



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza



**Detección del plásmido '*pIRES-hrGFP-1a*' a las 24 horas en cerebro de ratones
administrado por vía oftálmica**

T E S I S

Para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Guerra Muñiz José de Jesús

Director: Dr. Emiliano Tesoro Cruz

Asesor: Dr. Martha Asunción Sánchez Rodríguez

Índice

Resumen	3
Introducción	4
Fundamentación teórica	5
Justificación	26
Planteamiento del problema	26
Pregunta de investigación	26
Hipótesis	26
Objetivo general	27
Objetivos específicos.....	27
Diseño experimental.....	28
Materiales y métodos	29
Diseño estadístico	41
Diagrama de flujo	41
Resultados.....	43
Discusión de resultados	55
Conclusión.....	59
Índice de Cuadros	60
Referencias	61
Anexos.....	66

Resumen

Detección del plásmido '*pIRES-hrGFP-1a*' a las 24 horas en cerebro de ratones administrado por vía oftálmica

Objetivo

Identificar al *pIRES-hrGFP-1a* y la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) desde el ojo al cerebro de ratones 24 horas después de ser administrado oftálmicamente.

Materiales y métodos

Se utilizaron 27 ratones hembra-Balb/c los cuales se dividieron en seis grupos, 3 de 6 y 3 de 3, los primeros fungieron como experimentales (E1, E2 y E3), los siguientes como control (C1, C2 y C3). Los experimentales recibieron vía oftálmica 25µg del *pIRES-hrGFP-1a* en 5µL de PBS y los controles 5µL de PBS; 24 horas después se sacrificaron y se extrajeron los ojos, nervio óptico y cerebro. Los grupos E1 y C1, fueron utilizados para cortes histológicos e inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP. Los cerebros de los grupos E2 y C2 se seccionaron en: bulbos olfatorios, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdala, cerebelo y tallo; posteriormente, se extrajo el ARN y se realizó RT-PCR. Los grupos E3 y C3 fueron igualmente seccionados y se les extrajo el ADN para realizar PCR.

Resultados

Se detectó la fluorescencia de la GFP en observaciones en directo e inmunohistoquímica en diferentes regiones cerebrales. La expresión de la GFP fue identificada en nervio óptico, bulbos olfatorios, corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo, amígdala, cerebelo y tallo mediante la extracción de ARN. Mientras que se logró identificar al plásmido mediante la extracción de ADN en el nervio óptico, bulbo olfatorio, amígdala, cerebelo y tallo.

Conclusión

El *pIRES-hrGFP-1a* puede funcionar como un transportador de genes, así mismo, el ojo resultó ser una excelente vía de entrada hacia el cerebro, lo cual permite el desarrollo de nuevos estudios de terapia génica para enfermedades que involucran estos órganos.

Introducción

La investigación en la administración de fármacos oculares se ha mantenido como una de las más importantes tareas para los científicos. A pesar de numerosos esfuerzos, la entrega eficiente de fármacos oculares sigue siendo un enorme desafío para los farmacéuticos. La mayoría de las enfermedades oculares se tratan mediante aplicación tópica del fármaco en forma de soluciones, suspensiones y pomadas. Estas formas de dosificación convencionales sufren problemas de biodisponibilidad ocular, a causa de distintas barreras anatómicas y fisiopatológicas que prevalecen en el ojo. Se ha estimado que típicamente menos de 5% de un medicamento de aplicación tópica llega a los tejidos intraoculares.

El ojo y el cerebro son tejidos que manifiestan Inmunoprivilegio (IP) en la que la respuesta inmune a antígenos extraños se suprime o se inhibe completamente. Investigación biológica molecular moderna ha producido cada vez más prometedoras posibilidades terapéuticas génicas para el tratamiento médico. El ojo es un blanco atractivo para las estrategias de terapia génica, debido a su accesibilidad y las características de inmuno privilegio. Esta última propiedad es ideal para la terapia génica local ya que se espera que las reacciones inflamatorias e inmunes hacia el vector de genes no sea un inconveniente importante. Debido a su pequeño tamaño relativo, el tratamiento efectivo de los tejidos oculares requiere concentraciones menores del vector, mientras que la difusión en la circulación es limitada en el ojo. Muchas enfermedades oculares y del SNC son crónicas y progresivas, por lo que necesitan una estrategia terapéutica a largo plazo. Al respecto, la ingeniería genética da posibles sistemas de suministro de fármacos con un enfoque sólido para el tratamiento de las enfermedades oculares y/o del SNC. El método ideal de la terapia génica debe suministrar genes altamente eficientes, los cuales deben de alcanzar efectivamente su célula diana. Estudiar la ruta que sigue nuestro plásmido *pIRES-hrGFP-1a*, así como identificar los lugares en donde se encuentra por medio de la búsqueda de su material genético o la expresión de su proteína verde fluorescente (GFP) desde el ojo hasta el cerebro de ratones nos abre la posibilidad de conocer cómo funciona esta construcción como un vector genómico no viral.

Fundamentación teórica

Anatomía: Estructura y función del ojo

Un requisito fundamental para conocer la ruta que sigue el plásmido al cerebro es disponer de un conocimiento de la anatomía del ojo, capas del globo ocular, vías visuales, nervios oftálmicos y craneales.

Los globos oculares están ubicados en las orbitas –cavidades óseas de la parte frontal del cráneo- y constituyen unas estructuras complejas con diferentes funciones. El ojo humano es un órgano sensorial altamente especializado. Contiene numerosas estructuras accesorias que modifican los estímulos visuales antes de que sean captados por las células receptoras visuales ^[1].

Capas del globo ocular (figura 1)

En un corte lateral del globo ocular se distinguen tres capas: una túnica externa más resistente que las otras, formada por colágena donde se localiza hacia adelante la **córnea**, la cual se prolonga hacia atrás con la **esclerótica**, que rodea y protege el globo ocular hasta la salida del nervio óptico; una túnica media, fundamentalmente vascular que en general se conoce como **úvea** y que por delante constituye el **iris**, en su parte intermedia el **cuerpo ciliar**, y hacia atrás, en contacto con la retina, las **coroides**; y una túnica interna sensorial, que forma la **retina** ^[2].

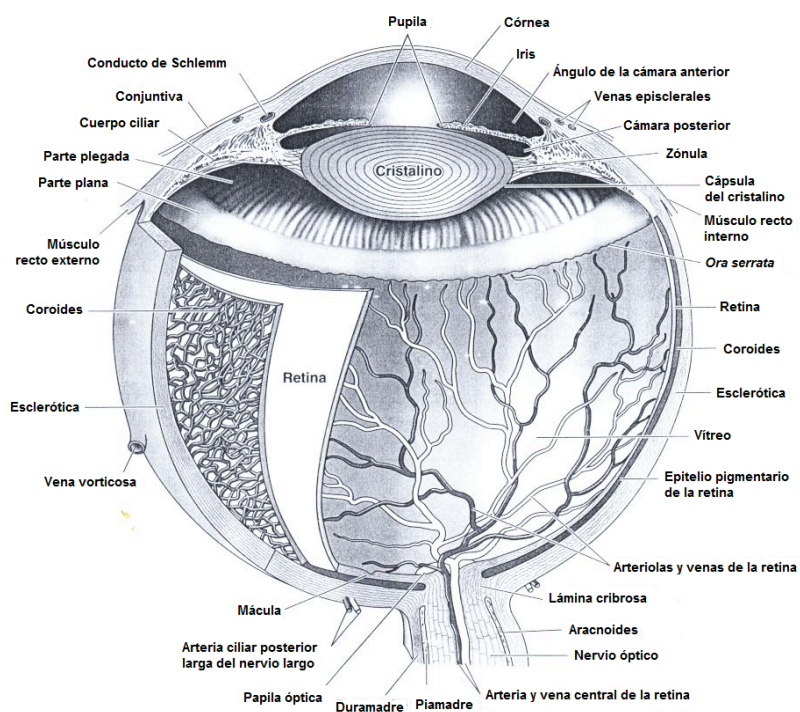


Figura 1: Estructuras internas del ojo. Modificada de Riodan, 2009.

Contenido del globo ocular (figura 2)

Una vez analizadas las capas del globo ocular: córnea y esclerótica; coroides, cuerpo ciliar e iris; y retina, queda por estudiar el contenido del mismo. Para su mejor entendimiento debe dividirse en tres áreas: la cámara anterior, que comprende el espacio entre la córnea y el iris; la cámara posterior, un espacio reducido entre la cara posterior del iris y la cámara anterior del vítreo, y la cámara vítrea, que comprende el espacio entre la cara posterior del cristalino y la retina.

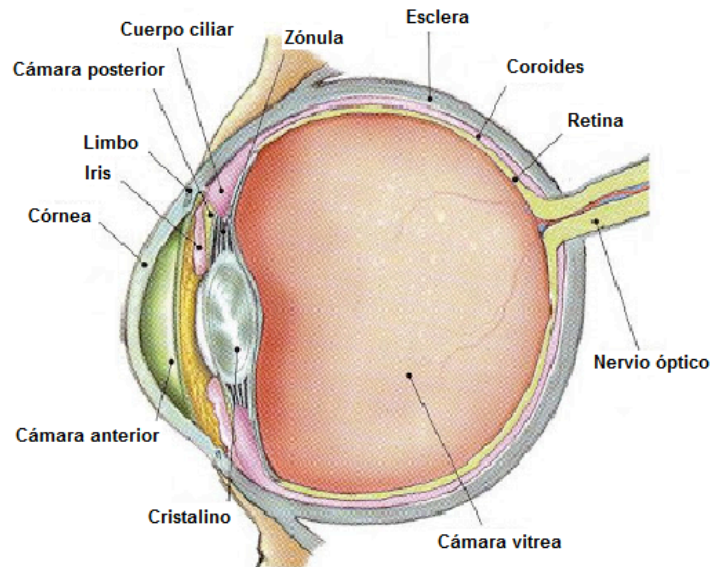


Figura 2: Estructura del globo ocular. Modificada de Peña, 2012 [Internet].

Cámara anterior

Éste es un espacio lleno de humor acuoso producto de la actividad secretora del cuerpo ciliar. La cámara anterior mide de 3 a 4 mm en su porción central (en el eje de la pupila) y tiende a estrecharse hacia la periferia, donde forma un ángulo agudo. En el vértice está el mecanismo de filtración del humor acuoso, la malla trabecular, el conducto de Schlemm y los túbulos colectores.

Cámara posterior

Ésta se comunica con la cámara anterior a través de la pupila y por ella fluye el humor acuoso producido en el cuerpo ciliar. La cámara posterior está ocupada por humor acuoso y por el cristalino.

Cámara vítrea

Ocupa las dos terceras partes del contenido ocular, desde la cara posterior del cristalino hasta la retina, oro serrata y pars plana. El contenido de la cámara vítrea es el humor vítreo, un gel con un volumen cercano a 4 mL, transparente y que contiene agua en 98%; tiene además colágena, proteínas, ácido hialurónico, mucopolisacáridos y solutos. Hacia la periferia y en contacto con la retina hay una condensación de sus fibras colágenas que forman una seudomembrana o hialoides que se adhiere a la retina. Los sitios de adherencia de la hialoides son múltiples, pero los más importantes son la oro serrata (base del vítreo) y el polo posterior. Cuando la hialoides se desprende de sus adherencias en ocasiones suele producirse desgarros en la retina, que a su vez pueden ser el inicio de un desprendimiento retiniano ^[2].

Humor acuoso

El humor acuoso es un medio a través del cual el cuerpo proporciona alimento y elimina los desechos del segmento anterior del ojo; dado que la córnea y el retículo trabecular no tienen riego sanguíneo, necesitan un sistema de circulación alternativo. El humor acuoso se produce en el cuerpo ciliar, circula por la cámara posterior, pasa a través de la pupila a la cámara anterior y posteriormente sale del ojo a través del retículo trabecular y de vías no convencionales ^[4].

El humor acuoso es un líquido claro que llena las cámaras anterior y posterior del ojo. Su volumen es alrededor de 250 μL y su velocidad de producción que presenta variaciones diurnas, es casi de 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ^[5]. El humor acuoso procede del plasma y su diferencia principal es que está casi totalmente desprovisto de proteínas y contiene concentraciones mucho más altas de ascorbato, piruvato, así como lactato y valores más bajos de urea y glucosa; además, comparado con el plasma, es ligeramente ácido e hipertónico ^[4].

Humor vítreo

El humor vítreo es un cuerpo gelatinoso, claro, avascular, que constituye dos terceras partes del volumen y del peso del ojo. Llena el espacio limitado por cristalino, retina y papila óptica. El humor vítreo contiene cerca de 99% de agua. El resto del porcentaje incluye dos componentes, colágeno y ácido hialurónico, que le brindan la forma y consistencia vítrea similar a un gel, debido a su capacidad de fijar volúmenes grandes de agua ^[5].

Nervio óptico

El tronco del nervio óptico se constituye por cerca de un millón de axones que se originan en las células ganglionares de la retina (capa de fibras nerviosas). El nervio óptico emerge de la superficie posterior del globo, a través del agujero esclerótico posterior, el cual es una abertura circular corta en la esclerótica. Las fibras nerviosas se mielinizan al salir del ojo, por tanto aumentan en diámetro de 1.5 mm (dentro de la esclerótica) a 3 mm (dentro de la órbita) ^[5]. Los cuerpos celulares de los axones se encuentran en la capa de células ganglionares de la retina y la sinapsis de los axones en el cuerpo geniculado lateral. El transporte axoplasmático lleva los materiales necesarios para el funcionamiento axonal del cuerpo de las células ganglionares a la sinapsis en el cuerpo geniculado lateral (transporte ortógrado) y devuelven los materiales al cuerpo de las células ganglionares (transporte retrógrado). La papila óptica además de axones, contiene glía, un esqueleto de colágeno y vasos sanguíneos ^[4].

Vía óptica (figura 3)

El nervio óptico está formado por los axones de las células ganglionares; más que un nervio es un fascículo de axones que lleva la información al sistema nervioso central (SNC). Una vez que abandona el globo ocular está cubierto en su trayecto orbitario por una vaina de mielina. En su ingreso a la órbita se recubre de meninges y con ellas atraviesa el canal óseo; esto implica su contacto con el líquido cefalorraquídeo. Al salir del agujero óptico se dirige posterior y temporalmente para alcanzar el quiasma óptico.

El quiasma es el sitio de entrecruzamiento de los nervios ópticos. Las cintillas ópticas salen del quiasma óptico con la información procedente de un hemisferio para seguir su trayectoria hacia el cuerpo geniculado lateral, donde hacen sinapsis. Hasta allí siguen corriendo los axones de las células ganglionares retinianas. En su trayecto las acompañan fibras pupilomotoras que abandonan las cintillas antes de su sinapsis en el cuerpo geniculado lateral. Las fibras pupilomotoras van a los núcleos pretectales. En el cuerpo geniculado lateral hacen sinapsis las cintillas ópticas. Se condensan y organizan por sectores para salir en forma de radiaciones ópticas hacia la corteza occipital ^[2].

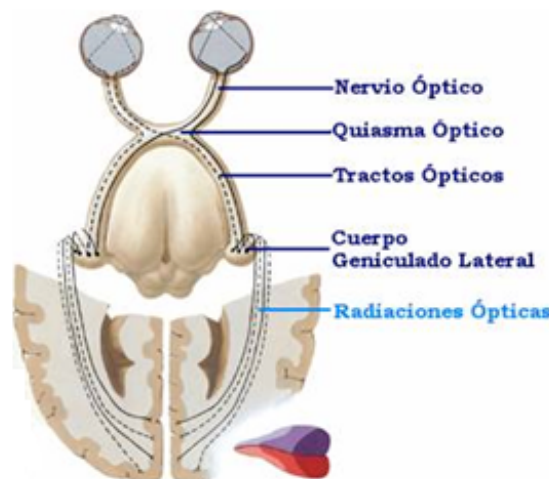


Figura 3: Vía óptica. Modificada de Facultad de Medicina Universidad de la Frontera [Internet].

