kreiser D, Moran O, Zeligson S, Givol D, Yitzhaky A, Itskovitz-Eldor J, Kventsel I, Rosenthal E, Amariglio N, Rechavia G. 2005. CD133-Positive Hematopoietic Stem Cell “Stemness” Genes Contain Many Genes Mutated or Abnormally Expressed in Leukemia. *Stem Cells*. 23: 1142–1153.
66. Torne A, Setoain FJ, Pahisa J, Pons F, Lomeña F. 2006. Ovarian and paraaortic recurrence from cervix cancer detected by PET/CT. *Rev Esp Med Nucl*. 25: 31-34.
67. Ulanova M, Marcet-Palacios M, Munoz S, et al. 2006. Involvement of Syk kinase in TNF-induced nitric oxide production by airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 351:431–437.
68. Vorobjeva M, Zenkova M, Venyaminova A, et al. 2006. Binary hammerhead ribozymes with improved catalytic activity. *Oligonucleotides*, 16:239–252.
69. Wagner R P. 1999. Rudolph Virchow and the Genetic Basis of Somatic Ecology *Genetics*, Vol. 151, 917-920.
70. Weichselbaum R.R., Kufe D. 2009. Translation of the radio- and chemo-inducible TNFerade vector to the treatment of human cancers, *Cancer Gene Ther*. 16: 609–619.
71. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. 2008. Brca1 breast tumor contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cell with cancer stem cell characteristic. *Breast Cancer Res*. 10: 105.
72. Xu J, Zeng JQ, Wan G, Hu GB, Yan H, Ma LX. 2009. Construction of siRNA/miRNA expression vectors based on a one-step PCR process. *BMC Biotechnol*. 9:53.
73. Zhang B., Wang Y., Liu K., Yang X, Song M., Bai Y., 2008. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against peroxiredoxin I enhances the radiosensitivity of human intestinal cancer. *Biochem Pharmacol*. 75: 660–667.
74. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, et al. 2006. iRNA-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441:111–4.
75. Zitelli JA, Brown CD and Hanusa BH: Surgical margins for excision of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37:422-429.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Marisol Blancas Mosqueda

Candidato para el grado de
Doctor en Ciencias con acentuación en Microbiología.

Tesis: CD133: Blanco terapéutico en cáncer.

Datos personales: Nacida en Guanajuato Gto., el 13 de Agosto de 1977, hija de Marcos Blancas Zendejas y María Soledad Mosqueda Morales, y madre de Mariana Paulina Honorato Blancas.

Educación: Egresada de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista, en la Universidad Autónoma de Zacatecas, en el año 2000, estudios de Maestría en Biología Experimental, obteniendo el grado en el 2005.

Experiencia profesional: Técnico académico en el laboratorio de Biología de la Conservación de la Unidad Académica de Biología experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas, desde el 2004.