



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**IZTACALA**

**“EXPRESIÓN ASTROCITO-ESPECÍFICA DE LAS  
PROTEÍNAS FLUORESCENTES AMARILLA Y CIAN  
EN LA LÍNEA CELULAR C6, REGULADAS  
TRANSCRIPCIONALMENTE POR EL PROMOTOR DE  
LA PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ACÍDICA (*GFA2*),  
EMPLEANDO DOS VECTORES RETROVIRALES”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**JACQUELINE BETZABET YÁÑEZ JÁCOME**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JOSÉ SEGOVIA VILA**



**IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO ENERO DE 2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

A mis padres José Antonio Yáñez Becerril y Graciela Jácome Tejeda, por todo el apoyo, amor y comprensión que me han otorgado durante toda mi vida. Con esta tesis veo culminada una importante meta en mi vida, que les dedico y al mismo tiempo les agradezco por todo lo que han hecho por mí, pero sobre todo les agradezco por enseñarme a siempre permanecer en pie de lucha.

A mis hermanos José A. (Pepe), por el buen ejemplo que siempre ha representado para mí; Julio Cesar, por ayudarme a decidirme por esta carrera, por estimular mi aprendizaje; a E. Christopher, por ser mi confidente, y un motivo desde siempre de superación; a los tres por su amistad, cariño y apoyo incondicional.

A mi esposo Jair Rangel, por lo maravilloso que es, por su comprensión, apoyo y amor. Por que él entiende lo importante que es la biología para mí. Por lo feliz que me hace desde hace más de cuatro años. Por ser mi amigo y cómplice en mis proyectos y en mi vida. Por que en todo momento me insistió y ayudo para culminar esta meta.

A mis sobrinos Danahi y Alexis por que me contagian de su inocencia y alegría.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer instancia a la Universidad Autónoma de México, FES Iztacala, por ser la fuente de mi aprendizaje y proporcionarme las herramientas con las que con compromiso y orgullo trabajaré.

Al Dr. José Segovia, por permitirme realizar este proyecto, con lo que además pude aprender muchas cosas. A la química Paula, que siempre mostró disposición de ayudarme y a Alejandro B. por orientarme en mi trabajo.

Agradezco al M. en C. Jorge Gersenowies, por sus comentarios y revisión a esta tesis. Por los muchos conocimientos que me impartió, por contagiarme del gusto por la neurobiología, porque queda en mí como un ejemplo y un amigo.

A mi amiga Diana, por la gran amistad que hemos consolidado, demostrándome en todo momento muestras de cariño y apoyo. Por tener una palabra de aliento para mí, cuando lo he necesitado. Por compartir conmigo la pasión de ser biólogos y de estudiar la vida.

A Gloria, por la amistad que nunca morirá, y por que me brindó momentos inigualables, desde un siempre novedoso recorrido por las calles del centro, hasta una interminable plática.

A Daniel Candelas y Jorge Crespo por ser amigos con los que compartí muy buenos momentos en la carrera.

A mi prima Cecil, por su cariño y amistad desde niñas. A mis abuelitos Eutiquio y Tomasita, por ser ejemplo de vida.

Al Sr. Alfonso Rangel y la Sra. Martha B. por su cariño. A Lisette, por su ayuda en trámites y por su amistad. A la pequeña Lakshami por brindarme muchas sonrisas que en momentos de tensión, me ayudaron a relajarme.

A mis maestros que me regalaron muchos conocimientos, en especial al Dr. Sergio Vaca por sus atinados consejos, por su apoyo para realizar mi servicio social, y por enseñarme a ver la vida con simpatía. Al Dr. Diego Arenas, por ser un muy buen maestro y ejemplo de profesionalismo. Al Biol. Hector Barrera, por sus clases de biología celular que no dejan de servirme y sus palabras de apoyo. A los maestros Ángel, Pilar, Eduardo Barrera, Roberto Rico (donde quiera que este), Alberto Arriaga, Martín Martínez y Gumersindo por ser pilares en mi formación como bióloga y de quienes me llevo un grato recuerdo.

## Indice

Introducción.....	5
1. Astrocitos .....	6
1.1. Astrocitos reactivos.....	8
1.2. Astrocitos como plataforma para expresión génica.....	8
1.3. Astrocitos usados para estudios de desarrollo neural.....	8
1.4. Proteína glial fibrilar acídica .....	10
1.5. Línea celular C6 .....	10
2. Especificidad de la expresión de los transgenes.....	11
2.1. Promotor de la proteína glial fibrilar acídica.....	12
3. Sistemas de transferencia génica.....	13
3.1. Sistemas no virales.....	14
3.2. Sistemas virales.....	14
3.2.1. Vectores adenovirales.....	15
3.2.2. Vectores Adeno-asociados.....	16
3.2.3. Vectores Derivados del Herpes Virus Simplex Tipo 1.....	17
3.2.4. Vectores Híbridos.....	18
3.2.5. Vectores Retrovirales.....	18
3.2.6. Vectores lentivirales.....	19
3.3. Empacamiento del vector retroviral.....	20
3.3.1. Líneas celulares empacadoras.....	22
3.4. Utilización de vectores retrovirales de SNC.....	24
4. Proteínas fluorescentes como marcadores en expresión génica.....	25
Justificación.....	30
Objetivos.....	32
Estrategia experimental.....	33
Materiales y Métodos.....	35
1. Amplificación de p <sub>gfa2</sub> -LacZ, pBlueScript SK+ y de los vectores retrovirales pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP .....	36
1. Construcción de pBScGfa2.....	36
2.1. Secuenciación de pBScGfa2.....	41
3. Construcción pLNgfaECFP .....	42
4. Construcción pLNgfaEYFP.....	42
5. Obtención de retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP.....	42
5.1. Cultivos celulares.....	42
5.2. Transfección de GP+E-86.....	44
5.3. Transducción de células NIH-3T3 y obtención del título viral.....	44
6. Transducción de C6 con los vectores retrovirales.....	45
7. Fijación de células y observación en microscopio de fluorescencia.....	46
Resultados.....	47
1. Construcción del plásmido pBScGfa2.....	47
1.1 Secuenciación de pBScGfa2.....	50
2. Construcción de pLNgfaECFP .....	51
3. Construcción de pLNgfaEYFP.....	53

4. Obtención de retrovirus pLNgaECFP y pLNgaEYFP.....	55
5. Transducción de C6 con los vectores retrovirales.....	56
6. Expresión de las proteínas fluorescentes cian y amarillas en las líneas celulares C6, NIH-3T3 y GP+E-86.....	56
Discusión .....	62
Conclusiones.....	64
Referencias.....	66
Lista de abreviaturas.....	77

## **INTRODUCCIÓN:**

Durante las últimas décadas, ha surgido un explosivo progreso en diversas ramas biológicas, como la patología, microbiología, bioquímica, biología celular y sobre todo en la biología molecular; esta última ha permitido además de conocer los sistemas vivos con mayor definición, también, y citando a Theodore Friedmann (1999): “un nuevo entendimiento de la biología humana: lo normal y lo anormal”. Por medio de técnicas como la clonación génica, se han generado muchas investigaciones para poder analizar los elementos responsables de regular la expresión génica, y subsecuentes análisis se han realizado para evaluar la actividad de estos en diferentes condiciones fisiológicas o para poder evidenciar sus características fenotípicas. Los efectos que los genes tienen sobre el crecimiento celular y desarrollo de tejidos han podido vislumbrarse por la sobre-expresión o mutaciones nulas de determinados genes (Klingston, 1997). Aunado a esto, el hacer posible la clonación o introducción de material génico a diversos tipos celulares y crear líneas celulares modificadas ha abierto puertas para nuevas y quizás mejores alternativas de tratamientos, para los diversos “padecimientos genéticos”, introduciendo material genético a las células somáticas de un individuo, para con ello obtener resultados benéficos a este, es decir, “Terapia génica”. Esto ha podido ser logrado por el uso de herramientas moleculares para la transferencia de genes, aunque se sigue buscando el perfeccionamiento de estos.

Particularmente para las neurociencias la transferencia génica es una herramienta que ha sido utilizada para ayudar en la comprensión de los diferentes mecanismos celulares. Sin embargo, dado que el cerebro es un complejo órgano con intrincadas interconexiones entre varios tipos de neuronas, glia y otras células, su manipulación genética es complicada y requiere de la combinación de células transplantadas y métodos de transferencia génica donde se proporcione la seguridad y eficiencia de estos (Davidson y Breakefield, 2003).

En ese sentido varios tipos de células han sido propuestas para usarse como vehículos para liberación génica en el Sistema Nervioso Central (SNC), como células progenitoras, neuronas, células de la glia, fibroblastos, entre otros tipos celulares que han sido probados para este propósito (Ridet et al., 1999; Davidson y Breakefield, 2003).

## 1. ASTROCITOS

El Sistema nervioso central se compone de dos principales tipos celulares, las neuronas y las células gliales (glia). En el sistema nervioso de los vertebrados, existen de 10 a 50 veces más células gliales que neuronas (Kandel et al., 2001). Se reconocen tres tipos celulares de la glia: 1. La macroglia, como astrocitos y oligodendrocitos, originadas del ectodermo del tubo neural; 2. la microglia, con células macrofágicas, de origen mesodérmico y 3. las células ependimales, de origen ectodérmico.

El tejido glial realiza entre otras funciones el papel de sostén, alimentación y protección para las neuronas (Junqueira y Carneiro, 1987). Los astrocitos son elementos muy importantes dentro del SNC porque cumplen con diversas funciones:

En condiciones normales los astrocitos juegan un importante papel en el monitoreo del microambiente (Muñoz y Ludwin, 1985), realizando una variedad de importantes procesos fisiológicos. Aquellos encontrados adyacentes al endotelio, son importantes para el transporte de células sanguíneas (por ejemplo leucocitos, durante inflamación) y nutrientes a través de la barrera hematoencefálica. Los ácidos grasos son transferidos del plasma al cerebro a través de las células endoteliales y astrocitos, los cuales son capaces de desnaturalizarlos y formar ácidos grasos poliinsaturados, con los que las membranas de las células cerebrales son enriquecidas. Inmunológicamente participan en la remoción de restos celulares. En la regulación del balance iónico (homeostasis), regulan las concentraciones de  $K^+$ , pH y el volumen del espacio extracelular; los astrocitos pueden activamente transportar  $Cl^-$  y poseen anhidrasa carbónica, la enzima responsable para la transformación de  $CO_2$  producido por la actividad neuronal a  $HCO_3^-$ ; expresan canales de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y dependientes de voltaje en sus membranas, que son necesarias para redistribuir el exceso de  $K^+$  liberado por la actividad neuronal (Tacconi, 1998). Y participan en el metabolismo de algunos neurotransmisores, como el GABA, glutamato y serotonina; expresan las enzimas GABA transaminasa y la glutamina sintetasa (Fedoroff y Vernadakis, 1986).



## 1.1 ASTROCITOS REACTIVOS

Una de las características más notables de los astrocitos, que además es conservada en diversas especies animales, es su rápida respuesta a diversos daños neurológicos (astrocitosis), como traumatismos focales mecánicos (daños en el tejido del SNC), o daños causados por la muerte celular de diversos padecimientos neurales, tales como en demencia por SIDA, una variedad de otros padecimientos virales, isquemia, hipoxia, epilepsia, encefalopatías espongiiformes asociadas a priones, y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, epilepsia, entre otras (Eng, 1985; Eddleston y Mucke, 1993; Tacconi, 1998; Segovia, 2002). En estos casos, los astrocitos responden con un aumento en el tamaño y número de estos, se acumula glicógeno y se edematizan (Tacconi, 1998), neuroquímicamente experimentan un aumento de la expresión de la proteína citoesquelética: proteína glial fibrilar ácida (GFAP), lo que provoca fibrosis, y sólo cesa la transcripción de esta proteína hasta que el astrocito recibe señales neuronales (Eddleston y Mucke, 1993).

Existe evidencia que los astrocitos reactivos participan en varios procesos biológicos importantes como en la regulación de niveles de neurotransmisores, reparación de matriz extracelular y soporte trófico de otros componentes celulares del SNC (ver revisión de Eddleston y Mucke, 1993).

Aunque son muchos los conocimientos generados en cuanto a la función de los astrocitos reactivos, de las moléculas que liberan y para que le sirven a otras células del SNC; sin embargo aún se requieren más investigaciones de astrocitos en co-cultivo con otras células del SNC como neuronas, como modelos *in vitro* de padecimientos neurológicos, donde se evalúe el papel de los astrocitos reactivos en respuesta a daño neuronal, o bien estudios donde se busque moléculas responsables de astrocitosis, tales como factores promotores-gliales (GPFs) que al ser liberadas por neuronas estimulan el crecimiento de astroglia en cultivo (Bottenstein et al., 1988).

## **1.2. ASTROCITOS COMO PLATAFORMA PARA EXPRESIÓN GÉNICA**

El poder responder al daño neuronal, es un atributo para que el astrocito sea una buena plataforma de expresión de moléculas de interés terapéutico en el cerebro (Cortez et al., 2000; Ridet et al., 1999; Segovia et al., 1998a; Segovia et al., 1998b; Zamorano et al., 2004). Aunado a esto, los astrocitos tienen un eficiente sistema secretor y proveen soporte a las neuronas a través de liberar factores tróficos que promueven su supervivencia, diferenciación y regeneración.

El pequeño espacio que existe entre los procesos astrocíticos con las neuronas, hace posible el usar estas células para la liberación de sustancias neuroactivas (Segovia et al., 1998b). Además los astrocitos pueden ser fácilmente separados de los demás componentes celulares del cerebro y crecerse en cultivo (McCarthy y De Vellis, 1980), incluso pueden ser criopreservados y modificados genéticamente para expresar transgenes en células inmortalizadas (Segovia et al., 1998<sup>a</sup>; Segovia et al., 1998b; Ridet et al., 1999; Cortez et al., 2000; Zamorano et al., 2004).

La principal característica que hace que los astrocitos sean usados como vehículos de transferencia génica en el SNC, es que siendo constituyentes de este, con ellos se puede realizar transferencia génica *ex vivo* (introducción de genes exógenos en células de cultivo, para luego introducir estas células modificadas en modelos animales o en pacientes), sin provocar reacción inmunológica (Ridet et al., 1999).

## **1.3. ASTROCITOS USADOS PARA ESTUDIOS DE DESARROLLO NEURAL**

El desarrollo del sistema nervioso mamífero presenta algunos notables ejemplos de interacción entre células. Entre estas, la interacción neurona-glia es extremadamente importante debido a que la glia juega un importante papel en el establecimiento de la arquitectura cerebral y en el desarrollo. Numerosos estudios han revelado que durante el desarrollo, las células gliales están involucradas en la migración neuronal (glia radial); la remoción de células y restos celulares (microglia); y formando la barrera hematoencefálica (astrocitos) (Zhang, 2001).

Las células gliales proveen señales neurotróficas a neuronas, que son requeridas para su sobrevivencia, proliferación y diferenciación. Además se ha demostrado que las células gliales intervienen en la migración neuronal durante el desarrollo embrionario del cerebro. La forma y polaridad neuronal, son de fundamental importancia para una adecuada formación de los circuitos durante el desarrollo del sistema nervioso, siendo esto regionalmente modulado por poblaciones de astrocitos (Barres y Barde, 2000).

Si bien son varias las investigaciones que indican la influencia de las células gliales en muchos aspectos de la morfología y fisiología neuronal, el efecto de neuronas sobre la diferenciación de células gliales no se ha comprendido completamente. Al respecto se han realizado estudios donde se muestra que la diferenciación de astrocitos puede ser modulada por neuronas *in vitro* (Alcantara et al., 1999).

Acerca del origen de los astrocitos se ha encontrado que sus precursores embrionarios expresan el filamento intermediario vimentina, el cual es reemplazado por la GFAP durante la maduración astrocítica. Por lo que Alcantara et al. (1999) evaluaron el papel que desempeñan las neuronas de embrión en la diferenciación astrocítica en un co-cultivo de astrocitos obtenidos de un ratón transgénico (embrión) con el promotor de GFAP regulando la expresión del gen *lacZ* que codifica para la proteína reportera  $\beta$ -galactosidasa; probando que las neuronas promueven la diferenciación de astrocitos, en donde los autores proponen que es por la liberación de factores que se unen directa o indirectamente al promotor de GFAP, promoviendo la transcripción del gen reportero, lo que se reflejó en un aumento en la expresión de  $\beta$ -galactosidasa, sin embargo aún se realizan estudios para encontrar las moléculas responsables de la diferenciación (Alcantara et al., 1999). El papel activo de los astrocitos en la formación del SNC, función y plasticidad neuronal es una interesante área de investigación para los años venideros.

#### **1.4. PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ACÍDICA (GFAP)**

Otra característica de los astrocitos que los diferencia de otras células, es la expresión en su citoplasma, de la proteína glial fibrilar ácida (Kristjan y Mirsky, 1980; Muñoz et al., 1985). La GFAP fue aislada por primera vez en placas de esclerosis múltiple; constituyendo la proteína más abundante encontrada en astrocitos. Los filamentos GFAP son uno de las cinco clases de filamentos citoplasmáticos intermedios, que pueden ser distinguidos por métodos inmunológicos y bioquímicos (Jessen et al., 1980); y son llamados filamentos intermedios por su tamaño de 10 nanómetros de diámetro, intermedio entre los microfilamentos (6 nanómetros) y los microtúbulos (23 nanómetros); los filamentos intermedios están involucrados con la elasticidad y el mantenimiento de la integridad celular. Además de la proteína glial fibrilar ácida pertenecientes a esta clase se encuentran los neurofilamentos, encontrados en los sistemas nerviosos central y periférico, la desmina, encontrada predominantemente en músculo, esqueleto y células del músculo cardíaco; la ventina, presente en células mesenquimales y la queratina, de las células epiteliales (Fuchs y Cleveland, 1998). La GFAP es encontrada casi exclusivamente en astrocitos, por lo que ha sido considerada como “marcador celular específico de astrocitos” (Jessen et al., 1980; Eng L, 1985; Chiu et al., 1981).

La regulación transcripcional del gen de la GFAP está íntimamente relacionada con las funciones de los astrocitos: su activación inicial marca la diferenciación de los mismos y el aumento en su expresión evidencia daño en el sistema nervioso (Segovia, 2002).

### **1. 5. LÍNEA CELULAR C6**

La línea celular C6 proviene de un glioma de rata, es un modelo usado para estudiar las propiedades bioquímicas de las células gliales. Algunas propiedades gliales son conservadas en las células C6, tienen un fenotipo no diferenciado con rapidez en la división celular. Estas células expresan la GFAP en su citoplasma, proteína que puede incrementarse tras un aumento intracelular de AMPc por

efecto de forskolina, dbcAMP, toxina de cólera, entre otros compuestos (Messens y Slegers, 1992; Segovia et al., 1994).

## **2. ESPECIFICIDAD DE LA EXPRESIÓN DE TRANSGENES**

Para regular la expresión génica se ha usado algún promotor, es decir, la región de ADN que participa en la unión de la ARN polimerasa para el inicio en la transcripción. Como el promotor de citomegalovirus humano (CMV), que no es específico a ningún tipo celular, por lo que este tipo de promotores, generalmente permanecen activos por años, pero pueden ser inactivados por metilación, además la expresión de los transgenes es baja, lo que dificulta su detección (Thomas et al., 2003). Con el fin de controlar el nivel, duración y especificidad de la expresión transgénica, se usan promotores específicos que limiten la expresión transgénica a una población celular, con lo que se evita principalmente, una inapropiada expresión de los transgenes a otros tipos celulares con graves consecuencias (Ferver, 2001; Benitez y Segovia, 2003). Para esto se usan generalmente promotores mamíferos, constituyendo regiones génicas regulatorias, no codificantes de proteínas, que normalmente sean expresados en la célula blanco (Davidson y Breakefield, 2003).

### **2.1. PROMOTOR DE LA PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ACÍDICA (GFAP)**

Como se mencionó anteriormente, los astrocitos pueden ser usados para expresar transgenes en el SNC, promoviendo la expresión de manera específica en estas células de ADN exógeno, Brenner y colaboradores propusieron en 1994, al promotor de la proteína glial fibrilar acídica humana (*gfa2*) para cumplir con este propósito. Este promotor es activo desde la diferenciación de los astrocitos, y permanece así durante toda la vida del individuo (Segovia, 2002). En 1991, Besnard y colaboradores, identificaron una secuencia mínima de la región no traducida 5' del gen de la GFAP, que es suficiente para manejar la expresión de genes reporteros, debido a que poseen sitios para la regulación de la transcripción de la GFAP; uno de los elementos encontrados es un sitio para un factor de transcripción que es regulado por AMPc. Se ha reportado que la actividad de *gfa2* incrementa en respuesta a señales extracelulares que inducen gliosis reactiva (Tacconi, 1998) o incremento intracelular de AMPc, provocando cambios morfológicos en los astrocitos (Messens y Slegers, 1992; Segovia et al., 1994).

Contiene además elementos de respuesta a los factores de transcripción Sp-1, Ap-1, Ap-2 y NF-1 (Besnard et al., 2001).

La regulación transcripcional del promotor de la GFAP fue probada por Brenner y colaboradores en 1994, donde produjeron ratones transgénicos que expresan la proteína reportera  $\beta$ -galactosidasa, ligado a este promotor en el extremo 5' del ADNc. La expresión de  $\beta$ -galactosidasa fue observada en astrocitos, probando que el promotor puede dirigir la expresión de transgenes específicamente en este tipo celular; este promotor es estimulado durante la gliosis, generando un mecanismo de retroalimentación en el cual un incremento en el daño inducido por una enfermedad regularía la transcripción del transgen. Consecuentemente con el promotor de la GFAP, los astrocitos en los cuales este es expresado, podrían ser una plataforma para expresar transgenes en el SNC (Segovia et al., 1998b).

### **3. SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA**

La introducción de material genético con fines experimentales se conoce como transferencia de genes. Los métodos de transferencia de genes incluyen sistemas virales y no virales.

#### **3.1. SISTEMAS NO VIRALES:**

ADN exógeno puede ser introducido con la ayuda de métodos de transferencia químicos tal es el caso de la transfección mediada por fosfato de calcio, donde se produce un ambiente químico que resulta en la unión del ADN a la superficie celular, el ADN es introducido en la célula, por endocitosis (Friedmann, 1994; Klingston, 1997).

La electroporación ha sido usada para eficientemente introducir genes virales en una variedad de tipos celulares *in vitro*, en este sistema se usa un campo eléctrico que abre poros en la membrana celular, a través de los cuales el

ADN entra a la célula. Este tipo de sistema puede ser usado para prácticamente todas las células.