El cerebro

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal ^[7]. El encéfalo del hombre adulto tiene un peso medio de 1300g rodeado por las meninges, ocupa la caja craneana ósea. Su superficie inferior o base encefálica, descansa sobre la superficie ósea de la base del cráneo, en tanto que la superficie superior, convexa, de los llamados hemisferios cerebrales se aplica a la bóveda craneana ^[8].

El cerebro, que es la única estructura del telencéfalo, es la porción de mayor tamaño del encéfalo (alrededor de 80% de su masa), y es la principal región del encéfalo que se encarga de las funciones mentales superiores. El cerebro consta de hemisferios derecho e izquierdo, conectados internamente por un tracto de fibras grandes llamado cuerpo calloso.

El cuerpo calloso es el principal tracto de axones que interconecta funcionalmente los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo ^[9]. Tres formaciones integran el cerebro: corteza cerebral (= sustancia gris), sustancia blanca y núcleos de la sustancia blanca (núcleos basales = ganglios basales, cuerpo amigdalino, claustró) ^[10]. Desde el punto de vista embriológico se distinguen las siguientes regiones encefálicas:

- El rombencéfalo con el bulbo raquídeo (*medulla oblongata*), el puente (*pons*) y el cerebelo (*cerebellum*) que, a veces, se incluye en esta región.
- El mesencéfalo (encéfalo medio); y
- El prosencéfalo (encéfalo anterior) con el diencéfalo (cerebro medio) y el telencéfalo (cerebro anterior).

De estas regiones encefálicas, el bulbo, el puente y el mesencéfalo se reúnen bajo la denominación de tallo encefálico (tronco encefálico). Se hallan en estrecha relación funcional entre sí y constituye el punto de partida de los nervios craneanos ^[8].

El telencéfalo (cerebro terminal), dan origen a los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo. Los dos hemisferios forman la porción más grande del encéfalo ^[11]. Los hemisferios consisten en una corteza cerebral externa, compuesta de 2 a 4 mm de sustancia gris y sustancia blanca subyacente. La corteza cerebral se caracteriza por muchos pliegues y surcos llamados convoluciones, los pliegues elevados de las convoluciones se llaman circunvoluciones, y las ranuras deprimidas son los surcos. Cada hemisferio cerebral está subdividido por los surcos profundos, o cisuras, hacia cinco lóbulos, cuatro de los cuales son visibles desde la superficie. Estos lóbulos son el frontal, parietal, temporal y occipital, que son visibles desde la superficie, y la ínsula que se encuentra en planos profundos, cubierta por porciones de los lóbulos frontal, parietal y temporal ^[9].

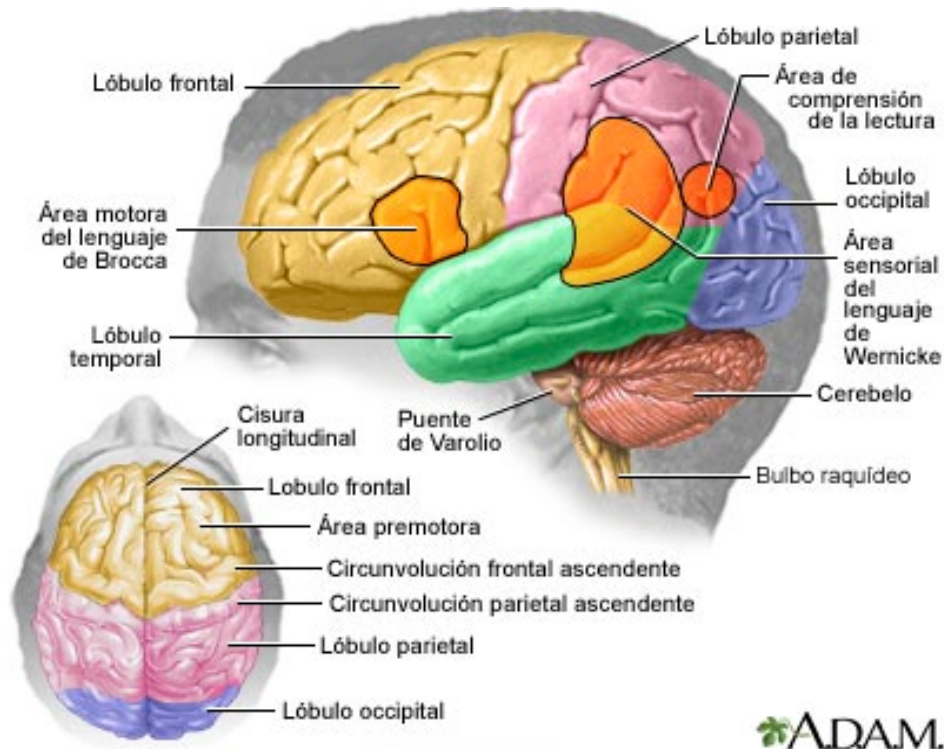


Figura 4: Regiones cerebrales. Tomada de Dugdale, 2012 [Internet]

El lóbulo frontal es la porción anterior de cada hemisferio cerebral. Una cisura profunda, llamada el surco central, separa el lóbulo frontal del lóbulo parietal. La circunvolución precentral, involucrada en el control motor, está ubicada en el lóbulo frontal justo enfrente del surco central. Los cuerpos celulares de las interneuronas localizadas aquí se llaman neuronas motoras superiores debido a su papel en la regulación muscular. La circunvolución poscentral, localizada justo detrás del surco central en el lóbulo parietal, es el área primaria de la corteza de la cual depende la percepción de la sensación somatoestésica, sensación que surge a partir de receptores cutáneos, musculares, tendinosos y articulares ^[9].

Inmunología del cerebro

El SNC en condiciones normales, los anticuerpos no pueden atravesar la barrera hemato-encefálica (BHE). Las células mononucleares (linfocitos T, T_H0 -memoria = $T_{\text{memoria central}}$ = linfocitos $T_{\text{efectores}}$ (TMC), T_H1/T_H2 , monocitos activados) que migran al encéfalo desde la sangre tienen en el encéfalo una sobrevivencia breve. Los TMC llegan al plexo coroideo a través de la corioidea anterior, allí se dirigen al estroma desde las vénulas poscapilares y pasan a través de las uniones estrechas del epéndimo. Desde el espacio del líquido cefalorraquídeo ejecutan el control inmunológico del SNC. Toda lesión del SNC activa las células inmunitarias presentes en esos órganos (p. ej., microglía, astrocitos, células endoteliales).

En virtud de esto se arriba a un aumento (regulación en más) del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH; sigla en inglés: MHC) y de complejos de coestimulación, que producen la liberación de citocinas y quimiocinas. Estas moléculas aumentan la permeabilidad para las células mononucleares (monocitos, linfocitos, células dendríticas). Las células de la microglía impulsan el proceso de la inflamación y, en cambio, las células dendríticas son esenciales como presentadoras de antígenos para los linfocitos T.

La activación de los linfocitos T_H0 conduce a su diferenciación a linfocitos T_H1 y T_H2 . Los linfocitos T_H1 estimulan a los astrocitos, la microglía y los macrófagos que producen citocinas y citotoxinas proinflamatorias (peróxido de hidrogeno, óxido nítrico, $TNF\alpha$, IL-1, IL-6). Los linfocitos T_H2 controlan la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Los anticuerpos citotóxicos de los linfocitos B pueden liberar otros antígenos que refuerzan la reacción inmunitaria. Además, en el proceso inflamatorio ingresan al SNC granulocitos y macrófagos. Al mismo tiempo, los antígenos provenientes de la lesión del SNC llegan a compartimientos periféricos inmunocompetentes. Las células dendríticas de los ganglios linfáticos presentan estos antígenos, ligados al MHC clase I y clase II, a los linfocitos T_H1 y T_H2 . Además se produce la activación y la expansión clónica de linfocitos B. Los linfocitos B activados pueden atravesar la BHE e invadir los espacios perivacuulares y leptomenigeos. Debido a estas razones, la reacción inmunológica del SNC constituye una interacción intensiva del sistema inmune del cuerpo con las células del SNC ^[10].

Inmunología ocular

El ojo es uno de los órganos sensoriales más especializados del cuerpo. La naturaleza lo ha dotado de protección ósea y anatómica y de reflejos fisiológicos. Existen procesos inmunitarios, así como sistemas bioquímicos y enzimáticos, que protegen a los ojos de la inflamación ^[13]. El ojo es un sitio Inmuno Privilegiado (IP) que se ha adaptado para mantener la vía visual, mientras que al mismo tiempo proporcionan una defensa contra organismos invasores. El ojo hace esto mediante la selección de las respuestas inmunes que funcionan en la ausencia de inflamación ^[14].

La superficie ocular está constantemente expuesta a una amplia gama de microorganismos. La capacidad del sistema ocular externa de reconocer patógenos como extrañas y eliminarlas es crítico para mantener la transparencia corneal, por lo tanto, la preservación de la vista. Por lo tanto, una combinación de mecanismos de defensa mecánica, anatómica, e inmunológicos ha evolucionado para proteger el exterior del ojo ^[15]. La inmunología de la superficie ocular es una interacción notable entre los sistemas innato y adaptativo del cuerpo inmune: una diversidad de mecanismos de defensa que actúan para evitar la colonización microbiana ^[16].

Propiedades inmunológicas del ojo

Células y tejidos

Varios tejidos oculares tales como la úvea, la córnea, la conjuntiva, y la fascia periocular, contienen ricas redes de las células inmunes naturales derivadas de médula ósea como macrófagos y células dendríticas (DC) que, junto con las células del parénquima, secretan una amplia variedad de mediadores que sustentan el IP. La retina contiene células especializadas mieloides (microglia), similar a la microglia cerebral. Además, en la parte central (alrededor del nervio óptico) y periférica (en la pars plana) bordes de la retina contiene una pequeña población de células dendríticas tipo MHC Clase II^{hi}, al igual que en la periferia de la córnea.

La córnea en la parte central tiene pocas DC's pero contiene macrófagos MHC de Clase II⁺, mientras que en la periférica células epiteliales corneales de Langerhans. La lente no contiene células mieloides, mientras que el tejido normal extravascular del ojo es desprovisto de células B o T [17].

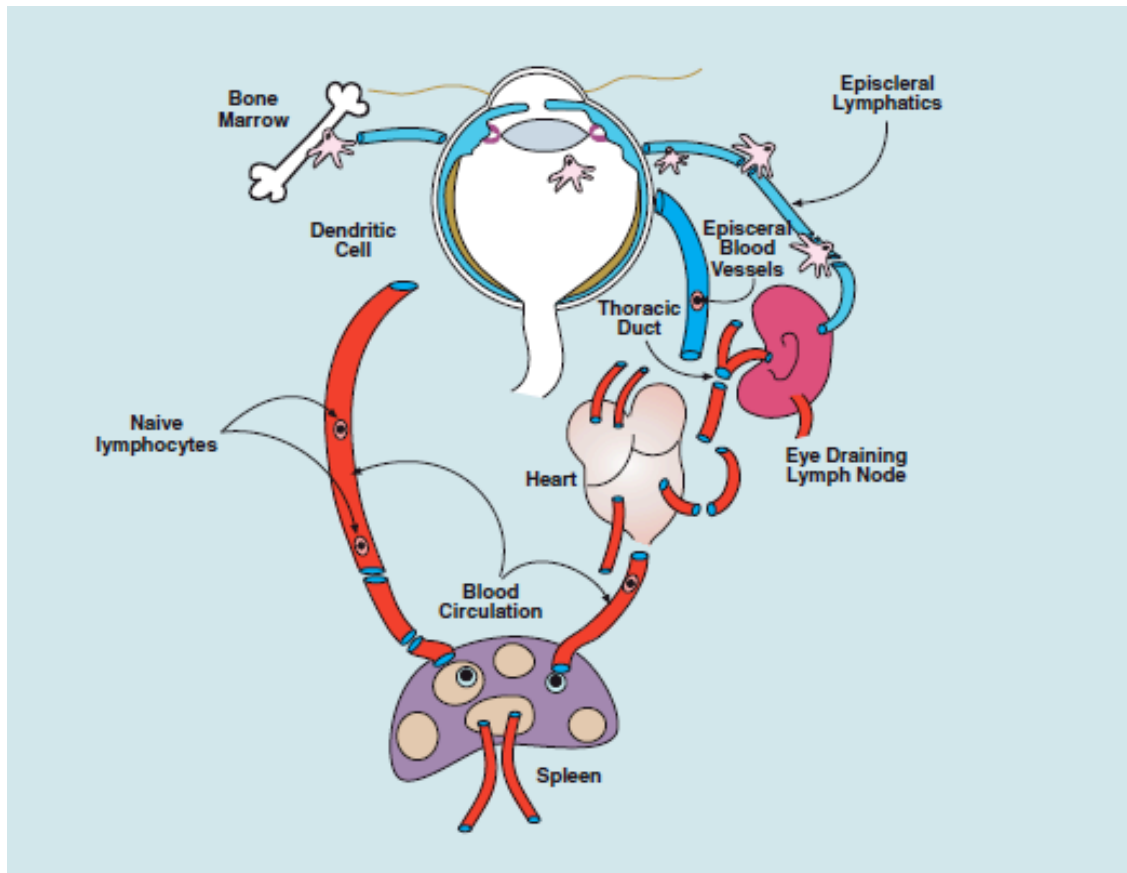


Figura 5: Circulación de las células inmunes en el ojo. Tomada de Forrester, 2012

Sistema inmune de la conjuntiva y la córnea

La conjuntiva y la córnea son de importancia crucial en la defensa de la superficie ocular ^[18]. La córnea se compone de un tejido conectivo transparente (estroma) cubiertos por epitelio en ambos lados. El estroma se sella del ambiente externo por uniones luminales y forma una barrera física contra antígenos externos. Esto se complementa con una barrera fisicoquímica derivada de la capa de mucina epitelial que protege contra la adhesión y la entrada de antígenos. La córnea central es avascular, porque los vasos sanguíneos y linfáticos terminan en la zona límbica y por lo tanto evita que un acceso de la gran mayoría de las células inmunológicamente relevantes ^[19].

El sistema inmune de la glándula lagrimal

La glándula lagrimal desempeña un papel crucial en la protección inmunológica de la superficie ocular ^[18]. Es anatómicamente continua a la conjuntiva por 10 a 12 conductos excretores lagrimales. Es una glándula túbulo-acinar con túbulos de ramificaciones cortas que terminan en los acinos secretores ^[19]. Esta glándula, sirve como la fuente predominante de anticuerpos IgAs (IgA secretora) en el lagrimeo, es el tejido efector primario en la defensa inmune secretora. Contiene un diverso conjunto de linfocitos, incluyendo a las células plasmáticas, células T, células B, células dendríticas y macrófagos. Curiosamente, la glándula también contiene una densidad extraordinariamente alta de IgA y células plasmáticas IgD-positivas, que se originan principalmente a partir de las amígdalas y adenoides, migran a través de los ganglios linfáticos cervicales y hacen de la glándula lagrimal una de las mejores fábricas para la producción de los anticuerpos IgA ^[18].

Sistema inmune de la película lagrimal

La película lagrimal es un componente importante de la defensa inmune funcional en la superficie de la mucosa ocular ^[19]. En individuos sanos, el volumen del líquido lagrimal es de unos 5-10 µL y aproximadamente el 95% es producido por las células caliciformes y las glándulas lagrimales accesorias de la conjuntiva. La película lagrimal es una estructura compleja de tres láminas que está en contacto directo con el medio ambiente y su importancia es crítica para proteger al ojo de las influencias externas. La película lagrimal precorneana consta de tres capas, y cada una de ellas cumple diferentes funciones ^[13].

