



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OBTENCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA LA
INHIBICIÓN DE ADN METILTRANSFERASA 3a
(DNMT3a) MEDIANTE UN SISTEMA CRISPR/dCas9
EN UN CULTIVO CELULAR DE GLÍA DE MÜLLER

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA
EN QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A
REBECA YAEL VICTORIA CHÁVEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MÓNICA LAMAS GREGORI

ASESORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres, Bárbara y José. Por su apoyo en este largo trayecto de mi formación profesional, por su comprensión y su amor.

A Karen, por permanecer a mi lado, por su amistad y cariño.

A mis amigos, por brindarme momentos de grandes risas y reflexión.

AGRADECIMIENTOS

Quiero ofrecer un especial agradecimiento a la Dra. Mónica Lamas, por aceptarme en su laboratorio y ofrecerme los recursos, tanto económicos como intelectuales para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Martha Legorreta Herrera por su guía durante la elaboración del presente escrito.

Al Dr. Bladimir Roque y al Lic. Ignacio Escalante por las asesorías y metodologías de trabajo para llevar a cabo los protocolos experimentales.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, así como a los investigadores que en éste laboran y me brindaron apoyo.

A mis sinodales: Dra. Mónica Lamas Gregori, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dra. Ma. Isabel Soto Cruz, Dra. Adriana Gutiérrez Hoya y al M.C. Jesús Aguilar Castro, por sus aportaciones y correcciones durante la revisión de este trabajo.

A los profesores que participaron en mi formación académica y a todas aquellas personas, que directa o indirectamente, me apoyaron para el término de este trabajo.

ÍNDICE

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. RETINA Y VISIÓN	8
2.2. REGULACIÓN EPIGÉNÉTICA.....	10
2.2.1. Metilación del ADN	10
2.2.2. ADN metiltransferasas.....	11
2.3. SISTEMA CRISPR/Cas.....	13
2.3.1. Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas	15
2.3.2. Usos de los sistemas CRISPR-Cas	16
2.3.3. CRISPR/dCas9 como herramienta para la regulación de la expresión génica. 17	
2.4. PLÁSMIDOS	19
2.4.1. Plásmido pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB.....	20
2.4.2. Plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression.....	21
2.5. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general.....	25
5.2. Objetivos particulares	25
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26

6.1. Tipo de estudio.....	26
6.2. Población.....	26
6.3. Variables.....	26
6.4. Análisis estadístico	26
6.5. Material	26
6.5.1. Material biológico	26
6.5.2. Reactivos.....	27
6.5.3. Materiales.....	28
6.5.4. Equipos.....	29
6.6. Métodos.....	29
6.6.1. Diseño del vector de clonación, sgRNA y primers.....	29
6.6.2. Transformación de bacterias competentes	31
6.6.3. Obtención de ADN plasmídico por lisis alcalina.....	31
6.6.4. PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	32
6.6.5. Análisis densitométrico.....	34
6.6.6. Cultivo celular de glía de Müller	34
6.6.7. Cotransfección del vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB y sgDNMT3a-1.....	34
6.6.8. Extracción de ARN con trizol y RT-PCR.....	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1. Obtención de colonias de <i>Escherichia coli</i> JM109 transformadas	36
7.2. Comprobación de la inserción del plásmido en colonias de la cepa bacteriana <i>E. coli</i> JM109.....	37
7.3. Evaluación del sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición de DNMT3a.....	39
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	42

9. CONCLUSIONES	47
10. PERSPECTIVAS	47
11. REFERENCIAS.....	47

1. INTRODUCCIÓN

Las herramientas que facilitan el estudio y modificación del genoma aumentaron desde que se determinó que el ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información genética de la célula, en 1944 por Avery, McLeod y McCarty, y la posterior elucidación de su estructura en doble hélice por Watson y Crick en 1953 (1).

En las bacterias se descubrieron los sistemas CRISPR-Cas, un tipo de mecanismo de defensa procarionte hacia elementos génicos invasores como plásmidos y bacteriófagos. Los sistemas CRISPR-Cas se estudiaron y clasificaron en tres tipos, los de tipo II (CRISPR-Cas9) son los más empleados debido a su simplicidad y a su función como regulador de la expresión génica por modificaciones a la proteína Cas asociada. Esto es de importancia ya que, con los arreglos CRISPR específicos para un gen; se puede activar o inhibir su transcripción en función de los dominios acoplados al sistema (VP16 o KRAB) y a las mutaciones en los sitios catalíticos que generan una proteína Cas deficiente (dCas9).

Por la característica gen-específico que presenta el arreglo CRISPR, es posible la inhibición o activación selectiva del gen codificante para un solo tipo enzimático perteneciente a un grupo de enzimas con dominios catalíticos conservados como las ADN metiltransferasas (DNMTs).

En este trabajo se presentan las bases para el diseño y obtención de un plásmido con el sistema CRISPR/dCas9 específico para la inhibición del gen codificante de la enzima DNMT3a, así como los resultados obtenidos de la evaluación por PCR punto final de la especificidad del sistema mediante la cotransfección del vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB y el arreglo CRISPR (sgDNMT3a) a un cultivo celular de glía de Müller, el tipo celular más abundante en retina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Retina y visión

El ojo es un órgano primario sensorial de la visión, se encarga de captar la luz y de su posterior decodificación a señales eléctricas enviadas a través del nervio óptico hacia el cerebro para su procesamiento a imágenes. Este órgano está formado por diversas estructuras que le permiten llevar a cabo su función, como lo son: la retina, la córnea, el cristalino, el iris y la esclerótica (figura 1) (2).

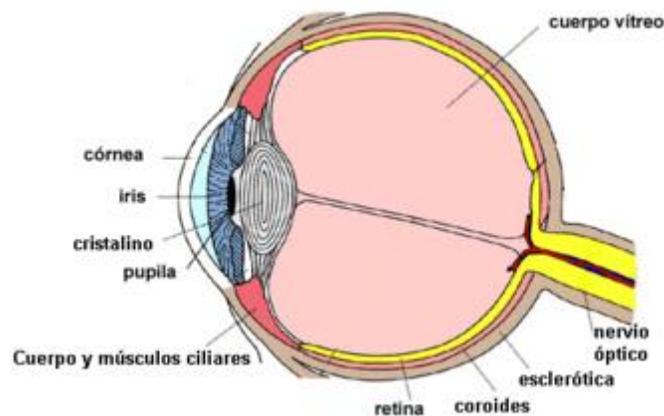


Figura 1. Esquema de las estructuras que conforman el ojo de mamíferos y que están involucradas en la captación y el procesamiento de la luz a señales eléctricas que permiten la visión. Modificada de Tortora, 2006 (3).

En la retina se encuentran las células encargadas de la transformación de la luz recibida por el ojo dispuestas en tres capas nucleares bien definidas (figura 2). En la capa nuclear externa se encuentran los fotorreceptores: los bastones, que permiten ver luces tenues y diferentes tonos de grises y los conos, que permiten distinguir colores cuando se estimulan por luz brillante. La capa nuclear interna se conforma por células bipolares, amacrinas y horizontales mientras que las células ganglionares conforman la capa nuclear ganglionar. A lo largo de todas las capas de la retina se encuentra la glía de Müller, que principalmente da soporte e interconecta a las demás neuronas. Las conexiones sinápticas entre estos siete

tipos celulares conforman las capas plexiformes interna y externa. Circundando la capa de fotorreceptores se encuentra el epitelio pigmentado retiniano que, entre otras funciones, provee soporte estructural y metabólico a las neuronas adyacentes (2–4).

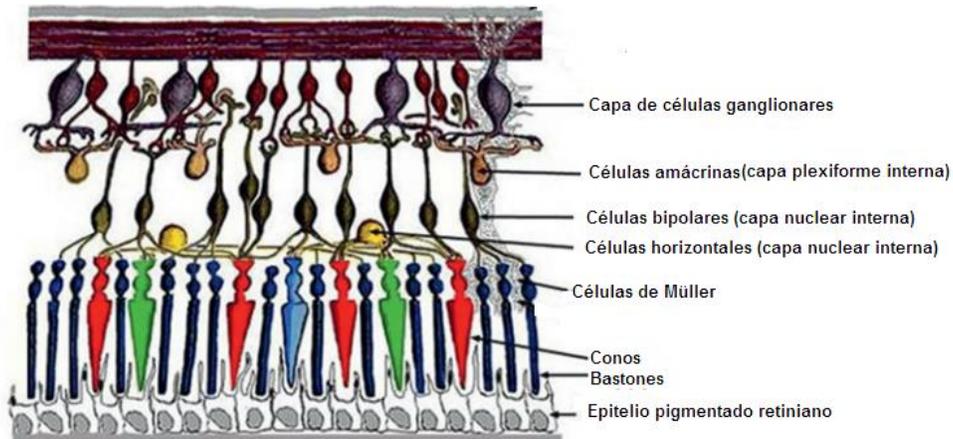


Figura 2. Esquema representativo de las células que conforman la retina transforman señales lumínicas en señales eléctricas que se envían al cerebro a través del nervio óptico para su procesamiento. Modificada de Prasad, 2011 (4).

Las células que conforman la retina se generan a partir de un progenitor común proveniente del tubo neural, que se encuentra presente durante todo el desarrollo embrionario, esta célula troncal es capaz de diferenciarse en cualquiera de los siete tipos celulares retinianos. En mamíferos adultos, la retina tiene una nula capacidad de regeneración funcional, por lo que, si se presenta un daño en este tejido no hay neurogénesis activa y esto conduce a la pérdida de la visión (2,5,6).

En vertebrados como el pez cebra y el pollo se observa que, después de un daño en retina, existen cambios en las células de Müller a nivel génico que inducen su desdiferenciación, es decir, la pérdida de morfología, funciones y marcadores propios de la estirpe celular (6) para dar paso a un proceso de proliferación seguido de una transdiferenciación, donde las células de Müller que pierden sus características distintivas son capaces de diferenciarse en otros tipos celulares

pertenecientes al mismo tejido; generalmente los cambios en la regulación epigenética favorecen esta transformación (7).

2.2. Regulación epigenética

En la formación de un nuevo organismo, el material genético de las células gaméticas de los progenitores sufre una serie de cambios en la organización y estructura de la cromatina para su transformación en células totipotentes (8) lo que modifica la expresión de genes y la estabilidad del genoma (9).

Las modificaciones covalentes como la acetilación o fosforilación en el extremo N-terminal de las histonas, la metilación del ADN (10) y la expresión de micro-ARNs (miRNAs) (11) son mecanismos por los cuales se regula la expresión de genes sin alterar la secuencia génica (12) y que generan marcas epigenéticas, las cuales forman parte de la memoria celular que es transferida de una célula a sus descendientes (13).

Las marcas epigenéticas permiten que, en los organismos pluricelulares, se desarrollen múltiples células y tejidos a partir de células progenitoras (14). Esta sección se enfocará en la metilación del ADN por su importancia en el proceso de desdiferenciación de la glía de Müller.

2.2.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso mediante el cual se adiciona un grupo metilo (-CH₃) al carbono 5 de la citosina (generalmente) para formar la 5-metilcitosina (5mC) (15); se metilarán casi exclusivamente las islas CpG, las cuales son zonas de la secuencia con una alta cantidad de citosinas y guaninas adyacentes unidas por un grupo fosfato (16).

En los humanos, al menos el 60% de los sitios promotores poseen una alta cantidad de islas CpG (17), por lo que, al metilarse las citosinas se promueve la agrupación

de diversas proteínas que impiden la unión de los factores de transcripción y de la enzima RNA polimerasa tipo II a estos sitios del ADN (16), con la finalidad de silenciar genes para generar una marca epigenética involucrada en la regulación y estabilización del genoma (10).

La adición del grupo metilo a la citosina no se lleva a cabo de manera espontánea, requiere de la intervención de una enzima para catalizarla (18).

