



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Administración intranasal (IN) de un plásmido (pIRES-hrGFP-1a) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), estudio de acceso hacia el cerebro en un modelo murino.

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta:
ADRIÁN REYES MONDRAGÓN

Director de Tesis: Dr. Emiliano Tesoro Cruz

Asesor: M. en C. Maritere Domínguez Rojas

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Administración intranasal (IN) de un plásmido (pIRES-hrGFI²-1^a) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), estudio de acceso hacia el cerebro en un modelo murino

Que presenta el pasante: Adrián Reyes Mondragón

Con número de cuenta: 305344586 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de octubre de 2013.

PROFESORES QUE INTECRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osaya	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	QFB. Azucena Lee Mendoza	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Emiliano Tesoro Cruz, por darme la oportunidad de participar en este proyecto y dejarme conocer el mundo de la investigación al que creí jamás tendría acceso, literalmente fue un sueño hecho realidad. Le estoy sinceramente agradecido.

También quiero agradecer a la Dra. Norma Oviedo de Anda, a la Dra. Sandra Orozco Suárez, y a la Dra. Leticia Manuel Apolinar ya que sus valiosos conocimientos y enseñanzas contribuyeron en gran medida para que este proyecto se llevara a cabo.

A mi familia, por enseñarme que a pesar de las adversidades siempre se puede salir adelante, gracias por darme su amor y apoyo incondicional.

A mi facultad, uno de los pocos faros de conocimiento al norte de la ciudad.

Stay positive and love your life.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. ANATOMÍA NASAL.....	4
3.2. REGIÓN OLFATORIA.....	5
3.3. REGIÓN RESPIRATORIA.....	7
3.4. VASCULATURA NASAL.....	9
3.5. EL LINFOEPITELIO Y EL NALT (TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSA NASAL).....	10
3.6. RUTAS DESDE LA CAVIDAD NASAL HACIA EL SNC.....	10
3.7. EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS BARRERAS EPITELIALES.....	11
3.8. TRANSPORTE DESDE LA MUCOSA HACIA LOS PUNTOS DE ENTRADA AL CEREBRO.....	12
3.9. TRANSPORTE HACIA OTROS SITIOS DEL CEREBRO.....	13
3.10. LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP).....	14
3.11. PLÁSMIDO PIRES-HRGFP-1A.....	15
3.12. EL RNA 18S RIBOSOMAL.....	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
7. HIPÓTESIS.....	18
8. OBJETIVOS.....	18
8.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
9.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS <i>E. COLI</i> DH5A CON PLÁSMIDO PIRES-HRGFP-1A, POR EL MÉTODO DE CHOQUE TÉRMICO.....	19
9.2. CULTIVO DE BACTERIAS <i>E. COLI</i> DH5A AMPICILINA-RESISTENTES.....	19
9.3. PURIFICACIÓN DEL PIRES-HRGFP-1A UTILIZANDO EL KIT “PLASMID PLUS (100) QIAGEN PLASMID MIDI”.....	19
9.4. CUANTIFICACIÓN DEL PIRES-HRGFP-1A EN NANODROP ND1000.....	20
9.5. MODELO ANIMAL (VER ANEXO AL FINAL).....	21
9.6. ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DEL PIRES-HRGFP-1A.....	21
9.7. EXTRACCIÓN DE CEREBRO DE RATÓN.....	23
9.8. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	25
9.9. CORTES HISTOLÓGICOS DEL CEREBRO.....	26
9.10. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
9.11. EXTRACCIÓN DE RNA.....	27
9.12. TRATAMIENTO CON DNASA I.....	28
9.13. CUANTIFICACIÓN DE RNA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	28

9.14. RT-PCR.....	29
9.15. PCR 18S A PARTIR DE CDNA.....	30
9.16. PCR GFP A PARTIR DE CDNA.....	32
9.17. EXTRACCIÓN DE DNA	34
9.18. CUANTIFICACIÓN DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	35
9.19. PCR 18S A PARTIR DE DNA	36
9.20. PCR GFP A PARTIR DE DNA.....	38
9.21. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	40
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
10.1. OBSERVACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS EN FRESCO	41
10.2. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS	44
10.3. PESAJE DE CEREBROS Y CUANTIFICACIÓN DE RNA EN GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL	46
10.4. PESAJE DE CEREBROS Y CUANTIFICACIÓN DE DNA EN GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL	47
10.5. GELES DE AGAROSA AL 0.8% DE 18S A PARTIR DE CDNA.....	49
10.6. GELES DE AGAROSA AL 1.2% DE 18S A PARTIR DE DNA.....	50
10.7. GELES DE AGAROSA AL 0.8% DE GFP A PARTIR DE CDNA	51
10.8. GELES DE AGAROSA AL 1.2% DE GFP A PARTIR DE DNA.....	52
11. CONCLUSIONES.....	54
12. ANEXO.....	55
12.1. DESCRIPCIÓN GRÁFICA DEL PROCEDIMIENTO	55
13. REFERENCIAS.....	56

1. RESUMEN

En el presente trabajo se examinó el alcance del plásmido pIRES-hrGFP-1a (5.0kb), el cual posee el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), al ser administrado por la vía intranasal (IN) a ratones Balb/c, con el fin de determinar si es posible identificar al pIRES-hrGFP-1a y su respectiva expresión en cerebro de ratones, 24 horas posteriores a la administración IN así como precisar su capacidad de alcanzar distintas áreas del cerebro. Para ello, se utilizaron 27 ratones Balb/c de 8-10 semanas de edad, 18 fungieron como grupo experimental y 9 como grupo control. Se administró el pIRES-hrGFP-1a al lote experimental y al control se le administro PBS; 24 horas después fueron sacrificados y se les extrajeron los cerebros.

Del grupo experimental se utilizaron 6 cerebros para cortes histológicos (en congelado prefijados con paraformaldehído) y tinciones inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo específico anti-GFP, 12 cerebros se diseccionaron y se obtuvieron las siguientes regiones: bulbos olfatorios, corteza cerebral, hipocampo, amígdala, hipotálamo, cerebelo y tallo, se extrajo también el nervio olfatorio y los nervios ópticos; 6 de estos cerebros se destinaron para extracción de DNA y PCR y 6 para extracción de RNA y RT-PCR. El lote control fue tratado de la misma manera utilizando 3 cerebros para cada una de las pruebas realizadas.

En cortes histológicos se observó inmunofluorescencia de la GFP en vasos sanguíneos, hipotálamo, cerebelo y tallo. Tanto el pIRES-hrGFP-1a como la expresión de la GFP fueron identificados en nervio óptico, nervio olfatorio, bulbos olfatorios, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdala, cerebelo y tallo.

Los resultados obtenidos sugieren que el pIRES-hrGFP-1a es capaz de alcanzar el cerebro, permitiendo la transcripción y expresión de la GFP 24 horas después de su administración IN, por lo que la vía nasal puede ser útil para el envío de plásmidos, poseedores de ciertos genes, hacia estructuras del cerebro permitiendo el desarrollo de nuevos estudios de terapia génica para enfermedades que afectan a este órgano.

2. INTRODUCCIÓN

Desde principios del siglo pasado se demostró que la ruta intranasal servía como punto de acceso hacia el sistema nervioso central (SNC) para algunos virus (Flexner, 1912; Sabin y Olitsky, 1937) y algunas sustancias tales como ferrocianuro de potasio y citrato de amonio férrico (Faber, 1937) pero fue hasta inicios de la década de los 70's cuando esta vía comenzó a llamar la atención de los científicos para ser considerada como una potencial vía de administración al reportarse que albúmina (Kristensson y Olson, 1971), oro coloidal (Gopinath et al., 1978), y conjugado de peroxidasa de rábano- aglutinina de germen de trigo (WGA-HRP) (Baker y Spencer, 1986) podían ser transportados desde el epitelio de la cavidad nasal hasta el cerebro.

Actualmente hay muchos ejemplos de fármacos de bajo peso molecular capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y llegar al cerebro, pero casi todas las sustancias de elevado peso molecular son incapaces, en condiciones normales, de atravesar la BHE, lo cual está bien cuando se trata de bloquear el paso hacia el cerebro de sustancias potencialmente neurotóxicas, pero representa un obstáculo importante cuando se busca, qué sustancias con algún efecto terapéutico sobre este órgano la atraviesen, la razón de que ocurra esto, es que la BHE está asociada a una baja permeabilidad además de que posee uniones extremadamente estrechas lo cual favorece que haya una especie de sellado entre las membranas de células endoteliales contrapuestas (Reese y Karnovsky, 1967), la baja permeabilidad se deduce a partir del hecho de que la BHE posee una resistencia eléctrica transendotelial de 1500-2000 Ω/cm^2 la cual es muy elevada si la comparamos con la de los capilares sanguíneos que es de 3-30 Ω/cm^2 (Crone y Olesen, 1982; Butt et al., 1990). Algunas sustancias de elevado peso molecular han demostrado ser prometedoras para el tratamiento de enfermedades neurológicas, pero debido al impedimento que tienen para atravesar la BHE se ha vuelto necesario buscar estrategias que permitan evadir los obstáculos que presenta el SNC, una de esas estrategias es el uso de la vía intranasal (IN), ya que provee un método no-invasivo para el envío de sustancias de elevado peso molecular como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, vectores

virales, vectores de génicos (plásmidos) e incluso células madre hacia el SNC permitiendo evitar a la BHE (Thorne y Lochhead, 2012); es por esto que la cavidad nasal ha capturado la atención de múltiples grupos de investigación como una vía de administración alternativa a la enteral, lo cual ha tenido como consecuencia la publicación de numerosos trabajos basados en el envío de sustancias biológicas hasta el cerebro a través de esta ruta, entre ellos se encuentran los siguientes ejemplos:

La insulina es capaz de alcanzar elevadas concentraciones tanto en el nervio trigémino como en el bulbo olfatorio después de 1h de haber sido administrada de manera IN (Francis et al., 2009).

Se demostró que un neuropéptido parecido a la galanina, logro alcanzar el bulbo olfatorio, el cerebro anterior, el hipocampo, hipotálamo, cerebelo y tallo cerebral de ratones por la vía IN (Nonaka et al., 2008).

El factor de crecimiento nervioso recombinante alcanza mayores concentraciones por la vía IN que por la vía IV en el bulbo olfatorio, córtex, cerebelo, tallo cerebral, hipocampo y amígdala (Chen et al., 1998).

El IFN- β 1b, tras la administración intravenosa (IV), alcanzo niveles más bajos en el sistema nervioso central que los alcanzados por la vía IN en ratas (Ross et al., 2004).

Por otro lado, con el empleo de plásmidos administrados intranasalmente, se ha reportado que el plásmido pGQH, poseedor del gen codificante para la proteína G del virus de la rabia, así como su respectiva expresión de mRNA fue detectado en el cerebelo y corteza cerebral, la proteína G fue localizada en cerebelo, corteza cerebral (neocortex), hipocampo, NALT (tejido linfoide asociado a mucosa nasal), células gliales (microglia) y capilares cerebrales (Tesoro et al., 2008).

En otro reporte se detectó el plásmido pCMV β (7.2kb) en el cerebro, 15 min. después de su administración IN, y se demostró que los niveles del pCMV β en suero eran más elevados en comparación con la administración IV (Oh et al., 2001).

Los plásmidos pCMV β (7.2kb) y pN2/pCMV β (14.2kb), ambos poseedores del gen que expresa a la β -galactosidasa, fueron detectados en bulbo olfatorio, área

septal, cuerpo estriado, hipotálamo, tálamo, cerebro medio, hipocampo y cerebelo, 15 minutos después de ser administrados por la vía IN (Han et al., 2007).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Anatomía nasal

La nariz es el sitio de entrada para el aire inhalado que va hacia el sistema respiratorio de los mamíferos. La cavidad nasal está dividida en dos pasajes por el septum. Cada pasaje nasal se extiende desde los nostrilos hasta la nasofaringe. El aire inhalado fluye a través de los nostrilos o fosas nasales, hacia el vestíbulo, que es una ligera dilatación que se encuentra justo dentro de las fosas nasales y antes de la cámara principal de la nariz. A diferencia de la cámara nasal principal más distal, que está rodeada por el hueso, el vestíbulo nasal está rodeado principalmente por cartílago más flexible, su superficie luminal está revestida por un epitelio escamoso similar a la de la piel externa.

Después de pasar a través del vestíbulo nasal, el aire inhalado pasa a través de la parte más estrecha de la totalidad del tracto respiratorio, la válvula nasal (*ostium internum*), en la cámara nasal principal. Cada pasaje nasal de la cámara principal está delimitado por una pared lateral, una pared septal, un techo, y un suelo. La luz de la cámara principal se encuentra revestida por una membrana mucosa bien inervadas y vascularizadas, cubierta por una capa continua de moco. La capa mucosa nasal es movida distalmente por los cilios subyacentes hacia la orofaringe, donde pasa a través del esófago. Los cornetes, estructuras óseas revestidas por el tejido vascularizado de la mucosa, se proyectan desde las paredes laterales hacia la luz de la cámara principal de la cavidad nasal, incrementando el área de la superficie interna de la nariz, lo cual es importante en el filtrado, humidificación, y el calentamiento del aire inspirado.

A pesar del pequeño tamaño de la cavidad nasal en murinos, se ha estimado que el área de superficie en ratas es de 13.4cm^2 (Thorne y Lochhead, 2012), lo cual nos da una idea del área de superficie en la cavidad nasal de un roedor más pequeño, como los ratones empleados en este trabajo. Las necesidades evolutivas de los ratones, en cuestión de función olfativa, han definido la forma de

los cornetes, haciendo mucho más complejos sus patrones de plegado y ramificación, esto también ha determinado el tipo, cantidad y distribución de los tipos de células que los recubren (Harkema et al., 2006).

En la cavidad nasal hay cuatro tipos de epitelio: el epitelio escamoso (SE), el de transición (TE), el olfatorio (OE) y el respiratorio (RE) (**Figura 1**). Nos enfocaremos en el epitelio olfatorio y respiratorio ya que se cree son los sitios en los que hay mayor absorción de productos biológicos y de fármacos (Thorne y Lochhead, 2012).

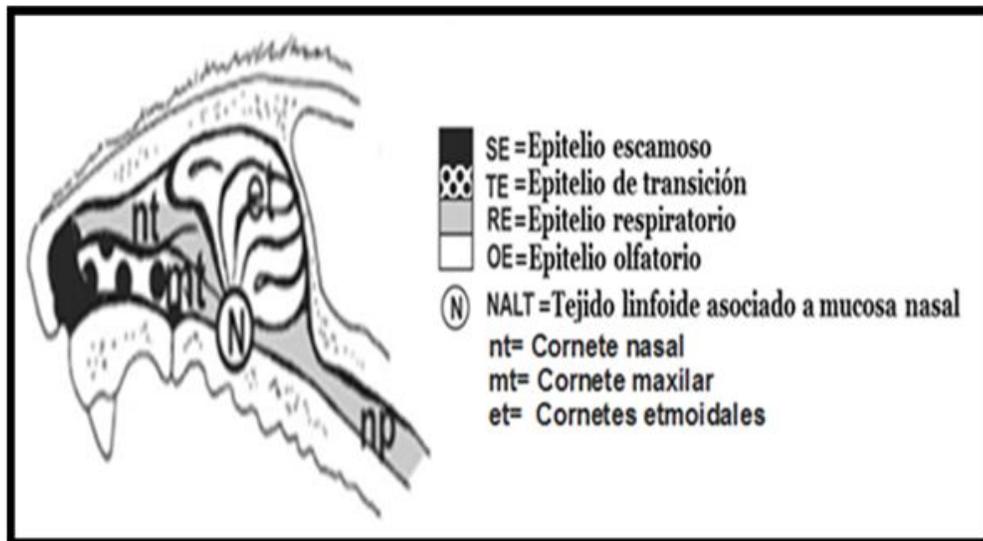


Fig. 1. Distribución de los diferentes tipos de epitelio y cornetes en uno de los pasajes de la cavidad nasal. (Tomado y modificado de: Harkema et al., 2006)

3.2. Región olfatoria

El epitelio olfatorio se encuentra localizado en la sección superior de la cavidad nasal enfrente del septum y justo debajo de la lámina cribosa (Illum, L., 2000). En el humano esta región comprende menos del 10% del área total del epitelio nasal, mientras que en ratas abarca el 50% (Thorne y Lochhead, 2012).

Aquí se encuentran las neuronas sensoriales olfatorias (NSO), son neuronas bipolares, localizadas en el estrato medio del epitelio olfatorio y las puntas de sus dendritas se extienden hasta la capa mucosa que está directamente expuesta al ambiente, estas dendritas terminan en una protuberancia de la cual salen cilios sin

motilidad, estos cilios poseen en su membrana plasmática receptores sensibles a las moléculas odoríferas. Los axones de estas neuronas son no mielinizados y pasan a través de la lámina basal y se unen a otros axones de otras neuronas formando haces de axones, a cada haz de axones se le denomina *fila olfactoria* (**Figura 2**). Desde su origen y hasta que llegan al bulbo olfatorio, a estos haces de axones se les unen células olfativas envainadoras formando un tipo de canales que encaminan la *fila olfactoria* hasta el bulbo olfatorio, a su vez las células olfativas envainadoras se ven rodeadas o cubiertas por fibroblastos formándose así una capa de tipo perineural alrededor de la *fila olfactoria* (Field, et al., 2003), esta capa perineural y la *fila olfactoria* comprenden el nervio olfatorio el cual pasa a través de los pequeños huecos en la lámina cribosa del hueso etmoides hasta llegar al cerebro, ahí estos axones hacen sinapsis con las dendritas de células mitrales y otros blancos celulares en los glomérulos del bulbo olfatorio, una vez ocurrido esto la información olfatoria es llevada a través de los axones de las células mitrales hasta zonas como el núcleo olfatorio anterior, tubérculo olfatorio, córtex piriforme y amígdala.