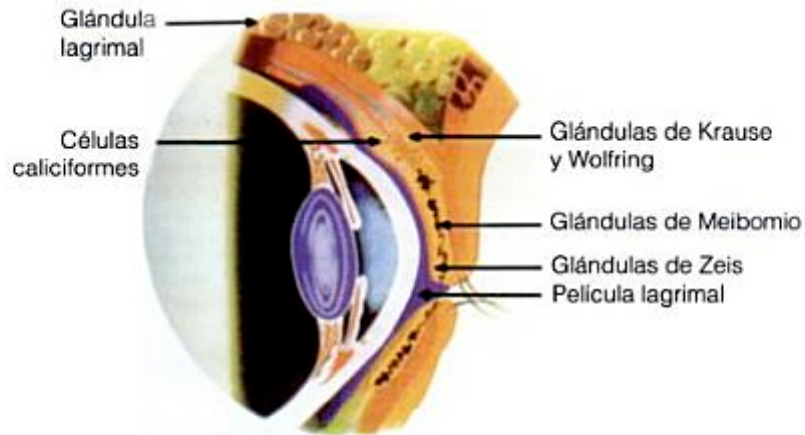


Figura 6: Película lagrimal. Tomada de Garg, 2007

La composición química de la lágrima humana es bastante compleja y contiene proteínas, lípidos, metabolitos, enzimas, electrolitos y otros elementos que juegan un papel importante en la defensa de la parte externa del ojo ^[13]. Aparte de un efecto de limpieza inducida por barrido de la superficie, que contiene los anticuerpos IgA específicos que son secretadas por la glándula lagrimal y por las superficies de las mucosas oculares. Además, hay un número cada vez mayor de péptidos y proteínas reportadas del sistema inmune. Algunos de ellos tienen un efecto directo antimicrobiano, mientras que otros (por ejemplo, quimiocinas y citocinas) reclutar y activar los leucocitos, incluidas las células linfoides ^[19].

Las proteínas de las lágrimas forman la primera línea de defensa contra las influencias externas ^[13]. Debido a la concentración relativa, tres proteínas secretadas antimicrobianas son las más importantes. La lisozima destruye la pared celular bacteriana, la lactoferrina se une al hierro, de uso específico de prealbúmina (lipocalina) actúa como un limpiador de productos bacterianos; el complemento se produce como un trasudado del suero. La angiogenina es una proteína lagrimal recién descrita que se encuentra en concentraciones elevadas en prácticamente todas las muestras de lágrimas. Parece que tiene un efecto principalmente antimicrobiano dentro de la película lagrimal ^[19].

Barreras hemato-oculares

En el ojo, así como en el SNC, existe un obstáculo para el paso sustancial de moléculas. Sin embargo, exámenes más profundos revelan que la integridad de las barreras es variable en función del tipo de vaso (arteria, capilar o vena) y su composición pericelular. Se supuso que estas barreras estarían presentes para partículas grandes, tales como células, pero es evidente que esto no podía ser así, estudios de seguimiento de células han revelado que existe una rotación constante de células derivadas de la médula ósea al cerebro y a la retina.

Las células T pueden penetrar la barrera hemato-retiniana, pero no entran de inmediato de la circulación, sino sólo después de un período de varias horas, tiempo durante el cual la vasculatura es regulada por moléculas de adhesión y otros receptores. En contraste, células mieloides frescas emigrantes de la médula ósea son capaces de cruzar esta barrera, mientras que macrófagos "activados" no. Así, aunque estas barreras parecen ser estrictamente controladas por el movimiento pasivo de las moléculas en los tejidos, el paso de las células parecen ser más selectivos y activos que involucran procesos migratorios transendoteliales ^[20]. Los compartimentos intraoculares son separados de la circulación de sangre y del sistema linfático por la barrera hemato-acuosa y la barrera sangre-retinal ^[17].

Barrera hemato-acuosa

La Barrera hemato-acuosa tiene dos componentes, uniones estrechas entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos ciliares y uniones similares entre las células del revestimiento epitelial. Las células epiteliales del cuerpo ciliar mantienen la presión intraocular mediante el bombeo de fluido que drena a través de la malla trabecular poroso de la cámara anterior hacia los vasos sanguíneos y linfáticos de la episclerótica. La propia esclerótica, como la córnea central, es avascular ^[17].

Barrera hemato-retinal

La barrera hemato-retiniana también comprende dos componentes, uniones estrechas de los vasos de la retina y del epitelio pigmentario de la retina (EPR; o por sus siglas en inglés RPE). El RPE es una capa de diferenciación terminal de las células derivadas del neuroectodermo formado embriológicamente por las células de la capa de desarrollo exterior de la taza óptica, cuya función es la de mantener la fisiología de los fotorreceptores y eliminar los productos de desecho ^[17].

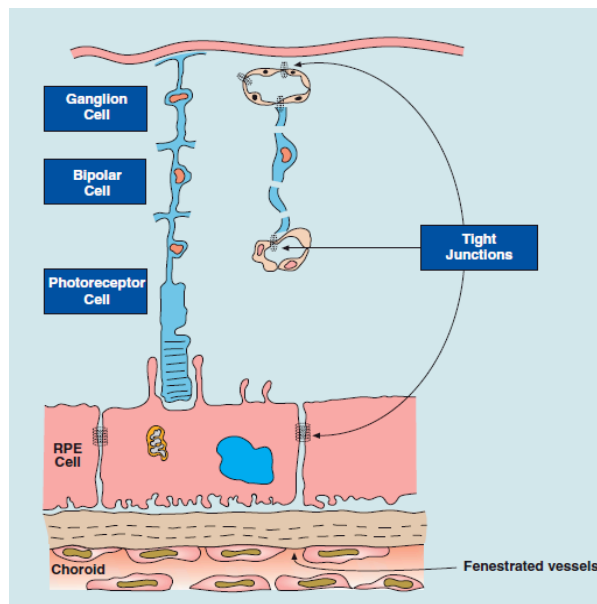


Figura 7: Barrera Hemato-retinal.
Tomado de Forrester, 2012.

Privilegio inmune en el ojo

El ojo es un sitio IP que se ha adaptado para mantener la vía visual, mientras que al mismo tiempo proporciona una defensa contra organismos invasores. El ojo hace esto mediante la selección de las respuestas inmunes que funcionan en la ausencia de inflamación^[21]. La razón de la existencia de IP ocular se cree que se refieren a la configuración especializada anatómica y molecular del eje visual por el cual las imágenes del mundo llegan a la retina. Sólo un eje mantenido con precisión visual permite que la luz llegue con precisión a la retina, lo que hace posible la visión enfocada. La inflamación, ya sea de origen inmune innato o adaptativo, amenaza la integridad del eje visual, y por lo tanto, la inflamación en el ojo debe ser evitada. Para ello, hay un consenso general entre los investigadores en este campo que el IP hace posible que el globo ocular reciba la protección inmune frente a los patógenos, evitando daños por una inflamación destructiva e intensa en el delicado eje visual del ojo^[22].

La comprensión de los mecanismos del IP que subyacen en el segmento anterior y posterior del ojo conducirá inevitablemente a enfoques innovadores y más racionales para nuevas estrategias terapéuticas^[23]. La barrera hemato-ocular no es impenetrable, y se han demostrado vasos linfáticos tanto en el ojo y como en el cerebro. Más importante aún, estudios en los últimos 30 años han indicado que los procesos activos, presididos por las propiedades del ojo (y cerebro) regulan la creación y el mantenimiento del IP. Se ha establecido firmemente que el IP en la cámara anterior del ojo depende tanto de factores inmunomoduladores solubles presentes en el microambiente ocular y de moléculas inmunomoduladoras que se expresan en la superficie de las células del parénquima ocular. Ahora también es evidente que el privilegio inmune se extiende mucho más allá de la inhibición de la respuesta inmune adaptativa. La evidencia que existe ahora permitir la conclusión de que los resultados de privilegio inmune en los sitios y tejidos es una regulación tanto de la inducción y la expresión de la respuesta inmune innata y adaptativa^[22].

Mecanismos de privilegio inmune en el ojo

Para entender la repuesta inmune de un ojo tiene que considerar los múltiples mecanismos superpuestos que contribuyen a la creación y al mantenimiento de los privilegios. En primer lugar, el ojo está lleno de factores inmunosupresores incluyendo neuropéptidos, aMSH (hormona estimulante de los melanocitos), somatostatina, péptido intestinal vasoactivo, péptido relacionado con el gen de calcitonina, citoquinas (por ejemplo TGFb-2), inhibidores del complemento, y un inhibidor de la actividad de las células NK (factor inhibidor de macrófagos).

En segundo lugar, la baja expresión de MHC de clase II en el ojo limita la presentación de antígenos. En tercer lugar, las células del estroma del iris, el cuerpo ciliar y la retina del ojo son capaces de convertir linfocitos T a linfocitos T reguladores (Treg). Además, las células del epitelio pigmentario (RPE) que recubren los bordes de los ojos son capaces de inhibir directamente a células T. En cuarto lugar, las moléculas de inducción de la muerte como PDL-1 y FasL se expresan por las células del estroma en el ojo e inducen la apoptosis de las células inmunes que transgreden los tejidos oculares ^[21].

Administración ocular

La administración de fármacos oculares se ha mantenido como una de las más desafiantes tareas para los científicos farmacéuticos. La anatomía y fisiología del ojo, hace que sea un órgano altamente protegido y su estructura única limita la entrada de moléculas de fármacos en el sitio de acción necesario ^[24, 25, 26]. La mayoría de las enfermedades oculares se tratan con la aplicación tópica de gotas para los ojos, estas formas de dosificación convencionales sufren problemas de biodisponibilidad ocular. Después de la aplicación de una gota en el ojo, típicamente menos de 5% del fármaco aplicado penetra en la córnea y llega a los tejidos intraoculares, mientras que una fracción mayor de la dosis se absorbe y entra en la circulación sistémica ^[27]. Investigación biológica molecular moderna ha producido cada vez más prometedoras posibilidades terapéuticas para el tratamiento médico. Estos incluyen, por ejemplo: factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales, métodos de genes desmontables y terapia genética ^[28].

Una comprensión fundamental de las vías de absorción, distribución y eliminación para la entrega de fármacos al segmento posterior son necesarios para los paradigmas de los tratamientos ^[24].

Absorción ocular

Cuando se administra una gota en el ojo, el humano momentáneamente puede contener un volumen 30 μL ^[27], el fármaco se mezcla con el fluido lacrimal, y el tiempo de contacto del fármaco estará en función del lagrimeo, drenaje de las lágrimas y de la rotación lagrimal, como en alguna medida en la composición de la película lagrimal ^[29]. La solución se eliminará por medio del drenaje lagrimal hasta que el volumen lagrimal vuelva a su normalidad (5-10 μL). La velocidad de lagrimeo para los ojos es de 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ en los seres humanos. Esta tasa disminuye con viscosidad y aumenta con un mayor volumen de gotas oculares.

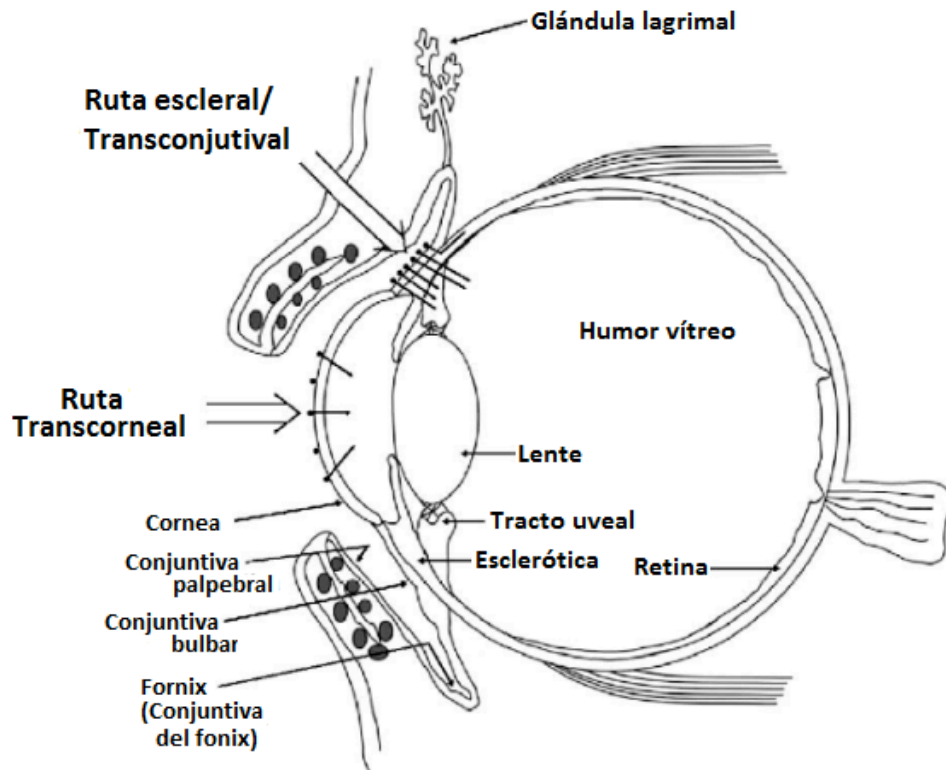


Figura 8: Vías de absorción ocular. Modificada de Hosoya, 2005.

Si el volumen de una gota en el ojo se reduce a 5-10 μL y la dosis aplicada se mantiene constante mediante el aumento de la concentración, la biodisponibilidad ocular puede ser incrementada sustancialmente y la disminución de la absorción sistémica. Se ha demostrado, usando un teorema de transporte de masa, que puede ser máximamente una mejora de cuatro veces en la biodisponibilidad ocular logrado para medicamentos de aplicación tópica con una baja permeabilidad corneal si el volumen aplicado se disminuye suficientemente ^[27].

Al aplicar el fármaco este puede ser absorbido por dos vías (figura 8):

La vía corneal (córnea $\rightarrow$ humor acuoso $\rightarrow$ tejidos intraoculares)

La vía no-corneal (conjuntiva $\rightarrow$ esclerótica $\rightarrow$ coroides/ epitelio pigmentario de la retina).

La vía preferida depende principalmente de la permeabilidad corneal de moléculas de fármaco ^[25].

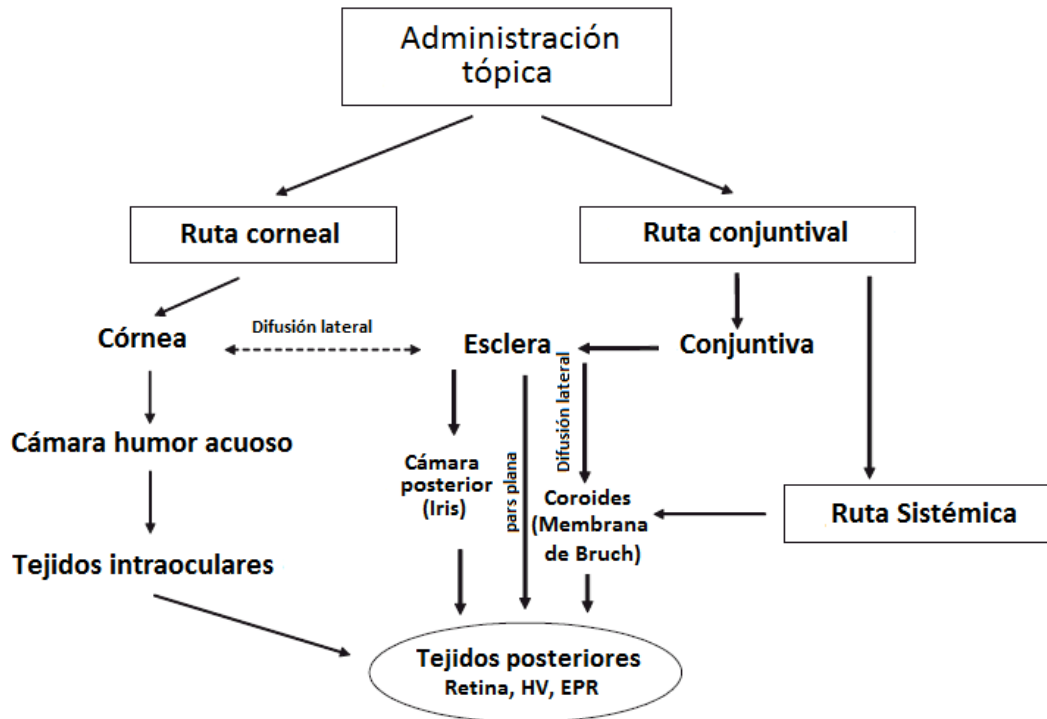


Figura 9: Caminos a través de la córnea y la conjuntiva después de la administración ocular tópica.
Modificada de Hughes, 2005.