2.2.2. ADN metiltransferasas

Las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs), como su nombre lo indica, adicionan grupos metilo al ADN (19). Su mecanismo de reacción se caracteriza por la formación de un complejo ternario con la base de ADN sobre la cual se adicionará el grupo metilo, el donador de grupo (generalmente S-adenosil-L-metionina o AdoMet) y un cofactor, en la transferencia del grupo se forma un enlace covalente intermediario entre la enzima y la base diana (16).

El genoma humano posee la información necesaria para codificar cinco DNMTs con actividades diferentes: DNMT1 se encarga del mantenimiento de la metilación después de la replicación del ADN, DNMT2 es un regulador post-transcripcional sin actividad catalítica, DNMT3a y DNMT3b establecen la metilación *de novo* y DNMT3L interviene como coenzima de la DNMT3a (17,19).

Los dominios catalíticos de las DNMTs se conforman por diez motivos de los cuales cinco están altamente conservados: I, IV, VI, IX y X (16), se expresan como una firma característica en la mayoría de los vertebrados, plantas e incluso bacterias (figura 3) (20).



Figura 3. Esquema representativo de DNMT1, DNMT3a y DNMT3b, donde se observan los dominios que conforman la región reguladora y los motivos pertenecientes al dominio catalítico altamente conservados (I, IV, VI, IX, X). *PBD* PCNA dominio de unión; *NLS* señal de localización nuclear; *RFTS* secuencia de focalización de sitios de replicación; *CXXC* dedo de zinc dominio rico en cisteína; *BAH* dominio homólogo bromo-adyacente; *PWWP* dominio prolina-triptófano-triptófano-prolina; *ADD* dominio ATRX-Dnmt3-Dnmt3L. Modificado de Jeltsch, 2016 (16).

Estos motivos se clasifican de acuerdo con su función: los motivos I a III facilitan la unión de la enzima con el cofactor; el motivo IV contiene un dipéptido de prolina-cisteína que forma el tiolato necesario para iniciar la transferencia del grupo metilo; los motivos VI, VIII y X conforman el bolsillo de unión al sustrato (citosina) y los motivos V y VII generan un pliegue en el dominio de reconocimiento de sustrato (21).

De acuerdo con la figura 3, la región reguladora de la enzima DNMT1 se compone de los dominios PBD (dominio de unión al antígeno nuclear de proliferación celular), NLS (señalamiento de localización nuclear), RFTS (secuencia de focalización de sitios de replicación), CXXC (dedo de zinc) y BAH (homólogo bromo-adyacente) (16), lo que le permite a la enzima el reconocimiento y unión a islas CpG hemimetiladas por interacción con la proteína UHRF1 (tipo ubiquitina) (22).

Por otra parte, las enzimas DNMT3a y DNMT3b en su región reguladora poseen los dominios PWWP (prolina-triptófano-triptófano-prolina) y ADD (ATRX-Dnmt3-Dnmt3L) (16), los cuales están relacionados con la unión a cromatina y el reconocimiento de sitios propensos a metilación en células troncales embrionarias (17).

La regulación de la expresión génica de las ADN metiltransferasas es crítica para el entendimiento de la coordinación de la metilación con otros procesos bioquímicos (23,24).

En retina, la metilación del ADN se correlaciona con la expresión génica característica de los siete tipos neuronales. La inhibición farmacológica de las tres DNMTs catalíticas con SGI-1027, un derivado de quinolina (25), en ratones favorece el proceso de desdiferenciación de la glía de Müller (26) y aumenta la expresión de genes de pluripotencia como Oct4 y Lin28 (27), sin embargo, la retina pierde completamente su estructura (28), por lo que recientemente se estudian nuevas técnicas como son los sistemas CRISPR/Cas para la inhibición selectiva de sólo uno de los isotipos de DNMT.

2.3. Sistema CRISPR/Cas

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas también conocidas como CRISPR (por sus siglas en inglés), en conjunto con proteínas asociadas a CRISPR (proteínas Cas) son una especie de respuesta inmune adaptativa encontrada en algunos procariontes y arqueas (29,30), que logra la eliminación de elementos genéticos invasores como son los bacteriófagos y plásmidos (31), y le otorga protección a los microorganismos.

El loci CRISPR está conformado por secuencias espaciadoras no repetitivas de 21 a 76 pares de bases (pb) obtenidas de ADN extracromosomal (plásmidos), secuencias repetidas de 24 a 37 pb y operones de genes cas (figura 4) (31,32).



Figura 4. Loci de arreglo CRISPR en *Escherichia coli* K12. Se observan los operones cas (asociados a CRISPR); los sitios promotores de los genes cas y del arreglo CRISPR se indican con flechas rojas; L: Secuencia iniciadora líder de CRISPR; R: Repeats (secuencia de los espaciadores repetitivos); S: Spacers (secuencia de los espaciadores no repetitivos). Modificada de Golubov, 2016 (29).

El número de arreglos CRISPR varía de acuerdo al microorganismo; en arquea se pueden encontrar cinco arreglos, mientras que en bacterias se observan de tres hasta cientos de arreglos (29).

La función antiviral del arreglo CRISPR en bacterias se logra a través de tres etapas (figura 5):

1. Adaptación. Fragmentos de ADN génico invasor (fagos o plásmidos) son introducidos al genoma bacteriano como nuevos espaciadores no repetitivos en el loci CRISPR seguido de la síntesis de una nueva secuencia espaciadora repetitiva (33).
2. Expresión o biogénesis de ARN asociado a CRISPR o ARN guía (crRNA). Se transcribe el loci CRISPR y se genera el crRNA de un solo arreglo espaciador-repetición (34).
3. Interferencia. Hibridación del crRNA con su secuencia complementaria en el genoma viral, lo cual dirige a las proteínas Cas con dominios de endonucleasa hacia la secuencia objetivo para su destrucción (35).

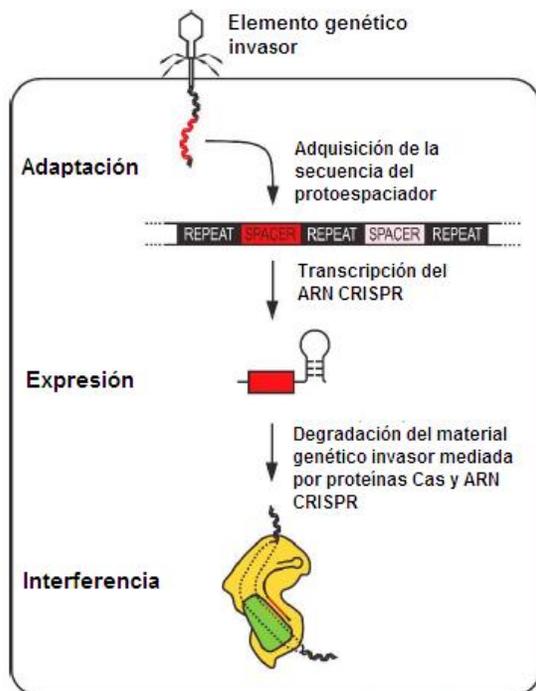


Figura 5. Esquema general de la adquisición de inmunidad viral de las bacterias por medio del sistema CRISPR-Cas. Se observan las tres etapas de inmunización: adaptación, expresión o biogénesis del crRNA e interferencia o degradación. Modificada de Rath, 2015 (34).

2.3.1. Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas se clasifican en tres tipos en función de las proteínas Cas involucradas en las etapas de adquisición de inmunidad viral (figura 6) (36). Los sistemas de tipo I se caracterizan por la acción de la proteína Cas3, que tiene dominios de helicasa y ADNasa (30). El loci de este sistema consiste en un set de ocho genes Cas: Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6e, Cas1 y Cas2, dispuestos cuesta arriba del arreglo CRISPR, todos los genes Cas se encuentran bajo el control de un mismo promotor a excepción de la Cas3 que posee un promotor independiente (29). Las proteínas Cas1 y Cas2 están estrechamente relacionadas con la adaptación de la secuencia viral al arreglo CRISPR; la proteína Cas6e es la encargada de realizar la maduración del ARN asociado a CRISPR (crRNA), mientras que las proteínas Cse1, Cse2, Cas7 y Cas5 forman un complejo con el crRNA maduro (complejo Cascade) que induce la formación de un giro o loop en el ADN blanco para que el crRNA pueda unirse (37), lo que provoca un cambio conformacional en el complejo Cascade que sirve como señal para que la Cas3 se reclute y lleve a cabo su función (36).

Los sistemas de tipo II se clasifican por la acción de la proteína Cas9 (36). Esta proteína posee dos dominios que le confieren la actividad de nucleasa, uno en la porción amino terminal (RuvC-like nucleasa) y un dominio HNH (McrA-like) en la sección media (38), el operon cas que compone este tipo de sistema es el más sencillo, consta de cuatro genes: Cas9, Cas1, Cas2 y, según el subtipo (A o B), Csn2 o Cas4 (36). Cas9 participa en la adaptación del protoespaciador viral, en el procesamiento o maduración del crRNA, interacciona con el complejo formado por el crRNA y un ARN adicional llamado tracrRNA y escinde el genoma viral. Las proteínas Cas1 y Cas2 están inmersas en la etapa de adaptación. Csn2 se encuentra en sistemas tipo II-A, su acción aún no se describe por completo, pero se sabe que participa en la etapa de adaptación y en la unión del complejo crRNA-tracrRNA al ADN viral. Cas4, presente en el sistema tipo II-B, interviene en la fase de adaptación y tiene un rol no específico en el proceso de unión al ADN (34).

El sistema de tipo III se caracteriza por la expresión de Cas10 además de genes codificantes para RAMPs (proteínas misteriosas asociadas a repeticiones) (39), una superfamilia de proteínas Cas de reconocimiento de ARN (csm3, csm4 y csm5 en el subtipo A o cmr3, cmr4 y cmr6 en el subtipo B) (36), en el loci se encuentran también los genes Cas1 y Cas2 que codifican para proteínas que intervienen en el proceso de adaptación (30). Cas10 en conjunto con las RAMPs llevan a cabo la degradación del ADN viral (37).

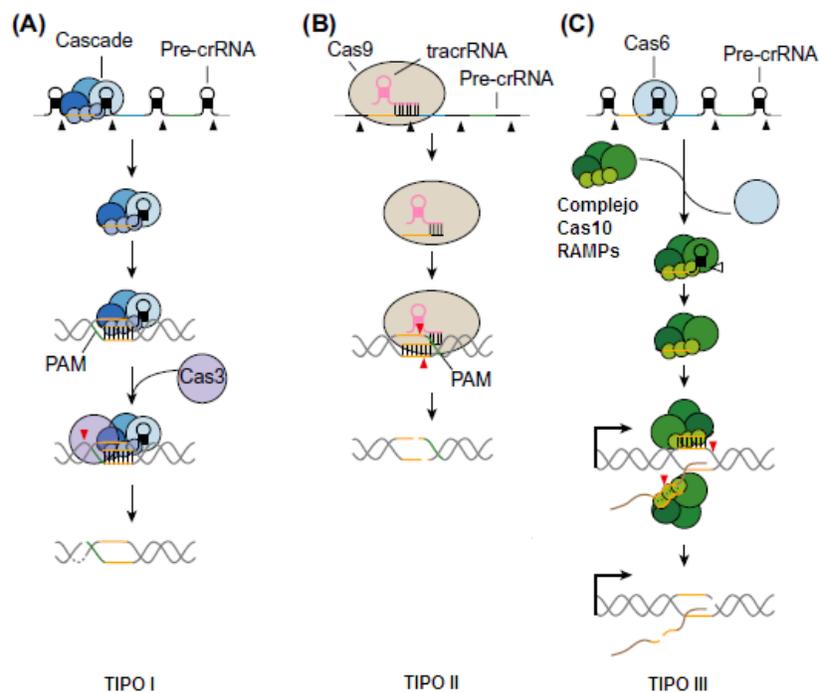


Figura 6. Mecanismos de adquisición de inmunidad viral por medio de los diferentes sistemas CRISPR-Cas. (A) Sistema tipo I, caracterizado por la expresión de Cas3 y el complejo Cascade; (B) Sistema tipo II, caracterizado por la expresión de Cas 9 y un ARN guía formado por crRNA y tracrRNA. (C) Sistema III, caracterizado por la presencia del complejo Cas10-RAMPs. Modificada de Golubov, 2016 (29).

