



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE  
SONIC HEDGEHOG MEDIANTE EL USO DE  
LUCIFERASA COMO REPORTERO DINÁMICO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**AIMÉE BASTIDAS PONCE**

TUTOR PRINCIPAL

DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. GABRIEL GUTIERREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ  
INSTITUTO BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D.F. MAYO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 mi familia,**  
a quienes pertenezco, admiro, agradezco y quiero.

**A mi madre,**  
por ser mi fuerza y el mejor todo de mi vida. Siempre es tuyo.

**A mi padre,**  
por la evolución, el entre líneas de siempre y el apoyo constante.

**A mi hermano,**  
por las risas y ser mi compañía en la vida, mi niño adulto.

A las decisiones, frustraciones, confusiones y fortalezas  
que se conjuntan en la breve historia de un momento para celebrar...

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente al Instituto de Biotecnología (IBT) que me permitió en sus espacios realizar este proyecto en paralelo a variadas experiencias de vida.

Al **Dr. Christopher Wood**, por la amistad, la confianza, el apoyo y el gesto amable. Por la oportunidad, el riesgo tomado y la enseñanza de cada día.

Al **Dr. Luis Covarrubias**, por permitirme ser parte de un gran proyecto, el apoyo y siempre sonreír compartiendo ciencia. A la **Dra. Susana Castro**, por sus comentarios y críticas constructivas al proyecto. A la **MC. Concepción Valencia**, por ser un apoyo esencial y estar presente cada vez.

Al comité tutorial: **Dr. Ignacio López** y **Dr. Gabriel Gutiérrez** por las críticas y discusiones que cada semestre fueron enriqueciendo al proyecto y desarrollando mis percepciones.

Al comité revisor **Dra. Claudia Treviño**, **Dra. Magdalena Guerra**, **Dr. Jean Louis Charli**, **Dr. Gustavo Pedraza** y **Dr. Luis Cárdenas**; por el tiempo y las aportaciones brindadas para mejorar el escrito.

A bioterio, **Marcela Ramírez** y **Elizabeth Mata** por el cuidado y contribución de los animales siempre con un gesto amable.

A los compañeros y amigos del laboratorio: **Gilda, Jorge, Raul, Rocío, Elida Conchita, Ximena, Adriana, Francisco, Celina, Damaris, David, Francisco (primo superman), Victor, Carolina, Wendy, Rayo, Maricela, Sra. Elena, Sra. Lorena, Sr. Rubén**; y a los hermanos castores: **Sara, Daniel, María y Saul**.

A todos los compañeros y amigos de la generación de maestría por el tiempo, clases y fiestas compartidas.



**A los amigos de ayer y hoy.** Por ser mi familia elegida y permitirme en algún momento ser parte de su historia: **Iván, Angel, Héctor, Yesenia, Cynthia, Eve, Esme, Graciela, Alma, Lalo, Luis Enrique, Abel, Elida, Adriana, Rocío, Chris, Jorge, Agustín, Gilda.** Porque a su lado esta historia ha estado llena de momentos divertidos que recordar, alcoholes con que brindar, festejos leves e interminables, palabras que aprender, hombros para llorar, guarradas para conocer, lapsos de risas, el impulso inicial, la trayectoria media y siempre ser la compañía perfecta para todos los momentos. Por tanto, porque el camino se ha disfrutado mucho más en su compañía.

A ti, que me aguantas y me acompañas en paciencia y cariño en esta etapa del último jalón lleno de locuras y detalles.

A la **Sra. Silvia** y **Sr. Leonardo**, por adoptarme como hija bajo su techo. A la **Sra. Carmen** y el **Sr. Héctor**, por remachar casa y persona en sus visitas.

A **mi familia**, por ser el motor y el mejor sabor de realidad dentro de la vida real. Por la fuerza y la paz encontrada siempre.

A todos, por contribuir, con el aleteo de la mariposa, para generar el contexto adecuado para este proyecto de vida e investigación.

El resumen sentimental de una historia no sentimental que se perdía en la lejanía  
(La insoportable levedad del ser, M. Kundera)

# Índice

<b>Índice</b>	<b>5</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>Abstract</b>	<b>10</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
Enfermedad de Parkinson	11
Establecimiento del sistema nervioso central	12
Organización del mesencéfalo: el Istmo y la Placa del Piso	13
Neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo	13
Células troncales embrionarias	16
<b>Antecedentes</b>	<b>17</b>
I.    Vía de Sonic Hedgehog	17
II.   Regulación transcripcional del gen shh	19
2.   Reporteros genéticos: luminiscencia y fluorescencia	21
<b>Justificación</b>	<b>23</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>24</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>24</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>24</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>25</b>
Manipulación de células HEK293T	25
Manipulación de células troncales embrionarias (CTEs)	25
Cultivo y manipulación de explantes de mesencéfalo	27
Inmunocitoquímicas y transfección	28
Ensayo de luciferasa	30
Biología molecular	30
Microscopía	31
<b>Resultados</b>	<b>32</b>
Construcción de plásmidos para el estudio dinámico de la expresión de Shh	32
1.    Obtención de los fragmentos individuales	32

2. Obtención de las construcciones para el estudio dinámico	39
Ensayo poblacional de la actividad bioluminiscente en células HEK293T	47
Ensayos de expresión dinámica de los plásmidos inductor/Shh en células individuales HEK293T	49
Ensayo poblacional de la actividad bioluminiscente en cultivos P-P1	52
Establecimiento de células estables y líneas celulares estables	55
Análisis de la actividad bioluminiscente durante la diferenciación <i>in vitro</i> de CTEs a nDA	56
a. Ensayos poblacionales de la actividad bioluminiscente en CTEs estables	58
f. Ensayos poblacionales de la actividad bioluminiscente en líneas celulares estables de CTEs	58
<b>Discusión</b>	<b>61</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>66</b>
<b>Anexos</b>	<b>67</b>
1. Neuronas Dopaminérgicas (nDA)	67
2. Luciferasa Renilla	68
3. Lista de enzimas	68
4. Softwares utilizados	69
5. Aislantes	70
6. Cepas E. Coli: DH5 $\alpha$ y Sure	71
7. Agonista de Smo, SAG	71
8. Materiales y métodos	72

# Abreviaturas

AR	Ácido Retinoico
BMP	Del inglés "Bone Morphogenetic Protein"
CE	Cuerpo Embrioide
CTE	Células Troncales Embriónicas
DNA	Del inglés, "Deoxyribonucleic acid"
Dpc	Días post coito
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
Fgf8	Del inglés "Fibroblast growth factor 8"
FoxA2	Del inglés "Forkhead box protein A2"
FP4	Del inglés "Floor plate 4"
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GFP	Del inglés " Green Fluorescent Protein"
LIF	Del inglés "Leukaemia Inhibitory Factor"
Luc	Luciferasa
MAP2	Del ingles "Microtubule-Associated Protein 2"
NeuN	Del inglés "Neuronal Nuclei"
Ngn	Neurogenina
NDA	Neuronas Dopaminérgicas
NDAm	Neuronas Dopaminérgicas del Mesencéfalo
Pax	Del inglés "Paired Box"
PP	Placa del Piso
RE	Retículo Endoplásmico
LucR	Luciferasa Roja
RRF	Del inglés Retrorubal Field
SBE	Sonic hedgehog Brain Enhancer
SFPE	Sonic hedgehog Floor Plate Enhancer
Shh	Sonic hedgehog
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNpc	Sustantia Nigra pars Compacta
TGF- $\beta$	Del inglés "Transforming Growth Factor Beta"
TH	Tirosina Hidroxilasa
VTA	Del inglés "Ventral Tegmental Area"

# Resumen

Actualmente una de las enfermedades neurodegenerativas más importantes, asociadas al envejecimiento es la enfermedad de Parkinson. Esta enfermedad es causada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (nDA) localizadas en el mesencéfalo, específicamente en la sustantia nigra. Uno de los enfoques más prometedores para tratar esta enfermedad es la terapia de reemplazo celular. Las células troncales embrionarias (CTEs) son pluripotentes, es decir, tienen el potencial de diferenciarse a cualquier tipo celular que se encuentra en el organismo, incluyendo a las nDA. Debido a este potencial, las CTEs representan una fuente importante de células que se pueden emplear en terapias de reemplazo celular.

Sin embargo, para lograr que la terapia de reemplazo celular sea efectiva, es importante conocer los mecanismos de diferenciación de CTEs a nDA, los cuales aún no se conocen por completo; además, el porcentaje de nDA generadas como producto de la diferenciación de las CTEs a partir de los protocolos comúnmente empleados es bajo e insuficiente.

Un factor determinante en la definición de linajes neuronales a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural es el morfógeno Sonic Hedgehog (Shh), que es secretado por la placa de piso (PP). En la zona ventral del mesencéfalo se localiza el nicho de las neuronas dopaminérgicas (nDA), este linaje neuronal se caracteriza por la expresión de *Lmx1a* y la expresión de marcadores de PP (Shh, FoxA2, FP4) en la etapa de la diferenciación de precursor neural.

El destino celular esta determinado por la regulación transcripcional de genes, se ha demostrado que la expresión de algunos genes puede ser dinámica, es decir, su expresión es variable conforme el tiempo en los procesos celulares (proliferación, diferenciación). Actualmente, las proteínas reporteras son una herramienta poderosa para analizar la expresión de genes. Una estrategia es utilizar el gen que codifica para una proteína reportera bajo la actividad de un promotor de interés, lo que permite integrar secuencias reguladoras.

En este proyecto de investigación analizamos la actividad transcripcional del gen *Shh*, debido su importante papel durante la diferenciación dopaminérgica y a su expresión dinámica reportada en la literatura durante la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas. Este estudio dinámico lo realizamos mediante la expresión dinámica de luciferasa (Luc), usando el promotor e potenciador (SBE1 y SFPE1) de *Shh*, los cuales dirigen su expresión a regiones específicas del tubo neural (mesencéfalo y regiones caudales respectivamente).

Construimos plásmidos usando Luc como reportero para evaluar la actividad transcripcional de *Shh* regulado por los potenciadores: SBE1 y SFPE1; en todos los plásmidos se integraron aislantes (insulators) y el gen de selección neomicina (neo). Posteriormente, analizamos los plásmidos en diferentes células: HEK293T, CTEs y células de cultivos primarios derivados del mesencéfalo (dorsales y ventrales) y de metencéfalo (ventrales).

Determinamos la funcionalidad de los plásmidos para el monitoreo de la expresión de Shh utilizando diferentes tipos celulares. En células HEK293T transfectadas, observamos una baja actividad bioluminiscente para todas las construcciones en los ensayos realizados a partir de lisados de poblaciones de células. La expresión nula observada en las células HEK293T confirma que las secuencias regulatorias contenidos en los plásmidos dirigen la expresión de la proteína reportera de manera específica.

Con el fin de evaluar la actividad bioluminiscente generada bajo la actividad transcripcional de *shh*, proporcionamos un contexto específico regional requerido por las secuencias regulatorias, utilizando cultivos P-P1 (primarios pase 1) de células aisladas de diferentes entornos del tubo neural del embrión. Al transfectar los plásmidos en estas células, solamente se observó expresión significativa de la proteína reportera con el plásmido SBE1-Shh-Luc en el cultivo de células de mesencéfalo ventral transfectadas. Con estas células, confirmamos que las secuencias regulatorias restringe la expresión de la proteína reporta a un contexto específico y regionalizado.

Finalmente, para evaluar la expresión durante la diferenciación dopaminérgica. Electroporamos los plásmidos linearizados en células troncales embrionarias (CTEs) y generamos células y líneas celulares estables para evaluar la actividad transcripcional de *Shh* durante la diferenciación de CTEs a nDA *in vitro*. Durante este proceso, observamos variabilidad en la expresión de luciferasa durante diferentes etapas de diferenciación evaluadas. Con estos ensayos, reafirmamos el dinamismo de la expresión de Shh durante la diferenciación.

Con los resultados obtenidos hasta el momento hemos confirmado la funcionalidad específica regional de los elementos reguladores y el monitoreo de la actividad transcripcional de *shh*. Por lo que, los plásmidos funcionan como herramientas para el análisis de la expresión de Shh, a través de la expresión dinámica de la proteína Luc.

## Abstract

Globally, Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative condition present during adult life. It results from the degeneration of dopaminergic neurons (nDA) in the substantia nigra in the midbrain. There is much interest in developing cell transplant-based replacement therapies for PD.

Pluripotent ESCs have great potential as a source of cells for transplant during such therapies, however the protocols for differentiating ESCs to nDA are inefficient, and the mechanism is poorly characterized. In the embryonic developing midbrain, the nDA form at the ventral midline, from floor plate cells that express the morphogen Sonic Hedgehog (Shh). The niche for nDA differentiation is formed and maintained by Shh in concert with other morphogens, whose expression levels vary dynamically over time. It is not known to which extent these expression dynamics are recapitulated during *in vitro* or *ex vivo* differentiation of ESCs to nDA.

In this study, we attempted to characterize the dynamics of *shh* transcription through monitoring the activity of bioluminescent reporter genes coupled to transcriptional regulatory elements (enhancer/promoter) from *shh* gene. We used the SBE1 and SFPE1 enhancers to direct expression of reporter genes to specific regions of the neural tube (midbrain and caudal regions respectively). We analyzed the expression of these vectors in HEK293T, ESCs and cells isolated from the developing embryonic neural tube. Our results indicate that luciferase activity was generally extremely low, although in primary cells, regulatory elements did direct and limit expression of luciferase to the ventral mesencephalic-derived precursors.

# Introducción

## Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo asociado al envejecimiento. En la actualidad, esta enfermedad es considerada un importante problema social, ocupando el segundo lugar en trastornos neurodegenerativos después de la enfermedad de Alzheimer, afectando aproximadamente al 1% de los adultos mayores de 65 años (2).

Las principales características patológicas de este trastorno son: la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (nDA, anexo 1) de la sustancia nigra pars compacta (SNpC) que presentan estrés oxidativo, deficiencia en el proceso de respiración mitocondrial y agregación anormal de proteínas.

La degeneración de nDA de la SNpC se relaciona con su limitada capacidad de respuesta ante el estrés oxidativo debido a la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas durante la síntesis de dopamina (DA) (4). Además, de una disfunción mitocondrial vinculada con la EP, específicamente una disminución en la actividad del complejo I (NADH ubiquinona reductasa) de la cadena transportadora de electrones, produciendo más EROs debido al daño oxidativo generado.

Otra característica de la EP es la formación y acumulación de inclusiones celulares. Estas inclusiones son conocidas como cuerpos de Lewy y están compuestos de numerosas proteínas como: alfa-sinucleína, parkina, ubiquitina y neurofilamentos. La formación de estos agregados proteínicos, se ha vinculado con la deficiencia en el funcionamiento del retículo endoplásmico (RE), es decir, proteostasis en las nDA (3).

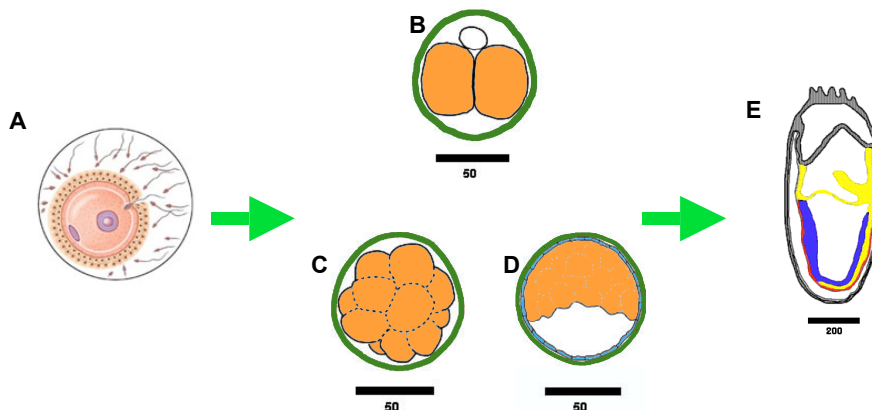
Recientemente, se sugirió que la predisposición a degradarse de las nDA de la SNpC respecto a otras nDA se debe al elevado flujo de calcio ( $Ca^{2+}$ ) derivado de su actividad independiente a la sinapsis para mantener los niveles de DA en la región distante conocida como cuerpo estriado; la vía nigroestriada, lleva a la DA a través de los axones neuronales desde la SNpC al cuerpo estriado y se encargada del control de los movimientos voluntarios del organismo.

La elevada concentración de  $Ca^{2+}$  en las nDA conlleva a su transporte al lumen del RE comprometiendo el ensamblaje y procesamiento de proteínas. Así mismo, se transporta calcio a la mitocondria aumentando la generación de ATP y de EROs a través de la cadena respiratoria debido al flujo elevado del ión (5). El elevado flujo del ión en estas neuronas estresa y compromete el funcionamiento de los dos organelos (RE y mitocondria) que se involucran con las características patológicas de la EP.



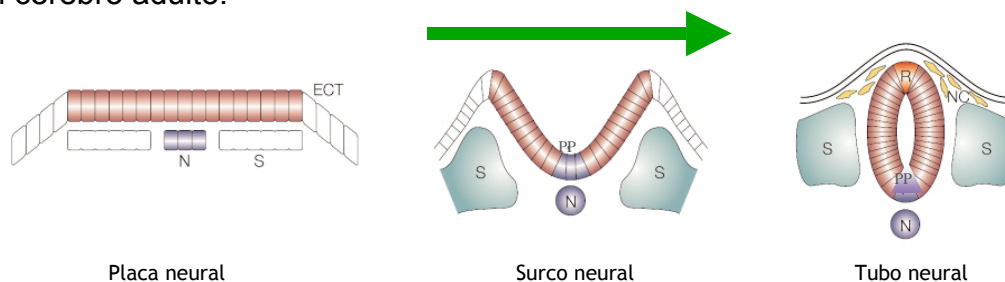
## Establecimiento del sistema nervioso central

El proceso de embriogénesis consiste en la formación y desarrollo del embrión. Este inicia con la fecundación formando el cigoto, el cual pasará por una serie de divisiones mitóticas dando lugar a un conjunto de células totipotentes conocidas como mórula; posteriormente, se genera una cavidad que se convierte en blastocisto. El blastocisto se compone de dos tipos celulares: las células gigantes del trofocotodermo que están involucradas en la diferenciación de tejidos extraembrionarios y la masa celular interna conformada por células pluripotentes que darán lugar a los tejidos embrionarios. La migración y el movimiento coordinado de las células del blastocisto promoverá la gastrulación donde se establecen las 3 capas germinales a partir de las cuales se generan todos los linajes celulares del organismo (Fig. 1).



**Figura 1. Proceso de embriogénesis. Pre-implantación: Fecundación → Gastrulación.** A) Fecundación. B) Divisiones mitóticas. C) Etapa de morula. D) Blastocisto: Masa celular interna (naranja) y trofocotodermo (verde). E) Gastrulación, establecimiento de las tres capas germinales: ectodermo (azul), mesodermo (amarillo) y endodermo (rojo).

La capa ectodermal esta involucrada en el establecimiento de la epidermis y del sistema nervioso (SN). El SN se divide en: Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). En el SNC residen las funciones cognitivas y emocionales, además de ser el encargado de percibir y actuar ante los estímulos del medio exterior, mientras que el SNP es el conductor de las señales del exterior hacia el SNC. El desarrollo del SNC se inicia con la formación de la placa neural a partir de una región del ectodermo dorsal conformado por células de apariencia columnar. El mesodermo induce el plegamiento de la placa neural hasta formar el tubo neural (Fig. 2); (6). Es a partir del tubo neural que se establecen las 5 regiones (telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo) que darán origen a las estructuras del cerebro adulto.



**Figura 2. Formación del tubo neural.** La placa neural se induce a diferenciar y plegar para formar el surco neural, finalmente se cierra la estructura para formar el tubo neural. Ectodermo (ECT), notocorda (N), somitas (S), placa de piso (PP), placa del techo (R). Modificado de Jessell (7).

## Organización del mesencéfalo: el Istmo y la Placa del Piso

El mesencéfalo se encarga de la regulación del movimiento y de algunas estructuras involucradas en la visión (ver adelante, Fig.4).

La especificación del mesencéfalo en el eje antero-posterior está determinada por un centro organizador en el límite del cerebro medio y posterior llamado **istmo** (8), que secreta al morfógeno **Fgf8** (fibroblast growth factor 8) involucrado en la inducción de progenitores neuronales del mesencéfalo y en el mantenimiento de la expresión de genes del linaje dopaminérgico (9).

El establecimiento antero-posterior del istmo se debe a la represión mutua de dos genes homeobox, es decir, por un lado la sobreexpresión de Gbx2 (Gastrulation brain homeobox 2) anterioriza al Istmo y disminuye el área del mesencéfalo; mientras que por el otro lado Otx2 (Orthodenticle homeobox 2) alarga la región mesencefálica posteriorizando al Istmo (10).

El eje dorso-ventral del mesencéfalo se organiza en respuesta a la presencia de dos centros organizadores: La **placa del techo (R)** que secreta morfógenos de la familia Wnt y BMPs y se localiza en la parte dorsal; y la **placa del piso (PP)** en la zona ventral del mesencéfalo y secreta a **Shh** (Sonic hedgehog), otro morfógeno necesario en la inducción de progenitores neurales para la diferenciación de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo (nDAm); (10).

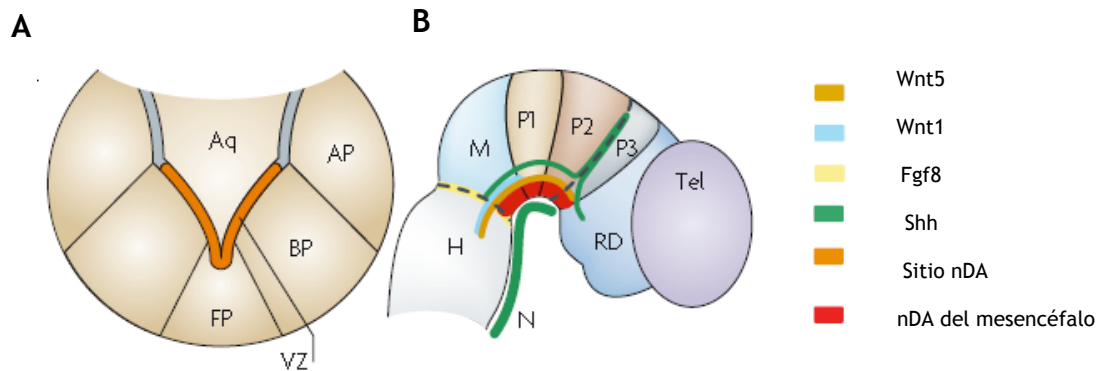
La PP se ubica a lo largo de la línea media ventral en todo el tubo neural y está integrada por células gliales especializadas (11). Se establece debido a la expresión notocordal de Shh y Nodal y se caracteriza por la expresión de Shh, FP4, Foxa2 y Anexina IV que se utilizan como marcadores de la región.

La PP secreta moléculas que intervienen en la diferenciación a distintos linajes celulares a lo largo del eje dorso-ventral (11). Cultivos de mesencéfalo han permitido demostrar que las células diferenciadas a nDAm expresan marcadores característicos de la PP durante la diferenciación temprana, sugiriendo que la PP tiene capacidad neurogénica (2, 12, 13).

### Neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo

A lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural se observan diferentes microambientes que conllevan a obtener diversos tipos neuronales dependiendo de la identidad posicional y a la plasticidad celular (7). Las neuronas dopaminérgicas (nDA) tienen un papel fundamental en varias funciones del cuerpo y comportamiento (14).

La zona ventral del mesencéfalo, se ha caracterizado por la intercepción del gradiente de Fgf8 y Shh (10), estableciendo el nicho adecuado para el desarrollo de progenitores neurales que diferenciarán a nDAm durante el desarrollo embrionario (E9.5); (24). En etapas posteriores de la embriogénesis entre E9.5-11.5, se observa diferenciación neural debido a una estimulación en la capacidad neurogénica en el mesencéfalo debido a la represión transcripcional de *shh* generada por la expresión de Wnt1 (25); (Fig.4).



**Figura 4. Señales involucradas en la generación del nicho de neurogénesis en el mesencéfalo.** A) Organización dorso-ventral (arriba-abajo) del mesencéfalo. La línea naranja enmarca el sitio de generación de las nDAm. Aq, acueducto; AP, placa alar; BP, placa basal; FP, (del inglés "floor plate") placa de piso; y, VZ, zona ventral. B) Vista antero-posterior (derecha-izquierda) del cerebro, permite visualizar la zona de expresión de Wnt5 (café), Wnt1 (azul claro), Fgf8 (amarillo) y Shh (verde), las cuales convergen y generan el nicho para las nDAm (rojo). H, metencéfalo; M, mesencéfalo, P1-3, prosomeros; RD, diencefalo rostral; Tel, telencefalo; N, notocorda (10). A la derecha se describe la asignación de colores.

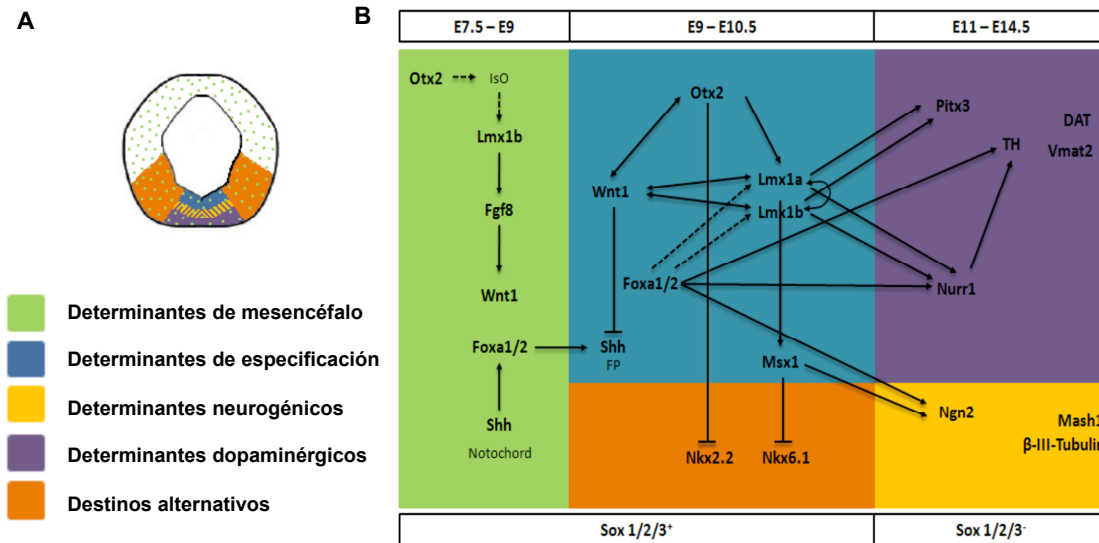
En el desarrollo de nDAm se observan 3 estadios celulares: *progenitores neurales*, expresan genes como: Otx2, FoxA2, Mash1, Ngn2, Wnt1, Lmx1a/b, En1/2. Las *neuronas inmaduras* expresan Nurr1 y la expresión inicial de  $\beta$ III-Tubulina, Lmx1a/b, Ngn2, En1/2; y finalmente las *neuronas maduras* que expresan Ptx3, Lmx1a/b, TH, DAT, Nurr1, Aadc,  $\beta$ III-Tubulina (Fig. 5); (26) caracterizados por la expresión de marcadores moleculares con diversas funciones (Tabla I).

Tabla I. Marcadores moleculares de la diferenciación a nDAm

Proteína	Función
Otx2	Controla la especificación regional y propagación del linaje
FoxA2	Marcador de placa de piso, progenitores neuronales
Mash1	Estimula la maduración neuronal
Ngn2	Induce la transición de progenitores a neuronas inmaduras
Wnt1	Activa Otx2, suprime Nkx2.2 y antagoniza a Shh
Lmx1a	Define la población, presente durante toda la diferenciación, activa Mash1 y Ngn2.
Lmx1b	Participa en el mantenimiento neuronal
En 1/2	Participan en el establecimiento del nicho, en la generación y mantenimiento de las neuronas
Nurr1	Involucrado en el mantenimiento, regula la expresión de TH, Vmat2 y DAT
$\beta$ III-tubulina	Marcador general de neurona
Ptx3	Induce la expresión de TH, involucrado en la diferenciación terminal de las neuronas nDAm
TH	Enzima limitante en la biosíntesis de dopamina, identidad neuronal
DAT	Enzima transportadora de dopamina, especifica el linaje

(10, 26)

Para la diferenciación dopaminérgica se describen las siguientes etapas principales: 1) Determinación del mesencéfalo (especificación del istmo) e inducción del fenotipo mediante la interacción de las señales de Fgf8, Shh y Wnt1. 2) Ventralización (expresión de marcadores de PP, Shh, FoxA2) e inhibición de otros destinos celulares (Nkx2.2 y Nkx6.1). 3) Promoción de la neuralización; y, 4) Especificación del fenotipo dopaminérgico y sobrevivencia (Fig. 5) (27, 28).

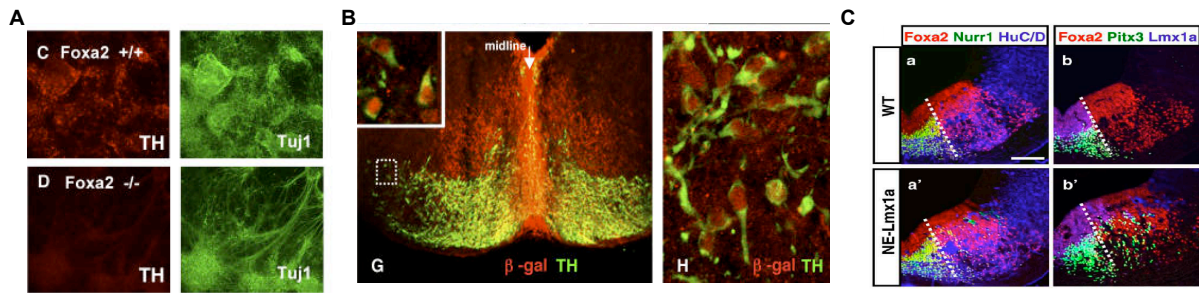


**Figura 5. Proceso de diferenciación de las nDAm.** A) Diagrama del tubo neural donde se especifican las regiones del mesencéfalo, denotando las zonas de las distintas etapas de la diferenciación de las nDAm, los colores refieren a las etapas para describir A y B. B) Diagrama que ilustra como se desglosan las diferentes etapas de la diferenciación dopaminérgica. Inducción (verde), ventralización (azul), inhibición de otros destinos (naranja), neuralización (amarillo), especificación del linaje y supervivencia (morado). Se incluye la red entre los factores y genes involucrados en cada etapa de la diferenciación (28).