La córnea es la principal vía de absorción del fármaco y el epitelio de la córnea es la principal barrera limitante en la absorción del fármaco ^[31]. El epitelio de la córnea representa una barrera de absorción muy fuerte para la difusión pasiva de las sustancias hidrófilas, debido a la alta expresión de uniones estrechas en la capa epitelial superficial. Para los fármacos altamente lipofílicos, el estroma es una barrera de premiación adicional debido a las características hidrófilas del estroma ^[32].

A primera vista, la esclerótica tiene un tejido relativamente uniforme compuesto de una gran cantidad de colágeno de tipo I, unas pocas fibras elásticas, y algunos fibroblastos. Los proteoglicanos, que constituyen la mayor parte del gel amorfo en el espacio interfibrilar, se ha pensado que es el principal responsable de la vía de difusión para fármacos hidrófilos. El papel del colágeno sin embargo no debe, ser pasado por alto. Estas fibras de colágeno que cruzan el ojo paralelos bajo la epiesclerótica pueden tener un espacio libre acuoso alrededor de ellos, proporcionando una vía de menor resistencia para la difusión de moléculas, en comparación con la matriz de proteoglicanos. De estas y otras observaciones, se puede ver una vía por la que los compuestos administrados por vía tópica pueden difundirse a través de la conjuntiva y la esclerótica. Desde aquí, los fármacos pueden penetrar en la raíz del iris y posteriormente en el humor acuoso de la cámara posterior ^[24].

Terapia génica

Los grandes avances en la medicina y la biología molecular en la última década han dado lugar al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas; éstos incluyen a los enfoques para tratamientos basados en genes, conocido como terapia génica^[33]. La terapia génica se refiere a la utilización de genes para tratar varias condiciones médicas. El concepto implica la transferencia de material genético en células, tejidos u órganos con el objetivo de curar una enfermedad o mejorar el estado clínico de un paciente^[34]. La transferencia de genes es la introducción de material genético exterior en las células^[35]. El objetivo central de la terapia génica es para reemplazar genes que son no funcionales o defectuosos con nuevos genes que son completamente funcionales^[34]. Un estado patológico producido por un gen defectuoso puede ser revertido por la adición de un gen funcional exógeno, sustituyendo la función errónea^[35].

La terapia génica y el ojo

El ojo es una diana atractiva para las estrategias de terapia génica debido a su accesibilidad bien definida y las características inmunes privilegiadas^[36,37]. De hecho, el ojo podría ser incluso considerado como un órgano “ideal” que proporciona ventajas^[33], como:

- Que es fácilmente accesible y diversas rutas de suministro de genes se pueden utilizar para dirigirse a diferentes regiones.
- Uniones estrechas entre las células RPE y la presencia de la barrera hemato-retinal, limitan al vector y/o gen de fugas en la circulación y le confiere un útil estado inmunoprivilegiado para el ojo^[38].
- El estado inmunoprivilegiado del ojo es una ventaja para el desarrollo de enfoques terapéuticos génicos^[33]. Esta propiedad es ideal para la terapia génica local, ya que se espera que las reacciones inflamatorias e inmunes hacia el vector de genes y/o proteínas transgénicas no será un inconveniente importante^[36].
- Debido a su pequeño tamaño y estructura cerrada, se requieren bajas dosis del vector y/o genes para lograr un efecto terapéutico^[36, 38].
- Un número significativo de enfermedades oculares han sido delineadas a nivel molecular^[33]. Han sido identificados muchos genes que causan directamente y/ o están involucrados en enfermedades de los ojos^[38].
- Existen disponibles modelos animales apropiados^[33].

La transferencia de genes al cerebro

La intervención farmacológica del cerebro está limitada por la accesibilidad del tejido.

La presencia de una BHE es responsable del fracaso de muchos fármacos potenciales debido a la dificultad en la entrega de ellos en cantidad suficiente para el SNC. Por otro lado, aquellas moléculas que atraviesan la BHE pueden tener una diferente acción generalizada en el tejido neuronal, proporcionando efectos secundarios. Por otra parte, antes de alcanzar la difusión cerebral periférica se produce la degradación de una serie de medicamentos.

La terapia génica ofrece varias posibilidades para el tratamiento eficaz de las enfermedades del sistema nervioso central. La administración dirigida de un transgén en el tejido cerebral o célula dañada produce la proteína terapéutica in situ, evitando los efectos secundarios y la degradación periférica. Esto es particularmente importante para moléculas tales como factores neurotróficos utilizados para las enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, se puede obtener la expresión a largo plazo (más de 1 año). El control de la expresión del transgén por moléculas exógenas, como la doxiciclina puede interrumpir o iniciar el tratamiento.

La absorción depende de la zona del cerebro dañada y del tipo de célula. Los receptores para la fijación del virus en las células, las barreras anatómicas en el tejido diana, y las técnicas experimentales determinarán la difusión del vector sobre el tejido y la entrada. Por otra parte, los promotores insertados junto al transgén determinarán el patrón y el alcance de la expresión de la molécula terapéutica. Durante la última década, mucho se ha logrado en el desarrollo de la terapia génica para diferentes enfermedades neurológicas. Los enfoques exitosos en modelos animales experimentales son alentadores para el desarrollo de ensayos clínicos.

Hoy en día, las enfermedades neurodegenerativas son tratados por la restauración del déficit patológico, por medio de medicamentos que revierten las anomalías bioquímicas. Sin embargo, estos tratamientos paliativos son incapaces de prevenir el deterioro progresivo de las neuronas implicadas. La terapia génica potencialmente puede detener o retrasar la degeneración de las células, o incluso regenerar el daño. Esto puede lograrse mediante la entrega de factores neurotróficos, la restauración de los niveles de proteínas, la introducción de genes anti-apoptóticos, o silenciar la expresión de genes con efectos deletéreos^[35].

Los vectores para la transferencia de genes

El éxito de cualquier terapia génica depende de la eficiencia con la que el transgén terapéutico se puede entregar con el tipo celular apropiado^[39]. En principio las técnicas de introducción de material genético en las células se pueden dividir en dos formas de aplicación: sistemas de transferencia de genes utilizando virus recombinantes como vehículo de transferencia de genes o técnicas basadas en métodos no virales^[33, 38].

La transferencia génica con vectores virales

Los vectores virales incluyen diferentes familias de virus que se han convertido de una enfermedad infecciosa en un agente terapéutico mediante la manipulación genética ^[33]. Los vectores virales utilizados para la transferencia génica ocular son adenovirus, adeno-asociados, retrovirus, lentiviral y virus *Herpes simplex* 1 ^[38].

Adenovirus: Los vectores adenovirales, comúnmente utilizados en la terapia génica, tienen una amplia gama de células huésped y pueden infectar tanto a células que se dividen y no se dividen. Dado que no se integran en el genoma, su expresión es transitoria. El mayor obstáculo en el uso de adenovirus para la terapia génica es la inmunogenicidad de la cápside y las proteínas que expresan. La mayoría de los vectores adenovirales se derivan de adenovirus de serotipo 5, que tiene un genoma de 35 kb ^[40].

Los vectores adenovirales de primera generación eliminan al gen E1, con supresión parcial o completa del gen E3, lo que permite una capacidad de transgén de 8,5 kb. La eliminación de los genes E1 y E3 hace que el virus de la mayoría de replicación deficiente y aumenta la capacidad del vector, respectivamente. Segunda generación de vectores adenovirales tienen delecciones adicionales de parte de la E2 y/o la mayoría de los genes E4, disminuyendo de ese modo la respuesta inmune a las proteínas virales. Vectores adenovirales de tercera generación contienen sólo las secuencias necesarias para la iniciación de empaquetamiento del ADN viral y la replicación. Por lo tanto son menos inmunogénicos y tienen la capacidad sustancial de transgén de contención ^[41].

Virus adeno-asociado. Los virus adeno-asociados tienen un pequeño genoma (4,7 kb), no son patógenos y pueden infectar tanto a células en división y no división. A pesar del hecho de que los vectores virales adeno-asociados no codifican para las proteínas virales, una respuesta inmune humoral se provoca después de su administración debido a la cápside viral. En contraste con la de tipo salvaje, virus adeno-asociados que demuestran la integración específica del sitio en el genoma, los vectores virales adeno-asociados integran en los sitios de roturas en el ADN de doble cadena.

Los retrovirus. Los vectores retrovirales, comúnmente utilizados en la terapia de genes, pueden integrarse en el genoma del huésped y por lo tanto ofrecer la expresión del transgen a largo plazo. Debido a su integración al azar que pueden causar mutagénesis insercional, es decir, insertar el transgén en una región de codificación.

Lentivirus. Los lentivirus son un subtipo de los retrovirus que tienen la capacidad de infectar tanto las células que se dividen como las que no se dividen, que es una ventaja de estas construcciones.

El vector lentiviral más ampliamente utilizado se basa en el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. Un diseño reciente de vectores lentivirales puede eludir el riesgo de mutagénesis de inserción por la deficiencia de integración.

Virus Herpes simplex 1 (HSV-1). HSV-1 es fuertemente neurotrópico y puede replicarse en las células epiteliales. El tamaño del genoma de HSV-1 es de 152 kb y esto permite acomodar relativamente grandes transgenes ^[40].

La toxicidad y la inducción de una respuesta inmune contra el vector son todavía problemas importantes que tienen que ser resueltos antes de que se considere la terapia génica con vectores virales como opción terapéutica ^[33].

La transferencia de genes con técnicas no virales

El desarrollo de la terapia génica ha estado limitado generalmente por la respuesta inmune del huésped al antígeno extraño en el transgén o vector. Aunque, el ojo goza de una situación inmunoprivilegiada, la inflamación puede ser provocada por vectores de suministro de genes virales ^[37]. Los vectores virales tales como adenovirus, virus adeno-asociado y retrovirus han sido ampliamente utilizados para la terapia génica ocular. Sin embargo, estos sistemas tienen riesgos potenciales asociados con su inmunogenicidad, mutagénesis o potencial de persistencia en el cerebro. Estos efectos secundarios obstaculizan aún más el desarrollo de estos sistemas y de su potencial de amplia aplicación para la terapia génica humana. Los vectores no virales son por lo tanto una alternativa prometedora. Son relativamente no inmunogénicos, no provocan ninguna respuestas inflamatorias importante en tejido ocular, son seguras y tienen baja toxicidad. Además, son fáciles de manejar y pueden ser producidos en gran escala. En la transferencia de genes con técnicas no virales los oligonucleótidos (ODN) pueden ser entregados de forma desnuda (como plásmidos) o atrapados en lípidos catiónicos, polímeros o péptidos que forman los sistemas de suministro de liberación lenta, que se pueden adaptar de acuerdo con el órgano objetivo y los fines de terapia ^[36].

Plásmidos (ADN desnudo)

La introducción de ADN plasmídico que expresan los genes terapéuticos en las células diana sin el uso de virus cae en la categoría general de los métodos de transferencia de genes no virales. La terapia génica no viral se considera más segura que la terapia génica viral, debido a la baja toxicidad e inmunogenicidad, bajo riesgo de mutagénesis y a la falta de patogenicidad. La entrega de genes más simple es la aplicación de ADN desnudo en los tejidos locales ^[37, 41].

Plásmido pIRES-hrGFP-1a

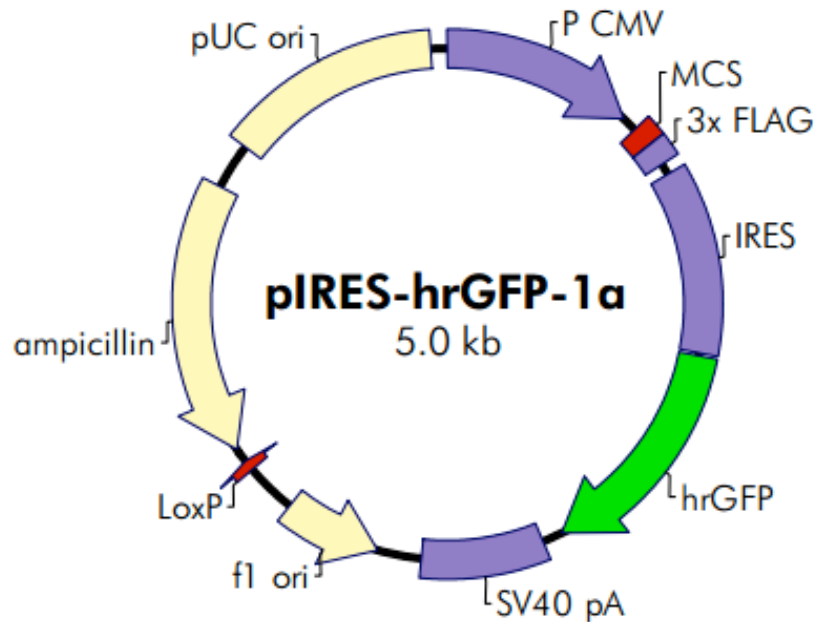


Figura 10: plásmido *pIRES-hrGFP-1a*.

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), 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 debajo de hrGFP dirigen el correcto procesamiento del extremo 3' del ARNm. Este diseño permite la expresión de un gen de interés para ser monitoreado a nivel celular debido a la expresión de la hrGFP.

Proteína verde fluorescente (GFP)

La proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína, que ya ha sido clonado, se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador. El descubrimiento y estudio de GFP representó un enorme avance para los investigadores, amplía la capacidad del microscopio óptico, y otorga una nueva dimensión visible al ojo humano ^[42].

La estructura de la proteína verde fluorescente es de 238 aminoácidos, que forman once cadenas beta, cuyo conjunto forma un cilindro, en el centro del cual se encuentra una hélice alfa. Contiene un cromóforo especial (constituido por los aminoácidos 65, 66 y 67), un grupo químico que absorbe y emite luz. Cuando la luz UV o luz azul impacta sobre el cromóforo, éste toma la energía de la luz y se excita. En la fase siguiente, el cromóforo se libera de la energía emitiendo luz en longitud de onda verde. La GFP posee dos picos de excitación: uno menor, a 475 nm, y uno mayor, a 395 nm. Su pico de emisión está a 509 nm, en la zona verde del espectro [43].

Perspectivas de una terapia génica vía oftálmica

Varias técnicas han sido desarrolladas hasta ahora para la transferencia de material genético en las células o tejidos sin usar vectores virales [33]. El método ideal de la terapia génica debe suministrar genes altamente eficientes de las células diana específicas sin ser tóxico o inmunogénicos. Se debe inducir la expresión del transgén a largo plazo sin ser potencialmente mutagénico al integrarse en el genoma del huésped. Por último, debe ser fácil de fabricar y aplicable clínicamente [36].

Muchos de los mecanismos responsables de privilegio inmune se han dilucidado, y estrategias terapéuticas basadas en los principios de privilegio inmune se están considerando [14]. La terapia génica no viral se considera más segura que la terapia génica viral, debido a la baja toxicidad e inmunogenicidad, bajo riesgo de mutagénesis y a la falta de patogenicidad [37,41]. Además, la expresión génica basada en plásmidos es transitoria porque el ADN plasmídico no se integra en el cromosoma del huésped y la producción de plásmidos es sencilla y rentable [37]. Al estudiar la ruta e identificar los lugares en donde se distribuye en el cerebro el plásmido *p/RES-hrGFP-1a* nos abre la posibilidad de utilizar esta construcción como un vector genómico no viral por la vía ocular.