En la región olfatoria también se encuentran las células sustentaculares, las cuales básicamente sirven como células de soporte, las células de la glándula de Bowman que se originan en la lámina propia y pasan a través de la lámina basal formando una especie de ducto tubular a través del cual segregan una especie de fluido seroso el cual sale hacia la superficie del epitelio que está en contacto con la luz de la cavidad nasal, y ahí ese fluido sirve como solvente para moléculas odoríferas. Hay también células basales horizontales (CBH) y células basales globosas (CBG), las CBH se encuentran más cerca de la lámina basal y tienen como función diferenciarse en nuevas células sustentaculares, células para la glándula de Bowman y más CBG una vez que ocurre el recambio celular en esta zona, a su vez las CBG se encuentran un poco más arriba que las CBH y sirven para reemplazar a las NSO cuando éstas mueren. En la lámina propia se pueden encontrar vasos sanguíneos, células inflamatorias y vasos linfáticos los cuales drenan hacia los ganglios linfáticos del cuello (Thorne y Lochhead, 2012).

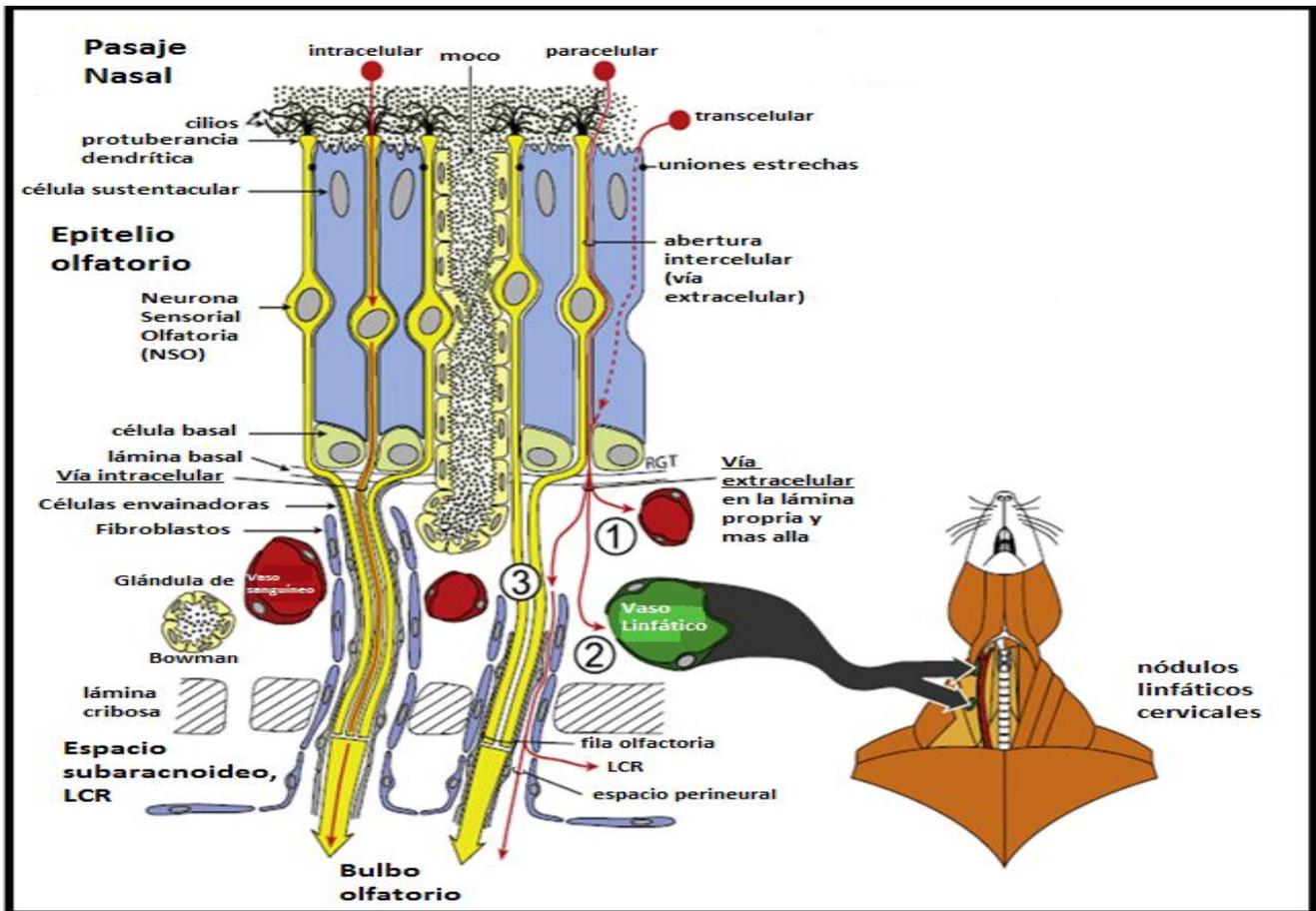


Fig. 2. Epitelio olfatorio (Tomado y modificado de: Thorne y Lochhead, 2012).

3.3. Región respiratoria

El epitelio respiratorio se encuentra sobre el cornete inferior, el cornete medio, y más atrás, en el cornete superior. Este tipo de epitelio comprende aproximadamente un 80-90% de la cavidad nasal en los humanos y 50% en ratas. Esta región está compuesta por epitelio secretor columnar pseudoestratificado el cual está formado por células caliciformes, células columnares ciliadas, células columnares no ciliadas y células basales. Las células caliciformes secretan moco. La principal función de las células ciliadas es impulsar, con ayuda de sus cilios el moco hacia la nasofaringe donde puede ser tragado o expectorado y las células basales tienen como única finalidad servir como progenitoras de los otros tipos de células del epitelio respiratorio. El epitelio nasal se encuentra innervado por ramas del nervio trigémino, de tal manera que muchas de sus fibras se ramifican de

manera tan extensa que casi llega hasta la superficie del epitelio deteniéndose solamente por las uniones estrechas que existen entre las células tanto del epitelio respiratorio como olfatorio (**Figura 3**) (Thorne y Lochhead, 2012).

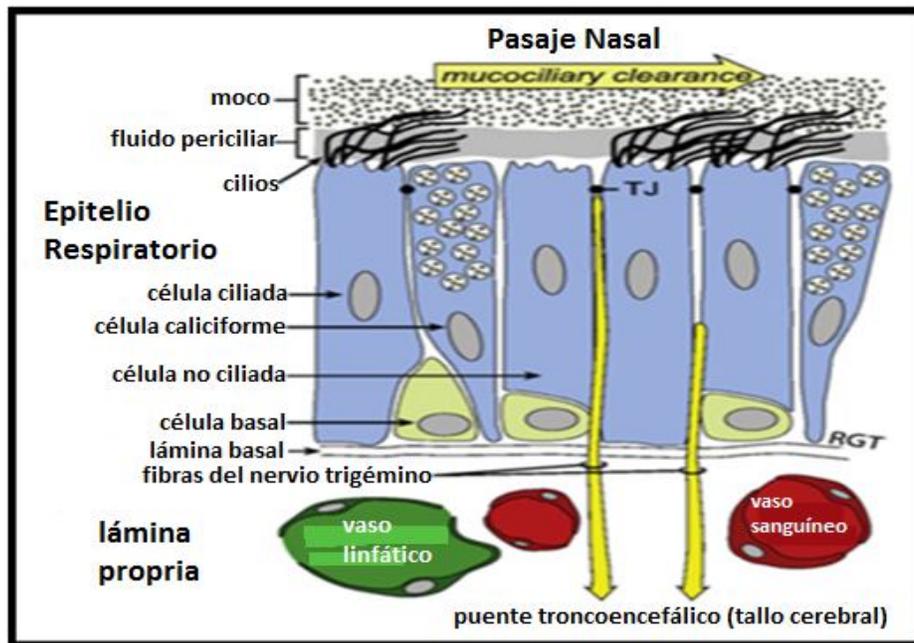


Fig. 3. Epitelio respiratorio (Tomado y modificado de: Thorne y Lochhead, 2012).

El nervio trigémino sale desde la parte lateral del puente troncoencefálico (*pons*) en una raíz sensorial larga y otra raíz motora corta, por lo que es referido como un nervio mezclado que es capaz de llevar fibras motoras hasta los músculos de la masticación y transmitir información sensorial desde la cara, cuero cabelludo, boca y pasajes nasales. Las tres ramas principales del nervio trigémino son el nervio oftálmico (V_1), nervio maxilar (V_2) y el nervio mandibular (V_3): el nervio trigémino está compuesto principalmente de fibras aferentes en las que la información sensorial es transmitida hasta el cerebro desde los pasajes nasales y otras áreas inervadas. V_1 y V_2 son nervios sensoriales que también poseen fibras autónomas y V_3 es la parte mezclada del nervio trigémino. Los cuerpos celulares de las fibras del nervio trigémino se localizan en el ganglio semilunar; sus axones se proyectan hasta el tronco cerebral al nivel del puente troncoencefálico donde hacen sinapsis con neuronas del tronco cerebral (**Figura 4**). Es importante resaltar que solamente

V₁ y V₂ tienen ramificaciones que llegan hasta el epitelio nasal (Thorne y Lochhead, 2012).

3.4. Vasculatura nasal

La sangre que llega a la cavidad nasal es proporcionada principalmente por 1) las ramas de la arteria oftálmica: las arterias etmoidales anterior y posterior, 2) la arteria esfenopalatina y 3) ramas de la arteria facial.

En humanos, la arteria oftálmica se ramifica directamente desde la arteria carótida interna, mientras que en ratas la arteria oftálmica se origina en la arteria pterigopalatina (poco desarrollada en humanos), en humanos la arteria esfenopalatina es una rama de la arteria maxilar, mientras que en las ratas la arteria esfenopalatina viene de la arteria pterigopalatina.

En humanos, el drenaje desde la cavidad nasal por las venas ocurre principalmente a través de la vena esfenopalatina y venas acompañantes de las arterias etmoidales: algunas venas atraviesan la lámina cribosa para unirse a otras en el lóbulo frontal (Thorne y Lochhead, 2012).

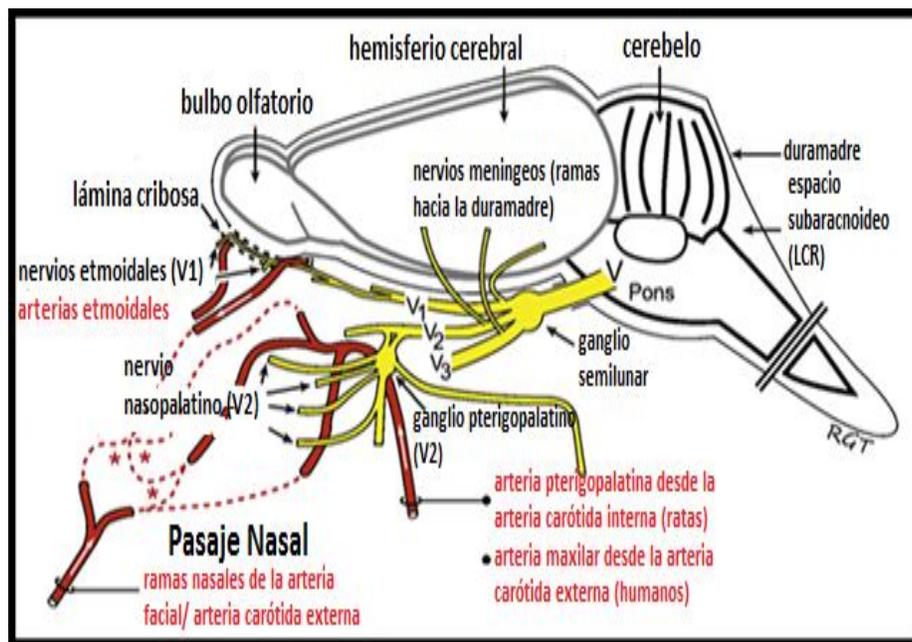


Fig. 4. Ramas del nervio trigémino y la vasculatura nasal. (Tomado y modificado de: Thorne y Lochhead, 2012).

3.5. El linfoepitelio y el NALT (tejido linfoide asociado a mucosa nasal)

El MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) se describe como un órgano linfoide secundario que a su vez incluye al tejido linfoide asociado al intestino (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*), a los bronquiolos (BALT, *bronchiole-associated lymphoid tissue*) y a la nariz (**NALT, *nose-associated lymphoid tissue***). En roedores el NALT se encuentra localizado en el piso del conducto nasofaríngeo, justo en la entrada de la nasofaringe por donde pasa el aire inhalado y las secreciones nasales, el linfoepitelio se encuentra recubriendo a los agregados celulares que forman al tejido linfoide del cual está formado el NALT. El NALT tiene una ubicación estratégica ya que el aire inhalado y las secreciones nasales entran en contacto con el área donde se localiza (Harkema et al., 2006).

La estructura del linfoepitelio la componen algunas células cuboidales ciliadas y muchas células cuboidales no ciliadas con microvellosidades (conocidas como células membranosas o células M), el linfoepitelio es capaz de formar pliegues en los que pueden quedar atrapados los antígenos transportados en el aire inhalado o las secreciones nasales, una vez ahí se cree que los antígenos pueden ser translocados por las células M hacia regiones subepiteliales donde los linfocitos de los agregados celulares del NALT son estimulados mediante la presentación del antígeno por células dendríticas, estos agregados poseen un centro germinal donde la proliferación de linfocitos B (LB) es antígeno-dependiente mientras que en la periferia solo hay Linfocitos T (LT) CD4+ y CD8+; la población de LB es mayor que la de LT y el NALT tiene la capacidad de producir IgA a nivel local (Harkema et al., 2006).

3.6. Rutas desde la cavidad nasal hacia el SNC

Para que una sustancia llegue hasta el SNC después de una administración IN, al menos tres pasos son necesarios: a) transporte a través de las “barreras” epiteliales, ya sea en el epitelio olfatorio o respiratorio, b) transporte desde la mucosa nasal hasta los sitios de entrada al cerebro y c) transporte desde el sitio inicial de entrada al cerebro hasta otros sitios del SNC (Thorne y Lochhead, 2012).

3.7. El transporte a través de las barreras epiteliales

El transporte para atravesar las barreras epiteliales puede ocurrir de dos formas: intracelular y extracelularmente. Las rutas intracelulares en el epitelio olfatorio incluyen la endocitosis de las sustancias por parte de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) para su posterior transporte hacia el bulbo olfatorio (**Figura 5a**) o también puede ser por transporte transcelular a través de las células sustentaculares hacia la lámina propia (**Figura 5b**). Las rutas de transporte intracelular en el epitelio respiratorio podrían incluir la endocitosis de las sustancias por parte de los procesos periféricos del nervio trigémino que se encuentran más cerca de la superficie epitelial y subsecuentemente el transporte intracelular hacia el tronco cerebral o transporte transcelular a través de otras células del epitelio respiratorio hacia la lámina propia (Thorne y Lochhead, 2012). El transporte extracelular, tanto en el epitelio olfatorio como en el respiratorio, se lleva a cabo por difusión paracelular hasta la lámina propia (**Figura 6**). Al administrar una molécula por vía IN se debe tomar en cuenta las uniones estrechas que conforman la barrera epitelial, estas uniones están dadas por las proteínas *zonula occludens* (ZO)-1,2 y 3, ocludina, y claudinas 1, 3, 4, 5 y 19 todas ellas expresadas en el epitelio olfatorio y respiratorio, dificultando el paso de cualquier sustancia que quiera atravesar estos epitelios. Se ha sugerido que el continuo recambio de células en el epitelio nasal podría conllevar a la pérdida temporal de las uniones estrechas, esto como una consecuencia de que al morir las NSO o las células sustentaculares en el epitelio olfatorio o las células ciliadas o globosas en el epitelio respiratorio, es la población de células basales la encargada de reemplazar estas células, pero mientras esto ocurre, se podrían estar creando espacios en ambos tipos de epitelios facilitando el transporte paracelular de moléculas de elevado peso molecular hasta la lámina propia (Thorne y Lochhead, 2012).

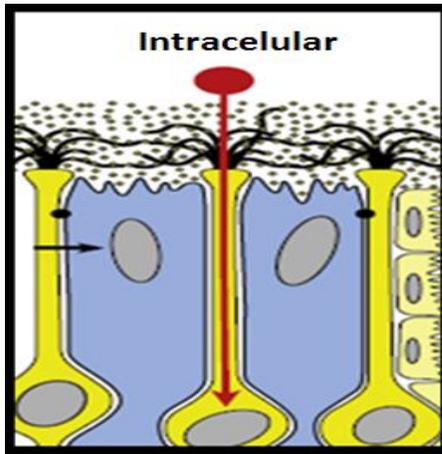


Fig. 5a. Transporte por vía intracelular en el epitelio olfatorio: endocitosis por parte de las Neuronas Sensoriales Olfatorias (Tomado y modificado de: Thorne y Lochhead, 2012).