2.3.2. Usos de los sistemas CRISPR-Cas

Debido a su versatilidad, los sistemas CRISPR-Cas se emplean en diversos sectores económicos como en la industria alimenticia, en la industria farmacéutica y principalmente en la investigación (34).

Con este sistema, se modula virtualmente cualquier organismo, con intervención en su rendimiento funcional mediante edición genómica. Se emplea como una nucleasa programable específica y se observó que múltiples crRNA con diferentes sitios objetivos hibridan al mismo tiempo con una función completa; este principio se aplica para la creación de antibióticos secuencia-específicos que podrían erradicar una o más especies en una población heterogénea de bacterias (40,41).

El sistema CRISPR-Cas9 (tipo II) es el más empleado debido al reducido número de proteínas Cas implicadas (34). Es posible inducir mutaciones en los dominios HNH y RuvC de las proteínas Cas9 lo que genera una deficiencia en la actividad de nucleasa (40); la dCas9 fusionada a dominios transcripcionales de activación o inhibición se utiliza para regular la expresión génica en células de diversos organismos (42).

El futuro en las aplicaciones de los sistemas CRISPR-Cas implica la creación de terapias génicas para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas en humanos (43), modificaciones en cultivos y animales, síntesis de biomateriales (42), disrupción de genes virales para disminuir su patogenicidad, creación de vacunas más seguras, control ecológico de vectores como los mosquitos o para el seguimiento de blancos farmacológicos (44).

2.3.3. CRISPR/dCas9 como herramienta para la regulación de la expresión génica

La tecnología CRISPR-Cas9 se puede utilizar como una secuencia específica no mutagénica para la regulación de la expresión génica (40) mediante la transformación de los dominios que le confieren a Cas9 la actividad de nucleasa (HNH y RuvC) (45). La dCas9 no escinde el ADN y es capaz de unirse al genoma mediante el reconocimiento de sitios PAM (motivos adyacentes al protoespaciador) y del ARN guía (sgRNA) formado por el crRNA y el ARN asociado a CRISPR transactivado (tracrRNA) (42).

Para ello es necesario el reclutamiento de diversas proteínas efectoras que intervengan en la regulación de la expresión génica a nivel de transcripción (40). La inhibición de la expresión de un gen mediante sistemas CRISPR-Cas y represores transcripcionales como KRAB (caja asociada-Krüppel) (46) se denomina CRISPR de interferencia o CRISPRi (47), donde el apareamiento del complejo sgRNA-dCas9-KRAB con la secuencia de ADN objetivo interviene en la fase de iniciación o de elongación de la transcripción donde, por impedimento estérico, bloquea la acción de la ARN polimerasa tipo II, así como de los factores de transcripción (figura 7) (48).

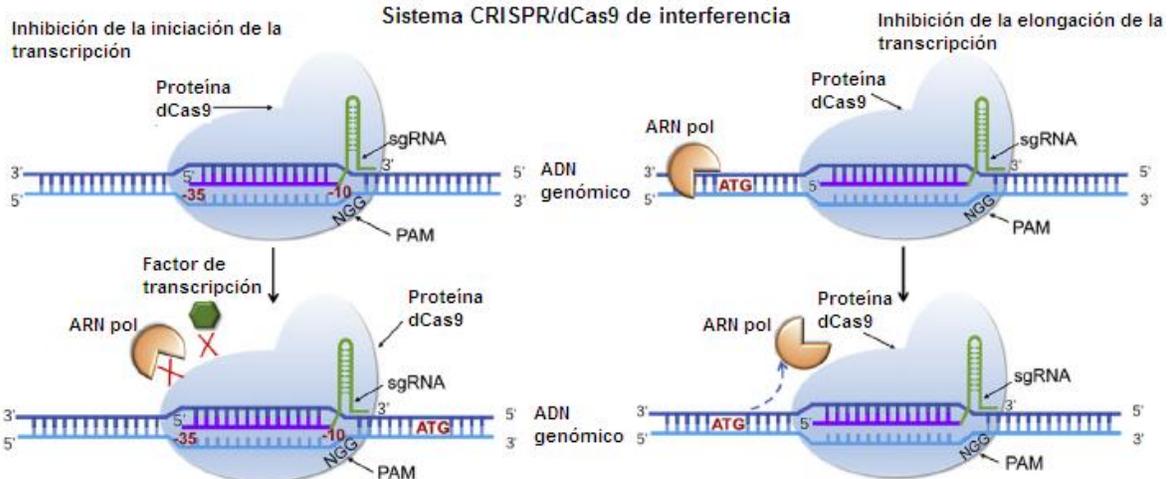


Figura 7. Esquema representativo de las dos formas de silenciar la expresión génica mediante sistemas CRISPR/dCas9. El complejo dCas9-sgRNA hibrida con la secuencia del promotor mediante el reconocimiento de las secuencias PAM (motivos adyacentes al protoespaciador) y por impedimento estérico bloquea a la ARN polimerasa (ARN pol) y/o factores de transcripción, con lo que se inhibe la iniciación de la transcripción. También el complejo dCas9-sgRNA puede hibridar con un fragmento de la secuencia del primer exón del gen para evitar la elongación de la transcripción. Modificada de Tian et al, 2017 (48).

dCas9 se puede convertir también en un activador transcripcional mediante la integración de los dominios de activación (40) VP16/VP64 (figura 8) o p65 que reclutan factores de transcripción en el sitio promotor de genes endógenos y genes reporteros, por lo que se conoce también como CRISPRa (CRISPR de activación) (48). La activación de genes de pluripotencia como OCT4, SOX2, NANOG o ASCL1

requiere múltiples sgRNA, lo que incrementa la especificidad y la eficiencia de la activación de la transcripción (46).

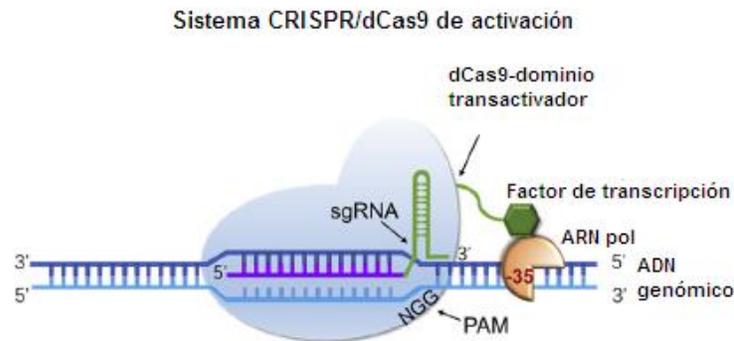


Figura 8. CRISPR de activación. La enzima dCas9 se fusiona con un dominio de transactivación que recluta factores de transcripción hacia el sitio promotor del gen, lo que facilita la unión de la enzima ARN polimerasa (ARN pol) y otros factores de transcripción para una eficiente iniciación transcripcional. Modificada de Tian et al, 2017 (48).

2.4. Plásmidos

Los plásmidos son fragmentos de ADN extracromosómico de doble cadena presentes en la mayoría de bacterias, generalmente son circulares y se replican de forma independiente al ADN cromosómico, se componen de genes no esenciales que les confieren cierta ventaja frente a condiciones adversas como la resistencia a antibióticos, metales pesados o a bacteriófagos (49–51).

Varían en estructura, peso, modo de replicación, número de copias por bacteria (49), así como en su habilidad de transferirse entre diferentes especies bacterianas, de integrarse al ADN cromosómico o a otros plásmidos (52).

Los vectores de propagación, manipulación y transfección de secuencias específicas de ADN se construyen con fragmentos de plásmidos encontrados naturalmente en las bacterias como *Escherichia coli*. Todos los vectores derivados de plásmidos poseen tres rasgos característicos: 1) un replicador, que es la parte de la secuencia del ADN donde inicia la replicación (origen de replicación u *Ori*) así

como los genes que codifican para los ARN y proteínas necesarios para ésta; 2) un marcador selectivo para el mantenimiento del plásmido en la célula, generalmente de resistencia a algún antibiótico; y 3) un sitio de clonación que se reconocerá por enzimas de restricción y donde se podrán insertar secuencias de ADN sin que interfieran con la capacidad de replicación del vector y que puedan conferir a la célula hospedera el fenotipo deseado (49,50).

2.4.1. Plásmido pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB

La caja asociada-Krüppel (KRAB) es un dominio proteico conservado compuesto por aproximadamente 75 aminoácidos organizados en dos subunidades, se encuentra en el extremo N-terminal de la mayoría de las proteínas con dedos de zinc y tiene una actividad de represión transcripcional (53).

Para desempeñar su función de represión, las proteínas con caja KRAB, se asocian con co-represores como la proteína 1 asociada a KRAB (KAP1) que se une al dominio KRAB como oligómero y recluta a otras proteínas, como proteína 1 heterocromatina (HP1a), histona desacetilasas y una proteína con motivo SET que metila la lisina 9 de la histona H3 (setdb1) (54), que forman un complejo que interactúa con la cromatina lo que promueve su condensación y evita la unión de las ARN polimerasas (53).

La fusión de los dominios KRAB a proteínas deficientes dCas9 promueve la reclusión dirigida (por arreglos CRISPR) de complejos represores modificadores de la cromatina (55) hacia secuencias cercanas a sitios promotores para generar un silenciamiento génico a nivel transcripcional (56).

La transfección de los genes codificantes para estas proteínas se lleva a cabo mediante vectores virales o no virales, el más empleado es el vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB (figura 9) donde se clona dCas9-KRAB en una construcción lentiviral mínima bajo el control del enfoque de formación de virus de bazo (SFFV)

que posee, entre otros genes, un sitio de origen de replicación, el promotor y la secuencia codificante para la proteína dCas9, así como para el dominio KRAB además de un gen de resistencia a la ampicilina. Para su replicación se insertan en bacterias transformadas o competentes (56).

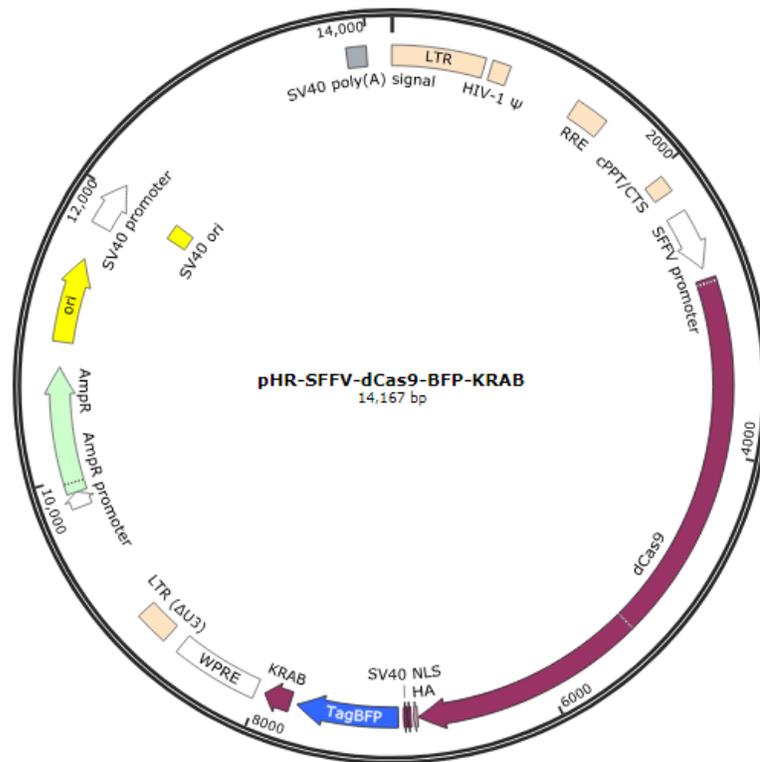


Figura 9. Mapa genético del vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB propuesto por Gilbert et al, 2013. Conformado por las secuencias codificantes para la proteína dCas9 fusionada con el dominio de represión KRAB además de un gen de resistencia a la ampicilina (56).