Justificación

Actualmente existen diversos métodos de administración de fármacos oculares, aunque la vía ocular tópica se prefiere debido a la facilidad de administración. El ojo es un blanco atractivo para las estrategias de terapia génica debido a su accesibilidad para llegar al cerebro, esto mediante la vía óptica que comprende al nervio óptico desde la salida del globo ocular hasta la corteza occipital del cerebro y las características de inmuno privilegio que comparte con el cerebro, ya que se espera que las reacciones inflamatorias e inmunes hacia el vector de genes no sea un inconveniente importante. Los vectores no virales como los plásmidos son una alternativa prometedora, ya que son relativamente no inmunogénicos, son seguros y tienen baja toxicidad; además, son fáciles de manejar y debido a su pequeño tamaño relativo estas moléculas circulares de ADN como el plásmido *pIRES-hrGFP-1a* podría funcionar como un vector efectivo para la llegada de genes a tejidos intraoculares y/o regiones cerebrales.

Planteamiento del problema

El ojo es un blanco atractivo para las estrategias de terapia génica, debido a su accesibilidad y las características de inmuno privilegio. El presente trabajo nos dará un panorama de la ruta que sigue el plásmido *pIRES-hrGFP-1a* al identificar su presencia y la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) desde el ojo hasta el cerebro de ratones, 24 horas posteriores a su administración oftálmica, lo que será el precedente para futuros trabajos sobre terapia génica al evaluar la posibilidad de administrar este tipo de construcciones o vectores genéticos por esta vía.

Pregunta de investigación

¿Se logrará identificar la presencia del plásmido *pIRES-hrGFP-1a*, así como la expresión de la GFP en algunas estructuras del ojo hasta el cerebro de ratones, 24 horas posteriores a su administración oftálmica?

Hipótesis

Después de la administración oftálmica del plásmido *pIRES-hrGFP-1a*, se identificará tanto la presencia del plásmido como su expresión en algunas estructuras del ojo hasta el cerebro de ratones.

Objetivo general

- Identificar la presencia del plásmido *pIRES-hrGFP-1a* administrado oftálmicamente y la expresión de la GFP desde el ojo hasta el cerebro de ratones a las 24 horas.

Objetivos específicos

- Probar que la administración oftálmica puede ser una vía de entrada directa hacia el cerebro.
- Estudiar la ruta que sigue el plásmido desde el ojo hasta el cerebro.
- Identificar la expresión del plásmido en dicha ruta.
- Identificar a la GFP en diferentes cortes histológicos en las estructuras de la ruta.

Diseño experimental

Tipo de estudio: Experimental Prospectivo Comparativo Transversal.

Población de estudio

Se utilizaron un total de 27 ratones hembra balb/c de 10-12 semanas alimentados *ad libitum* con una dieta comercial (Harlan), los cuales nacieron y fueron criados en el Bioterio de Centro Médico Nacional “Siglo XXI”.

Criterios de Inclusión

Ratones sanos hembra de la cepa Balb/c de 10-12 semanas con un peso y talla concorde a su edad.

Criterios de Exclusión

Ratones en los que hubo evidencia clara de perdida de la dosificación al cerrar los ojos durante la administración o sacudir la cabeza una vez soltados.

Variables

Variable Independiente: Tratamiento: -Ratones con Tx

-Ratones sin Tx

Variable Dependiente:

- Plásmido

Definición operacional	Escala de medición	Nivel de medición
Observación de la banda de amplificación en el gel de agarosa	Cualitativo	+/-
Transcripción del plásmido, observación de la banda de amplificación en el gel de agarosa	Cualitativo	+/-

- Proteína

Definición operacional	Escala de medición	Nivel de medición
Observación de fluorescencia emitida por la GFP en cortes histológicos	Cualitativo	+/-

Materiales y métodos

Plásmido *pIRES-hrGFP-1a*

El plásmido utilizado fue el *pIRES-hrGFP-1a* el cual está formado por las siguientes regiones:

- Promotor CMV 1–602
- Sitio de múltiple clonación 651–715
- Banderas 3x 716–787
- Sitio de entrada ribosomal 823–1397
- Regio que codifica para la proteína verde fluorescente(hrGFP) 1407–2123
- Sitio polyA 2188–2571
- Origen f1 2709–3015
- Secuencia LoxP 3178–3211
- Resistencia a la ampicilina (bla) ORF 3256–4113

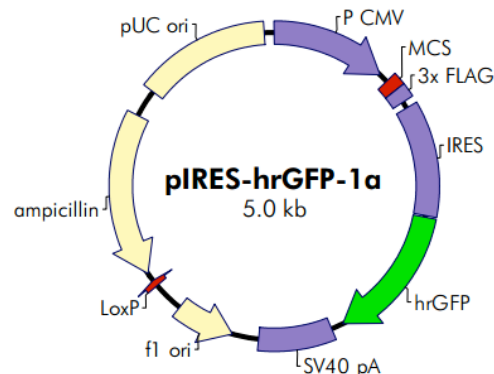


Figura 11: plásmido *pIRES-hrGFP-1a*.

Obtención del plásmido

Producción del plásmido *pIRES-hrGFP-1a*

Para la realización del experimento se produjo el plásmido en el laboratorio a partir de plásmido comercial *pIRES-hrGFP-1a* (Vitality hrGFP Mammalian Expression Vectors), para esto fue necesario la transformación de bacterias competentes para que pudieran recibir al plásmido.

Transformación de bacterias

Bacterias competentes, se contaba con bacterias *Escherichia coli* DH5α que habían sido capacitadas químicamente para permitir la entrada del material genético (con cloruro de rubidio), estas bacterias se mantenían congeladas a – 70° C.

Se tomaron 100 µL de las bacterias competentes y se les agrego 1 µL del plásmido en un tubo Eppendorf en condiciones de esterilidad. Se dejó reposar en hielo por 15 minutos, pasado el tiempo se colocó en una incubadora digital (Boekel Scientific) a 42° C por 2 minutos y enseguida se colocó de nuevo en hielo por 15 minutos para el choque termico.

Después se le adicionó 1 mL de medio LB (Cloruro de sodio 0.5%, extracto de levadura 0.5%, triptona 1%) y se dejó incubar a 37° C por 1 hora, al terminar la incubación se tomaron 100 µL de medio y se esparcieron en una caja Petri con agar LB (Cloruro de sodio 0.5%, extracto de levadura 0.5%, triptona 1 %, agar 1.5%) con ampicilina (50 µg/mL) como antibiótico de selección de bacterias transformadas, se dejó la caja a 37° por 24 horas. Posteriormente se prepararon 4 tubos con 5 ml de medio LB más 5 µL de ampicilina (100 mg/mL), de los cuales se inocularon 3 con colonias aisladas de la caja anterior, dejando uno como testigo, estos tubos fueron dejados incubando a 37° C con agitación por 24 horas. Al otro día se observó si había buen crecimiento en los tubos por medio de la turbidez comparándola con el testigo y se prepararon 3 matraces con 300 mL de medio LB más 300 de ampicilina (100 mg/mL), a los cuales se le agregó 3 mL de cada uno de los cuatro tubos con crecimiento del día anterior, estos matraces fueron incubados a 37° C por 24 horas en agitación.

Producción y purificación del plásmido

Para la extracción del plásmido se usaron los 3 matraces con bacterias transformadas del paso anterior, y se utilizó el sistema comercial “Plasmid Plus Midi Kit” (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo 1) para la extracción y purificación del plásmido. Al final se obtuvieron 4 tubos Eppendorf con 200 µL de ADN plasmídico que tiene alto grado de pureza, el cual se cuantificó por espectrofotométrica en un NanoDrop (ND-1000). Estos plásmidos fueron corridos en un gel para observar su integridad; y para verificar su buena calidad y pureza se les realizó una PCR con primers hrGFP (FORWARD: 5'-GTG AGC AAG CAG ATC CTG AAG-3'; REVERSE: 5'-ACT TGG TGA AGG TGC GGT TG-3') para obtener un producto de amplificación de 250 pb.

Modelo animal

Se utilizaron un total de 27 ratones hembra balb/c de 10-12 semanas. Los cuales se dividieron en seis grupos, tres de 6 ratones y tres de 3 ratones, los primeros fungieron como grupos experimentales (E1, E2 y E3) y los siguientes como controles (C1, C2 y C3).

Grupos experimentales:



Grupos E1, E2, E3
(6 ratones por grupo)
n= 18

Grupos control:



Grupos C1, C2, C3
(3 ratones por grupo)
n= 9

Administración

La administración se realizó utilizando una micropipeta de 100 µL y una vez sostenido al ratón se le colocaba la solución en gotas pequeñas esperando a que estas fueran absorbidas de la película lagrimal. A los grupos experimentales se les administró el plásmido *pIRES-hrGFP-1a* a una dosis de 25 µg diluida en 25 µl de PBS por ratón; los grupos controles recibieron 25 µl de PBS.

Método de sacrificio

Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la administración del plásmido, estos fueron decapitados utilizando una guillotina. El método de sacrificio empleado fue adecuado ya que es compatible con los propósitos del protocolo experimental, tiene la capacidad de producir una muerte rápida y es seguro. Además es un medio para obtener el tejido cerebral íntegro, esto de acuerdo al punto 9.5.3.3 de la **NOM-062-ZOO-1999**.

Extracción de cerebro

Una vez decapitado el ratón, se tomó la cabeza y se le quitó la piel del cráneo, después se le introdujeron unas tijeras de microcirugía por la parte de atrás de cuello para realizar tres cortes, el primero sobre la línea media del cráneo y los otros dos en dirección hacia las orejas y los ojos, estos cortes fueron cuidando no dañar el tallo cerebral. Posteriormente se abrió el cráneo y las meninges y se invirtió la cabeza para que el cerebro se desprendiera por su propio peso y recibirlo en una caja Petri con solución salina.

Cortes histológicos del tejido cerebral

Una vez extraídos el cerebro de los ratones. Del grupo experimental E1, tres cerebros se seccionaron con un corte coronal y tres con un corte transversal, y del grupo control C1, uno se seccionó coronalmente y dos transversalmente, cada fragmento se crio-protegió con metil-butano en hielo seco. Posteriormente fueron colocados en las platinas y se recubrieron con parafina (tissue tek paraffin) para obtener cortes del tejido de 5-10 µm de espesor utilizando un crióstato (Leica) a -20° C, y se montaron en laminillas. De esta forma se obtuvieron 10 laminillas de cada uno de los ratones de los dos grupos.

Tratamiento de cerebros para la extracción de ARN y ADN

Una vez extraídos los cerebros de los grupos E2, C2, E3 y C3 estos fueron seccionados en las siguientes regiones: bulbo olfatorio, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdalas, cerebelo y tallo cerebral, también se incluyó al nervio óptico y al nervio olfatorio. Se juntaron las estructuras de los 3 ratones (grupos control) y de los 6 ratones (grupos experimentales) en tubos Eppendorf por grupo y se colocaron en un termo con nitrógeno líquido para ser transportadas a un ultracongelador (Revco) y conservándose a -70°C hasta su posterior procesamiento.

Los grupos E2 y C2 fueron los utilizados para la extracción de ARN y los grupos E3 y C3 para la extracción de ADN.

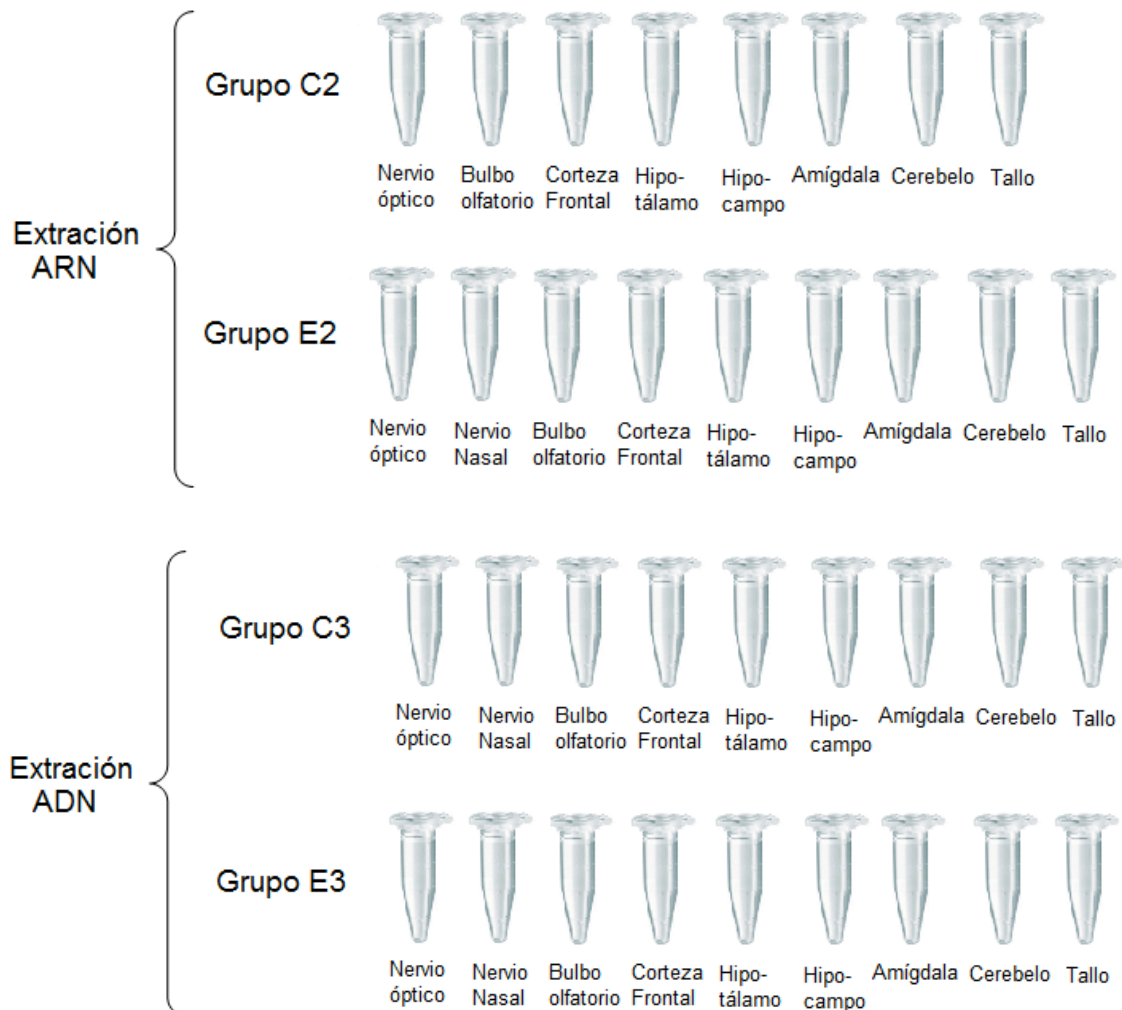


Figura 12: tubos con las regiones de cada grupo.

Procesamiento de los cortes histológicos

Observación en directo

Las laminillas se fijaron en acetona fría por 1 minuto y se secaron al aire. Posteriormente se colocaron en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 (PBS) (Sigma) por media hora, y se incubaron en cámara húmeda con suero normal de caballo por 30 minutos. Se contra-tiñeron con ioduro de propidio y se montaron con Vectashield (Vector Laboratorios, Inc. Burlingame, CA94010) medio para fluorescencia, se sellaron con barniz y se dejaron secar 1 día para observarlos en un microscopio de epifluorescencia con cámara digital (Evolution de Media Cybernetics). Finalmente se capturaron las imágenes utilizando un equipo fotográfico integrado al microscopio.

Inmunohistoquímicas Anti-GFP

Las laminillas se fijaron en acetona fría por 1 minuto y se secaron al aire. Después se colocaron en PBS por media hora y se incubaron en cámara húmeda con suero normal de caballo por 30 minutos, posteriormente se le agregó el primer anticuerpo anti-GFP (Biotechnology Sta. Cruz GFP SC-8334) y se incubaron en cámara húmeda por 24 horas, al siguiente día se lavaron en PBS por 10 minutos para posteriormente incubar con un segundo anticuerpo (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG) en cámara húmeda por 2 horas. Finalmente se contra-tiñeron con ioduro de propidio, se montaron con Vectashield medio para fluorescencia para ser observadas en un microscopio de epifluorescencia (Evolution de Media Cybernetics) y ser capturadas las imágenes con un equipo fotográfico integrado al microscopio.