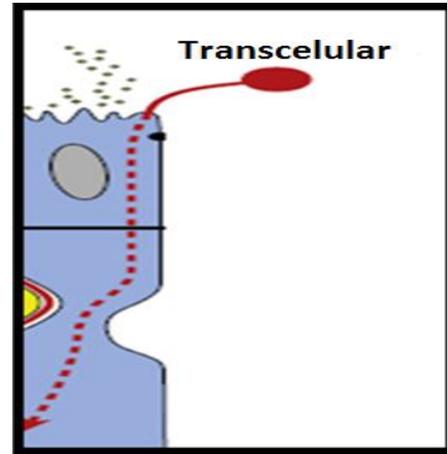


Fig. 5b. Transporte por vía intracelular en el epitelio olfatorio: transporte a través de las células sustentaculares (Tomado y modificado de: Thorne y Lochhead, 2012).

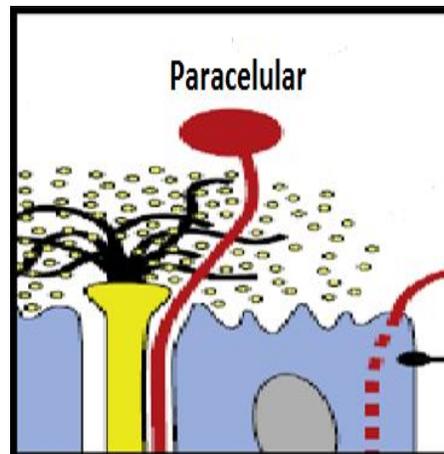


Fig. 6. Transporte por vía extracelular en el epitelio olfatorio: difusión paracelular (Tomado y modificado de: Thorne y Lochhead, 2012).

3.8. Transporte desde la mucosa hacia los puntos de entrada al cerebro

El transporte desde la mucosa nasal hacia sitios de entrada al cerebro a nivel de los bulbos olfatorio o el tronco cerebral puede ocurrir de manera intracelular o extracelular; en la sección anterior ya se vieron las rutas intracelulares. Los posibles destinos de las sustancias que alcanzan la lámina propia de manera extracelular podrían ser: (1) absorción en los vasos sanguíneos y entrada a la circulación general; (2) absorción en los vasos linfáticos y drenaje hacia los ganglios linfáticos cervicales del cuello; (3) transmisión a través de los espacios

perineurales que rodean a la fila olfatoria con la subsecuente entrada al compartimiento craneal (Thorne y Lochhead, 2012) (**Figura 7**).

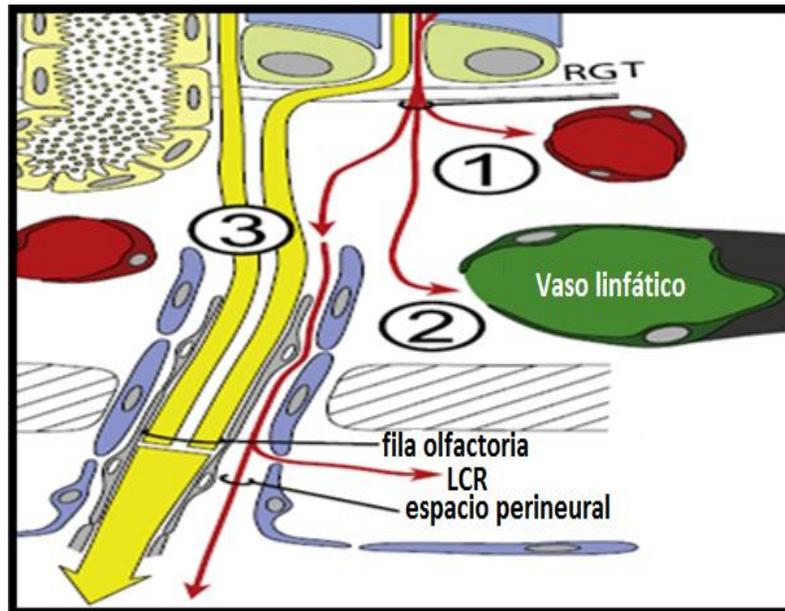


Fig. 7. Destino de las sustancias que alcanzan la lámina propia (Tomado y modificado de: Thorne y Lochhead, 2012).

3.9. Transporte hacia otros sitios del cerebro

Se cree que la distribución final de sustancias desde los puntos de entrada al nivel del bulbo olfatorio y tronco cerebral hacia otras áreas del SNC puede ocurrir por transporte intracelular, transfiriéndose a neuronas de segundo orden cuando las NSO o el nervio trigémino hacen sinapsis con ellas o por vía extracelular mediante la distribución generalizada a través de los espacios perivasculares cerebrales, permitiendo una difusión local desde estos espacios hasta el parénquima cerebral; el flujo extracelular ocurre a lo largo de los componentes del nervio olfatorio hacia el bulbo olfatorio y trigémino hacia el puente tronco encefálico en el tallo cerebral, el mecanismo que podría explicar la distribución de moléculas desde los puntos de entrada en el nervio olfatorio y trigémino en el cerebro hacia otros sitios distantes del SNC es la gran cantidad de flujo presente en los espacios perivasculares de los vasos sanguíneos cerebrales (Illum, 2000) (**Figura 8**).

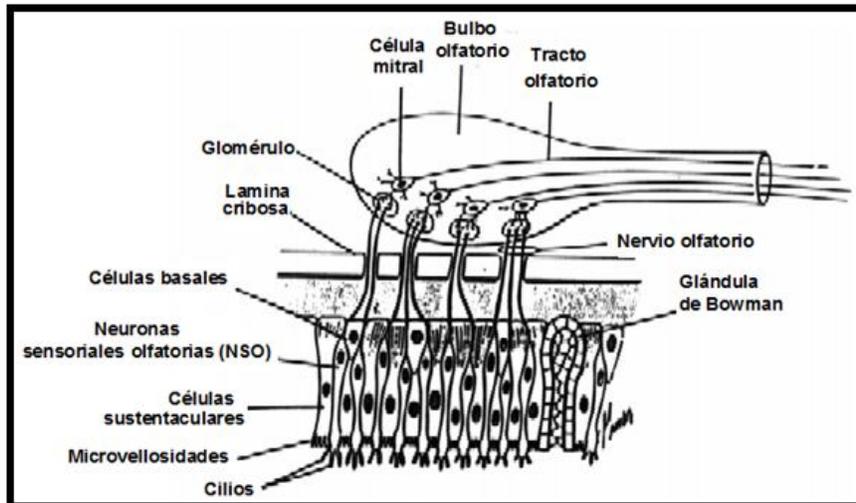


Fig. 8. Transporte desde el epitelio olfatorio hacia otros sitios del cerebro (Tomado y modificado de: Illum, 2000)

3.10. La proteína verde fluorescente (GFP)

La GFP (Green Fluorescent Protein) es una proteína compuesta por 238 aminoácidos y con un peso molecular de 27-30 kDa y proviene de la medusa de mar bioluminiscente *Aequorea victoria*, la luz es producida cuando la energía es transferida desde la fotoproteína activada por calcio aequorina hacia la proteína verde fluorescente (Shimomura et al., 1962; Ward et al., 1980). La GFP produce un color verde intenso ya que absorbe luz azul a una longitud de onda máxima de 395 nm y emite luz verde a un máximo de 509 nm, además su grupo cromóforo emite luminiscencia sin necesidad de cofactores externos (Arun et al., 2005).

Desde que se pudo codificar genéticamente el gen para la GFP fue posible fusionar fácilmente a la GFP con prácticamente cualquier proteína deseada para vigilar los procesos intracelulares, de esta manera la GFP se convirtió en una herramienta fundamental en la investigación actual de la biología celular. La GFP, al igual que otras proteínas fluorescentes, tiene una estructura proteica en 3D que consiste en 11 cadenas en forma de barril con una α -hélice interna donde se encuentra incrustado el tripéptido cromogénico (Ser65-Tyr66-Gly67 en la GFP) (Bettati, 2011).

3.11. Plásmido pIRES-hrGFP-1a

Este vector contiene un solo sitio de clonación múltiple (MCS), seguido por el IRES (internal ribosome entry site), unido a la secuencia codificante hrGFP (humanized recombinant GFP) (amplicon: 250pb), la expresión del transcrito bicistrónico está dado por el promotor de citomegalovirus (P CMV), situado corriente arriba del MCS, las señales de poliadenilación SV40 corriente abajo de hrGFP dirigen el correcto procesamiento del extremo 3' del mRNA. Este diseño permite la expresión de un gen de interés para ser monitoreado a nivel celular debido a la expresión de la hrGFP.

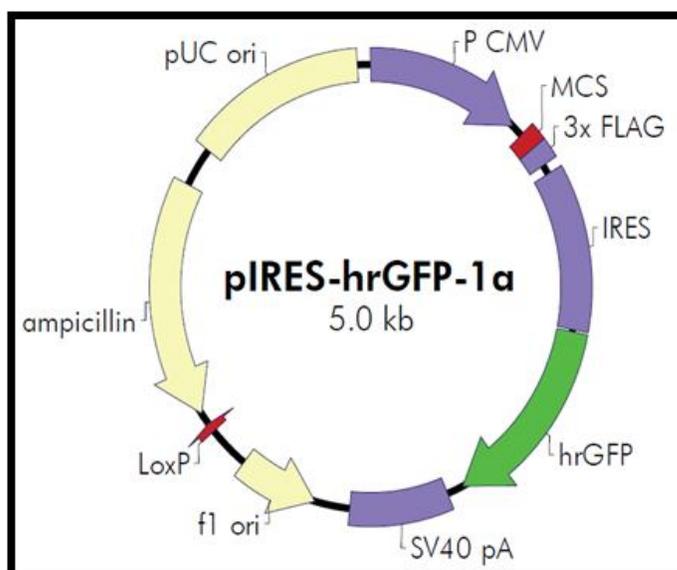


Fig. 9. Estructura del plásmido pIRES-hrGFP-1a.

3.12. El RNA 18S ribosomal

En el análisis de la expresión de genes, tanto la calidad como la cantidad de RNA mensajero (mRNA) obtenido puede variar de una muestra a otra. Para el control de tales variaciones, estándares internos o controles internos se han empleado para la normalización de los niveles de expresión de genes cuando son evaluados a través de técnicas como Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). El uso de genes endógenos como estándares internos requiere que sean expresados a un

nivel constante entre diferentes tejidos en todas las etapas de desarrollo y que no sean afectados por tratamiento experimental (Bustin, 2000). Los estándares endógenos más comunes actualmente en uso son los genes de actina, ubiquitina, gliceraldehído - 3 -fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el RNA18S (amplicon: 324 pb). A pesar de los informes de que los niveles de expresión de GAPDH y actina pueden variar ampliamente en algunos tejidos o tipos de células en respuesta a la manipulación experimental (Bustin, 2000; Goidin et al., 2001; Schmittgen y Zakrajsek, 2000), los estudios que utilizan estos genes como normas endógenas todavía se pueden encontrar en algunas de las publicaciones actuales.

El RNA ribosomal se ha convertido en el estándar más empleado cuando se utiliza junto con RT-PCR y RT-qPCR. Varios estudios recientes también han llegado a la conclusión de que el uso de RNA ribosomal como un estándar interno fue consistentemente la mejor opción cuando se comparó con otros métodos en una variedad de sistemas celulares (Aerts et al., 2004; Schimid et al., 2003).

4. JUSTIFICACIÓN

Al administrar sustancias de elevado peso molecular a través de la vía enteral estas son incapaces de traspasar la BHE, solamente moléculas liposolubles de bajo peso molecular son capaces de atravesarla, las características intrínsecas que hacen tan selectivo a este tipo de endotelio han despertado la necesidad de encontrar una alternativa que permita evitar esta barrera, por lo cual la cavidad nasal como una posible vía de administración para el envío de vectores génicos hacia el cerebro se encuentra en estudio por diversos grupos de investigación en el mundo ya que los plásmidos administrados intranasalmente son ideales para sortear este obstáculo, alcanzando al cerebro sin entrar en contacto con la BHE, además la administración IN de plásmidos ofrece futuras aplicaciones debido a la posibilidad de insertar en estos vectores genes específicos con la capacidad de expresar proteínas con algún efecto terapéutico y así contribuir en futuros estudios sobre terapia génica.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que los mecanismos implicados en el transporte de un plásmido desde la cavidad nasal hasta el cerebro aún siguen sin conocerse con exactitud, se cree que hay dos rutas principales: la primera a través de las NSO, las cuales entran en contacto con neuronas de segundo orden en el glomérulo de los bulbos olfatorios, la segunda a través del nervio trigémino, que al generarse en el puente troncoencefálico podría funcionar en sentido inverso con respecto a su origen transportando al vector génico hacia el tallo cerebral (Thorne y Lochhead, 2012). Recientemente se ha demostrado que dos plásmidos: pCMV β (7.2kb) y pN2/CMV β (14.1kb), fueron capaces de llegar a distintas regiones del cerebro después de haber sido administrados intranasalmente (Han, et al., 2007; Oh, et al., 2001). Con base en esta información el plásmido pIRES-hrGFP-1a se administró por la vía intranasal a ratones con objeto de establecer si 24 horas son suficientes para que este vector plasmídico pueda llegar hasta el cerebro una vez que entra en contacto con el epitelio nasal y así determinar su capacidad de alcanzar distintas áreas del cerebro.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El pIRES-hrGFP-1a será capaz de llegar hasta el cerebro y expresar la GFP 24 horas después de haber sido administrado intranasalmente?

7. HIPÓTESIS

Si se administra el pIRES-hrGFP-1a por vía intranasal, éste logrará arribar a diferentes regiones cerebrales y entonces se observará la expresión de la GFP.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general

Identificar la presencia del plásmido pIRES-hrGFP-1a y la expresión de la GFP en cerebro de ratones mediante técnicas de biología molecular y tinciones inmunohistoquímicas, para determinar si el plásmido es capaz acceder al cerebro 24 horas posteriores a la administración IN.

8.2. Objetivos específicos

1.- Detectar tanto al pIRES-hrGFP-1a como la expresión de la GFP en nervios olfatorios, nervios ópticos, bulbos olfatorios, corteza cerebral, hipocampo, amígdala, hipotálamo, cerebelo y tallo cerebral, mediante PCR y RT-PCR respectivamente, 24 horas posteriores a la administración IN.

2.- Detectar la GFP en cortes histológicos de cerebro en fresco y realizando inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP 24 horas posteriores a la administración IN.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α con plásmido pIRES-hrGFP-1a, por el método de choque térmico

En el laboratorio ya se contaba con bacterias capacitadas químicamente para permitir la entrada de material genético (bacterias competentes) y con el plásmido comercial pIRES-hrGFP-1a.

A 7 μ L de una dilución del pIRES-hrGFP-1a (concentración final 1 μ g/ μ L) se le agregó, en condiciones de esterilidad, 100 μ L de bacterias competentes *E. coli* DH5 α , este tubo se dejó reposar en hielo 15 minutos para después incubarlo a 42°C por 2 minutos, posteriormente el tubo se volvió a colocar en hielo por otros 15 minutos. Se adicionó en esterilidad 1 mL medio de crecimiento Luria Bertani (LB), y se incubó a 37°C/1 hora. Después de la incubación, 100 μ L de bacterias transformantes se sembraron masivamente en una caja Petri con medio LB y ampicilina como antibiótico de selección. La caja se incubó 24 horas/37°C.

9.2. Cultivo de bacterias *E. coli* DH5 α ampicilina-resistentes

Se prepararon 4 tubos con 5 ml de medio LB y 5 μ L de ampicilina (100 mg/mL). Un tubo funciona como control negativo mientras que en los tres tubos restantes se sembraron tres colonias diferentes de bacterias ampicilina-resistentes obtenidas en el procedimiento anterior, estos tubos se dejaron agitando 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo en tres matraces Erlenmeyer se colocaron 300 ml de medio LB y 300 μ L de ampicilina, se agregó a cada uno 3 ml de bacterias ampicilina-resistentes que crecieron en cada uno de los tres tubos. Estos matraces se dejaron agitando 24 horas/37°C.

9.3. Purificación del pIRES-hrGFP-1a utilizando el kit “plasmid plus (100)

QIAGEN plasmid MIDI”

Se pasó a frascos de plástico el cultivo de los matraces del día anterior y se balancearon para luego centrifugar el cultivo a 4000 r.p.m. por 30 min. a 4°C, se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 4 ml de amortiguador P1 (Resuspension buffer), Se adicionaron 4 ml de amortiguador P2

(Lysis buffer) y se mezcló por inversión de 4-6 veces para luego incubar a temperatura ambiente por 3 min. A continuación, se adicionaron 4 ml de amortiguador S3 frío (Neutralization buffer), se mezcló inmediatamente por inversión y el lisado se transfirió al filtro y se incubó a temperatura ambiente por 10 min., durante la incubación se prepararon las columnas de QIAGEN MIDI con el adaptador y se montaron en una trampa de vacío. Pasados los 10 minutos de incubación se insertó el pistón en el filtro y se filtró el lisado en un tubo nuevo. Posteriormente, se adicionaron 2 ml de amortiguador BB (*Binding buffer*) y se mezcló por inversión de 4-6 veces. En seguida, se transfirió el lisado a la columna de QIAGEN MIDI y se conectó la fuente de vacío para eliminar el amortiguador y dejar en la columna el DNA. Se lavó la columna con 0.7 ml de amortiguador ETR (*Endotoxin wash buffer*) y se centrifugó a 12000 r.p.m. por 1 min. descartando el sobrenadante. Se agregaron 0.7 ml de amortiguador PE (*wash buffer*) y se centrifugó a 12000 r.p.m. por 1 min. desechando el sobrenadante. Para remover completamente los residuos de amortiguador PE se centrifugó nuevamente la columna a 12000 r.p.m. por 1 min. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf nuevo y se eluyó el DNA plásmidico adicionando 200 μ L de amortiguador EB (*elution buffer*) en el centro de la columna, se dejó incubando por 1 min. y se centrifugó a 12000 r.p.m. por 1 min. Este último paso se repitió para obtener una segunda elución del DNA de la columna.