Durante la diferenciación a nDAm, las células expresan Shh y FoxA2 característico del centro organizador de la PP, es importante mencionar que la adquisición de identidad de PP es exclusiva y necesaria durante la diferenciación a nDAm. Se ha reportado la co-expresión del factor de transcripción Lmx1a con otras moléculas que se han caracterizado como marcadores de placa de piso como Shh, Foxa2 y FP4 durante la diferenciación neural dopaminérgica (12).

Experimentalmente se ha demostrado que las nDAm adquieren identidad de PP; en explantes de mesencéfalo de embriones nulos para el gen *Foxa2*<sup>-/-</sup>, no se observaron células positivas para TH y por ende neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, sí se identificaron células que expresan βIII-Tubulina demostrando que hay diferenciación neuronal, es decir, neuralización pero no especialización en estos explantes (Fig. 6A); (2). Por otro lado, Kittappa *et al.*, realizaron un análisis de linaje neural empleando el sistema CRE-LoxP, es decir, limitaron la expresión de la proteína CRE recombinasa bajo el promotor de *shh* y verificaron por colorimetría la expresión de Shh con un plásmido reportero que expresa a la proteína β-galactosidasa al eliminarse un codón escindido por los sitios LoxP, demostrando que las células TH<sup>+</sup> expresan al marcador de PP Shh (2); (Fig. 6B).

Además, durante la especificación del linaje dopaminérgico del mesencéfalo se observa que Lmx1a es capaz de reprimir la expresión de genes de diferenciación celular a otros linajes (motoneuronas) a través de Msx1, siempre y cuando se exprese FoxA2, sugiriendo que es necesaria la expresión coordinada de ambos genes Lmx1a y FoxA2, durante la especificación dopaminérgica (Fig. 6C); (13)



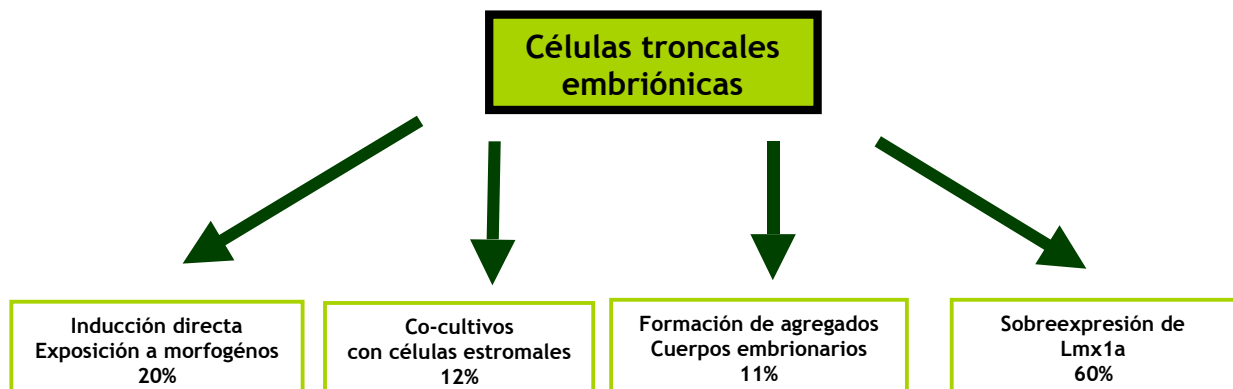
**Figura 6. Identidad de placa de piso durante la diferenciación dopaminérgica.** A) Explantes de mesencéfalo donde se muestra que la producción de nDAM se elimina en ratones nulos para FoxA2 (marcador de PP). B) Corte sagital de mesencéfalo de 12.5 dpc, co-localización de la expresión de  $\beta$ -Gal (dirigida por Shh) y TH. A la derecha un acercamiento de la colocalización en las células. C) Corte sagital de mesencéfalos de 12.5 dpc, se muestran explantes silvestres (wt) y explantes que sobreexpresan Lmx1a (NE-Lmx1a), se observa que fuera del contexto de expresión de FoxA2 la expresión de Lmx1a no es suficiente para generar nDAM que se determinan por la expresión de Pitx3. FoxA2, marcador de PP; TH, tirsoina hidroxilasa marcador de nDAM; Tuj1 ( $\beta$ III-tubulina), marcador de neuronas;  $\beta$ -Gal,  $\beta$ -Galactosidasa reportero; Lmx1a, marcador de linaje dopaminérgico; Nurr1, marcador de neuronas; Pitx3, marcador de nDAM (2, 12, 13).

## Células troncales embrionarias

Las células troncales embrionarias (CTE) se derivan de la masa celular interna de los blastocistos y tienen la capacidad de adquirir todas las identidades celulares presentes en los tejidos del embrión, es decir, son pluripotentes (29). Debido a su plasticidad, las CTEs se han diferenciado *in vitro* a linajes celulares con el objetivo de entender los mecanismos del desarrollo celular mediante la manipulación de señales extrínsecas para favorecer la obtención de células de interés clínico (30).

Actualmente, una importante línea de investigación en el área de células troncales es la obtención de linajes neuronales específicos a partir de las CTEs, particularmente tipos neuronales afectados en procesos neurodegenerativos. Existen un gran número de estudios dirigidos a la diferenciación de las CTEs a nDA. Se han utilizado diferentes estrategias de diferenciación para obtener nDA maduras (Fig. 7).

La diferenciación *in vitro* a nDAM arroja datos que posibilitan la manipulación de las señales involucradas en regular el proceso de la diferenciación, lo que podría permitir en un futuro el uso de las CTEs en terapias de reemplazo celular. Células diferenciadas a partir de CTEs son consideradas como una fuente potencial para estas terapias en enfermedades como: la EP, el Alzheimer, la diabetes, entre otras. Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento lo suficientemente exitoso que justifique su utilización clínica.



**Figura 7. Eficiencia de diferentes estrategias de diferenciación *in vitro* a nDA.** Estrategias de diferenciación *in vitro* de CTEs a nDA con los porcentajes de diferenciación que se obtiene en cada uno.

Para la obtención de nDA se han reportado varias estrategias como en la que se forman agregados celulares conocidos como cuerpos embrioides (CE) que se cultivan en medios condicionados con factores como Shh, Fgf8 y Fgf2, ya sea de manera individual o en combinación. Además, se han sobreexpresado factores involucrados en la diferenciación como: Ngn2, Lmx1a, Msx1, Ptx3 al dirigir su expresión con promotores como Nestina (31, 32), entre otras estrategias (Fig. 7).

Sin embargo, la eficiencia de la mayoría de las estrategias de generación de nDA *in vitro* a partir de las CTEs ha sido baja (menos de 20%) respecto a neuronas totales,  $\beta$ III-Tubulina<sup>+</sup> (33). Algunas estrategias han logrado eficiencias por arriba del 50%, como la que se logró expresando Lmx1a ectópicamente bajo el control del promotor de Nestina (marcadora neural) en cultivo de monocapa, obteniendo una eficiencia del 60% de células que co-expresaban Lmx1a, TH, Nurr1 y Ptx3 confirmando la diferenciación al linaje dopaminérgico mesencefálico (34).

## Antecedentes

### I. Vía de Sonic Hedgehog

Durante el desarrollo embrionario, todas las células contienen el mismo material genético pero difieren en la temporalidad y la naturaleza de los genes expresados diferenciando a diversos tipos celulares hasta generar un organismo complejo. La actividad de las vías de señalización depende en gran medida de la acción de factores secretados, dentro de los cuales se incluyen miembros de las familias de Hedgehog (Hh), Wnt, Notch, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ).

En el desarrollo embrionario, la vía de señalización activada por Shh es muy importante debido a que, en su función como morfógeno, especifica patrones de expresión de genes y determina procesos como la proliferación y la diferenciación celular (35). Por otro lado, en el adulto el mal funcionamiento o la regulación anormal de esta vía se han asociado con la formación de tumores (36, 37).

A nivel embrionario, Shh se difunde desde su sitio de secreción a diferentes regiones del tejido generando un gradiente de concentración a lo largo de su eje de expresión. El establecimiento del gradiente depende de: 1) la producción y difusión de Shh, 2) a la interpretación de la señal extracelular (presencia de Shh) a intracelular, y 3) la regulación de la expresión genética. El gradiente de Shh mediante la regulación de la expresión de factores transcripcionales delimita espacialmente a los nichos neurogénicos (nDA, motoneuronas) a lo largo del eje dorso-ventral en el tubo neural.



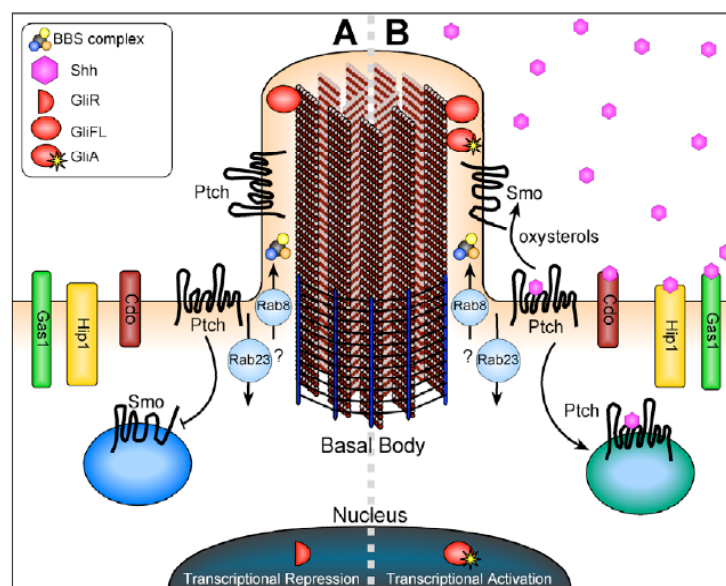
La proteína Shh requiere de una serie de modificaciones post-traduccionales para su activación. Inicialmente el precursor de Shh se procesa de manera auto-proteolítica, seguida por modificaciones lipídicas covalentes en sus extremos carboxilo (C) y amino (N) terminal con colesterol y ácido palmítico respectivamente, para finalmente secretarse de forma activada a la matriz extracelular.

La difusión de Shh se regula por diferentes proteínas extracelulares y transmembranales que se pueden clasificar en: a) proteínas activadas por acción de Shh como Ptch1 y Hhip1; y, b) proteínas que intensifican la señal de Shh como Cdo, Boc y Gas1 (Fig. 8).

La interpretación de la señal extracelular a intracelular se basa en la activación de la proteína transmembranal Smo a través de la presencia de Shh. Smo presenta diferentes conformaciones que le permiten conjugarse con pequeñas moléculas que agonizan o antagonizan su actividad como la molécula SAG (35).

Recientemente, se observó que la vía de señalización de Shh sucede en el cilio primario, el cual, funciona como estructura de anclaje para las proteínas Ptch1 y Smo. En ausencia de Shh la proteína transmembranal Ptch1 se encuentra anclada al cilio primario reprimiendo la acción de Smo, mientras que en presencia de Shh este se une a su receptor Ptch1 y desreprime así a Smo permitiendo que se inicie una cascada transcripcional (Fig. 8).

Finalmente, la vía de señalización de Shh regula la actividad de factores transcripcionales de la familia Gli, mediante inhibición y activación de genes represores y activadores de esta familia (Fig. 8). Gli1 y Gli2 funcionan como activadores transcripcionales, por su parte Gli3 presenta una función dual, por un lado participa en la activación génica, sin embargo, durante su traducción puede ser procesado generando un Gli3 que funciona como represor (38).



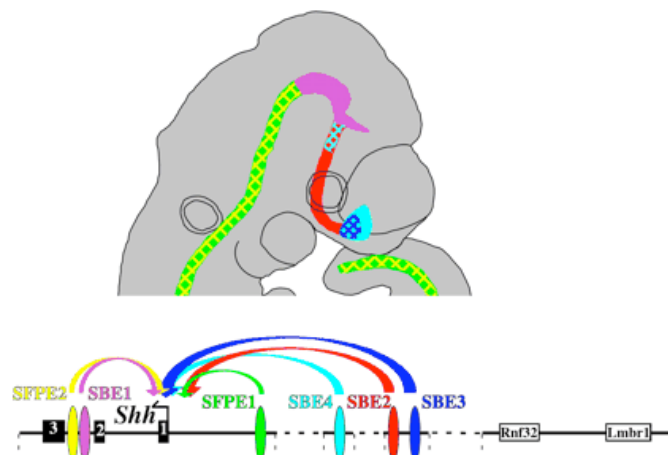
**Figura 8. Modelo de la vía de Sonic hedgehog en ausencia (A) y en presencia de Shh (B).** A) En ausencia de shh, Ptch se localiza en el cilio primario e inhibe a la proteína Smo, Gli3 (GliR-Represor) se encuentra en su forma represora en el núcleo. B) En presencia de Shh, este se une a la proteína Ptch, que se desprende del cilio, permitiendo que Smo se localice en el cilio, esto permite la activación de las proteínas Gli (GliA-Activados) que traslocaran al núcleo. Las proteínas de unión Cdo, Hip1 y Gas1 controlan el nivel de respuesta a la concentración de Shh mientras que las proteínas Rab (Rab8 y Rab239) se han propuesto como las responsables en el tráfico al cilio (39).

## II. Regulación transcripcional del gen *shh*

La transcripción del gen *shh* se controla por diferentes secuencias regulatorias que dirigen la expresión de Shh a regiones definidas en el organismo: cerebro y extremidades. De manera específica, en el sistema nervioso central (SNC), la transcripción de *shh* se dirige por al menos 6 potenciadores (enhancers): SFPE1/2 (Sonic hedgehog Floor Plate Enhancers) y SBE1/2/3/4 (Sonic hedgehog Brain Enhancer) generando diferentes patrones de expresión de Shh a lo largo de la PP del tubo neural (1).

Los potenciadores SBEs dirigen la expresión a diferentes regiones del cerebro que corresponden desde el istmo hacia la parte rostral del tubo neural mientras que ambos potenciadores SFPE1s dirigen la expresión del istmo hacia las regiones caudales del tubo neural (Fig. 9).

Para este proyecto utilizamos los siguientes potenciadores: SBE1 que dirige la expresión de Shh a la zona del mesencéfalo que constituye el nicho de las nDA y SFPE1 que dirige la expresión de Shh a regiones caudales donde no se presenta capacidad neurogénica en la PP.



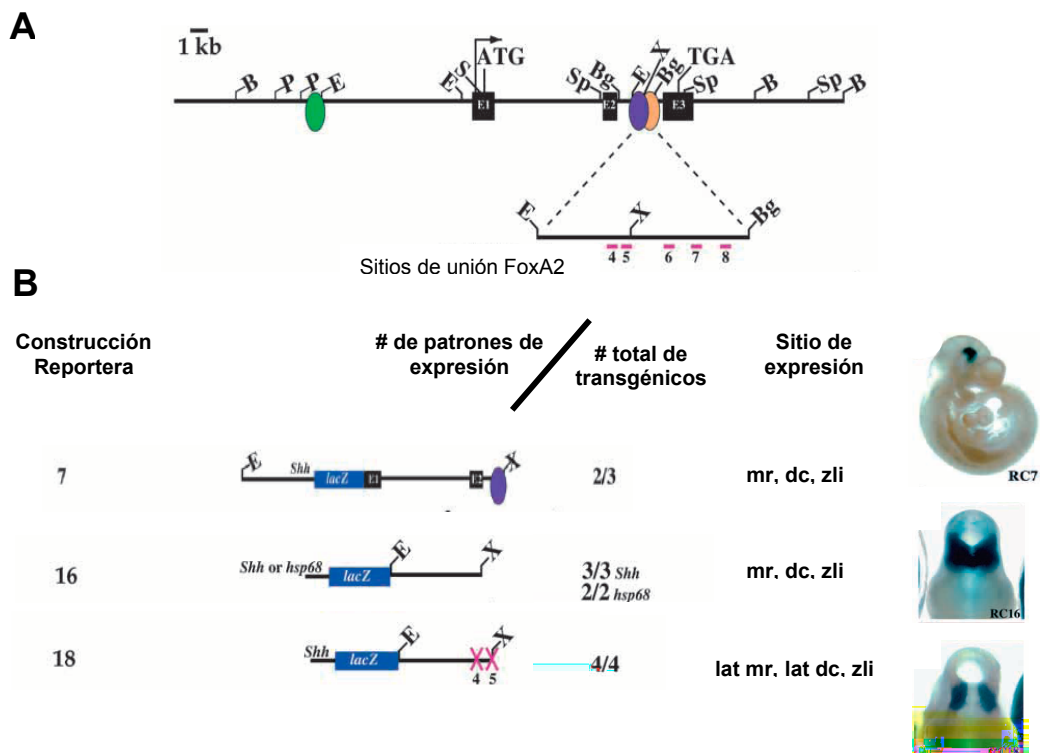
**Figura 9. Vista esquemática de la expresión de la expresión de Shh por múltiples potenciadores en el SNC.** En la parte superior se observa una imagen del tubo neural en el ratón, los colores indican la región de expresión de Shh dirigida por las secuencias regulatorias: Shh Floor Plate Enhancer 1 y 2 (SFPE1 y SFPE2) y Shh Brain Enhancer 1-4 (SBE1-4). En la parte inferior, se muestra un mapa genómico del locus de *shh*, los cuadros negros refieren a los exones y los colores a la región de los potenciadores cuya expresión se regionaliza en la parte superior.

El inductor SBE1 está constituido por 532 pb, se localiza río abajo del sitio de inicio de la transcripción de *shh* dentro del segundo intrón del gen y se encuentra adyacente al inductor SFPE2 (que genera un patrón de expresión igual a SFPE1 y contiene a los dominios 6, 7 y 8 de unión a FoxA2).



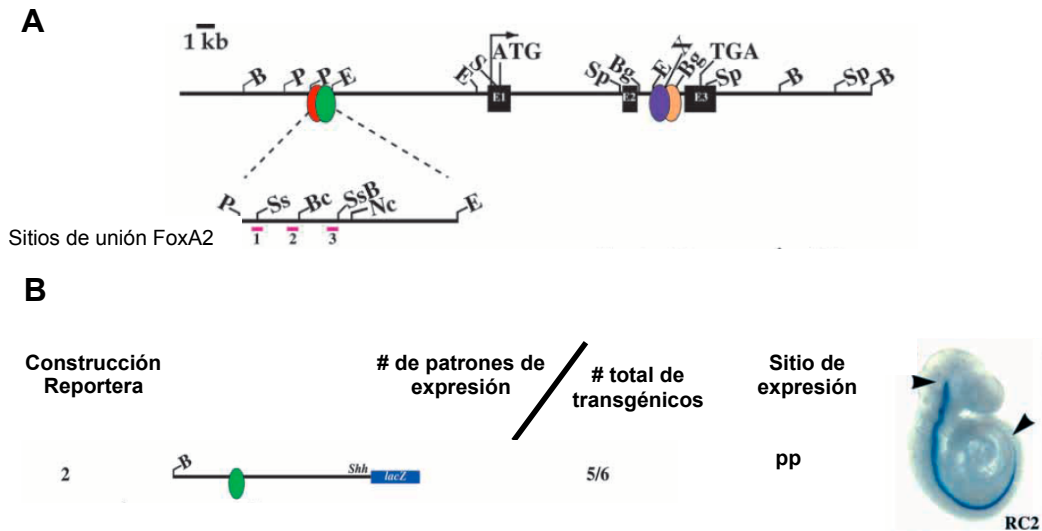
SBE1 dirige la expresión de *Shh* a la PP del mesencéfalo y de la región caudal del diencefalo (Fig. 9, 10). En su secuencia solo se encuentran los dominios 4 y 5 de unión al factor de transcripción FoxA2 (HNF3). La acción del inductor SBE1 depende de FoxA2 ya que al mutar los dos dominios de reconocimiento contenidos en la secuencia regulatoria se perdió la actividad del inductor y la expresión de *Shh* de la zona ventral del mesencéfalo (40); (Fig.10).

El inductor SFPE1 está constituido por 1.1 kb, se localiza 8 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *shh*, y dirige la expresión de *Shh* a la PP desde el istmo hacia toda la región caudal del tubo neural (Fig. 9, 11).



**Figura 10.** Mapa esquemático del locus del gen *shh* para el inductor SBE1. A) Esquema del locus de *shh* donde se observan 3 potenciadores representados por círculos de colores (Verde, SFPE1; Lila, SBE1; Naranja, SFPE2) y algunos sitios de restricción importantes. Además, se observa una amplificación de la región de los potenciadores SBE1 y SFPE2 en el segundo intrón donde se muestran los dominios de unión a FoxA2 (HNF3) del 4 al 8. B) Esquema de las construcciones 7, 16 y 18 con sus respectivos patrones de expresión de *Shh*. La construcción 7, contiene al inductor SBE1 y al promotor de *shh* acoplado al reportero lacZ, se muestra el patrón de expresión generado en un ratón transgénico generado con esta construcción. Las construcciones 16 y 18, muestran la dependencia del inductor SBE1; la construcción 16 contiene a los sitios de unión 4 y 5 y se muestra la expresión de *Shh* en la PP. En la construcción 18 los sitios de unión 4 y 5 fueron modificados y se observa que la expresión de *Shh* en la PP fue eliminada. B, *Bam*HI; Bg, *Bg*II; E, *Eco*RI; P, *Pst*I; S, *Sac*II; Sp, *Spe*I; X, *Xho*I; mr, mesencéfalo rostral; dc, diencefalo caudal; zli, zona limitante intraláminica; lat, lateral; todas las imágenes de la derecha son de ratón 10.5 dpc. Modificado Epstein 1999<sup>(40)</sup>.

SFPE1 se encuentra adyacente al inductor que regionaliza la expresión de *Shh* a la notocorda (SNE) y dentro su secuencia se encuentran tres dominios (1, 2 y 3) de unión al factor de transcripción FoxA2 (HNF3). La actividad de SFPE1 es independiente a FoxA2 ya que al mutar los 3 dominios de reconocimiento se mantuvo intacta la expresión de *Shh* en la PP en las regiones correspondientes al inductor (40); (Fig. 11).



**Figura 11.** Mapa esquemático del locus de *shh* del inductor SFPE1. A) Esquema del locus *shh* donde se observan 4 potenciadores representados por círculos de colores (Verde, SFPE1; Lila, SBE1; Naranja, SFPE2; Rojo, SNE) y algunos sitios de restricción importantes, las cajas negras son los exones. Se muestra una amplificación de la región río arriba al promotor donde se encuentran los potenciadores SFPE1 y SNE, además se muestran los dominios de unión a FoxA2 del 1 al 3 que se encuentran dentro del inductor. B) Esquema de la construcción 2 que contiene al inductor SFPE1 y el patrón de expresión de *shh* que genera en un ratón de 10.5 dpc. B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; P, *Pst*I; S, *Sac*II; Sp, *Spe*I; X, *Xho*I; PP, placa de piso. Modificada Epstein 1999<sup>(40)</sup>.

## 2. Reporteros genéticos: luminiscencia y fluorescencia

En la actualidad, los sistemas de proteínas reporteras son una estrategia muy utilizada para el estudio de la expresión génica y su regulación tanto en procariotes como en eucariotes, su uso más frecuente es como indicador de la actividad transcripcional de diferentes genes de interés. Esta estrategia involucra, la fusión de un gen reportero al promotor del gen a caracterizar dentro de un vector de expresión que se transfecta en células, las cuales se monitorean en ensayos que permiten observar directamente la presencia del reportero o medir la actividad catalítica del mismo.

Los sistemas reporteros genéticos basados en la producción de fotones son los más comunes: fluorescencia y luminiscencia. En ambos casos, los fotones son consecuencia de la energía en transición de un electrón en estado excitado a un orbital de menor energía. La diferencia entre estos sistemas es la forma de adquisición de energía para la excitación y por ende la emisión del fotón. En fluorescencia esta energía se obtiene por fotones de excitación mientras que en luminiscencia se genera por una reacción oxidativa (41).

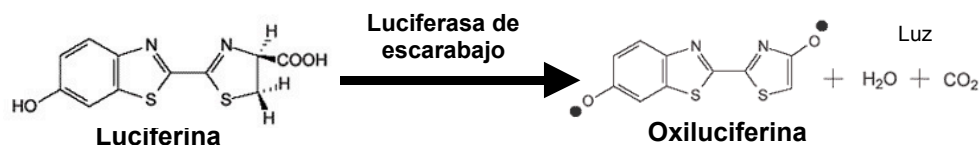
En fluorescencia se presenta un elevado flujo de fotones, generado a partir de la iluminación que se utiliza para excitar al fluoróforo y la luz de emisión obtenida del mismo. Es por ello, que se requiere de la utilización de filtros para distinguir entre los fotones de excitación y los de emisión, además de la señal inespecífica que se genera en las muestras biológicas debido a la presencia de compuestos que fluorescen (autofluorescencia), estas características interfieren en la cuantificación de los resultados. Por otro lado, debido a la estabilidad de las proteínas fluorescentes, estas no son muy utilizadas para el monitoreo de la dinámica transcripcional de genes. Actualmente, la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés "Green Fluorescent Protein") se ha modificado en sus extremos terminales generando una proteína con una vida media más corta permitiendo su utilización para el análisis de procesos dinámicos (41).

Por su parte, en los ensayos transcripcionales a base de la luminiscencia no se requiere la introducción de fotones a la muestra, por lo tanto, no requiere de filtros, además de que la poca señal inespecífica y su posible discriminación permite la cuantificación de la señal mediante el conteo de fotones. El bajo flujo de fotones en los ensayos de bioluminiscencia permite que éstos se lleven a cabo durante largos periodos de tiempo sin daño a los cultivos celulares y sin la generación de condiciones de estrés para las células que las lleven a la muerte (41).

Las enzimas bioluminiscentes son una herramienta muy utilizada funcionando como reporteras de la expresión de un gen, ya que permiten analizar la función de elementos genéticos que actúan en *cis* como lo son los promotores y los potenciadores. Se han estudiado modificaciones en el promotor y en la expresión transcripcional, acoplado el gen de la enzima como reportero a secuencias específicas a analizar.

La intensidad de la luz generada en bioluminiscencia depende de la concentración de los reactantes, por lo que todos los componentes para la reacción se encuentran en exceso excepto la enzima que se encuentra acoplada al promotor del gen que se está analizando. De tal forma que la señal que se observa depende exclusivamente de la actividad de las secuencias regulatorias derivadas del gen de interés y que se han acoplado al gen reportero, por ejemplo luciferasa.

El gen *luc* codifica a la enzima luciferasa de escarabajo, para formar un monómero de 62kDa que no se modifica post-traduccionalmente. La reacción enzimática de la luciferasa de escarabajo se lleva a cabo en dos pasos: 1) Activación del carboxilato de luciferil por acción del ATP, 2) el intermediario reacciona con el oxígeno para generar dos productos oxidados, oxiluciferina y CO<sub>2</sub> (Fig. 12).



**Figura 12. Reacción enzimática de luciferasa de escarabajo.** Reacción de oxidación catalizada por la enzima luciferasa de escarabajo sobre su sustrato luciferina produciendo oxiluciferina y luz.

Para los ensayos bioluminiscentes, se mide primero la actividad de la luciferasa de escarabajo agregando el sustrato luciferina al lisado, posteriormente se añade el sustrato para la luciferasa renilla (coelenterazina, anexo 2) mientras se apaga la actividad de la primera enzima y se mide la actividad de la segunda reacción enzimática. La cantidad de luz generada en la reacción se mide en un luminómetro, ya sea manual o de placas, la luz emitida se mide y se expresa un valor asignado en unidades relativas de luz (URL). Estos ensayos son poblacionales ya que determinan la actividad bioluminiscente de tejidos o cultivos celulares lisados.

Clásicamente, la actividad transcripcional se ha estudiado en poblaciones celulares y en tiempos definidos de los procesos celulares (diferenciación, muerte, proliferación, etc.) en un momento determinado del mismo. A partir de estos estudios se proporcionan datos que representan promedios de cambios en la respuesta transcripcional en rango de tiempo específicos. Algunas técnicas utilizadas son: inmunohistoquímicas, RT-PCRs, northern blot, qPCR e hibridaciones *in situ* (42). Las cinéticas han sido una forma de establecer secuencias de sucesos; sin embargo, se siguen evaluando eventos particulares dentro de un proceso continuo.

Por otro lado, el acoplamiento de la microscopía con los ensayos bioluminiscentes permite estudiar la actividad enzimática de la proteína reportera usando un microscopio acoplado a una cámara capaz de captar los fotones generados en la reacción. Esto representa una gran ventaja ya que de esta manera podemos no solo observar poblaciones sino también determinar la actividad en células individuales. Para ello, se analizan con softwares especializados la dinámica de la expresión durante el cultivo de tejido o células.

El análisis de la transcripción con genes reporteros ha sugerido que la expresión de genes no siempre es constante, sino más bien que puede ser variable o en pulsos (41-43). En estos ensayos se ha utilizado la luciferasa como reportero dinámico para evaluar en tiempo real patrones transcripcionales en células individuales, cultivos celulares y de tejido. Por ejemplo, se logró monitorear la actividad transcripcional del promotor del gen de la hormona prolactina (PRL) en tiempo-real. Con el estudio dinámico se determinó que la expresión de la PRL es en pulsos en líneas de células lactotróficas (44, 45) en cultivos primarios (44). En ratas transgénicas generadas bajo la regulación del locus del gen PRL de humano (hPRL-Luc49) se detectó luminiscencia en la periferia de la pituitaria adulta donde se encuentran las células lactotóxicas activas, además se observó que la transcripción de la PRL se presenta en pulsos durante etapas tempranas del desarrollo (17.5 dpc) y que el patrón de expresión se vuelve constante en etapas más desarrolladas (19.5 dpc y pituitarias de 1.5 pN); (44).