2.4.2. Plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression

La proteína viral 16 (VP16) es un factor de transcripción codificado por el gen UL48 del virus del herpes simple tipo I. Está compuesta por 490 aminoácidos con dos dominios funcionales importantes: un dominio de unión al ADN (DBD) en la región central y un dominio de activación de la transcripción (TAD) en la región C-terminal (57).

El TAD de la proteína VP16 es uno de los más potentes, interactúa con numerosas proteínas involucradas en la activación génica como los factores de transcripción (TF) TFIIA, TFIIB, TFIIIF, TFIID y subunidades de TFIID (58), así mismo recluta enzimas como las histonas acetiltransferasas en los sitios promotores, lo que facilita la unión del complejo de pre-iniciación de la transcripción (57).

Por lo anterior, se fusiona con el DBD de otras proteínas en diversas construcciones de plásmidos que tienen la finalidad de activar o aumentar la expresión de un gen determinado, es altamente utilizada en sistemas CRISPR/dCas9 de activación.

El plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression (figura 10), es una construcción de expresión doble debido a que contiene la información necesaria para codificar una proteína dCas9 fusionada al dominio de transactivación VP16, así como el promotor U6 y un sitio de ligación para la secuencia CRISPR de interés (59). Contiene también otros genes que permiten su replicación y supervivencia en bacterias competentes así como un gen de resistencia a la ampicilina para facilitar la selección positiva de unidades formadoras de colonias transformadas (55).



Figura 10. Mapa genético del vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression propuesto por Cheng et al, 2013. Constituido por secuencias de diversos genes entre los que destacan el gen codificante para la proteína dCas9 fusionada al dominio de transactivación VP16, el promotor U6, el sitio de ligación para el arreglo CRISPR y el gen de resistencia a la ampicilina (59).

2.5. Transformación de bacterias competentes

La transformación genética es un proceso por el cual las bacterias pueden alojar ADN libre y estabilizarlo en forma de un replicón extracromosómico o como parte de su genoma mediante recombinación homóloga (60); algunas bacterias incorporan el ADN exógeno mediante la capacidad genética denominada competencia natural (61).

El estado de competencia natural se observa en cepas de *Escherichia coli*, un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Por el tiempo de replicación (18 a 20 minutos), *E. coli* es de las bacterias más empleadas para la transformación y ligación de plásmidos (62).

Para que en las bacterias haya un proceso exitoso de transformación es necesario tratarlas artificialmente, de tal forma que se modifique su estructura externa y se tornen competentes. Este proceso consta de cuatro etapas: 1) desarrollo de un estado de competencia celular, 2) unión de las cadenas de ADN libre a la superficie celular, 3) entrada y procesamiento y, 4) expresión del ADN adquirido (61).

La transformación se realiza cuando las bacterias y el ADN se combinan en presencia del ion calcio (Ca^{2+}) a 0°C y con un posterior aumento abrupto de temperatura a 42°C (choque térmico) (61). El mecanismo por el cual el Ca^{2+} media este proceso de transformación artificial no está completamente establecido, sin embargo, se sabe que ayuda a la apertura de canales al formar el complejo poli- β -hidroxibutirato (PHB)/calcio/polifosfato, por los cuales el ADN ingresa a la célula. El choque térmico desestabiliza la membrana celular y favorece la entrada de ADN a través de la formación de poros temporales (60).

Debido a la estabilidad de los vectores de clonación, la transformación de bacterias competentes mediante choque térmico es una técnica viable para la replicación de plásmidos empleados para la transfección de sistemas CRISPR/dCas9. Para comprobar la inserción del plásmido se realiza un procedimiento denominado lisis alcalina que consiste en la exposición de la bacteria a un medio con un detergente fuertemente aniónico y un pH elevado con lo cual se fragmenta la pared celular, se desnaturaliza el ADN cromosómico, se precipitan las proteínas y se extrae casi exclusivamente el ADN plasmídico, el cual se somete a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su análisis (63).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células de Müller tienen capacidad de desdiferenciación para adquirir funciones de células troncales que les permite la regeneración funcional de la retina en diversos vertebrados como el pez cebra y el pollo, pero en mamíferos no existe este proceso. Al inhibir farmacológicamente a las DNMTs con SGI-1027 *in vivo*, las células de Müller comienzan a expresar genes propios de células troncales, sin embargo, en ratones con retinas dañadas con N-metil-D-aspartato (NMDA) la administración de dicho fármaco incrementa el daño (probablemente debido a que se inhiben las tres DNMTs de importancia catalítica), por lo que el desarrollo de un sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición selectiva de DNMT3a permitirá identificar su función en el proceso de desdiferenciación de las células de Müller en retinas dañadas, no obstante, es necesario comprobar la efectividad y selectividad del sistema antes de su uso como método de estudio.

4. HIPÓTESIS

El diseño de un arreglo CRISPR específico que hibrida con el gen codificante para DNMT3a (sgDNMT3a-1) y su posterior co-transfección con el vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB a un cultivo celular de glía de Müller inhibe parcial o totalmente la expresión del gen.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Diseñar un sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición del gen codificante para DNMT3a y evaluar su funcionalidad en un cultivo celular de glía de Müller.

5.2. Objetivos particulares

- Diseñar y obtener un plásmido con el arreglo CRISPR que codifique para un ARN guía específico a DNMT3a.

- Transformar bacterias competentes de *Escherichia coli* con el plásmido diseñado y comprobar su inserción.
- Inhibir la expresión de DNMT3a en cultivo celular de glía de Müller para verificar el funcionamiento del sistema CRISPR/dCas9 empleado.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1. Tipo de estudio

Semicuantitativo, longitudinal, experimental.

6.2. Población

Colonias de *Escherichia coli* cepa JM109

Cultivo celular de glía de Müller

6.3. Variables

Dependiente: Expresión génica de ADN metiltransferasa 3 alfa (DNMT3a)

Independiente: Sistema CRISPR/dCas9 para inhibición de DNMT3a

6.4. Análisis estadístico

Se realizó la prueba ANOVA de una vía con prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las determinaciones por densitometría de las expresiones relativas de DNMT3a, mediante el uso del programa IBM SPSS Statistics 20. Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ como significativo.

6.5. Material

6.5.1. Material biológico

- Bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* JM109.
- Ratones de la cepa C57BL/6J postnatal 8.

- Cultivo primario de glía de Müller.

6.5.2. Reactivos

- Medio de cultivo DMEM Gibco®.
- Medio de cultivo OptiMEM Gibco®.
- Suero fetal bovino Gibco®.
- Caldo de cultivo Luria Bertani (LB) Sigma®.
- Agar LB Sigma®.
- Amortiguador TBF1 Sigma®.
- Amortiguador TBF2 Sigma®.
- Enzima T4 ADN ligasa BioLabs®.
- Ampicilina Sigma®.
- QIAprep Spin Miniprep Kit Qiagen®.
- Mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) Sigma®.
- Isopropanol Química Meyer®.
- Etanol Química Meyer®.
- Agua inyectable Pisa®.
- Kit para PCR Thermo Scientific®.
- Agarosa Sigma®.
- Tris-Base Sigma®.
- Ácido Bórico Sigma®.
- EDTA Sigma®.
- Bromuro de etidio Sigma®.
- Amortiguador de carga 6X Invitrogen®.
- TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.
- Tripsina Gibco®.
- Colagenasa Gibco.
- Lipofectamine 2000 Invitrogen®.
- Cloruro de Sodio Sigma®.

- Cloruro de potasio Sigma®.
- Fosfato ácido de sodio Sigma®.
- Fosfato ácido de potasio Sigma®.
- Trizol Sigma-Aldrich®.
- Cloroformo Sigma-Aldrich®.
- Kit SuperScript™ First-Strand Syntesis System for RT-PCR Invitrogen®
- Plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression
- Plásmido pHR-SSFV-dCas9-BFP-KRAB

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR punto final.

Gen	Secuencia	Tm °C
sgDNMT3a	CACCGCGCTCTCAGCACCGCGCG	75.2
	AAACCGCGCGGTGCTGAGAGCGC	71.7
CloningSpeIF	GCGCACTAGTATTATGATTCCTTCAT	66
CloningKpnIR	GCGCCGTACCTCTAGAGCCATTTG	68
DNMT3a	GCCGAATTGTGTCTTGGTGGATGACA	61.3
	CCTGGTGGAAATGCACTGCAGAAGGA	63.1
DNMT3b	TGGGTACAGTGGTTTGGTGA	56.2
	GCCCTTGTTGTTGGTGACTT	56
GAPDH	ACTGGCATGGCCTTCCGTGTTCCCTA	64.2
	TCAGTGTAGCCCAAGATGCCCTTC	60.9

6.5.3. Materiales

- Asa bacteriológica.
- Asa bacteriológica calibrada estéril desechable Santa Cruz Biotechnology®.
- Cajas de Petri estériles desechables Continental Lab Products®.
- Puntas para micropipeta 10, 20 – 200, 500 µL, estériles y libres de nucleasas Neptune®.
- Tubos para centrífuga de 15 mL con tapa de rosca Corning®.
- Tubos para microcentrífuga de 0.2, 0.6, 1.5 mL Neptune®.
- Matraz Erlenmeyer de 125 mL Pyrex®.
- Material de disección.
- Frasco de cultivo de 75 cm² Corning®.

- Placas de seis pozos Corning®.

6.5.4. Equipos

- Computadora Notebook HP®.
- Incubadora con agitación orbital Biosan®.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf®.
- Microcentrífuga Gusto®.
- Micropipetas de 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL Transferpette®.
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL Gilson®.
- Placa de agitación y calentamiento SpinMaster®.
- Balanza granataria Sartorius®.
- Balanza analítica ADAM®.
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific®.
- Agitador Vórtex VWR Scientific®.
- Termociclador MasterCycler Personal de Eppendorf®
- Campana de flujo laminar NUANRE®.
- Incubadora (cuarto de cultivo) VWR®.
- Microscopio óptico Leica®.
- Horno de microondas Daewoo®
- Cámara horizontal para electroforesis Galileo Bioscience®.
- Fuente de poder BioRad®
- Transiluminador UV Bio-Imaging Systems®.
- Autoclave YXQ®.

6.6. Métodos

6.6.1. Diseño del vector de clonación, sgRNA y primers

Se diseñó, mediante la herramienta web CHOP-CHOP, el ARN guía y se hizo la selección de la secuencia diana. Los recursos básicos necesarios para el diseño fueron el nombre del gen, coordenadas genómicas o copia de la secuencia en

formato FASTA o GenBank; la lista de microorganismos de crecimiento; elección del sistema a emplear (CRISPR/dCas9) y un ordenador o computadora con acceso a internet.

Para obtener la secuencia diana óptima se configuró la secuencia del gen a inhibir, la secuencia PAM (Motivo Adyacente al Protoespaciador), la posición del PAM dentro de la secuencia del gen, la longitud esperada del ARN guía (sgRNA) y las discrepancias permitidas en secuencias fuera de rango.

Se obtuvo una lista de secuencias dianas de las cuales se seleccionó la que presentaba una mayor eficiencia, nulas secuencias blanco fuera de rango y que se encontraba en el primer exón del gen DNMT3a murino. Posterior a la selección de la secuencia diana, el recurso web nos proporcionó también las secuencias de los primers para la comprobación por PCR tabla 2. Las secuencias obtenidas (arreglo CRISPR y primers) se ordenaron sintetizar a la empresa Eurofins Genomics.

Tabla 2. Secuencia diana y primers obtenidos para el arreglo CRISPR específico a DNMT3a.