9.4. Cuantificación del pIRES-hrGFP-1a en NanoDrop ND1000

Para limpiar la superficie óptica se colocaron 3 μ L de agua estéril desionizada en la superficie óptica inferior del sistema de retención, se cerró el brazo para asegurar que el pedestal superior entrara en contacto con el agua desionizada y se retiró el agua de las superficies ópticas con un pañuelo especial para superficies delicadas. En el software de NanoDrop se seleccionó la aplicación para cuantificar dsDNA, con ayuda de un micropipeta se colocó 1 μ L de elution buffer (EB) en la superficie óptica inferior, se bajó el brazo, se seleccionó la opción *blank* y *measure*, una vez que la medición estuvo completa las superficies ópticas fueron limpiadas con un pañuelo para superficies delicadas. Se colocó 1 μ L de muestra

en la superficie óptica inferior, se seleccionó la opción *measure* en la aplicación y el software calculó automáticamente la concentración de plásmido en las muestra. Finalmente la muestra fue removida con un pañuelo y la superficie óptica limpiada con agua desionizada. De esta manera fueron cuantificadas la primera y segunda elución del plásmido (ver **tabla No. 18**).

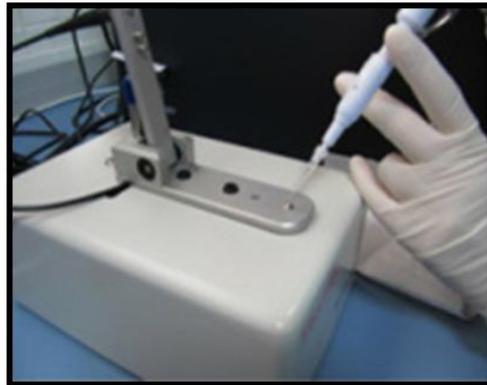


Fig. 10. NanoDrop ND1000, Thermo Scientific.

9.5. Modelo Animal (Ver anexo al final)

Se utilizaron 27 ratones hembra de la cepa Balb/c de 8-10 semanas de edad los cuales recibieron alimento (Harlan 5000) y agua *ad libitum* del bioterio del CMNSXXI. Se formó un grupo experimental (n=18) y uno control (n=9). Para poder diferenciar entre ambos grupos se utilizó la técnica de muesqueo de oreja, el grupo experimental se marcó en la oreja izquierda y el control en la oreja derecha.

9.6. Administración intranasal del pIRES-hrGFP-1a

Con ayuda de una micropipeta se administró vía intranasal una solución que contenía 25 μg del pIRES-hrGFP-1a al grupo experimental y al control un volumen equivalente de PBS; 24 horas después fueron sacrificados por decapitación y posteriormente fueron extraídos los cerebros, para ello se siguieron las especificaciones indicadas en la NOM-062-ZOO-1999 (**Figura 11**).



Fig. 11. El pIRES-hrGFP-1a se administró por instilación (gota a gota), 24 horas después los ratones fueron sacrificados.

Para asegurar que se administró un volumen que contuviera los 25 µg de plásmido, se realizaron los cálculos necesarios con base en la cuantificación del plásmido que se hizo en el NanoDrop (ver resultados), por ejemplo: se cuantificó 1071.5 ng/µL de pIRES-hrGFP-1a en una de las eluciones, se realizó el siguiente cálculo:

$$X\mu\text{L}=25\mu\text{g} \times \frac{1\mu\text{L}}{1071.5\text{ng}} \times \frac{1000\text{ng}}{1\mu\text{g}} = 23.33\mu\text{L}$$

De tal manera que al administrar 23.3 µL de la solución también se administró 25 µg de plásmido por la vía intranasal. De acuerdo a la cantidad de plásmido cuantificada el volumen necesario para administrar 25 µg de plásmido de cada elución fue el siguiente:

Tabla No. 1. Volumen de plásmido purificado a administrar por la vía IN de cada una de las tres muestras obtenidas.

Primera elución de plásmido	Concentración de plásmido (µg)	Volumen administrado vía IN al lote experimental (µL/ratón)
pIRES 1	25	23.3
pIRES 2	25	13.0
pIRES 3	25	23.6

Por ser el más concentrado y por lo tanto requerir un menor volumen para la administración IN, la primera elución del pIRES 2 fue utilizada para todo el lote experimental (ver **tabla No. 18**). De la misma manera se administró un volumen equivalente de PBS al grupo control. Las eluciones del pIRES 1 y 3 que no se usaron fueron almacenadas a -20°C .

9.7. Extracción de cerebro de ratón

La cabeza de cada ratón fue enjuagada con agua corriente para retirar el exceso de sangre y se procedió de la siguiente manera:

Se retrajo hacia el hocico toda la piel que cubre al cráneo y con los dedos índice y pulgar se sujetó esta piel para tener una buena sujeción de la cabeza (**Figura 12**).



Fig. 12. Para facilitar el trabajo, es recomendable despegar la piel del cráneo con la punta de las tijeras antes de comenzar a retraerla.

Con tijeras de punta curva se realizó un corte en el cráneo sobre la línea media, desde la altura del tallo cerebral hasta el comienzo del hocico del ratón (**Figura 13**).



Fig. 13. El corte se comenzó introduciendo las tijeras por el hueco de la tráquea.

Se hicieron dos cortes más, ambos partiendo desde la altura del tallo cerebral hasta cada una de las cavidades auditivas del animal (**Figura 14**).

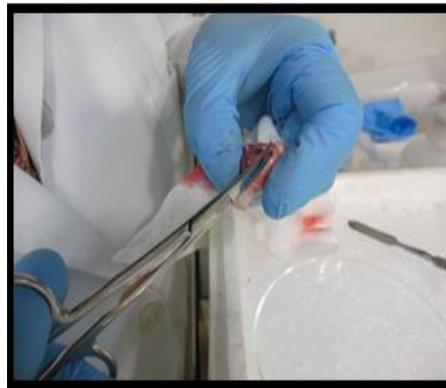


Fig. 14. En este caso las tijeras con las que se realizaron ambos cortes también se introdujeron desde la tráquea.

Con ayuda de unas pinzas se comenzó a desprender el cráneo para dejar descubierto al cerebro (**Figura 15**).



Fig. 15. Se tuvo mucho cuidado de no lesionar al cerebro con las pinzas al estar desprendiendo los fragmentos de cráneo.

Una vez que el cerebro se encontraba expuesto, se desprendió con unas pinzas desde su base y se cortó cualquier estructura que estuviera reteniéndolo para que cayera por efecto de la gravedad. El cerebro se colocó en una caja Petri y se lavó con SSF (**Figura 16**).

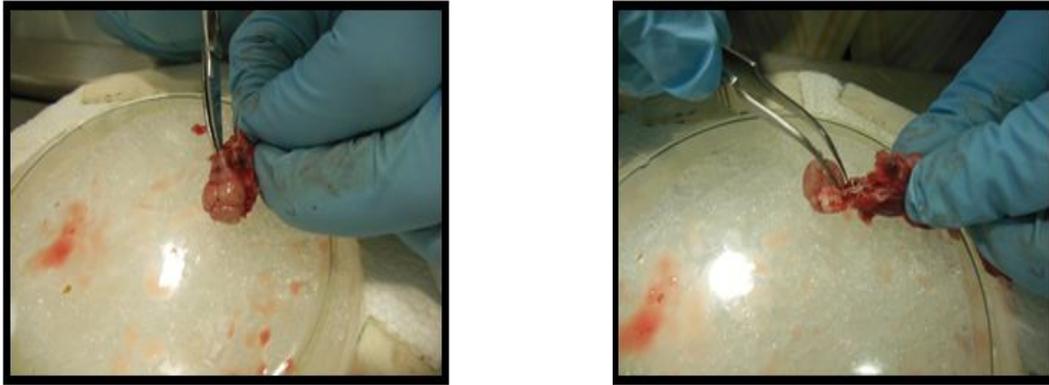


Fig. 16. Se extrajo el cerebro lo más íntegro posible, para después diseccionar las áreas de interés.

9.8. Procesamiento de las muestras

Para realizar cortes histológicos y tinciones inmunohistoquímicas, se usaron 6 cerebros del grupo experimental y 3 del grupo control; estos órganos fueron tratados como se indica en los **apartados 9.9. y 9.10.**

De los 12 cerebros restantes del grupo experimental: 6 se diseccionaron para obtener los bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**), adicionalmente se extrajeron nervios olfatorios (**N.Olf**) y nervios ópticos (**N.Opt**); cada una de estas estructuras fue recolectada por separado en 9 tubos eppendorf (un tubo para 6 bulbos olfatorios, un tubo para 6 cortezas cerebrales, etc.), los tubos fueron etiquetados con el nombre de las muestras contenidas antes de ser almacenados a -70 °C para posteriormente llevar a cabo la extracción de DNA y PCR (**Figura 17**). Se utilizó el mismo procedimiento para los últimos 6 cerebros del grupo experimental, realizándose la extracción de RNA y RT-PCR a partir de estas muestras (**Figura 18**). Los 6 cerebros remanentes del grupo control se procesaron de la misma manera pero se utilizaron 3 cerebros para extracción de DNA y PCR y 3 para extracción de RNA y RT-PCR.

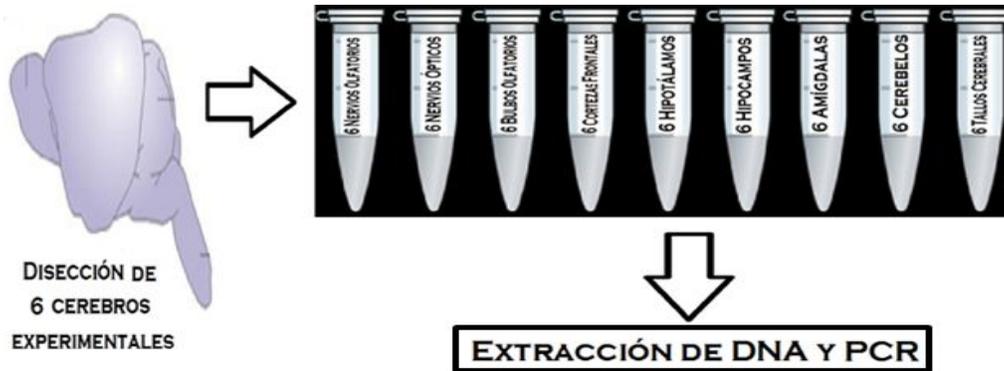


Fig. 17. Se destinaron 6 cerebros del grupo experimental para realizar extracción de DNA y PCR. El mismo procedimiento se realizó con 3 cerebros del grupo control.

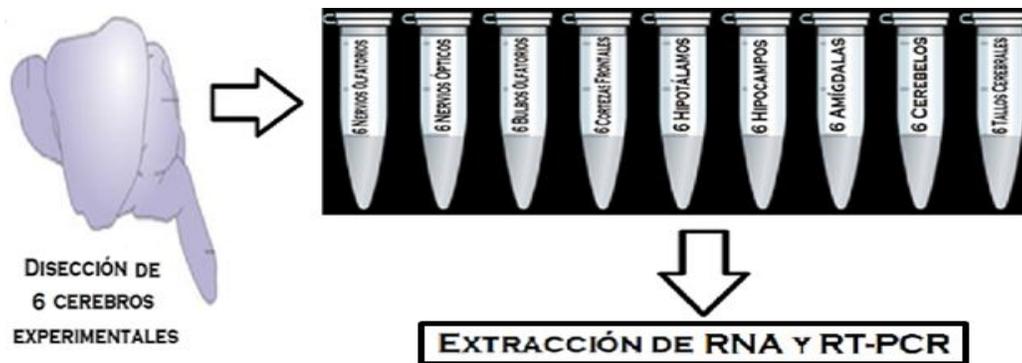


Fig. 18. Los 6 cerebros restantes del grupo experimental se utilizaron para realizar extracción de RNA y RT-PCR. El mismo procedimiento se realizó con 3 cerebros del grupo control.

9.9. Cortes histológicos del cerebro

Una vez extraído el cerebro, se colocó en 2-metilbutano (Merck) por 2 min, trascurrido este tiempo se realizó un corte coronal y se transfirieron los segmentos del cerebro a hielo seco, se dejaron ahí por 1 min, después se fijaron con Tissuettek (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y se realizaron cortes de 5-10 μm de grosor en un criostato (Leica, Frigocut 2800N).



Fig. 19. Las flechas azules indican la dirección en que fueron realizados los cortes en el criostato.

9.10. Tinción Inmunohistoquímica

Una vez que los cortes fueron montados en un portaobjetos, se hidrataron en PBS 0.12 M por 5 min, se colocaron sobre el portaobjetos algunas gotas de suero normal de caballo 1:200 y se dejó reposar 30 min, se agregó 1 mL del anticuerpo anti-GFP 1:200 (GFP SC-8334, Santa Cruz Biotechnology), se mantuvo en reposo por 24 h para posteriormente lavar con PBS 0.12 M por 10 min, se agregó 1 mL de anti-anticuerpo anti-GFP (Alexa fluor 488 goat anti-mouse) 1:200 dejándose reposar por 2 h, se lavó con PBS 0.12M por 5 min, se adicionaron 2 gotas de yoduro de propidio dejándose reposar 2 min, se lavó con PBS 0.12 M por 5 min, se agregaron algunas gotas de Vectashield (Vector Laboratories) y finalmente se colocó un cubreobjetos para observar la muestra bajo el microscopio de epifluorescencia.

9.11. Extracción de RNA

El contenido de cada uno de los tubos destinados para extracción de RNA y RT-PCR tanto del grupo control como experimental y etiquetados como nervios ópticos, nervios olfatorios, bulbos olfatorios, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdala, cerebelo y tallo cerebral que se mantuvieron a -70°C fue pesado y pulverizado por separado en morteros estériles agregando un poco de N₂ líquido, se dejó evaporar el nitrógeno, se recuperó el polvo de tejido en tubos eppendorf para después agregarle 1 ml de TRIZOL reagent, disgregando por completo con un homogeneizador de tejidos (Tissue Master 125, OMNI international). Se centrifugó a 1200 rpm/10min/4°C, se recuperó el sobrenadante y se le agregó 0.1 ml de 1-bromo-3-cloropropano, a continuación se centrifugó a 1200 rpm/15min/4°C y se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio, a esta fase se le adicionó 0.5 ml de isopropanol y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1200 g/10min/4°C. El botón se lavó con 1 ml de solución de H₂O-DEPC/etanol al 75%, posteriormente se centrifugó a 1200 rpm/5min./4°C, se deshechó el sobrenadante dejando secar el botón al aire 5 min., una vez transcurrido este tiempo, se resuspendió en 100 µL de H₂O-DEPC, obteniendo así el RNA total de cada una de las muestras. Se tomaron 10 µL de cada muestra de

RNA para agregarles 2 μL de buffer de carga 2X; se mezcló en vortex, se cargó el volumen total en un gel de agarosa al 0.8% y se corrió una electroforesis a 70V/1h para determinar la presencia del RNA extraído, el RNA restante de cada muestra del grupo control y experimental fue almacenado a -70°C esperando su cuantificación y ser utilizado para realizar PCR de las unidades 18s y GFP.

9.12. Tratamiento con DNasa I

Todas las muestra de RNA se trataron con DNasa I, en caso de que las muestras aun contuvieran DNA genómico.

Preparación de DNasa I buffer 10X:

400 mM Tris pH 8

100 mM MgCl_2

30 mM CaCl_2

En un tubo eppendorf se colocaron 5 μL de RNA, se agregó 1 μL de DNasa buffer 10X y 1 μL de DNasa I (Roche), la reacción se llevó a un volumen final de 10 μL con H_2O -DEPC, se mezcló muy bien y se incubó a $37^{\circ}\text{C}/1\text{h}$, se agregó 1 μL de EDTA 25 mM y se incubó a $65^{\circ}/15\text{min}$.

9.13. Cuantificación de RNA por espectrofotometría

Preparación del blanco: Se agregó 10 μL de H_2O -DEPC a 490 μL de agua bidestilada estéril en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se homogenizó en vortex durante algunos segundos.

Preparación de las muestras: Se agregó 5 μL de RNA de cada una de las muestras control y experimentales a 495 μL de agua bidestilada estéril en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se homogenizó en vortex durante algunos segundos.