## Justificación

Debido a la importancia de la expresión de Shh durante la diferenciación a nDAm, se considera la utilización de reporteros dinámicos como estrategia para el análisis a nivel poblacional (ensayos de bioluminiscencia) y de célula única (microscopio) de la actividad transcripcional del gen *shh* durante el proceso de diferenciación de las nDAm. Para esto, se deben generar herramientas (plásmidos) que acoplan la luciferasa de escarabajo como reportero dinámico a elementos regulatorios (potenciador/promotor) de *shh*.

# Hipótesis

El sistema reportero luciferasa puede aplicarse para la caracterización espacio-temporal de la expresión del morfógeno sonic hedgehog durante el proceso de diferenciación a neuronas dopaminérgicas.

## Objetivo General

Analizar la expresión espacio-temporal de sonic hedgehog de manera dinámica en el proceso de diferenciación dopaminérgica.

## Objetivos Particulares

1. Obtener los fragmentos individuales (promotor, potenciadores, gen de selección, Gen reportero) para construir los plásmidos para el estudio dinámico que nos permitirán caracterizar la expresión de Shh. Los vectores son:

- Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (Shh),
- Sbe1-LucR-PGKNeo-InsMAF (inductor SB)
- Sbe1-shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SBShh)
- Sfpe1-LucR-PGKNeo-InsMAF (inductor SFP)
- Sfpe1-shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SFPShh)

2. Analizar la actividad de los elementos potenciador/promotor de *shh* contenidos en los plásmidos construidos en células HEK293T mediante ensayos de la actividad de luciferasa en luminómetro.

3. Establecer y optimizar el protocolo para el monitoreo de la bioluminiscencia en células individuales durante periodos prolongados de cultivo en el microscopio.

4. Analizar el dinamismo espacio-temporal de la actividad de los elementos promotor/inductor derivados del gen de *shh* en cultivos primarios aislados de diversas regiones de cerebro de embriones mediante ensayos de la actividad de luciferasa en luminómetro.

5. Analizar la actividad espacio-temporal de los elementos promotor/inductor derivados del gen de *shh* en un modelo *in vitro* de diferenciación de CTEs a nDA.

# Materiales y Métodos

## Manipulación de células HEK293T

### a. Cultivo de células HEK293T

Para el cultivo de HEK293T se descongela un vial y se cultivan sobre cajas de 100 cm<sup>3</sup>. El medio debe cambiarse cada dos días, si se acidifica (color anaranjado-amarillo) indica que hay muchas células y es necesario cambiar el medio y sub-cultivar.

Las células se deben sub-cultivar antes de que lleguen a confluencia, por ello es necesario monitorearlas diariamente. La densidad del sub-cultivo depende de para que se utilizará, pero se recomienda siempre sembrar a bajas densidades para conservar la morfología y el estado pluripotente de las células. El medio para estas células requiere 7% de SFB y no requiere de aminoácidos esenciales.

## Manipulación de células troncales embrionarias (CTEs)

### b. Cultivo de CTEs

Para el cultivo de CTEs se descongela un vial y se cultivan sobre cajas con monocapa de células feeders en medio M15. El medio debe cambiarse diariamente, si se acidifica (color anaranjado-amarillo) indica que hay muchas células y es necesario cambiar el medio y sub-cultivar.

Las células se deben sub-cultivar antes de que lleguen a confluencia, por ello es necesario monitorearlas diariamente. Antes de sub-cultivar el medio se debe cambiar de 2 a 3 h antes para mejorar la viabilidad en el pase. La densidad del sub-cultivo depende de para que se utilizará, pero se recomienda siempre sembrar a bajas densidades para conservar la morfología y el estado pluripotente de las células.

### c. Formación de cuerpos embrionarios (CEs)

Para la formación de CEs, se sub-cultivan CTEs en una caja previamente gelatinizada sin feeders con medio M15 suplementado con 1000 U/mL de LIF (10 $\mu$ L por cada mL). Las células se cultivan durante 3-4 días para aumentar la población de CTEs, el medio debe cambiarse diariamente. Posteriormente, se aspira el medio y se lava dos veces con PBS 1X para luego tripsinizar las células, contarlas y resuspenderlas para sembrar 2x10<sup>6</sup> células en cajas bacteriológicas de 10 cm con 10 mL de medio M15. Este cultivo se mantiene durante 4 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% aire atmosférico y el medio se cambia cada 2 días. Para el cambio de medio de los CEs, estos se transfieren a un tubo Falcón de 50 mL usando una pipeta de 25 ml, se dejan sedimentar durante 5 min en la campana de flujo, luego se aspira el medio y se resuspenden los CEs en 10 mL de M15 para finalmente transferirlos a una caja bacteriológica nueva.

#### **d. Protocolo de 5 pasos para diferenciar las CTEs a neuronas dopaminérgicas**

**Paso 1:** Expansión de las células troncales embrionarias (Ver inciso h, protocolos)

**Paso 2:** Formación de cuerpos embrionarios (Ver inciso i, protocolos)

**Paso 3:** Selección de células precursoras neurales:

Los CEs se transfieren a un tubo de 15 mL con una pipeta de 25 mL, se permite que sedimenten, se aspira el medio y se añaden 10 mL de M15. Luego, se transfieren a una caja de 10 cm previamente gelatinizada y se incuban 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>/95% aire atmosférico, permitiendo que se adhieran al plato de cultivo. Después, se cambia el medio M15 por medio ITSFn y se cultivan durante 7 días cambiando el medio cada dos días.

**Paso 4:** Expansión de células precursoras neurales:

Para esta etapa anticipadamente se deben preparar cajas de 24 multipozos, se cubren los pozos con 0.5 mL de Poli-D-Lisina, se incuban las cajas de 1h hasta toda la noche a 37° C. Luego, se lavan los pozos 2 veces con PBS 1X y se cubren con 0.5 mL de PBS desde 1 h hasta toda la noche a 37° C.

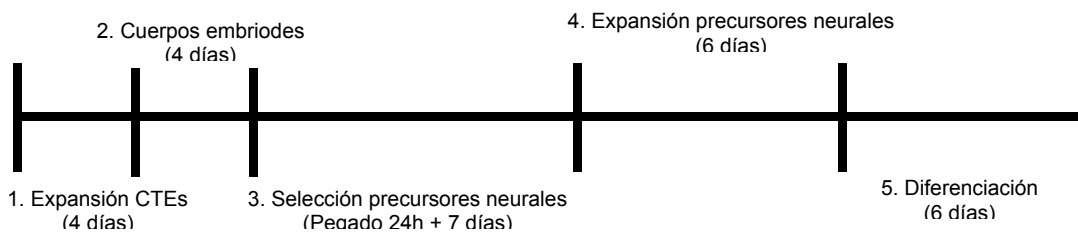
Posteriormente, se lavan 1 vez con PBS 1X, se cubren con 0.5 ml de fibronectina 1µg/ml y se incuban a 37°C al menos durante 2 h. Finalmente, se lavan los pozos 1 vez con PBS 1X antes de usarse. Las cajas pueden mantenerse a 4°C en PBS hasta por 1 semana.

Para la expansión de precursores se aspira el medio ITSFn y se lava 2 veces con PBS 1X. Se tripsinizan las células y se incuban por 5 min a 37° C, la tripsina se inactiva con medio M15, la solución celular se transfiere a un tubo donde se permite que sedimenten los agregados, se toma el sobrenadante y se disocia manualmente para luego centrifugar a 1000 rpm durante 4 min.

Después, se aspira el medio, las células se resuspenden en medio de expansión sin factores y se cuentan. Finalmente se siembran de 3 a 4 x 10<sup>5</sup> células por pozo en las cajas pre-tratadas de 24 pozos, se agregan los factores de crecimiento a la siguiente concentración final: Fgf2 (10 ng/ml), Fgf8 (100 ng/ml), Shh (500 ng/ml) y ajustando el volumen a 500 µl por pozo. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Durante esta etapa se cambia el medio de expansión y los factores de crecimiento al tercer día y luego cada vez que se acidifique el medio (se torne anaranjado-amarillo) hasta el sexto día.

**Paso 5:** Diferenciación de las células precursores neurales a neuronas dopaminérgicas: Cambiar el medio de expansión por medio de diferenciación e incubar las células a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>/95% aire atmosférico por otros 6 días, cambiando el medio de diferenciación cada dos días.

En la fig. 13 se esquematiza este protocolo de diferenciación.



**Figura 13. Esquema del protocolo de diferenciación a nDA en 5 pasos.** Se desglosan las etapas y la duración de las mismas.

### **e. Cultivo de células primarias ventrales y dorsales**

Se preparan previamente cajas con Poli-D-Lisina/Laminina, las cajas se cubren con poli-D-Lisina (o poli-L-Ornitina) a una concentración de  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  y se dejan a temperatura ambiente en un periodo de 12-14h, posteriormente se lavan 2 veces con PBS 1X y se dejan 10 min en PBS 1X. Después se lavan una vez más con PBS y se cubren con laminina a una concentración de  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 12-14h. Finalmente se lavan con PBS 1X y están listas para usarse.

Estas células se derivan del mesencéfalo, telencéfalo o metencéfalo de embriones en la etapa de 10.5 días post coito (10.5 dpc). Para la disección se realizan cortes que limiten el área de interés. No se remueven las meninges para evitar que se maltraten los tejidos. La disección se realiza en medio DMEM/F12, el tejido se disgrega mediante pipeteo, se procede a realizar conteo celular y se siembran en cajas poli-D-Lisina/Laminina.

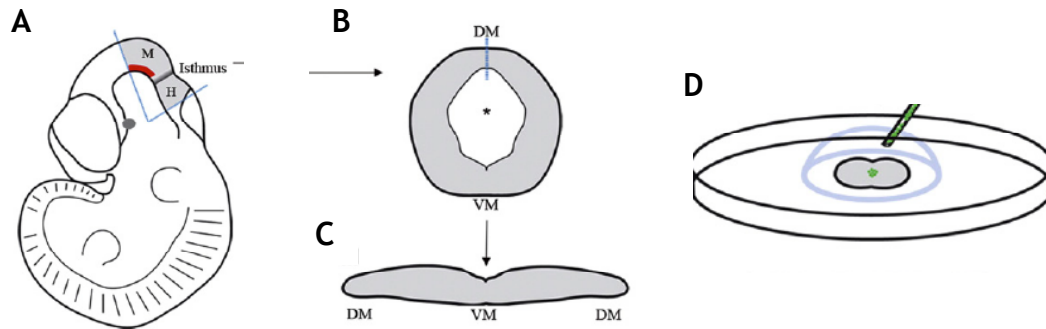
## **Cultivo y manipulación de explantes de mesencéfalo**

### **a. Explantes de mesencéfalo**

El mesencéfalo se disecciona de embriones de 10.5 días post coito (10.5 dpc). Para ello, se efectúan dos cortes (Ver Fig.11). No se remueven las meninges para evitar el maltrato del tejido. La disección de los mesencéfalos se realiza en medio DMEM/F12. Durante toda la disección los tejidos se mantienen en hielo.

El mesencéfalo se corta a lo largo de la línea media dorsal para cultivarlos en forma de “libro abierto” (Fig.18). Los tejidos deben abrirse conforme se van a cultivar ya que tienden a cerrarse perdiendo la forma. Con la ayuda de una punta azul con el extremo recortado, se transfieren los tejidos abiertos a una caja petri de 35 mm, depositando cada tejido en una pequeña gota de medio. Luego se colocan con la región ventricular de cada tejido hacia arriba, tratando de remover lo más posible volumen de medio. A cada tejido se agregan  $30\ \mu\text{L}$  de la mezcla de colágeno, se sumerge cuidadosamente el tejido en la gota de colágeno y se incuban durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$  en  $5\% \text{CO}_2/95\%$  aire atmosférico para permitir que el colágeno se polimerice completamente. Posteriormente, se cubren los explantes suavemente con 2 mL de medio Optimix y se incuban durante 7 días, cada 2 días se debe cambiar la mitad del medio.





**Figura 18. Procedimiento de cultivo de explante.** A) Representación de embrión de ratón de 10.5 dpc, el área del mesencéfalo se encuentra en gris, el área de neurogénesis dopaminérgica se marca en rojo. Las líneas azules denotan los cortes para escindir el tejido de interés. B) Vista frontal del mesencéfalo, la línea azul marca el corte en la línea dorsal a realizar para exponer la parte ventral del tejido. C) Explante de mesencéfalo en forma de "libro abierto". D) Explantes con la zona ventral expuesta, embebidos en gel de colágeno (forma azul). (Modificado de Baizabal y col., 2009<sup>(46)</sup>)

## Inmunocitoquímicas y transfección

### a. Inmunofluorescencia en cortes

Las laminillas se lavan 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos cada lavado, se utiliza un lápiz hidrofóbico para delimitar el área que contiene los cortes en la laminilla. Luego, se cubre la sección de interés con solución de bloqueo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se prepara el anticuerpo primario en solución de bloqueo para luego colocarlo en la sección de interés, se deja durante toda la noche a 4° C. Después, se lavan las laminillas de 3 a 4 veces con PBS 1X en lavados de 5 minutos. Además, se prepara el anticuerpo secundario en solución de bloqueo, se deja a temperatura ambiente durante 1 hora, al terminar se lavan las laminillas con PBS 1X durante 5 min. Finalmente, se montan las laminillas, usando PBS-glicerol (50%-50%), colocando un cubre-objetos encima y sellando con barniz transparente. Las laminillas se pueden guardar a 4° C, hasta observarse en el microscopio.

### b. Inmunofluorescencia en tejido completo ("Whole mount")

El tejido (fresco o explante) se debe fijar como se mencionó anteriormente. Luego, el tejido se incuba en PBS/Tritón X-100 1% a 4° C durante 24 h, deben realizarse 4 cambios en intervalos de 30 minutos. Para bloquear se incuba con suero de cabra 10%/PBS/Tritón X-100 1%, durante 3 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Posteriormente, se incuba el tejido con el anticuerpo primario durante 72 h a 4° C en PBS/Tritón X-100 1%/ Suero de cabra 10%.

Se lava con PBS/Tritón X-100 1% durante un día completo (24 h) a 4° C realizando por lo menos 4 cambios en intervalos de 30 minutos. Luego se incuba el tejido con el anticuerpo secundario durante 48 h en PBS/Tritón 1%/Suero de cabra 10% a 4° C. Posteriormente, se lava con PBS/tritón 1% durante un día completo (24h) a 4° C realizando al menos 4 cambios en intervalos de 30 minutos. Finalmente, se observa el tejido en un microscopio de epifluorescencia, con la longitud adecuada para detectar el anticuerpo secundario.

### c. Transfección de células

#### ❖ *Por CaCl<sub>2</sub>*

Sembrar las células, 24h antes de la transfección, a una densidad de  $35 \times 10^4$  por placa de 35 mm con 2mL de medio. A las 24h, se reduce el volumen de las placas a 1mL.

En un tubo Eppendorf de 1.5mL, se mezclan para cada muestra: 5  $\mu$ g de plásmido con agua grado cultivo en un volumen total de 43.5  $\mu$ L que se resuspende con la pipeta para homogenizar. Se añaden 6.25 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 2M que también se resuspende suavemente un par de veces con la pipeta. Se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se agregan 50 $\mu$ L de HBS 2X resuspendiendo muy suavemente una sola vez. El tubo se incuba en un baño maría a 37° C durante 2 min.

Finalmente se agrega la mezcla al cultivo mediante goteo y se agita delicadamente el cultivo. Los cultivos se incuban a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, cambiando la solución de transfección por medio fresco en 12-15 h.

#### ❖ *Lipotransfección*

Sembrar las células en cajas de 35 mm a 80-90% de confluencia. Se preparan los siguientes tubos:

- TUBO 1: 2-3 $\mu$ g de plásmido en 200  $\mu$ L de Optimem o DMEM + 1% de Glutamatax + 1% de piruvato
- TUBO 2: 3-6  $\mu$ L de lipofectamina 2000 en 200  $\mu$ L de Optimem o DMEM + 1% de Glutamatax + 1% de piruvato

Los contenidos de los dos tubos se mezclan suavemente, para dar un volumen final de 400  $\mu$ L y se incuban a temperatura ambiente durante 15-25 min. Luego, se agregan 600  $\mu$ L de medio, dando una solución de transfección con volumen total de 1mL. Las células se cambian a medio Optimem o DMEM + 1% de Glutamatax + 1% de piruvato. La solución de transfección se agrega a las células y se deja de 4-6 h a 37° C. El medio se cambia después de 18-24h.

#### ❖ *Electroporación*

Se colectan las células mediante tripsinización y se resuspenden a una densidad de  $1.1 \times 10^7$  células /mL

Se colocan 5 $\mu$ g de ADN en una celda de electroporación, luego se le adicionan 0.9ml de la suspensión celular y se mezcla suavemente con la pipeta, tomando la precaución de evitar la formación de burbujas en el líquido.

Se les da un pulso de 230V y 500  $\mu$ F a las células. Posteriormente, la solución se pasa a un tubo estéril de 50 mL, donde se adicionan 15 mL de medio M15 lentamente y se resuspenden las células uniformemente.

La suspensión se distribuye en 5 platos de 10 cm con células alimentadoras y al día siguiente se les cambia el medio. Para la selección se adiciona el antibiótico de selección durante al menos 11 días.

## Ensayo de luciferasa

Para los ensayos de actividad bioluminiscente en poblaciones celulares utilizando el luminómetro, los cultivos se transfectaron, se cambio de medio después de 14 h. Posteriormente, se adicionaba el agonista (Shh o SAG) y luego de 12 h se preparaba el lisado celular usando el buffer de lisis a una concentración de 1X, se retira el medio de cultivo y se lava con PBS 1X luego se agrega el buffer de lisis de manera que recubra a las células distribuyendo bien el medio, moviendo la placa de manera circular. Una vez obtenido lisado celular se coloca en hielo, se mezcla bien la suspensión usando vortex y se centrifuga a 12, 000 x g durante 15 s a temperatura ambiente, finalmente se toma el sobrenadante que puede ser almacenado a  $-70^{\circ}$  C.

Para el ensayo de luciferasa, se colocan 100 $\mu$ L de la solución de ensayo de luciferasa (Kit luciferase assay system, Promega) en tubos de luminómetro, preparando un tubo para cada muestra, luego se programa el luminómetro para una medición de 5 s y se mezclan 20  $\mu$ L de muestra por pipeteo. Se procede a hacer la medición.

## Biología molecular

### a. PCR (Del inglés "Polymerase Chain Reaction)

Para una reacción de PCR se mezclan lo siguiente: agua (19.4 $\mu$ L), Buffer + MgCl<sub>2</sub> 10X (2.5 $\mu$ L), dNTPs 10 mM (0.5 $\mu$ L), oligonucleotidos (0.5 $\mu$ L, se desglosan en la tabla 2) y enzima Taq polimerasa 5U (0.1 $\mu$ L).

Para las reacciones de PCR se utilizaron diferentes oligos que se desglosan en la tabla 2.

	Genes	Oligonucleótidos	Tm
1	RC14 (Sbe1-Sfpe2)	Sentido: TTC GAG GAT CCC TCC CAA ATG AGC AGC GGT AA Antisentido: TTG ACG AAT TCA CTG GCC CGG CGC AGA CT	68° C
2	RC6 (sfpe1)	Sentido: CTG CAG TTG CCT CTC GTT TAA CC Antisentido: CGA ATT CTT AGC TTA GTC TCC GCT T	65° C
3	T7 PRIMER T3 PRIMER	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG	

## Microscopía

### a. Fluorescencia

La captura de fotografías de fluorescencia se realizaron con el microscopio invertido Axio Observer Z1 (Zeiss) utilizando una cámara AxioCamMR3. Se utilizaron objetivos EC Plan-Neofluar de aire: 5X (AN =0.16), 10X (AN =0.3), 20X (AN =0.5). Las imágenes se procesaron mediante el programa AxioVision (Zeiss) e Image J (Anexo 4).

En la tabla 3 se desglosan los filtros utilizados.

Tabla 3. Lista de filtros usados en fluorescencia

Filtro	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Dapi	358	463
Alexa 488	493	520
Alexa 594	590	610
Rhodamina	551	573
Ioduro de propidio	538	617

### b. Luminiscencia

La captura de imágenes de luminiscencia se realizaron con el microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon) utilizando una cámara Ixon X3 (Andor Technology).

Para el cultivo de las células en el microscopio se utilizó una incubadora XL S1 de material polarizado. El sistema de incubación consiste en una unidad de calentamiento XL S, un módulo S de CO<sub>2</sub>, un modulador de temperatura S y una cubierta de calentamiento y CO<sub>2</sub> S, todos marca PECON.

Las células se cultivaron en placas de 35 mm con fondo de vidrio (17µm) de marca FluoroDish (FD35-100, World Precision Instruments). Para el cultivo de células HEK293T y AD293 no se requirió ningún tratamiento. Por otro lado, para las células de cultivos primarios se recubrieron las placas con el procedimiento desglosado en materiales y métodos.

Las imágenes se tomaron mediante el software Image J, los datos se analizaron usando el software Cell Profiler (Anexo 4).

En el anexo 8 se pueden encontrar soluciones y otros protocolos generales utilizados durante este proyecto de investigación.

# Resultados

## Construcción de plásmidos para el estudio dinámico de la expresión de Shh

Los elementos que constituyen a los plásmidos para el estudio dinámico son:

- ❖ **Potenciadores: SBE1 y SFPE1.** Estos elementos regulatorios dirigen la expresión de Shh a distintas regiones del tubo neural, al mesencéfalo y a regiones caudales respectivamente.
- ❖ **Promotor de *shh*.** Secuencia de DNA que contiene el sitio de inicio de la transcripción del gen *shh*.
- ❖ **Gen de Luciferasa Roja.** Secuencia de DNA que codifica para la enzima luciferasa roja del escarabajo *Pyrophorus plagiophthalmus* (emisión, 611 nm).
- ❖ **Aislantes (Insulators, INS).** Secuencias de DNA limitan la acción de un inductor a un promotor inhibiendo su interacción con otro, además, inhibe el mecanismo de silenciamiento.
- ❖ **PGK** (del inglés "Phosphoglycerate kinase", fosfoglicerato cinasa), es el promotor constitutivo de la enzima fosfoglicerato cinasa.
- ❖ **Gen de resistencia a neomicina (Neo).** Secuencia de DNA que codifica para neo, confiere resistencia a las células que contienen un plásmido insertado de manera estable en el genoma de las células.

La construcción de los plásmidos se llevó a cabo en dos etapas:

### 1. Obtención de los fragmentos individuales

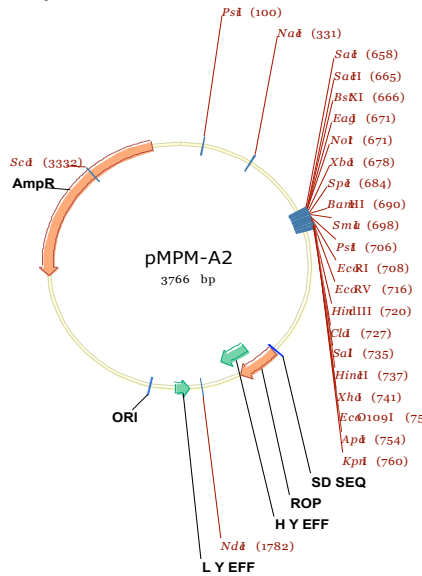
#### - Promotor Shh

El plásmido RC1 que contiene al promotor *shh* y los plásmidos RC14 y RC6 que contiene a los potenciadores (SBE1 y SFPE1 respectivamente) son una donación del Dr. Douglas J. Epstein del Departamento de Genética, de la Universidad de Pensilvania (40).

Primeramente, clonamos el promotor de *shh* en el plásmido pMPMA2 (Fig.14). Para ello, se escindió el promotor de *shh* (1100 pb) del plásmido RC1 (inserto) usando las enzimas XhoI y SpeI. Por otro lado, se digirió el plásmido pMPMA2 (vector), con una doble digestión utilizando las mismas enzimas (XhoI y SpeI).

Posteriormente se purificó el fragmento del vector y del inserto, para después ligar estos fragmentos. Transformamos bacterias DH5 $\alpha$  con los productos de

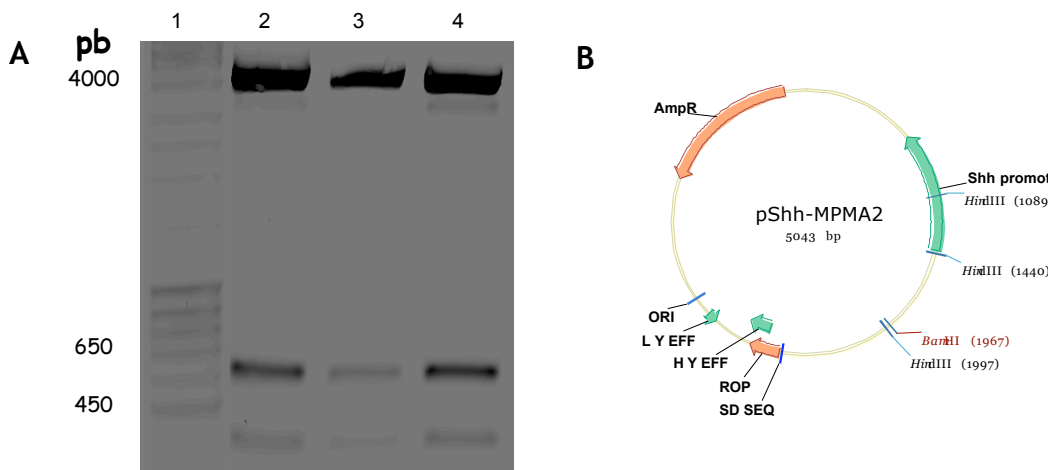
la ligación y utilizamos ampicilina como antibiótico de selección.



**Figura 14. Plásmido pMPMA2.** El plásmido pMPMA2 se utilizó como vector base para subclonar los fragmentos que constituyeron todas las construcciones obtenidas, además se utilizó como control negativo en nuestros ensayos de transfección.

La búsqueda de clonas positivas se realizó aleatoriamente de algunas colonias de la transformación, realizamos minipreps y digerimos el DNA plasmídico con la enzima HindIII.

El vector pMPMA2 con la inserción del promotor de *shh* presenta 3 sitios de restricción para la enzima HindIII generando un patrón de bandas de: 4135, 557 y 351 pb (Fig. 15). Se secuenciaron un par de muestras que presentaron dicho patrón de bandas corroborando que la inserción del promotor de *shh* en el plásmido pMPMA2 era correcta, esta construcción se nombró pShh-MPMA2 (Fig. 15).



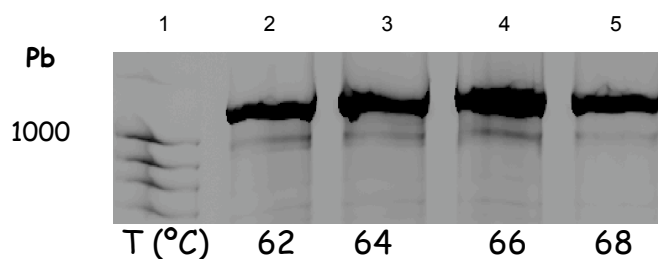
**Figura 15. Plásmido pShh-MPMA2.** A) Gel de agarosa para la digestión realizada con HindIII. Carril 1, marcador de peso molecular Mass Ruler. Carriles: 2-4: Patrón de bandas de la inserción del promotor Shh en el vector MPMA2 digerido con HindIII. B) Diagrama del plásmido pShh-MPMA2. Se observan los sitios que se utilizaron para evaluar la inserción del promotor mediante HindIII (Negro). Sitio único de BamHI (rojo).

## - Inductor SBE1

Los plásmidos RC14 y RC6, que contienen a los potenciadores SBE1 y SFPE1 respectivamente, se digirieron considerando los sitios de restricción proporcionados en la información enviada por el laboratorio donador. No pudimos obtener los potenciadores a partir de estas digestiones debido a que se observaron patrones de bandeado que no coincidieron con los esperados para los fragmentos de interés. Por ello, utilizamos diferentes estrategias para subclonarlos en el plásmido pMPMA2.

El plásmido RC14 contiene al elemento SBE1, como se menciona en la introducción este se encuentra adyacente al inductor SFPE2 por lo que decidimos subclonar ambos elementos en el plásmido pMPMA2. Para aislar los elementos SBE1/SFPE2 se diseñaron oligonucleótidos con sitios de restricción en sus extremos 5': BamHI y EcoRI (Tabla 2-Oligos #1). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó con la polimerasa termoestable Pfu Ultra de alta fidelidad, que se caracteriza por una tasa de error baja comparada con otras polimerasas.

Las condiciones para la reacción se establecieron con la temperatura de alineación (TM) calculada por el software "Vector NTI" considerando la secuencia primaria de los oligonucleótidos. Evaluamos la TM utilizando un gradiente de temperatura para optimizar la reacción y amplificar solo nuestro fragmento de interés. Se observó una banda con un peso de  $\approx 1283$  pb en un gel de agarosa al 2% que corresponde al peso molecular de los potenciadores SBE1/SFPE2 (Fig.16). Para la purificación del fragmento y su subsiguiente clonación, se utilizó la banda que se encuentra en el carril que corresponde a la PCR hecha a la temperatura de alineamiento de  $68^{\circ}\text{C}$ , debido a que se observaban menos bandas inespecíficas en esta condición (Fig. 16).



**Figura 16. Gradiente de TM para PCR sobre el plásmido RC14.** Gel de agarosa con el gradiente de temperatura para el PCR sobre el plásmido RC14 /SBE1/SFPE2). Carril 1, marcador molecular; Carriles 2 a 5: productos de PCR hechos con temperaturas de alineación que van aumentando  $2^{\circ}\text{C}$  del carril 2 al 5 desde  $62^{\circ}\text{C}$  hasta  $68^{\circ}\text{C}$ .