La encapsulación de ADN en vesículas lipídicas (liposomas) es un método donde la transfección del ADN es mediada por lípidos catiónicos; los grupos fosfatos del ADN cargados negativamente, se unen a la superficie de los liposomas cargados positivamente, y la carga residual positiva entonces presumiblemente media la unión a los residuos cargados negativamente de la superficie celular (ácido sialico) (Kingston, 1997).



### **3. SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA**

La introducción de material genético con fines experimentales se conoce como transferencia de genes. Los métodos de transferencia de genes incluyen sistemas virales y no virales.

#### **3.1. SISTEMAS NO VIRALES:**

ADN exógeno puede ser introducido con la ayuda de métodos de transferencia químicos tal es el caso de la transfección mediada por fosfato de calcio, donde se produce un ambiente químico que resulta en la unión del ADN a la superficie celular, el ADN es introducido en la célula, por endocitosis (Friedmann, 1994; Kingston, 1997).

La electroporación ha sido usada para eficientemente introducir genes virales en una variedad de tipos celulares *in vitro*, en este sistema se usa un campo eléctrico que abre poros en la membrana celular, a través de los cuales el ADN entra a la célula. Este tipo de sistema puede ser usado para prácticamente todas las células.

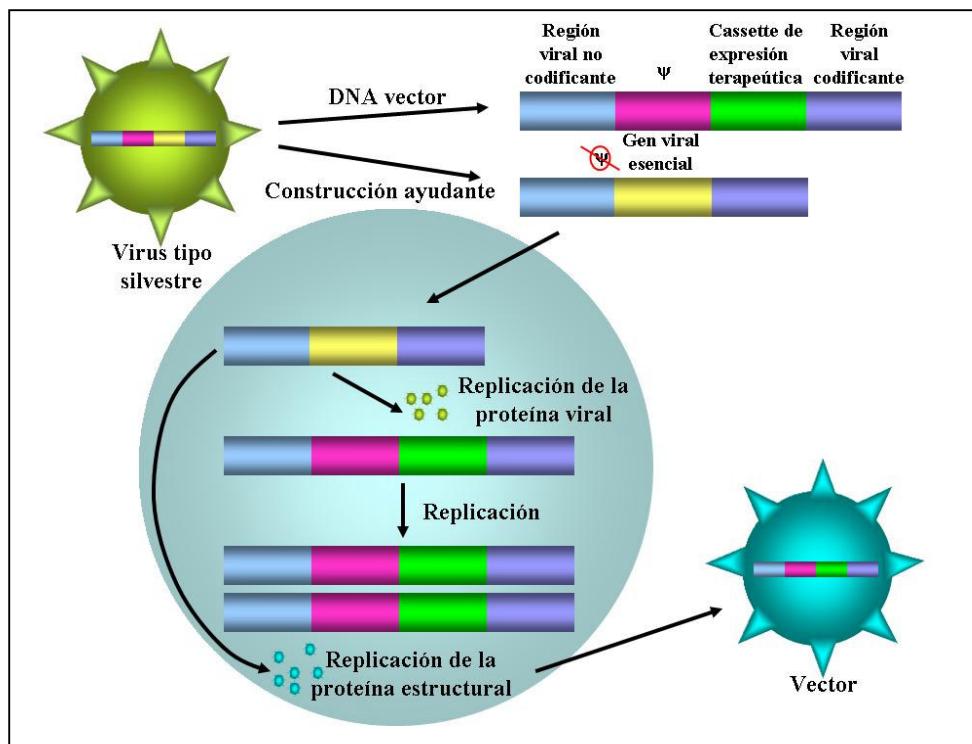
La encapsulación de ADN en vesículas lipídicas (liposomas) es un método donde la transfección del ADN es mediada por lípidos catiónicos; los grupos fosfatos del ADN cargados negativamente, se unen a la superficie de los liposomas cargados positivamente, y la carga residual positiva entonces presumiblemente media la unión a los residuos cargados negativamente de la superficie celular (ácido sialico) (Kingston, 1997).

#### **3.2. SISTEMAS VIRALES:**

Los virus son máquinas biológicas altamente evolucionadas, que eficazmente acceden a las células hospederas para explotar la maquinaria celular para su replicación (Thomas et al., 2003). El ciclo viral puede ser dividido en dos fases: Infección y replicación. La infección resulta de la introducción del genoma viral dentro de la célula. Esto da paso a la replicación, donde se sintetizan muchas copias del genoma viral, para continuar con la expresión, cuando las proteínas

estructurales son expresadas y se generan nuevas partículas virales (Kay et al., 2001).

En la construcción de un vector viral, los genes codificantes y las secuencias reguladoras del genoma viral (en *cis*) necesarios para la reconstitución de nuevas partículas virales, son separados del resto del genoma del virus (Güzburg y Salmons, 1995), pero se dejan intactas las secuencias que son requeridas para el empacamiento del genoma del vector. Los genes deletados codifican para proteínas involucradas en la replicación o para las proteínas de la cápside (Thomas et al., 2003); y son incorporados a plásmidos o en virus modificados (construcciones ayudantes) que proveen las funciones *in trans* al transfectarse en células empacadoras (Kay et al., 2001). En sustitución de los genes virales deletados, se les introduce un “cassette” de expresión con genes reporteros en el caso de monitoreo celular o un gen terapéutico, en el caso de terapia génica (figura 1).



**Figura 1.** Estrategia genética para el diseño de un vector viral. El ADN de la construcción “ayudante” (plásmido o virus) que contiene genes esenciales para la replicación viral, es establemente insertado dentro del ADN cromosomal de la célula empacadora. El ADN ayudante carece del dominio de empacamiento ( $\emptyset$  o  $\psi$ ). El vector contiene el cassette de expresión con el ADN exógeno, que ha sustituido los genes regulatorios y conserva el dominio de empacamiento. Este vector es transfectado a la célula empacadora. Las proteínas virales que se requieren para la replicación del vector son producidas, permitiendo la síntesis de muchas copias del vector. Las proteínas virales estructurales reconocen al vector ( $\psi$  positivo) pero no al ayudante ( $\psi$  negativa), para resultar en el empacamiento de los ácidos nucleicos del vector infeccioso, pero carente de replicación (modificado de Thomas et al., 2003).

El genoma del vector y la construcción ayudante son co-transfectados en la célula empacadora para la producción de partículas recombinantes, deficientes de replicación (Thomas et al., 2003); de hecho, asegurar la producción de virus deficientes en su replicación es un factor determinante en la eficiencia y seguridad del vector (Kay et al., 2001).

La concentración relativa de vectores producida por células empacadoras, es medida como título viral, expresado como la concentración de partículas virales y/o el número de viriones que son capaces de transducción, esto es referido como unidades formadores de colonias/ml (CFU/ml) (Kay et al., 2001).

La infección defectuosa (no replicativa) que introduce información genética funcional del vector recombinante dentro de la célula blanco es conocida como transducción.

Existen mas de 10 tipos de vectores con diferente tropismo (el rango de tipos celulares que pueden infectar) que permiten aplicaciones distintas, pero son cinco los más estudiados, que pueden ser categorizados en dos grupos dependiendo de si su genoma se integra a la cromatina de la célula hospedera (oncoretrovirus y lentivirus) y los que se mantienen en el núcleo extracromosomales o episomales (AAV, adenovirus y herpes virus) (Davidson et al., 2003).

### **3.2.1. VECTORES ADENOVIRALES**

Los adenovirus contienen una doble cadena de ADN en su genoma; la mayoría causan infecciones del tracto respiratorio, sin embargo, infectan diversos tipos de células diferenciadas y en proliferación (Friedmann, 1999). El ciclo vital no implica la integración de su ADN en el genoma de la célula hospedera, debido a que se replican como elementos episomales en el núcleo de la célula huésped, por lo que no causan ningún riesgo de mutagénesis insercional (Thomas, et al., 2003).

Aproximadamente 36 kb de genoma viral contienen unidades de regulación transcripcional y ADN codificante para cerca de 50 polipéptidos. Al entrar a la célula la partícula viral contiene proteínas que promueven la lisis endosomal permitiendo la entrada del genoma viral al núcleo. El gen temprano E1 es rápidamente transcrito y sirve en parte para iniciar el proceso de expresión génica viral culminando en la replicación del genoma. Además de E1, para el proceso replicativo es requerido el gen E2; mientras que el gen E3 se encuentra involucrado con el secuestro del complejo de histocompatibilidad lo que evita que el virus provoque respuesta inmune. Seguido de la replicación, los genes de las proteínas estructurales son transcritas y traducidas para envolver los virus. Una célula puede producir cerca de 10 000 viriones que son liberados por la lisis viral-inducida celular. Por lo que pueden obtenerse concentraciones de  $1 \times 10^{13}$  partículas virales/ml (Kay et al., 2001).

Los vectores adenovirales deficientes de replicación (vectores Ad) de primera generación se construyeron por la delección del gen E1, no son capaces de replicación, pero su uso provoca una fuerte respuesta inmune a antígenos virales. En Vectores Ad de segunda generación se deletaron los genes E2a y E4 y/o los fragmentos de lectura abierta en el gen E4, con lo que se disminuyó la antigenidad de los vectores.

Recientemente, Ad “de alta capacidad” han sido generados para retener sólo las secuencias ITR (repetidos terminales invertidos) necesarias para empacamiento y replicación del genoma, pero han sido deletados los genes estructurales; lo que le confirió varias ventajas como: alta eficiencia de transducir células blanco *in vitro* e *in vivo*, alta capacidad transgénica (cerca de 37 kb), obtención de un alto título viral ( $> 10^{11}$ /ml), expresión prolongada de los transgenes liberados y la respuesta antigénica fue disminuida, aunque aún sigue siendo un problema (Constantini et al., 2000). Para estos vectores Ad no se han podido construir células empacadoras (células con los genes deletados que ayudan *en trans* a la replicación de virus infectivos no replicativos), por lo que se han generado construcciones plasmídicas o virales ayudantes con los genes requeridos para la replicación (Kay et al., 2001).

### 3.2.2. VECTORES ADENO-ASOCIADOS

Los virus adenoasociados (AAV) son pequeños parvovirus que no se ha encontrado que sean patógenos al hombre, lo que además de su pequeño tamaño (20-24 nm en diámetro), los vuelve interesantes para usarlos como vectores (Kay et al., 2001). Se constituyen de una sola cadena de ADN; los vectores basados en AAV tienen una capacidad transgénica de 4.5 kb. En los AAV silvestres el gen *cap* codifica para proteínas estructurales, el gen *rep* es requerido para la amplificación replicativa del genoma viral y es el gen necesario para la integración específica en el cromosoma 19q. Flanqueante a estos genes se encuentran las terminales de repetidos invertidos (ITRs) que contienen elementos necesarios para la replicación y empacamiento de las partículas virales.

En los vectores basados en estos AAV, los genes *rep* y *cap* son deletados y colocados en plásmidos o virus ayudantes. Debido a la delección del gen *rep*, los vectores pierden la capacidad de integrarse al cromosoma 19q. La expresión del transgen por largo tiempo de los vectores AAV es facilitada por la capacidad de estos, para integrarse y/o mantenerse como un elemento episomal dentro del núcleo celular hospedero (Constantini et al., 2000). Son capaces de infectar a un amplio número de tipos de células post-mitóticas (Thomas et al., 2003).

En la infección de los vectores AAV requiere la presencia de adenovirus modificados para proveer funciones ayudantes, los cuales pueden ser separados por gradiente de centrifugación; sin embargo las proteínas desnaturalizadas que quedan tienen potencial tóxico (Davidson et al., 2003). Recientemente se ha generado un método libre de Adenovirus para producción de AAV recombinantes en altos títulos, a su vez se han desarrollado nuevas estrategias para purificación de vectores AAV (Constantini et al., 2000).

Este vector puede por su tamaño pequeño y simplicidad, ser administrado en altas dosis sin provocar respuesta inflamatoria ni efectos tóxicos (Davidson et al., 2000), sin embargo, se ha visto la generación de anticuerpos neutralizantes

después de su administración por lo que limita la re-administración (Kay et al., 2001).

### **3.2.3. DERIVADOS DEL HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1)**

El virus HSV-1 es el virus con mayor complejidad de todos los virus que son desarrollados para terapia génica, y una importante característica de este vector es su capacidad de llevar fragmentos de ADN exógeno (Davidson et al., 2003). El virus silvestre HSV-1 es un virión envuelto (su cápside esta envuelta por una bicapa lipídica), es un patógeno humano que tiene preferencia por las neuronas (el HSV-1 silvestre puede causar encefalitis). Este tipo de vector no se integra en el genoma celular, permaneciendo episomal. A partir del HSV-1 se han generado dos tipos de vectores: vectores deficientes de replicación y los amplicones (Friedmann, 1994). Los vectores HSV-1 de replicación deficiente pueden llevar hasta 40 kb de ADN exógeno. Estos vectores poseen la desventaja de causar problemas inflamatorios y su expresión es transitoria (de corto tiempo). Para evitar la respuesta inmune se han generado los amplicones, que están basados en plásmidos bacteriales que contienen el origen de replicación y la señal de empacamiento de HSV-1 por lo que son empacados en viriones HSV-1 infecciosos; tienen mayor capacidad transgénica (hasta 150 kb), pudiendo llevar varios “cassettes” de expresión de genes. Ambos vectores tienen la ventaja de que pueden obtenerse en altos títulos virales (Davidson et al., 2003).

### **3.2.4. VECTORES HÍBRIDOS**

En algunas investigaciones se ha realizado la combinación de las mejores características de los diferentes virus en vectores híbridos. Uno de los más interesantes es el híbrido donde se acopla la maquinaria de integración sitio específico de los virus AAV con la eficiencia para internarse en el núcleo celular del adenovirus o del herpes virus. La doble cadena del genoma AAV es envuelta en la cápside adenoviral, debido a la combinación de ITRs AAV y adenovirales (Kay et al., 2001). En otros vectores se conjunta el AAV y Ad, con la expresión

transitoria de la proteína Rep, para intentar conseguir la integración sitio-específico y evitar mutagénesis insercional. Aunque de forma no clara sólo ocurre de un 50-70% de los eventos de integración se da sitio-específico, por lo que aún queda latente el riesgo de mutagénesis insercional (Thomas et al., 2003).

Otros vectores híbridos han sido realizados al combinar el genoma retroviral con el adenoviral para integrar en la ausencia de la actividad de la integrasa retroviral. Otros métodos usan la integración sitio específica de ADN usando integrasas bacteriófagas; sin embargo aún se sigue experimentando con estos sistemas (Thomas et al., 2003; Kay et al., 2001).

### **3.2.5. VECTORES RETROVIRALES**

Los retrovirus fueron los primeros virus en ser modificados para la transferencia génica y han sido los más usados en casos clínicos con terapia génica. El vector retroviral más comúnmente utilizado es el virus de la Leucemia Murina de Moloney (MoMLV), aunque recientemente se han generado vectores basados en el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH (lentivirus) (Eglitis y Anderson, 1988).

Los retrovirus son virus envueltos (bicapa lipídica rodeando la cápside), en cuyo interior se encuentra una sola cadena de RNA de 7 a 11 kb (Thomas et al., 2003).

Los retrovirus han evolucionado de tal manera que son capaces de integrar su genoma eficientemente en la cromatina celular de una gran variedad de tipos de células (Günzburg y Salmons, 1995), en donde permanecen y se replican junto con ella. En el caso del retrovirus MoMLV requiere de la disrupción de la membrana para la preintegración del material genético y su posterior acceso a la cromatina, por lo que la transducción por este vector es estrictamente dependiente de mitosis celular. Esto puede ser una limitación puesto que la mayoría de las células somáticas son diferenciadas (Kay et al., 2001); sin embargo, estos vectores han sido ampliamente usados en la transferencia de genes para el

estudio de una gran variedad de enfermedades, presentan las ventajas de ser fácilmente manipulables *in vitro* además de que el genoma se integra de manera estable a la célula anfitriona sin presentar una toxicidad aparente. Pueden así, ser usados para transferencia génica en células inmortalizadas *in vitro* e *in vivo* (Eglitis y Anderson, 1988).

Las desventajas de este tipo de vectores es que se obtienen títulos virales menores en comparación con otros sistemas virales, actualmente se cuentan con líneas celulares empacadoras con las que se puede obtener títulos virales de  $1 \times 10^7$  partículas de transducción (t.u.)/ml (Kay et al, 2001) y debido a su inserción azarosa, existe el riesgo de mutagénesis insercional, induciendo la regulación anormal de oncogenes y la posibilidad de formar tumores (Friedmann,1994; Gunzburg y Salmons, 1995, Sokol y Gewirtz, 1996, Slack y Miller, 1996).

### **3.2.6. VECTORES LENTIVIRALES**

Los lentivirus basados en VIH-1 tienen la ventaja de tener la capacidad para integrarse en el genoma hospedero de células no mitóticas. El rango restringido de hospederos, títulos bajos y las características patogénicas de VIH-1 limitan su utilidad como un sistema de transferencia génica.

En un esfuerzo por retener los atributos positivos de los lentivirus, se han hecho vectores VIH-1 pseudotipificados con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) con la que se amplía el rango de tejidos hospederos (tropismo).

Asi mismo, para minimizar la posibilidad de generar virus con replicación competente a través de recombinación, se emplea un sistema de expresión transitoria de tres plásmidos: el primero es el de empaquetamiento de VIH-1, el segundo plásmido contiene la integrasa y un promotor que dirige la expresión de los transgenes y un tercer plásmido que expresa la glicoproteína G de superficie del VSV-G (Kay et al., 2001; Thomas et al., 2003).

Estos virus tienen genes adicionales que codifican para proteínas estructurales importantes en su regulación transcripcional (tat, rev, vpu). Algunos



de estos genes codifican para proteínas de la matriz y vpr que facilitan la integración de proviral en el cromosoma proviral en el cromosoma de células postmitóticas. Las proteínas Ma y vpr, facilitan la entrada al núcleo, interactuando con la maquinaria de transporte nuclear y mediando el transporte activo del complejo de preincubación de VIH a través del nucleoporo (Constantini et al., 2000, Kay et al., 2001).

Los vectores lentivirales transducen eficientemente varios tipos de tejidos diferenciados, epitelios de roedores, humanos y otras especies (Davidson y Breakefield, 2003).

### **3.3. EMPACAMIENTO DEL VECTOR RETROVIRAL**

Todos los genomas retrovirales silvestres tienen dos secuencias terminales largas de repetidos (LTR) en los extremos finales, estas secuencias contienen al promotor, señales “enhancer” necesarias para la iniciación y terminación de la transcripción (poli-A), señales para la integración y encapsulación (secuencia psi, fundamental para el empaquetamiento del ARN viral). Seguido de LTR 5', se encuentra la secuencia psi, y tres genes estructurales *gag*, *pol* y *env* que codifican las proteínas estructurales, las polimerasas/integrasas y las glicoproteínas, respectivamente; al final de esta secuencia se continua con una LTR 3' (Friedmann, 1994; Günzburg y Salmons, 1995).

La infección retroviral es un proceso de varios pasos. Primero, los retrovirus pueden unirse a la superficie de la célula blanco vía receptor celular, para internalizarse en el citoplasma donde la transcriptasa reversa derivada del gen *pol* convierte el genoma del ARN del virus en una doble cadena de ADN. El ADN lineal debe llegar al núcleo. Una o más copias del ADN se integran en el genoma del huésped, con ayuda de la enzima integrasa (gen *pol*). El ADN proviral integrado se transcribe por la ARN polimerasa II de la maquinaria del huésped para producir ARNs virales (Wahlfors et al., 1997), que sirven tanto como ARNm y como genomas para ser empaquetados como viriones (figura 2). Las enzimas

transcriptasa inversa e integrasa se transportan con el genoma en la partícula viral (Eglitis y Anderson, 1988; Lewin, 2001).

La localización de secuencias regulatorias que actúan *en cis* en las LTR hace posible que estos virus puedan ser usados como vectores sustituyendo los genes gag, pol y env por un cassette de expresión de 8.5 kb (Constantini et al, 2000).

Los vectores retrovirales usualmente son contruidos de tal manera que puedan introducir más de un gen a la célula blanco. Usualmente en tales vectores se les incorpora un gen que codifica para un marcador selectivo con el cual poder identificar clonas transducidas con el vector y poder generar poblaciones celulares a partir de las clonas seleccionadas, un ejemplo de esto es el gen bacterial selectivo neo, que confiere a las células resistencia a la droga G418 (Eglitis y Anderson, 1988).

Los genes estructurales son proporcionados *in trans* en dos construcciones separadas que son establemente incorporadas a líneas empacadoras, para poder realizar la replicación viral con la maquinaria celular, lo que además aumenta la bioseguridad del vector (Friedmann, 1994).

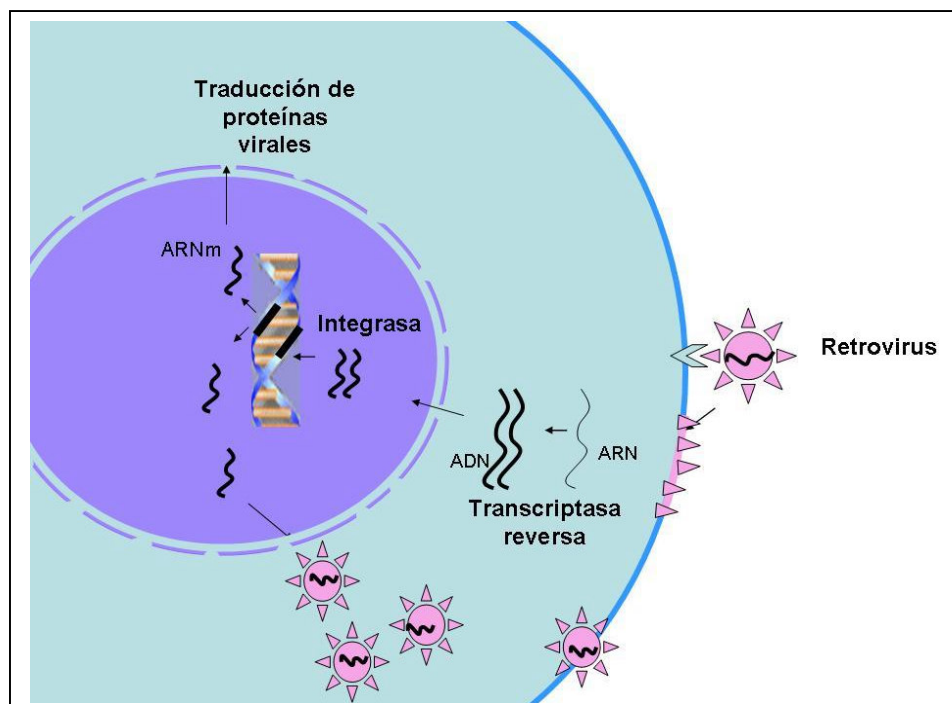


Figura 2. Ciclo de vida del Retrovirus. Tras entrar a la célula (en mitosis), el ARN es retrotranscrito a ADN. El ADN llega al núcleo y es integrado al ADN celular. El ADN proviral es transcrito en ARNm (para traducción de las proteínas virales) y otros ARNs virales son empaquetados, para producirse viriones infectivos (Modificada de Eglitis y Anderson, 1988).