Nombre	Secuencia
Secuencia diana	GCGCTGTCAGCACCGCGCGCCGAGT
Primer Forward	CACCGCGCTCTCAGCACCGCGCG
Primer Reverse	AAACCGCGCGGTGCTGAGAGCGC

El vector de clonación pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression y el vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB se adquirieron a Promega®. Se realizó la ligación del arreglo CRISPR específico para DNMT3a en el vector de clonación pAC156-dual-dCas9VP160-sgExpression con la enzima T4 ADN ligasa (BioLabs®). Para ello, en un tubo Ependorff® de 1.6 mL puesto en baño de hielo, se mezclaron 1.1 µL amortiguador de la enzima T4 DNA ligasa (10X), 3 µL de una suspensión del vector (VP160) con una concentración de 12 ng/µL, 4.9 µL de la suspensión del inserto (CRISPR) de 3 ng/µL y 1 µL de la enzima T4 ADN ligasa. Se mezcló suavemente

por pipeteo y se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente toda la noche. Se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos y después se incubó en hielo.

6.6.2. Transformación de bacterias competentes

Se realizó una siembra de bacterias *Escherichia coli* de la cepa JM109 en 5 mL de caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm durante 9 horas. Se tomó una alícuota de 200 µL de la suspensión bacteriana y se transfirió a un tubo Falcon® con 20 mL de caldo LB estéril, se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por un periodo de 1 a 2 horas. Posteriormente se centrifugó la suspensión a 4400 rpm por 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 10 mL de amortiguador TFB1 y se dejó reposar por 20 minutos. Después se centrifugó la suspensión a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 2 mL de amortiguador TFB2 y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se almacenó a -70°C hasta su utilización.

Se transfirieron 5 µL de la mezcla del plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a a un tubo Ependorff® de 1.6 mL y se agregaron 50 µL de suspensión de bacterias JM109 competentes, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 20 minutos. Posteriormente se transfirió el tubo a un baño maría a 42°C durante 45 segundos y después se incubó en hielo por 2 minutos. Se agregaron 300 µL de caldo de cultivo LB sin ampicilina, se mezcló y se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 1.5 horas. Con un asa calibrada se sembraron 100 µL de bacterias transformadas en agar Luria-Bertani (LB) con ampicilina (0.1 mg/mL) y se incubaron a 37°C por 16 a 24 horas.

6.6.3. Obtención de ADN plasmídico por lisis alcalina

Se adicionaron 10 mL de caldo de cultivo LB/ampicilina en un tubo Falcon de 15 mL, se inoculó el medio con una asada de una colonia aislada de *E. coli* JM109 transformada y se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 16 a 24

horas. Se centrifugó la suspensión bacteriana a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 250 µL de solución de lisis 1 (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM). Se agregaron 250 µL de solución de lisis 2 (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcló suavemente por inversión de 4 a 5 veces. Se añadieron 350 µL de solución de lisis 3 (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial) y se mezcló hasta la formación de un precipitado blanquecino. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C y se depositó el sobrenadante en un tubo Ependorff® de 1.6 mL limpio y estéril. Se agregaron 100 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló en vórtex por 15 segundos. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo Ependorff® de 1.6 mL limpio y estéril, se adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol, se mezcló en vortex y se incubó 15 minutos a -70°C. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C, se retiró cuidadosamente el sobrenadante, se agregaron lentamente 500 µL de etanol al 70% para lavar el botón y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el etanol y se secó la muestra por inversión del tubo sobre un papel absorbente. Se resuspendió el botón en 25 µL de agua MQ estéril, se determinó la concentración de ADN de la suspensión por espectrofotometría UV.

6.6.4. PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa al 1%

En un tubo Ependorff® de 0.2 mL puesto en baño de hielo, se adicionaron los reactivos que se muestran en la tabla 3 a excepción de la suspensión de ADN, el volumen varía de acuerdo con el número de reacciones a realizar, por lo que es necesario efectuar las multiplicaciones pertinentes antes de comenzar con el protocolo. Se mezcló ligeramente en vórtex por 5 segundos y se centrifugó a 4500 rpm por 10 segundos a temperatura ambiente. Se adicionaron 9 µL de la mezcla de reacción a tubos Ependorff® de 0.2 mL y se agregó a cada tubo la suspensión de ADN correspondiente o agua según fue el caso. Se programó el termociclador MasterCycler® Personal de Ependorff® con las condiciones de ciclado mostradas en la tabla 4, se colocaron los tubos en la placa del aparato y se inició el programa

de PCR. Terminada la reacción, se preparó un gel de agarosa al 1% horizontal. Para ello en un matraz Erlenmeyer se depositaron 45 mL de amortiguador TBE 1X y 0.45 g de agarosa, se calentó la mezcla en horno de microondas a intervalos de 20 segundos entre los cuales se agitó ligeramente. Una vez disuelta la agarosa se adicionaron 4 μ L de solución de bromuro de etidio, se mezcló bien y se depositó la mezcla en el molde provisto con un peine. A cada tubo de reacción con productos de PCR se le agregaron 2 μ L de amortiguador de carga 6X, se mezcló bien y se depositó en un pozo del gel de agarosa, se cargó en un pozo 5 μ L de marcador de peso molecular de 100 – 10000 pb. Se realizó la electroforesis a 100 V por una hora con TBE 1X como amortiguador de corrimiento. Se visualizó el resultado en un transiluminador UV y se realizó el análisis de densitometría mediante el programa Gel Quant Express.

Tabla 3. Volúmenes requeridos de cada reactivo que compone la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reactivo	Concentración en la reacción	Volumen requerido por reacción (μ L)
Agua	-	6.92
Amortiguador (10X)	0.72X	0.72
MgCl ₂ (25 mM)	0.9 mM	0.36
Deoxinucleótidos trifosfatados (10 mM)	0.36 mM	0.36
Enzima Taq pol (5 U/ μ L)	0.02 U/ μ L	0.04
Primer Forward (0.5 nM)	0.015 nM	0.30
Primer Reverse (0.5 nM)	0.015 nM	0.30
ADN (50 ng/ μ L)	5 ng/ μ L	1
Total	-	10

Tabla 4. Condiciones del programa de ciclado para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 min
2	95°C	35 s
3	T _m	65 s
4	72°C	40 s
Repetir al paso 2, 35 veces		
5	72°C	5 min
6	4°C	1 h

T_m: Temperatura de fusión de los primers, datos en la tabla 1.

6.6.5. Análisis densitométrico

Se tomó fotografía de los geles de agarosa con el sistema Bio-Imaging Systems® que se compone de un transiluminador UV, una cámara fotográfica y el analizador de imagen. La intensidad de las bandas se determinó con el programa Gel Quant Express (Bio-Imaging Systems). Se utilizó la siguiente fórmula para determinar la expresión relativa por densitometría (64) de DNMT3a respecto al gen GAPDH:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(\text{densidad del gen DNMT3a} - \text{densidad del fondo})}{(\text{densidad del gen GAPDH} - \text{densidad del fondo})}$$

6.6.6. Cultivo celular de glía de Müller

Se disecaron los ojos de cuatro ratones de ocho días de nacidos y se incubaron toda la noche en medio modificado de Dubelcco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% en oscuridad a temperatura ambiente. Se depositaron los ojos en un tubo Falcon® de 15 mL y se agregó medio DMEM suplementado con tripsina al 1% y colagenasa a una concentración de 70 IU/mL y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se separaron cuidadosamente las retinas de los demás tejidos oculares y se disociaron por trituración. Se transfirió la suspensión de retinas a un frasco de cultivo de 75 cm² con medio DMEM suplementado con SFB al 4% y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ toda la noche. Se cambió el medio de cultivo a las 16-24 horas. Después de 3 a 4 días de incubación se agitó vigorosamente el cultivo para descartar células no adherentes. Se incubó el cultivo de glía de Müller en DMEM con SFB al 4% hasta que se detectó un 80 – 90% de confluencia (11,27,65,66).

6.6.7. Cotransfección del vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB y sgDNMT3a-1

Se sembraron de 0.5 a 3.5x10⁶ células de Müller a transfectar en placas de 6 pozos y se cultivaron en medio OptiMEM suplementado con SFB al 4% hasta que se

detectó una confluencia del 70 – 90%. Se mezcló la suspensión de ADN plasmídico (arreglo CRISPR con su promotor o sgDNMT3a-1) con la suspensión del vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB en una proporción molar de 3 a 1. Se diluyó la mezcla de ADN en OptiMEM libre de suero para obtener una concentración de 0.02 µg/µL. Se realizó por separado la dilución de Lipofectamine® 2000 (1mg/mL) en OptiMEM libre de suero para obtener una concentración de 0.04 mg/µL. Se incubaron ambas diluciones 5 minutos a temperatura ambiente. Se mezclaron partes iguales de la dilución de ADN y de Lipofectamine® 2000 y se dejó reposar la mezcla de 20 – 30 minutos a temperatura ambiente para la formación de los complejos liposoma-ADN. Se retiró el medio de crecimiento de los cultivos celulares sembrados en las placas de 6 pozos, se adicionó 1 mL de PBS estéril a cada pozo, se agitaron lentamente y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el PBS y se adicionaron 250 µL de la mezcla con los complejos liposoma-ADN a cada pozo y 1.25 mL de OptiMEM libre de suero. Se incubó la placa a 37°C y 5% de CO₂ hasta por 48 horas (67–69).

6.6.8. Extracción de ARN con trizol y RT-PCR

Posterior al tiempo de transfección (24 o 48 horas), se retiró el medio de crecimiento de los pozos correspondientes a cada tiempo y se adicionó a cada uno 1 mL de PBS estéril, se agitaron lentamente y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el PBS de todos los pozos. Se adicionó 1 mL de trizol a un solo pozo y con una punta para micropipeta estéril se recolectaron las células mediante dispersión mecánica, se transfirió la suspensión celular formada al pozo número dos, se realizó el mismo procedimiento y se repitió en el pozo 3. Se depositó la suspensión final en un tubo Ependorff® de 1.6 mL limpio y estéril, se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 200 µL de cloroformo frío, se agitó en vórtex por 15 segundos, se incubó 15 minutos a 4°C y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa, se adicionó un volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C por 15 minutos y a -70°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 20

minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se adicionó cuidadosamente al botón formado 500 µL de etanol al 75%. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C, se retiró el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente por inversión del tubo sobre papel absorbente. Se resuspendió el botón en 20 µL de agua estéril libre de RNasas. Se determinó la concentración de ARN por espectrofotometría. Se realizó la reacción de retrotranscripción con el kit de SuperScript™ First-Strand Syntesis System for RT-PCR (Invitrogen®) conforme el protocolo del proveedor (11).

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de colonias de *Escherichia coli* JM109 transformadas

Se ligó el arreglo CRISPR para DNMT3a (sgDNMT3a-1) en el vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression, la construcción se insertó en bacterias de la cepa *Escherichia coli* JM109 competentes, para hacer una selección positiva de unidades formadoras de colonias (UFC), se realizó la siembra masiva de las bacterias transformadas en agar Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina a una concentración de 0.1 mg/mL; se obtuvieron colonias escasas (figura 11a) que posteriormente se sembraron en agar LB con ampicilina (figura 11b) para obtener mayor cantidad de material biológico para experimentación.