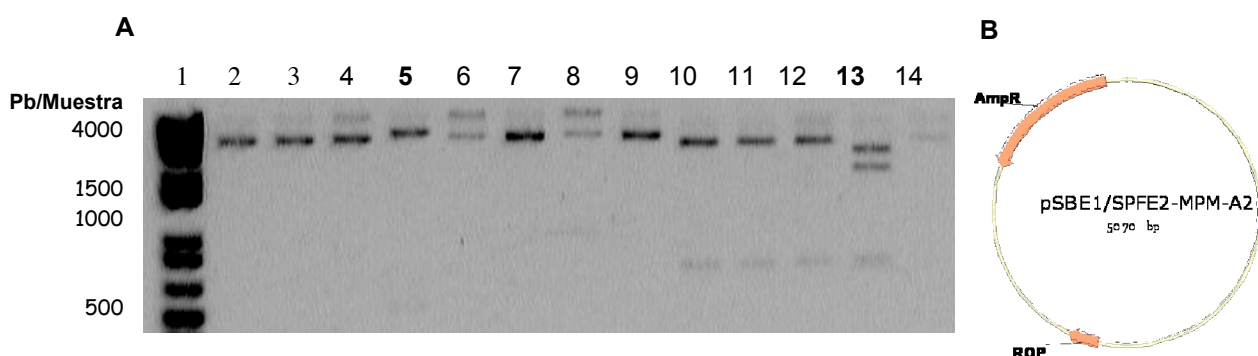
Intentamos sub-clonar el fragmento SBE1/SFPE2, obtenido mediante PCR, en el plásmido pMPMA2 digiriendo el producto de la PCR (en sus extremos) y el vector pMPMA2 con BamHI/EcoRI. Sin embargo, no obtuvimos resultados positivos después de realizar la ligación del inserto:vector y la transformación en DH5 $\alpha$  del producto de la ligación, posiblemente por que no alcanzamos la relación óptima inserto:vector, es decir, la concentración del inserto no era suficiente para lograr una relación molar 3:1 respecto a la cantidad del vector presente en la ligación.

Para solucionar el problema exploramos diferentes estrategias que incluyeron modificaciones en el protocolo de purificación de DNA en la parte de la elución, clonación con extremos romos utilizando el sitio de restricción HincII, además de la desfosforilación de los extremos romos del plásmido pMPMA2 y la fosforilación de los oligonucleótidos para aumentar la probabilidad de unión entre ambos componentes (inserto SBE1/SFPE2 y vector pMPMA2) y disminuir la proporción de plásmido pMPMA2 recirculado. Con estas estrategias, logramos reducir colonias con vector re-ligado y/o uniones inespecíficas de la ligación.

Además, con la finalidad de favorecer el crecimiento de nuestras bacterias transformadas preparamos medio LB líquido y cajas con LB-Ampicilina en respuesta al poco crecimiento observado en medio sólido. Posteriormente ligamos el inserto (SBE1/SFPE2) y el vector pMPMA2, transformamos bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  y usamos ampicilina como antibiótico de selección.

Obtuvimos una buena cantidad de clonas ligadas ( $\approx$ 540) respecto a nuestro control de plásmido recircularizado donde obtuvimos  $\approx$ 100. Utilizando la estrategia de inserto sin fosforilar en sus extremos y vector pMPMA2 fosforilado, logramos obtener una proporción inserto:vector adecuada para la ligación, además de la notable mejora en el crecimiento de bacterias en caja.

Posteriormente, analizamos plásmidos aislados de clonas seleccionadas aleatoriamente, para verificar si contenían el fragmento SBE1/SFPE2, utilizando las enzimas de restricción XhoI y de DraI. El patrón de bandas esperado para la digestión con XhoI es de: 4532 y 530 pb; mientras que para DraI es de: 2493, 1866 y 792 pb (Fig.17A). De las clonas analizadas, dos de ellas contenían el plásmido que presentaban los patrones de bandas esperados (Se presenta una clona en Fig. 23 carril 5 y 13) . Para corroborar la correcta de los elementos SBE1/SFPE2 en el plásmido pMPMA2, se secuenció uno de los plásmidos que presentaba el patrón correcto de bandas con ambas digestiones. La construcción obtenida la llamamos pSBE1/SFPE2-MPMA2 (Fig.17B).



**Figura 17. Plásmido pSBE1/SFPE2-MPMA2.** A) Gel de agarosa para la digestión realizada con XhoI y DraI. Carril 1, marcador de peso molecular Mass Ruler. Carriles: 2-9: Muestras evaluadas en busca del patrón de bandas de la inserción de los potenciadores SBE1/SFPE2 en el vector pMPMA2 digerido con XhoI. La muestra del carril 5 presentó el patrón el patrón de bandas esperado en la digestión, la banda de 530 pb se observa débilmente. Carriles: 10-14: Muestras evaluadas con la enzima DraI. La muestra del carril 13 presenta el patrón de bandas esperado (2493, 1866 y 792 pb) y confirma la correcta inserción debido a que es la misma clona evaluada con XhoI (carril 5). B) Diagrama del plásmido pSBE1/SFPE2-MPMA2 generado al insertar el fragmento SBE1/SFPE2 al vector pMPMA2. Se marcan los sitios que se utilizaron para evaluar la inserción del fragmento (XhoI, DraI).

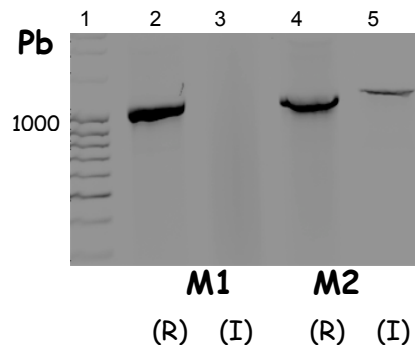


## - Inductor SFPE1

Para aislar el elemento SFPE1 contenido en el plásmido RC6 también se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el fragmento correspondiente al inductor. Se utilizó el plásmido RC6 como templado para obtener el fragmento SFPE1, a pesar de que se probaron varias condiciones de TM no se logró amplificar ningún producto de la reacción de PCR, por lo que concluimos que el plásmido estaba degradado.

Procedimos a obtener el inductor mediante PCR a partir de DNA genómico. Se sintetizaron oligonucleótidos específicos, usando "Vector NTI" considerando la secuencia genómica de ratón (*mus musculus*), encontrada en la base de datos del NCBI (del inglés, National Center Biotechnology Information) (Tabla 2-Oligos #2). Utilizamos DNA genómico de ratón de la cepa C57BL-6 proporcionado en nuestro grupo de investigación por el estudiante de doctorado MC. Raúl Pérez.

La TM para la PCR fue de 65° C, realizamos dos reacciones de PCR utilizando enzimas Taq Polimerasa de 2 diferentes casas comerciales (Invitrogen y Roche), obteniendo más producto con la enzima de Roche (Fig. 18). El producto de PCR fue del tamaño esperado (1000 pb) (Fig. 18) y la banda se purificó utilizando un kit de purificación de DNA de geles de agarosa.

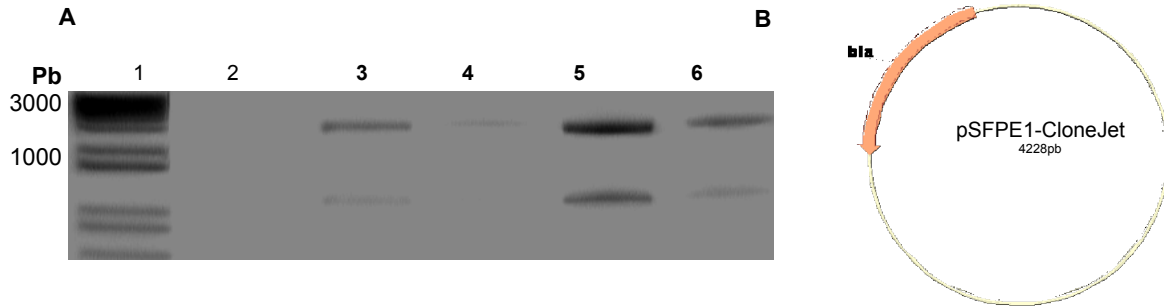


**Figura 18. PCR para aislar el elemento SFPE1.** Gel de agarosa del producto de PCR SFPE1. Carril 1, marcador de peso molecular, Mass ruler. Carriles 2 y 3, PCR de la muestra 1 usando dos Taq polimerasa: Invitrogen y Roche respectivamente; Carriles 4 y 5, PCR de la muestra 2 usando dos Taq polimerasa: Invitrogen y Roche respectivamente. La temperatura de alineamiento utilizada para todos los PCRs fue de 65° C.

Debido a los problemas que tuvimos anteriormente con el aislamiento y clonación de los potenciadores SBE1/SFPE2, decidimos seguir las siguientes 3 estrategias de ligación en el caso de la clonación del inductor SFPE1 en el plásmido pMPMA2: i) Usando el Kit pGem-T Easy Vector, ii) Con el kit CloneJet PCR cloning, y, iii) Usando la enzima T4 Ligasa. La segunda estrategia fue la única con la que obtuvimos colonias al transformar los productos de la ligación.

El kit Clonejet consta de un vector linealizado cuyos extremos se complementan para la secuencia de una enzima tóxica en bacterias, por ello cuando el vector se recirculariza las bacterias se mueren y solo las clonas con el inserto sobreviven, lo que aumenta la probabilidad de encontrar colonias positivas para el plásmido esperado a pesar de tener pocas colonias en medio sólido.

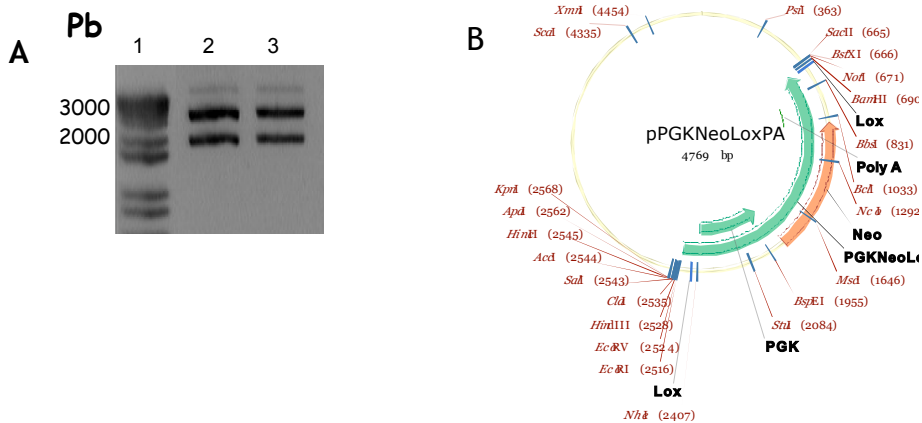
A partir de las colonias se purificó DNA plasmídico el cual se analizó con ensayos de digestión usando las enzimas BgIII-XhoI, siendo el patrón esperado dos bandas, una de 3097 y otra de 1118 pb (Fig. 19). Para corroborar este resultado, se secuenció el fragmento usando los oligos del mismo kit y se obtuvo la construcción que nombramos como pSFPE1-CloneJet (Fig. 19).



**Figura 19. Plásmido pSFPE1-CloneJet.** A) Gel de agarosa para la doble digestión realizada con BgIII-XhoI. Carril 1, marcador 1kb plus ladder. Carriles: 2-6: Muestras evaluadas en busca del patrón de bandas de la inserción del inductor Sfp1 en el vector cloneJet. Las muestras en los carriles 3-6 presentan un patrón correspondiente al esperado (3097 y 1118 pb). La muestra del carril 4 no se logró ver en el gel debido a la baja cantidad de plásmido digerido. B) Diagrama del plásmido pSFPE1-CloneJet generado al insertar el potenciador SFPE1 al vector CloneJet. Se marcan los sitios que se utilizaron para evaluar la inserción del potenciador (BgIII-XhoI).

### - PGKNeoLoxPA

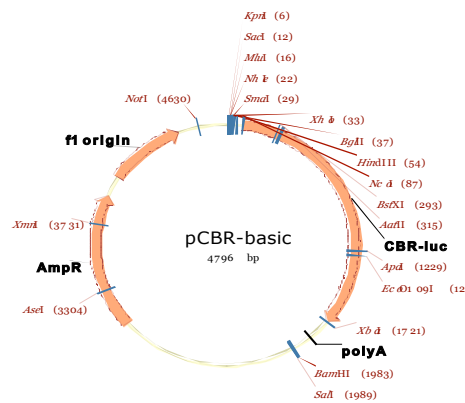
El plásmido que contiene el promotor PGK y el gen de resistencia a neo flanqueados por los sitios LoxP, fue digerido con la enzima XhoI. El patrón de digestión fue el esperado (2818 y 1851 pb) en todas las colonias analizadas, confirmando que el plásmido era el correcto. Para corroborar que el fragmento PGKNeo se había insertado correctamente en el vector, se secuenció uno de los plásmidos. A esta construcción la continuamos llamando pPGKNeoLoxPA (Fig. 20).



**Figura 20. Plásmido pPGKNeoLoxPA.** A) Gel de agarosa para la digestión realizada con XhoI. Carril 1, marcador 1kb plus ladder. Carriles: 2 y 3: Muestras evaluadas, ambas presentan el patrón correspondiente al esperado. B) Diagrama del plásmido PGKNeoLoxPA. Se marcan los sitios únicos en el plásmido.

### - Gen Luciferasa Roja

El gen de luciferasa roja del escarabajo *Pyrophorus plagiophthalmus* (con emisión a 611nm), lo obtuvimos a partir del plásmido comercial pCBR-Basic (Promega); (Fig.21).

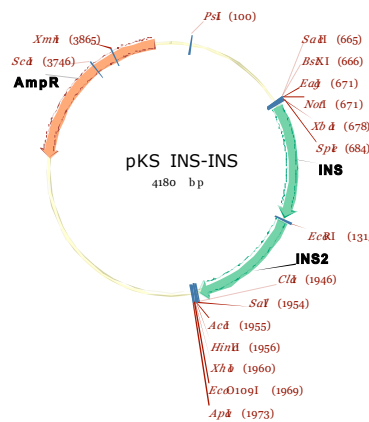


**Figura 21. Plásmido pCBR-basic.** A) Diagrama del plásmido pCBR-Basic que contiene a la luciferasa roja (CBR-luc). Se marcan los sitios únicos de restricción en el plásmido.

### - Aislantes (Insulators, INS)

Los INS son secuencias de DNA que se ha demostrado limitan la acción de un inductor a un promotor inhibiendo su interacción con otro, es decir, permiten limitar la actividad de un regulador a un solo promotor (Anexo 5). Es por ello, que decidimos incluirlos en los plásmidos que construimos para que la expresión de nuestra proteína reportera se genere solo por acción del elemento inductor/promotor de *shh*.

Los INS se encuentran en el plásmido pKS INS-INS (Fig. 22).



**Figura 22. Plásmido pKS-INS-INS.** A) Diagrama del plásmido pKS Ins Ins que contiene un par de insuladores (INS, INS2). Se marcan los sitios únicos en el plásmido, el sitio EcoRI se eliminó y se insertaron los sitios MssI, AvrII y FspAI.

El plásmido original presenta un sitio EcoRI entre los insuladores (Fig. 22). Este sitio fue modificado, mediante la inserción vía ligación en el sitio EcoRI, utilizando oligonucleótidos para eliminar el sitio EcoRI e insertar tres sitios de restricción cuya secuencia de corte constan de 6 u 8 pares de bases de reconocimiento que son poco comunes en la secuencia de plásmidos (AvrII, FspAI y MssI). Los sitios únicos insertados permiten linearizar el plásmido para su posterior uso al transfectar en CTEs para generar líneas estables. Esta modificación se realizó en nuestro laboratorio como parte del proyecto de licenciatura de la Bióloga Sara Albarran. El plásmido modificado se nombró INS-INS-MAF.

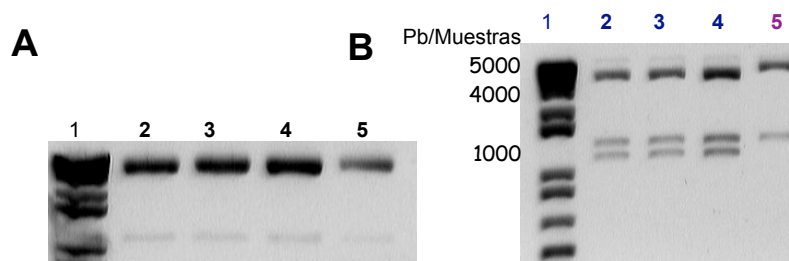
## 2. Obtención de las construcciones para el estudio dinámico

### ❖ Plásmido pSFPE1-Shh

Para unir los elementos SFPE1 y el promotor *shh*, aislamos el inductor SFPE1 del plásmido pSFPE1-CloneJet (Fig.19) usando la enzima BglII cuyos sitios flanqueaban al fragmento. Por otro lado, linearizamos el plásmido pShh-MPMA2 (Fig.15) utilizando la enzima BamHI (sitio único), éste se usó como vector base o receptor. Luego se ligó el fragmento SFPE1 en el vector pMPMA2. Posteriormente, se usó el producto de la ligación para transformar bacterias DH5 $\alpha$ , para después hacer la selección con antibiótico ampicilina, en cajas de LB.

Se seleccionaron colonias aleatoriamente de las cuales se purificó DNA plasmídico vía minipreps para analizarse mediante digestión con la enzima EcoRI. Las bandas esperadas eran de: 5000 y 1115 pb (Fig. 23A); logramos obtener un 100% de clonas positivas, es decir, todas las clonas evaluadas presentaron el patrón de bandas esperado.

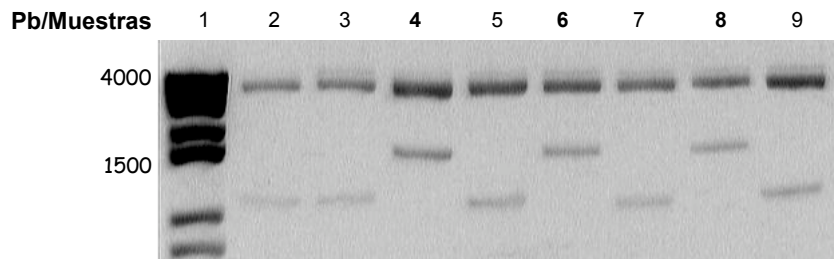
Para determinar la dirección en que se insertó el potenciador SFPE1 respecto al promotor digerimos el DNA plasmídico con la enzima XbaI. El patrón de bandas cuando el inductor y el promotor se encuentran en la dirección deseada incluye bandas de 4863 y 1277 pb; el patrón de bandas cuando se encuentran en sentido inverso consiste en bandas de: 3760, 1277 y 1112 pb (Fig. 23B). El análisis de las clonas indicó que en 6 de ellas el potenciador se encontraba en sentido contrario al promotor y 3 en fase con el promotor (Fig. 23B). Sin embargo, la actividad del inductor no se ve afectada por su direccionalidad respecto al promotor, ya que se observó el mismo patrón de expresión para ambas construcciones independientemente de la dirección del inductor (40). Para nuestros fines tenerlo en ambas orientaciones nos permite generar diferentes estrategias experimentales en la construcción del plásmido final aprovechando los sitios de restricción.



**Figura 23. Plásmido parcial pSFPE1-Shh.** A) Gel de agarosa cargado con la digestión realizada sobre el plásmido pSFPE1-Shh usando la enzima EcoRI sobre el DNA plasmídico obtenido de clonas transformadas con la ligación del vector pSFPE1-Shh. Carril 1: Marcador 1kb plus ladder. Las muestras en los carriles 2 al 5 presentando el patrón de bandas esperado (4863 y 1277pb). B) Gel de agarosa de las muestras positivas del gel anterior digeridas con la enzima XbaI para determinar la direccionalidad del potenciador SFPE1 insertado en el vector pShh-MPMA2 que contiene al promotor de Shh. Carril 1, marcador 1kb plus ladder, Carriles 2-4,7, 9 y 10 (números morados) presentan el bandeo esperado cuando el inserto está en dirección opuesta al promotor. Carriles 5, 6 y 8 (números azules) presentan las dos bandas esperadas cuando el potenciador está en fase con el promotor.

### ❖ Plásmido pSBE1-Shh

El inductor SBE1 se encuentra en el plásmido pSBE1/SFPE2-MPMA2 (Fig. 17). Para escindir el fragmento SBE1 utilizamos las enzimas XhoI y BamHI, como se había reportado previamente (40). El vector pShh-MPMA2 (Fig. 15) lo digerimos con XhoI y Sall. Se obtuvo DNA plasmídico de clonas seleccionadas aleatoriamente vía miniprep y se analizaron mediante digestión con XhoI en busca del patrón de bandas esperado para la construcción con el elemento SBE1 y el promotor de Shh (3986 y 1540 pb), este plásmido lo nombramos como pSBE1-Shh (Fig. 24).



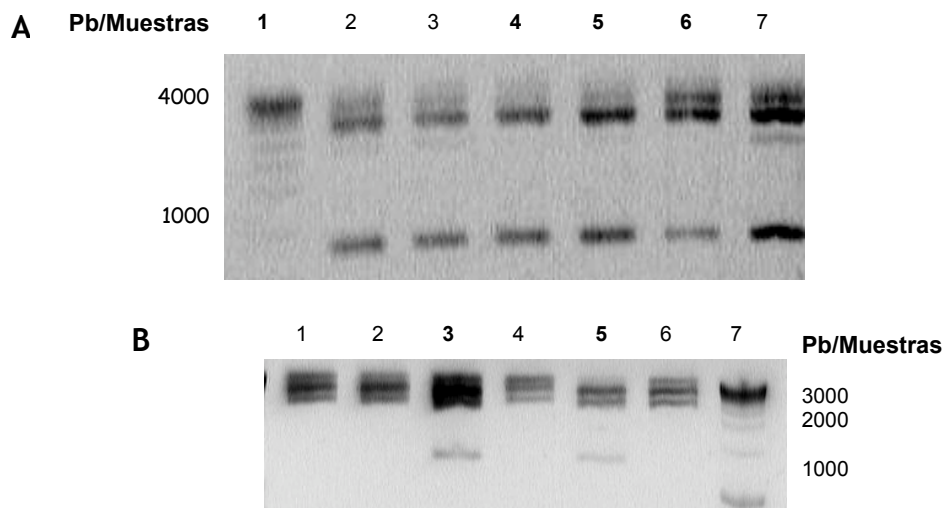
**Figura 24. Plásmido pSBE1-Shh.** Gel de agarosa cargado con la digestión realizada sobre el DNA plasmídico obtenido de clonas transformadas con ligación del potenciador SBE1 ( $\approx 500$  pb) y el vector que contiene al promotor de Shh usando la enzima XhoI. Carril 1, marcador 1kb plus ladder. Los carriles 4, 6 y 8 contienen muestras que presentan el patrón de bandas esperado.

#### ❖ Plásmidos pSBE1-Shh-InsMAF y pSFPE1-Shh-InsMAF

Los plásmidos que contienen en su secuencia a cada uno de los potenciadores y al promotor de *shh* (pSFPE1-Shh y pSBE1-Shh) se digirieron con las enzimas NotI y PstI para insertar direccionalmente a los insulators en cada uno de estos plásmidos.

Los INS los escindimos del plásmido INS-INS-MAF (Fig. 22-modificado) utilizando las enzimas NotI y HincII. Las bandas de interés, correspondientes a los plásmidos pSBE1-Shh y pSFPE1-Shh y al fragmento que contiene a los INS respectivamente, se cortaron y purificaron. Se ligaron los insulators con cada una de los plásmidos pSBE1-Shh y pSFPE1-Shh para obtener los plásmidos pSBE1-Shh-InsMAF y pSFPE1-Shh-InsMAF respectivamente. Para la ligación se utilizó la estrategia cohesivo-romo para dirigir la ligación del inserto (InsMAF) en sentido correcto respecto al promotor. Se utilizaron bacterias de la cepa SURE (Anexo 6), para reducir la recombinación inherente a los INS debido a su secuencia repetida.

De las bacterias que crecieron en medio sólido con el antibiótico ampicilina se seleccionaron clonas de manera aleatoria y se analizó su DNA plasmídico mediante una doble digestión usando las enzimas con ClaI y XbaI. El patrón de bandas esperado para la construcción pSBEI-SHH-InsMAF era de: 3676, 1277 y 1266 pb y se obtuvieron 4 clonas positivas, es decir, su patrón de bandas coincidía con el esperado (Fig. 25A). Se siguió la misma estrategia para el plásmido pSFPEI-SHH-InsMAF, se analizaron 6 clonas seleccionadas aleatoriamente, se purificó su DNA plasmídico y se digirió con las enzimas ClaI y XbaI buscando el patrón de bandas correspondiente a: 3147, 2435 y 1260 pb. Se observaron 2 clonas con el patrón de bandas coincidente al esperado (Fig. 25B).



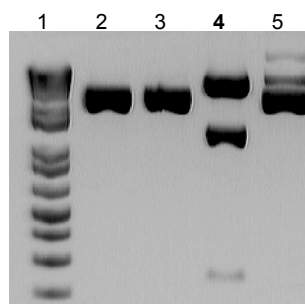
**Figura 25. Plásmidos pSBE1-Shh-InsMAF y pSFPE1-Shh-InsMAF.** Geles de agarosa cargados con la doble digestión (ClnI-XbaI) realizada sobre el DNA plasmídico obtenido de clonas transformadas para las construcciones pSBE1-Shh-InsMAF y pSFPE1-Shh-InsMAF. A) pSBE1-Shh-InsMAF. Carril 1, marcador 1kb plus ladder. Los carriles 4-6 contienen muestras evaluadas que presentan el patrón de bandas esperado. B) pSFPE1-Shh-InsMAF. Los carriles 3 y 5 contienen muestras evaluadas que presentan el patrón de bandas esperado. Carril 7: Marcador 1kb plus ladder.

#### ❖ Plásmido pLucR-PGKNeo

El gen de luciferasa se escindió del vector pCBR-Basic (Fig.21) mediante una doble digestión usando las enzimas SmaI y ClnI. El vector PGKNeoLoxPA (Fig. 20) se digirió usando las enzimas HincII y ClnI, igual que en la construcción anterior dirigimos la inserción usando la estrategia cohesivo-romo.

Se realizó una reacción de ligación para insertar el gen de luciferasa en el plásmido PGKNeoLoxPA. Esta reacción se llevó a cabo agregándole polietilenglicol (PEG; 3 $\mu$ L, 10% v/v). Estas condiciones favorecen las ligaciones de los extremos romos (SmaI-HincII) debido a que el PEG es una sustancia volumen excluyente con lo que se aumenta la probabilidad de que los extremos del vector y del inserto coincidan espacialmente, favoreciendo su unión.

Se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  con la ligación y se analizaron colonias seleccionadas aleatoriamente. El análisis se realizó digiriendo el DNA plasmídico con la enzima HincII. El patrón de bandas esperado para la construcción ligada correctamente era de: 5227, 1236 y 245 pb. Se obtuvo una colonia positiva con el patrón de bandas coincidentes para la construcción pLucR-PGKNeo (Fig.26).



**Figura 26. Plásmido pLucRPGKNeo.** Gel de agarosa cargado con la digestión realizada sobre el DNA plasmídico obtenido de clonas transformadas con la ligación del vector PGKNeoLoxPA y el gen de luciferasa roja realizada para



obtener la construcción parcial pLucRPGKNeo. Carril 1, marcador 1kb plus ladder. En el carril 4 se observa que la muestra presenta el patrón de bandas esperado.

### ❖ Plásmidos pSBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF y pSFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF

En la tabla 4 se desglosan las tres estrategias implementadas para generar los plásmidos pSBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF y pSFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF. Fueron realizadas siguiendo el orden descendente presentado en la tabla. Al seguir la primera estrategia obtuvimos construcciones cuyos patrones de digestión presentaban bandeos diferentes a los esperados; esto lo adjudicamos a recombinaciones entre los INS a pesar de haber usado bacterias de la cepa SURE.

Con la segunda estrategia obtuvimos menores concentraciones de vector e inserto aislados, la disminución es debido a una mayor manipulación de los fragmentos ya que se rasuraron sus extremos y se desfosforiló al vector para reducir la recircularización. A pesar de las bajas cantidades se procedió con la ligación y se transfectaron células de la cepa SURE. De las clonas obtenidas se seleccionaron algunas, se les purificó y analizó el DNA plasmídico mediante la utilización de enzimas de restricción. Finalmente, se observó que el patrón de bandas obtenido no correspondía al esperado.

Para la siguiente estrategia utilizamos un plásmido donde se había sub-clonado al fragmento LucR-PGK-Neo y se encontraba flanqueado por sitios NotI, esto nos permitió realizar una ligación de extremos cohesivos, que aunque no nos permitía dar direccionalidad al inserto, disminuía la manipulación de los fragmentos en comparación con las estrategias anteriores.

Tabla 4. Estrategias para ligar Potenciadores-Promotor-ShhInsMAF + LucR-PGKNeo

Vector	Inserto	Extremos	Observaciones
NotI-SacII	NotI-BglIII	Cohesivo-Romo	El corte con SacII, se realizaba dentro del promotor.
NotI	NotI-BglIII	Romo	Se rellenaron ambos plásmidos, no dirección. Desfosforilamos vector.
NotI	NotI	Cohesivo	Sin dirección, el inserto se escindió de un plásmido sub-clonado. Desfosforilamos el vector.

Tabla 4. Estrategias de ligación para ligación final. En la tabla se desglosan las estrategias utilizadas de manera descendente para ligar el plásmido inductor(SBE1 o SFPE1)-pShh-InsMAF con el plásmido LucR-PGKNeo.