El espectrofotómetro (unicom optics uv-visible 2100c) se ajustó a 260nm/280nm, la solución blanco se transfirió a una cubeta de plástico y se introdujo en el espectrofotómetro para calibrarlo. Una vez calibrado, se introdujeron en el espectrofotómetro las cubetas con las muestra de RNA y se obtuvieron las absorbancias y las concentraciones expresadas en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

9.14. RT-PCR

El RNA obtenido se sometió a una reacción de RT-PCR para obtener el cDNA. Las muestras de RNA de las diferentes áreas del cerebro se diluyeron en agua libre de nucleasas de tal manera que un volumen de 10 μ L contenía 2 μ g de RNA (ver resultados de cuantificación de RNA). Se preparó la reacción del “master mix” agregando las cantidades que se muestran a continuación de cada uno de los reactivos del kit para RT-PCR (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems):

Tabla No. 2. Volumen de reactivos empleados en la preparación del “master mix” necesario para la síntesis de cDNA.

Componente	Volumen (μ L)
10X RT Buffer	2.0
25X dNTPs Mix (100Mm)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
Multiscribe Reverse Transcriptase	1.0
cbp 10 μ L con H ₂ O libre de nucleasas	

Finalmente los 10 μ L de la dilución de RNA mencionada se mezcló con 10 μ L de este “master mix” obteniendo un volumen total de 20 μ L los cuales se colocaron en un termociclador para realizar la RT-PCR siguiendo las condiciones indicadas en el inserto (**Tabla No. 3**).

Tabla No. 3. Condiciones a las que se llevó a cabo la RT-PCR.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10min	120min	5min	∞

De esta manera se obtuvo el cDNA de las muestras tanto de los grupos control como experimental. Este cDNA se almacenó a -20°C esperando su cuantificación y ser utilizado para realizar PCR para 18S y GFP.

9.15. PCR 18S a partir de cDNA

Se inicio con una dilución 1:100 de cada una de las muestras de cDNA tanto del grupo control como experimental, de esta dilución se tomó **1.0µL** y se probó amplificar las unidades 18S, se probaron las diluciones necesarias hasta encontrar la ideal para amplificar a 18S, en algunas muestras fue necesario agregar directamente 1.0 µL de cDNA. Se utilizó un kit (GoTaq Green Master Mix, Promega Corporation) en el cual el mix (GoTaq Green Master Mix) de reacción venía listo para usarse inmediatamente, es decir que ya venían mezclados el buffer de reacción, el MgCl₂, los dNTPs y la TaqPol; el inserto indicaba los volúmenes necesarios a utilizar de cada uno de los componentes para una reacción de PCR de 10 µL (**Tabla No.4**).

Tabla No. 4. Volumen de reactivos empleados para la preparación de una reacción de PCR de 10µL de acuerdo al inserto del kit.

Reactivo	Volumen agregado (µL)
GoTaq Green Master Mix	5
Plantilla de DNA	1-5
Forward 18S	0.2
Reverse 18S	0.2
cbp 10 µL con H₂O libre de nucleasas	

Las reacciones de PCR para 18S del grupo control y experimental (**Tabla No. 5 y 6 respectivamente**) fueron preparadas tomando en cuenta la información de la **tabla No. 4**.

Tabla No. 5. Reacciones de PCR para 18S en cDNA obtenido mediante una RT-PCR del RNA del grupo control. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras del grupo control	N. opt	N. olf	B. O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T.C.
Mix (μL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
cDNA (μL) / dilución ideal	1.0 directo	1.0 1:100	1.0 1:50	1.0 directo	1.0 1:100	1.0 1:100	1.0 1:100	1.0 1:50	1.0 1:100
Forward 18S	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Reverse 18S	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H₂O libre de nucleasas (μL)	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
Volumen final (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla No. 6. Reacciones de PCR para 18S en cDNA obtenido mediante una RT-PCR del RNA del grupo experimental. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras Experimentales	Control (-)	N. opt	N. olf	B. O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T.C.
Mix (μL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
cDNA (μL) / dilución ideal	-	1.0 1:100	1.0 1:100	1.0 directo	1.0 1:20	1.0 1:100	1.0 1:100	1.0 1:20	1.0 1:100	1.0 1:100
Forward 18S	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Reverse 18S	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H₂O libre de nucleasas (μL)	4.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
Volumen total (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Secuencias de los primers para 18S empleados:

Forward (5'-TCTCGATTCCGTCGGGTGGTGG-3')

Reverse (5'-CTTATGACCCGCACTTACTCG-3')

Las condiciones que se fijaron en el termociclador (Bio-Rad, MJ Mini Personal Thermal Cycler) y a las cuales fueron sometidas las muestras del grupo control y experimental aparecen en la **tabla No. 7**.

Tabla No. 7. Condiciones para la PCR de 18s

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Temperatura	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	1min	30s	30s	30s	7min.	∞

┌──────────────────┐
└──────────────────┘
24x

9.16. PCR GFP a partir de cDNA

En esta ocasión se partió de las diluciones de cDNA que funcionaron para amplificar 18S tanto en el grupo control como experimental, de estas diluciones se tomó **1.0 µL** de cada una de las muestras y se amplificó el gen de la GFP, de la misma manera se probaron las diluciones necesarias hasta encontrar la ideal para amplificar a GFP, en algunas muestras fue necesario agregar directamente 1.0 µL de cDNA. Se utilizó el mismo kit (GoTaq Green Master Mix, Promega Corporation) que se indica en la **Tabla No. 4**.

Las reacciones de PCR para GFP del grupo control y experimental (**Tabla No. 8 y 9, respectivamente**) se prepararon realizando los ajustes necesarios con respecto a las cantidades de cDNA empleadas en la PCR de 18S.

Tabla No. 8. Reacciones de PCR para GFP a partir de cDNA obtenido mediante una RT-PCR del RNA del grupo control. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras Control	(-)	(+)	N. Opt	N. olf	B. O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T.C.
Mix (µL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
cDNA (µL) / dilución ideal	-	1.0*	1µL directo	1.0 1:50	1.0 directo	1µL directo	1µL directo	1.0 1:100	1.0 1:100	1.0 1:50	1.0 1:100
Forward GFP	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Reverse GFP	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O libre de nucleasas (µL)	7.6	2.6	3.6	2.6	2.6	3.6	3.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Volumen total (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla No. 9. Reacciones de PCR para GFP a partir de cDNA obtenido mediante una RT-PCR del RNA del grupo experimental. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras Experimentales	(-)	(+)	N. opt	N. olf	B. O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T. C.
Mix (µL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
cDNA (µL)/ dilución ideal	-	1.0*	1.0 1:10	1.0 1:10	1.0 directo	1.0 directo	1.0 1:10	1.0 1:10	1.0 directo	1.0 1:10	1.0 1:10
Forward GFP	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Reverse GFP	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O libre de nucleasas (µL)	4.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Volumen total (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

*El DNA utilizado en la reacción de PCR para el control positivo se tomó de una dilución 1:50 previamente preparada de pIRES-hrGFP-1a con una concentración original de 1056ng/µL.

Secuencias de los primers para GFP empleados:

Forward (5'-GTGAGCAAGCAGATCCTGAAG-3')

Reverse (5'-ACTTGGTGAAGGTGCGGTTG-3')

Las condiciones que se fijaron en el termociclador (Bio-Rad, MJ Mini Personal Thermal Cycler) y a las cuales fueron sometidas las muestras del grupo control y experimental aparecen en la **tabla No. 10**.

Tabla No. 10. Condiciones para la PCR de GFP

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	2min	30s	30s	30s	3min.	∞



34x

9.17. Extracción de DNA

El contenido de cada uno de los tubos destinados para extracción de DNA y PCR tanto del grupo control como experimental y etiquetados como nervios ópticos, nervios olfatorios, bulbos olfatorios, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdala, cerebelo y tallo cerebral que se mantuvo a -70°C fue pesado y pulverizado por separado en morteros estériles agregando un poco de N₂ líquido. Se dejó evaporar el nitrógeno, se recuperó el polvo de cada tejido en tubos eppendorf resuspendiéndose en 10 volúmenes de buffer de lisis siendo disgregado por completo con un homogenizador de tejidos (Tissue Master 125, OMNI international), se adicionaron 3 µL de RNAsa incubándose a 37°C/1hora, transcurrido este tiempo se agregaron 10 µL de proteinasa K, se mezcló bien para después incubar a 50°C durante 3 horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente (TA) y se agregó un volumen de fenol 0.1 M pH=8, se mezcló el tubo por

inversión y se centrifugó a 6500 rpm/15min/temperatura ambiente (TA) y con una pipeta Pasteur estéril se transfirió la fase acuosa a otro tubo, repitiéndose dos veces más la extracción con fenol, a este sobrenadante acuoso recuperado se le adicionó 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto a TA. Para recuperar el DNA precipitado se centrifugó a 10000 rpm/5min/TA, una vez que el DNA se fue al fondo del tubo se deshecho el sobrenadante y el DNA precipitado se lavó 3 veces con etanol al 70%, se agregaron 100 μ L de tris-EDTA (TE) y los tubos se pusieron en agitación 24 horas a 4°C para disolver el DNA, transcurrido este tiempo, se tomaron 10 μ L de cada una de las muestras de DNA para agregarles 2 μ L de buffer de carga 2X, se mezcló en vortex, se cargó el volumen total en un gel de agarosa al 1.2% y se corrió una electroforesis a 70V/1h para verificar la presencia del DNA extraído, el DNA restante de cada muestra del grupo control y experimental fue almacenado a -20°C para posteriormente cuantificarlo y ser utilizado para realizar la PCR de las unidades 18S y GFP.

9.18. Cuantificación de DNA por espectrofotometría

Preparación del blanco: Se agregó 10 μ L de Tris-EDTA y 490 μ L de agua bidestilada estéril en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se homogenizó en vortex durante algunos segundos.

Preparación de las muestras: Se agregó 5 μ L de DNA de cada una de las muestras control y experimentales a 495 μ L de agua bidestilada estéril en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se homogenizó en vortex durante algunos segundos.

El espectrofotómetro (unicom optics uv-visible 2100c) se ajustó a 260nm/280nm, la solución blanco se transfirió a una cubeta de plástico y se introdujo en el espectrofotómetro para calibrarlo. Una vez calibrado se introdujeron en el espectrofotómetro las cubetas con las muestra de DNA y se obtuvieron las absorbancias y las concentraciones expresadas en μ g/ μ L.

9.19. PCR 18S a partir de DNA

Tanto las muestras control como las experimentales fueron sometidas a una PCR de 18S utilizando el DNA obtenido de la extracción de DNA. Se utilizó un kit (Axygen Biosciences) cuyo inserto indicaba que para una reacción de PCR de 10µL se debían agregar las siguientes cantidades de reactivos para preparar el mix:

Tabla No. 11. Volumen de reactivos empleados para la preparación del mix para una reacción de PCR de 10µL de acuerdo al inserto del kit.

Reactivo	Volumen final (µL)
Buffer de reacción 5x	1
MgCl ₂ 7.5mM	0.6
dNTP 1mM	0.2
Forward 18S	0.2
Reverse 18S	0.2
TaqPol (5U/µL)	0.2
Volumen total	2.4

De acuerdo a la cuantificación de DNA por espectrofotometría, se realizaron los cálculos necesarios para agregar un volumen de muestra que contuviera 300 ng de DNA (ver resultados de cuantificación por espectrofotometría). Como ejemplo, para los nervios olfatorios del grupo experimental se realizó el siguiente cálculo:

$$300 \text{ ng} \times \frac{1 \mu\text{g}}{1000 \text{ ng}} \times \frac{\text{mL}}{865.5 \mu\text{g}} = \mathbf{0.34 \mu\text{L}}$$

Por lo que se agregó 0.34 µL de DNA de nervios olfatorios del grupo experimental a la reacción de PCR (ver **tabla no. 13**).

Tabla No. 12. Reacciones de PCR para 18S en DNA obtenido del grupo control. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras Control	(-)	N. opt	N. olf	B. O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T.C.
Mix (µL)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
DNA (µL)	-	2.26	0.33	1.24	0.38	3.04	1.19	2.07	0.53	1.22
H ₂ O libre de nucleasas (µL)	7.6	5.34	7.27	6.36	7.22	4.56	6.41	5.53	7.07	6.38
Volumen total (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla No. 13. Reacciones de PCR para 18s en DNA obtenido del grupo experimental. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras Experimentales	(-)	N. opt	N. olf	B. O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T. C.
Mix (µL)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
DNA (µL)	-	0.34	0.33	0.62	0.89	0.66	0.67	2.36	0.72	1.02
H ₂ O libre de nucleasas (µL)	7.6	7.26	7.27	6.98	6.71	6.94	6.93	5.24	6.88	6.58
Volumen total (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Secuencias de los primers para 18S empleados:

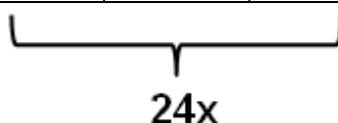
Forward (5'-TCTCGATTCCGTCGGGTGGTGG-3')

Reverse (5'-CTTATGACCCGCACTTACTCG-3')

Las condiciones que se fijaron en el termociclador (Bio-Rad, MJ Mini Personal Thermal Cycler) y a las cuales fueron sometidas las muestras del grupo control y experimental aparecen en la **tabla No. 14**.

Tabla No. 14. Condiciones para la PCR de 18S

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Temperatura	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	1min	30s	30s	30s	7min.	∞



24x

9.20. PCR GFP a partir de DNA

Las muestras de DNA tanto control como experimentales fueron sometidas a una PCR para amplificar el gen de la GFP utilizando el kit (Axygen Biosciences) cuyas indicaciones de uso aparecen en la **tabla No.11**.

Las reacciones de PCR para GFP del grupo control y experimental (**Tabla No. 15 y 16, respectivamente**) se prepararon realizando los ajustes necesarios con respecto a las cantidades de DNA empleadas en la PCR de 18S.

Tabla No. 15. Reacciones de PCR para GFP a partir de DNA del grupo control. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras Control	(-)	(+)	N. opt	N. olf	B.O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T.C.
Mix (µL)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
DNA (µL)	-	2.6*	3.0	0.5	2.0	1.0	3.5	1.2	2.0	0.6	1.2
H₂O libre de nucleasas (µL)	7.6	5.0	4.6	7.1	5.6	6.6	4.1	6.4	5.6	7.0	6.4
Volumen total (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla No. 16. Reacciones de PCR para GFP a partir de DNA del grupo experimental. Nervios ópticos (**N.opt**), nervios olfatorios (**N.olf**), bulbos olfatorios (**B.O.**), corteza frontal (**C.F.**), hipotálamo (**HipT**), hipocampo (**HipC**), amígdala (**A.**), cerebelo (**C.**) y tallo cerebral (**T.C.**).

Muestras Experimentales	(-)	(+)	N. opt	N. olf	B.O.	C.F.	HipT	HipC	A.	C.	T.C.
Mix (µL)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
DNA (µL)	-	2.6 *	0.4	1.3	0.9	1.0	0.66	0.67	2.36	0.72	1.02
H ₂ O libre de nucleasas (µL)	7.6	5.0	7.2	6.3	6.7	6.71	6.94	6.93	5.24	6.88	6.58
Volumen total (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

* El DNA utilizado en la reacción de PCR para el control positivo se tomó de una dilución 1:50 previamente preparada de pIRES-hrGFP-1a con una concentración original de 1056ng/µL.

Secuencias de los primers para GFP empleados:

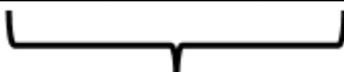
Forward (5'-GTGAGCAAGCAGATCCTGAAG-3')

Reverse (5'-ACTTGGTGAAGGTGCGGTTG-3')

Las condiciones que se fijaron en el termociclador (Bio-Rad, MJ Mini Personal Thermal Cycler) y a las cuales fueron sometidas las muestras del grupo control y experimental aparecen en la **tabla No. 17**.

Tabla No. 17. Condiciones para la PCR de GFP

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	2min	30s	30s	30s	3min.	∞



34x

9.21. Electroforesis en gel de agarosa

Al terminar las reacciones de PCR, cada una de las muestras fueron cargadas en geles de agarosa al 0.8% cuando las reacciones de PCR provenían de RNA y al 1.2% cuando las reacciones provenían de DNA. La cantidad necesaria de agarosa se agregó en TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), se calentó para disolverla, se colocó en el portagel y se dejó solidificar, una vez ocurrido esto, se retiró el peine y se transfirió el gel a la cámara de electroforesis. Los 10 μ L de cada reacción de PCR se mezclaron con 2 μ L de buffer de carga. Con una micropipeta se cargó en el primer pozo el marcador de peso molecular y en los otros pozos se colocaron las muestras con el buffer de carga. Se corrió la electroforesis a 70V/45min.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla No. 18. Cuantificación del pIRES-hrGFP-1a en NanoDrop ND1000.