Extracción de ARN

Se utilizaron los grupos C2 (grupo control) y E2 (grupo experimental) para la extracción de ARN, en el grupo C2 se contaba con 8 tubos Eppendorf con los tejidos de las siguientes regiones: nervio óptico, bulbo olfatorio, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdalas, cerebelo y tallo; en el grupo E2 con 9 tubos Eppendorf con los tejidos de las siguientes regiones: nervio óptico, nervio olfatorio, bulbo olfatorio, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdalas, cerebelo y tallo. Estos tejidos fueron pesados y posteriormente macerados en morteros estériles con nitrógeno líquido y el ARN total se extrajo en 1 mL de Tri-Reagent (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo 2). Finalmente se diluyó 5 µL de cada ARN extraído en 955 µL de agua y se cuantificó la concentración a partir de las medidas de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (BioMate 3; Thermo Electron Corporation). El ARN extraído se conservó a – 70° C hasta su uso.

Tratamiento con DNAsa

Para eliminar el ADN genómico que pudiera haber quedado en nuestras muestras de ARN, tanto el grupo C2 y el grupo E2 fue sometido a un tratamiento con enzima DNAsa; para esto se tomaron 10 µL de cada muestra en tubos Eppendorf y se le agregó 1.5 µL de amortiguador de DNAsa 10X (pH=8; 400 mM Tris, 100 mM MgCl₂, 30 mM CaCl₂), 1.0 µL de la enzima DNAsa (Roche) y 2.5 µL de agua DEPC; la mezcla fue incubada a 37° C durante 30 minutos, pasado el tiempo se le adicionó 1 µL de EDTA (25mM) y se incubó a 65°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Finalmente se centrifugaron los tubos y se volvieron a colocar a – 70° C hasta su uso. Este fue el ARN que se utilizó para la RT-PCR, como en este paso el ARN fue diluido se tuvo que ajustar la concentración que había sido previamente calculada en el espectro.

RT-PCR

El ARN fue transcrito a su ADN complementario (cADN), para esto utilizamos el kit comercial “High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit” (Applied Biosystems); primero en tubos Eppendorf en hielo se prepararon 10 µL de la mezcla 2X que viene en el instructivo del fabricante (ver Anexo 3) para cada muestra; a estas mezclas se le agregó el volumen necesario de cada muestra para 2 µg de RNA tomando en cuenta la concentración ajustada después del tratamiento con DNAsa, completando a un volumen final de 20 µL con agua DEPC. Esta mezcla se colocó en un termociclador (MJ Mini Thermal Cycler) a las condiciones que marca el fabricante.

Cuadro 1: Mezcla realizada por muestra (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit)

Componente	Volumen (µL)
10X RT amortiguador	2.0
25X dNTP, Mix (100 mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease-free H ₂ O	4.2
Volumen total de Reacción:	10.0



A la mezcla se le agregó:

1. *X µL de cada muestra para tener 2 ng de ARN
2. 10 µL - X µL de agua libre de Nucleasas

El volumen final de reacción: 20 X µL

* El volumen ocupado de cada muestra viene en la tabla de resultados de extracción de RNA

PCR con primers 18s

Como control interno para verificar la buena integridad del ARN extraído, así como el buen funcionamiento de la RT-PCR, se corrió una PCR con el ADN complementario sintetizado de cada muestra utilizando oligonucleótidos de ácido ribonucleico ribosomal rARN 18S (FORWARD: 5'-TCT CGA TTC CGT CGG GTG GTG G-3'; REVERSE: 5'-CTT ATG ACC CGC ACT TAC TCG-3') para obtener un producto de amplificación de 300 pb.

En estas PCR's se utilizó la mezcla comercial "Green Mix" (Promega), la cual cuenta con todos los ingredientes necesarios para la reacción (ver Anexo 4) y se encuentra a una concentración 2X; para las muestras tanto controles como experimentales se probaron diferentes diluciones para estandarizar la concentración de lo que se amplificaba quedando como volúmenes de cADN óptimos para las PCR's los siguientes:

Cuadro 2: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo C2 (Control)								
Componentes	Regiones							
	Nervio óptico	Bulbo olfatorio	Corteza frontal	Hipo- tálamo	Hipo- campo	Amígdala	Cerebelo	Tallo
Primer 18s F	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Primer 18S R	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Green Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
cADN (dilución)	2.5 µL (1:25)	0.5 µL	2 µL (1:25)	1.5 µL	2 µL (1:75)	2 µL (1:25)	2 µL (1:25)	2 µL (1:100)
Nuclease-free H2O	2.1 µL	4.1 µL	2.6 µL	3.1 µL	2.6 µL	2.6 µL	2.6 µL	2.6 µL
Volumen final:	10 µL							

Cuadro 3: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo E2 (Experimental)									
Componentes	Regiones								
	Nervio Óptico	Nervio Nasal	Bulbo Olfatorio	Corteza Frontal	Hipo-tálamo	Hipo-campo	Amíg.	Cerebelo	Tallo
Primer 18s F	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Primer 18S R	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Green Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
cADN	*2 µL	*2 µL	0.5 µL	1.6 µL	*2 µL	0.5 µL	*2 µL	1.2 µL	*3.5 µL
Nuclease-free H2O	2.6 µL	2.6 µL	4.1 µL	3.0 µL	2.6 µL	4.1 µL	2.6 µL	3.4 µL	1.1 µL
Volumen final:	10 µL								
* Dilución 1:100									

Las mezclas fueron calculadas a un volumen final de 10 μ L. Estas mezclas se corrieron con las condiciones que marca el fabricante para la enzima del mix y con una temperatura de fusión (T_m) de 58° C óptima para los primers 18s.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Cuadro 4: Condiciones de la PCR					
1	2	3	4	5	6
95° C	95° C	58° C	72° C	72° C	4° C
01:00	00:30	00:30	00:30	07:00	Forever
	L	25 ciclos	2		

PCR con primers hrGFP

Ya teníamos los volúmenes óptimos para amplificar todas las muestras con los primers de 18s; y se partió de estos volúmenes para realizar la PCR con los oligonucleótidos específicos para identificar la expresión de nuestro plásmido; estos fueron los primers hrGFP (FORWARD: 5'-GTG AGC AAG CAG ATC CTG AAG-3'; REVERSE: 5'-ACT TGG TGA AGG TGC GGT TG-3') para obtener un producto de amplificación de 250 pb. En estas PCR's se utilizó la mezcla comercial "Green Mix" (Promega) el cual cuenta con todos los ingredientes necesarios para la reacción (ver Anexo 4) y se encuentra a una concentración 2X. Para el control positivo se utilizó 10 μ g del plásmido y para el negativo solo agua; los volúmenes que se utilizaron de ADNc para cada reacción fueron los siguientes:

Cuadro 5: Componentes para la PCR con primers hrGFP del Grupo C2 (Control)									
Componentes	Regiones								
	Nervio Óptico	Bulbo Olfatorio*	Corteza Frontal	Hipo-tálamo*	Hipo-campo	Amígdalas	Cerebelo	Tallo	
Primer hrGFP F	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	
Primer hrGFP R	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	0.2 μL	
Green Mix	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	
cADN	2.0 μL	0.5 μL	2.0 μL	1.0 μL	1.5 μL	2.0 μL	2.0 μL	1.0 μL	
Nuclease-free H2O	2.6 μL	4.1 μL	2.6 μL	3.6 μL	3.1 μL	2.6 μL	2.6 μL	3.6 μL	
Volumen final:	10 μL								
* Debido a su baja concentración estas muestras se corrieron a 40 ciclos									

Cuadro 6: Componentes para la PCR con primers hrGFP del Grupo E2 (Experimental)									
Componentes	Regiones								
	Nervio Óptico	Nervio Nasal	Bulbo Olfatorio*	Corteza Frontal*	Hipo-tálamo	Hipo-campo*	Amíg.	Cerebelo*	Tallo
Primer hrGFP F	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Primer hrGFP R	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
Green Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
cADN	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL	1.5 µL	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL	1.2 µL	1.2 µL
Nuclease-free H2O	3.6 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.1 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.6 µL	3.4 µL	3.4 µL
Volumen final:	10 µL								
* Debido a su baja concentración estas muestras se corrieron a 40 ciclos									

Las mezclas fueron calculadas a un volumen final de 10 µL. Estas mezclas se corrieron con las condiciones que marca el fabricante para la enzima del mix y con una temperatura de fusión (Tm) de 58° C óptima para los primers hrGFP, debido a la diferencia de concentración de las muestra fue necesario aumentar a 40 ciclos las muestras con menor concentración.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Cuadro 7: Condiciones de la PCR					
1	2	3	4	5	6
95° C	95° C	58° C	72° C	72° C	4° C
02:00	00:30	00:30	00:30	03:00	Forever
	L	35 ciclos	☐		
	L	*40 ciclos	☐		

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el tejido de los grupos C3 (grupo control) y E3 (grupo experimental), en el grupo C3 se contaba con 8 tubos Eppendorf con los tejidos de las siguientes regiones: nervio óptico, bulbo olfatorio, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdalas, cerebelo y tallo; y en el grupo E3 con 9 tubos Eppendorf con los tejidos de las siguientes regiones: nervio óptico, nervio olfatorio, bulbo olfatorio, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, amígdalas, cerebelo y tallo. Estos tejidos fueron pesados y posteriormente macerados en morteros estériles con nitrógeno líquido, se dejó evaporar el nitrógeno y se recuperó el polvo del tejido en un tubo Eppendorf, resuspendiéndose en 500 µL de amortiguador de lisis (10 mM Tris pH=8, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS).

Se mezcló con ayuda de un homogenizador de tejidos (Tissue Master, OMNI International) y se le agregó 3 µL de RNAsa (10 mg/mL; Macherey-Nagel) dejándolo a 37°C durante 1 hora en un incubador (Digital Dry Bath; Boekel Scientific); pasado el tiempo se le agregó 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL; Sigma) y se dejó incubar a 50°C durante 16 horas; posteriormente se dejó enfriar a TA y se le agregó 500 µL de fenol (Fenol equilibrado con 0.1 M de Tris pH=8), se mezcló por inversión durante 10 minutos y se centrifugó a 6500 rpm por 15 minutos a TA (Centrifuga Mini Spin; Eppendorf), después se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se repitió la extracción con fenol dos veces más. Al sobrenadante acuoso recuperado se le adiciono 200 µL de acetato de amonio (10M) y 1 mL de etanol absoluto y se centrifugó a 6500 rpm por 5 minutos a TA. Al ADN precipitado se le decanto el líquido y se lavó con 1 mL de etanol al 70% por 3 veces más. Se removió el etanol sin dejar secar la pastilla y se le agregó 100 µL de TE (Tris-EDTA pH= 7.6) dejándolo en una plataforma de agitación (Thermolyne; M-26125) por 24 horas a 4°C para que se disolviera completamente el DNA extraído. Finalmente se corrió 10 µL de cada muestra en un gel de agarosa al 0.7% en TAE (40mM Tris base, 20mM ácido acético y 1mM EDTA) y se diluyó 5 µL de cada ADN extraído en 955 µL de agua, para cuantificar la concentración a partir de las medidas de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (BioMate 3; Thermo Electron Corporation). El ADN extraído se conservó a -20° C hasta su uso.

PCR con primers 18s

Como control interno se corrió una PCR con el ADN extraído de cada muestra utilizando oligonucleótidos 18S (FORWARD: 5'- TCT CGA TTC CGT CGG GTG GTG G- 3'; REVERSE: 5'-CTT ATG ACC CGC ACT TAC TCG- 3') para obtener un producto de amplificación de 300 pb. En estas PCR's se utilizó el kit comercial "Taq DNA Polymerase Reagent Kit" (Corning Axygen; Biosciences) el cual cuenta con todos los reactivos necesarios para la mezcla, utilizando las cantidades de cada reactivo que marca el fabricante (ver Anexo 5) y 0.2 µL de cada primer por reacción. Con las concentraciones obtenidas por espectrofotometría se calculó el volumen de cada muestra para que cada PCR contará con aproximadamente 300 ng de ADN; los volúmenes que se utilizaron de cada reactivo para la mezcla y de ADN de cada muestra para la PCR fueron los siguientes:

Cuadro 8: Cantidad por Reacción (Corning Axygen)	
Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador 10X Taq	1
MgCl ₂	0.6
dNTP's	0.2
Taq Polimerasa (Axygen)	0.2
Primer 18s F	0.2
Primer 18s R	0.2

Cuadro 9: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo C3 (Control)

Componentes	Regiones								
	Nervio Óptico	Nervio Nasal	Bulbo Olfatorio	Corteza Frontal	Hipo-tálamo	Hipo-campo	Amígdalas	Cerebelo	Tallo
Mezcla	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL
ADN	1.0 µL	3.0 µL	3.4 µL	0.8 µL	3.2 µL	2.9 µL	3.5 µL	1.2 µL	3.0 µL
Nuclease-free H2O	6.6 µL	4.6 µL	4.2 µL	6.8 µL	4.4 µL	4.7 µL	4.1 µL	6.4 µL	4.6 µL
Volumen final:	10 µL								

Cuadro 10: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo E3 (Experimental)

Componentes	Regiones								
	Nervio Óptico	Nervio Nasal	Bulbo Olfatorio	Corteza Frontal	Hipo-tálamo	Hipo-campo	Amígdala	Cerebelo	Tallo
Mezcla	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL
ADN	0.5 µL	2.9 µL	3.1 µL	2.1 µL	2.9 µL	2.0 µL	3.6 µL	0.7 µL	1.1 µL
Nuclease-free H2O	7.1 µL	4.7 µL	4.5 µL	5.5 µL	4.7 µL	5.6 µL	4.0 µL	6.9 µL	6.5 µL
Volumen final:	10 µL								

Las mezclas fueron calculadas a un volumen final de 10 µL. Estas mezclas se corrieron con las condiciones que marca el fabricante para la enzima del kit y con una temperatura de fusión (Tm) de 58° C óptima para los primers 18s en un termociclador (MJ Mini Thermal Cycler, Modelo: PTC-1148; BioRad). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Cuadro 11: Condiciones de la PCR

1	2	3	4	5	6
95° C	95° C	58° C	72° C	72° C	4° C
01:00	00:30	00:30	00:30	07:00	Forever
	L	25 ciclos	□		

PCR con primers hrGFP

Se partió de los volúmenes estandarizados en la amplificación con los primers de 18s para realizar la PCR con los oligonucleótidos específicos para identificar nuestro plásmido, primers hrGFP (FORWARD: 5'-GTG AGC AAG CAG ATC CTG AAG-3'; REVERSE: 5'-ACT TGG TGA AGG TGC GGT TG-3') para obtener un producto de amplificación de 250 pb. Para estas PCR's se utilizó el kit comercial "Taq DNA Polymerase Reagent Kit" (Corning Axygen; Biosciences) el cual cuenta con todos los reactivos necesarios para la mezcla, utilizando las cantidades de cada reactivo que marca el fabricante (ver anexo 5) y 0.2 µL de cada primer por reacción. Para el control positivo se utilizó 10 µg del plásmido y para el negativo solo agua estéril; los volúmenes de ADN de cada muestra para la PCR fueron los siguientes:

Cuadro 12: Componentes para la PCR con primer hrGFP del Grupo C3 (Control)

Componentes	Regiones								
	Nervio Óptico	Nervio Nasal	Bulbo Olfatorio	Corteza Frontal	Hipo-tálamo	Hipo-campo	Amígdalas	Cerebelo	Tallo
Mezcla	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL
ADN	1.0 µL	3.0 µL	3.4 µL	0.8 µL	3.2 µL	2.9 µL	3.5 µL	1.2 µL	3.0 µL
Nuclease-free H ₂ O	6.6 µL	4.6 µL	4.2 µL	6.8 µL	4.4 µL	4.7 µL	4.1 µL	6.4 µL	4.6 µL
Volumen final:	10 µL								