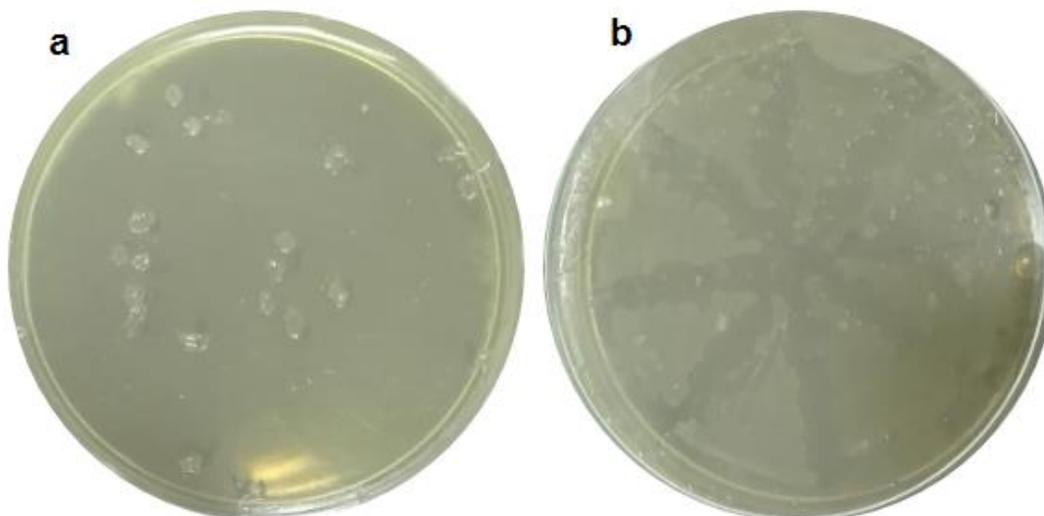


Figura 11. Placas de Petri con agar Luria-Bertani/ampicilina 0.1 mg/mL. a) Sembrado masivo de bacterias *E. coli* JM109 transformadas con el vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a. b) Resiembrado de las colonias de *E. coli* JM109 transformadas aisladas.

7.2. Comprobación de la inserción del plásmido en colonias de la cepa bacteriana *E. coli* JM109.

Mediante la técnica de MiniPrep o lisis alcalina, se realizó la extracción de ADN plasmídico de las colonias de *E. coli* aisladas y se comprobó la inserción del plásmido en las bacterias seleccionadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final y electroforesis (figura 12).

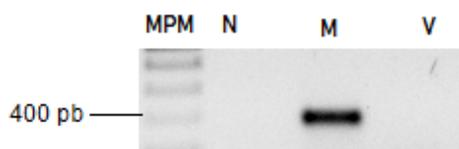


Figura 12. PCR punto final del vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a replicado en bacterias de la cepa *E. coli* JM109, se observa una banda que indica la presencia del plásmido. MPM: Marcador de peso molecular; N: Control negativo a expresión; M: Muestra de ADN plasmídico; V: Carril vacío.

Se comprobó la integridad de la región delimitada por los sitios de restricción *SpeI* y *KpnI* del plásmido donde se encuentra el inserto sgDNMT3a mediante doble PCR punto final (figura 13); se probaron colonias al azar y en el gel de agarosa se observa que las bandas correspondientes a la colonia 5 presentan una mayor nitidez (figura

14), por lo que los ensayos subsecuentes se realizaron con resiembras de esta colonia.

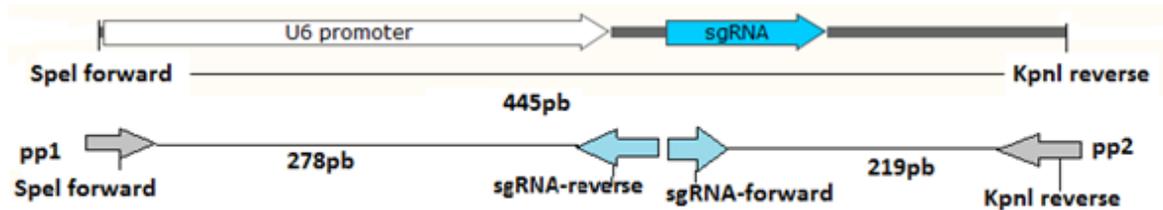


Figura 13. Diseño de doble PCR para la comprobación de la integridad de la región del plásmido donde se encuentra ligado sgDNMT3a. Se amplifican dos fragmentos de la misma región, la primera (pp1) corresponde al fragmento comprendido por el promotor U6 que se encuentra flanqueado por el sitio de restricción SpeI y el sitio de inserción de sgDNMT3a; la segunda (pp2) corresponde al fragmento de sgDNMT3a, flanqueado por el sitio de inserción de sgDNMT3a y el sitio de restricción KpnI.

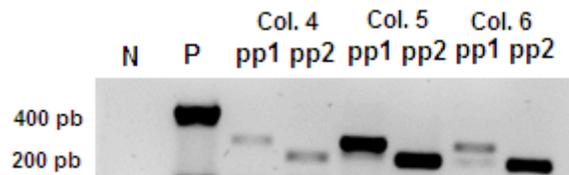


Figura 14. Comprobación de la integridad del inserto sgDNMT3a en colonias de *E. coli* JM109 mediante doble PCR, donde pp1 corresponde a la fracción compuesta por el sitio promotor U6 (276 pb) y pp2 a sgDNMT3a (215 pb); N: negativo a inserción del plásmido; P: Positivo a inserción del plásmido con amplificación de la región SpeI-KpnI (445 pb); Col.: Colonia.

Posterior a la comprobación de integridad del inserto sgDNMT3a, se envió para secuenciación al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) la región SpeI-KpnI del vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression (figura 15) con lo que se demostró que la secuencia del sgDNMT3a es complementaria a un fragmento de la secuencia del primer exón del gen codificante para la enzima DNMT3a.

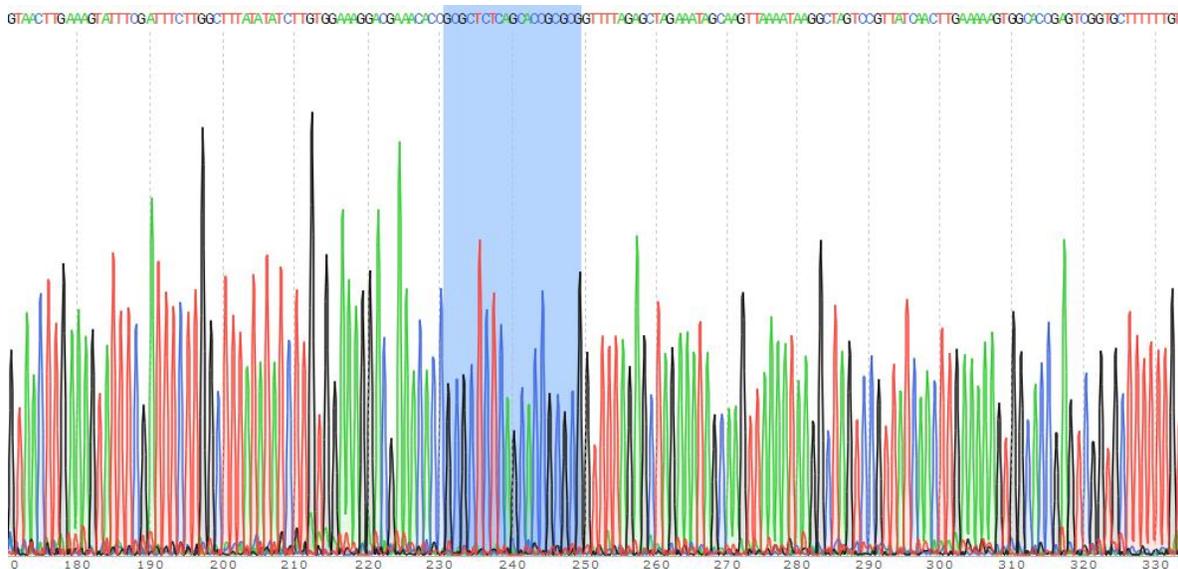


Figura 15. Fragmento del electroferograma correspondiente a la secuenciación de la región Spel-KpnI del plásmido para sgDNMT3a insertado en la cepa *E. coli* JM109. Se observa en azul celeste la parte de la secuencia complementaria a un fragmento del primer exón del gen codificante para la enzima DNMT3a.

7.3. Evaluación del sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición de DNMT3a

Posteriormente se realizó la evaluación del sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición de DNMT3a en un cultivo celular de glía de Müller (MG). Debido a que el vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression codifica para una proteína dCas9 fusionada al dominio de transactivación VP16, se realizó la cotransfección de la región Spel-KpnI con el vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB, que codifica para una proteína dCas9 fusionada al dominio de inhibición KRAB, mediante el uso de Lipofectamine® 2000.

Se observó que las células de Müller en cultivo poseen una morfología característica de tipo neuronal y se extienden radialmente en la superficie de crecimiento (figura 16a). Se trató un cultivo celular con Lipofectamine® 2000 (figura 16b), y se observó una disminución en la confluencia celular además de cambios morfológicos en las células, que adquirieron una forma fusiforme. En los cultivos transfectados con el vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB, sgDNMT3a y lipofectamina (16c y 16d) se

observó disminución en el número de células en el cultivo, así como cambios en el tamaño y morfología de las células de Müller.

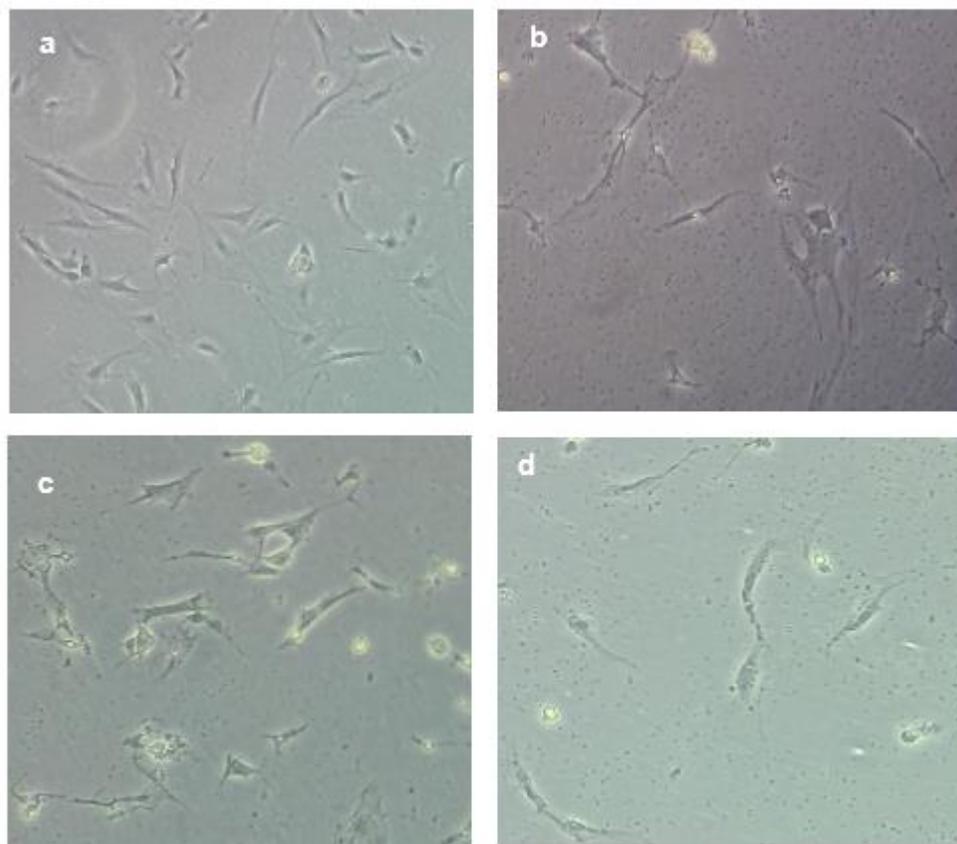


Figura 16. Cultivo secundario de glía de Müller. a: Cultivo celular sin tratamiento, marcado como control negativo, incubado en DMEM libre de suero donde se observa un crecimiento radial de las células; b: Cultivo tratado con Lipofectamine 2000 e incubado en DMEM libre de suero, se observa una disminución de la confluencia celular con respecto al control negativo; c: Cultivo celular de glía de Müller observado a las 24 horas post-transfección; d: Cultivo celular de glía de Müller observado a las 48 horas post-transfección. 10X.