Solución de plásmido	1ª elución (ng/μL)	2ª elución (ng/μL)
pIRES 1	1071.5	14.8
pIRES 2	1911.5	386.6
pIRES 3	1056.0	17.3

10.1. Observación de cortes histológicos en fresco

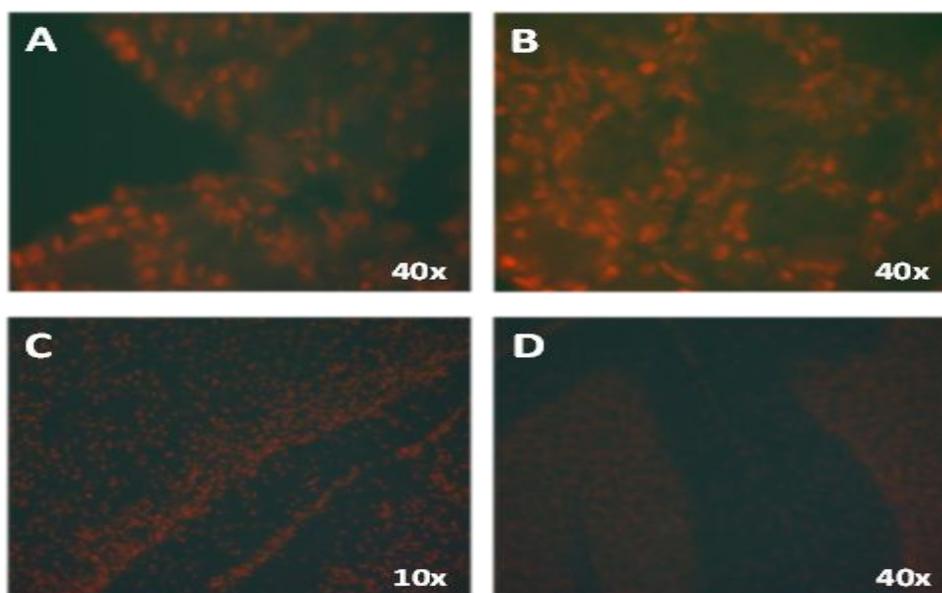


Fig.20. Muestras control con yoduro de propidio como medio de contraste (rojo).
A: Bulbos olfatorios. B: Corteza frontal. C: Cerebelo. D: Tallo cerebral.

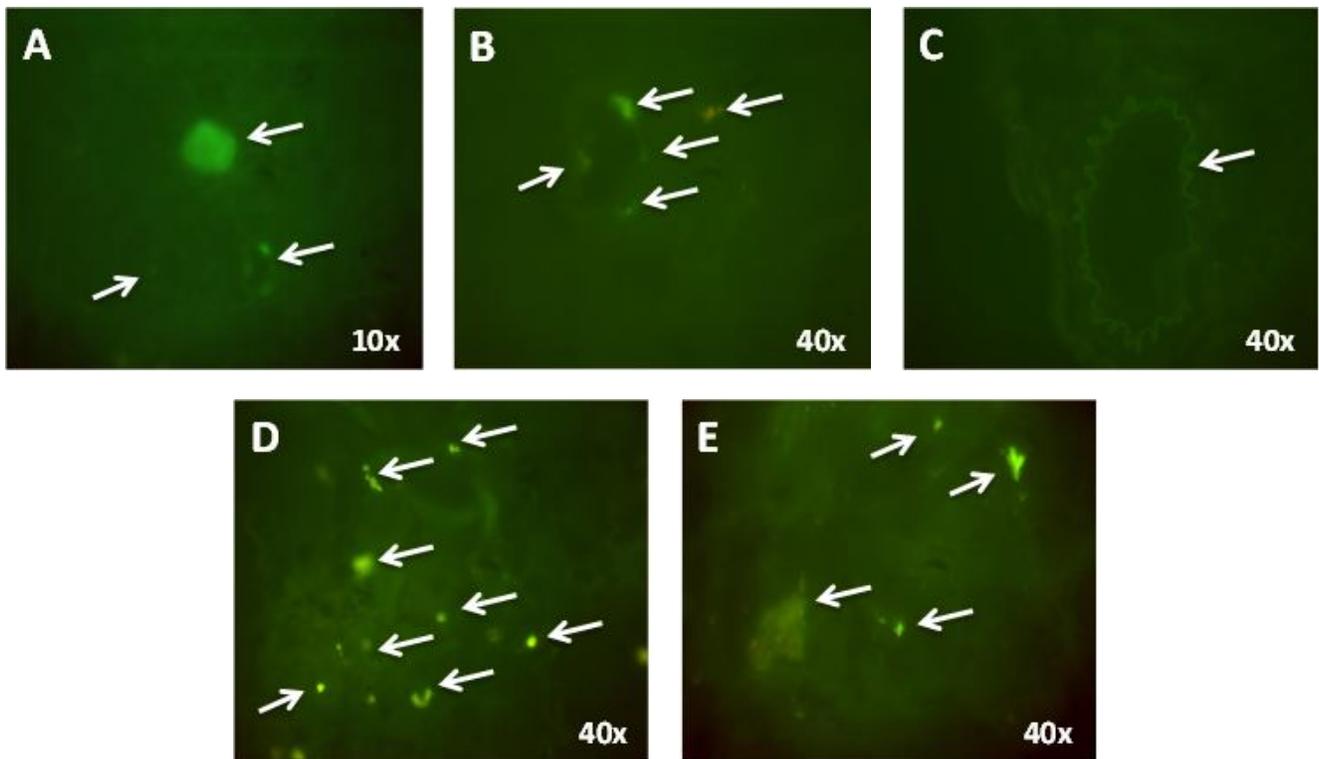


Fig.21. Observación de cortes de tejido en fresco. A: Se observan agregados de GFP rodeando vasos sanguíneos cerebrales, B: El mismo campo que en A pero haciendo énfasis en un vaso sanguíneo a 40x. C: Vaso sanguíneo cerebral fluoresciendo por efecto de la GFP. D y E: Puntos de fluorescencia de GFP en bulbos olfatorios y corteza frontal respectivamente.

En la **figura 21** se observa la presencia de GFP en cortes de tejido cerebral realizados en fresco, 24 horas posteriores a la administración IN, se pueden ver agregados de GFP tanto en bulbos olfatorios como en corteza frontal, así como en capilares cerebrales; Han et al. (2007) determinaron por medio de una RT-qPCR que el plásmido pCMV β administrado intranasalmente, se encontraba en células endoteliales de capilares cerebrales pero no en microglia y por lo tanto dedujeron que este había sido capaz de arribar al cerebro lo suficientemente intacto como para expresarse, además demostraron que los niveles de plásmido en estas células incrementaban de manera proporcional con la dosis administrada por la vía IN.

Estos resultados indican que la vía IN podría ser útil para administrar un plásmido dirigido específicamente hacia las células endoteliales cerebrales. Recientemente, un RNA pequeño de interferencia (siRNA) se administró por vía sistémica para dirigirlo hacia las células endoteliales del cerebro (Hino et al., 2006). Para el suministro *in vivo*, fue necesario administrar grandes dosis de siRNA por vía

intravenosa utilizando la técnica hidrodinámica descrita en el estudio. Teniendo en cuenta el potencial terapéutico del siRNA para las enfermedades cerebrales, podría ser interesante probar si la vía IN puede proporcionar una manera más eficaz para el envío de siRNA dirigido a células endoteliales del cerebro en comparación con la administración sistémica.

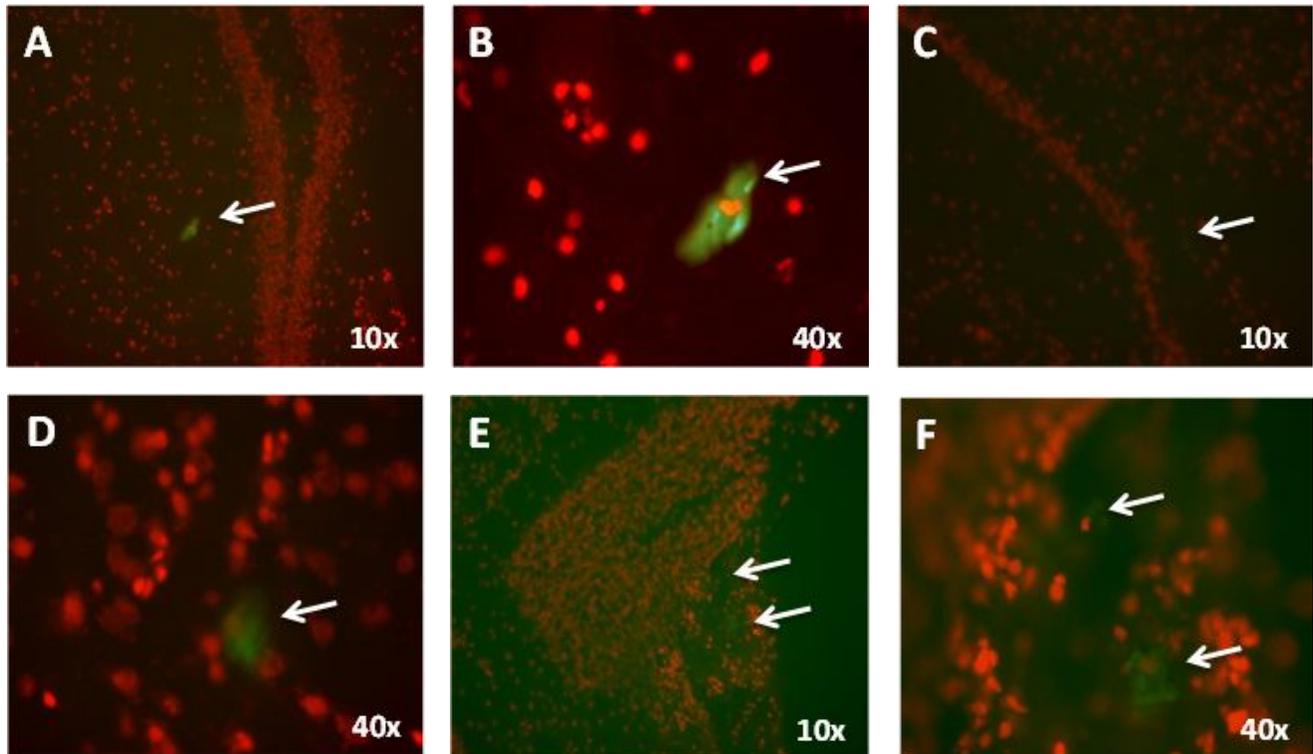


Fig.22. Observación de cortes de tejido en fresco con yoduro de propidio como medio de contraste (rojo). A, B, C y D: Detección de GFP en cerebelo. E: detección de GFP en tallo cerebral. F: el mismo campo que en E pero visto con el objetivo de 40x.

10.2. Tinciones inmunohistoquímicas

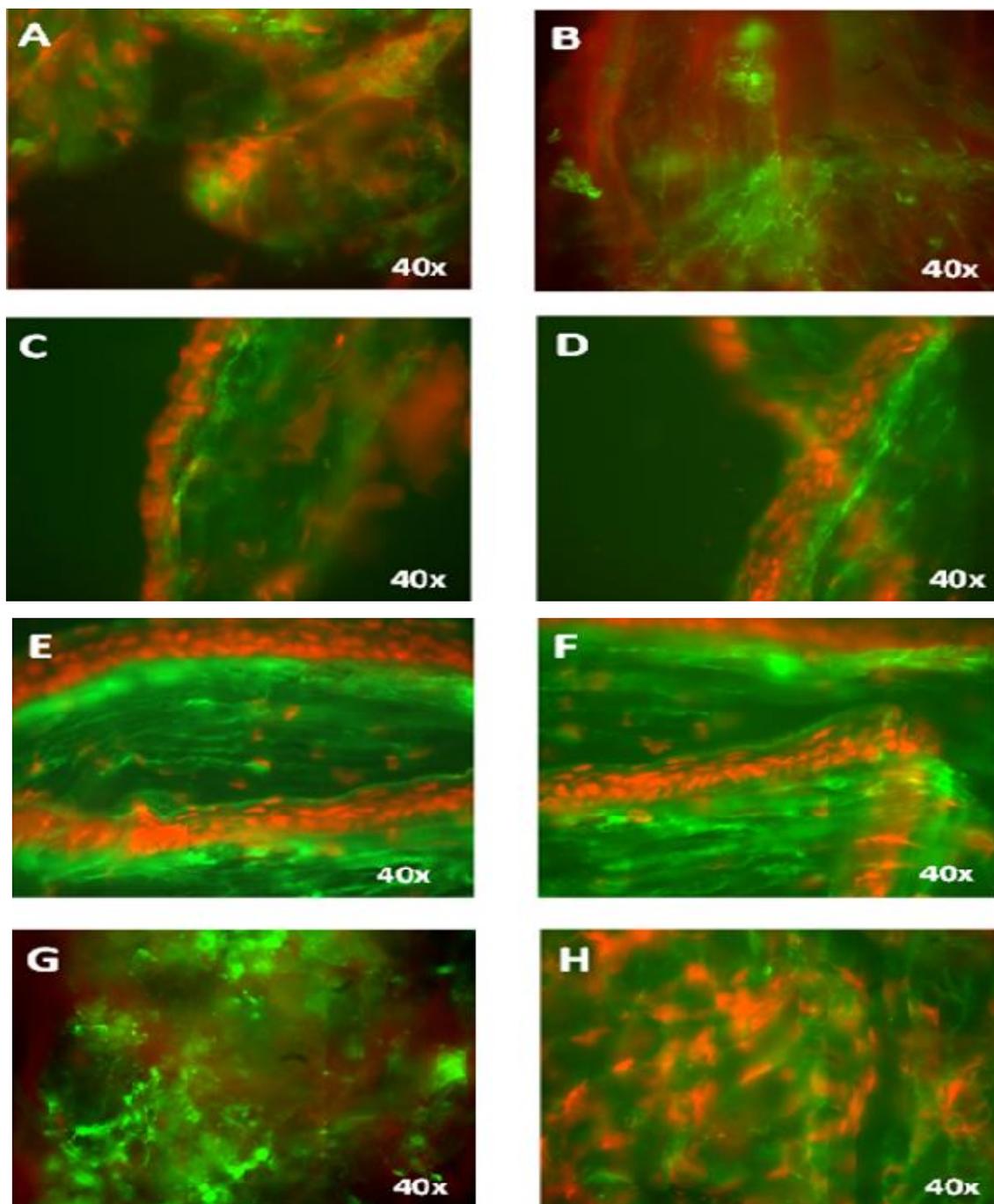


Fig.23. Tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-GFP (anti rabbit IFTC) y yoduro de propidio como medio de contraste. Se observa inmunofluorescencia en A: Bulbos olfatorios. B: Amígdala. C, D, E y F: Cerebelo. G y H: Tallo cerebral.

Así como en la **figura 21** se observó la presencia de GFP en regiones de la parte anterior del cerebro (bulbos olfatorios y corteza frontal), en las imágenes de la **figura 22** se logró detectar la fluorescencia emitida por cúmulos de GFP en regiones de la parte posterior del cerebro (cerebelo y el tallo cerebral), estas observaciones en conjunto con las tinciones inmunohistoquímicas de la **figura 23**, donde se detectó a la GFP con una mayor especificidad y permitió confirmar que la GFP se encuentra en las regiones ya mencionadas de la parte anterior y posterior del cerebro además de la amígdala, posibilitan generar una idea acerca de cómo es que estos vectores génicos se diseminan hacia distintas áreas del cerebro una vez que entran en contacto con este órgano. Se cree que una vez que un plásmido entra en contacto con el epitelio nasal, hay dos posibles maneras a través de las cuales, podría diseminarse hacia el cerebro: la primera, es a través de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO), las cuales entran en contacto con neuronas de segundo orden en el glomérulo del bulbo olfatorio, facilitando así la diseminación del plásmido desde la parte anterior hacia las regiones cerebrales más posteriores; la segunda, es a través del nervio trigémino o quinto par craneal, que al generarse en el puente troncoencefálico podría funcionar en sentido inverso con respecto a su origen transportando al vector génico hacia el tallo cerebral. Es evidente que los bulbos olfatorios y el tallo cerebral juegan un papel muy importante en la distribución de un plásmido en el cerebro; Oh et al., 2001 sugirieron que los bulbos olfatorios son un punto de entrada hacia el cerebro ya que al someter a una qPCR los plásmidos pCMV β (7.2kb) y pN2/pCMV β (14.2kb), detectaron niveles más elevados de ellos en el bulbo olfatorio que en otras regiones analizadas después de su administración intranasal.

10.3. Pesaje de cerebros y cuantificación de RNA en grupos control y experimental

Tabla No. 19. Peso de cerebros y cuantificación de RNA en el grupo control.

Cerebros control	Peso total (mg)	Cuantificación de RNA ($\mu\text{g/mL}$)
3 Nervios olfatorios	38	256
3 Nervios ópticos	170	784
3 Bulbos olfatorios	115	296
3 Cortezas frontales	91	488
3 Hipotálamos	27	459
3 Hipocampos	143	387
3 Amígdalas	35	352
3 Cerebelos	197	1976
3 Tallos cerebrales	152	2088

Tabla No. 20. Peso de cerebros y cuantificación de RNA en el grupo experimental.

Cerebros experimentales	Peso total (mg)	Cuantificación de RNA ($\mu\text{g/mL}$)
6 Nervios olfatorios	68	1480
6 Nervios ópticos	328	2688
6 Bulbos olfatorios	216	560
6 Cortezas frontales	185	2192
6 Hipotálamos	52	648
6 Hipocampos	306	3320
6 Amígdalas	73	1128
6 Cerebelos	378	4736
6 Tallos cerebrales	325	2560

10.4. Pesaje de cerebros y cuantificación de DNA en grupos control y experimental

Tabla No. 21. Peso de cerebros y cuantificación de DNA en el grupo control.