Cuadro 13: Componentes para la PCR con primer hrGFP del Grupo E3 (Experimental)

Componentes	Regiones								
	Nervio Óptico	Nervio Nasal	Bulbo Olfatorio	Corteza Frontal	Hipo-tálamo	Hipo-campo	Amígdala	Cerebelo	Tallo
Mezcla	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL	2.4 µL
ADN	0.5 µL	2.9 µL	3.1 µL	2.1 µL	2.9 µL	2.0 µL	3.6 µL	0.7 µL	1.1 µL
Nuclease-free H ₂ O	7.1 µL	4.7 µL	4.5 µL	5.5 µL	4.7 µL	5.6 µL	4.0 µL	6.9 µL	6.5 µL
Volumen final:	10 µL								

Las mezclas fueron calculadas a un volumen final de 10 µL. Estas mezclas se corrieron con las condiciones que marca el fabricante para la enzima del kit y con una temperatura de fusión (T_m) de 58° C óptima para los primers hrGFP. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Cuadro 14: Condiciones de la PCR

1	2	3	4	5	6
95° C	95° C	58° C	72° C	72° C	4° C
02:00	00:30	00:30	00:30	03:00	Forever
	L	24 ciclos	□		

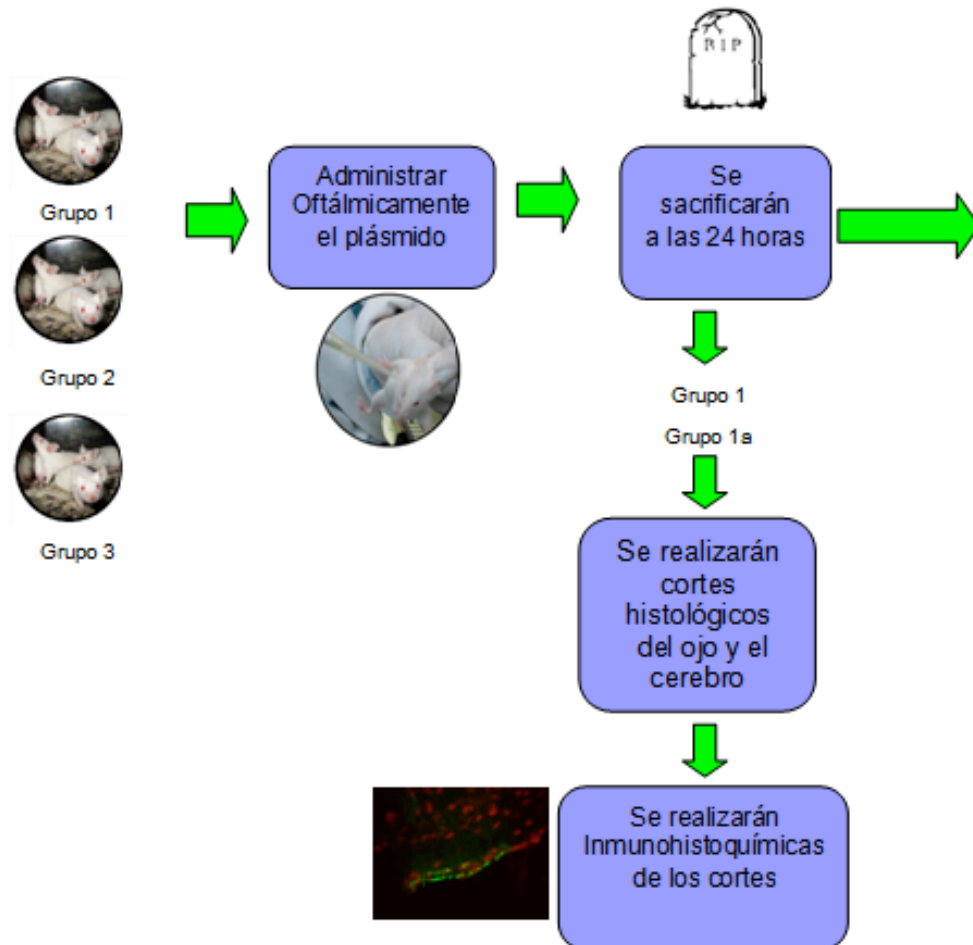
Electroforesis

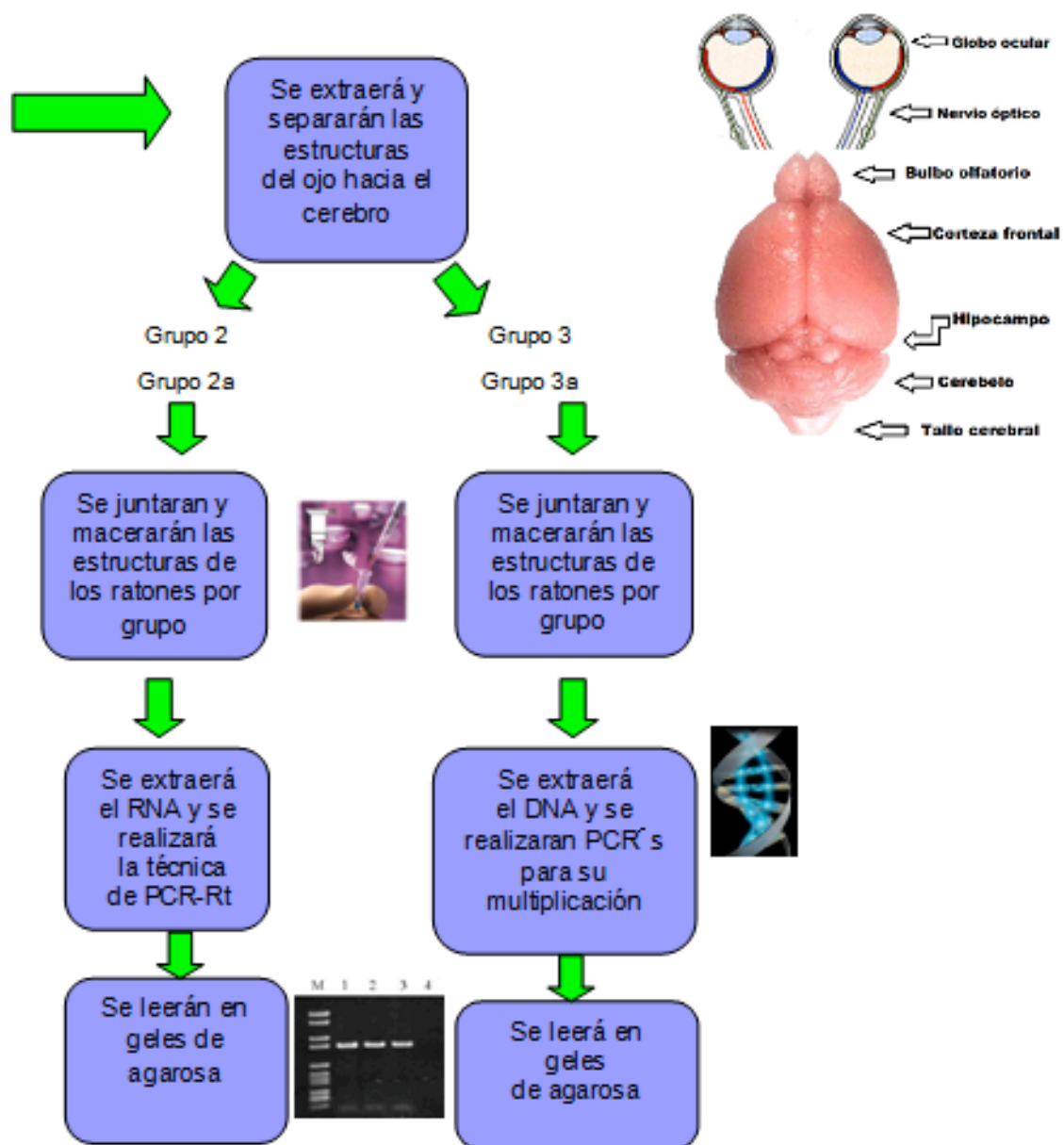
Para todas las PCR's que se realizaron se elaboraron geles de diferente tamaño dependiendo la cantidad de muestras que se necesitaba observar. Los geles fueron preparados con agarosa al 1.2% en TAE (40mM Tris base, 20mM ácido acético y 1mM EDTA); esta mezcla se calentaba en una parrilla eléctrica y se colocaba en el molde correspondiente con el peine necesario. El gel se colocaba en la cámara de electroforesis (Lansing) con los pozos hacia el lado negativo (color negro), la cual se llenaba con TAE. En el primer pozo se colocó el marcador molecular de 100 pares de base (pb) (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) y 1 kilobase (Kb) (GeneRuler 1 kb DNA Ladder) y en los siguientes las muestras a correr; la cámara se conectaba a la fuente para electroforesis a 85 Volts por aproximadamente 1 hora y finalmente se coloca en un transiluminador con luz UV (BioDoc-It Imaging System; UVP).

Diseño estadístico

Para la comparación de los resultados del grupo control contra los del experimental se utilizó la prueba de χ^2 , considerándose un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Diagrama de flujo





Resultados

Producción del plásmido *pIRES-hrGFP-1a*

Se obtuvieron tres tubos Eppendorf con aproximadamente 200 μL de plásmido, en el cuadro 15 tenemos las concentraciones que se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000). De cada tubo se tomaron 5 μL de plásmido y se corrió en un gel de agarosa, en la imagen 1 tenemos este gel, donde podemos observar dos bandas debido a que por su forma circular los plásmidos forman topoisómeros y estos corren a diferentes velocidades.

Como control interno para observar la integridad de cada uno de nuestros plásmidos purificados se realizó una PCR con los oligos específicos de la GFP, los cuales amplifican a 250 pb, en la imagen 2 podemos observar el gel de esta PCR donde los primeros dos plásmidos si amplificaron, por lo que se decidió omitir al plásmido 3 para el experimento.

Cuadro 15: Concentraciones de los plásmido producidos y purificados

Plásmido	Concentración (ng/ μL)
1	1071.5
2	1911.5
3	1905.2

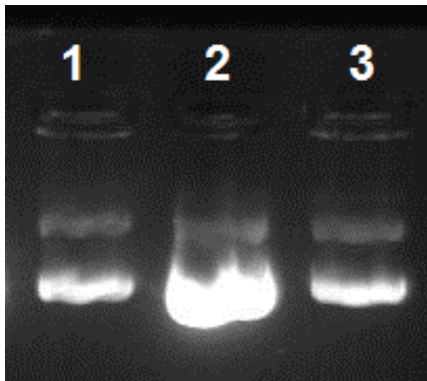


Imagen 1: Gel de agarosa con los plásmido purificados. Pozo: 1. Plásmido I, 2. Plásmido II, 3. Plásmido III

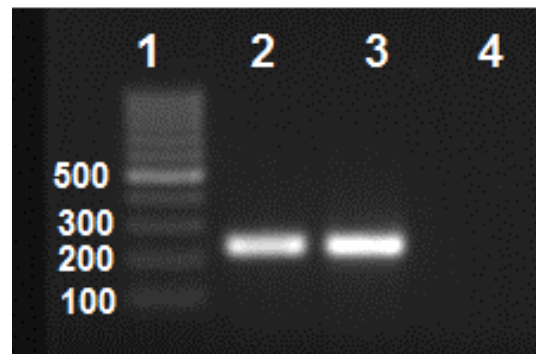


Imagen 2: Gel de agarosa con las muestras de la PCR del plásmido, se puede observar que se obtuvo un amplificado de 250 pb en dos de la muestras. Pozo: 1. Marcador 100pb (GeneRuler), 2. Plásmido I, 3. Plásmido II, 4. Plásmido III

Cortes del cerebro

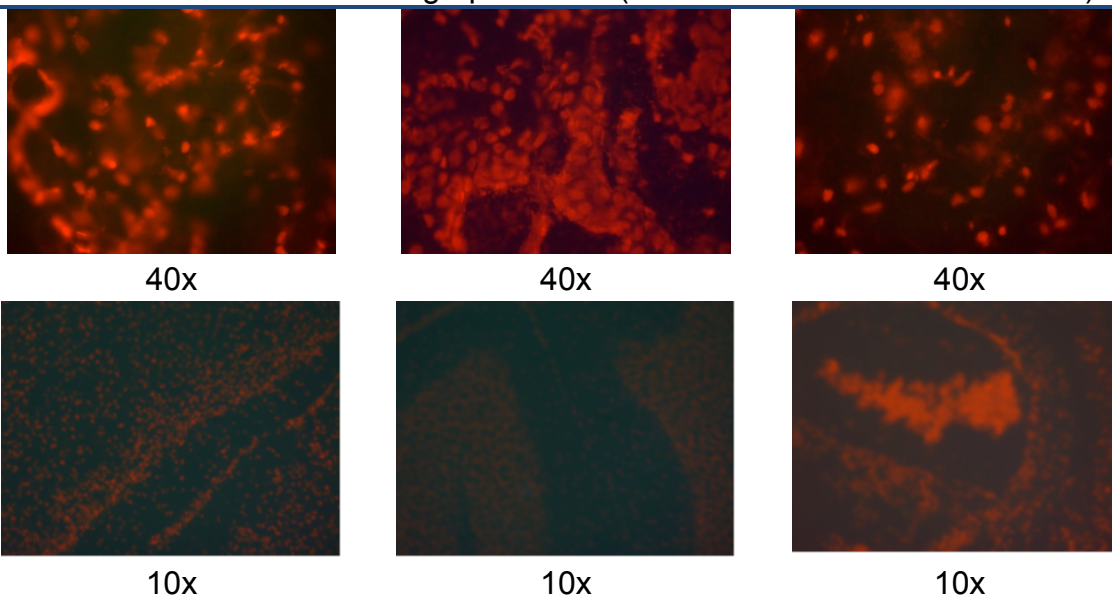
Una vez extraídos los cerebros se les realizaron dos tipos de cortes: cortes transversales y cortes coronales. Los primeros se observaron de forma directa solo tiñendo las células cerebrales con yoduro de propidio lo que les daba un color rojo. Los que se cortaron coronalmente se sometieron a las inmunohistoquímicas con el anticuerpo específico para la proteína verde fluorescente (GFP), lo que mejoró y facilitó la observación de la fluorescencia en el microscopio.

Observación en directo (cortes transversales del cerebro).

Una vez que teníamos los cortes en las laminillas se tiñeron con yoduro de propidio y se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia, en el **cuadro 16** podemos observar 6 fotografías obtenidas del grupo control, las primeras tres se encuentran ampliadas a 40x y las siguientes tres a 10x, se puede observar las células cerebrales teñidas de rojo por el yoduro de propidio, aunque no podemos identificar el tipo de células, ni la región específica del cerebro en donde nos encontramos.