Se obtuvieron muestras de ARN a las 24 y 48 horas post-transfección (hpt) para detectar la expresión de DNMT3a, DNMT3b y gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa (GAPDH) mediante PCR punto final. Se retrotranscribieron 308 ng de ARN de cada tiempo y se incluyeron dos controles, uno positivo compuesto por ARN extraído del cultivo celular sin tratamiento y un control de transfección, obtenido del cultivo celular tratado con Lipofectamine® 2000. Se realizaron tres ensayos de PCR punto final y electroforesis en los que no se observó un cambio en la expresión de los genes DNMT3b y GAPDH en los dos controles y en las muestras

obtenidas a las 24 y 48 hpt (figura 17). Así mismo se observa expresión del gen DNMT3a en los carriles correspondientes a los cultivos controles, sin embargo, a las 24 hpt hay una detección casi nula de la expresión mientras que a las 48 hpt se observa un aumento de la expresión de DNMT3a con respecto a la muestra tomada a las 24 hpt (figura 17), lo que indica una inhibición selectiva no sostenida de la expresión de este gen.

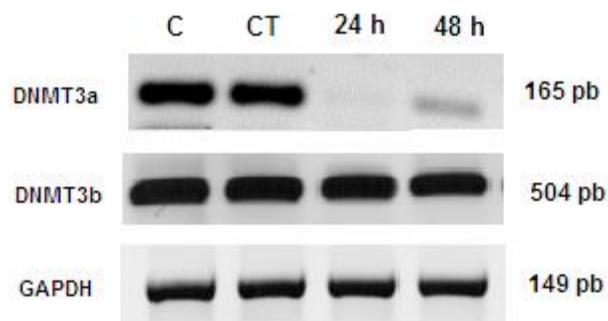


Figura 17. Perfil de expresión de los genes DNMT3a, DNMT3b y GAPDH. C: Control positivo de expresión, muestra tomada de cultivo celular sin tratamiento incubado en DMEM libre de suero; CT: Control de transfección, cultivo celular incubado en DMEM libre de suero y tratado con Lipofectamine® 2000; 24 h: Muestra tomada a las 24 hpt; 48 h: Muestra tomada a las 48 hpt.

Para determinar los cambios en el nivel de expresión de DNMT3a respecto a GAPDH o expresión relativa de DNMT3a, se realizó un análisis por densitometría a los geles de agarosa con el programa Gel Quant Express (figura 18), donde se observa una disminución significativa ($P \leq 0.05$) a las 24 hpt y un aumento de expresión relativa a las 48 hpt con significancia $P \leq 0.05$.

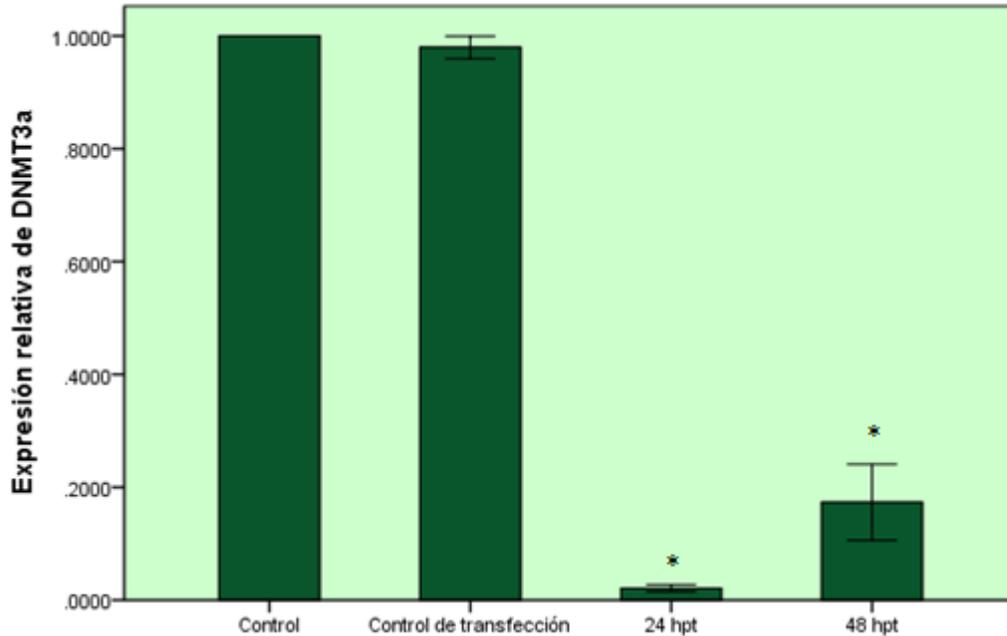


Figura 18. Determinación por densitometría de la expresión relativa del gen DNMT3a respecto a GAPDH. Valores de expresión relativos obtenidos del análisis de los geles de agarosa resultantes de la electroforesis de los productos de PCR para el gen DNMT3a de cultivos celulares de glía de Müller transfectados con el vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB y sgDNMT3a-1, se graficaron las medias de los valores obtenidos de tres ensayos y por la prueba de ANOVA con posterior análisis de Tukey ($P \leq 0.05$) se determinaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 hpt y 48 hpt.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este trabajo se diseñó un sistema CRISPR/dCas9 para inhibir del gen codificante de la enzima ADN metiltransferasa 3a (DNMT3a) para su posterior uso en la identificación de la función de la enzima en la desdiferenciación de la glía de Müller, ya que se observó que durante este proceso la expresión de DNMT3a era sostenida y es probable que debido a ello las células de Müller no expresen por un tiempo prolongado genes asociados a pluripotencia lo que conlleva a la no regeneración funcional de la retina (27).

Las DNMTs, en general, son de importancia en el proceso de diferenciación celular en organismos pluricelulares, ya que establecen y mantienen la metilación lo que genera la activación o represión de genes (70). El regular o modificar la expresión

de estas enzimas puede favorecer la generación de un nuevo estado de pluripotencia en las células (25).

Se utilizó la tecnología CRISPR/dCas9 debido a su alta selectividad lo que la convierte en una herramienta altamente recomendada para la regulación de la expresión génica (71). Este proceso depende ampliamente del sitio de hibridación del ARN guía (sgRNA) con el gen a regular, y de los dominios (de activación o represión) fusionados a la proteína deficiente dCas9 (55).

Existen también técnicas para la inhibición de la expresión génica a nivel post-transcripcional como lo son los ARN de interferencia (RNAi), los cuales son ARN de doble cadena con una longitud de 21 a 25 pb que hibridan con el ARN mensajero maduro e induce su degradación por lo que no se traduce a proteína (72). Si bien los RNAi presentan numerosas ventajas sobre los sistemas CRISPR/dCas9, como su capacidad para generar un silenciamiento génico perdurable o transitorio según se requiera (73), los RNAi tienden a hibridar con secuencias fuera de rango (off-target) lo que causa una inhibición no selectiva (74), por los requerimientos del proyecto a futuro, el sistema CRISPR/dCas9 generado es idóneo para inhibir a DNMT3a.

Por otra parte, los medios de cultivo selectivos permiten el aislamiento de un solo tipo de bacterias de acuerdo con sus requerimientos nutricionales específicos y/o las ventajas genéticas que presenten, como la resistencia a un antibiótico (75). Debido a que el medio de crecimiento utilizado contiene ampicilina, el aislamiento de bacterias en éste nos proporcionó un criterio de exclusión para los microorganismos transformados por el plásmido transfectado pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a, el cual contiene un gen de resistencia a la ampicilina, por lo que sólo aquellas colonias que presentaron el inserto crecieron en el medio, y permitieron la selección positiva de éstas (76).

El crecimiento en el medio de cultivo selectivo indica la presencia del plásmido en la bacteria por la expresión del gen de resistencia a la ampicilina, sin embargo, esto no da información de su integridad, ya que por las mismas enzimas bacterianas puede sufrir modificaciones o, si las bacterias *E. coli* JM109 realizan conjugación con otras bacterias contaminantes del medio, el plásmido podría no encontrarse completo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más sencilla para llevar a cabo la comprobación de la integridad del plásmido, ya que permite la amplificación de un fragmento específico de éste. En particular, con base en el diseño previo, se sabe que el fragmento delimitado por los sitios de restricción SpeI y KpnI contiene la información necesaria para codificar el sgRNA (77).

En la figura 14 se observa la doble PCR realizada, con ella se verificó la integridad del fragmento del plásmido delimitado por los sitios de restricción SpeI y KpnI y se comprobó que la ligación de la secuencia codificante para el sgRNA para DNMT3a se llevó a cabo de la manera correcta, por lo que el plásmido es competente para la transactivación del gen debido a que posee los arreglos necesarios para codificar el ARN guía y la proteína Cas asociada al dominio VP16.

La secuenciación de ADN es un procedimiento destinado para determinar la secuencia de nucleótidos en una cadena de ADN, en la actualidad se realiza de forma automatizada mediante la adición de cuatro fluoróforos a la muestra, uno para cada base nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina), como resultado de la secuenciación se obtiene un diagrama denominado electroferograma que muestra la secuencia de acuerdo a la fluorescencia detectada a diferentes puntos de la cadena, con el electroferograma obtenido (figura 15) se determinó que el ARN guía hibrida con una secuencia de 19 pb que se encuentra en el primer exón del gen DNMT3a, por lo que, al reclutarse la proteína dCas9-KRAB es posible lograr una inhibición de la expresión del gen a nivel de la fase de elongación de la transcripción (14).

Durante la cotransfección del vector pHR-SFFV-dCas9-BFP-KRAB y la fracción delimitada por los sitios de restricción SpeI y KpnI del vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a en un cultivo celular de Glía de Müller se observó que la confluencia celular de dicho cultivo disminuyó (figura 16), esto es atribuible a los efectos citotóxicos causados por la lipofectamina, que es un agente químico de lipofección que forma complejos con moléculas de ácidos nucleicos, en este caso vectores no virales, mediante interacciones electrostáticas y posteriormente ingresan a la célula mediante el proceso de endocitosis; por lo cual un aumento en la concentración de lipofectamina induce muerte celular (68).

Así mismo se observaron cambios en la morfología de las células de Müller posteriores a la transfección, esto puede indicar que la inhibición de la enzima DNMT3a induce la reactivación de genes silenciados (25), entre ellos genes asociados a pluripotencialidad, con lo cual la célula pierde características propias de su estirpe celular (como la conformación radial) y adopta formas y características nuevas (78).

Mediante PCR punto final se identificaron cambios en la expresión del gen DNMT3a, a las 24 horas post-transfección (hpt) la expresión disminuyó alrededor de un 97%, sin embargo, a las 48 hpt la expresión volvía a ser visible en el gel de electroforesis, esto se debe a que los vectores no virales (plásmidos transfectados) presentan una expresión transitoria en células eucariotas, debido a que no se integran al genoma celular (79), además de que el uso de lipofectamina como transportador de ADN hacia el interior de la célula tiene una eficiencia solamente del 50% al 90% (68), por lo que un porcentaje de las células pudieron no transfectarse y por la alta sensibilidad de la técnica de PCR, es posible detectar la expresión del gen en éstas células no transformadas o que expulsaron el plásmido (80).

También, si la densidad celular o confluencia del cultivo es muy baja, la transfección puede ser escasa, por lo cual solamente algunas células expresaran el sistema

CRISPR/dCas9-KRAB de inhibición para DNMT3a y otras no, lo que conduce a una expresión parcial del gen en el cultivo, por lo que se recomienda el uso de cultivos celulares con una confluencia del 80 – 95% (68).

La enzima DNMT3a se encarga, junto con la DNMT3b, de establecer *de novo* la metilación. Durante el desarrollo embrionario se observa que la actividad y expresión de DNMT3b es mayor que la de su homóloga, sin embargo, la DNMT3a participa activamente en el mantenimiento de la metilación en células adultas lo que la convierte en un blanco para modificar la metilación en tejidos como la retina (81).

Se decidió identificar también la expresión del gen DNMT3b para verificar la selectividad del sistema CRISPR/dCas9-KRAB para la inhibición de DNMT3a. En las imágenes obtenidas se observa una expresión sostenida del gen DNMT3b a las 24 hpt y 48 hpt, por lo que se dice que el sistema es altamente selectivo ya que sólo inhibió a un isotipo de la enzima DNMT3. Esto se debe a que el gen DNMT3a es diferente en secuencia al gen DNMT3b, por lo que el sgRNA diseñado sólo puede hibridar con su secuencia complementaria que se encuentra en el primer exón del gen DNMT3a (17,21).