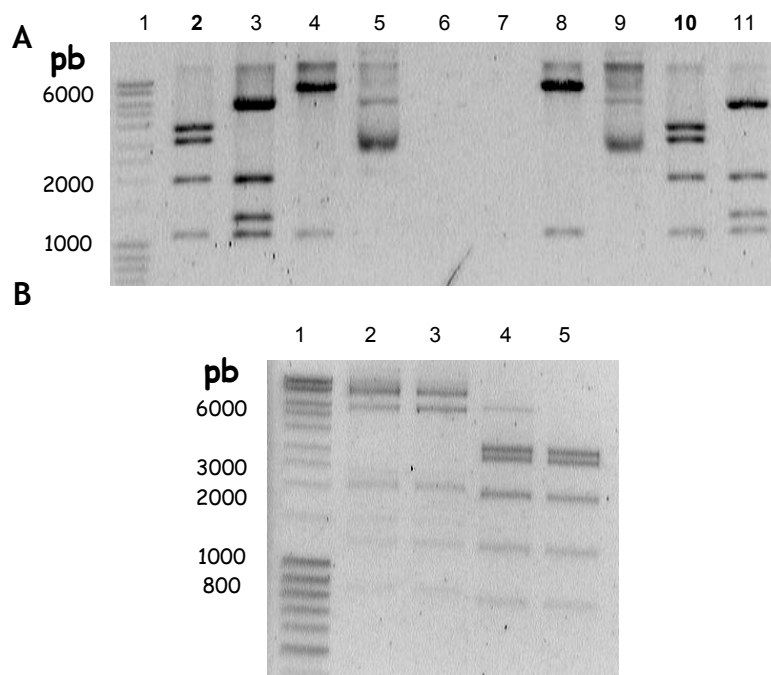
Se mejoró la recuperación de los fragmentos modificando el protocolo del kit de extracción de DNA de geles de agarosa en el paso de elusión. Para ello, utilizamos agua caliente para eluir el DNA de la columna de purificación y aumentamos las cantidades de plásmido inicial. Por otro lado, las reacciones de desfosforilación con SAP se incubaron durante más tiempo ya que notamos una disminución en la eficiencia de la enzima.

Además, en las ligaciones agregamos PEG para favorecer la unión del vector y del inserto aumentando la probabilidad de que sus extremos coincidan

espacialmente. También, preparamos un nuevo lote de células competentes DH5 $\alpha$  y Sure. Con todos estos cambios, aumentamos las proporciones del vector y del inserto para la ligación, mejoramos la eficiencia del crecimiento de las bacterias en placas de agar y disminuimos la recircularización del vector.

- **Plásmido pSFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF**

El fragmento LucR-PGKNeo se escindió utilizando los sitios NotI que lo flanqueaban. Por otro lado, el vector pSFPE1-ShhInsMAF se linearizó usando el sitio único NotI. Se ligaron el inserto LucR-PGKNeo y el vector, posteriormente, se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  y de las clonas observadas se seleccionaron 8 al azar. Se purificó su DNA plasmídico vía miniprep y se utilizó la enzima EcoRI para digerir y buscar el siguiente patrón de bandas: 6284, 1964, 13311, 1115 pb (Fig. 27A - Carriles: 3 y 11). Las clonas correspondientes al patrón de bandas esperado se analizaron con otros dos patrones de digestión usando: HincII (5661, 2022, 1236, 840 y 240 pb) y ClaI/XmnI (3207, 2805, 1932, 1223, 792 pb) (Fig. 27B). Se observaron patrones de bandas correspondientes a los esperados en ambos ensayos de digestión, corroborando así la obtención del plásmido pSFPE1-Shh-InsMAF-LucRPGKNeo.



**Figura 27. Plásmido final pSFPE1-Shh-InsMAF-LucRPGKNeo.** A) Digestión con la enzima EcoRI en el DNA plasmídico en busca del patrón correspondiente a la construcción pSFPE1-Shh-InsMAF-LucRPGKNeo. Carril 1, marcador Mass Ruler, Carriles 2-5 y 8-11: Muestras seleccionadas aleatoriamente para analizar los patrones de digestión con EcoRI. Los carriles 3 y 11 presentan el bandeo esperado para la construcción. B) Patrón de bandeo observado digiriendo con la enzima HincII: carriles 2 y 3 (Clona 3 y 11 respectivamente) y con la enzimas ClaI-XmnI: carriles: 4 y 5 (Clona 3 y 11 respectivamente). Los carriles 6 y 7 no contienen muestra.

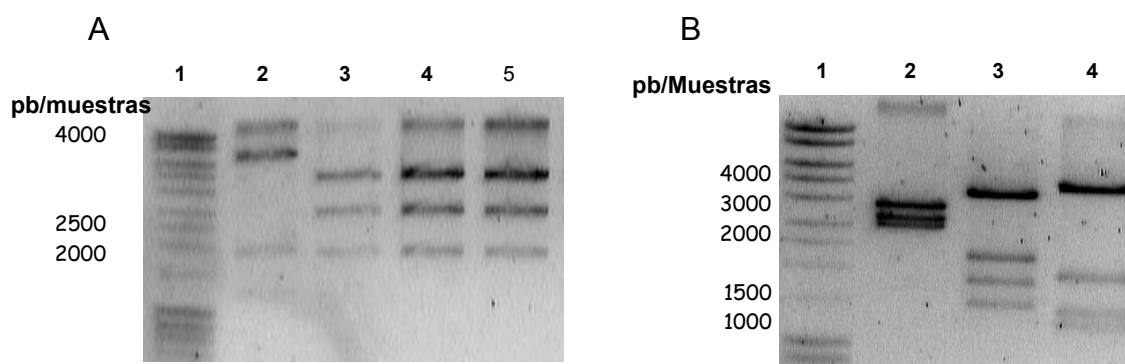
- **Plásmido pSBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF**



Esta ligación la realizamos transformando tanto bacterias *DH5 $\alpha$*  como Sure. De las bacterias SURE transformadas solo se encontró una, mientras que en las células *DH5 $\alpha$*  obtuvimos un mayor número de colonias en la caja de agar respecto a las encontradas en la caja obtenida al ligar solo vector usado como control de ligación.

Analizamos la clona que obtuvimos de la cepa Sure y 3 clonas de la cepa *DH5 $\alpha$* . Para ello, utilizamos el DNA plasmídico de las clonas obtenido vía miniprep y digerimos con la enzima EcoRI, buscando el patrón de bandas correspondientes a 4315, 2489, 1964 y 1311 pb. El patrón se encontró en la única clona de la cepa Sure, mientras que ninguno de los patrones encontrados en las clonas de la cepa *DH5 $\alpha$*  correspondían al buscado (Fig. 28A - Carril 2).

Para corroborar que el plásmido extraído de la clona SURE era el correcto, se hicieron otros análisis de digestión usando las siguientes combinaciones de enzimas de restricción: Apal-MssI (Fig. 28B-Carril2: 3769, 3265 y 3069 pb), XhoI-EcoRI (Fig. 28B - Carril3: 4457, 2280, 1826, 1540 pb) y ClaI-SpeI (Fig. 28B - Carril4: 4947, 1969, 1445, 1284 y 406 pb). Se observaron patrones de bandas correspondientes a los esperados en ambos ensayos de digestión corroborando la obtención del plásmido pSFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF.



**Figura 28. Plásmido pSBE1-Shh-InsMAF-LucRPGKNeo.** A) Digestión con la enzima EcoRI en el DNA plasmídico de la clona SURE y clonas *DH5 $\alpha$*  en busca del patrón de bandas correspondiente a la construcción pSBE1-Shh-InsMAF-LucRPGKNeo. Carril 1, marcador Mass Ruler, Carriles 2-5: Muestras seleccionadas aleatoriamente para analizar los patrones de digestión. El carril 2 corresponde a la colonia SURE y los carriles 3-5 corresponden a las colonias *DH5 $\alpha$* . Solo en el carril 2 se observa el patrón de bandeado esperado para la construcción. B) Bando observado en las digestiones con las enzimas Apal-MssI (Carril2: 3769, 3265 y 3069pb), XhoI-EcoRI(Carril3: 4457, 2280, 1826, 1540pb) y ClaI-SpeI (Carril4: 4947, 1969, 1445, 1284 y 406pb). Con esto se confirmó la correcta obtención del plásmido pSBE1-Shh-InsMAF-LucRPGKNeo.

Ambas construcciones finales obtenidas y analizadas mediante patrones de digestión se corroboraron por secuenciación en el fragmento que corresponde a la última ligación realizada (pSBE1-Shh-InsMAF o pSFPE1-Shh-InsMAF + LucRPGKNeo). La secuenciación se realizó utilizando los oligos número 3 de la Tabla 2, se obtuvieron homologías del 100% en ambas construcciones.

#### - **Plásmido pShh-InsMAF-LucR-PGKNeo**

La construcción pShh-InsMAF-LucR-PGKNeo carece de potenciadores y consta del: promotor de Shh, el gen reportero de luciferasa roja y el gen de selección Neo. Al linearizarse el vector con una de las enzimas MssI, ApaI, FpsI queda flanqueada por los INS.

Para construir este plásmido utilizamos inicialmente al plásmido pSFPE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo. Primero escindimos el fragmento correspondiente al inductor (SFPE1) usando las enzimas BglII y Sall; posteriormente, se purificó la banda correspondiente al vector sin inductor y rellenamos los extremos. Después, se recircularizó al vector linearizado en una reacción de ligación para luego transformar bacterias DH5 $\alpha$  con la reacción de ligación. Se seleccionaron clonas aleatoriamente, se realizaron minipreps y se analizó el DNA plasmídico mediante una doble digestión con EcoRV y MscI buscando un patrón de bandas de: 5728, 2399, 878 y 547 pb.

De las clonas que presentaban el bandeo esperado, seleccionamos una y corroboramos que la construcción era correcta. Lo analizamos mediante una doble digestión usando las enzimas BglII/XmnI que generaron el patrón de bandas correspondiente a lo esperado (3661, 3106, 1453, 853 y 479 pb).

#### - **Plásmidos pSBE1-InsMAF-LucR-PGKNeo y pSFPE1-InsMAF-LucR-PGKNeo**

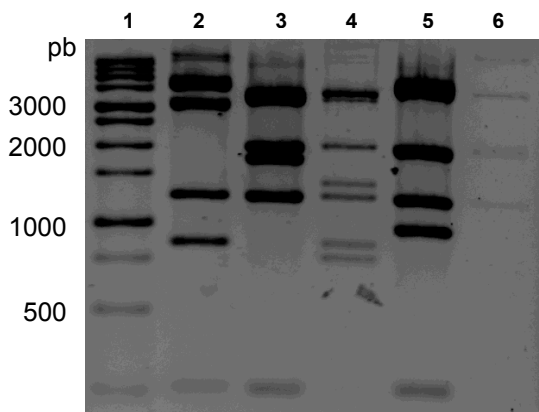
Los plásmidos pSBE1-InsMAF-LucR-PGKNeo y pSFPE1-InsMAF-LucR-PGKNeo carecen del promotor de *shh* y constan del: gen reportero de luciferasa roja, el gen de selección PGK-Neo y los potenciadores SBE1 y SFPE1 respectivamente.

Para generar las construcciones, partimos de los plásmidos pSFPE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo y pSBE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo respectivamente.

Primeramente, escindimos el fragmento correspondiente al promotor de *shh* utilizando las enzimas BglII y SacII en cada una de las construcciones, se rasuraron los extremos y se purificaron los vectores digeridos. Posteriormente se procedió a recircularizar los plásmidos mediante una reacción de autoligación. Luego se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  con la reacción de ligación. Se purificó el DNA plasmídico de clonas seleccionadas aleatoriamente y se analizaron los patrones de bandas correspondientes a dos diferentes dobles digestiones. Para el plásmido pSBE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo: ClaI-XbaI (3684, 1722, 1490, 1266, 367 y 253 pb); para el vector pSFPE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo, usamos las enzimas EcoRV-XmnI (3549, 3163, 1932, 803 pb).

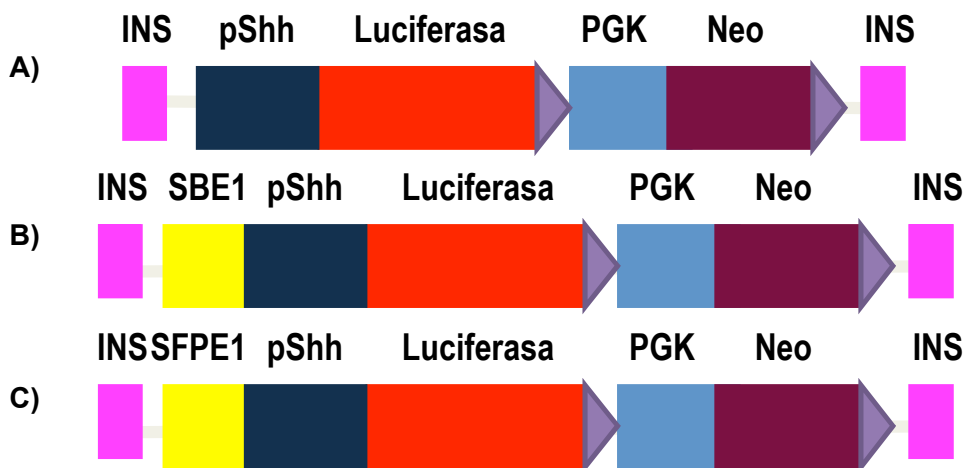
De las clonas positivas encontradas, seleccionamos una clona para cada plásmido (pSBE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo y pSFPE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo) y corroboramos que ambas eran correctas usando las siguientes combinaciones de enzimas de restricción. Para pSBE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo: NotI- MscI (4436, 2871, 975 y 528 pb); y para pSFPE1-Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo XbaI-BglI (3391, 2168, 1722, 1036, 707 y 367 pb). En todas las digestiones observamos los patrones de bandas esperados para ambas construcciones.

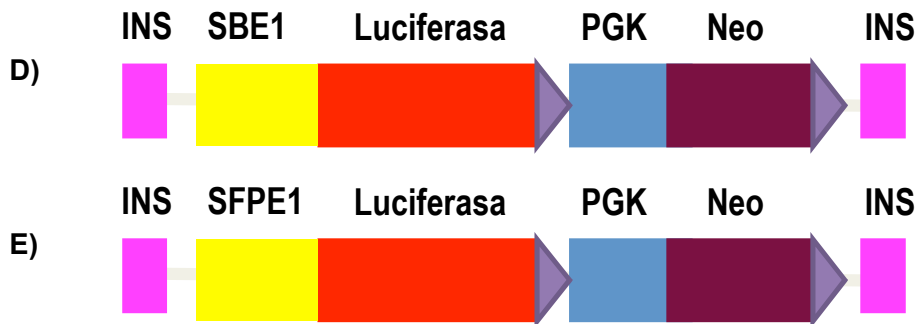
Finalmente, corroboramos que los 5 plásmidos finales generados presentaban el bandeo adecuado para dobles digestiones realizadas al final del proceso de su construcción. Para Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo, se usaron las enzimas HincII-ClaI (3997, 3137, 1236, 840, 245 pb). SBE1-LucR-PGKNeo-InsMAF y SBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF se digirieron con las enzimas HincII-Xmnl (3657, 1932, 1740, 1236 y 245 pb; 3657, 1932, 1400, 1236, 840, 800 y 245 pb, respectivamente). Para SFPE1-LucR-PGKNeo-InsMAF y SFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF, usamos las enzimas HincII-XhoI (4433, 1934, 1593, 1236 y 245 pb; 4433, 1934, 1593, 750 y 245 pb, respectivamente); (Fig. 29).



**Figura 29. Gel de corroboración para las construcciones finales.** Carril 1, marcador GeneRuler, carril 2: Shh-InsMAF-LucR-PGKNeo; carril 3: SBE1-LucR-PGKNeo-InsMAF; carril 4: SBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF; carril 5: SFPE1-LucR-PGKNeo-InsMAF y carril 6: SFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF. A pesar de que en el gel no se observa bien el bandeo debido a la cantidad de DNA cargado, esa construcción ya se había confirmado como correcta anteriormente (Fig. 32).

Los plásmidos que se construyeron para el estudio dinámico de la expresión de Shh se esquematizan en la figura 30.





**Figura 30. Construcciones para el estudio dinámico de la expresión de Shh.** A) Contiene el promotor de Shh sin potenciadores. B) Contiene el potenciador SBE1 que dirige la expresión a regiones de mesencéfalo. C) Contiene el inductor SFPE1 que dirige la expresión del Istmo a regiones caudales. D y E) Construcciones de ambos potenciadores (SBE1 y SFPE1) sin promotor. INS: Insulators; pShh: Promotor Shh; PGK: (del inglés Phosphoglycerate kinase) fosfoglicerato cinasa; Luc: Luciferasa; Neo, Neomicina.

Para el análisis funcional de las construcciones usamos diferentes líneas celulares que por sus características nos permitieron analizar varios aspectos de los plásmidos como: viabilidad, funcionalidad y especificidad.

### Ensayo poblacional de la actividad bioluminiscente en células HEK293T

El cultivo de células HEK293T (del inglés, human embryonic kidney 293T) es muy práctico, son células que se cultivan fácilmente, es decir, su medio no requiere de la adición de muchos factores y presentan una alta eficiencia de transfección que favorece los ensayos transitorios para evaluar toxicidad y funcionalidad en el contexto de esta línea celular.

Con la finalidad de evaluar la especificidad de los plásmidos utilizamos células HEK293T, siendo un contexto que no cuenta con los requerimientos para dirigir la expresión del sistema inductor/promotor de *shh*. Consideramos que el modelo nos proporcionaría de manera sencilla y rápida información sobre expresión inespecífica de la proteína reportera.

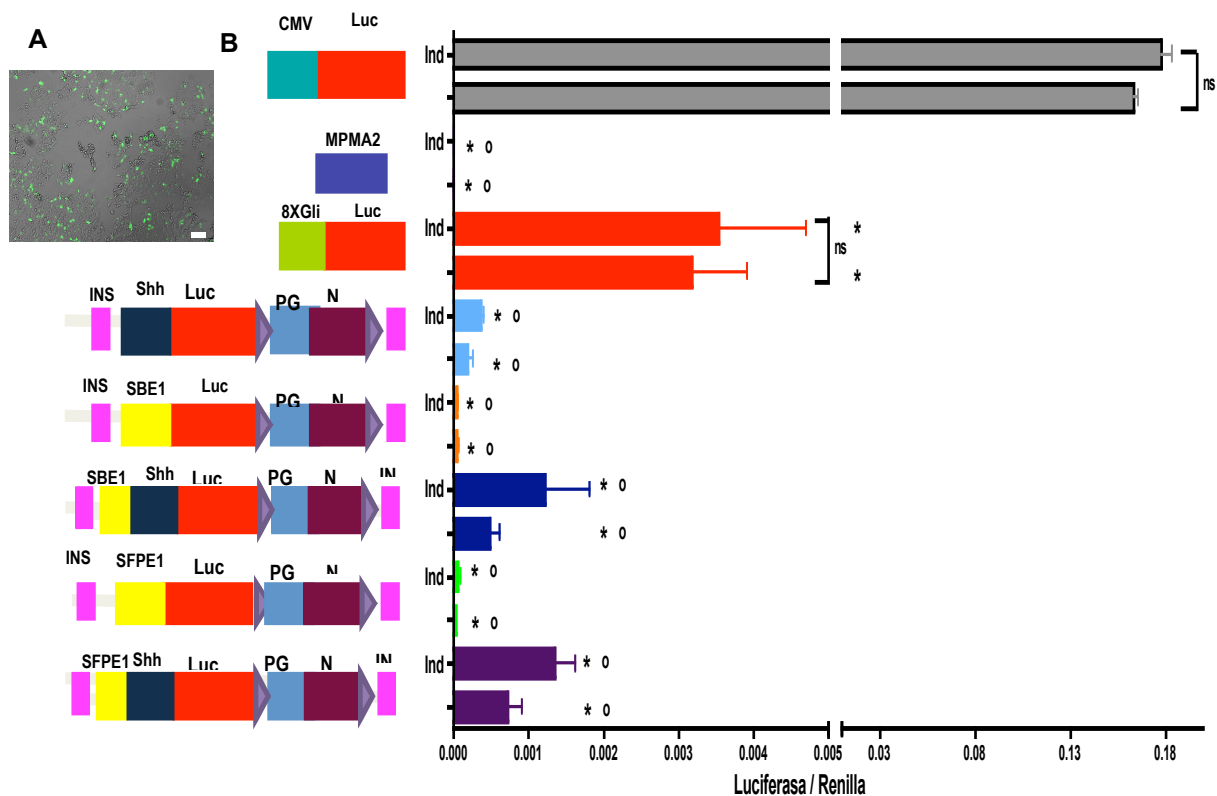
Para el ensayo utilizamos  $\text{CaCl}_2$  para co-transfectar de manera transitoria los plásmidos CMV-Renilla con cada uno de los 5 plásmidos construidos: Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (Shh); SBE1-LucR-PGKNeo-InsMAF (SB); SBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SBShh); SFPE1-LucR-PGKNeo-InsMAF (SFP); SFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SFPShh); 8X-Gli como control positivo de la vía de Shh; MPMA2 como control negativo, ya que representa un vector sin proteína luciferasa y fue el vector base para todas las construcciones; y, CMV-Luc, control positivo . siendo CMV un promotor constitutivo.

Se logró obtener una eficiencia de transfección en todos los ensayos de aproximadamente un 80%. La eficiencia se evaluó usando un plásmido que dirige la expresión de la proteína GFP bajo un promotor constitutivo (Fig. 31A). Todos los plásmidos se evaluaron en condiciones de expansión, sin inducción e inducidas con el agonista de Smo SAG (Anexo 7) después de la transfección.

Los valores de actividad bioluminiscente obtenidos de luciferasa roja de escarabajo en poblaciones celulares transfectadas con cada uno de los plásmidos se normalizaron respecto a Renilla y se presentan en la gráfica contenida en la fig. 31B.

En el ensayo poblacional utilizando células HEK293T observamos prácticamente actividad bioluminiscente nula para las células transfectadas con el plásmido pMPMA2 y para las construcciones que carecen del promotor de Shh: SB y SFP, tanto en condiciones sin inducción como para condiciones inducidas (Fig. 31B).

En el caso de los plásmidos que contienen al promotor de *shh*: Shh, SBEShh, SFPShh; observamos un aumento en la actividad luminiscente respecto a MPMA, SB y SFP tanto en condiciones no inducidas como inducidas. Sin embargo, debido a la alta variabilidad registrada entre los experimentos no se encontró diferencias significativas. Tampoco se determinó diferencia entre la actividad normalizada de los plásmidos en condiciones no inducidas respecto a su versión inducida. Por otro lado, la actividad en las células transfectadas con la construcción 8X-Gli fue significativamente mayor respecto a todos los otros plásmidos tanto en condiciones sin inducir como induciéndolos con SAG (Fig. 31B).



**Figura 31. Ensayo poblacional de actividad bioluminiscente en células HEK293T.** A) Células HEK293T co-transfectadas con los plásmidos sbe1-shh-LucR-PGKNeo-InsMAF y pCMV-GFP mediante CaCl<sub>2</sub>. Se observó una eficiencia del 80%. La imagen es una superposición de campo claro con fluorescencia (GFP). B) Gráfica de los datos obtenidos con el ensayo dual de luciferasa al transfectar células HEK293T con las construcciones: Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (Shh), SBE1-LucR-PGKNeo-InsMAF (SB), SBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SBShh), SFPE1-LucR-PGKNeo-InsMAF (SFP), SFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SFPShh), 8X-Gli y MPMA2. Se graficó el valor normalizado con la actividad de los ensayos para la luciferasa Renilla transfectada bajo el promotor TK tanto para condiciones no inducidas e inducidas con el agonista SAG (Se le agrego -A, a los gráficos en condiciones inducidas) para todas las construcciones. Los valores graficados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados en duplicado. Las diferencias significativas tienen un grado de confianza menor a un p=0.05 con prueba Duncan.

Con los ensayos poblacionales en células HEK293T observamos que los plásmidos no presentan expresión inespecífica de la proteína reportera en este contexto no inductivo para los elementos potenciador/promotor de *shh*.

### **Ensayos de expresión dinámica de los plásmidos inductor/Shh en células individuales HEK293T**

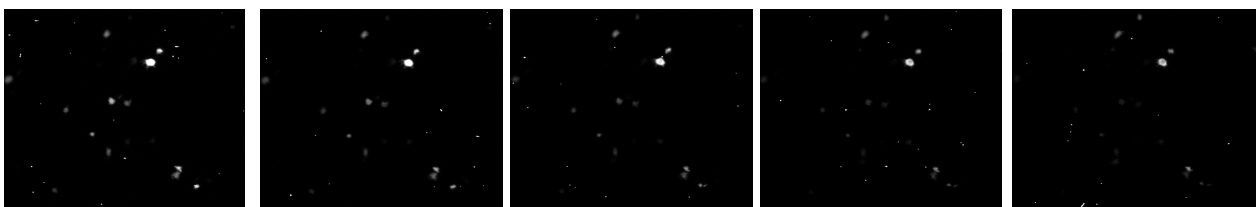
Debido a que durante los ensayos poblacionales observamos actividad bioluminiscente de la luciferasa de escarabajo, aprovechamos las características de este cultivo para establecer y optimizar las condiciones de cultivo y análisis de actividad bioluminiscente en el microscopio.

Se realizaron experimentos de manera independiente donde se monitorearon las células *in vivo* en condiciones de incubación durante 24h en el microscopio, tanto en condiciones no inducidas como inducidas (agregando SAG). Durante el período de incubación se detectó actividad en el cultivo celular mediante imágenes secuenciales que se generaron al coleccionar fotones emitidos durante un intervalo de 30 minutos (20 min. de exposición y 10 min. de recuperación), de esta forma se generaron imágenes secuenciales como películas y se logró analizar el cambio en la actividad bioluminiscente en células individuales mediante la utilización del software CellProfiler.

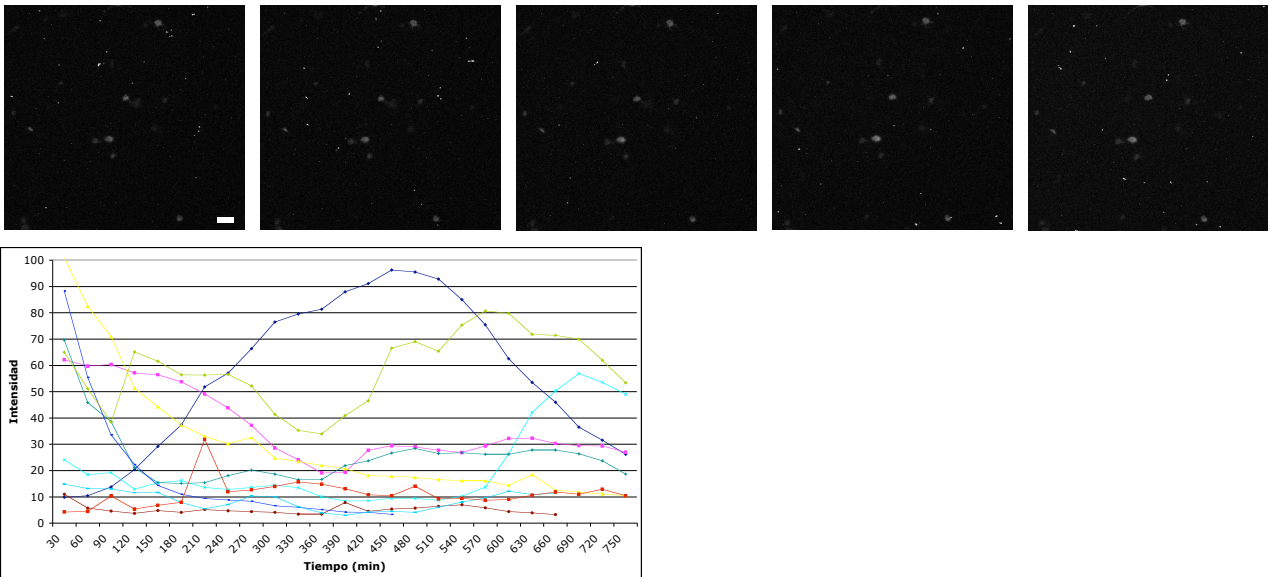
En este ensayo observamos la actividad bioluminiscente de células transfectadas con los plásmidos SBShh y SFPShh a nivel de células individuales. Para ambos plásmidos (SBShh y SFPShh) se observaron pequeñas fluctuaciones en la emisión de fotones registrada a lo largo de la incubación principalmente en las condiciones inducidas, es decir, cuando se les agregó el agonista SAG (Fig. 32 y 33).

El análisis de la actividad bioluminiscente de los plásmidos SBShh y SFPShh en el modelo de células HEK293T nos permitió establecer condiciones en el microscopio de luminiscencia para la incubación y supervivencia de células durante el monitoreo de la expresión dinámica de Shh usando los plásmidos construidos.