### 3.3.1 LÍNEAS CELULARES EMPACADORAS

Dado que se observó que en el genoma retroviral se encuentra una secuencia específica que puede ser reconocida por la maquinaria de empaquetamiento viral, la secuencia  $\psi$  ( $\emptyset$ ); se generó la primera línea de células emparadoras de retrovirus,  $\emptyset$ -2, que fue obtenida a partir de la transfección con un plásmido (Mo-MLV) con una mutación simple en la región de empaquetamiento  $\psi$ , por otra parte el vector retroviral con el cassette de expresión en el lugar de los genes virales gag-pol-env, tiene intacta la región  $\emptyset$ , lo que empacaba viriones que al transducir otras células, evitaba empacar el ARN genómico en viriones. Sin embargo seguían ocurriendo eventos de recombinación y por lo tanto permanecían virus competentes de replicación (Friedmann, 1994). Para reducir estos riesgos se obtuvieron otras líneas celulares en las que se incluyen las líneas PC-3, FN-X, GP+E-86, entre otras.

La línea empaadora ecotrófica (células que producen viriones con glicoproteínas que reconocen sólo receptores de células murinas) GP+E-86 se originó a partir de la transfección con dos construcciones separadas, una que expresa los genes gag y pol y una segunda que expresa los genes env. Las expresiones génicas de ambas construcciones son manejadas por las LTR de Mo-MLV, y una secuencia de SV40 como señal de poliadenilación. En las dos construcciones fue removida la señal  $\emptyset$ . Estas dos construcciones fueron introducidas en la línea celular NIH-3T3. De tal forma que mediante esta línea productora, se obtienen viriones capaces de transducción pero deficientes de replicación (figura 3) (Friedmann, 1999).

La línea GP+E-86 es capaz de producir un título viral de  $10^5$  a  $10^6$  por ml., lo que reduce la posibilidad de traducir las proteínas transgénicas (Markowitz et al, 1988; Dunbar et al, 1995).

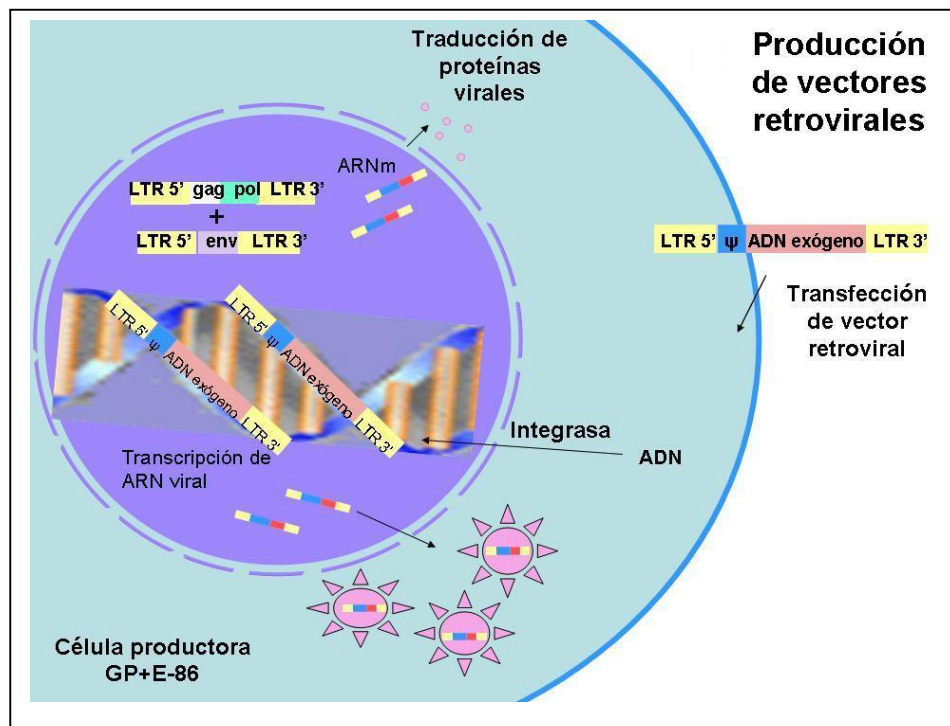


Figura 3. Producción de vectores retrovirales a partir de la línea celular productora GP+E-86, donde dos construcciones separadas con los genes env y gag-pol, fueron previamente introducidas para proporcionar *in trans* los productos proteicos de estos genes. Después de la transfección del ADN (vector viral) son producidos viriones infectivos pero deficientes de replicación (Modificada de Salmons y Günzburg, 1993).

### 3.4. UTILIZACIÓN DE VECTORES RETROVIRALES EN EL SNC

La transferencia génica en el SNC, requiere de uso de vectores de transferencia génica que proporcionen: 1) seguridad en el sistema de liberación, evitando efectos citotóxicos y respuesta inmune contra este; 2) eficacia en la transferencia génica para conducir el transgen al tipo celular diana, 3) estabilidad de la expresión del transgen, lo cual tiene que ver con la prevención de inactivación de promotores y la pérdida del vector, y 4) especificidad hacia el tipo celular deseado (Constantini et al., 2000; Benítez y Segovia, 2003). Los vectores retrovirales como se mencionó anteriormente, tienen la habilidad de integrar su genoma sólo en células en división, por lo que los hace interesantes para ser usados para modificar selectivamente células en cultivo de tumores del SNC y desarrollar Terapia Génica *ex vivo* (Eglitis y Anderson, 1988), o para análisis de los procesos celulares en el desarrollo del cerebro (Davidson y Breakefield, 2003). Si bien la integración no garantiza una expresión estable del gen transducido, si es un camino efectivo para mantener la información genética en un tejido por largo tiempo; aunado a ello, estos vectores presentan las ventajas de tener un tamaño comparativamente pequeño. Además, los vectores basados en MoMLV muestran poca homología con los retrovirus humanos, por lo que al ser producidos por líneas empaquetadoras, se elimina el riesgo de generar virus replicantes (Slack y Millar, 1996; Kay et al., 2001).

La Terapia Génica involucra la transducción *ex vivo* o *in vivo* de un gen activo que pueda funcionar en lugar de otro gen inactivo o defectuoso, o bien un gen que genere una nueva función; esto tiene el fin de disminuir la progresión de la enfermedad o corregir anomalías genéticas. La transferencia génica *ex vivo* usando vectores retrovirales ha sido utilizada en una variedad de tipos celulares en el SNC, incluyendo fibroblastos, astrocitos, células endoteliales y células progenitoras neurales. Estas células son mantenidas en cultivo, transducidas con un transgen terapéutico y luego transplantadas como agentes terapéuticos de enfermedades en el cerebro (Constantini et al., 2000).

De esta forma se han generado protocolos en modelos murinos y en tratamientos clínicos humanos donde el vector de transferencia es retroviral, con genes citotóxicos para tumores cerebrales, como el gen de timidin cinasa del Herpes simplex (HSV-tk) que es transferido en células tumorales de rata usando un vector retroviral, las células tumorales transducidas con este transgen son sensibles al ganciclovir, lo que provoca su muerte (Culver et al., 1992); genes que codifican proteínas apoptóticas, como el gen que codificara la proteína Gas1 (Growth arrest specific-1) en células de glioma (Zamorano et al., 2004).

Los vectores retrovirales no sólo pueden ser aplicados para tratamientos de neoplasias del sistema nervioso, también pueden ser usados para tratamientos de enfermedades neurodegenerativas, como en la enfermedad del Parkinson (Cortez et al., 2000); para neuroprotección y neurosobrevivencia en daños patológicos al sistema nervioso (Breakefield, 1993).

#### 4. PROTEÍNAS FLUORESCENTES COMO MARCADORES EN EXPRESIÓN GÉNICA

La transfección es el procedimiento más comúnmente utilizado para análisis de expresión génica *in vivo*. El seguimiento de la regulación génica de un promotor, en los diversos tipos celulares, así como la creación de líneas celulares que contienen tal promotor es “facilitada” cuando este regula la expresión de una proteína reportera. Además, el monitoreo de la expresión de genes reporteros en células en cultivo, en tejidos fijados e incluso en animales intactos vivos es crucial para muchas aplicaciones en biología celular. Pese a que marcadores luminiscentes como la luciferasa o cromogénicos como la  $\beta$ -galactosidasa, han sido eficientes para la biología celular, su uso requiere sustratos o enzimas, lo que limita su uso en observación en células vivas (Mercer et al., 1991; Bhaumik y Gambhir, 2002; Chalfie et al., 1994; Timmons et al., 1997; Klingston 1997).

Con la observación de una medusa brillante, partió el descubrimiento y desarrollo de las proteínas fluorescentes de organismos marinos que han revolucionado el estudio del comportamiento celular por proveer convenientes marcadores para la expresión génica tanto en células en cultivo como en organismos, permitiendo avances en el estudio de la localización proteínica dentro del contexto celular y de las interacciones de las células (Lippincott et al., 2001).

En 1962 Shimomura y colaboradores descubren la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) dentro del filo *Cnidaria*, en el hidrozoo *Aequorea victoria*, una medusa bioluminiscente (Miyawaki et al., 2003), ellos aislaron una proteína que se observaba en un tono verdoso bajo luz de tungsteno, y que exhibía un muy brillante color verde bajo luz ultravioleta (UV). Una vez caracterizada bioquímicamente, no fue sino hasta 30 años después de su descubrimiento, cuando en 1992, Prasher y colaboradores logran clonar el gen de GFP, y, Chalfie y colaboradores demostraron que este gen contiene la información necesaria para la síntesis postransduccional del fluoróforo, el cual crea fluorescencia en otros organismos, en una variedad de tipos de células sin ayuda enzimática (Lippincott y Patterson, 2003; Cubitt et al., 1995). La detección de la fluorescencia verde que expresa la proteína de GFP, se ha demostrado en

células eucariontes y procariontes, diversos sistemas celulares incluyendo *E. coli*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y en células de mamíferos; ha sido aplicada también *in vivo* en ratones transgénicos que portan la secuencia de la proteína fluorescente que funciona como un gen reportero (Dunbar et al, 1995; Levy et al, 1996).

Debido a que la detección de GFP, no interfiere con el crecimiento y función celular, puede ser usado como indicador de transformación, crecimiento o migración celular. El relativo pequeño tamaño de la proteína (27 KDa) puede facilitar su difusión a través del citoplasma de células como las gliales o neuronales (Chalfie et al., 1994).

La proteína aequorina esta conformada por 238 aminoácidos (Cubitt et al., 1995). El cromóforo se forma de los residuos 65 a 67 de la proteína, Ser-Tir-Gli en la proteína nativa, es un p-hidroxibenzilideneimidazol; para su formación requiere que posterior a la síntesis de la GFP, se lleven a cabo un proceso de maduración donde al doblarse la proteína sigue una serie de pasos que consisten en ciclización que inicia por un ataque nucleofílico del grupo amino de Gli67 sobre el grupo carboxilo de Ser65 para formar un penta-anillo, seguido por pérdida de agua por la 1,2-deshidrogenación de la tirosina y una oxidación en este mismo residuo tir66 (figura 4); sólo en este estado el fluoróforo adquiere absorbancia visible y fluórese (Miyawaki et al., 2003, Cubitt et al., 1995). La proteína tiene forma de un  $\alpha$ -barril con una  $\alpha$ -hélice en el eje del cilindro y unido a esta se encuentra el fluoróforo, casi por el centro del cilindro (Tsien, 1998; Miyawaki, 2003).

Con el fin de mejorar la expresión de la proteína se han realizado una gran cantidad de mutaciones en el gen GFP, lo que produjo propiedades espectrales favorables, dando un cambio en sus picos de absorción y emisión; relativa resistencia a los efectos del pH sobre la fluorescencia; fotoestabilidad y aceleración de la maduración del cromóforo (Lippincott et al., 2001). La glicina 67 del cromóforo es el mejor nucleófilo en la ciclización por lo que este aminoácido es conservado en todas las mutantes de la GFP que retienen fluorescencia (Tsien, 1998). Sin embargo Tir66 es reemplazado por otro aminoácido aromático (Trp, His o Phe), acortando la longitud de onda del pico de excitación y emisión. Mientras que el reemplazo de Ser65 por Thr, Cis, Leu, Val y Ala aumenta la longitud de



onda y entre otras ventajas en algunas mutantes se aumenta su brillo, les proporciona relativa resistencia a pH y se disminuye el fotoaclaramiento (photobleaching) o pérdida de fluorescencia y la fotoisomerización (Lippincott et al., 2001). Para mejorar la expresión de GFP en células de mamíferos se ha construido una variante llamada Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) la cual contiene una mutación en la región del cromóforo lo que hace a la proteína 35 veces más brillante que la GFP (Cormack et al, 1996; Chiu et al, 1996).

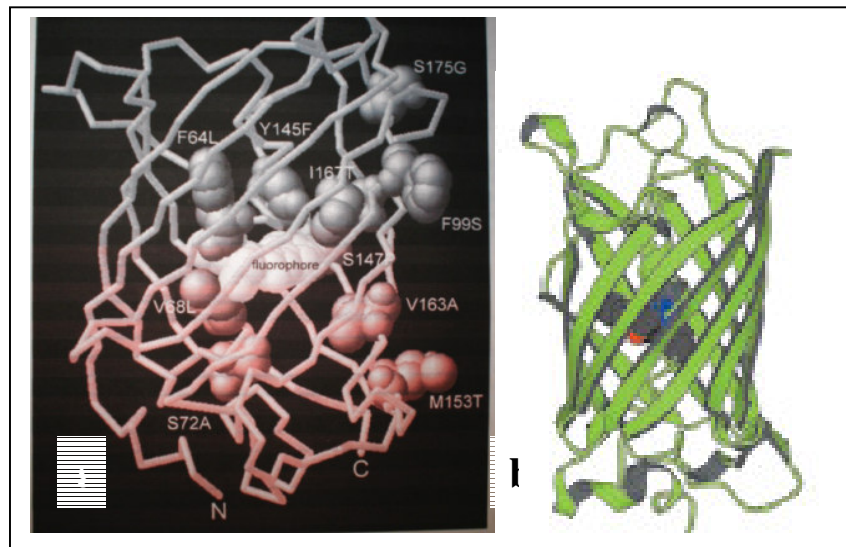


Figura 4. Inciso a. Aminoácidos más importantes en la proteína fluorescente GFP, que son mutados para cambiar propiedades espectrales, en el centro se observa el fluoróforo. Inciso b. La proteína tiene forma de barril /Teign

También se construyeron las variantes Enhancer yellow fluorescent protein (EYFP) y Enhancer cyan fluorescent protein (ECFP) (que en lo sucesivo será referida como proteína amarilla y cian fluorescentes, respectivamente), con el propósito de expandir sus aplicaciones hasta lograr avances como la fluorescencia de doble color en el doble marcaje de cultivos celulares (Stauber et al, 1998; Zhang, 2002). Estas proteínas tienen mayores ventajas que la GFP, como aumento en el brillo y mayor resistencia a cambios de pH (Griesbeck, 2001; Zhang; 2002).

El uso de estas proteínas en neurociencias es ilimitado, ha sido reportado en transfecciones por liposomas en construcciones que llevan diferentes

promotores neuronales; también ha sido usada para la medición directa de segundos mensajeros tales como AMPc, GMPc entre otros (Tsuchiya et al., 2002).

Los avances en la tecnología han permitido la creación de nuevas proteínas fluorescentes con mejores características espectrales, pero a la par de esto, han surgido avances en la microscopia de fluorescencia, existiendo filtros específicos para cada proteína. En el microscopio de fluorescencia, una lámpara generalmente de mercurio o argón emite radiación UV, esta es absorbida por los electrones de una sustancia (el fluoróforo en la proteína fluorescente) y esta energía es emitida en forma de fotones o cuantos, de luz visible. El espectro de absorción de una sustancia, indica su capacidad para absorber luz y se establece como longitud de onda. Se dice que cuando una molécula absorbe este tipo de energía se encuentra en un estado excitado, por ello se le conoce como espectro de excitación. Cuando se pierde esa energía que había excitado, entonces es emitida en forma de luz, esta luz emitida es la fluorescencia (Lehninger, 1970). Para que esta energía de excitación sea regulada, se usan filtros que retienen parte de la radiación y dejan pasar sólo un poco en un rango de longitud de onda específica.

La GFP tiene características espectrales similares a las de la fluoresceína, por lo que puede ser visualizada con el filtro FITC. Casi para cada proteína fluorescente se ha diseñado un filtro. El filtro FITC permite el paso de luz con un rango de longitud de onda de 450 a 520 nm (Klingston R. 1997). Siendo de 492 a 500 nm el punto máximo de excitación (Lippincott, 2001); los picos de excitación máximos de las proteínas ECFP y EYFP son 452 y 510 nm respectivamente, y un pico de emisión máximo en 477 nm para ECFP y 527 nm para EYFP (Tsien, 1998). Pese a que se requieren de los filtros específicos para estas proteínas (como los comerciales quantum yield 0.40 y 0.60, para ECFP y EYFP, respectivamente –Clontech-), que pueden excitar al punto máximo para cada proteína; sin embargo, puede usarse el filtro FITC, por que como se ve en la gráfica (figura 5), parte del espectro de excitación que requiere cada proteína cae dentro del rango de FITC, sin embargo el color emitido será parecido al de la fluoresceína, verde y con menor intensidad.

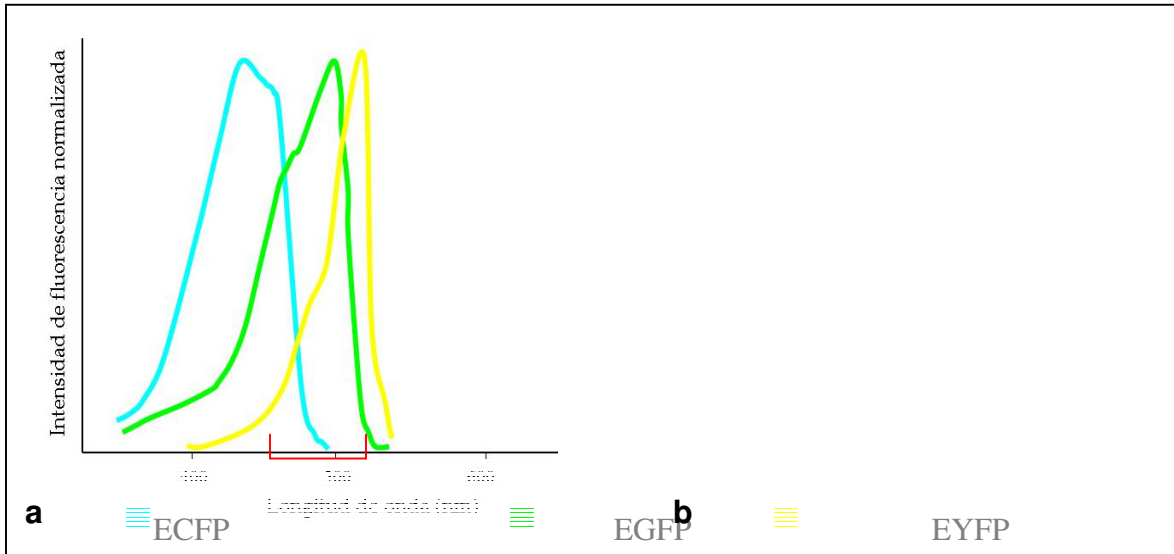


Figura. 5. Rango de excitación de las proteínas fluorescentes. b. Emisión de proteínas fluorescentes. En rojo se marca el rango en el que el filtro FITC realiza su máxima excitación (Lippincott. 2001).

## JUSTIFICACIÓN

La transferencia génica es una herramienta que ha contribuido en gran medida al conocimiento de la biología celular. Uno de los métodos más eficientes para la transferencia génica son los vectores virales, de los cuales los vectores retrovirales pueden usarse eficientemente para transducir células en división, como astrocitos. Se sabe que bajo ciertas condiciones patológicas, los astrocitos aumentan su proliferación, esto aunado a las diversas funciones que cumplen estas células, hacen que sean una buena plataforma de expresión de transgenes en el SNC. Dirigir la expresión de proteínas fluorescentes con el promotor de la proteína glial fibrilar ácida de manera específica en astrocitos, empleando un vector retroviral, provee una herramienta para ser usada en estudios de: interacción de astrocitos con neuronas; formación de gliomas, gliosis reactiva, y de desarrollo del SNC, permitiendo identificar a los astrocitos fácilmente de otras células, en co-cultivo. El promotor *gfa2* tiene ventajas en comparación con otros promotores no específicos para ser usados en astrocitos, además puede verse afectado por señales extracelulares, y por aumento en las concentraciones de AMPc, incrementando la expresión de la proteína que regula; así los astrocitos modificados con este vector, pueden ser usados para el estudio de sustancias que promuevan el incremento de la transcripción de este promotor, con el monitoreo de la expresión de las proteínas fluorescentes. También podrán ser usados como un adecuado control en experimentos de terapia génica ex vivo, para enfermedades neurodegenerativas y en gliomas, donde los transgenes terapéuticos sean regulados por el promotor *gfa2*. En estudios previos, se demostró que realizando un implante de astrocitos primarios transducidos retroviralmente con el transgen de la Tirosina Hidroxilasa (TH), cuya transcripción fue regulada por el promotor *gfa2*, se pudo inducir recuperación conductual en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (Cortez, et al., 2000). También fue usado un vector retroviral para transferencia del gen apoptótico Gas1 a gliomas implantados en un ratón desnudo, lo que indujo una significativa disminución en el crecimiento del tumor (Zamorano et al., 2004), en ambos trabajos el control fue realizado con viriones que expresan LacZ, estos virus no tienen el promotor específico de astrocitos; con el fin de evitar errores metodológicos para estos y

otros trabajos, resulta necesario realizar controles con células astrocíticas modificadas donde el promotor de gfa2 dirija de manera específica la expresión de una proteína fluorescente como gen reportero. Estas proteínas fluorescentes presentan como ventajas en comparación con otras proteínas, una alta eficiencia en su uso como genes reporteros, no requieren sustratos fluorogénicos y pueden monitorearse sin necesidad de fijar el tejido, aunque esta no le afecta. En el presente trabajo se clonó el promotor gfa2 en un vector retroviral que previamente contenía la secuencia de la proteína cian fluorescente y en otro con la secuencia de la proteína amarilla fluorescente, con los viriones con esta construcción fueron transducidas células astrocíticas (C6).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Expresar específicamente en astrocitos de la línea celular C6, las proteínas cian y amarilla fluorescentes, reguladas transcripcionalmente por el promotor de la proteína glial fibrilar ácida (gfa2), empleando un vector retroviral.