La inhibición selectiva de estas enzimas puede dar paso a la generación de nuevas técnicas para el estudio y entendimiento de la importancia de la metilación en los procesos de regeneración funcional en retina.

9. CONCLUSIONES

Se diseñó y se evaluó la capacidad del arreglo CRISPR/dCas9 generado para inhibir la expresión del gen DNMT3a a 24 hpt, corroborado mediante PCR punto final. El gen DNMT3b no se observó modificado, lo que indica una inhibición selectiva. Debido al incremento en la expresión a las 48 hpt, se concluye el sistema CRISPR/dCas9 generado permite la inhibición transitoria del gen DNMT3a y por ello es óptimo para su utilización como método de estudio.

10. PERSPECTIVAS

Con la creación del sistema CRISPR/dCas9 para inhibir la expresión de DNMT3a se pretende evaluar detalladamente la función de esta enzima, involucrada en la metilación del ADN, durante el proceso de desdiferenciación de las células de Müller en respuesta al daño en retina.

Asímismo, con los conocimientos adquiridos se diseñarán sistemas CRISPR/dCas9 para la inhibición selectiva de otras enzimas involucradas en la metilación del ADN como DNMT1, DNMT3b, TET y Gadd45.

11. REFERENCIAS

1. Allison L. Fundamental Molecular Biology. United Kingdom: Blackwell publishing; 2007.
2. Lamas M, Garfias Y. Medicina regenerativa ocular: La retina y la córnea. In: Células troncales Biología y aplicaciones en biomedicina. 1st ed. Ciudad de México: Porrúa Grupo Editorial; 2017. p. 163–91.
3. Tortora G, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. 11th ed. Editorial Médica Panamericana; 2006. 588-589 p.
4. Prasad S, Galetta SL. Anatomy and physiology of the afferent visual system. Handb Clin Neurol. 2011;102:3–19.
5. Tropepe V, Coles B, Chiasson B, Horsford J, Elia A, McInnes R, et al. Retinal

- Stem Cells in the adult Mammalian Eye. *Science* (80-). 2000;287:2032–6.
6. Das A V., Mallya KB, Zhao X, Ahmad F, Bhattacharya S, Thoreson WB, et al. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: Regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol.* 2006;299(1):283–302.
 7. Chohan A, Singh U, Kumar A, Kaur J. Müller stem cell dependent retinal regeneration. *Clin Chim Acta.* 2017;464:160–4.
 8. Geiman T, Robertson K. Chromatin remodeling, histone modifications and DNA methylation - How does it all fit together? *J Cell Biochem.* 2002;87:117–25.
 9. Meissner A, Walter J. *Epigenetic Mechanisms in Cellular Reprogramming.* Alemania: Springer Berlin Heidelberg; 2015. 79-84 p.
 10. Carlberg C, Molnár F. *Mechanisms of Gene Regulation.* 2nd ed. Finlandia: Springer Nature; 2016.
 11. Quintero H, Gómez-Montalvo AI, Lamas M. MicroRNA changes through Müller glia dedifferentiation and early/late rod photoreceptor differentiation. *Neuroscience.* 2016;316:109–21.
 12. García R, Ayala P, Perdomo SP. Epigenética: Definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev Ciencias la Salud.* 2012;10(1):59–71.
 13. Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, et al. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* 2002;16(14):1779–91.
 14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular biology of the cell.* 6th ed. EUA: Garland Science; 2015. 299-312 p.
 15. Rodríguez M, Téllez N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Investig clínica.* 2004;56(1):56–71.
 16. Jeltsch A, Jurkowska RZ. DNA methyltransferases - Role and function. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Suiza: Springer International

Publishing Switzerland; 2016.

17. Manzo M, Wirz J, Ambrosi C, Villaseñor R, Roschitzki B, Baubec T. Isoform-specific localization of DNMT3A regulates DNA methylation fidelity at bivalent CpG islands. *EMBO J.* 2017;36(23):3421–34.
18. Juvenal G. Epigenética: Vieja palabra, nuevos conceptos. *Rev Argent Endocrinol Metab.* 2014;51:66–74.
19. Lyko F. The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet.* 2018;19(2):81–92.
20. Pósfai J, Bhagwat A, Pósfai G, Roberts R. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2421–35.
21. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene.* 1999;236(1):87–95.
22. Bostick M, Jong KK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science.* 2007;317:1760–4.
23. Rinaldi L, Datta D, Serrat J, Morey L, Solanas G, Avgustinova A, et al. Dnmt3a and Dnmt3b Associate with Enhancers to Regulate Human Epidermal Stem Cell Homeostasis. *Cell Stem Cell.* 2016;19(4):491–501.
24. Leoni C, Montagner S, Rinaldi A, Bertoni F, Polletti S, Balestrieri C, et al. Dnmt3a restrains mast cell inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(8):E1490–9.
25. Yoo J, Choi S, Medina-Franco JL. Molecular Modeling Studies of the Novel Inhibitors of DNA Methyltransferases SGI-1027 and CBC12: Implications for the Mechanism of Inhibition of DNMTs. *PLoS One.* 2013;8(4):1–13.
26. Reyes-Aguirre LI, Lamas M. Oct4 methylation-mediated silencing as an epigenetic barrier preventing Müller Glia dedifferentiation in a murine model of retinal injury. *Front Neurosci.* 2016;10:1–13.
27. Franco I, Ortiz L, Roque B, Ramírez GB, Lamas M. Pharmacological inhibition of DNA methyltransferase 1 promotes neural differentiation from rodent and

- human nasal olfactory stem/progenitor cell cultures. *Int J Dev Neurosci*. 2017;58:65–73.
28. Trejo Groba RA. Evaluación de la proliferación celular retiniana inducida por la modificación en la metilación del DNA en un modelo murino de daño in vivo. Tesis de maestría. CINVESTAV; 2018.
 29. Golubov A. CRISPR: Bacteria Immune System. In: *Genome Stability*. EUA: Elsevier Inc; 2016. p. 87–98.
 30. Han W, She Q. CRISPR History: Discovery, Characterization, and Prosperity. Vol. 152, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2017. 95-114 p.
 31. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468:67–71.
 32. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Dusko Ehrlich S. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(8):2551–61.
 33. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*. 2014;54(2):234–44.
 34. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015;117:119–28.
 35. Barrangou R, Van Der Oost J. CRISPR-Cas Systems. *RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea*. New York: Springer; 2013. 145-219 p.
 36. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467–77.
 37. Briner AE, Barrangou R. Guide RNAs: A glimpse at the sequences that drive crispr–cas systems. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(7):594–600.
 38. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annu*

- Rev Genet. 2011;45(1):273–97.
39. Katrekar D, Hu M, Mali P. Advances in CRISPR-Cas based genome engineering. *Curr Opin Biomed Eng.* 2017;1:78–86.
 40. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262–78.
 41. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, et al. Exploiting CRISPR-cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1146–50.
 42. Schmidt F, Platt RJ. Applications of CRISPR-Cas for synthetic biology and genetic recording. *Curr Opin Syst Biol.* 2017;5:9–15.
 43. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release.* 2017;266:17–26.
 44. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-).* 2014;346(6213).
 45. Du D, Qi LS. CRISPR technology for genome activation and repression in mammalian cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(1):40–50.
 46. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(1):5–15.
 47. Dong X, Jin Y, Ming D, Li B, Dong H, Wang L, et al. CRISPR/dCas9-mediated inhibition of gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods.* 2017;139:79–86.
 48. Tian P, Wang J, Shen X, Rey JF, Yuan Q, Yan Y. Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synth Syst Biotechnol.* 2017;2:219–25.
 49. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman JG, Smith J, et al. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons; 1998. 1.5.1-1.5.17.
 50. De la Rosa M, Prieto J, Navarro JM. *Microbiología en ciencias de la salud:*

- conceptos y aplicaciones. 3rd ed. España: Elsevier; 2011. 24-26 p.
51. Puerta C, Urueña C. Prácticas de biología molecular. España: Editorial Pontificia Universidad Javeriana; 2005. 31-38 p.
 52. Jiménez A, Guerrero R. Genética molecular bacteriana. España: Reverté S.A.; 1982. 294-296 p.
 53. Baudet LS. Mecanismos moleculares de la tolerancia central. Universidad Autónoma de Barcelona; 2007.
 54. Bellefroid EJ, Poncelet DA, Lecocq PJ, Revelant O, Martial JA, Rutter WJ. The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins (DNA-binding proteins/sequence conservation/ceil differentiation). *Biochemistry*. 1991;88:3608–12.
 55. Gong J, Tang D, Leong KW. CRISPR/dCas9-mediated cell differentiation. *Curr Opin Biomed Eng*. 2018;7:9–15.
 56. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442–51.
 57. Hirai H, Tani T, Kikyo N. Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. *Int J Dev Biol*. 2010;54:1589–96.
 58. Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev*. 1988;2(6):718–29.
 59. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*. 2013;23:1163–71.
 60. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557–80.
 61. Serrano Y. Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Rev CENIC Ciencias biológicas*. 2013;44(2):23–8.
 62. Rodríguez-Angeles MG. Principales características y diagnóstico de los

- grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex.* 2002;44(5):464–75.
63. Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning Volumen 1*. 3rd ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
 64. Sigh J, Lindenstrøm T, Buchmann K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2004;17(1):75–86.
 65. Ramírez M, Hernández-Montoya J, Sánchez-Serrano SL, Ordaz B, Ferraro S, Quintero H, et al. GABA-mediated induction of early neuronal markers expression in postnatal rat progenitor cells in culture. *Neuroscience.* 2012;224:210–22.
 66. Reyes-Aguirre LI, Ferraro S, Quintero H, Sánchez-Serrano SL, Gómez-Montalvo A, Lamas M. Glutamate-induced epigenetic and morphological changes allow rat Müller cell dedifferentiation but not further acquisition of a photoreceptor phenotype. *Neuroscience.* 2013;254:347–60.
 67. Masotti A, Mossa G, Cametti C, Ortaggi G, Bianco A, Grosso N Del, et al. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2009;68:136–44.
 68. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 2004;33:95–103.
 69. Vad-Nielsen J, Lin L, Bolund L, Nielsen AL, Luo Y. Golden Gate Assembly of CRISPR gRNA expression array for simultaneously targeting multiple genes. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:4315–25.
 70. Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci.* 2010;13(4):423–30.
 71. Zheng Y, Shen W, Zhang J, Yang B, Liu YN, Qi H, et al. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain. *Nat Neurosci.*

- 2018;21(3):447–54.
72. López T, Silva D, López S, Arias C. RNA de interferencia: el silencio de los genes. *Biotecnología*. 2007;14:109–18.
 73. Noriega D, Valencia A, Villegas B. ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga. *UDCA Act Div Cient*. 2016;4(191):25–35.
 74. Morgens DW, Deans RM, Li A, Bassik MC. Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes. *Nat Biotechnol*. 2016;34(6):634–6.
 75. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Gary P, Schreckenberger P, et al. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. 6th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006. 562-564 p.
 76. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007. 263-266 p.
 77. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;2(5):70–8.
 78. Rajavelu A, Tulyasheva Z, Jaiswal R, Jeltsch A, Kuhnert N. The inhibition of the mammalian DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by dietary black tea and coffee polyphenols. *BMC Biochem*. 2011;12(1):1–8.
 79. Jo J ichiro, Tabata Y. Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68(1):90–104.
 80. Castro FO, Portelles Y. Transfección De ADN a Células De Mamíferos. Vol. 14, *Biotecnología Aplicada*. 1997. p. 149–61.
 81. Gagliardi M, Strazzullo M, Matarazzo MR. DNMT3B Functions: Novel Insights From Human Disease. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;6:1–9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2018.00140>