**A**

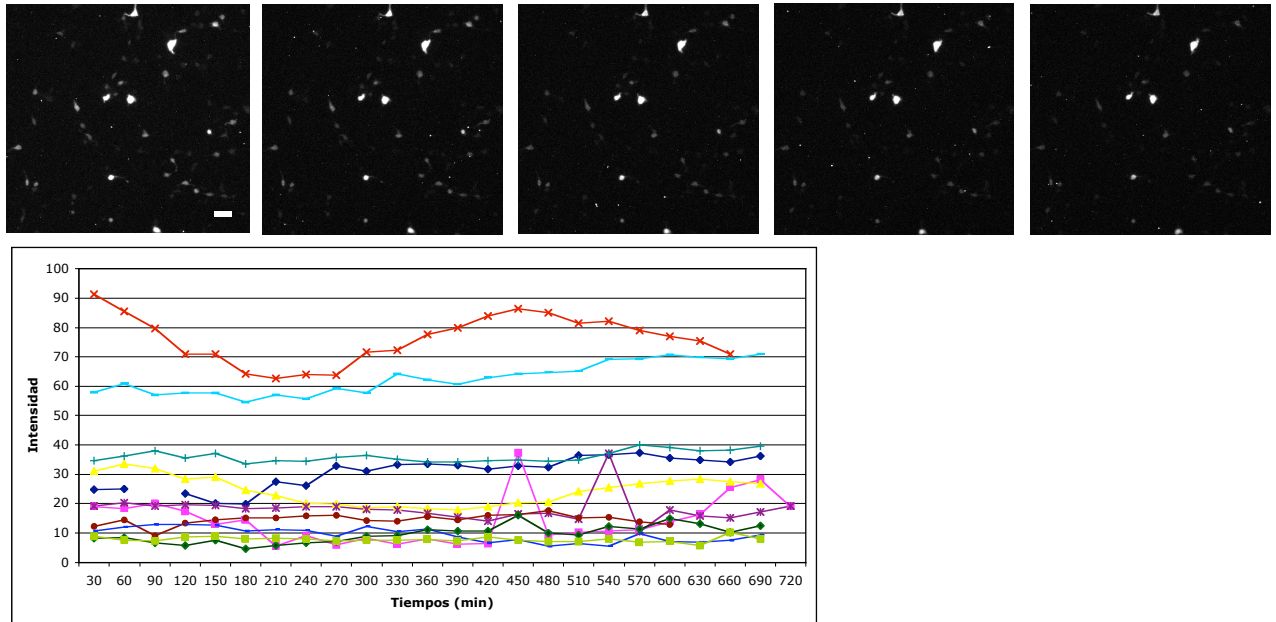
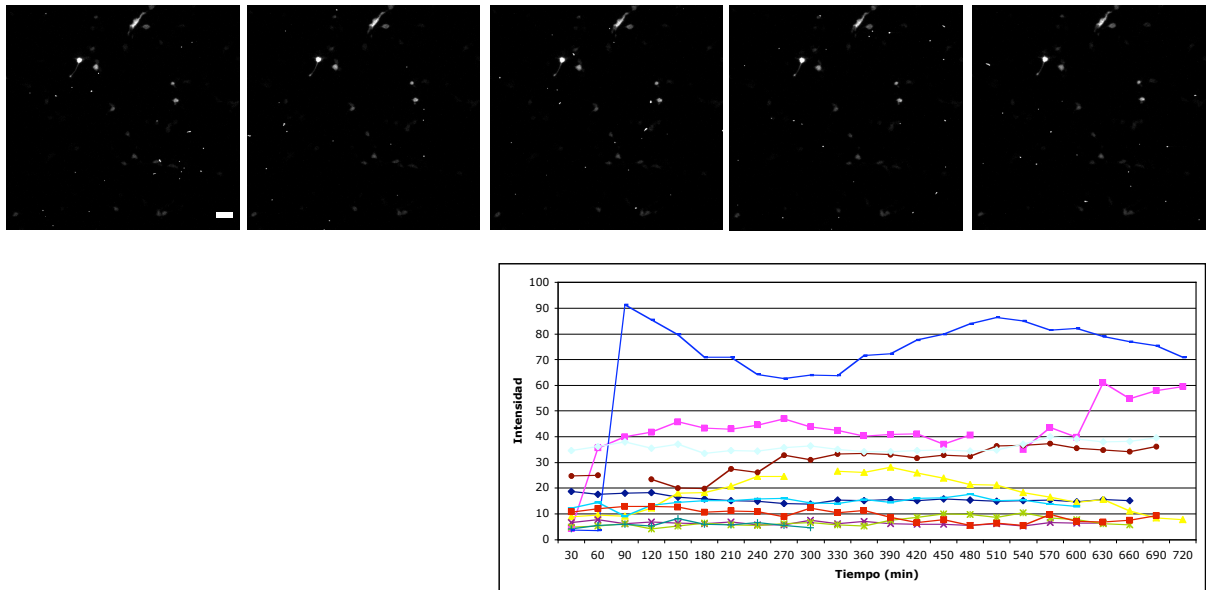


**B**



**Figura 32. Monitoreo de la actividad bioluminiscente en células HEK293T transfectadas con el plásmido SBShh.** A) Imágenes del monitoreo de la actividad bioluminiscente cada 30 min en células HEK293T no inducidas. Gráficas de intensidad respecto al tiempo de incubación generada a nivel de célula individual de la construcción SBShh para la condición no inducida. B) Imágenes del monitoreo de la actividad bioluminiscente cada 30 min en células HEK293T en condiciones inducidas. Gráficas de intensidad respecto al tiempo de incubación generada a nivel de célula individual de la construcción SBShh para la condición inducida. Los colores representan diferentes células analizadas en ambas gráficas. Barra de escala de 100  $\mu$ m.



**A****B**

**Figura 33. Monitoreo de la actividad bioluminiscente en células HEK293T transfectadas con el plásmido SFPShh.** A) Imágenes del monitoreo de la actividad bioluminiscente cada 30 min en células HEK293T no inducidas. Gráficas de intensidad respecto al tiempo de incubación generada a nivel de célula individual de la construcción SBShh para la condición no inducida. B) Imágenes del monitoreo de la actividad bioluminiscente cada 30 min en células HEK293T en condiciones inducidas. Gráficas de intensidad respecto al tiempo de incubación generada a nivel de célula individual de la construcción SBShh para la condición inducida. Los colores representan diferentes células analizadas en ambas gráficas. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ .

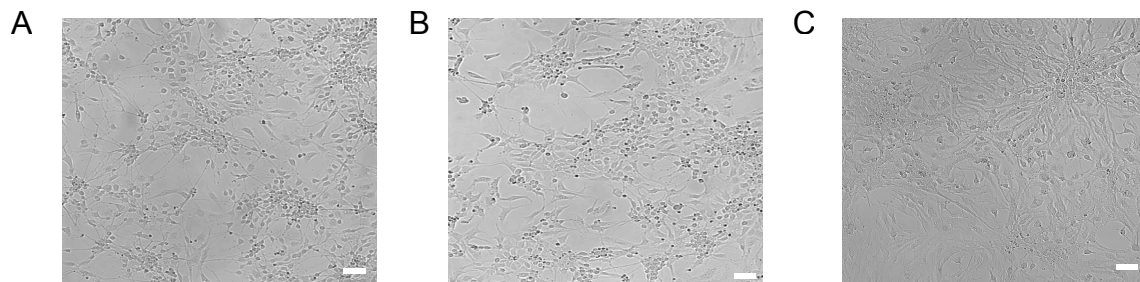
Estos experimentos nos permitieron establecer y optimizar condiciones de cultivo en microscopio para el monitoreo de la actividad bioluminiscente en células individuales. En las células HEK293T observamos rangos de expresión de Luc variables en cada las células individuales, sin observar una tendencia poblacional.



## Ensayo poblacional de la actividad bioluminiscente en cultivos P-P1

En respuesta a la necesidad de un contexto inductivo para probar la funcionalidad en la generación de actividad bioluminiscente a partir de los plásmidos construidos, decidimos utilizar células derivadas de cultivos primarios.

Las células de cultivos primarios se obtuvieron de la disgregación mecánica del tejido de regiones ventrales del mesencéfalo o metencéfalo y dorsales de embrión de ratón de 10.5 dpc (Fig. 34) fueron utilizadas después de un pase con la finalidad de estabilizar el cultivo *in vitro*, es decir, descartar células muertas y expandir el cultivo para el análisis posterior. A este cultivo lo denominamos cultivo P-P1 (primario-pase1).

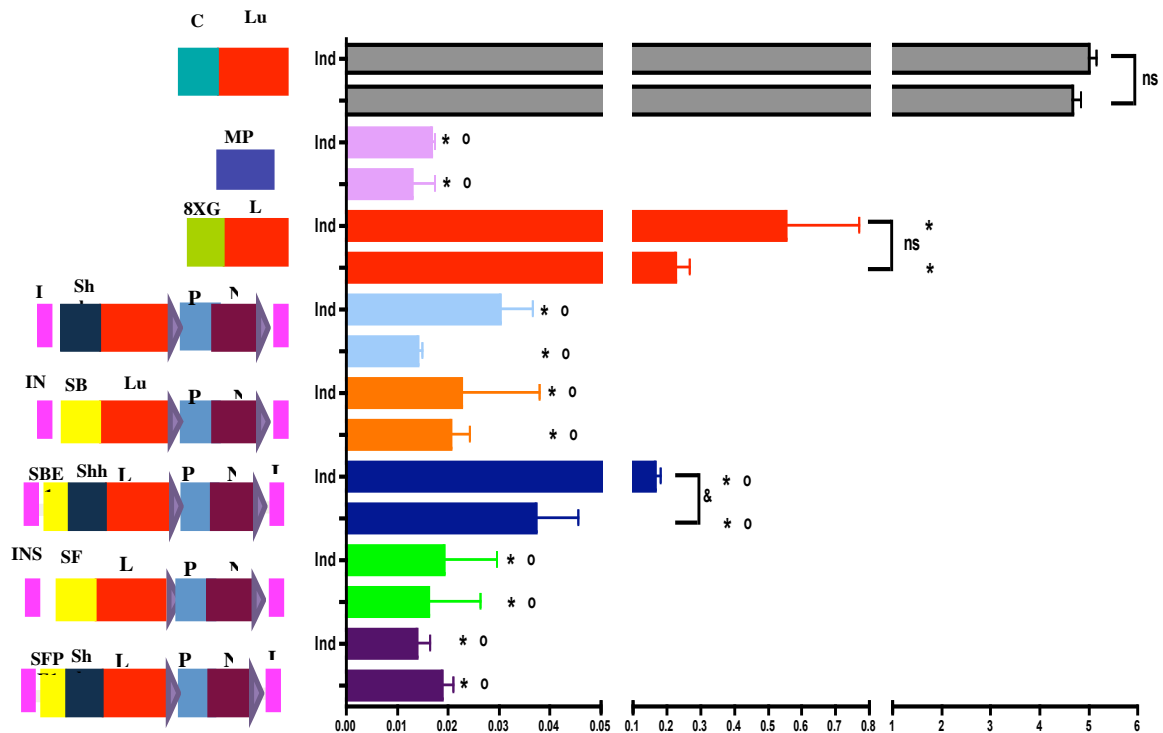


**Figura 34. Morfología de cultivo de células primarias. Células obtenidas mediante la disgregación mecánica de tejido.** A) Células dorsales de mesencéfalo. B) Células ventrales de mesencéfalo, C) Células ventrales de metencéfalo. Todas las imágenes se tomaron usando campo claro. Barra de escala 100 µm.

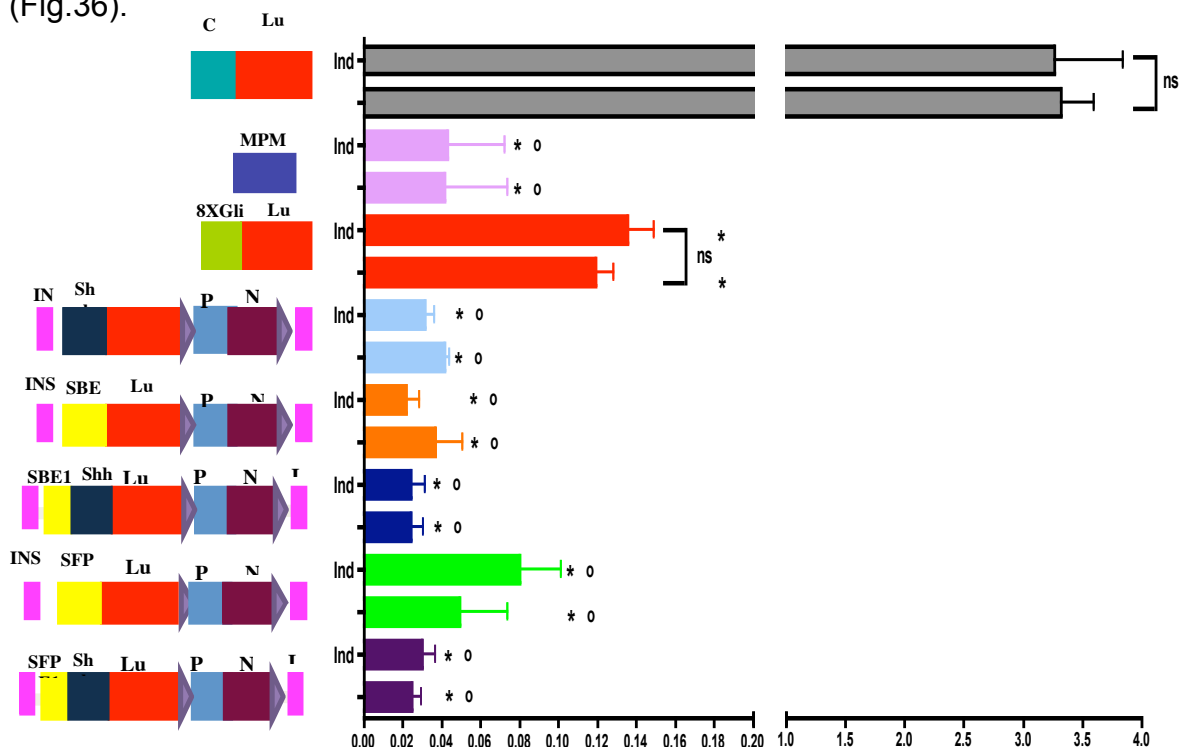
Estos cultivos brindan un contexto región-específico para la actividad de los potenciadores/promotor de *shh*, es decir, constituyen condiciones correspondientes tanto regional como temporal para los potenciadores. Utilizamos cultivos de mesencéfalo ventral para analizar la especificidad del inductor SBE1 y de metencéfalo ventral para el inductor SFPE1 correspondientes a sus regiones de expresión respectivamente. Además, usamos un cultivo P-P1 de células dorsales de mesencéfalo como control negativo. La eficiencia de transfección para estas células fue de 60%, esto se evaluó contando las células transfectadas con un plásmido que dirige la expresión de la proteína GFP bajo un promotor constitutivo.

Los valores de actividad bioluminiscente correspondientes a la luciferasa roja de escarabajo se normalizaron respecto a los valores de la actividad de Renilla obtenidos en los cultivos P-P1 transfectados con los plásmidos. Los datos normalizados se presentan en la gráfica contenida en la Fig. 35. Para cada una de las muestras se realizaron duplicados de 3 experimentos independientes.

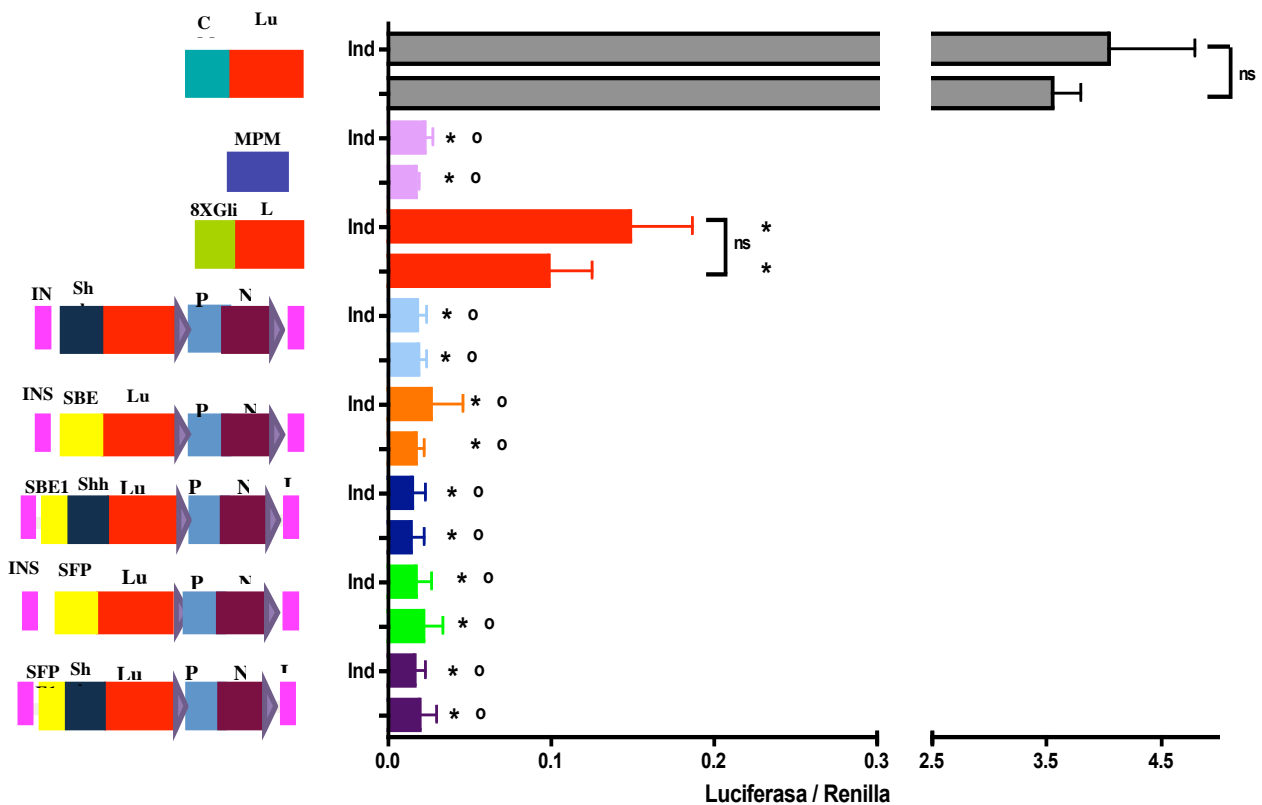
En cultivos P-P1 Vm, se determinó diferencia significativa entre la actividad bioluminiscente generada por los plásmidos control CMV y 8XG. Además, se observó diferencia significativa para las condiciones inductivas en el plásmido que contiene al inductor específico para la región del mesencéfalo ventral (SBE1) correspondiente a la zona de obtención del cultivo primario para el cultivo P-P1 Vm (Fig.35). Esto refleja la especificidad del plásmido SBSHh (SBE1-Shh-LucR-Neo-InsMAF) particularmente del inductor.



En los cultivos P-P1 dorsales se determinó diferencia significativa de la actividad bioluminiscente de luciferasa de escarabajo normalizada entre los plásmidos y los controles positivos (8XG y CMV, respectivamente). En ninguna construcción se observó diferencia significativa respecto a su versión inducida (Fig.36).



**Figura 36. Ensayo poblacional de la expresión de luciferasa en cultivos P-P1 dorsales de mesencéfalo.** Gráfica de los datos normalizados de la actividad bioluminiscente de luciferasa roja de escarabajo respecto a la actividad de renilla obtenidos de los lisados de cultivos P-P1 dorsales de mesencéfalo co-transfectados con el plásmido TK-Renilla y cada una de las construcciones: Shh (morado), SB (verde), SBSHh (azul marino), SFP (naranja), SFShh (azul), 8XG (rojo), MPMA (lila) y CMV (gris) obtenidos con el luminómetro manual. Las células se transfectaron y se analizó la actividad de luciferasa después de 24h (recuperación e inducción), tanto en condiciones inducidas con SAG (Ind) como no inducidas. Los asteriscos representan diferencia significativa respecto al plásmido CMV (gris) considerando tanto condiciones sin inducción como inducidas (ind). Los círculos representan diferencia significativa respecto al plásmido 8XG (rojo) considerando tanto condiciones sin inducción como inducidas (ind). Todas las diferencias significativas se evaluaron con  $P > 0.05$ , prueba Duncan. Ind, inducción; ns, no significativo



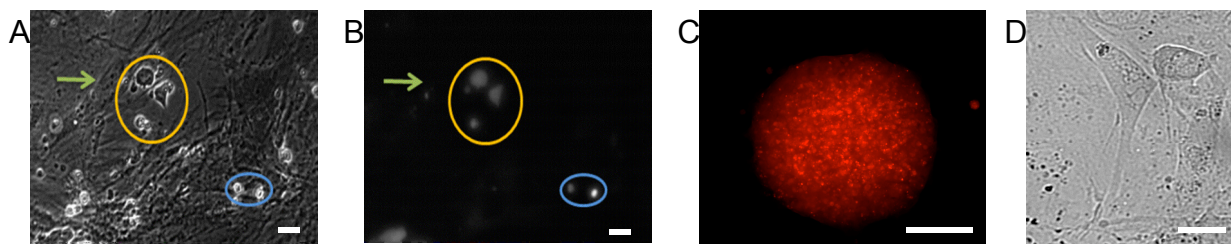
**Figura 37. Ensayo poblacional de la expresión de luciferasa en cultivos P-P1 ventrales de metencéfalo.** Gráfica de los datos normalizados de la actividad bioluminiscente de luciferasa de escarabajo respecto a renilla obtenidos de los lisados de cultivos primarios Vmt co-transfectados con el plásmido TK-Renilla y cada una de las construcciones: Shh (morado), SB (verde), SBSHh (azul marino), SFP (naranja), SFShh (azul), 8XG (rojo), MPMA (lila) y CMV (gris) obtenidos con el luminómetro manual. Las células se transfectaron y se analizó la actividad de luciferasa después de 24h (recuperación e inducción), tanto en condiciones inducidas con SAG (Ind) como no inducidas. Los asteriscos representan diferencia significativa respecto al plásmido CMV (gris) considerando tanto condiciones sin inducción como inducidas (ind). Los círculos representan diferencia significativa respecto al plásmido 8XG (rojo) considerando tanto condiciones sin inducción como inducidas (ind). Todas las diferencias significativas se evaluaron con  $P > 0.05$ , prueba Duncan. Ind, inducción; ns, no significativo

En los cultivos P-P1 Vmt, no observamos diferencias significativas entre plásmidos ni condiciones inducidas. Encontramos diferencias al comparar el nivel de expresión de luciferasa de los plásmidos respecto a los controles positivos (8XG y CMV, respectivamente); (Fig. 37).

Los cultivos P-P1 nos permitieron confirmar la especificidad de los elementos reguladores contenidos en los plásmidos, ya que solo observamos respuesta de los plásmidos encontrados en su región de expresión. Sin embargo, los valores de actividad bioluminiscente observada no fueron los esperados, sugiriendo que la actividad intrínseca de la luciferasa roja de escarabajo es de bajo nivel de expresión.

### Establecimiento de células estables y líneas celulares estables

El cultivo de CTEs nos permitió en un contexto *in vitro* y bajo condiciones controladas evaluar procesos que inducen diferenciación a diversos tipos celulares como hacia neuronas dopaminérgicas. En la fig. 38 se muestra la morfología de CTEs RFP<sup>+</sup>.



**Figura 38. Cultivos de diversos tipos celulares.** A) Colonias de CTEs, Imagen tomada utilizando campo claro. B) CTEs, Imagen tomada utilizando fluorescencia en el canal de ioduro de propidio. C) Cultivo de células troncales que expresan constitutivamente la proteína RFP<sup>+</sup>, fluorescencia en canal de ioduro de propidio. D) Células alimentadoras, imagen tomada utilizando campo claro. Barra de escala 100  $\mu$ m. Los círculos de colores (amarillo y azul) al igual que la flecha indican colonias de CTEs tanto en campo claro como en fluorescencia.

El término estable se refiere a CTEs de ratón que han integrado en su genoma un transgen de manera estable. Para generar células estables después del periodo de selección de 10 días con antibiótico (neo) todas las colonias en la caja se consideraron en conjunto (pool) para su posterior expansión. Para las líneas celulares estables, después del periodo de selección, las colonias se seleccionaron de manera individual como línea celular para su posterior expansión.

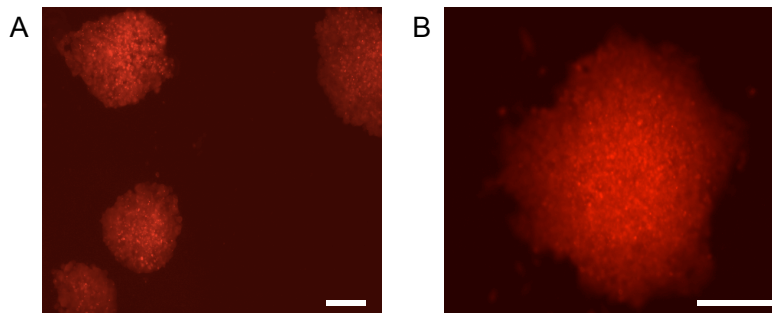
Se utilizaron CTEs que expresan de manera constitutiva la proteína rojo fluorescente (RFP<sup>+</sup>) para el establecimiento tanto de las células estables como de las líneas celulares estables donde los plásmidos construidos se integraron en el DNA de las células de manera estable.

Para el establecimiento de las células estables electroporamos células RFP<sup>+</sup> con los plásmidos: Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (Shh), SBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SBSHh) y SFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SFPSHh). Se cultivaron a las CTEs RFP<sup>+</sup> electroporadas en condiciones de selección con

neo durante 10 días para cada plásmido. Durante la etapa de selección se observó muerte celular característica de la etapa, al octavo día se empezaron a observar colonias de CTEs RFP<sup>+</sup> que integraron los plásmidos de manera estable confiriéndoles resistencia al antibiótico neo. Todas las colonias de CTEs RFP<sup>+</sup> se tripsinizaron ( $\approx 100$ ) en conjunto, se expandieron y congelaron, considerándolas células estables para cada uno de los plásmidos electroporados (Shh, SBShh y SFPShh). Posteriormente, se diferenciaron a nDA utilizando el protocolo de 5 pasos para diferenciar las CTEs a nDA y analizar la actividad bioluminiscente mediante la expresión de luciferasa dirigida por los plásmidos durante la diferenciación *in vitro*.

Para las líneas celulares estables se electroporaron células RFP<sup>+</sup> con los plásmidos: SBE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SBShh) y SFPE1-Shh-LucR-PGKNeo-InsMAF (SFPShh). Durante 10 días se seleccionaron utilizando el antibiótico neo, posteriormente se separaron las clonas individuales, se expandieron y se congelaron. Cada una de las clonas fue considerada como línea celular estable correspondiente al plásmido integrado en el genoma. Estas líneas se utilizaron para analizar la actividad bioluminiscente dirigida por los plásmidos bajo la actividad transcripcional de *shh*, para ello utilizamos protocolos de diferenciación *in vitro* (Método de 5 pasos).

Tanto las células estables como las líneas celulares estables presentaron morfología correspondiente a CTEs (Fig. 39).

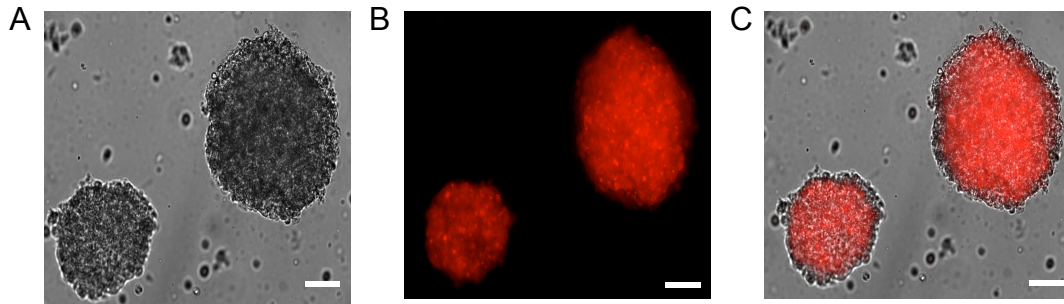


**Figura 39. Cultivos de células estables y líneas celulares estables que expresan luciferasa bajo el promotor de *shh*.** A) Colonias de la línea celular estable generada mediante la electroporación del plásmido SFPShh. B) Imagen de una clona de la línea celular estable electroporada con el plásmido de SFPShh. Ambas imágenes de fluorescencia (Canal de Ioduro de propidio). Barra de escala 100 $\mu$ m..

### **Análisis de la actividad bioluminiscente durante la diferenciación *in vitro* de CTEs a nDA**

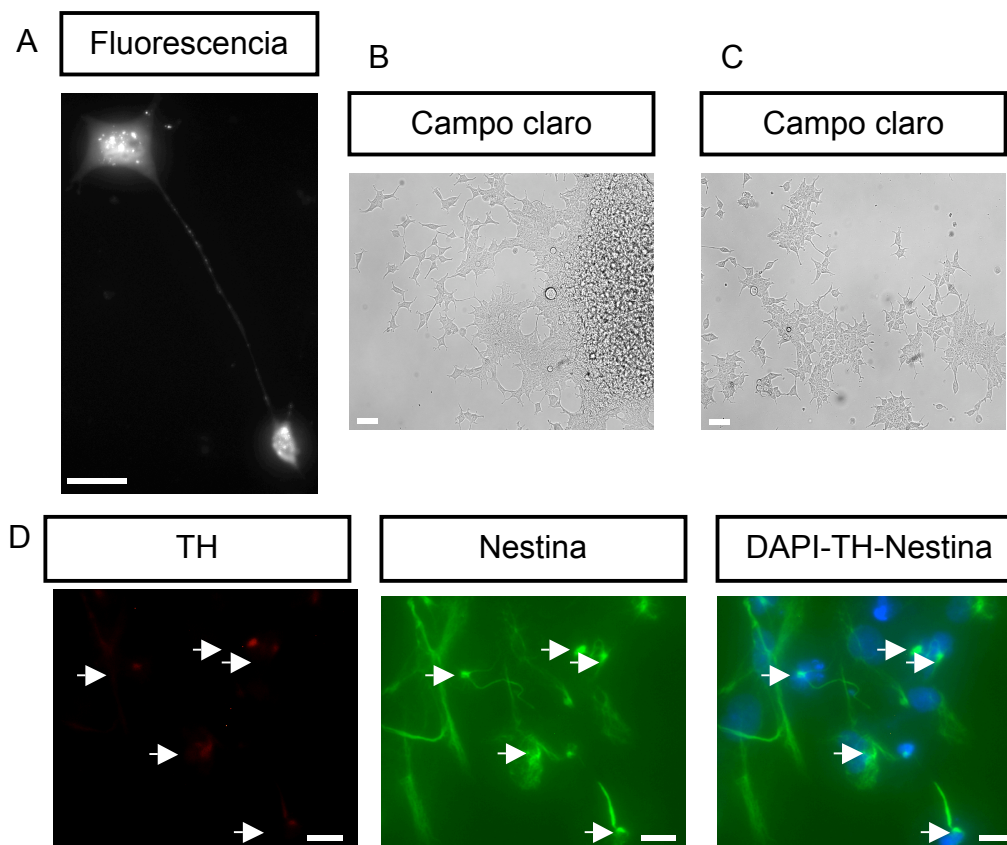
Como parte del protocolo que induce diferenciación se generaron cuerpos embrionarios (CE). La generación de estos CE es importante debido a que mimetizan la etapa de gastrulación, durante el proceso de diferenciación, en la cual se presentan las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). La producción de CE *in vitro* actúa como un proceso de pre-diferenciación, que genera un progreso en el desarrollo celular para posteriormente favorecer y dirigir la diferenciación a linajes específicos (Fig. 40).





**Figura 40. Cultivo de Cuerpos Embrionarios.** A) Cuerpos embrionarios RFP+; imagen en campo claro. B) Cuerpos embrionarios RFP+; imagen tomada en fluorescencia en el canal de rodamina. C) Superposición de la imagen de campo claro e imagen de fluorescencia. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ .

Utilizamos las células estables y las líneas celulares estables para analizar la actividad transcripcional de *shh* durante el proceso de diferenciación *in vitro* de CTEs a nDA. Usamos el protocolo de diferenciación de 5 pasos, obteniendo una eficiencia aproximada del 5% determinada por el número de nDA con expresión de TH respecto a las células Nestina<sup>+</sup> (Marcador neural); (Fig. 41).



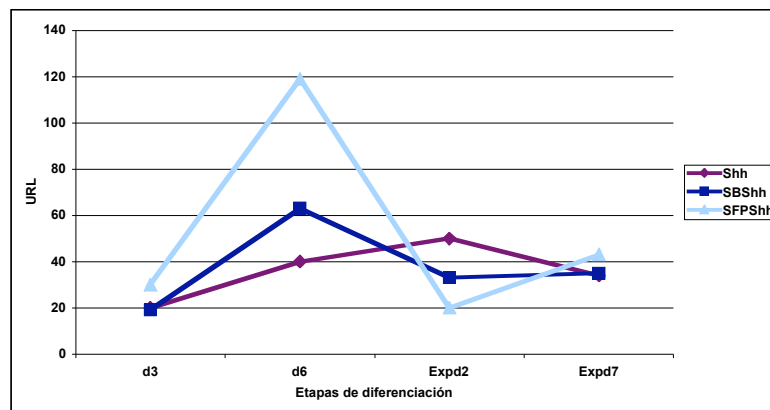
**Figura 41. Proceso de diferenciación *in vitro* a neuronas dopaminérgicas protocolo de 5 pasos.** A) Célula que expresa constitutivamente la proteína RFP+ de la línea celular SBShh diferenciada *in vitro*. Foto tomada en el canal de yodo de propidio. B y C) Células de la línea celular SBShh durante la etapa de selección del protocolo de diferenciación *in vitro* de 5 pasos día 1, día 5 respectivamente. Imagen tomada en campo claro. D) Inmunohistoquímica sobre células de la línea celular SBShh diferenciadas *in vitro* a neuronas dopaminérgicas, etapa final. TH = Rojo, Nestina = Verde (canal 488), Núcleos = Dapi (azul). Las flechas señalan las células que colocalizan para los 3 marcadores. Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ .

### a. Ensayos poblacionales de la actividad bioluminiscente en CTEs estables

Usando las células estables de los plásmidos: Shh, SBShh y SFPShh se analizó la actividad bioluminiscente regulada por la actividad transcripcional de *shh* durante la diferenciación *in vitro* de CTEs a nDA. Evaluamos lisados totales de diferentes etapas del protocolo de diferenciación (5 pasos) para células estables que integraron cada uno de los plásmidos.

Se recolectó el lisado celular para cada plásmido a los días 3 y 6 de la etapa de selección del protocolo de diferenciación y a los 2 y 7 días de la etapa de expansión (Fig.12, pág. 27). Se seleccionaron estas etapas debido a que se ha observado una mayor actividad transcripcional de *shh* durante etapas tempranas de la diferenciación a nDA (47).

A partir de los datos obtenidos de duplicados en dos experimentos independientes normalizados respecto al control negativo (vector vacío, sin gen de luciferasa) se graficaron y se presentan en la Fig. 43.



**Figura 43.** Gráfica de la expresión de luciferasa (URL) durante la diferenciación *in vitro* de CTEs estables (Shh, SBShh y SFPShh) a nDA usando el protocolo de 5 pasos. Gráfica de los datos de actividad bioluminiscente obtenidos de los lisados de CTEs estables de los plásmidos Shh, SB y SFP obtenidos usando un luminómetro manual. Se muestran datos para los días 3 de la etapa de selección (d3), día 6 de la etapa de selección (d6), día 2 de la etapa de expansión (Expd2), día 7 de la etapa de expansión (Expd7). Los valores se normalizaron respecto al control negativo (pMPMA2) y se muestra el promedio de duplicados.

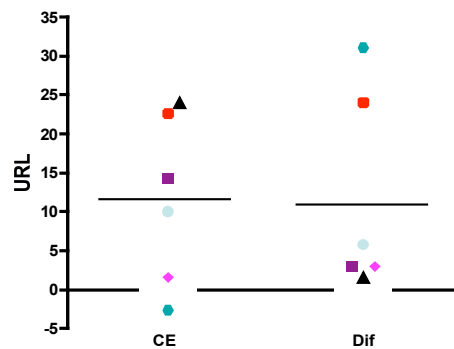
Los resultados normalizados respecto al vector vacío denotan una actividad bioluminiscente en un rango que va de 20 a 120 URL, en la ventana de tiempo analizada. Se observa un dinamismo en la expresión de luciferasa, es decir, los valores no permanecen constantes a lo largo de las etapas del proceso que induce la diferenciación. Sin embargo, los datos obtenidos hasta el momento, debido a la variabilidad no nos permiten determinar si hay diferencias significativas en la actividad bioluminiscente registrada para cada etapa en cada una de las células estables correspondientes a los plásmidos evaluados.

### f. Ensayos poblacionales de la actividad bioluminiscente en líneas celulares estables de CTEs

Analizamos la bioluminiscencia, durante la diferenciación *in vitro* de CTEs a nDA usando el protocolo de 5 pasos, en líneas celulares estables que se

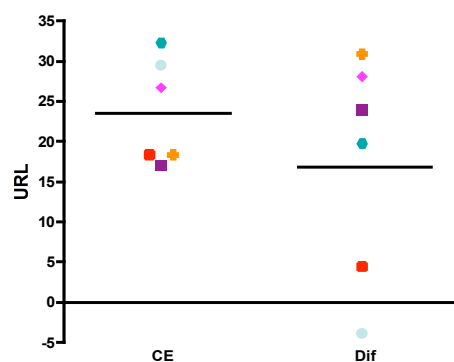
generaron por los plásmidos integrados al genoma de la célula. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente diferentes clones de las líneas celulares estables de ambos plásmidos, se expandió la población celular, se generaron los CE y se continuó con el protocolo de 5-pasos hasta la etapa de diferenciación a nDA. Se lisaron cultivos de ambas muestras tanto de la etapa de CE como de la de diferenciación. Se observó una gran variabilidad en los niveles de expresión de luciferasa para ambas líneas entre las diferentes clonas analizadas.

Las clonas de la línea celular SBSHh mostraron una gran variabilidad en la actividad bioluminiscente registrada tanto en la etapa de CE como en la etapa de diferenciación (Fig.44). La clona asignada con el color rojo fue la única que presentó valores de URL sobre el promedio que se obtuvo de todas las clonas que se analizaron en ambas condiciones (CE y diferenciación); (Fig. 44). Por su parte las clonas denotadas con color morado y azul tenue presentan una disminución en la actividad bioluminiscente entre la etapa de CE y de diferenciación del protocolo, esto es esperado debido a que se ha reportado una mayor expresión de Shh durante etapas tempranas de la diferenciación a nDA (47).



**Figura 44.** Gráfica de la expresión de luciferasa (URL) de distintas clonas de la línea celular SBSHh durante su diferenciación a nDA mediante el protocolo de 5 pasos. Gráfica que muestra la variabilidad de las diferentes clonas evaluadas en dos etapas del protocolo de diferenciación: formación de CE y diferenciación (Dif). Los colores identifican a las diferentes clonas analizadas. Los datos graficados se normalizaron respecto al control negativo.

De igual forma para la línea celular SFPShh se observó mucha variabilidad en la actividad bioluminiscente entre las clonas evaluadas (Fig. 45). Las clonas asignadas con color morado y rosa presentan valores de expresión en el rango del promedio generado por todas las clonas analizadas para ambas condiciones (Fig. 45). Las clonas de color rojo y azul claro presentan una disminución en la actividad bioluminiscente entre la etapa de CE y la de diferenciación del protocolo, esto es esperado debido a que se ha reportado mayor expresión de Shh durante etapas tempranas de la diferenciación a nDA *in vitro* (47).





**Figura 45. Gráfica de la expresión de luciferasa (URL) de distintas clonas de la línea celular SFPShh durante su diferenciación a nDA mediante el protocolo de 5 pasos.** Gráfica que muestra la variabilidad de las diferentes clonas evaluadas en dos etapas del protocolo de diferenciación: formación de CE y diferenciación (Dif). Los colores identifican a las diferentes clonas analizadas. Los datos graficados se normalizaron respecto al control negativo.

Los ensayos realizados durante la diferenciación *in vitro*, nos permiten confirmar la funcionalidad de los plásmidos para evaluar la actividad transcripcional de *shh* de manera dinámica. Sin embargo, las condiciones inherentes de los procesos de diferenciación dificultan la interpretación de los datos. Por ello, a partir de estos datos se determinarán las clonas que servirán para analizar la actividad transcripcional de *shh* a través de la expresión de luciferasa en contextos más específicos como los implantes celulares en la zona ventral de explantes de mesencéfalo o la generación de un ratón transgénico.

## Discusión

El estudio dinámico de la actividad de promotores de interés, involucrados en procesos de diferenciación, permite conocer los requerimientos de expresión de genes que participan en los procesos de diferenciación. Esta información es esencial para la aplicación futura de terapias de reemplazo celular para tratar enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, el proceso de diferenciación a nDA a partir de CTEs genera información que posibilita su aplicación al mejoramiento de estrategias de reemplazo celular para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (48).

A pesar del potencial pluripotente de las CTEs, existen varias limitaciones en su aplicación clínica, como son la dificultad para separar entre la población terapéutica y la endógena, la posibilidad de formación de teratomas y un posible rechazo inmunológico (49). Existen varias estrategias para contener estas limitaciones, algunos grupos de investigación han dirigido sus estudios a describir los procesos celulares a partir de CTEs (proliferación, diferenciación) y encontrar el contexto inductivo correcto para evitar la generación de otros tipos celulares diferentes a los requeridos.

Las proteínas reporteras se han utilizado para analizar la actividad de los elementos regulatorios de transcripción que actúan en *cis*, para así identificar la función y caracterizar la actividad transcripcional del elemento potenciador/promotor de genes de interés, ya que es posible correlacionar la expresión de la proteína reportera con la actividad transcripcional del gen de interés.

En este proyecto de investigación se construyeron plásmidos que nos permitirán analizar la actividad transcripcional del promotor y los potenciadores SBE1 y SFPE1 del gen *shh* en el proceso de diferenciación de CTEs a nDA, utilizando la luciferasa como proteína reportera. Se seleccionó el gen *shh* debido a su participación en varias etapas de la diferenciación dopaminérgica (inducción a nDA, precursor neural). Y en particular, por su función en la ventralización de las células en la etapa de precursor, cuando las células adquieren identidad de PP característica de este tipo de diferenciación neuronal (2, 12, 13).

Durante la diferenciación a nDA se ha observado un dinamismo en la actividad transcripcional de *shh*, ya que entre los días E9.5 y E11.5 de desarrollo disminuye su expresión al ser antagonizado por la expresión ventral del gen *wnt1* (25). Por esta razón se seleccionó a la luciferasa como proteína reportera ya que en los ensayos bioluminiscentes se presentan características que permiten monitorear el dinamismo de la expresión de genes debido a la vida media relativamente corta de la enzima luciferasa.

En los plásmidos que se construyeron se integraron los potenciadores SBE1 y SFPE1 que son 2 de los 6 potenciadores que regulan la expresión de Shh en diferentes regiones del tubo neural (1). Se seleccionaron estos dos elementos regulatorios debido a que el potenciador SBE1 dirige la expresión de *shh* a la región neurogénica que contempla al nicho de las nDA en el mesencéfalo mientras que el potenciador SFPE1 dirige la expresión de *shh* en una región caudal del tubo neural sin capacidad neurogénica (38), esto con la finalidad de determinar el requerimiento de especificidad regional de la expresión de *shh* durante la diferenciación a nDA.

De los 5 plásmidos que se construyeron (Fig.39), los dos que solo contienen a los potenciadores (SBE1 y SFPE1 respectivamente) para dirigir la expresión de luciferasa funcionaron como controles para determinar la actividad intrínseca de los potenciadores dirigiendo la expresión de la proteína reportera. Por otro lado, el plásmido que contiene solo al promotor de *shh* funcionó como control para evaluar la actividad basal por los potenciadores del promotor. De esta forma confirmamos que la expresión de la proteína reportera observada con los plásmidos SBE1/promotor\_ *shh* y SFPE1/promotor\_ *shh* corresponde específicamente a la actividad dirigida por el elemento potenciador/promotor de cada plásmido.

Todos los plásmidos se construyeron usando como base al vector pMPMA2 que se caracteriza por replicarse en un bajo número de copias, debido a que se probó que el promotor de Shh es tóxico para las bacterias al ser propagado en vectores que se replican en un alto número de copias (38).

Los plásmidos se transfectaron de manera transitoria en células HEK293T, estas células no son un modelo inductivo para la actividad transcripcional de *shh* por lo que observamos niveles de actividad bioluminiscente normalizada (luciferasa escarabajo/luciferasa renilla) prácticamente nula (Fig.31). A pesar de esto, los niveles de actividad bioluminiscente de luciferasa de escarabajo observados con los plásmidos SBE1/promotor\_ *shh* y SFPE1/promotor\_ *shh* nos permitieron establecer condiciones de incubación y monitoreo para las células HEK293T transfectadas en el microscopio de luminiscencia (Fig. 32 y 33).

Solamente el plásmido SBE1/promotor\_ *shh* presentó actividad bioluminiscente específica en las células correspondientes a su región de expresión (cultivo P-P1 Vm); (1). Además, se observó un efecto responsivo al inducir con el agonista SAG. El efecto responsivo observado corresponde a la presencia del factor transcripcional FoxA2 en los cultivos P-P1 induciendo la actividad del inductor SBE1 al unirse a su secuencia (Fig.34); (38).

Adjudicamos la baja expresión de la proteína reportera en los cultivos P-P1 principalmente a la heterogeneidad del cultivo y a los bajos niveles de expresión del promotor de *shh* (49). Es decir, las células responsivas para la actividad transcripcional del elemento potenciador/promotor de *shh* representa solo una población dentro del cultivo y los ensayos de luminiscencia se realizaron con los cultivos totales. Hemos considerado separar las poblaciones mediante el uso de marcadores utilizando citometría de flujo para lograr evaluar la expresión de la proteína reportera en la población adecuada.

Para los 3 plásmidos (promotor\_ *shh*, SBE1/promotor\_ *shh* y SFPE1/promotor\_ *shh*) evaluados en células estables, se observó un dinamismo en la expresión de luciferasa determinado por una tendencia a disminuir los niveles en la actividad transcripcional de *shh* durante las etapas evaluadas de la diferenciación *in vitro* a nDA (Fig.43); (2, 12, 13). Sin embargo, el número de repeticiones y duplicados realizados no nos permiten realizar un análisis estadístico.

En las líneas celulares estables (SBE1/promotor\_ *shh* y SFPE1/promotor\_ *shh*) los datos muestran cambios en los niveles de actividad bioluminiscente durante la diferenciación *in vitro* (Fig.44 y 45), a partir de estos datos se pretenden seleccionar clonas que representen una tendencia en la expresión de la proteína reportera de las diferentes líneas evaluadas para llevarlas a un contexto que presente las señales que promuevan la diferenciación (explantes de mesencéfalo) y evaluar la actividad transcripcional del elemento potenciador/promotor de *shh* contenido en los plásmidos.

Tanto para las células estables como para las líneas celulares estables, se utilizó el protocolo de diferenciación *in vitro* de 5-pasos, consideramos como una variable importante la heterogeneidad en la diferenciación celular determinada por la presencia de diferentes poblaciones y por la baja eficiencia (5%) de diferenciación del protocolo, lo cual es importante considerar para la interpretación de los resultados (31, 32).

La variabilidad y bajos niveles de expresión de la proteína reportera registrados en todos los modelos celulares (HEK293T y cultivos primarios) y condiciones (CTEs diferenciadas *in vitro* a nDA) pueden deberse a: la baja expresión intrínseca de la proteína luciferasa, la baja actividad del potenciador/promotor de *shh* y/o la necesidad de un contexto complejo e inductivo, determinado por procesos limitados de regulación transcripcional para el gen *shh* en tiempos específicos.

Para contender con estas limitaciones, consideramos estrategias donde se favorezca y seleccione la población inducida para la actividad transcripcional de los elementos potenciador/promotor de *shh* como por ejemplo: añadiendo factores al cultivo y seleccionando la población mediante marcadores específicos (FoxA2, FP4) utilizando técnicas como la citometría de flujo (46).

Otra estrategia que consideramos para analizar la actividad bioluminiscente es electroporar los plásmidos directamente a la zona ventral del tejido de mesencéfalo, ya que el mesencéfalo funciona como una matriz inductiva ya que contiene todas las señales necesarias para inducir la diferenciación a nDA incluyendo expresión del gene *shh* (46).

Además, tenemos considerado emplear las líneas celulares de CTEs que obtuvimos (SBS*Shh* y SFPS*Shh*) para generar un ratón transgénico que nos permita monitorear la actividad transcripcional de *shh* en explantes de mesencéfalo.

Por otro lado, la modificación de los plásmidos, son una manera de mejorar nuestras herramientas, las cuales nos permitirán utilizarlas de manera más eficiente en el análisis de la actividad transcripcional del gen *shh*. En este aspecto hemos considerado cambiar a la proteína reportera, luciferasa roja del escarabajo (*Pyrophorus plagiophthalmus*) por la proteína luciferasa ELuc(-) debido a que trabajos en el laboratorio (proyecto de maestría de Daniel Fuentes) nos han proporcionado información que indican que esta proteína tiene una mayor actividad bioluminiscente bajo un mismo promotor y en las mismas condiciones, es decir, presenta una mayor capacidad de expresión intrínseca.

Además existen sistemas que permiten amplificar la expresión de las proteínas reporteras cuando están bajo la actividad transcripcional de promotores débiles como el nuestro. El sistema de amplificación transcripcional de dos pasos (TSTA, del inglés two step transcriptional amplification) utiliza al gen *gal4* acoplado a un promotor específico y fuerte involucrado en el proceso de interés, para generar activadores transcripcionales que amplificarán la señal del promotor acoplado a la proteína reportera (Fig. 46); (49). Para las herramientas diseñadas en este trabajo, se ha considerado colocar al gen *gal4* bajo la actividad del gen *nestina* y de esa manera amplificar la actividad transcripcional de los elementos potenciador/promotor de *shh* y favorecer la expresión de luciferasa.

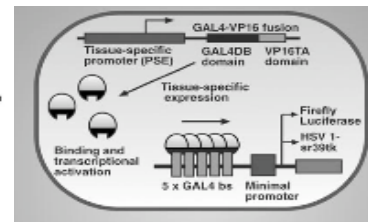


Figura 46. Esquema del sistema TSTA.

## Conclusiones

Se construyeron 5 plásmidos para analizar de manera dinámica la actividad transcripcional del elemento potenciador/promotor de *shh* usando a la proteína luciferasa como reportero.

Las células HEK293T sirvieron como modelo para evaluar si los plásmidos dirigían la expresión de la proteína luciferasa de escarabajo analizando la actividad bioluminiscente en células transfectadas transitoriamente. Se determinó la necesidad de un contexto específico para los elementos regulatorios. Además, nos permitieron estandarizar condiciones en el microscopio de luminiscencia para el monitoreo de actividad bioluminiscente durante largos periodos de incubación.

Por otra parte, los cultivos primarios permitieron evaluar la expresión de la luciferasa de escarabajo en un contexto región-específico para los potenciadores en los plásmidos.

El plásmido SBE1Shh presentó actividad bioluminiscente sólo en las células provenientes del mesencéfalo ventral que corresponde a la región donde se expresa el potenciador SBE1. Además, respondió a las condiciones de inducción del agonista de Smo registrando un valor significativamente mayor respecto al observado en condiciones no inducidas.

Se lograron generar CTEs que integraron, de manera estable, los plásmidos en su genoma: Células estables y líneas celulares estables.

Con las células estables se observó dinamismo en la expresión de la proteína luciferasa indicando diferentes niveles de la actividad transcripcional de *shh* en las etapas evaluadas del proceso de diferenciación *in vitro* a nDA. A pesar de que se registraron niveles bajos de actividad bioluminiscente Reflejando lo reportado sobre los niveles de expresión de Shh durante la diferenciación de NDA y la capacidad de monitorear la actividad transcripcional a partir de los elementos potenciador/promotor de *shh* incluidos en los plásmidos.

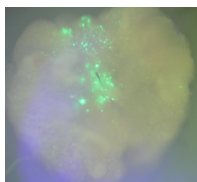
El modelo de diferenciación *in vitro* a nDA nos permitió determinar la actividad bioluminiscente para las diferentes líneas celulares en diversas etapas del proceso de diferenciación, además se observó mucha variabilidad en los niveles de expresión de luciferasa de escarabajo durante las etapas evaluadas de la diferenciación *in vitro* a nDA. Estos datos nos permitirán elegir clonas que servirán para analizar la actividad transcripcional del elemento potenciador/promotor de *shh* al ser implantadas en explantes de mesencéfalo.

## Perspectivas

Debido a que la expresión de Shh se puede detectar desde la etapa de 9.5 dpc se ha planteado obtener cultivos primarios de células Vm, Vd y Vmt en ese estadio del desarrollo embrionario para transfectar y analizar la actividad transcripcional del elemento potenciador/promotor de *shh* mediante la expresión de luciferasa.

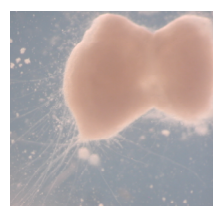
Usar la construcción SBE1/promotor\_ *shh* para monitorear la expresión de luciferasa de escarabajo en cultivos primarios de células Vm en el microscopio de luminiscencia, hasta el momento solo se han registrado un par de células, observando dinamismo en la actividad transcripcional, es decir, un cambio en la actividad bioluminiscente durante el periodo de incubación.

Se están estableciendo las condiciones de electroporación de tejido de mesencéfalo, para posteriormente electroporar explantes de mesencéfalo con los plásmidos obtenidos y analizar la actividad bioluminiscente directamente en el tejido (Fig.47).



**Figura 47.** Explante de mesencéfalo de 10.5 dpc electroporado con plásmido que expresa la proteína GFP bajo un promotor constitutivo (CMV).

Utilizando el modelo de explantes de mesencéfalo embrionario de 10.5 dpc para implantar CTEs al nicho de las nDA (zona ventral del mesencéfalo) y diferenciarlas, se implantarán CTEs de las líneas estables y se analizará la actividad bioluminiscente. Además, se establecerán las condiciones para monitorear la expresión de la proteína reportera luciferasa en células implantadas en los explantes de mesencéfalo utilizando el microscopio de luminiscencia (Fig. 48).



**Figura 48.** Explante de mesencéfalo de 10.5 dpc cultivado durante 7 días.

Modificar los plásmidos: 1) Cambiar el gen de la luciferasa de escarabajo por el de la luciferasa ELuc; y, 2) Utilizar el sistema TSTA para amplificar la señal del promotor de *shh* (Fig.46).

# Anexos

## 1. Neuronas Dopaminérgicas (nDA)

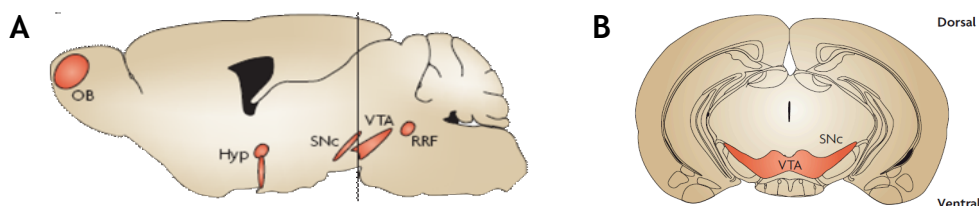
Existen diversos tipos de nDA que se localizan en el telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo (Ver adelante, Fig. 50). Todas las nDA comparten la expresión de genes involucrados en la ruta de síntesis y transporte de dopamina (DA); (Fig.49); (15). La enzima tirosina hidroxilasa (TH) cataliza la reacción limitante en la biosíntesis del neurotransmisor, por ello es ampliamente utilizada como marcador para nDA maduras. Sin embargo, no es específica ya que también está involucrada en la síntesis de otras catecolaminas como noradrenalina y adrenalina (16). Por ello, para identificar los diferentes tipos de nDA se busca que expresen TH y otro marcador específico, por ejemplo para las nDAm se utiliza Ptx3.



**Figura 49. Síntesis de dopamina (DA).** La fenilalanina y tirosina son aminoácidos esenciales para la síntesis del neurotransmisor, por lo tanto requieren incluirse en la dieta de los organismos. La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante en la biosíntesis de dopamina.

En el cerebro adulto el 75% de las nDA se encuentran en el mesencéfalo (17). Estas neuronas controlan los movimientos voluntarios y regulan el comportamiento relacionado a emociones, además están relacionadas con diversos desordenes psiquiátricos y neurológicos como la enfermedad de Parkinson y las alucinaciones (18, 19), además de estar involucradas en la generación de mecanismos de recompensa y en el desarrollo de comportamientos adictivos como el abuso de drogas (20).

Las nDAm se organizan en tres grupos dependiendo de la región en la que se ubican: las del área ventral tegmental (VTA), las del campo retrorubral (RRF) y las referidas a la sustancia nigra pars compacta (SNpc); (Fig.50); (10). Las neuronas del VTA regulan mecanismos de recompensa, novedad y adicción (21) y proyectan en las vías mesolímbica y mesocortical (22). Las neuronas del RRF regulan la actividad de las nDA de la SNpC (21), mientras que las de la SNpC están involucradas en el control del movimiento voluntario (23) y proyectan en la ruta nigroestriatal. Estas representan aproximadamente la mitad del total de las nDAm (22).



**Figura 50. Esquema de los grupos de nDA.** (A) Corte sagital de cerebro de ratón adulto, la línea vertical a la altura del mesencéfalo hace referencia al corte coronal mostrado en la imagen de la derecha (B). OB, bulbo olfatorio; Hyp, hipotálamo; SNpc, Sustancia nigra pars compacta; VTA, área ventral tegmental; RRF, campo retrorubral. (10).



## 2. Luciferasa Renilla

El gen luc codifica a la enzima luciferasa renilla (480 nm), para formar un monómero de 36kDa que no se modifica post-traduccionalmente. Esta enzima es requerida para el análisis de resultados, ya que la actividad del gen reportero se debe normalizar, discriminando la diferencia en el número celular y la eficiencia de transfección.

Por ello se co-transfecta la enzima luciferasa Renilla que se expresa bajo la actividad de un promotor constitutivo; con la finalidad de emplearse como control interno en los ensayos de bioluminiscencia. Su reacción enzimática requiere de un sustrato diferente, la coelenterazina (Fig. 51).

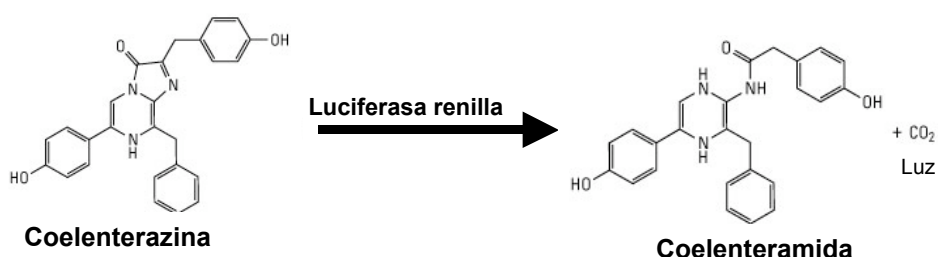


Figura 51. Reacción enzimática de la luciferasa Renilla. Reacción catalizada por la enzima luciferasa Renilla sobre su sustrato coelenterazina produciendo coelenteramida y luz.

## 3. Lista de enzimas

En la tabla 5 se enlistan las enzimas utilizadas en este proyecto.

Tabla 5. Enzimas de Restricción			
Enzima	Concentración	Marca	Núm. Catálogo
Apa I	10 U/ $\mu$ l	Fermentas	ER1411
Avr II	4 U/ $\mu$ l	BioLabs	RO174 S
Bam HI	20 U/ $\mu$ l	BioLabs	R0136 S
Bgl I	10 U/ $\mu$ l	Roche	621 641
Bgl II	10 U/ $\mu$ l	BioLabs	RO144 S
Cla I	5 U/ $\mu$ l	Biolabs	R0197S
Dra I	10 U/ $\mu$ l	Boehringer	779 695
Eco RI	10 U/ $\mu$ l	Fermentas	ERO271
Eco RV (Eco321)	10 U/m	Fermentas	ER0301
FspAI	5 U/ $\mu$ l	Fermentas	ERI1661
Hinc II	10 U/ $\mu$ l	BioLabs	103 L

Hind III	10 U/μl	Fermentas	ERO501
Mlsl (Bal I)	5 U/μl	Fermentas	ERI211
Mssl (Pmel)	5 U/μl	Fermentas	ER1342
Not I	10 U/μl	Fermentas	ERO591
Sac I	10 U/μl	Fermentas	ER1131
Sca II	20 U/μl	Biolabs	RO157S
Sal I	10 U/μl	Fermentas	ER0641
Sma I	8 U/μl	Amersham	E1085 Y
Spe I (Bcu I)	10 U/μl	Fermentas	RO133 S
Xbal	10 U/μl	Fermentas	ER0681
Xho I	10 U/μl	Fermentas	ERO691
Xmal	2 U/μl	Biolabs	180L
Xmnl	20 U/μl	Biolabs	R0194 S

#### 4. Softwares utilizados

##### ❖ Axiovision (Zeiss)

Software de manipulación de imágenes. Entre sus especificaciones destacamos las siguientes:

- Permite controlar interactivamente al microscopio y sus componentes (ventiladores, calentadores, inyector de CO<sub>2</sub>, etc.).
- Adquiere imágenes de alta resolución
- Ajusta parámetros y asigna escalas instantáneamente
- Generar imágenes con su información tanto del microscopio como de cámaras acopladas en formato ZVI
- Se configura en interfaz con Windows
- Observar imágenes multidimensionales en cualquier dimensión
- Ajustar tiempos de exposición

Este programa lo utilizamos para adquirir las imágenes de fluorescencia.