### **Objetivos Particulares:**

1. Clonar el promotor de la proteína glial fibrilar ácida en el plásmido pBlueScript SK+ (construcción llamada pBScGfa2).
2. Subclonar gfa2 (a partir de pBScGfa2) en los vectores pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP en el lugar de la región codificante para el promotor de citomegalovirus (CMV).
3. Obtener los retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, en donde la expresión de las proteínas fluorescentes este regulada por el promotor gfa2 con la línea productora de retrovirus GP+E-86.
4. Transducir de manera estable astrocitos de la línea celular C6 con los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP.
5. Comprobar la eficiencia del promotor gfa2 por la expresión de las proteínas fluorescentes de manera específica en astrocitos, por medio de microscopia de fluorescencia.

**A continuación se enumeran los pasos que se siguieron para cumplir con**

**los objetivos antes mencionados, los cuales son explicados en la metodología.**

1. Construcción del plásmido pBScGfa2 a partir de:
  - 1.1 La amplificación de gfa2 por la técnica de PCR a partir del plásmido pgfa2-LacZ.
  - 1.2 Clonación gfa2 en el plásmido pBlueScript SK+
  - 1.3 Verificación de la orientación (por análisis de restricción) e integridad (PCR y secuenciación) de la construcción pBScGfa2.
  
2. Obtención de los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, para lo cual se llevo a cabo:
  - 2.1 Subclonación de gfa2 (a partir de pBScGfa2) en los vectores pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP en el lugar de la secuencia correspondiente al promotor de citomegalovirus (CMV).
  - 2.2 Verificación de la orientación e integridad de los vectores pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP por análisis de restricción y PCR.
  
3. Obtención de los retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, en donde la expresión de las proteínas cian y amarilla fluorescentes (respectivamente) está regulada por el promotor gfa2:
  - 3.1 Transfección de los vectores a la línea (empaquetadora) GP+E-86.
  - 3.2 Selección con G418 (el gen que le confiere resistencia a neomicina o a su análogo G418, es llevado por el vector retroviral).
  - 3.3 Obtención del título viral de la línea productora de ambos viriones (pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP), con el empleo de las células NIH-3T3.
  - 3.4 Obtención de clonas productoras estables de retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP (elegidas por el mayor título viral).
  
4. Transducción de manera estable la línea celular C6 con los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP (liberados por GP+E-86).

- 4.1 Transducción del cultivo primario de astrocitos con los viriones de GP+E-86.
5. Comprobar la eficiencia del promotor gfa2 por la expresión de las proteínas fluorescentes de manera específica en astrocitos, por medio de microscopia de fluorescencia.
  - 5.1 Verificar que las proteínas fluorescentes no son expresadas en la línea productora y en la línea NIH3T3.
  - 5.2 Comprobar la eficiencia del promotor gfa2 para expresar las proteínas fluorescentes de manera específica en la línea estable C6 por medio de microscopia de fluorescencia.



## JUSTIFICACIÓN

La transferencia génica es una herramienta que ha contribuido en gran medida al conocimiento de la biología celular. Uno de los métodos más eficientes para la transferencia génica son los vectores virales, de los cuales los vectores retrovirales pueden usarse eficientemente para transducir células en división, como astrocitos. Se sabe que bajo ciertas condiciones patológicas, los astrocitos aumentan su proliferación, esto aunado a las diversas funciones que cumplen estas células, hacen que sean una buena plataforma de expresión de transgenes en el SNC. Dirigir la expresión de proteínas fluorescentes con el promotor de la proteína glial fibrilar ácida de manera específica en astrocitos, empleando un vector retroviral, provee una herramienta para ser usada en estudios de: interacción de astrocitos con neuronas; formación de gliomas, gliosis reactiva, y de desarrollo del SNC, permitiendo identificar a los astrocitos fácilmente de otras células, en co-cultivo. El promotor *gfa2* tiene ventajas en comparación con otros promotores no específicos para ser usados en astrocitos, además puede verse afectado por señales extracelulares, y por aumento en las concentraciones de AMPc, incrementando la expresión de la proteína que regula; así los astrocitos modificados con este vector, pueden ser usados para el estudio de sustancias que promuevan el incremento de la transcripción de este promotor, con el monitoreo de la expresión de las proteínas fluorescentes. También podrán ser usados como un adecuado control en experimentos de terapia génica ex vivo, para enfermedades neurodegenerativas y en gliomas, donde los transgenes terapéuticos sean regulados por el promotor *gfa2*. En estudios previos, se

demostró que realizando un implante de astrocitos primarios transducidos retroviralmente con el transgen de la Tirosina Hidroxilasa (TH), cuya transcripción fue regulada por el promotor *gfa2*, se pudo inducir recuperación conductual en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (Cortez, et al., 2000). También fue usado un vector retroviral para transferencia del gen apoptótico Gas1 a gliomas implantados en un ratón desnudo, lo que indujo una significativa disminución en el crecimiento del tumor (Zamorano et al., 2004), en ambos trabajos el control fue realizado con viriones que expresan LacZ, estos virus no tienen el promotor específico de astrocitos; con el fin de evitar errores metodológicos para estos y otros trabajos, resulta necesario realizar controles con células astrocíticas modificadas donde el promotor de *gfa2* dirija de manera específica la expresión de una proteína fluorescente como gen reportero. Estas proteínas fluorescentes presentan como ventajas en comparación con otras proteínas, una alta eficiencia en su uso como genes reporteros, no requieren sustratos fluorogénicos y pueden monitorearse sin necesidad de fijar el tejido, aunque esta no le afecta. En el presente trabajo se clonó el promotor *gfa2* en un vector retroviral que previamente contenía la secuencia de la proteína cian fluorescente y en otro con la secuencia de la proteína amarilla fluorescente, con los viriones con esta construcción fueron transducidas células astrocíticas (C6).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Expresar específicamente en astrocitos de la línea celular C6, las proteínas cian y amarilla fluorescentes, reguladas transcripcionalmente por el promotor de la proteína glial fibrilar ácida (gfa2), empleando un vector retroviral.

### **Objetivos Particulares:**

1. Clonar el promotor de la proteína glial fibrilar ácida en el plásmido pBlueScript SK+ (construcción llamada pBScGfa2).
2. Subclonar gfa2 (a partir de pBScGfa2) en los vectores pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP en el lugar de la región codificante para el promotor de citomegalovirus (CMV).
3. Obtener los retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, en donde la expresión de las proteínas fluorescentes este regulada por el promotor gfa2 con la línea productora de retrovirus GP+E-86.
4. Transducir de manera estable astrocitos de la línea celular C6 con los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP.
5. Comprobar la eficiencia del promotor gfa2 por la expresión de las proteínas fluorescentes de manera específica en astrocitos, por medio de microscopia de fluorescencia.

**A continuación se enumeran los pasos que se siguieron para cumplir con**

**los objetivos antes mencionados, los cuales son explicados en la metodología.**

1. Construcción del plásmido pBScGfa2 a partir de:
  - 1.1 La amplificación de gfa2 por la técnica de PCR a partir del plásmido pgfa2-LacZ.
  - 1.2 Clonación gfa2 en el plásmido pBlueScript SK+
  - 1.3 Verificación de la orientación (por análisis de restricción) e integridad (PCR y secuenciación) de la construcción pBScGfa2.
  
2. Obtención de los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, para lo cual se llevo a cabo:
  - 2.1 Subclonación de gfa2 (a partir de pBScGfa2) en los vectores pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP en el lugar de la secuencia correspondiente al promotor de citomegalovirus (CMV).
  - 2.2 Verificación de la orientación e integridad de los vectores pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP por análisis de restricción y PCR.
  
3. Obtención de los retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, en donde la expresión de las proteínas cian y amarilla fluorescentes (respectivamente) está regulada por el promotor gfa2:
  - 3.1 Transfección de los vectores a la línea (empaquetadora) GP+E-86.
  - 3.2 Selección con G418 (el gen que le confiere resistencia a neomicina o a su análogo G418, es llevado por el vector retroviral).

- 3.3 Obtención del título viral de la línea productora de ambos viriones (pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP), con el empleo de las células NIH-3T3.
- 3.4 Obtención de clonas productoras estables de retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP (elegidas por el mayor título viral).
  
4. Transducción de manera estable la línea celular C6 con los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP (liberados por GP+E-86).
  - 4.1 Transducción del cultivo primario de astrocitos con los viriones de GP+E-86.
  
5. Comprobar la eficiencia del promotor gfa2 por la expresión de las proteínas fluorescentes de manera específica en astrocitos, por medio de microscopia de fluorescencia.
  - 5.1 Verificar que las proteínas fluorescentes no son expresadas en la línea productora y en la línea NIH3T3.
  - 5.2 Comprobar la eficiencia del promotor gfa2 para expresar las proteínas fluorescentes de manera específica en la línea estable C6 por medio de microscopia de fluorescencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Previamente se obtuvo la construcción de los vectores retrovirales pLNCX-ECFP-N1 y pLNCX-EYFP-N1 (construidos por Cortez datos no publicados), que tienen la región codificante para las proteínas cian (ECFP) y amarilla fluorescentes (EYFP) respectivamente, en donde el ADNc está bajo el control transcripcional del promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV), que dirige la expresión de las proteínas fluorescentes en células de mamíferos. Este vector contiene además el gen de resistencia a neomicina y en las regiones 5´ y 3´ las terminales largas de repetidos (LTR).

### **1. Amplificación de los plásmidos pgfa2-LacZ, pBlueScripSK+ y de los vectores retrovirales pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP**

Para la clonación de gfa2 en los vectores retrovirales, se obtuvo suficiente ADN de los plásmidos pgfa2-LacZ (Besnard et al., 1991), pBlueScript SK+ (Stratagene) y los vectores retrovirales pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP (previamente construidos por Cortez), siguiéndose los pasos que a continuación se describen:

- a. *Transformación de bacterias E. coli DH $\alpha$ 5.* Se transformaron 50  $\mu$ l de bacterias competentes *E. coli* DH $\alpha$ 5 (Gibco BRL), con 1  $\mu$ g de ADN de los plásmidos, mezclas que fueron incubadas en hielo durante 25 minutos, inmediatamente después de transcurrido este tiempo, se transfirieron a un baño maría a una temperatura de 42°C por 90 s, para lograr la transformación por choque térmico, culminando con una última incubación en hielo por 2 minutos. Estas bacterias transformadas de cada uno de los plásmidos, fueron adicionadas a 2 ml de medio Lennox Broth Base (LB) (Gibco) y se incubaron en agitación constante a 230 rpm por 1 hr a 37°C.
- b. *Selección de cepas Escherichia coli: pgfa2-LacZ, pBluescript SK+, pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP.* Debido a que estos plásmidos llevan el gen denominado amp, que les proporciona a las bacterias resistencia para el antibiótico ampicilina, por lo que sólo crecieron colonias

bacterianas que contuvieran estos plásmidos; se sembró 100  $\mu$ l de las bacterias transformadas en placas de agar-LB, con 50  $\mu$ g/l de ampicilina (Research Organics). Después de 12 hr a 37°C de incubación, las colonias bacterianas fueron tomadas con un asa bacteriológica y transferidas a 500 ml de medio LB con ampicilina, incubándose en agitación constante por 12 hr a 37°C.

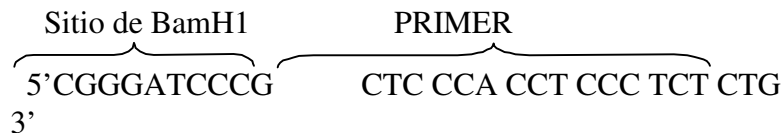
- c. *Purificación de ADN a partir de los plásmidos.* La purificación fue llevada a cabo con columnas maxiprep de acuerdo al protocolo del fabricante (Quiagen).

## 2. Construcción de pBScGfa2

Para las construcciones pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, se requirió obtener la construcción previa pBScGfa2 con los sitios de restricción BamHI flanqueante al extremo 5' y HindIII flanqueante al extremo 3' del promotor humanogfa2, por lo que se llevó a cabo lo siguiente:

- a. *Diseño de Oligonucleótidos.* A partir de la secuencia de pgfa2-LacZ, fueron diseñados en el programa OLIGO 4.1 y sintetizados por Sigma los siguientes oligos:

- El oligonucleótido denominado gfa2-BamHI, que cuenta con un sitio de restricción para BamHI en el extremo 5'



- El oligonucleótido denominado gfa2-HindIII, que cuenta con un sitio de restricción para HindIII en el extremo 3'



- b. *Amplificación de hgfa2.* Fue realizada a partir de 100 ng del plásmido pgfa2-LacZ por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo que fue empleado la enzima ADN polimerasa Vent® (New England Biolabs). El ADN fue desnaturalizado a 94



°C por 2 minutos por un ciclo (primera etapa). Otro ciclo comenzó por una desnaturalización de 30 s a 94 °C, la hibridación se realizó a 54 °C por 30 s, mientras que la temperatura de extensión fue de 75 °C por 2 minutos, ciclo que fue repetido 35 veces (segunda etapa); para concluir se dió un ciclo extra de 5 minutos a 75 °C, para extender las cadenas de ADN (tercer etapa). Fue usado un termociclador PCR Sprint HYBAID.

TIEMPO	T °C	No. CICLOS
2'	94 °C	1 ciclo
30"	94 °C	} 35 ciclos
30"	54 °C	
2'	75 °C	
5'	75 °C	1 ciclo

- c. *Purificación de gfa2.* El fragmento de 2210 pb de gfa2 amplificado, fue purificado por el sistema de elución de ADN GeneClean (Bio 101 Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después fue digerido 10 ì g de ADN con 1 U ì g de las enzimas BamHI y HindIII (New England Biolabs) en las condiciones que indica el fabricante; se observó por electroforesis 500 ng del producto de digestión en un gel de agarosa al 1%, para corroborar su pureza, además 1 µg de gfa2 fue restringido con la enzima NsiI que originó dos fragmentos: 1 de 382 pb y otro de 1833 pb, que fue visualizado en un gel de agarosa al 1%.
- d. *Restricción de hgfa2 y pBlueScript SK+.* 10 ì g del plásmido pBlueScript SK+ fue restringido usando las mismas enzimas (BamHI y HindIII), generándose dos fragmentos uno de sólo 27 pb, el cual no puede ser detectado en el gel de electroforesis (en el porcentaje que se uso) y otro de 2.9 kb, que fue visto en un gel de electroforesis al 1%.
- e. *Purificación de hgfa2 y pBlueScript SK+.* Los productos de digestión gfa2 de 2.2 kb y el de pBlueScript de 2.9 kb, fueron purificados en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, cortando la banda del peso esperado en presencia de luz UV (por un muy corto

periodo), posteriormente, el ADN fue purificado empleando el sistema Gene Clean (Bio 101 Inc).

- f. *Ligación.* Se llevo a cabo la ligación del vector pBlueScript y gfa2 (inserto) para obtener pBScGfa2, en una relación molar 1:9 (vector:inserto) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante para la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen life technologies), para extremos cohesivos.
- g. *Transformación pBScGfa2.* Se transformaron bacterias E. coli DH5 con 4 µl de esta mezcla de ligación (Siguiéndose el mismo protocolo del inciso 1a. Para la selección de las cepas E. coli pBScGfa2, además de ampicilina a las placas para selección, les fué agregado isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) al 0.1 M y 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (Xgal) (Research organics) 20 mg/ml. Debido a que la región de sitios múltiples de clonación (MCS) se encuentra dentro del gen lacZ, al ser interrumpido lacZ en caso de que un gen se clone en MCS; evitaría la expresión de la proteína β-galactosidasa, produciendo colonias blancas en caso contrario las colonias serían azules ([http://www.bios.niu.edu/johns/recdna/blue\\_white.htm](http://www.bios.niu.edu/johns/recdna/blue_white.htm)).
- h. Obtención de ADN plasmídico de las colonias bacterianas transformadas con el vector pBScGfa2, se seleccionaron diferentes colonias de la reacción de ligación crecidas en las placas antes mencionadas, y se crecieron en 2 ml de medio LB con ampicilina (50 µg/l) toda la noche con agitación constante a 230 rpm a 37°C.
- i. Se realizaron ensayos de miniprep para la extracción del ADN plasmídico como se describe a continuación:
  - Las bacterias se centrifugan durante 2 minutos a velocidad máxima (12000 rpm) y se descarta el sobrenadante.
  - Se adicionan 200 µl de Buffer de resuspensión (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10mM pH 8.0), homogenizar con vortex.
  - Agregar 200 µl de solución de lisis (0.2 NaOH y 1% SDS), mezclar suavemente invirtiendo los tubos hasta 5 veces. Agregar 200 µl de solución de precipitación (60 ml

de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de H<sub>2</sub>O) mezclar bien invirtiendo los tubos varias veces.

- Centrifugar los tubos a máxima velocidad (12000 rpm) por 3 minutos;
  - Aspirar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo de 1.5 ml;
  - Agregar 500  $\mu$ l de isopropanol y mezclar bien.
  - Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos (temperatura ambiente).
  - Descartar los sobrenadantes. Agregar 500  $\mu$ l de etanol al 70%, vortexear y centrifugar por un minuto.
  - Eliminar los sobrenadantes. Centrifugar por 15 s y aspirar el líquido sobrante de los tubos.
  - Agregar 60  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada y desionizada y resuspender el ADN.
- j. *Selección de clona con la ligación pBScGfa2* a partir del ADN del plásmido pBScGfa2 obtenido en el ensayo de minipreps, fue tomado 2  $\mu$ l del ADN obtenido por el ensayo de minipreps de cada colonia que fue “picada” y fue digerido con 2 U de la enzima ClaI (New England Biolabs) 1 h a 37°C, dicha enzima provocaría con un solo sitio de corte, una linearización con un peso de 5146 pb, la cual fue visualizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, así, se seleccionó la clona bacteriana positiva y con un peso distinto como negativa que terminaría por ser desechada.
- k. *Verificación de integridad y orientación del transgen.* Una vez detectada una clona pBScGfa2 de 5146 pb, se realizó un análisis de digestión para verificar la integridad y orientación del transgen: se digirió el ADN plasmídico con 2 U de las siguientes enzimas: ClaI y NsiI, por separado (5.1 kb) y en una reacción simultánea con ambas enzimas (generando fragmentos de 388 pb y de 4.7 kb); además se cortó con BamHI y HindIII para liberar el fragmento correspondiente a gfa2, siguiéndose las especificaciones del fabricante (todas las enzimas de New England Biolabs). Los fragmentos resultantes fueron observados en un gel de agarosa al 1%.
- l. Además de las restricciones, a partir de 100 ng de pBScGfa2 se realizó una PCR con los mismos oligos con que fue amplificado gfa2 (gfa2-BamHI y gfa2\_HindIII), que generó el

cDNA de 2.2 kb, además de utilizar un par de oligos mas, gfat 5' CAT CGC CAG TCT AGC CCA CTC CT 3' (Segovia 1998a), utilizando como oligo complementario en el sentido 3' el oligo gfa2-HindIII, generando un fragmento de 99 pb. para lo que fue empleado en un volumen final de 50  $\mu$ l, 2 U de Taq DNA polimerasa (Amersham Pharmacia Biotech), 5  $\mu$ l de Buffer de reacción 10 X que esta adicionado con 20 mM/l de MgCl<sub>2</sub> (resultando una concentración de 2 mM en el volumen final), 5  $\mu$ l de Dimethylsulfoxido (DMSO), mezcla equimolar de dNTPs a 0.5 mM y 50 pmol de iniciadores ("primers"). Se siguió el siguiente protocolo:

TIEMPO	T °C	No. CICLOS
2'	94 °C	1 ciclo
30"	94 °C	} 35 ciclos
30"	54 °C	
2'	72 °C	
5'	72 °C	1 ciclo

Para el caso del ADN utilizado para la PCR, la extracción de este, fue utilizado el kit de minipreps de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Quiagen).

- m. Una vez que se encontró la clona pBScGfa2 (bajo las pruebas de restricción y PCR), esta fue expandida y se purificó el ADN de dicho plásmido por columnas Quiagen, siguiéndose el mismo protocolo que en los incisos 1 a-c.

## 2.1 Secuenciación de pBScGfa2

La secuenciación del vector pBScGfa2 se realizó bajo un sistema automático de fluorescencia donde se realiza una PCR con una mezcla de oligonucleótidos marcado en 5' con una sonda fluorescente distinta; para A, dR6G con una emisión verde, derivado de fluoresceína;

para C, dROX con emisión roja, derivado de rodamina; para G, dR110 con una emisión azul, derivado de fluoresceína; y para T, dTAMRA con emisión amarilla, derivado de rodamina. Durante la electroforesis las bandas del ADN de cadena sencilla pasan a través de un laser de argón que excita las sondas fluorescentes, la señal de emisión de fluorescencia, una vez amplificada, es detectada a través de un filtro y asignada a la base correspondiente (protocolo ABI Prism BigDye, Applied Biosystems, 2000).

El ADN plasmídico pBScGfa2 fue diluido en agua inyectable hasta obtener una concentración de 200 ng/µl; se usaron los Primers T7 y Reverso para pBluescript en la reacción de secuenciación con el sistema ABI Prism BigDye Terminator V2.0. Llevada a cabo con el Secuenciador: Modelo 3100 Genetic analyzer del laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El análisis de las secuencias fue llevado a cabo con el programa Blast 2 Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/uti>)

### **3. Construcción del vector retroviral pLN<sub>gfa</sub>ECFP**

- a. 10 µg de ADN plasmídico pBScGfa2 y 10 µg de ADN del vector pLNCX-ECFP fueron digeridos en una reacción simultánea para cada uno de los dos plásmidos con las enzimas BamHI y HindIII (10 U de cada enzima). Los productos de la digestión fueron observados en un gel de bajo punto de fusión al 1% para cada una de las dos reacciones de restricción y a partir de este se purificaron los fragmentos correspondientes a gfa2 por su tamaño de 2.2 kb, y el fragmento correspondiente a pLNCX-ECFP sin CMV de 6556 pb. La purificación fue llevada a cabo como en el inciso 2 e. También fueron visualizados un fragmento de 2.9 kb para el caso de pBScGfa2 y uno de 812 pb correspondiente a CMV.
- b. Fueron ligados el vector pLNCX-ECFP y el inserto gfa2 restringidos y purificados, en una relación molar 1:10 (vector:inserto) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante por la enzima T4 ADN ligasa para extremos cohesivos.