Cerebros control	Peso total (mg)	Cuantificación de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
3 Nervios olfatorios	45	886.5
3 Nervios ópticos	150	192.5
3 Bulbos olfatorios	130	241.8
3 Cortezas frontales	105	772.8
3 Hipotálamos	21	298.62
3 Hipocampos	140	250.5
3 Amígdalas	49	344.4
3 Cerebelos	201	559.4
3 Tallos cerebrales	183	244.2

Tabla No. 22. Peso de cerebros y cuantificación de DNA en el grupo experimental.

Cerebros experimentales	Peso total (mg)	Cuantificación de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
6 Nervios olfatorios	80	865.5
6 Nervios ópticos	398	232.6
6 Bulbos olfatorios	290	483.5
6 Cortezas frontales	234	336.7
6 Hipotálamos	110	454.2
6 Hipocampos	250	444.4
6 Amígdalas	125	326.6
6 Cerebelos	423	414
6 Tallos cerebrales	378	292.7

El peso total obtenido del tejido cerebral de los grupos control y experimental para cuantificar el RNA y de los grupos equivalentes para realizar la cuantificación de DNA fue muy similar; es decir que de manera general los pesos de las regiones cerebrales empleadas en el grupo control y de las cuales se extrajo RNA guardan cierta similitud con el grupo control empleado para extracción de DNA, esta misma situación se puede observar en los grupos experimentales en donde se llevó a cabo la extracción de RNA y DNA. Las regiones cerebrales empleadas para los grupos control y experimentales tanto para extracción de RNA y DNA fueron obtenidas de ratones de la misma especie, cepa y edad por lo que es de esperarse que los cerebros sean similares. A pesar de estas similitudes la cantidad cuantificada de RNA presenta variaciones con respecto a la cantidad de DNA entre grupos equivalentes, en los cuales se empleó la misma cantidad de muestra y los pesos de tejido son relativamente parecidos. De manera general las cantidades de RNA cuantificadas fueron mayores en el grupo control y experimental que las cantidades de DNA encontradas en los grupos control y experimental, lo cual es normal si consideramos que una célula típica contiene 10 veces más RNA que DNA.

10.5. Geles de agarosa al 0.8% de 18s a partir de cDNA

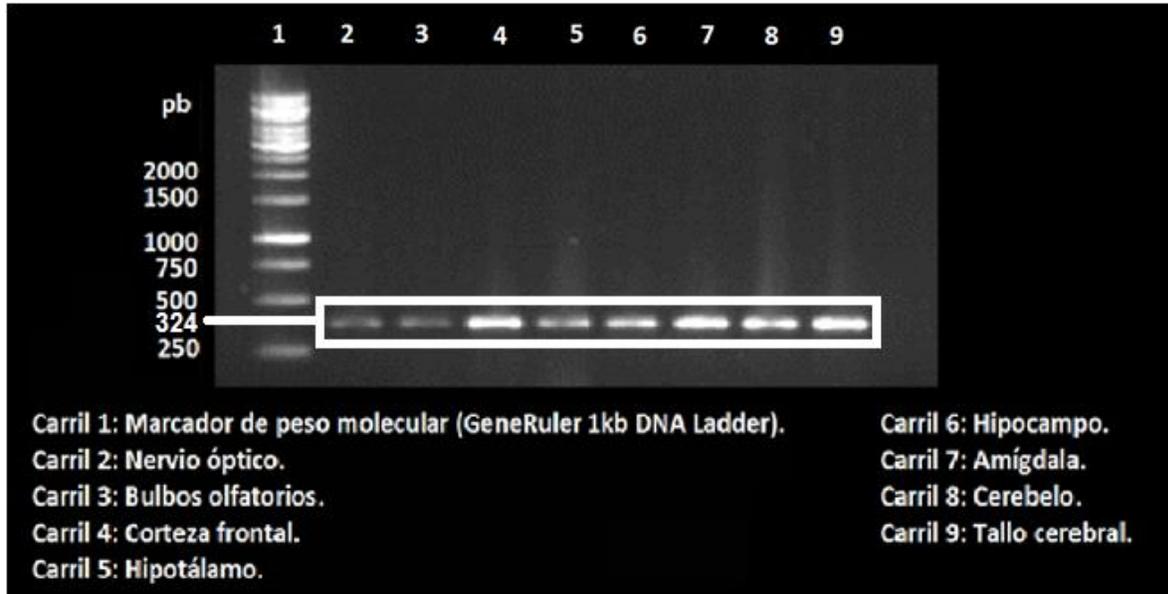


Fig. 24. Análisis de las unidades 18s en cDNA obtenido mediante una RT-PCR de RNA del grupo control.

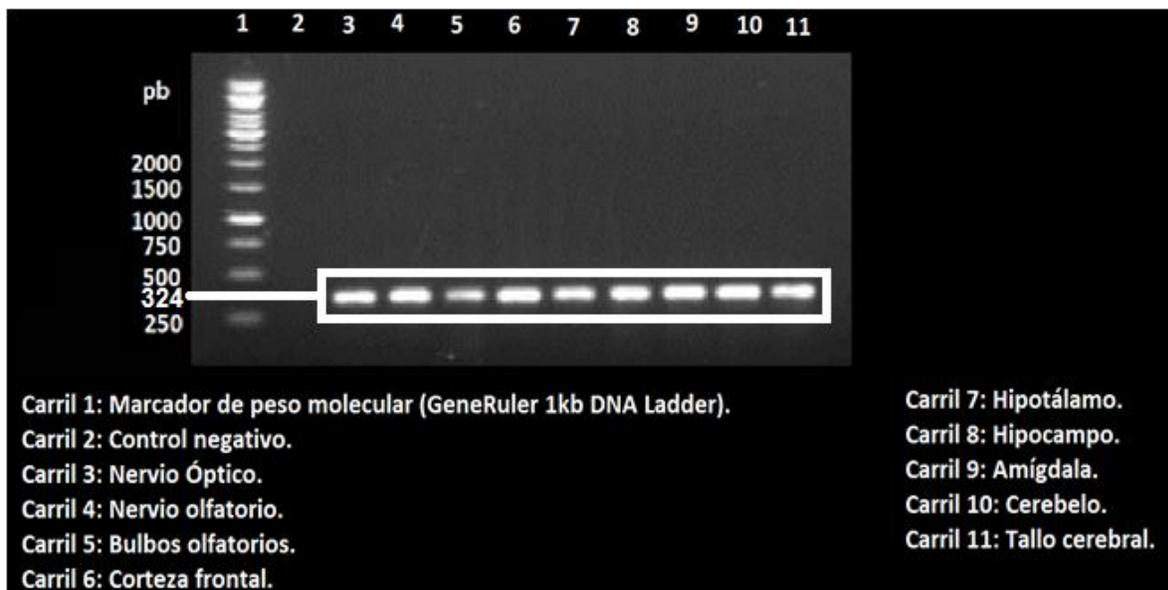


Fig. 25. Análisis de las unidades 18s en cDNA obtenido mediante una RT-PCR de RNA del grupo experimental.

10.6. Geles de agarosa al 1.2% de 18s a partir de DNA

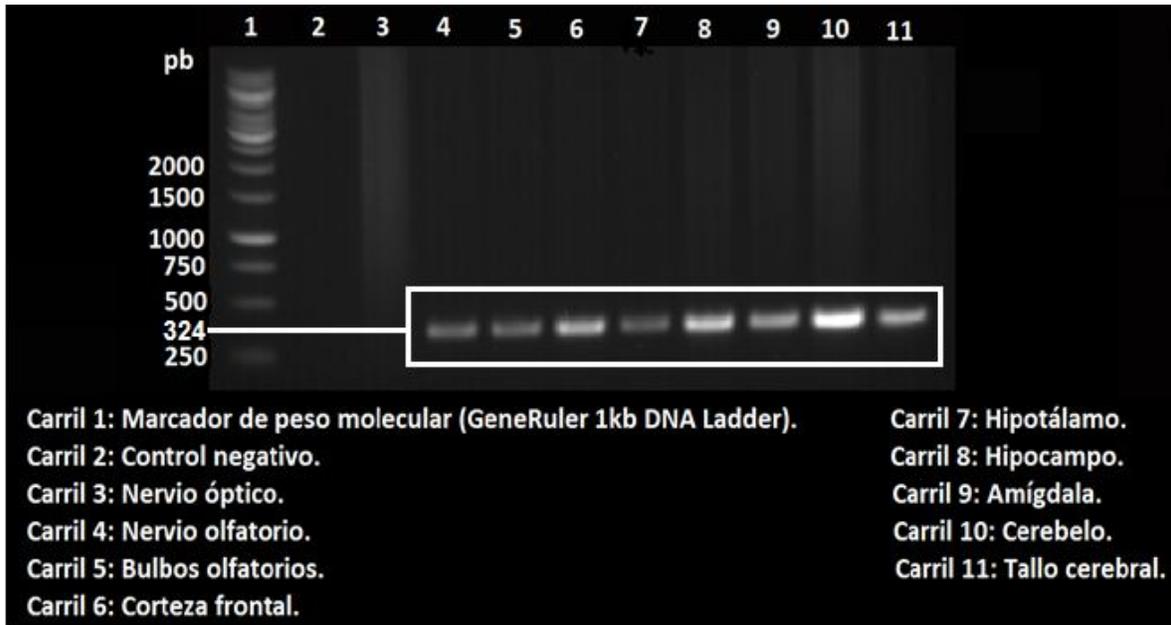


Fig. 26. Análisis de las unidades 18s en DNA obtenido del grupo control.

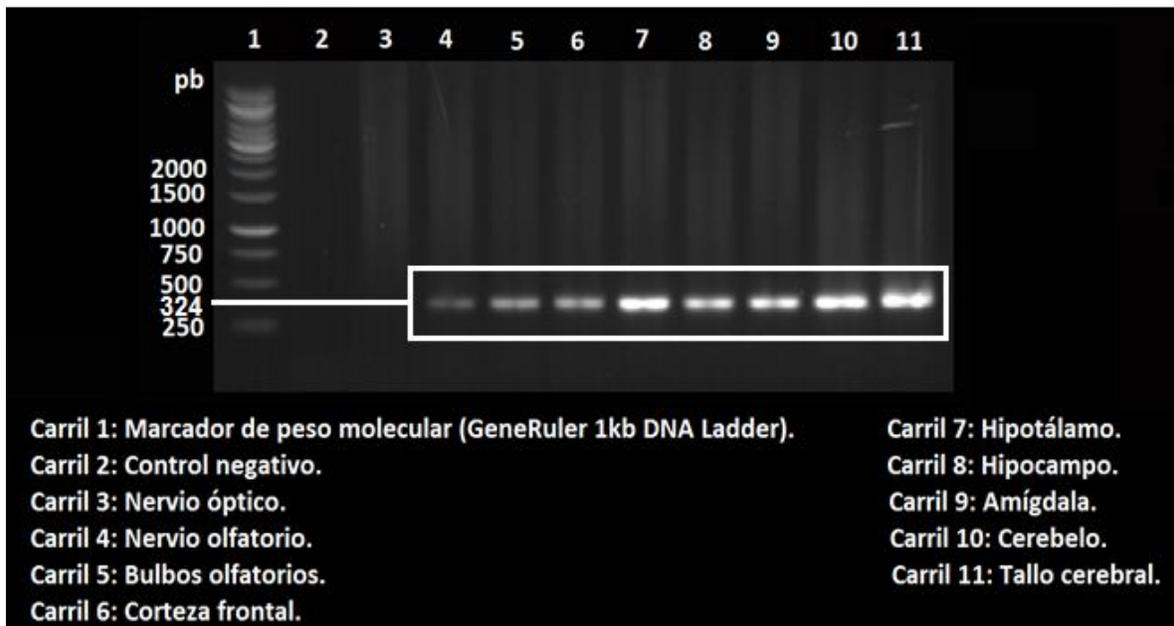


Fig. 27. Análisis de las unidades 18s en DNA obtenido del grupo experimental.

10.7. Geles de agarosa al 0.8% de GFP a partir de cDNA

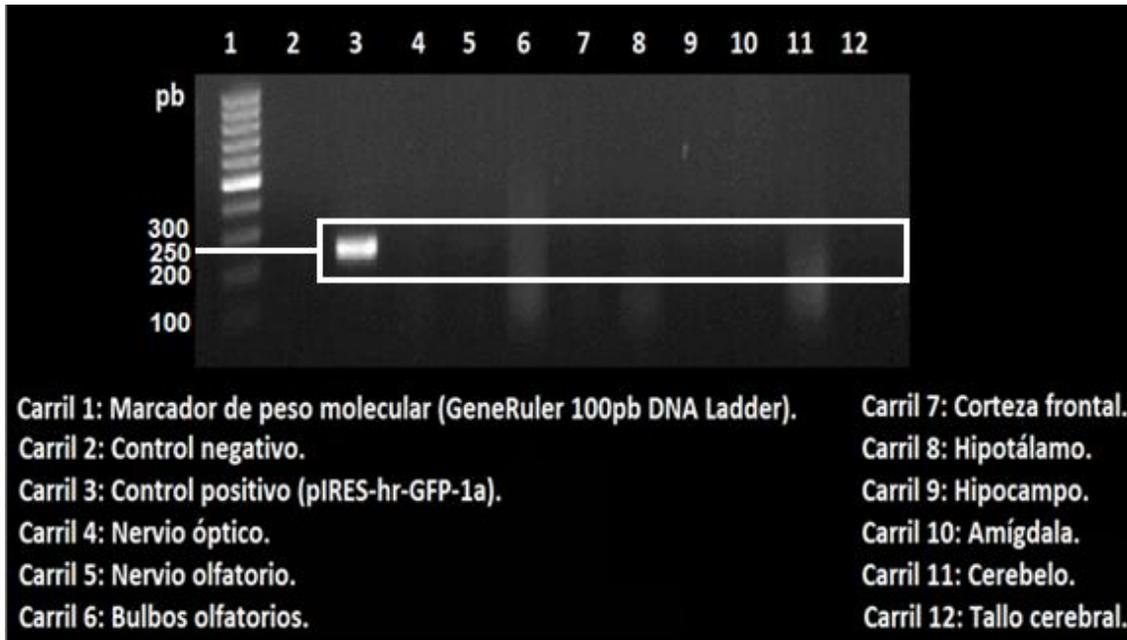


Fig. 28. Análisis de la expresión de la GFP a partir de cDNA obtenido mediante una RT-PCR de RNA del grupo control.

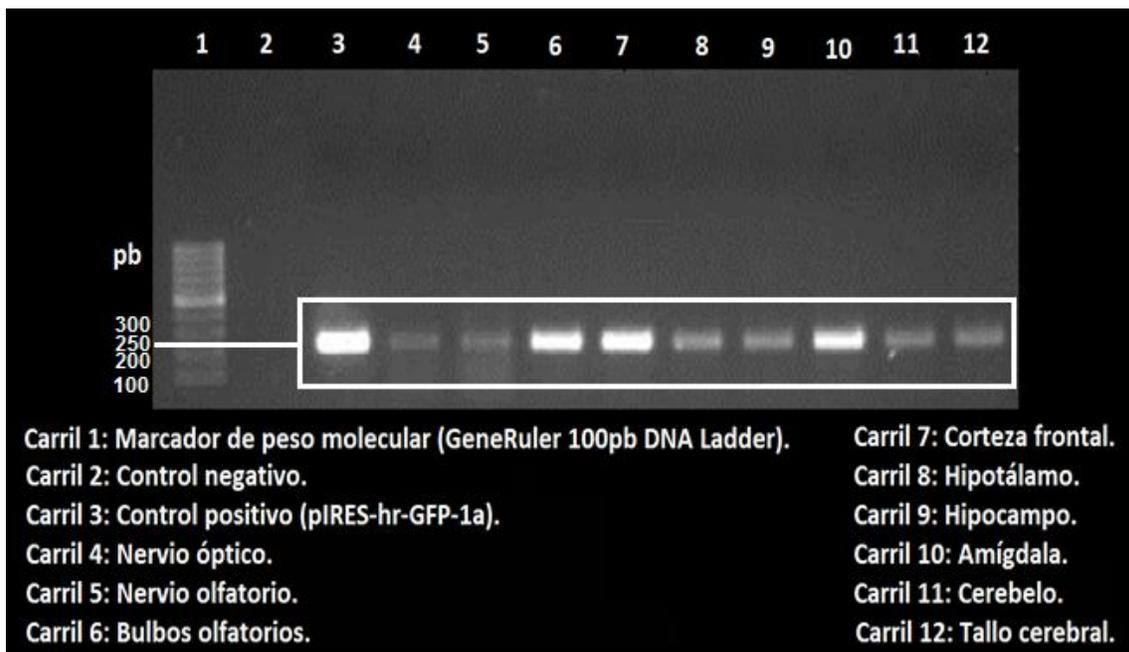


Fig. 29. Análisis de la expresión de la GFP a partir de cDNA obtenido mediante una RT-PCR de RNA del grupo experimental.