Página web:

[http://microscopy.zeiss.com/microscopy/en\\_de/products/software/axiovision-for-biology.html](http://microscopy.zeiss.com/microscopy/en_de/products/software/axiovision-for-biology.html)

##### ❖ Image J

Programa de procesamiento de imagen digital gratuito, es una plataforma popular, programada en Java. Es compatible con todos los sistemas operativos (Windows, Mac, Linux).

El programa puede mostrar, editar, analizar, procesar, guardar e imprimir imágenes (8, 16 y 32 bits). Lee varios formatos de imagen (TIFF, PNG, GIF, BMP, ZVI, entre otros). Genera películas, calcula área y estadísticas de píxeles seleccionados por el usuario, además mide intensidad. Permite la manipulación de imágenes (contraste, nitidez, brillo, etc.).

Este programa lo utilizamos para manejar las imágenes de los geles de agarosa presentados en esta tesis y para adquirir las imágenes de los cultivos incubados en el microscopio de luminiscencia.

Página web:

<http://difusion.df.uba.ar/ConectarIgualdad/ImageJ.pdf>

### ❖ CellProfiler

Software gratuito que permite medir cuantitativamente muchas imágenes de manera automática. Permite especificar el objeto de interés (células únicas) y medirle sus propiedades, mediante el uso de filtros que especifiquen los criterios a considerar (tamaño, forma). Tiene la capacidad de medir características como morfología, intensidad y tamaño.

Este programa lo utilizamos para analizar las imágenes de los cultivos incubados en el microscopio que utilizamos para observar la actividad bioluminiscente de las células. El análisis nos arrojó datos que nos permitieron graficar la intensidad luminosa registrada por células únicas durante los periodos de incubación, a partir de estos datos generamos las gráficas que se presentan en esta tesis.

Página web:

<http://www.cellprofiler.org/>

## 5. Aislantes

Los aislantes (insulators, INS) son complejos de proteína-DNA que intervienen en las interacciones, en forma cis o trans, con diferentes regiones del genoma. Aunque originalmente fueron descritos en *Drosophila* por tener la capacidad de bloquear la comunicación potenciador-promotor, actualmente se sabe que participan en una variedad de procesos del núcleo. Entre algunas de las funciones conocidas de los insulators se sabe que sirven como barreras para que no haya una extensión de la heterocromatina. Además regulan los límites entre un estado epigenético y otro. Inclusive se han reportado que sirven de andamiaje para interacciones intra y extracromosomales entre diferentes regiones del genoma.

Yang J y VG Corces. 2012. Insulators, long range interactions, and genome function. *Curr Opin Genet Dev* 22(2):86-92 PMID 22265227.

## 6. Cepas E. Coli: DH5 $\alpha$ y Sure

### DH5 $\alpha$

Genotipo: F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  
\_80dlacZ\_M15 \_(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), \_-

### Referencias:

- FOCUS (1986) 8:2, 9.
- Hanahan, D. (1985) in DNA Cloning: A Practical Approach (Glover, D.M., ed.), Vol. 1, p. 109, IRL Press, McLean, Virginia.
- Grant, S.G.N. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4645-4649 [PMID 2162051](#).
- Meselson M. and Yuan R. (1968) Nature 217:1110 [PMID 4868368](#).

### Sure (Stratagene)

Genotipo: endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC  
umuC::Tn5 uvrC e14- \_(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[ proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>  
lacZ\_M15 Tn10]

Esta cepa de E. Coli presenta una baja tasa de recombinación lo que permite aumentar la estabilidad de plásmidos con secuencias repetidas. Esta característica le confiere la falta de componentes de vías que catalizan el rearrreglo y delección de DNA.

### Página web:

<http://www.genomics.agilent.com/files/PDF/CofALot0006155162.pdf?ts=41255.645511169>

## 7. Agonista de Smo, SAG

La señalización de Hedgehog (Hh) funciona normalmente durante la embriogénesis en la proliferación y diferenciación celular. Una activación inusual está asociada a la formación de tumores. Smoothened (Smo) es un regulador central en la señalización de Hh durante el desarrollo embrionario, ya que es capaz de iniciar o transmitir una vía de activación ligando-independiente en la tumorigénesis. En la embriogénesis la regulación de Smo puede ser bloqueada por un alcaloide llamado ciclopamina lo que daría un efecto antagonista de la vía de Hh. Por otro lado SAG es un agonista de la vía de Hh al unirse a Smo y antagonizar la acción de la ciclopamina.

Santa Cruz, Smoothened Agonist, HCl (CAS 364590-63-6).

Chen JK, J Taipale, KE Young, T Maiti, PA Bachy. 2002. Small molecule modulation of Smoothened activity. Proc Natl Acad Sci U S A 99(22):14071-6 [PMID 12391318](#).

## 8. Materiales y métodos

Soluciones

### Para cultivo de células

#### a. **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO)**

El medio de cultivo se disuelve en 900 mL de agua estéril con 3.7g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM) ; luego se ajusta el pH a 6.9 con HCl 1N y posteriormente se afora a 1L. Finalmente, se esteriliza por filtrado en campana de flujo laminar.

#### b. **Suero Fetal Bovino inactivado (SFB; GIBCO)**

El suero fetal bovino se inactiva calentándolo a 56°C por 30 min., posteriormente se alícuota y almacena a -20°C. Las alícuotas se pueden mantener a 4°C hasta por 1 mes.

#### c. **$\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -MeOH; SIGMA)**

Para preparar 100 mL de solución 100X (10 mM) de  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -MeOH) se mezclan 72  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -MeOH 14 M en 100 mL de PBS IX. Posteriormente se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . La solución se almacena a 4°C hasta por 2 meses.

#### d. **Glutamax/Penicilina/Estreptomicina (GPS; GIBCO/SIGMA)**

Para preparar una solución 100X de GPS, de un frasco de 100 mL de Glutamax (200 mM) se transfieren 10 mL a un tubo para disolver 300 mg de penicilina y 500 mg de estreptomicina en los 10 mL de Glutamax. Los 10 mL se esterilizan por filtración en una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se agregan a los 90 mL restantes de la botella de Glutamax, se mezcla y alícuota en tubos Falcon de 15 mL y se guarda a -20°C. Las alícuotas descongeladas se pueden mantener a 4°C por 1 mes.

#### e. **Piruvato de Sodio 100X (GIBCO)**

#### f. **Aminoácidos no esenciales 100X (GIBCO)**

#### g. **Solución amortiguadora de fosfatos 1X (Phosphate Buffered saline, PBS1X):**

Para preparar 1L se mezclan 8 g de NaCl (8mM), 0.2 g de KCl (20 $\mu\text{M}$ ), 1.44 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2mM) y 0.27g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (20 $\mu\text{M}$ ) en 900 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1N. Se afora a 1 L en matraz. Finalmente se esteriliza por filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  o en la autoclave.

#### h. **Gelatina 1%**

Para preparar 300 mL de gelatina 1% se agregan 3 g de gelatina en polvo en 300 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  grado cultivo, posteriormente se disuelve con calor en el microondas y se esteriliza en autoclave. Para ser utilizada la solución se prepara al 0.1% en  $\text{H}_2\text{O}$  grado cultivo.

#### i. **Verseno (EDTA 0.02%)**

Se mezclan 10 mg de EDTA 4N en 50 mL de PBS y se esteriliza por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m.

**j. Tripsina 0.25%**

Se diluye el stock de tripsina (2.5%) con Verseno para obtener la concentración deseada, 0.25%.

**k. Factor Inhibidor de Leucemia (Leukemia Inhibitory Factor o LIF)**

Tomar 100  $\mu$ L del stock y mezclarlos con 900  $\mu$ L de medio M15, enriquecido con albúmina bovina a una concentración final de 1 mg/mL. De la solución preparada, poner 10  $\mu$ L (1000U) por mL de medio.

**l. Mitomicina C**

Para preparar un stock 50X, se toman 0.5mL de PBS 1X y se inyectan con una jeringa de 1mL al frasco de mitomicina de 2 mg, disolver completamente, pasar el contenido a 3.5 mL de PBS 1X y almacenar a 4° C en oscuridad hasta 1 mes.

**m. Medio M15**

Para 200 mL de medio M15 mezclar 162 mL de DMEM (pH =7), 30 mL de SFB-ES inactivado, 2 mL de  $\beta$ -MeOH 100X, 2 mL de GPS 100X, 2 mL de Aminoácidos no esenciales 100X y 2 mL de Piruvato de sodio 100X. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m y almacenar a 4° C.

**n. Medio de cultivo para células alimentadoras STO**

Para 200 mL de medio STO mezclar 184 mL de DMEM (pH =7), 14 mL de SFB inactivado y 2 mL de GPS 100X. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m y almacenar a 4° C.

**n. Medio de Congelación 2X**

Para 25 mL de medio de congelación 2X mezclar 15 mL de DMEM (pH =7), 5 mL de DMSO grado cultivo y 5 mL de SFB inactivado. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m y almacenar a 4° C.

**p. Medio ITSFn para selección de células precursoras neurales**

Para 50 mL de medio ITSFn se mezclan 48.41 mL de DMEM/F12 sin HEPES (pH =7), 62.4  $\mu$ L de Insulina 4 mg/mL, 625  $\mu$ L de Transferrina 4 mg/mL, 150  $\mu$ L de Selenita de sodio 10 mM, 250  $\mu$ L de Fibronectina 1 mg/mL y 500  $\mu$ L de GPS 100X. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m y almacenar a 4° C

**q. Medio para expansión de células precursoras neurales.**

Para 50 mL de medio de expansión se mezclan 48.5 mL de DMEM/F12 sin HEPES (pH =7), 500  $\mu$ L de N2 100X, 500  $\mu$ L de GPS 100X y 59  $\mu$ L Laminina 0.85  $\mu$ g/mL. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m y almacenar a 4° C.

**r. Factores de crecimiento.**

Preparar a las siguientes concentraciones: Fgf2 1 ng/mL, Fgf8 5 ng/mL y Shh 25 ng/mL.

**s. Medio para diferenciación de células precursoras neurales a neuronas dopaminérgicas.**

Para 50 mL de medio de expansión se mezclan 48.5 mL de DMEM/F12 sin HEPES (pH =7), 500 µL de N2 100X, 500 µL de GPS 100X, 59 µL Laminina 0.85 µg/m y 500 µL de ácido ascórbico 10 M. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22 µm y almacenar a 4° C.

**t. Medio para cultivo primario de cerebro (mesencéfalo, metencéfalo)**

Para 50 mL de medio se mezclan 24.5 mL de DMEM/F12 con HEPES (pH =7), 24.5 mL de neurobasal, 500 µL B27, 250 µL de N2 100X, 250 µL de GPS 100X y 50 µL β-mercaptoetanol. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22 µm y almacenar a 4° C. Al cultivo se le agrega Fgf2 en una concentración de 10µg/mL.

**Para cultivo de explantes en colágeno**

**a. Medio Optimix**

Para 15 mL de medio Optimem se mezclan 10.8 mL de Optimem, 3.75 mL de DMEM/F12 con HEPES, 300 µL de Glucosa 2M y 150 µL de GPS 100X. Esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22 µm y almacenar a 4° C.

**b. NaCl 1.5 M**

Disolver 0.8766g de NaCl en 10 mL de agua

**c. NaHCO<sub>3</sub> 7.5%**

Disolver 0.75g de NaHCO<sub>3</sub> en 10 mL de agua

**d. Glucosa 2M**

Disolver 3.604 g de glucosa en 10 mL de agua

Nota: Las soluciones se preparan usando agua para cultivo y se esterilizan por filtración con membrana de 0.22 µm.

**e. Gel de colágeno de rata**

Para preparar colágeno para 13 explantes se mezclan 300 µL de medio Optimix, 100 µL de colágeno de rata, 10 µL de NaCl 1.5M y 10 µL de NaHCO<sub>3</sub> 7.5%.

**Para inmunocitoquímicas, células competentes y transfecciones**

**a. Solución de bloqueo**

Para preparar 10 mL de solución de bloqueo se mezclan 200 µL de Triton X, 1 mL suero fetal bovino y 9 mL de PBS 1X.

**b. Medio TSS**

Para preparar 50 mL de medio TSS se mezclan 5 g de PEG 8000 y 1.5 mL cloruro de magnesio hexahidratado llevar a 50 ML con medio LB y ajustar el pH entre 6.5 y 6.7. Posteriormente, esterilizar el medio por filtración con membrana de 0.22 µm y luego agregar 2.5 mL de DMSO.

**c. HBS 2X**

Para preparar 100 mL de HBS2X se mezclan 1.6 g de NaCl (20 $\mu$ M), 0.074 g de KCl (1 $\mu$ M), 0.04g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 $\mu$ M), 0.2 g de Dextrosa (20 $\mu$ M) y 1 g de HEPES. Se disuelve en 95 mL de agua grado cultivo y se preparan 3 soluciones ajustando cada una a un pH distinto: 6.9, 7 y 7.1. En campana, filtrar las soluciones a través de una membrana de 0.22  $\mu$ m.

Determinar el buffer con mejor eficiencia (mínimo 70%), transfectando un vector de expresión de GFP, con los diferentes buffer de HBS a distintos pH. Alicuotar el buffer que dé lugar a la mejor eficiencia de transfección, cada alicuota de 500  $\mu$ L, y almacenarlo a -70° C.

#### **d. CaCl<sub>2</sub> 2M**

Para preparar 5mL de CaCl<sub>2</sub> 2 M se disuelve 1.472 g de CaCl<sub>2</sub> con 5 mL agua grado cultivo, en campana, filtrarlo a través de una membrana de 0.22  $\mu$ m.. Alicuotar en de 500  $\mu$ L y almacenar a 4° C.

### **Protocolos**

#### **Manipulación de CTEs**

##### **a. Preparación de cajas con gelatina 0.1%**

Cubrir con 5 mL de gelatina al 0.1% cajas de 10 cm de diámetro, las cajas de 6cm se cubren con 2 mL luego se incuban en campana de flujo laminar al menos 2 horas y finalmente se aspira la gelatina con la bomba de vacío.

##### **b. Tripsinización de células**

Para tripsinizar las células se agrega 1 mL de tripsina al 0.25% a una caja de 10 cm o 0.5 mL para caja de 6cm, se incuban durante 7 min a 37° C, posteriormente se inactiva la tripsina agregando medio (mínimo la misma cantidad agregada de tripsina). Las células se disocian mecánicamente subiendo y bajando el líquido con una pipeta de 1 mL. La suspensión se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min. Finalmente se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet en el medio adecuado para las células.

##### **c. Conteo de células**

Para contar células se toma una alícuota de 10  $\mu$ L de la suspensión celular y se agregan 10  $\mu$ L de azul de tripano, de la mezcla se toman 10  $\mu$ L y se colocan en la cámara de Neubauer para contar el número de células vivas. El conteo se realiza en los cuadrantes de las esquinas de la cámara, el número de células se promedia. Para obtener el número de células por mL multiplicamos el promedio obtenido por  $2 \times 10^4$ , ya considerando que el factor de dilución en azul de tripano fue de 1:2. Las células muertas se tiñen de azul debido a que éstas pueden incorporar el colorante.

##### **d. Procedimiento para congelar células**

Las células se tripsinizan (Ver inciso b) y se cuentan (Ver inciso c), posteriormente se resuspenden en el volumen necesario para obtener una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ mL. Los viales de congelación se etiquetan con el



nombre de la línea celular, número de pase, cantidad de células y fecha. A cada vial se agregan 500  $\mu$ L de medio para congelar 2X y 500  $\mu$ L de la suspensión celular. Es necesario homogeneizar mezclando suavemente. Los viales de congelación se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 h y posteriormente se almacenan en el tanque de nitrógeno líquido.

#### **e. Procedimiento para descongelar células**

Para descongelar se saca del tanque de nitrógeno líquido el vial de las células del tanque de nitrógeno líquido y se transfiere inmediatamente a un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  se dejan ahí descongelando aproximadamente 2 minutos, después la suspensión celular (1mL) se transfiere cuidadosamente a un tubo Falcón de 15 mL y se agregan 5 mL de medio lentamente por la pared del tubo. Se mezcla suavemente por inversión luego se centrifugan la solución a 1000 rpm durante 5 min. Finalmente, se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet en el medio apropiado. Las células alimentadoras (feeders) derivadas de células STO o MEFs se colocan en 10 mL y se siembran en cajas gelatinizadas de 10 cm. Las CTEs en 4 mL y se siembran en cajas de 6 cm con una monocapa de células alimentadoras.

#### **f. Sub-cultivo de células**

En ocasiones es necesario sub-cultivar las células para expandir la población, para ello se tripsiniza una caja con células, las células se resuspenden en el medio adecuado y se cuentan. Dependiendo de la cantidad de células se siembran las cajas necesarias y se congela el resto (Ver inciso d).

#### **g. Cultivo de fibroblastos de la línea STO (feeders)**

Para cultivar las CTEs es necesario generar monocapas de células alimentadoras (feeders) a partir de MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) o de la línea celular STO derivada a partir de MEFs. Para ello se descongela un vial de células STO (Ver inciso e). Las células STO se llevan a confluencia en cajas de 10 cm con 10 mL de medio. Para inactivar mitóticamente a las células STO o fibroblastos se agrega 200  $\mu$ L de la solución preparada de mitomicina C a cada caja de 10 cm, se incuban durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego el medio se aspira y se lava 2 veces con PBS 1X para eliminar la mitomicina, se tripsinizan las células STO y el pellet se resuspende para contar y sembrar a una densidad de  $1 \times 10^6$  de células STO o fibroblastos alimentadores (feeders) por caja de cultivo de 6 cm de diámetro previamente tratada con gelatina.

Se incuban toda la noche para permitir que las células se adhieran y se cambia el medio para eliminar las células muertas. Las células feeders pueden mantenerse 15 días en la incubadora; antes de usarse se debe cerciorar que la monocapa está intacta.

## **Manipulación de explantes de mesencéfalo**

### **a. Fijado de explantes de mesencéfalo**

Al terminar el periodo de cultivo, se pasan los explantes a tubos con PFA 4% y se incuban a 4° C durante 2 h con mezclado suave. Después, los explantes se lavan 5 veces con PBS 1X durante 10 min manteniendo los tubos en agitación ligera a 4° C. Se pueden guardar alrededor de 1 mes a 4° C en PBS 1X.

### **b. Corte de explantes de mesencéfalo**

Los tejidos se crio-protecten en sacarosa al 30% y se incuban en agitación toda la noche a 4° C. Después, el tejido se congela en la resina para congelar y se realizan cortes de 10  $\mu$ m de espesor en el criostato. Los cortes se colocan en laminillas pretratadas con gelatina al 0.7%, las laminillas se pueden almacenar con los cortes a 4° C.

## **Biología Molecular**

### **a. Gel de agarosa**

El porcentaje del gel de agarosa depende del tamaño de la banda que se desea observar. Para bandas de tamaño pequeño (menos de 500 pb) se hacen geles de porcentaje mayor (2-3%), y para bandas de mayor tamaño se usan geles de porcentaje menor (1% o menos). El buffer SB 1X (SB 20X: Se disuelve 8g NaOH y 45g ácido bórico en 1L de agua) se utiliza para la elaboración de geles donde las bandas de interés son de peso molecular pequeño. El TAE 1X se emplea en el caso de querer separar bandas pesadas. La cantidad de agarosa que se requiere depende del porcentaje del gel sobre el volumen total (Gel de 1%: 0.2 g de agarosa/20 mL de buffer).

### **b. Preparación de placas para el cultivo bacteriano con agar**

Preparar agar para 300mL:

Tryptona	3g
Extracto de levadura	5g
NaCl	3g
Agar	5g

Se disuelve y esteriliza la mezcla en el autoclave y se deja enfriar al punto en el que la piel resista lo caliente, después se agrega el antibiótico adecuado para la selección según el plásmido lo determina (100mg/ $\mu$ L por cada mL de agar). Finalmente se marcan las cajas y se vacía la solución sobre éstas bajo mechero, cuándo gelifican se guardan a 4° C.

### **c. Preparación de células *E.coli* competentes**

Crece un pre-cultivo de la cepa deseada (DH5 $\alpha$ , sure-Anexo 4) en 5 mL de medio LB sin antibiótico durante 12-14 horas. Luego pasar este pre-cultivo a 100 mL de medio LB para que siga creciendo el cultivo hasta que alcance una densidad en el rango de 0.2-0.5. Posteriormente, se centrifugan las células a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C, se remueve el sobrenadante y se resuspende el pellet con medio TSS (en un volumen equivalente a 10% del medio LB usado para crecer las células). La suspensión celular obtenida se alícuota congelando al instante en etanol con hielo seco o nitrógeno líquido, las alícuotas se almacenan a -80° C.

#### **d. Transformación de células competentes**

Temperar cajas con agar a 37° C. Las alícuotas de células competentes se descongelan en hielo. En un tubo Eppendorf se agregan hasta 20 µL de DNA (plásmido superenrollado, ligación, etc.) y se pone en hielo. Una vez descongeladas las células se homogenizan con pipeteo y se agregan 200 µL de células a cada tubo con plásmido. Después, se dejan en hielo durante 10 minutos, y se transfieren a la placa de calentamiento a 42° C durante 45 s para luego dejarse en hielo durante 2 min. Posteriormente, se agrega 0.9-1 mL de medio LB y se incuban los tubos a 37° C con agitación durante una hora (mínimo 40 min). Al terminar la recuperación se centrifugan los tubos durante 15s para concentrar las células, se decanta el medio, y se resuspenden las células con un pulso en el vortex. Finalmente, se siembran las células, para ello, el asa metálica se esteriliza sacándola del alcohol absoluto y poniéndola al mechero, luego se toman las células resuspendidas, se colocan en la placa, el asa se enfría en la caja para luego utilizarla para extender las células ya depositadas, las placas se dejan en la incubadora a 37° C durante 12-16 h.

#### **e. Minipreps**

Preparar una placa con agar. Esta caja será utilizada para generar un banco de colonias, ya que al seleccionar una colonia para analizarse se estriará en esta caja.

Para cada colonia a analizar se inoculan 3 mL de medio LB (5mL si el plásmido es de bajo número de copias) conteniendo antibiótico (1 µL por cada mL, en nuestro caso hemos utilizado ampicilina), se incuban con agitación a 37° C durante 14-16 hrs. Posteriormente, se centrifugan las bacterias en tubos de 2 mL a 12 000 rpm durante 20 s, se remueve el sobrenadante mediante decantación, se resuspenden las bacterias mediante vortex en 100 µL de buffer P1 + 10 µL de RNasa (por conjunto de reacciones), luego se agregan 100 µL de buffer de lisis (P2).

P2: Para un miniprep  
50µL de SDS2%  
2µL de NaOH 10N  
48µL de agua

Se mezcla por inmersión hasta observar que la solución se ve traslúcida, se agregan 120µL de buffer P3, se mezclan por inmersión y se incuban durante 3 min a temperatura ambiente. Esta suspensión se centrifuga a 12 000 rpm durante 10 min, se toma el sobrenadante utilizando pipeta y se transfiere a un tubo nuevo (previamente etiquetado). Cuidar de no llevarse el pellet.

Posteriormente, se agregan 200 µL de isopropanol, se mezcla por inmersión y se incuba durante 1 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifuga a 14 000 rpm durante 3 min. Remover el isopropanol por decantación. Se agregan 500 µL de etanol a 70% v/v con agua, se mezclan por inmersión, se centrifuga a 14 000 rpm durante 1 min, el EtOH se remueve por decantación, se quita

todo el etanol a 70% dejando que evapore durante 10 min a temperatura ambiente y finalmente se disuelve en 35  $\mu$ L de TE (o en agua grado milliQ).

**f. Digestiones enzimáticas**

Para una reacción de digestión se mezcla lo siguiente: agua (llevar a volumen total 20 $\mu$ L), Buffer correspondiente a la enzima 10X (2 $\mu$ L), enzima (0.5 $\mu$ L), DNA (depende de la finalidad de la digestión). Las enzimas utilizadas en este proyecto se enlistan en el anexo 1.

**g. Reacción de ligación**

Para una reacción de ligación de extremos cohesivos se mezcla lo siguiente: agua (llevar a volumen total 20 $\mu$ L), Buffer T4 ligasa 10X (2 $\mu$ L), enzima T4 ligasa 1U (0.5 $\mu$ L, Fermentas), inserto-vector (relación molar 3:1). La reacción se incuba toda la noche a 4° C.

Para una reacción de ligación de extremos romos se mezcla lo siguiente: agua (llevar a volumen total 20 $\mu$ L), Buffer T4 ligasa 10X (2 $\mu$ L), enzima T4 ligasa 5U (0.5 $\mu$ L, Fermentas), inserto-vector (relación molar 3:1). La reacción se incuba toda la noche a 12° C.

El volumen pequeño, las temperaturas y el tiempo de incubación respectivo para cada reacción favorecen termodinámicamente la unión de los fragmentos.

# Bibliografía

1. Y. Jeong, K. El-Jaick, E. Roessler, M. Muenke, D. J. Epstein, *Development* **133**, 761 (Feb, 2006).
2. R. Kittappa, W. W. Chang, R. B. Awatramani, R. D. McKay, *PLoS Biol* **5**, e325 (Dec, 2007).
3. W. Dauer, S. Przedborski, *Neuron* **39**, 889 (Sep 11, 2003).
4. J. O. Andressoo, M. Saarma, *Curr Opin Neurobiol* **18**, 297 (Jun, 2008).
5. C. S. Chan, T. S. Gertler, D. J. Surmeier, *Trends Neurosci* **32**, 249 (May, 2009).
6. J. L. Smith, G. C. Schoenwolf, *Trends Neurosci* **20**, 510 (Nov, 1997).
7. T. M. Jessell, *Nat Rev Genet* **1**, 20 (Oct, 2000).
8. H. Nakamura, T. Katahira, E. Matsunaga, T. Sato, *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 120 (Sep, 2005).
9. E. Roussa, K. Kriegstein, *Cell Tissue Res* **318**, 23 (Oct, 2004).
10. M. P. Smidt, J. P. Burbach, *Nat Rev Neurosci* **8**, 21 (Jan, 2007).
11. Y. Jeong, D. J. Epstein, *Development* **130**, 3891 (Aug, 2003).
12. Y. Ono *et al.*, *Development* **134**, 3213 (Sep, 2007).
13. T. Nakatani, M. Kumai, E. Mizuhara, Y. Minaki, Y. Ono, *Dev Biol* **339**, 101 (Mar 1).
14. N. Prakash, W. Wurst, *Cell Mol Life Sci* **63**, 187 (Jan, 2006).
15. N. Flames, O. Hobert, *Nature* **458**, 885 (Apr 16, 2009).
16. S. B. Dunnett, A. E. Rosser, *Exp Neurol* **203**, 279 (Feb, 2007).
17. A. Wallen, T. Perlmann, *Ann N Y Acad Sci* **991**, 48 (Jun, 2003).
18. A. Carlsson *et al.*, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 237 (2001).
19. O. Hornykiewicz, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **17**, 545 (1977).
20. J. Chao, E. J. Nestler, *Annu Rev Med* **55**, 113 (2004).
21. A. Abeliovich, R. Hammond, *Dev Biol* **304**, 447 (Apr 15, 2007).
22. A. Bjorklund, S. B. Dunnett, *Trends Neurosci* **30**, 194 (May, 2007).
23. A. E. Lang, A. M. Lozano, *N Engl J Med* **339**, 1130 (Oct 15, 1998).
24. W. Ye, K. Shimamura, J. L. Rubenstein, M. A. Hynes, A. Rosenthal, *Cell* **93**, 755 (May 29, 1998).
25. M. Joksimovic *et al.*, *Nat Neurosci* **12**, 125 (Feb, 2009).
26. S. L. Ang, *Development* **133**, 3499 (Sep, 2006).
27. S. Chung *et al.*, *Cell Stem Cell* **5**, 646 (Dec 4, 2009).
28. G. a. C. Guerrero-Flores, L. (2011).
29. S. J. Rodda, S. J. Kavanagh, J. Rathjen, P. D. Rathjen, *Int J Dev Biol* **46**, 449 (2002).
30. C. E. Murry, G. Keller, *Cell* **132**, 661 (Feb 22, 2008).
31. S. H. Lee, N. Lumelsky, L. Studer, J. M. Auerbach, R. D. McKay, *Nat Biotechnol* **18**, 675 (Jun, 2000).
32. L. Roybon, T. Hjalt, N. S. Christophersen, J. Y. Li, P. Brundin, *J Neurosci* **28**, 3644 (Apr 2, 2008).
33. Z. W. Du, S. C. Zhang, *Stem Cells Dev* **13**, 372 (Aug, 2004).
34. S. Friling *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7613 (May 5, 2009).
35. J. K. Chen, J. Taipale, K. E. Young, T. Maiti, P. A. Beachy, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14071 (Oct 29, 2002).
36. J. Wang, N. Pham-Mitchell, C. Schindler, I. L. Campbell, *J Clin Invest* **112**, 535 (Aug, 2003).
37. N. A. Riobo, K. Lu, C. P. Emerson, Jr., *Cell Cycle* **5**, 1612 (Aug, 2006).

38. S. A. Vokes *et al.*, *Development* **134**, 1977 (May, 2007).
39. F. Simpson, M. C. Kerr, C. Wicking, *Mech Dev* **126**, 279 (May-Jun, 2009).
40. D. J. Epstein, A. P. McMahon, A. L. Joyner, *Development* **126**, 281 (Jan, 1999).
41. D. Bakstad, A. Adamson, D. G. Spiller, M. R. White, *Curr Opin Biotechnol* **23**, 103 (Feb).
42. M. Wijgerde, F. Grosveld, P. Fraser, *Nature* **377**, 209 (Sep 21, 1995).
43. C. V. Harper *et al.*, *PLoS Biol* **9**, e1000607 (Apr).
44. K. Featherstone *et al.*, *J Cell Sci* **124**, 3484 (Oct 15).
45. C. V. Harper *et al.*, *J Cell Sci* **123**, 424 (Feb 1).
46. J. M. Baizabal, L. Covarrubias, *Dev Biol* **325**, 49 (Jan 1, 2009).
47. S. Chung *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9703 (Jun 7).
48. L. Lescaudron, P. Naveilhan, I. Neveu, *Curr Med Chem*, (Sep 3).
49. C. Tang, M. Drukker, *Semin Immunopathol* **33**, 563 (Nov).