- c. Se transformaron bacterias *E. coli* DH65 con 4 µl de la mezcla de ligación (de acuerdo al mismo protocolo del inciso 1 a. Para la selección de las cepas *E. coli* pLN<sub>gfa</sub>ECFP, se siguió las indicaciones del protocolo del inciso 1 b, las colonias que se seleccionaron fueron transferidas a 2 ml de medio LB con ampicilina (50 ì g/l), incubados toda la noche con agitación constante a 230 rpm a 37°C. Se prosiguió con el protocolo de minipreps de acuerdo al inciso 2 i.
- d. Para verificar la integridad y orientación del transgen se realizaron las mismas digestiones, así como las mismas reacciones de PCR con los dos juegos de oligos que para pBScGfa2.
- e. El plásmido pLN<sub>gfa</sub>ECFP fue expandido y purificado de la forma anteriormente descrita (ver incisos 1 a-c).

#### **4. Construcción de pLN<sub>gfa</sub>EYFP**

La clonación de *gfa2* en el vector PLNCX-EYFP, siguiendo los mismos pasos que para la construcción de pLN<sub>gfa</sub>ECFP.

#### **5. Obtención de retrovirus**

##### **5.1. Cultivos celulares:**

Para la realización de esta tesis fueron utilizadas las siguientes líneas celulares:

La línea celular GP+E-86 (pasaje 9) obtenida de ATCC (American Type Culture Collection), se descongeló en medio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) con alta glucosa (GIBCO-BRL, Life Technologies Inc) y 10% de suero fetal bovino (GIBCO-BRL, Life Technologies Inc). A las 24 hr les fue sustituido este medio para evitar que el DMSO (anteriormente adicionado en la congelación) dañara las células, por medio DMEM alta glucosa, conteniendo 10% de suero fetal bovino (HyClone) (previamente dializado con membrana de celulosa e inactivado en baño maría), 15 ì g/ml de hipoxantina, 10 ì g/ml de timidina, 2 ì g/ml de aminoptericina, 25 ì g/ml de ácido

micofenólico y 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, pH 7.2; medio que en lo sucesivo le llamaré “medio GP+E-86”.

La línea celular NIH 3T3 (pasaje 7) se cultivó en medio DMEM alta glucosa con 10% de suero fetal bovino (GIBCO-BRL, Life Technologies Inc), 4-7.5% de bicarbonato de sodio, pH 7.2.

Línea celular C6 (pasaje 30) (obtenida del Dr. J. de Vellis, Universidad de California, Los Angeles), se cultivo en medio compuesto por DMEM F12 y 10% de suero fetal bovino (GIBCO-BRL, Life Technologies Inc).

A todos los cultivos se les adicionó 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (In Vitro).

Para seleccionar a las células transfectadas y transducidas se les adicionó sulfato de neomicina o G418 (GIBCO-BRL) (a las C6 y NIH 3T3 400  $\mu$ g/ml y a los GP+E-86 800  $\mu$ g/ml), el cual fue agregado en cada cambio de medio (cada tercer día) (Zamorano et al., 2003).

Para el despegado de las células, se utilizó tripsina-EDTA (0.025%) (GIBCO-BRL) (1 ml para cajas de 35 mm, 2 ml para cajas de 60 mm, 3 ml para cajas de 100 ml) durante 4 minutos a 37° C. Para formar la pastilla celular se centrifugó las células tripsinadas, a 700 rpm durante 4 minutos a 9° C. El sobrenadante fue aspirado y las células se contaron utilizando un hemocitómetro, para lo cual se tomaron 50  $\mu$ l del pellet previamente resuspendido en un volumen conocido de medio y fue disuelto en 50  $\mu$ l de azul de tripano (dilución 1:2). Cuando fue necesario, se almacenaron en viales a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  con DMSO (MERCK) al 5%, incubándose inmediatamente a -70° C y posteriormente en nitrógeno líquido.

La diferenciación celular se indujo con 50  $\mu$ M de forskolina (Sigma), su concentración final (Segovia et al., 1998a).

Todos los cultivos fueron mantenidos en una incubadora con una mezcla de 95% de aire, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 100%.

## **5.2. Transfección de GP+E-86**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en cajas de 100 mm de diámetro, 24 hr después y con una confluencia del 50-80%, fue realizada una transfección con 4  $\mu$ g de ADN de los vectores PLNCX-ECFP y PLNCX-EYFP, como controles positivos (en estas células) para la expresión de las

proteínas fluorescentes, debido a que conservan el promotor constitutivo CMV; y de las construcciones pLN<sub>gfa</sub>ECFP y pLN<sub>gfa</sub>EYFP, utilizando Lipofectamina 2000, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life technologies). Además de las cuatro transfecciones (aisladas) con los vectores antes mencionados, se utilizó como control negativo de selección con G418, células en las mismas condiciones pero sin ADN. Las cajas se incubaron a 37° C y después de 24 hr les fue sustituido el medio. Transcurridas 48 hr después de la transfección se le adicionó 800 ì g/ml de G418 (Cortez et al, 2000). Después de 10 días de selección fueron transferidas 3 colonias de cada transfección, con trozos de papel filtro esteril y humedecido en tripsina, donde el papel con tripsina fue colocado en una colonia y al cabo de 3 minutos en incubación a 37° C, el papel fue trasladado a otra caja con medio de selección.

### **5.3. Transducción de células NIH 3T3 y obtención del título viral**

Se sembraron 75000 células NIH 3T3 en platos de 100 mm, y 24 hr después, con la mínima cantidad de medio para estas células sin suero, ni antibióticos (3 ml) se infecto con 10 ì l del medio proveniente de las cajas de cultivo con las GP+E-86 transfectadas (donde 24 hr les fue sustituido su medio por uno carente de suero y antibióticos, y que al cabo de este tiempo fue filtrado con filtros de 0.45 ì m, para con ello eliminar restos celulares para ser usado como "stock viral"); además les fue agregado 8 ì g/ml del polímero "Polybrene" (Sigma), se incubaron 6 h a 37° C, posteriormente les fue agregado mas medio con suero; también se usaron controles negativos como en el paso anterior. 48 hr después de la transducción se les cambió el medio por medio de selección, donde se uso 400 ì g/ml de G418. Diez días después se hizo el conteo de colonias y se obtuvo el título viral de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\text{cfu / ml} = \# \text{ colonias} / [(\text{volumen de sobrenadante en ml}) (\text{fracción de células sembradas} = 0.05) (\text{factor de replicación de células por colonia} = 4)]$$

Donde cfu es cantidad de partículas de infección (Klingston, 1997).

De acuerdo a este cálculo, se escogió la clona de GP+E-86 que tuviera el mayor título viral de cada una de las tres clonas conservadas de cada construcción (tanto para las que contenían el



promotor CMV y para las de *gfa2*) y fue “expandida” usando papel filtro con tripsina. Para el caso de las células NIH 3T3, fueron expandidas las que resultaron haber sido transducidas con el stock viral de las GP+E-86 con el mayor título de cada vector.

## **6. Transducción de células C6**

Fueron sembradas  $2 \times 10^6$  células C6 en platos de 100 mm, con medio DMEM-F12 sin antibiótico, ni suero; 24 hr después fueron transducidas con stock viral de cada uno de los vectores y el polication, tal como en el paso anterior, a diferencia de que fue utilizado todo el sobrenadante, dividido en dos partes: 1.5 ml fueron agregados y a las 6 hr de incubación, fue agregado el sobrante del stock viral. El G418, fue agregado 48 hr después de la transducción. También fue usada una caja de células gliales C6 sin transducción como control para el antibiótico de resistencia (400  $\mu$ g/ml), después de 10 días de selección las células fueron despegadas y expandidas, sin dejarle de agregar G418.

## **7. Fijación de células y observación en el microscopio de fluorescencia**

Para la fijación de las células, previamente se pusieron cubreobjetos estériles en cajas petri, donde luego se les agregó medio de cultivo y células de cada uno de las líneas celulares y de cada tratamiento es decir con o sin forskolina (para el caso de C6) y células transducidas con cada uno de los retrovirus pLN $\alpha$ gfaECFP y pLN $\alpha$ gfaEYFP, y los controles pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP, y células sin transducir. 24 hr después se les retiro el medio y se les dio dos lavados con PBS, posteriormente se dejo 5 minutos incubando en paraformaldehido al 4% en PBS; se le dio dos lavados más de PBS.

Las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Olympus con el filtro para fluoresceína FITC. Registrando imágenes en un aumento de 40x.



# RESULTADOS

## 1. Construcción del plásmido pBScGfa2

A partir del plásmido pgfa2-LacZ, se amplificó ADN del promotor de la proteína glial fibrilar acídica humana (hgfa2), que consta de 2.2 kb (figura 6a) y abarca desde la base -2163 hasta la base +47; el inicio de la transcripción es en +1, el triplete ATG en el sitio +15 ha sido mutado por TTG, además se localizan regiones requeridas para la actividad transcripcional (Besnard et al., 1991); esto permite que la síntesis de las proteínas fluorescentes sea regulable por este promotor de manera específica en astrocitos. Para la amplificación fue adicionado a los oligos un sitio de restricción en cada sentido, para las enzimas BamHI (gfa2-BamHI) y para la enzima HindIII (gfa2-HindIII) (ver materiales y métodos), por lo que una vez amplificado el fragmento de 2.2 kb, fue restringido con estas enzimas y purificado. Además para verificar que se trataba de gfa2 fue restringido con NsiI, lo que generó un fragmento de 382 y otro de 1833 los cuales fueron visualizados en un gel de electroforesis (figura 6b).

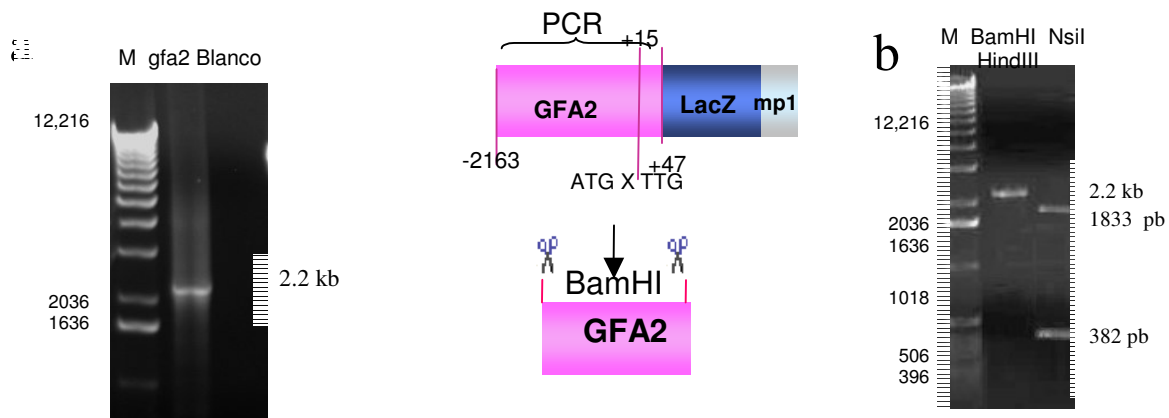
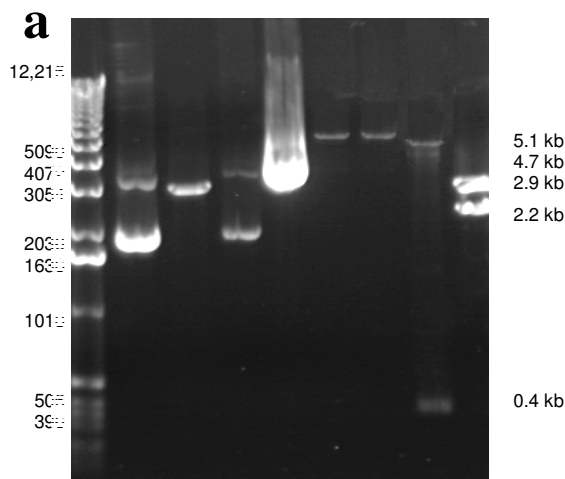


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de gfa2 amplificado por PCR. En el panel **a** se muestra el producto de la amplificación de gfa2 a partir de gfa2-LacZ (carril 2) y el blanco de la reacción (carril 3). El panel **b** muestra la restricción con BamHI y HindIII de gfa2 (carril 2) y la restricción del promotor con NsiI. El marcador usado en ambas fotos es de 1 kb. En el centro se resume de

Posteriormente se llevo a cabo la clonación de gfa2 en el plásmido pBlueScrip SK+ (2.9 kb). A partir de este nuevo plásmido (pBScGfa2) linearizado produjo un fragmento de 5146 pb (figura 7d), la inserción de gfa2 fue invertida por la posición de los sitios de restricción de HindIII y BamHI, sin embargo esto no afectó, debido a que cuando gfa2 fue restringido de este plásmido, sería clonado en posición correcta en los vectores retrovirales. Esta ligación fue verificada por un análisis de restricción: Se sometió a una linearización con la enzima ClaI que corta dentro de pBlueScrip y con NsiI que corta dentro del inserto lo que garantizó que este estuviera dentro del sitio multiple de clonación del plásmido, las linearizaciones produjeron un fragmento de 5.1 kb. Además se restringió con ambas enzimas que produjo dos fragmentos de 388 pb y de 4.7 kb, y una restricción simultánea con BamHI y HindIII, que origino los fragmentos de 2.9 kb (pBlueScrip) y otro de 2.2 kb (gfa2). Estas restricciones mostraron que la ligación fue llevada a cabo correctamente (figura 7a). Además se llevo a cabo una PCR con los mismos oligos, 5' gfa2-BamHI y 3' gfa2-HindIII, generando el fragmento de 2.2 kb correspondiente a gfa2 (figura 7b); así como una PCR con el juego de oligos 5' gfat (Segovia et al., 1998a) y 3' gfa2-HindIII lo que generó un producto de 99 pb, correspondiente al extremo 3' de gfa2 (figura 7c).

### **1.1. Secuenciación del plásmido pBScGfa2**

Para verificar que no hubiera mutaciones producidas por errores en la PCR, en las secuencias que son reconocidas por factores de transcripción, para lo cual se secuenciaron dos segmentos de la construcción pBScGfa2, un segmento de 728 pb, de las cuales 642 correspondían al extremo 5' de gfa2 (+1 a +642), y otro con un tamaño de 525 pb, de las cuales 460 pertenecían al extremo 3' (+1751 – +2211 de gfa2). En las secuencias que son reconocidas por factores de transcripción, no fue encontrada ninguna mutación (AP-2, NF-1, AP-1, SP-1 y hgcs) (figura 9a). Se encontró una mutación donde una g es cambiada por una timina en la base +148 de gfa2 (figura 9b).



1. Marcador 1kb
2. pBlueScript srestringir
3. pBlueScript Cla I
4. pBlueScript Nsi I
5. pBScGfa2 Sin restringir
6. pBScGfa2 Cla I
7. pBScGfa2 Nsi I
8. pBScgfa2 Cla I-Nsi I
9. pBScGfa2 Hind III y BamHI

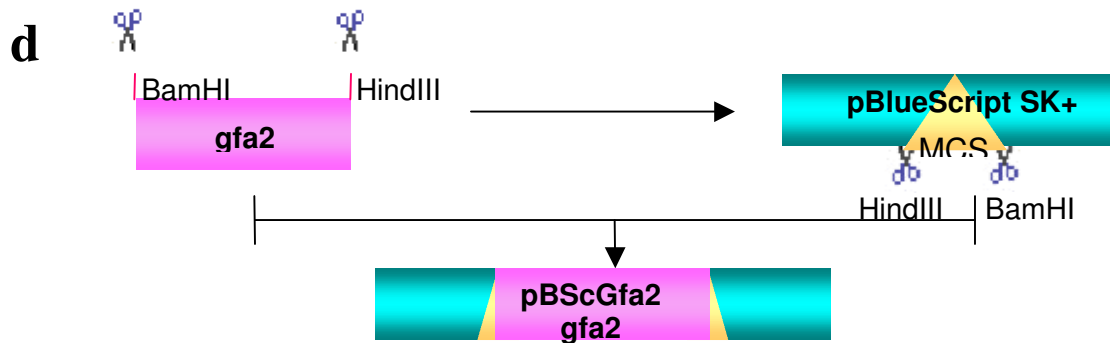
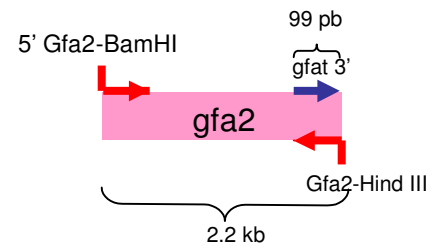
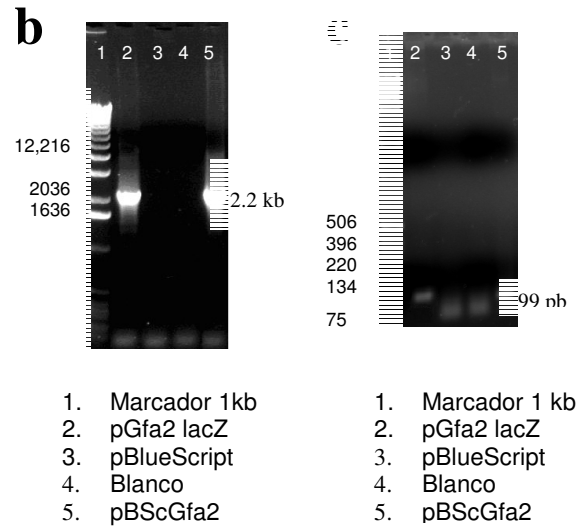
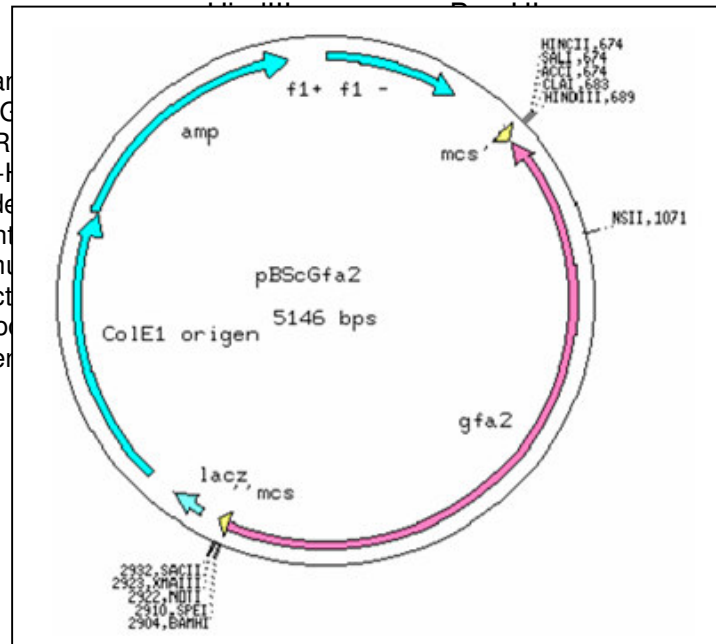


Figura 7. En el panel a se muestra el mapa de restricción de pBScGfa2 (5.146 bps) con los sitios de restricción de BamHI y HindIII. En el panel b y c, se muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de gfa2-LacZ como control y gfa2-HindIII. Debajo de los paneles b y c, se muestra la amplificación de un producto de aproximadamente 2.2 kb que genera un producto de aproximadamente 2.2 kb en Bluescript con las enzimas



1% del análisis de amplificación de 2.2 kb de gfa2, con los oligos gfa2-BamHI y gfa2-HindIII. En el panel d, se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de gfa2-LacZ como control y gfa2-HindIII. Debajo de los paneles b y c, se muestra la amplificación de un producto de aproximadamente 2.2 kb que genera un producto de aproximadamente 2.2 kb en Bluescript con las enzimas

Figura 8. Mapa de pBScGfa2 obtenido del programa clone, donde se muestra el sitio de restricción de Nsil, el cual fue restringido con esta enzima, como en la figura anterior se mostró. Además de los sitios para las enzimas BamHI y HindIII. gfa2 es clonado invertido, por la posición de los sitios BamHI y HindIII.

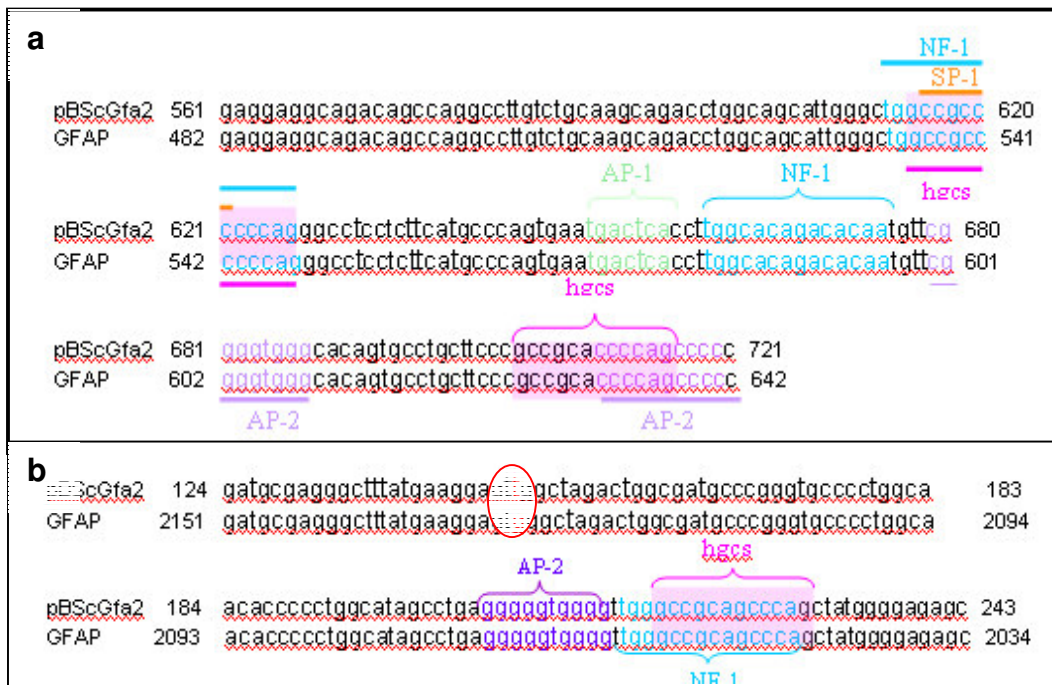
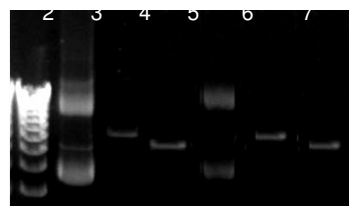


Figura 9. Comparación de la secuenciación de dos fragmentos de *gfa2* en el plásmido pBScGfa2, comparado con GFAP en el programa Blast. a. No se encuentra ningún cambio de bases por la PCR en las secuencias que reconocen para los factores NF-1, hgcs, AP-2, AP-1 y SP-1. b. Se encontró una mutación en la base 148. Sin embargo no fueron encontradas mutaciones en las regiones que reconocen los factores de transcripción AP-2, hgcs y NF-1 encontradas en el extremo 3' de *gfa2*.