10.8. Geles de agarosa al 1.2% de GFP a partir de DNA

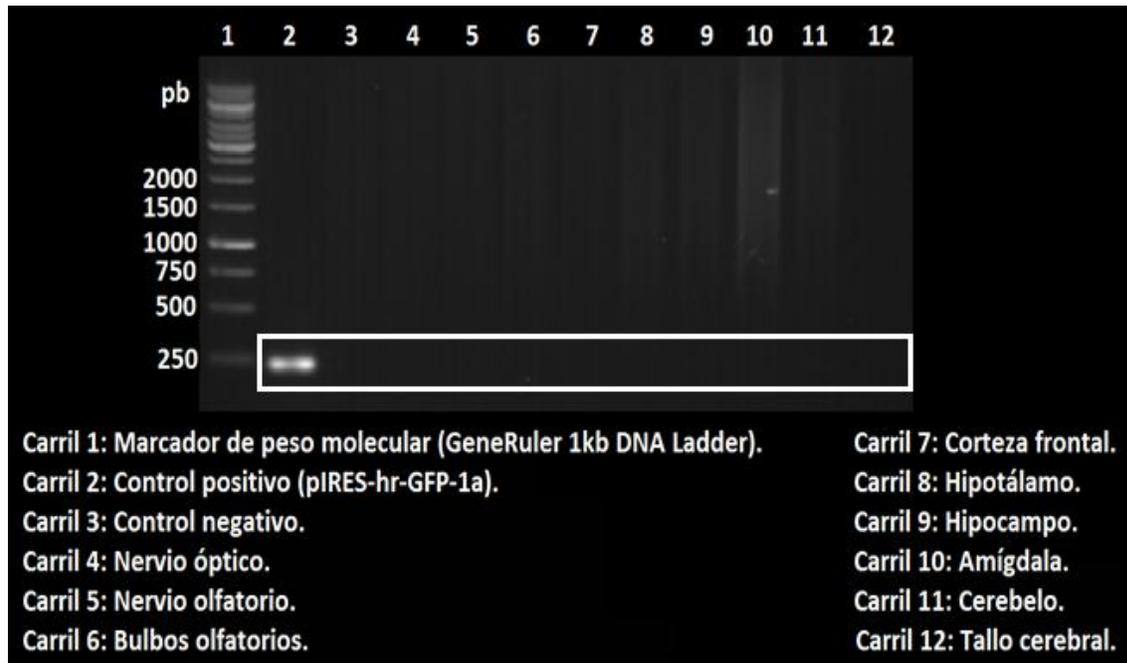


Fig. 30. Determinación de la presencia en cerebro del pIRES-hrGFP-1a a partir de DNA obtenido del grupo control.

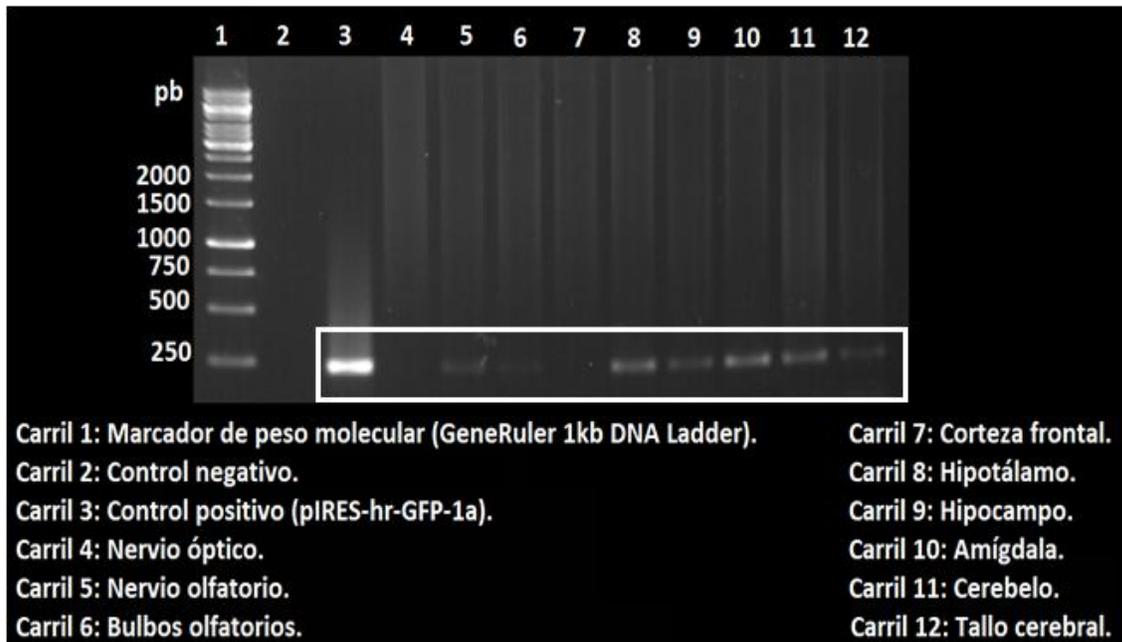


Fig. 31. Determinación de la presencia en cerebro del pIRES-hrGFP-1a a partir de DNA obtenido del grupo experimental.

La selección del patrón interno apropiado es crítica para controlar adecuadamente las variaciones en la cuantificación del material genético. Los genes empleados como estándares internos, en general son esenciales para la viabilidad y, por lo tanto, se expresan constitutivamente en niveles similares en todos los tipos celulares y tejidos para mantener la función celular. Para demostrar que las muestras contenían material genético de una calidad lo suficientemente buena como para permitir identificar la presencia del gen de la GFP en el DNA y su respectiva expresión en el RNA, en este trabajo se decidió emplear el RNA 18S ribosomal como estándar interno. La presencia de este gen fue detectada en las muestras de los grupos control y experimental de RNA (**fig. 22 y 25**), por lo cual se dedujo que la calidad del cDNA en nuestras muestras era capaz de permitir la amplificación de el gen de la GFP, el cual fue detectado en todas las muestras del grupo experimental (**fig. 29**), estos resultados demuestran que se llevó a cabo la transcripción que permitió la síntesis de mRNA y que muy posiblemente este mRNA haya sido traducido permitiendo la expresión de la GFP *in vivo* en ciertas regiones del cerebro de ratón, esto último se confirmó en las tinciones inmunohistoquímicas al observar directamente los agregados de GFP en los cortes histológicos de cerebro. Al no haber administrado el plásmido al grupo control, resulta lógico que en las muestras tanto de cDNA como de DNA pertenecientes al grupo control haya resultado imposible amplificar el gen de la GFP (**fig. 28 y 30** respectivamente). En las muestras de DNA del grupo experimental lo que se busco fue determinar si el plásmido aún se encontraba alojado en las regiones cerebrales de interés después de haber arribado al cerebro, la forma de detectar al plásmido fue por medio de la amplificación del gen de la GFP integrado a la estructura del pIRES-hrGFP-1a. En base a esto y de acuerdo a los resultados obtenidos nos indican que el pIRES-hrGFP-1a es capaz de permanecer en distintas regiones cerebrales, 24 horas después de haber sido administrado por la vía intranasal (**fig. 31**). Por otro lado, encontramos que el plásmido no pudo ser identificado en la corteza frontal ni en el nervio óptico, al parecer el plásmido pudo haber permanecido en estos lugares solo por un tiempo determinado ya que si se pudo revelar la expresión del plásmido en estas zonas, pero en el lapso de tiempo de 24 horas pudo haber

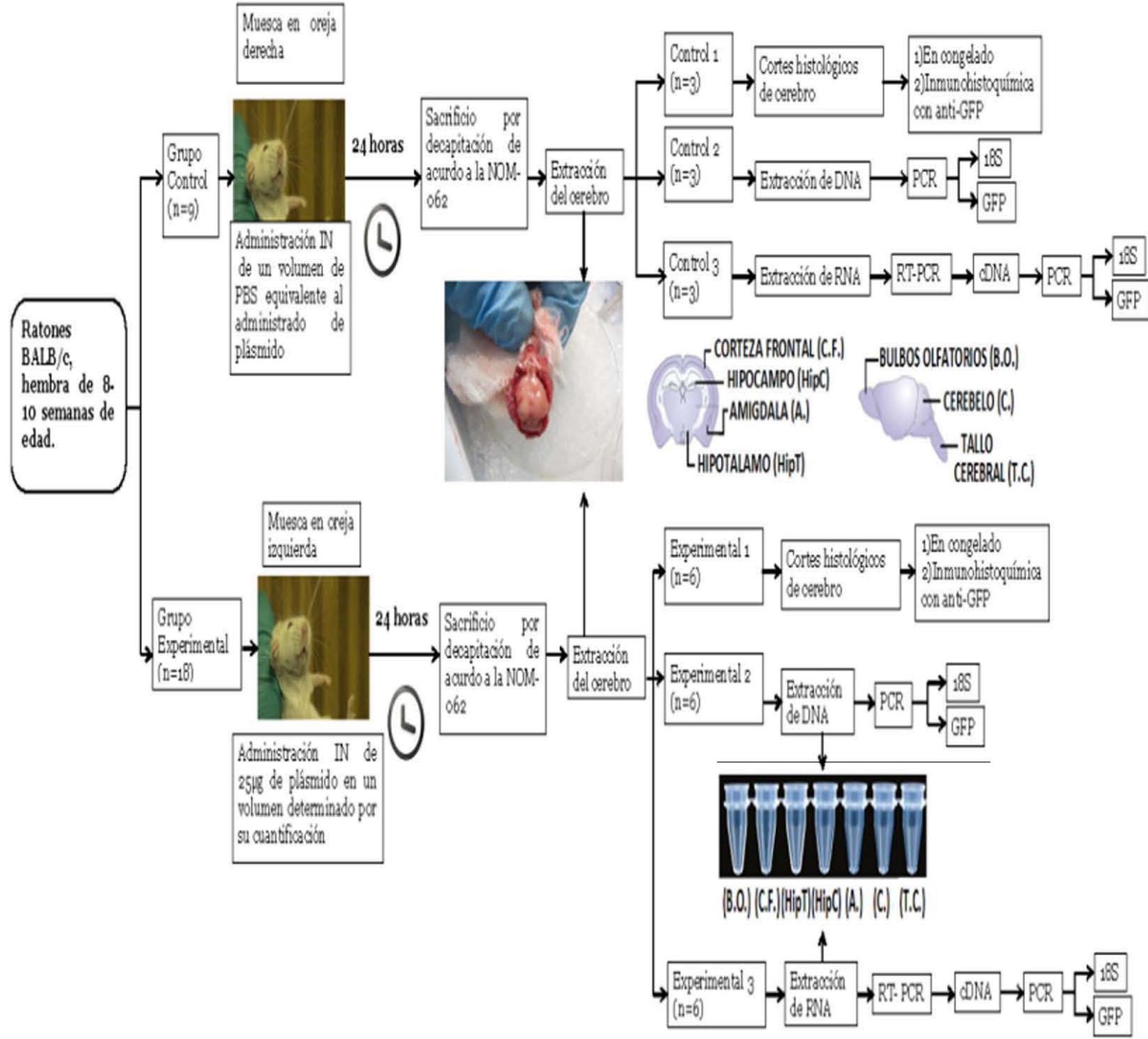
pasado hacia la circulación sanguínea, Han et al. (2007) detectaron el plásmido pCMV β en suero después de haber sido administrado intranasalmente; la idea de que los plásmidos administrados intranasalmente son capaces de llegar a la corriente sanguínea, e incluso a la circulación linfática explicaría porque Tesoro et al. (2011) encontraron elevados títulos de anticuerpos neutralizantes de rabia al igual que citocinas relacionadas con una respuesta inmune de tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α , y IL-2) en el día 30 después de la administración IN del plásmido pGQH a ratones.

11. CONCLUSIONES

- El pIRES-hrGFP-1a es capaz de llegar al cerebro permitiendo la transcripción y expresión *in vivo* de la GFP en nervios olfatorios, nervios ópticos, bulbos olfatorios, corteza cerebral, hipocampo, amígdala, hipotálamo, cerebelo y tallo cerebral, 24 horas después de su administración.
- La vía nasal podría ser útil para el envío del plásmido pIRES-hrGFP-1a hacia las células endoteliales del cerebro.
- Dado el carácter no invasivo de la administración intranasal, esta vía podría considerarse para futuros trabajos sobre terapia génica

12. ANEXO

12.1. Descripción gráfica del procedimiento



13. REFERENCIAS

- ❖ Aerts, J.L., Gonzales, M.I., Topalian, S.L. (2004). Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using realtime RT-PCR. *BioTechniques*, 36 (1), 84–91.
- ❖ Arun, K. H. S., Kaul, C. L., Ramarao P. (2005). Green fluorescent proteins in receptor research: An emerging tool for drug discovery. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51 (1), 1 –23.
- ❖ Baker, H., Spencer, R.F. (1986). Transneuronal transport of conjugated wheat germ agglutinin (WGA–HRP) from the olfactory epithelium to the brain of the adult rat. *Experimental Brain Research*, 63 (3), 461–473.
- ❖ Bettati, S. (2011). Structure and single crystal spectroscopy of Green Fluorescent Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814 (6), 824–833.
- ❖ Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25 (2), 169–193.
- ❖ Butt, A.M., Jones, H.C., Abbott, N.J. (1990). Electrical resistance across the blood–brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of Physiology*, 429 (1), 47–62.
- ❖ Chen, X.Q., Fawcett, J.R., Rahman, Y.E., Ala, T.A., Frey, I.W. (1998). Delivery of nerve growth factor to the brain via the olfactory pathway. *Journal of Alzheimer´s Disease*, 1 (1), 35–44.
- ❖ Crone, C., Olesen, S.P. (1982). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Research*, 241 (1), 49–55.
- ❖ Faber, W.M. (1937). The nasal mucosa and the subarachnoid space. *American Journal of Anatomy*, 62 (2), 121–148.
- ❖ Field, P., Li, Y., Raisman, G. (2003). Ensheatment of the olfactory nerves in the adult rat. *Journal of Neurocytology*, 32 (3), 317–324.
- ❖ Flexner, S. (1912). The mode of infection of epidemic poliomyelitis. *Journal of American Medical Association*, 59 (4), 1371.

- ❖ Francis, G., Martinez, J., Liu, W., Nguyen, T., Ayer, A., Fine, J., Zochodne, D., Hanson, L.R., Frey II, W.H., Toth, C. (2009). Intranasal insulin ameliorates experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, 58 (4), 934–945.
- ❖ Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.-J., Schmitt, D., Berthier-Vergnes, O. (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Analytical Biochemistry*, 295 (3), 17–21.
- ❖ Gopinath, P.G., Gopinath, G., Kumar, T.C.A. (1978). Target site of intranasally sprayed substances and their transport across the nasal mucosa: a new insight into the intranasal route of drug delivery. *Current Therapeutic Research*, 23 (3), 596–607.
- ❖ Han, I.K., Kim, M.Y., Byun, H.M., Hwang, T.S., Kim, J.M., Hwang, K.W., Park, T.G., Jung, W.W., Chun, T., Jeong, G.J., Oh, Y.K. (2007). Enhanced brain targeting efficiency of intranasally administered plasmid DNA: an alternative route for brain gene therapy. *Journal of Molecular Medicine*, 85 (1), 75–83.
- ❖ Harkema, J. R., Carey, S. A., Wagner, J. G. (2006). The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function and toxicology pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic Pathology*, 34 (3), 252-269.
- ❖ Hino T., Yokota T., Ito S., Nishina K., Kang YS., Mori S., Hori S., Kanda T., Terasaki T., Mizusawa H. (2006). In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340 (1), 263–267
- ❖ Illum, L. (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11 (1), 1-18.
- ❖ Kristensson, K., Olsson, Y. (1971). Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta Neuropathology*, 19 (2), 145–154.
- ❖ Nonaka, N., Farr, S.A., Kageyama, H., Shioda, S., Banks, W.A. (2008). Delivery of galanin-like peptide to the brain: targeting with intranasal delivery and cyclodextrins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325 (2), 513–519.

- ❖ Oh, Y.K., Kim, J.P., Hwang, T.S., Ko, J.J., Kim, J.M., Yang, J.S., Kim, C.K. (2001). Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery. *Vaccine*, 19 (31), 4519–4525.
- ❖ Reese, T.S., Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood–brain barrier to exogenous peroxidase. *Journal of Cellular Physiology*, 34 (1), 207–217.
- ❖ Ross, T.M., Martinez, P.M., Renner, J.C., Thorne, R.G., Hanson, L.R., Frey 2nd, W.H. (2004). Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood–brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 151 (1-2), 66–77.
- ❖ Sabin, A.B., Olitsky, P.K. (1937). The olfactory bulbs in experimental poliomyelitis. Their pathologic condition as an indicator of the portal entry of the virus. *Journal of American Medical Association*, 108 (21), 21–24.
- ❖ Schmid, H., Cohen, C.D., Henger, A., Irrgang, S., Schlondor, D., Kretzler, M. (2003). Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney International*, 64 (5), 356–360.
- ❖ Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT–PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 46 (1-2), 69–81.
- ❖ Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59 (3), 223–227.
- ❖ Tesoro, C., Feria R., Chávez, R., Orozco, S. Blanco, F., Calzada, B., Chávez, S., Manuel, A., Hernández, G., Aguilar, S. (2011). Intranasal anti-rabies DNA immunization promotes a Th1-related cytokine stimulation associated with plasmid survival time. *Archives of medical research*, 42 (7), 563-571.
- ❖ Tesoro, C., Feria R., López, M., Orozco, S., Hernández, G., Blanco, F., Pérez, T., Aguilar, S. (2008). Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine*, 26 (52), 6936–6944.

- ❖ Thorne, R. G., Lochhead, J. J. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (7), 614-628.
- ❖ Ward, W.W., Cody, C. W., Hart, R. C., Cormier, M. J. (1980). Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in renilla and aequorea green-fluorescent proteins. *Photochemistry and Photobiology*, 31 (6), 611–615.