## 2. Construcción del vector retroviral pLN $gfa$ ECFP

La construcción pLN $gfa$ ECFP, requirió eliminar al promotor de CMV del vector retroviral pLNCX-ECFP con las enzimas BamHI y HindIII, lo que generó un fragmento de 812 pb correspondiente a CMV y otro de 6556 pb (pLNCX-ECFP) (fig. 10). Por otra parte pBScGfa2 fue restringido para obtener *gfa2* con las mismas enzimas; posteriormente *gfa2* fue subclonado en el vector retroviral, en el lugar de CMV (figura 11e). Para encontrar la clona con la correcta ligación, el ADN de las clonas seleccionadas fue aislado y restringido con la enzima ClaI, hasta encontrar la del peso esperado de 8774 pb, una vez encontrada, se le realizó el siguiente análisis de restricción: el ADN fue digerido de manera independiente con las enzimas ClaI (corta fuera de *gfa2*) y NsiI (corta dentro de *gfa2*, por lo que de encontrarse, se generaría una banda de 8.7 kb, de lo contrario el ADN quedaría s/restringir), ambas linearizaciones produjeron una banda de 8.7 kb correspondiente al tamaño esperado de pLN $gfa$ ECFP. Así mismo se digirió con ambas enzimas en una reacción simultánea, lo que generó dos fragmentos uno de 1143 pb y otro de 7631 pb, que como puede verse en la figura 12, indican que la orientación de *gfa2* es correcta. Además la clona fue restringida con BamHI y HindIII que generó los fragmentos con un peso esperado correspondiente a *gfa2* de 2.2 kb y otro de 6556 correspondiente a pLNCX-ECFP (figura 11b). Para verificar la integridad del inserto, al igual que la clona de pBScGfa2, también la clona de pLN $gfa$ CFP fue sometida a una PCR con los mismos juegos de oligos, 5' *gfa2*-BamHI y 3' *gfa2*-HindIII que origino un producto de 2.2 kb, demostrando que la clonación fue correcta (figura 11c) y el par 5' *gfa2* y 3' *gfa2*-HindIII, con el producto amplificado de 99 pb (figura 11d).



- |                                |      |        |
|--------------------------------|------|--------|
| 1. Marcador 1kb                |      |        |
| 2. pLNCX-ECFP s/restringir     | 8144 |        |
| 3. pLNCX-ECFP Hind III         | 7126 |        |
| 4. pLNCX-ECFP Hind III y BamHI | 6108 | 7.3 Kb |
| 5. pLNgaEYFP sin restringir    | 5090 | 6.5 kb |
| 6. pLNgaEYFP Hind III          | 4072 |        |
| 7. pLNgaEYFP Hind III y BamHI  | 3054 |        |

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se muestra la liberación de CMV (812 pb) de pLNCX-ECFP y de pLNCX-ECFP, con las enzimas BamHI y HindIII. El tamaño de estos vectores linearizados es de 7.3 kb y de 6.5 kb sin CMV.

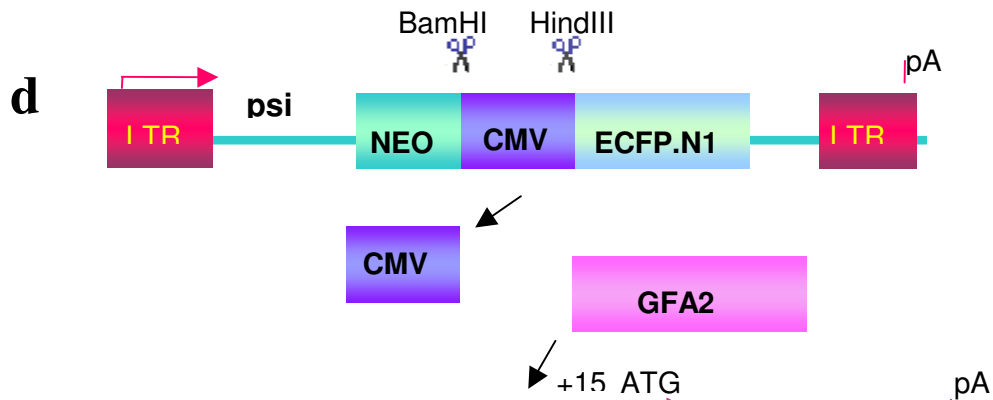
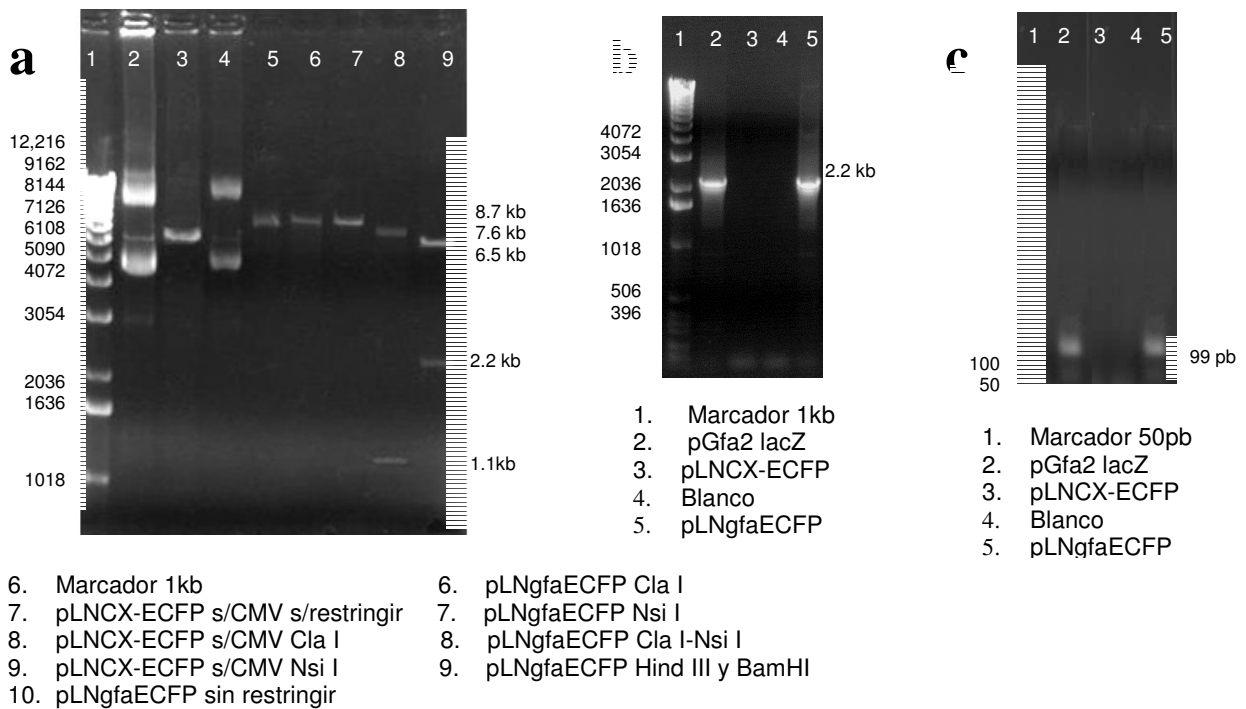


Figura 11. En el panel **a** se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del análisis de restricción de pLNgaECFP y de pLNCX-ECFP como control. **b** Los productos de amplificación de 2.2 kb (gfa2) de la PCR de los plásmidos pgfa2-LacZ como control positivo y de pLNCX-ECFP como control negativo de la reacción, con los oligos gfa2-BamHI y gfa2-HindIII, gel de agarosa al 1%. **c** Electroforesis de PCR con los oligos gfa2 y gfa2-HindIII con un producto de 99 pb a partir del plásmido pLNgaECFP con el plásmido pgfa2-LaZ como control positivo, y como control negativo pLNCX-ECFP, gel de agarosa al 2%. **d** Se muestra de manera gráfica la subclonación de gfa2 en pLNCX-ECFP con las enzimas BamHI y HindIII.



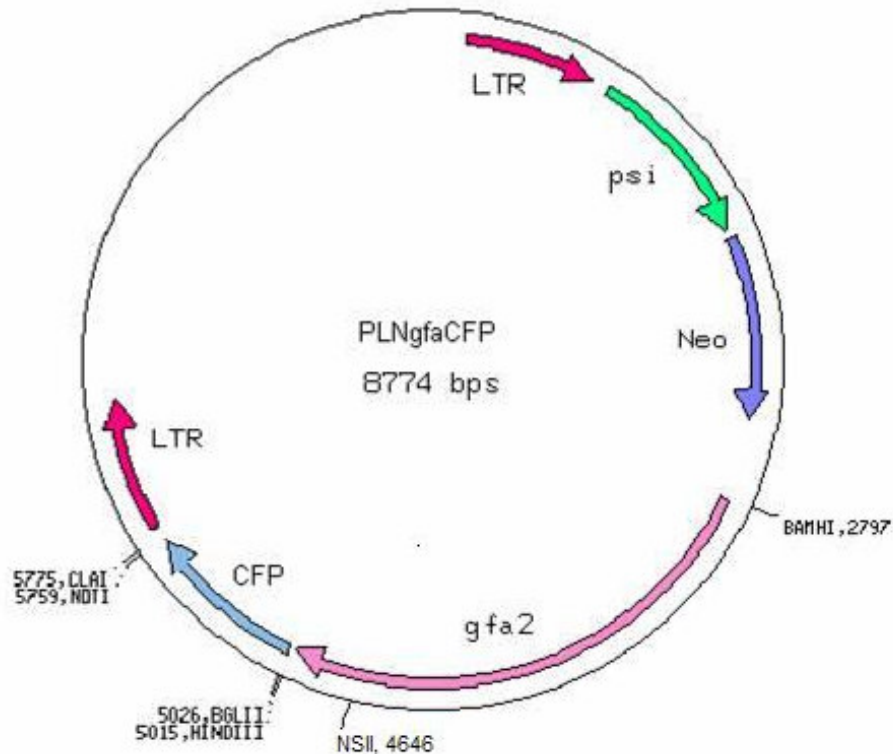
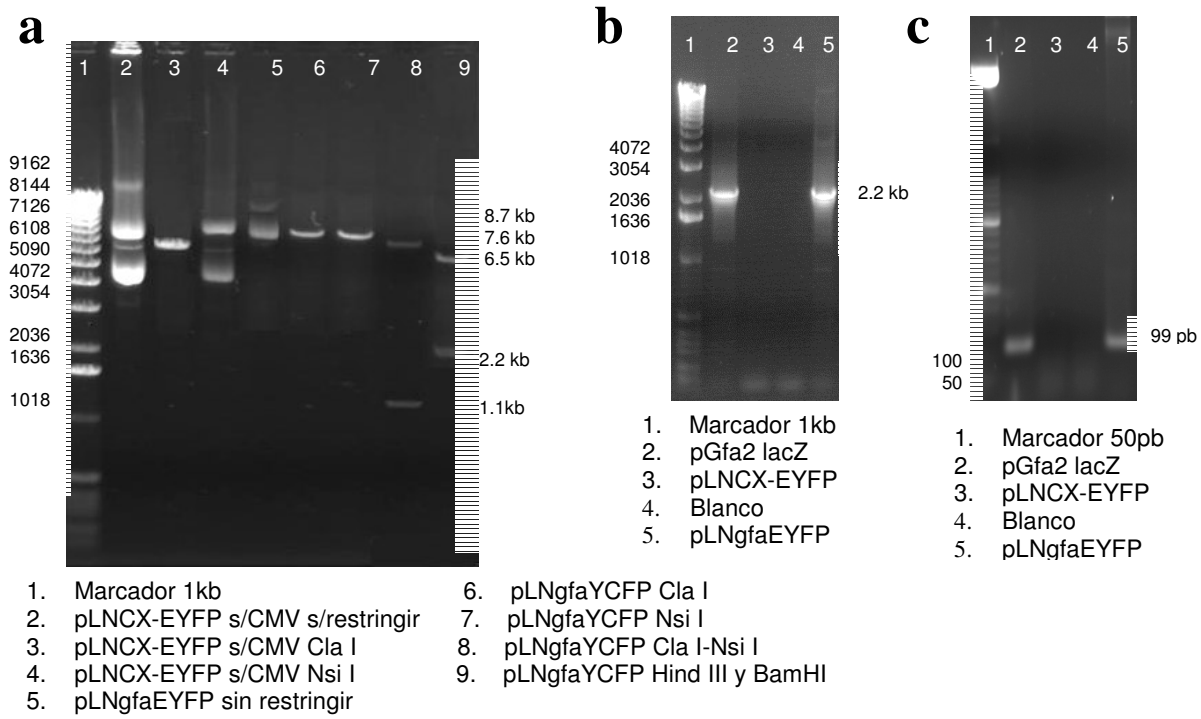


Figura 12. Mapa de pLNgfaECFP obtenido del programa clone, donde se muestra el sitio de restricción de NsiI dentro de gfa2, también se muestra el sitio de restricción de ClaI fuera del inserto, enzimas que fueron usadas en el análisis de restricción. Además de los sitios para las enzimas BamHI y HindIII.

### 3. Construcción del vector retroviral pLNgfaEYFP

La construcción pLNgfaEYFP fue hecha clonando gfa2 en el lugar de CMV en pLNCX-EYFP (figura 10), de la misma forma que pLNgfaECFP; así que la orientación correcta e integridad del inserto gfa2 fue verificada con un análisis de restricción (figura 13a) y PCR con las mismas enzimas y oligos (figura 13b y 13c) (respectivamente) que para pLNgfaECFP.



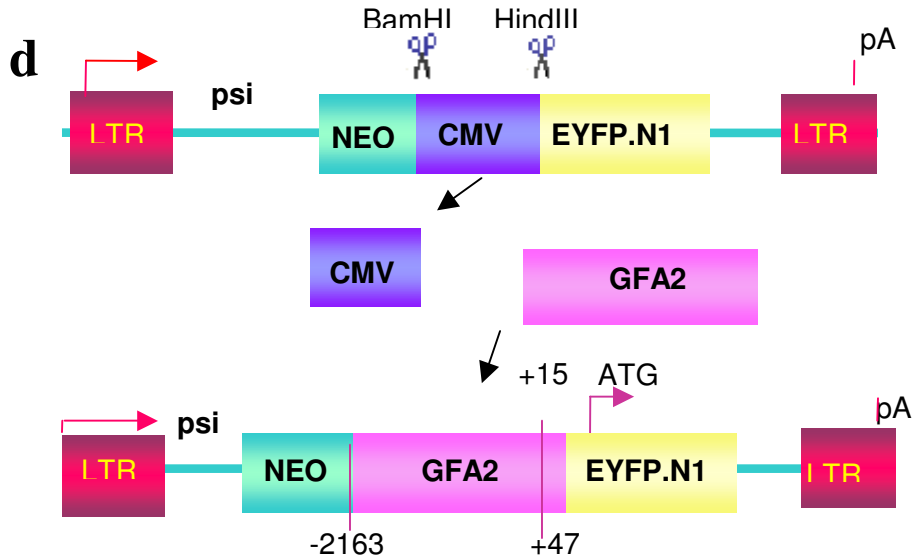


Figura 13. En el panel **a** se muestra la electroforesis en un gel de agarosa de 0.8% del análisis de restricción de pLNgfaEYFP y de pLNCX-EYFP como control. **b** Los productos de amplificación de 2.2 kb (*gfa2*) de la PCR del vector pLNgfaEYFP y de los plásmidos *pgfa2*-LacZ como control positivo y de pLNCX-EYFP como control negativo de la reacción, con los oligos *gfa2*-BamHI y *gfa2*-HindIII (gel de agarosa al 1%) **c** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR con los oligos *gfa2* y *gfa2*-HindIII con un producto de 99 pb a partir del plásmido pLNgfaEYFP, con el plásmido *pgfa2*-LacZ como control positivo y usando como control negativo pLNCX-EYFP. **d** Se muestra de manera gráfica la subclonación de *gfa2* en pLNCX-EYFP con las enzimas BamHI y HindIII.

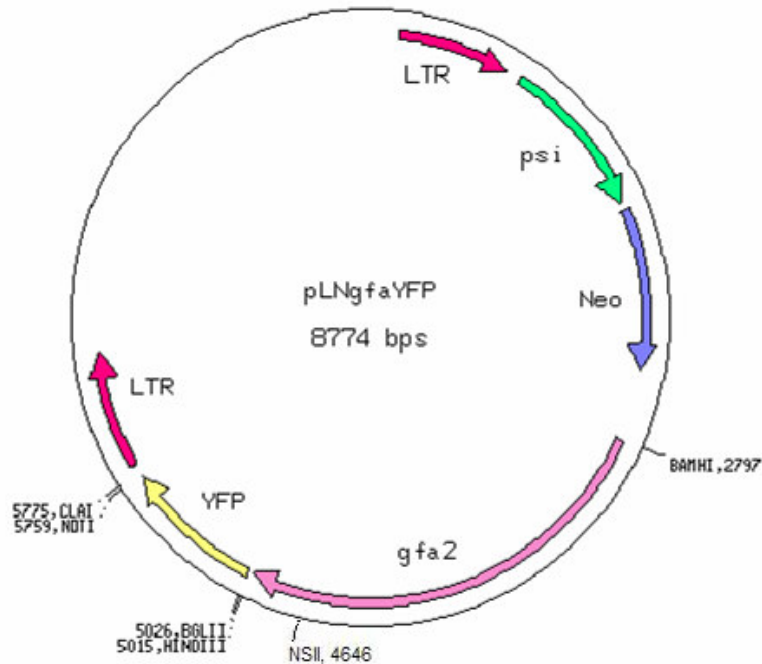


Figura 14. Mapa de pLNgaEYFP obtenido del programa clone, donde se muestra el sitio de restricción de NsiI dentro de gfa2, también se muestra el sitio de restricción de Clal fuera del inserto, enzimas que fueron usadas en el análisis de restricción. Además de los sitios para las enzimas BamHI y HindIII.

#### 4. Obtención de retrovirus pLNgaECFP y pLNgaEYFP:

Las células GP+E-86 transfectadas con los vectores de expresión pLNgaECFP y pLNgaEYFP, y como controles con los vectores pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP, fueron seleccionadas en medio de cultivo con sulfato de neomicina (G418). Se seleccionaron 3 colonias de cada una de las cuatro transfecciones, que fueron expandidas en cajas de 100 mm y se siguió seleccionando con G418 de cada vector por 10 días, al cabo de estos se determinó el título viral usando la línea celular NIH3T3, para lo que se llevo a cabo la transducción de estas células con el sobrenadante de cada una de las clonas GP+E-86. Diez días después de la transducción se realizó el conteo de colonias y se determinó el título viral es decir las cantidad de partículas infectantes en un ml (cfu/ml). De las 3 clonas por vector, sólo fue elegida aquella que tuviera el título viral mayor; las cuales siguieron seleccionándose con neomicina hasta hacerlas clonas productoras de retrovirus

estables, cuyo sobrenadante fue usado como stock viral. Las NIH3T3 que presentaron mayor número de colonias, también se siguieron seleccionando para hacerlas estables. El título viral mayor de cada clona se muestra en la tabla 1.

CLONA	No. COLONIAS	TÍTULO VIRAL (c.f.u/ml.)
<b>pLNCX-ECFP</b>	<b>56</b>	<b><math>2.8 \times 10^4</math></b>
<b>pLNCX-EYFP</b>	<b>61</b>	<b><math>3.2 \times 10^4</math></b>
<b>pLNgfaECFP</b>	<b>76</b>	<b><math>3.55 \times 10^4</math></b>
<b>pLNgfaEYFP</b>	<b>97</b>	<b><math>4.85 \times 10^4</math></b>

Tabla 1. Se presenta el título viral más alto de las tres clonas seleccionadas de las células productoras de retrovirus, pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP se usaron como controles ya que tienen como promotor CMV, con el cual se regulara la expresión de las proteínas fluorescentes en cualquier tipo celular, mientras que con pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP se expresará las proteínas fluorescentes de manera específica en astrocitos.

### **5. Transducción de células C6 con retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP:**

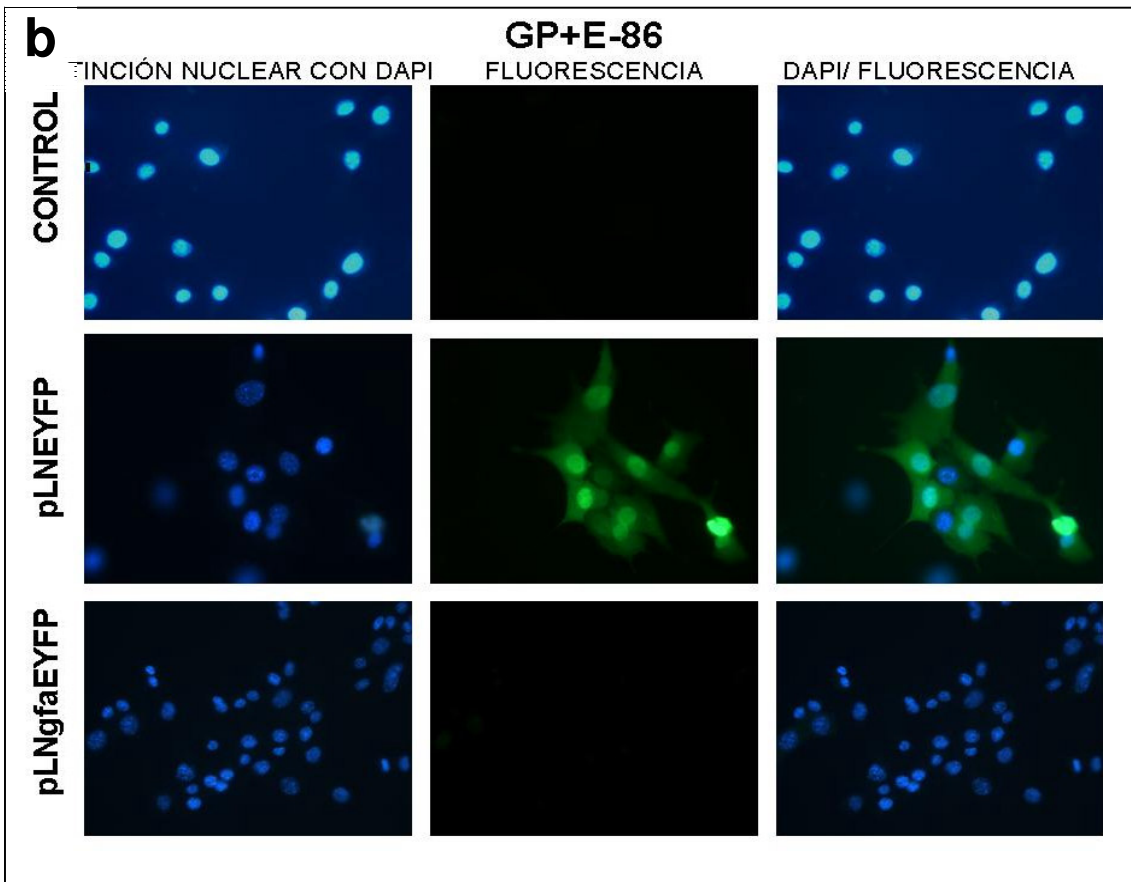
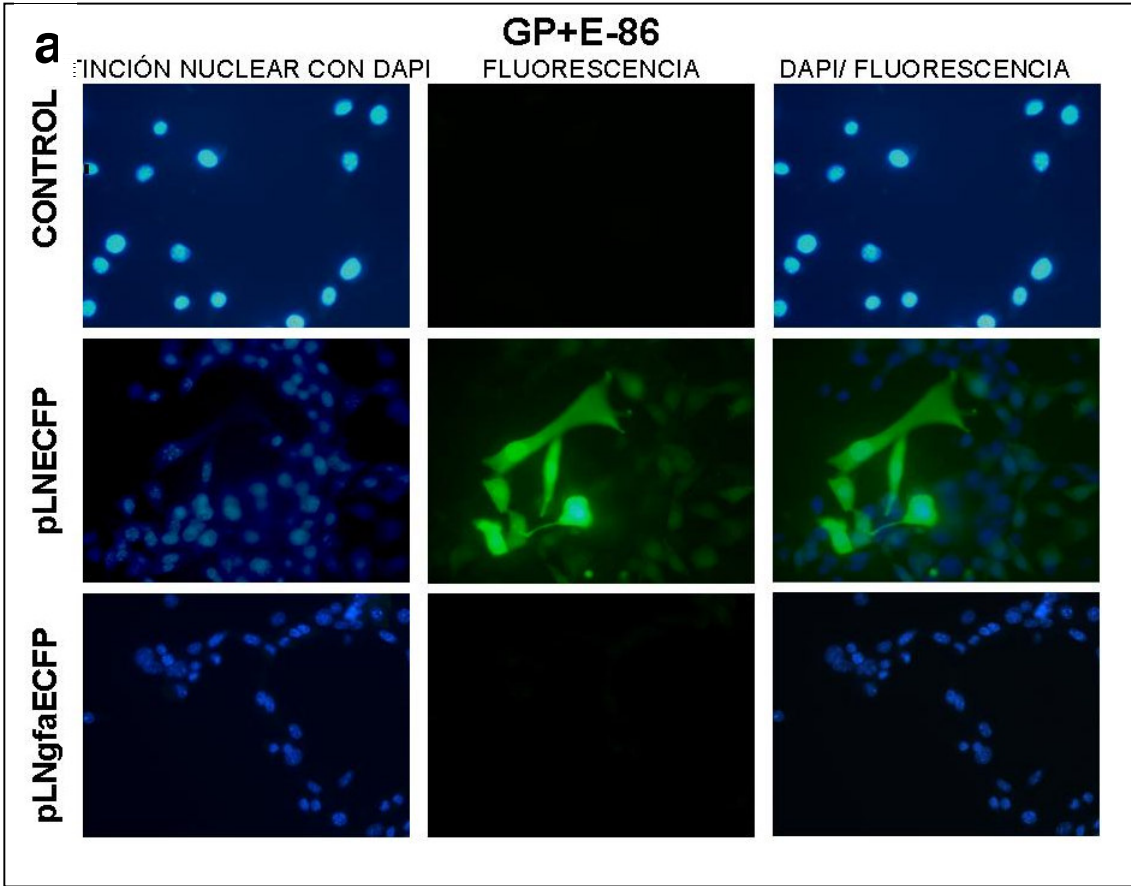
Un millón de células C6 fueron transducidas para cada vector, con el stock viral de GP+E-86 de pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP, y como controles positivos pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP. Las células transducidas fueron seleccionadas con G418 hasta hacerlas estables, aunque se les siguió agregando neomicina hasta su congelación.

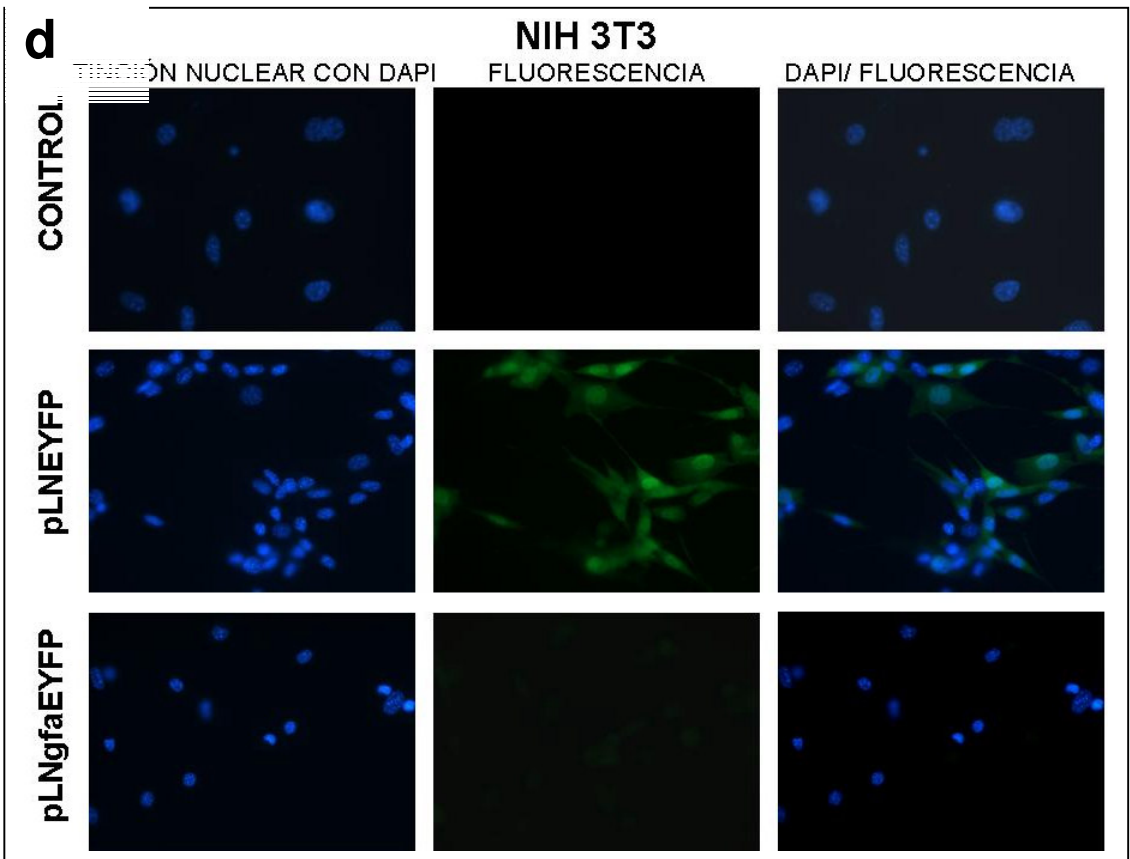
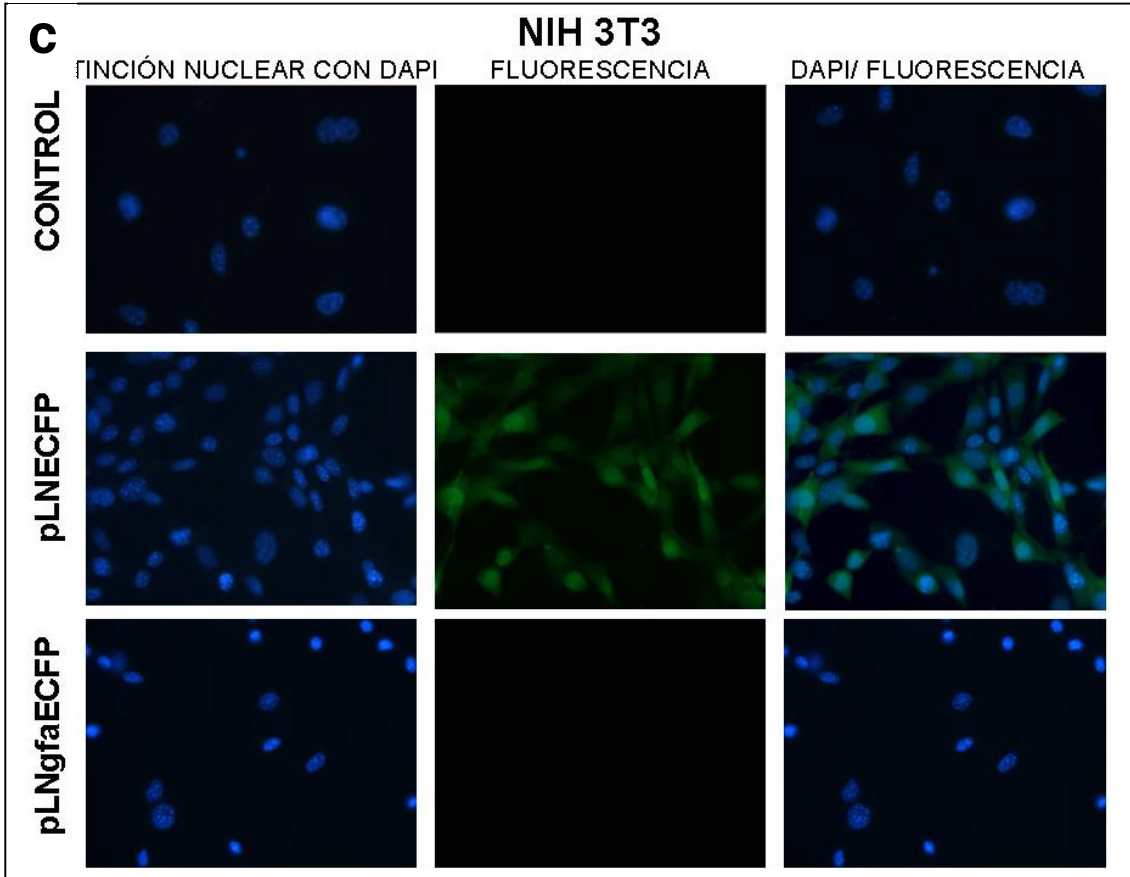
### **6. Expresión de las proteínas cian y amarilla fluorescentes en las líneas celulares C6, NIH-3T3 y GP+E-86**

Para determinar si los vectores retrovirales eran funcionables y además que la expresión regulada por gfa2 de las proteínas fluorescentes amarilla y cian, era específica en astrocitos se montaron en cubreobjetos células de cada una de las clonas de pLNgfaECFP, con su control pLNCX-ECFP y de las clonas de pLNgfaEYFP, con su control pLNCX-EYFP, este montaje se realizó en los tres

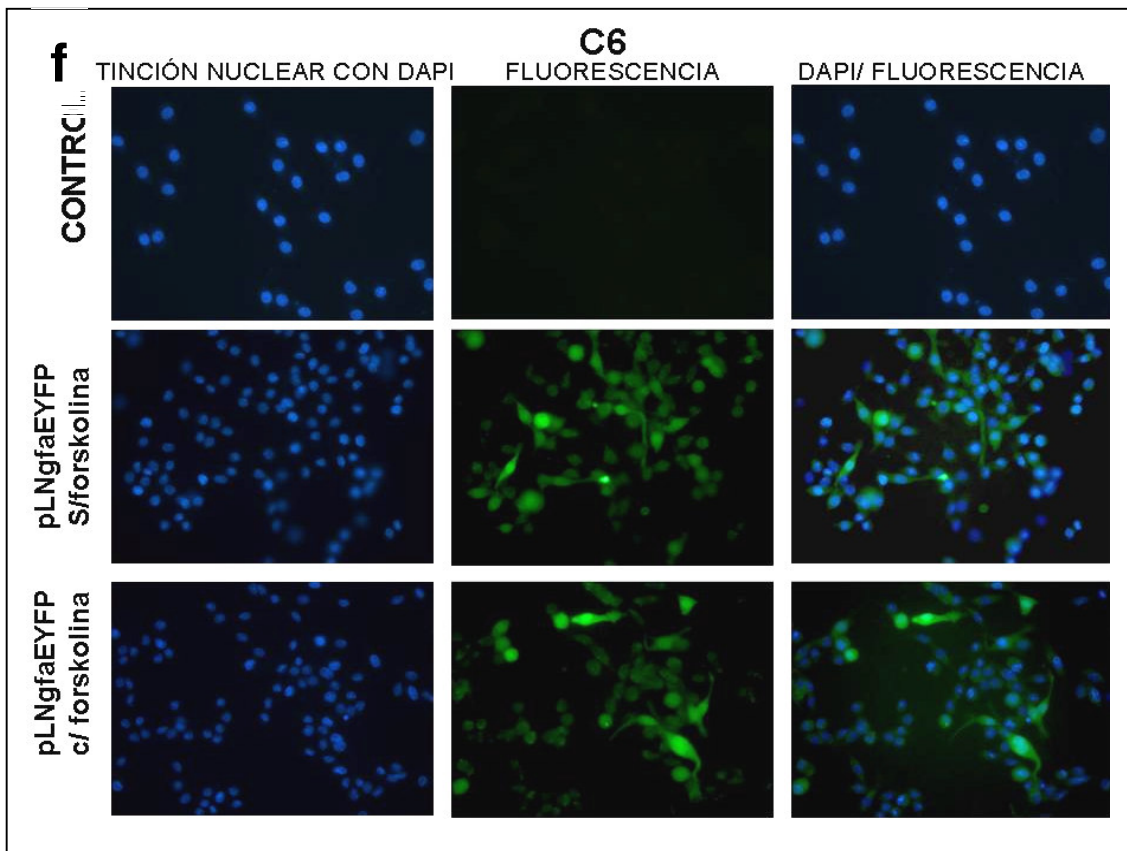
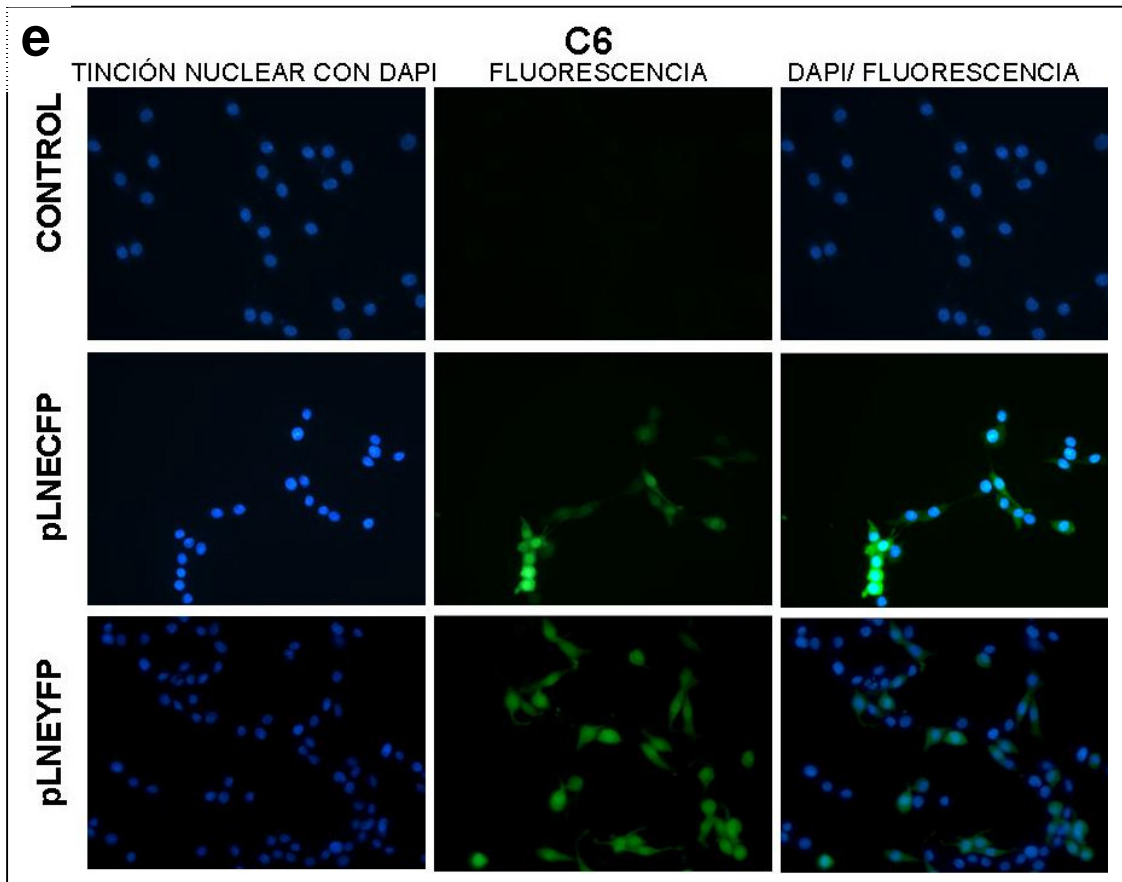
tipos celulares: la línea productora GP+E-86, NIH3T3 y C6; se uso un control negativo donde se tomo foto a células que no fueron transfectadas para cada uno de las líneas celulares. Las células fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia, con el filtro FITC, el cual hace que las células con la proteína fluorescente fueron vistas de color verde, tanto las que tienen la expresión de la proteína cian como la expresión de la proteína amarilla.

Las proteínas fluorescentes que se encontraban bajo la regulación del promotor gfa2 fueron expresadas en las células de la línea celular C6, y no así en las células GP+E-86 y NIH-3T3. Por el contrario la expresión de las proteínas fluorescentes fue detectada en las tres líneas celulares, cuando se utilizaron los vectores con el promotor constitutivo CMV. Por otro lado la forskolina indujo expresión con más brillo en las células C6 donde les fue agregada (figura 15).









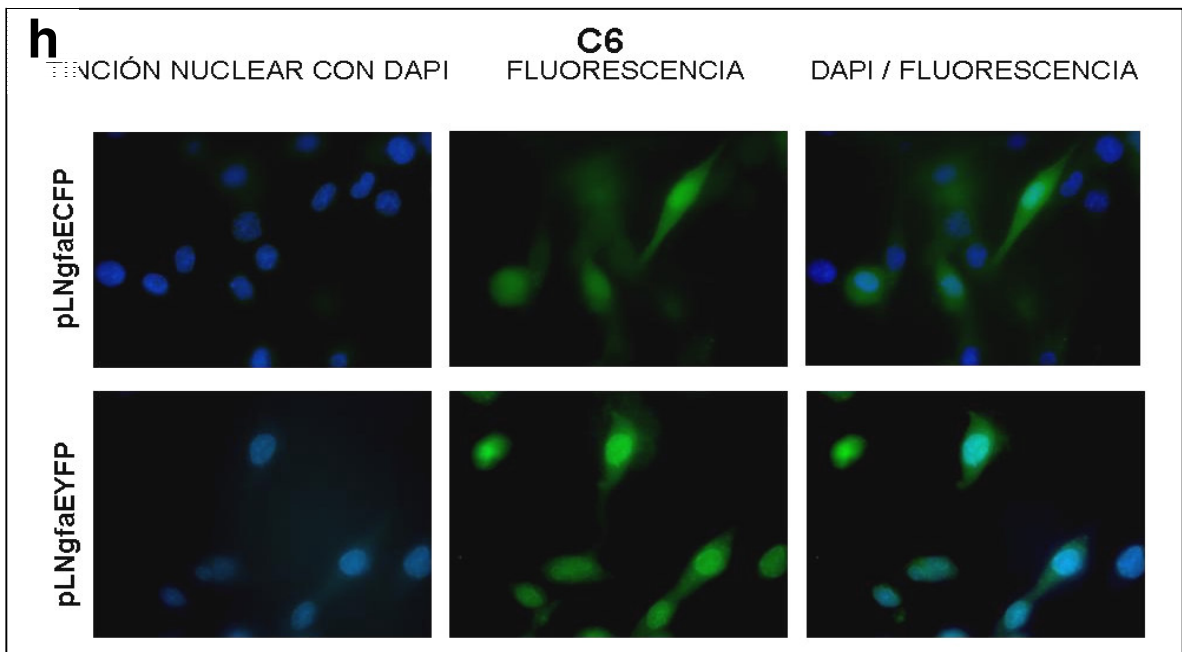
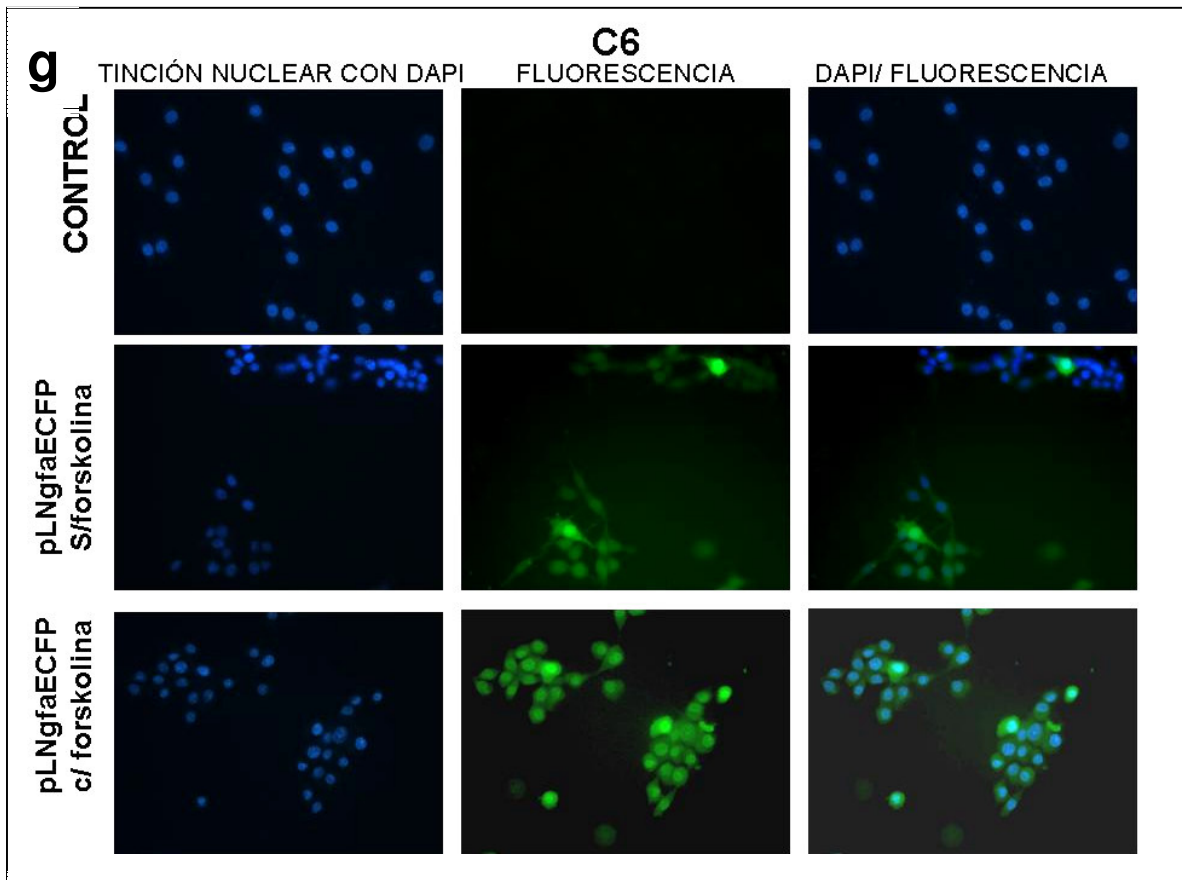


Figura 15. Panel a . Expresión de ECFP dirigidas por el promotor viral CMV en células GP+E-86. Panel b. expresión de EYFP en células GP+E-86 (promotor viral). Paneles c y d. Expresión de ECFP y EYFP dirigidas por el promotor viral CMV en células NIH-3T3. Panel e. Expresión de ECFP y ECFP con el promotor viral CMV en células C6. Panel f. Expresión de ECFP dirigidas por el promotor gfa2 en células C6, sin forskolina y con forskolina. Panel g. Expresión de EYFP dirigidas por el promotor gfa2 en células C6, sin forskolina y con forskolina. Panel a-g: 40x La expresión de las proteínas fluorescentes reguladas por el promotor gfa2 sólo fue detectada en C6. Panel h. Se observa células C6 fluorescentes por



## DISCUSIÓN

Se sabe que las células gliales participan activamente en la fisiología del cerebro (Jessen y Mirsky, 1980). En condiciones normales los astrocitos juegan un importante papel en el monitoreo del microambiente, controlando niveles de iones extracelulares, en el procesamiento de la información o señalización y responden a lesiones del SNC (Tacconi, 1998). Por lo que estas células pueden ser usadas para expresión y liberación de transgenes en el SNC, donde se pueden mencionar trabajos en gliomas (Zamorano et al., 2003; Zamorano et al., 2004) y en modelos experimentales de padecimientos neurodegenerativos (Trejo et al., 1999; Cortez et al., 2000); entre otros.

La regulación y la especificidad en la expresión génica es un problema que trata de resolverse usando promotores específicos a ciertos tipos celulares, debido a que el uso de promotores virales disminuye la expresión del transgen a largo plazo (Davidson y Breakefield, 2003); en este trabajo se emplean las cualidades de un promotor celular específico de astrocitos, es decir *gfa2* (Brenner et al., 1994), y un sistema de transferencia retroviral. El promotor *gfa2* permitiría afectar la expresión de moléculas en respuesta a señales endógenas y extracelulares a las que los astrocitos pudieran estar expuestas en condiciones normales y de lesión cerebral (Cortez et al., 2000). Los vectores retrovirales han sido ampliamente usados como vehículos de transferencia génica en SNC (Cortez et al., 2000; Thomas et al., 2003; Zamorano et al., 2004). Vectores basados en MoMLV, como el vector usado en este trabajo pueden integrar eficientemente su genoma en células, para con ello crear líneas celulares modificadas en cultivo; selectivamente infectan *in vivo* células tumorales en el sistema nervioso, o células en fase de desarrollo del cerebro (Davidson y Breakefield, 2003).

Tras la amplificación de *gfa2* fue llevado a cabo la clonación del promotor de manera correcta en pBlueScript SK+, lo que pudo verificarse por el análisis de restricción, PCR y secuenciación, para verificar la integridad del promotor. Besnard y colaboradores en 1994, encontraron que el promotor *gfa2* contenía secuencias que al ser deletadas reducían hasta 10 veces la actividad de un gen reportero. La especificidad de las del promotor se le atribuyó a una región que abarca de 552- 657 pb de *gfa2*, estos investigadores observaron que al deletar esta región la actividad del promotor produjo altos niveles de la proteína reportera en células U251. En esta región se encuentran elementos regulatorios que pueden interactuar con factores de transcripción (proteínas que son requeridas para la iniciación de la transcripción, que no sea parte de la ARN polimerasa). También fueron descritas dos regiones más, que contienen elementos que son indispensables para la transcripción. Sitios de reconocimiento tales como NF-1, hgcs, AP-2, AP-1 y SP-1, fueron encontrados en estas regiones (Besnard et al., 1994). En el análisis de la secuenciación, no se encontraron mutaciones que afectaran estos sitios de reconocimiento. La mutación generada se detectó fuera de estas regiones, sin embargo al parecer no tuvo consecuencias en la regulación de la transcripción, puesto que se logró la expresión de las proteínas fluorescentes.

El uso de virus incompetentes de replicación han sido ampliamente utilizados como sistemas de transferencia génica en células somáticas, pueden infectar con gran eficiencia un rango amplio de células en mitosis. Sin embargo tienen la desventaja, que se obtienen títulos virales bajos (hasta  $10^6$ ) (Markowitz et al., 1988). En este trabajo fueron obtenidos títulos virales aún menores a lo esperado, pero parecidos a los obtenidos por Zamorano et al., (2004). Pese a este título viral se logró eficientemente transducir de manera estable astrocitos con los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP.

La infectividad de los retrovirus producidos por las células GP+E-86, fue corroborado en células C6. Mientras que la especificidad del promotor fue probada por la expresión de las proteínas fluorescentes en células C6; y no se presento expresión en células no astrocíticas. La fluorescencia con el promotor astrocito-específico, en la transducción con pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP de células GP+E-86 no fue detectada, ni tampoco en las células NIH-3T3; en comparación con la transducción con los vectores retrovirales pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP, los cuales tienen un promotor viral, lo por lo que fueron expresadas las proteínas fluorescentes en las tres líneas celulares (C6, NIH-3T3 y GP+E-86).

El aumento en la transcripción de *gfa2* puede verse tras un incremento intracelular de AMPc por efecto de forskolina (Messens y Slegers, 1992; Segovia et al 1994). Al agregar 50  $\mu$ m de forskolina, se observó un aumento en la fluorescencia, produciendo células con más brillo y más alargadas.

El aumento intracelular de AMPc activa la fosforilación de vimentina y GFAP, induciendo un cambio en la forma poligonal lisa a una alargada y con procesos citoplasmáticas (Pollenz y McCarthy, 1986).

En este trabajo se logró obtener células productoras de retrovirus pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP. Con estos virus se logró transducir células C6. Estos retrovirus pueden tener aplicaciones, para realizar controles en estudios de expresión génica en astrocitos. También pueden usarse para transducir células progenitoras gliales; en protocolos donde el objetivo sea conocer los agentes que promuevan gliosis reactiva o en trabajos donde se estudie las interrelaciones que existen entre astrocitos y otras células del SNC. Las proteínas fluorescentes son una herramienta para la cuantificación de expresión génica, en tejidos fijados o en células vivas, y no requieren sustratos cromogénicos. En los últimos años se ha visto un gran interés en el estudio de estas proteínas, así se han generado variedades de la proteína verde fluorescente como las usadas en este estudio, permitiendo varios marcajes simultáneos en las células. Las proteínas ECFP y EYFP usadas en este trabajo tienen mejores características espectrales que la GFP (Tsien, 1998), aunque requiere de filtros específicos que ofrezcan la luz que excite a una longitud de onda para que pueda emitirse su máxima fluorescencia, en este trabajo sólo se observo emisión de fluorescencia en color verde, debido a que se utilizó el filtro FITC para fluoresceína, que sólo permite emitir fluorescencia de este color y con menor intensidad que con un filtro para estas proteínas. Esto se debe a que el filtro FITC permite el paso de luz con un rango de longitud de onda de 450 a 520 nm (Klingston R. 1997). Siendo de 492 a 500 nm el punto máximo de excitación (Lippincott, 2001); los picos de excitación máximos que requieren las proteínas ECFP y EYFP son 452 y 510 nm respectivamente, y un pico de emisión máximo en 477 nm para ECFP y 527 nm para EYFP (Tsien,

1998). Parte del espectro de excitación que requiere cada proteína cae dentro del rango de FITC, pero debido a que no es el máximo pico de excitación requerido por las proteínas, produce el color parecido al emitido por la fluoresceína pero con poco brillo. Por lo que en próximos trabajos es recomendable usar los filtros que proporcionen para cada proteína fluorescente el color que deben emitir (cian y amarillo).

Los vectores retrovirales pLNgfaECFP y pLNgfaEYFP construidos, pueden ser usados como una herramienta en la neurobiología, pudiendo tener un uso como control en estudios de Terapia Génica donde la expresión de proteínas terapéuticas para el SNC sea regulada por el promotor astrocito-específico de la proteína glial fibrilar ácida; así mismo se propone que pueda ser usado en estudios de desarrollo del SNC, interacciones glia-neurona, gliosis reactiva, formación de gliomas, etc., donde se requiera una rápida identificación de los astrocitos de otros tipos celulares, con la expresión de la proteína fluorescente.

## CONCLUSIONES

Se realizó de manera correcta la clonación del promotor de la proteína glial fibrilar ácida (*gfa2*), de manera correcta en pBluescrip SK+.

A partir de pBScGfa2, *gfa2* fue restringido y subclonado de forma correcta en los vectores retrovirales pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP, para regular la expresión de las proteínas fluorescentes cian y amarilla.

Fueron obtenidos retrovirus deficientes de replicación en donde la expresión de las proteínas fluorescentes cian (pLN*gfa*ECFP) y amarilla (pLN*gfa*EYFP), esta regulada por *gfa2*.

La infectividad de los retrovirus pLN*gfa*ECFP y pLN*gfa*EYFP liberados por las células empacadoras fue corroborada en células de glioma (línea celular C6), demostrándose que la expresión de las proteínas fluorescentes reguladas transcripcionalmente por el promotor *gfa2*, se dió de manera específica en astrocitos; a diferencia de los retrovirus pLNCX-ECFP y pLNCX-EYFP, donde las proteínas fluorescentes reguladas transcripcionalmente por el promotor de citomegalovirus (CMV), fueron expresadas de forma no específica en las líneas celulares de fibroblastos NIH-3T3 y GP+E-86, y en la línea celular de glioma C6.

## REFERENCIAS:

Alcantara F., Garcia J., Galou M., Paulin D. y Moura V. 1999. Neurons Induce GFAP Gene Promoter of Cultured Astrocytes From Transgenic Mice. *Glia*, 26:97-108.

Barres B., Barde Y. 2000. Neuronal and glial cell biology. *Current opinion Neurobiology*, 10:642-648.

Benitez J., Segovia J. 2003. Gene therapy targeting in the central nervous system. *Current Genetic Therapy*, 3:127-145.

Besnard F., Brenner M., Nakatani Y., Chao R., Purohit H J., Freese E. 1991. Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J. Biology Chemistry*, 266:18877-18883.

Bierhuizen M, Westerman Y, Visser T, Dimjati W, Wognum A., Wagemaker G. 1997. Enhanced Green Fluorescent Protein as selectable marker of retroviral



mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood*, 90:3304-3315.

Bhaumik S. y Gambhir S. 2002. Optical imaging of *Renilla luciferasa* reporter gene expresión in living mice. *PNAS*, 99 (1):377-382.

Bottenstein J., Hunter S., Seidel M. 1988. CNS neuronal cell line-derived factors regulate gliogenesis in neonatal rat brain cultures. *J. Neuroscience Research*, 20:291-303.

Breakefield X. 1993. Gene delivery into the brain using virus vectors. *Nature Genetic*, 3:187-189.

Brenner M., Kisseberth W., Su Y., Besnard F., Messing A. (1994) GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neuroscience*, 14: 1030-1037

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W., Prasher D. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802-805.

Cheng L., Fu J., Tsukamoto A., Hawley R. 1996. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 14:606.

Chiu F, Norton W., Fields K. 1981. The cytoskeleton of primary Astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J. Neurochemistry*, 37:147-155.

Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H., Sheen Y. 1996. Use of retroviral vectors in gene therapy. *Current Biology*, 6:325-330.

Cormack B, Valdivia R., Falkow S. 1996. FACS Optimized mutants of the green fluorescent protein (EGFP). *Gene*, 173:33-38.

Cortez N, Trejo F, Vergara P., Segovia J. 2000. Primary Astrocytes Retrovirally Transduced with a Tyrosine Hydroxylase Transgene Driven by a Glial-specific promoter elicit Behavioral Recovery in Experimental Parkinsonism. *J. Neuroscience Research*, 59: 39-46.

Costantini L, Bakowska J, Breakefield X., Isacson O. 2000. Gene Therapy in the CNS. *Gene Therapy*, 7: 93-109.

Culver K., Ram Z., Wallbridge S., Ishii H., Oldfield E., Blaese R. 1992. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256:1550-1552.

Davidson B., Breakefield X. 2003. Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nature Reviews of Neuroscience*, 4: 353-364.

Dunbar C, Cotter F, O'Shaughnessy J, Doren S, Carter C, Berenson R, Brown S, Moen R, Greenblat J., Stewart F. 1995. Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood*, 85:3048-3057.

Eglitis M., Anderson F. 1988. Retroviral Vectors for Introduction of genes into Mammalian Cells. *BioTechniques*, 6 (7): 608-614.

Eddleston M. y Mucke L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54 (1):15-36.

Eng L. 1985. Glial Fibrillary Acídic Proteín (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunology*, 8:203-214

Fedoroff S., Vernadakis A. 1986. Astrocytes development, morphology and regional specialitation of astrocytes. *Aca Press Inc*, 1:21-25.

Ferver D. 2001. Gene Therapy: Safer and virus-free? *Science*, 294:1638-1642.

Fuchs E., Cleveland D. 1998. A structural Scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, 279: 514-519.

Friedmann T. 1999. The development human gene therapy. Ed. CSHL PRESS. E.U.A. p 1-45.

Griesbeck O., Baird G., Campbell R., Zacharias D. 2001. Reducing the environment sensitivity of yellow fluorescent protein. J. Biology Chemistry, 276(31): 29188-29194.

Günzburg W., Salmons B. 1995. Virus vector design in gene therapy. Reviews Molecular Medicine Today, pp 410-417.

Jessen K y Mirsky R. 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. Nature, 280: 736-737.

Junqueira L., Carneiro J. 1987. Histología Básica. Ed. Salvat, p 181-184.

Kandel E., Schwartz J., Jessell T. 2001. Principios de Neurociencia. Ed. McGraw-Hill e Interamericana, Pp 20-21.

Kay M., Glorioso J., Naldini L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nature Medicine. 7 (1):33-39.

Kitt P, Adams M, Kondepudi A, Gallagher D., Kain S. 1995. Green fluorescent protein (GFP): a novel reporter for monitoring gene expression in living cells and organisms. Clontechiques.

Klingston R. 1997. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

Levy J., Muldoon R., Zolotukhin S., Link C. 1996. Retroviral transfer and expression of a humanized, red shift fluorescent protein gene in to human tumor cells. Nature Biotechnology, 14:610-614.

Lippincott S, Snapp E y Kenworthy. 2001. Studying protein dynamics in living cells. Nature Reviews, 2: 444-456.

Markowitz D., Goff S., Bank A. 1988. A safe packaging line for gene transfer: separating genes on two different plasmids. J. Virol, 62:1120-1124.

McCarthy K., De Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. J. Cell Biology, 85:890-902.

McLachlin J., Corneta K., Eglitis M., Anderson W. 1996. Retroviral-mediated Gene Transfer. Prog Nucleic Acid Res. MOI Biology, 38:91-135.

Mercer E., Hoyle G., Kapur R., Brinster R., Palmiter R. 1991. The Dopamine  $\alpha$ -Hydroxylase gene promoter direct expression of E. coli lacZ to sympathetic and other neurons in adult transgenic mice. *Neuron*, 7:703-716.

Messens J., Slegers H. 1992. Synthesis of glial fibrillary acidic protein in Rat C6 glioma in chemically defined Medium: Cyclic AMP-dependent transcriptional and translational regulation. *J. Neurochemistry*, 58 (6):2071-2080.

Miyawaki A., Sawano A., Kogure T. 2003. Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nature, Imaging in cell biology*, pp 1-12.

Muñoz-García D., Ludwin S. 1985. Intermediate Glial Cells and reactive astrocytes Revisited. *J. Neuroimmunology*, 8:237-254.

Ridet J., Corti O., Pencalet P., Hanoun N., Hamon M., Philippon J., Mallet J. 1999. Toward Autologous *ex Vivo* Gene Therapy for the Central Nervous System with Human Adult Astrocytes. *Human Gene Therapy*, 10:271-280.

Roeslert W., Vandenbark G., Hanson R. 1988. Cyclic AMP and Induction of Eukaryotic Gene Transcription. *J. Biological Chemistry*, 263 (19): 9063-9066.

Segovia J. 2002. Gene therapy for Parkinson's Disease. *Am J Pharmacogenomics*, 2 (2): 135-146.

Segovia J., Lawless G., Tillakaratne N., Brenner M., Tobin A. (1994) Cyclic AMP decreases the expression of a neuronal marker (GAD67) and increases the expression of an astroglial marker (GFAP) in C6 cells. *Journal of Neurochemistry*, 63: 1218-1225.

Segovia J., Vergara P., Brenner M. (1998a) Differentiation-dependent expression of transgenes in engineered astrocyte cell lines. *Neuroscience Letters*, 242: 172-176.

Segovia J., Vergara P., Brenner M. (1998b) Astrocyte-specific expresión of tyrosine hydroxylase after intracerebral gene transfer induces behavioral recovery in experimental Parkinsonism. *Gene Therapy*, 5: 1650-1665

Salmons B, Günzburg H. 1993. Targeting of retroviral vectors for Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, 4:129-141.

Slack R., Miller F. 1996. Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Curr. Op. Neurobiology*, 6:576-583.

Sokol G. 1996. Gene Therapy: Basic concepts and recent advances. *Critical reviews in eukariotic gene expression*, 629-57.

Stauber R., Hone K., Carney E., Hudson N., Tarasova G., Gaitanaris, Paviakis G. 1998. Development and applications of Enhanced Green Fluorescent protein Mutans. *Biotechniques*, 24:462-471.

Tacconi M. 1998. Neural death: Is there a role for astrocytes?. *Neurochemical Research*, 23:759-765.

Thomas C., Ehrhardt A., Kay M. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for Gene Therapy. *Nature Reviews, Genetics*, 4: 346-358.



Timmons L., Becker J., Barthmaier., Fyrberg C., Shearn A., Fyrberg E. 1997. Green fluorescent protein/ $\beta$ -galactosidase double reporters for visualizing *Drosophila* Gene expression patterns. *Developmental genetics*, 20:338-347.

Trejo F., Vergara P., Brenner M., Segovia J. 1999. Gene therapy in a rodent modelo of Parkinson's disease using differentiated C6 cells expressing a GFAP-Tirosine Hidroxilasa Transgene. *Life Sciences, Elsevier*, 65(5):483-491.

Tsuchiya R., Yoshiki F., Kudo Y., Morita M. 2002. Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellow cameleon, in the rat cortical primary cultures. *Brain Research*, 956:221-229.

Wahlfors J., Xanthopoulos K., Morgan R. 1997. Semliki Forest Virus-Mediated Production of Retroviral vector RNA in Retroviral Packaging Cells. 8:2031-2041.

Zhang J., Campbell., Ting A., Tsien R. 2002. Creating New fluorescent probes for cell biology. *Nature*, 3:906-918.

Zhang S. 2001. Defining glial cells during CNS development. *Nature Review*, 2:840-842.

Zamorano A., Lamas M., Vergara P., Naranjo J., Segovia J. 2003. Transcriptionally mediated gene targeting of *gas1* to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis. *J. Neuroscience Research*, 71:256-263.

Zamorano A., Mellström B., Vergara P., Naranjo J., Segovia J. 2004. Glial-specific retrovirally mediated *gas1* gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth *in vivo*. *Neurobiology of Disease*, 15:483-491.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AAV	Virus adeno-asociado
Av	Adenovirus
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
lacZ	Gen de $\beta$ -galactosidasa
C	Citocina
$^{\circ}\text{C}$	Centígrados
C6	Línea celular de gliosis reactiva
cis	Cistina
CFP	Cian Fluorescent Protein
CFU	Partículas formadores de colonias
CMV	Citomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxido
dNTPs	Mezcla de nucleótidos (Adenina, timina, guanina y citocina)
E1-4	Early 1-4 (genes tempranos)
ECFP	Enhancer Cian Fluorescent Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido tetra acético (etilendinitrilo)
env	Gen que codifica para las proteínas de la envoltura
EYFP	Enhancer Yellow Fluorescent Protein
FITC	Filtro de la flupresceina
G	Guanina
G418	Fármaco análogo a la neomicina
gag	Gen que codifica para las proteínas estructurales del retrovirus
Gas1	Growth arrest specific-1
GFAP	Proteína glial fibrilar acídica
gfa2	Promotor de la proteína Glial fibrilar acídica
gfa	Gen de la proteína glial fibrilar acídica
GP+E-86	Línea celular empacadora de retrovirus
GPFs	Factores promotores-gliales
His	Histidina
HSV-1	Virus Herpes Simplex tipo 1
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
ITR	Repetidos terminales invertidos (por sus siglas en ingles)
kb	Kilobases
kDa	kilodaltones

Leu	leucina
LTR	Terminales largas de repetidos (por sus siglas en ingles)
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramo
µl	Microlitro
MoMLV	Virus de la Leucemia Murina de Moloney
NaOH	Hidróxido de Sodio
neo	Gen de resistencia a neomicina
pb	Pares de bases
pBScgfa2	Plásmido de ligación pBlueScrip-gfa2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Phe	Fenilalanina
PLNCX-ECFP-N1	Retrovirus con Enhancer Cian Fluorescent Protein
PLNCX-EYFP-N1	Retrovirus con Enhancer Yellow Fluorescent Protein
pLNgfaECFP	Retrovirus con ECFP dirigido por el promotor hgfa2
pLNgfaEYFP	Retrovirus con EYFP dirigido por el promotor hgfa2
pmol	Picomoles
Pol	Gen que codifica para la polimerasa e integra retrovirales
Poli-A	Poli-adenina
psi	Señal de encapsulación de retrovirus
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
s	Segundo
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Timina
Thr	Treonina
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
Tris-HCL	Tris (Hidroximetil) aminometano hidrociorado
Trp	triptofano
U	Unidadades
UV	Ultravioleta
Val	Valina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YFP	Yellow Fluorescent Protein