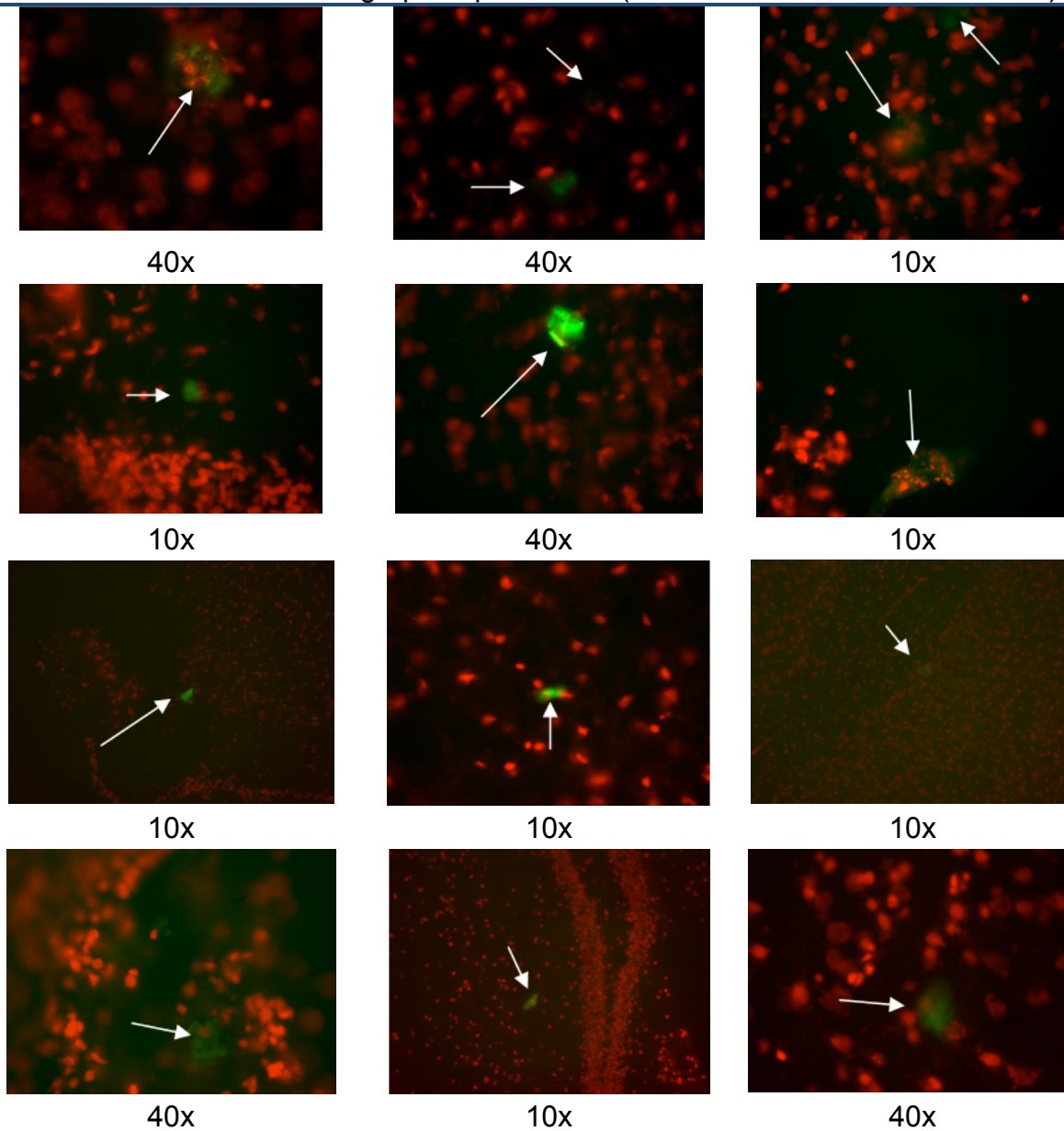
En el **cuadro 17** se observan imágenes representativas del grupo experimental en donde se muestran regiones con fluorescencia alrededor de las células cerebrales teñidas de rojo por el yoduro de propidio, aunque no podemos identificar el tipo de células, ni la región específica del cerebro en donde nos encontramos.

Cuadro 16: Laminillas del grupo control (cortes transversales del cerebro)



En las imágenes podemos observar regiones del cerebro de los grupos control donde solo se observa las células cerebrales teñidas de rojo por yoduro de propidio.

Cuadro 17: Laminillas del grupo experimental (cortes transversales del cerebro)



Microfotografías del grupo experimental donde se observa fluorescencia en algunas regiones del cerebro. Las flechas blancas indican la fluorescencia expresada por la proteína verde fluorescente (GFP) del plásmido pIRES.

Inmunohistoquímicas Anti-GFP (cortes coronales del cerebro)

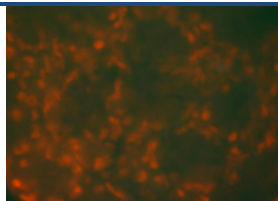
Los cerebros fueron cortados aproximadamente a la mitad coronalmente por lo que al realizar los cortes histológicos en las laminillas, nos encontramos con dos regiones una que iba del corte hacia los bulbos olfatorios y otra que iba del corte hacia el tallo cerebral.



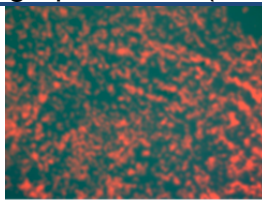
En el **cuadro 18** se presentan microfotografías que corresponden al grupo control, en las cuales no se observa fluorescencia alguna, fueron teñidas con ioduro de propidio por lo que las células cerebrales se observan de color rojo, se desconoce el tipo de células observadas y la región cerebral específica en donde nos encontramos.

En el **cuadro 19** se presentan microfotografías correspondientes al grupo experimental, en las cuales se observa fluorescencia; las primeras seis son imágenes de laminillas que iban de la región de bulbos olfatorios al corte y las últimas seis, de la región del corte al tallo cerebral, en estas laminillas también se desconoce el tipo de células observadas y la región cerebral específica.

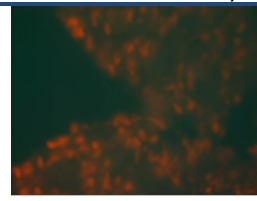
Cuadro 18: Laminillas del grupo control (cortes coronales del cerebro)



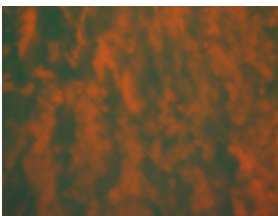
10x



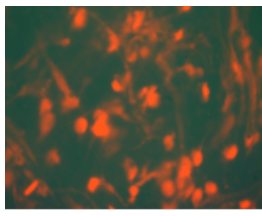
10x



10x



40x



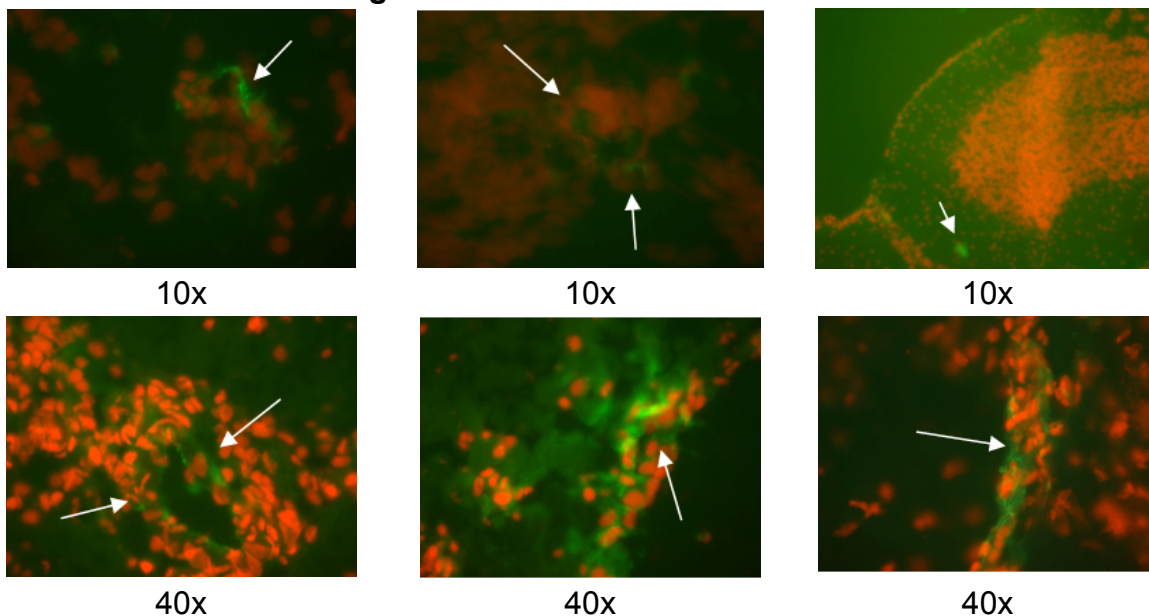
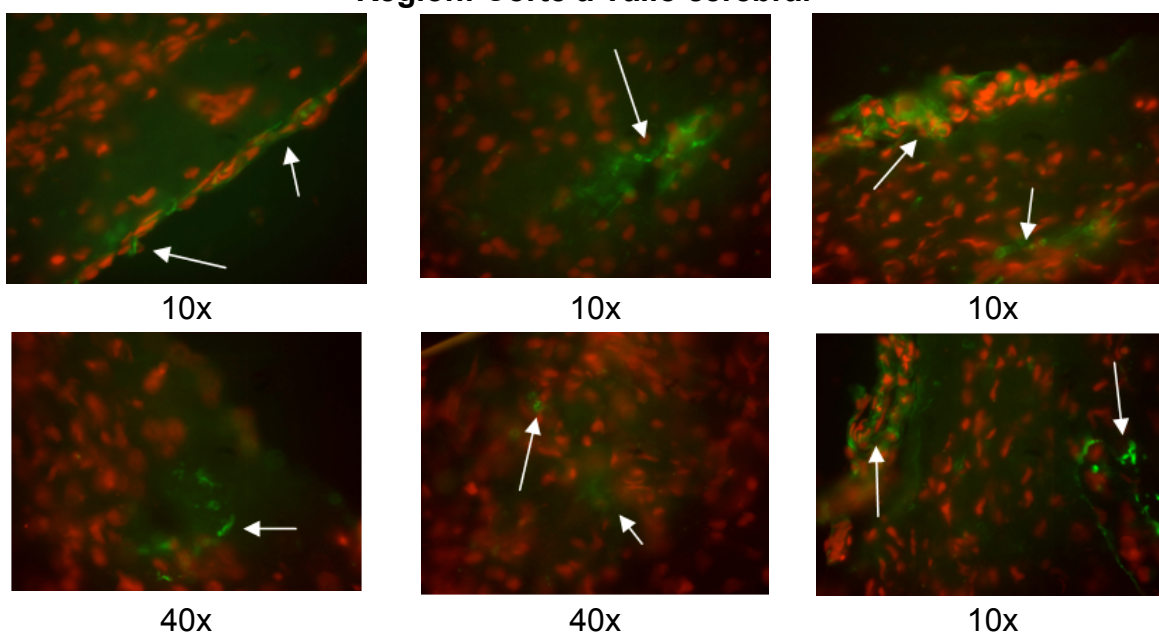
40x



10x

En las imágenes podemos observar regiones del cerebro de los grupos control en las cuales no se encontró fluorescencia, las células cerebrales están teñidas de color rojo por ioduro de propidio.

Cuadro 19: Laminillas del grupo experimental (cortes coronales del cerebro)

Región: Bulbos olfatorios a Corte**Región: Corte a Tallo cerebral**

En estas imágenes se observa fluorescencia alrededor de las células del tejido cerebral (color rojo) del grupo experimental. Las flechas blancas indican la fluorescencia expresada por la proteína verde fluorescente (GFP) del plásmido pIRES.

Comparando las frecuencias y proporciones de la observación de la proteína se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); por lo que se concluye que los resultados positivos que se obtienen dependen de la administración del plásmido.

Extracción de ARN

En los cuadros 20 y 21 se muestra el peso del tejido de cada una de las regiones utilizadas para la extracción de ARN y la concentración que se obtuvo en el espectrofotómetro después de extracción, así como el ajuste de la concentración posterior al tratamiento con DNAsa y el volumen que fue necesario para realizar la RT-PCR, del grupo control y del grupo experimental respectivamente.

Cuadro 20: Peso del tejido, concentración obtenida, ajuste de la concentración y volumen utilizado en la RT-PCR del grupo control

Grupo C2 (control)				
Muestra	peso (g)	Concentración ARN ($\mu\text{g/mL}$)	Ajuste Conc. ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volumen para RT-PCR (μL) ($\approx 2 \mu\text{g}$)
Nervio óptico	261	896	0.56	3.6
Bulbo olfatorio	220	848	0.53	3.8
Corteza frontal	248	840	0.525	3.8
Hipotálamo	71	616	0.385	5.2
Hipocampo	297	2424	1.515	1.3
Amígdala	83	640	0.4	5
Cerebelo	135	744	0.465	4.3
Tallo	197	1504	0.94	2.1

Cuadro 21: Peso del tejido, concentración obtenida, ajuste de la concentración y volumen utilizado en la RT-PCR del grupo experimental

Grupo E2 (experimental)				
Muestra	Peso (g)	Concentración ARN ($\mu\text{g/mL}$)	Ajuste Conc. ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volumen para RT-PCR (μL) ($\approx 2 \mu\text{g}$)
Nervio óptico	372	1064	0.665	3
Nervio Nasal	290	2016	1.26	1.6
Bulbo Olfatorio	302	1288	0.805	2.5
Corteza Frontal	351	1432	0.895	2.2
Hipotálamo	132	1048	0.655	3
Hipocampo	377	1528	0.955	2.1
Amígdala	143	1098	0.686	2.9
Cerebelo	313	1728	1.08	1.9
Tallo	322	1280	0.8	2.5

PCR con primers 18s

Como control interno para corroborar la integridad de nuestro ARN extraído y el funcionamiento de la RT-PCR, el ADN complementario se sometió a una PCR con oligos 18s para formar un amplificado de 300pb, en la imagen 3 se muestra el gel de agarosa ya con los amplificados de esta PCR de cada una de la regiones del grupo control, y en la imagen 4 tenemos a la del grupo experimental.

Grupo C2 (control)

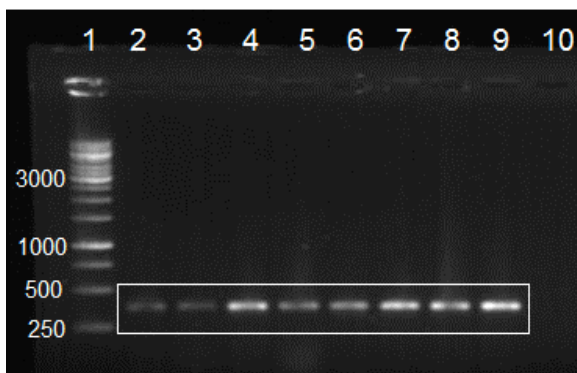


Imagen 3: Gel de agarosa de la PCR con oligos 18s del grupo control, se puede observar que se obtuvo un amplificado aproximadamente 300pb. Pozo: 1. Marcador 1 kb (GeneRuler), 2. Nervio óptico, 3. Bulbo olfatorio, 4. Corteza frontal, 5. Hipotálamo, 6. Hipocampo, 7. Amígdala, 8. Cerebelo, 9. Tallo.

Grupo E2 (experimental)

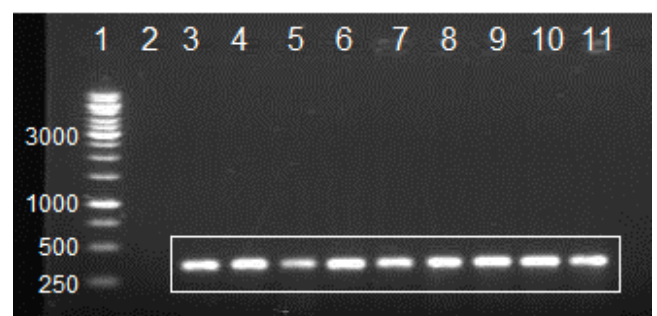


Imagen 4: Gel de agarosa de la PCR con oligos 18s del grupo experimental, se puede observar que se obtuvo un amplificado aproximadamente 300pb. Pozo: 1. Marcador 1 kb (GeneRuler), 2. Negativo, 3. Nervio óptico, 4. Nervio nasal, 5. Bulbo olfatorio, 6. Corteza frontal, 7. Hipotálamo, 8. Hipocampo, 9. Amígdala, 10. Cerebelo, 11. Tallo.

PCR con primers hrGFP

Una vez que teníamos las cantidades idóneas para realizar la PCR se procedió a realizarla con los oligos hrGFP específicos para el gen de nuestra proteína, en la imagen 5 tenemos la PCR del grupo control, donde podemos ver que no amplificó en ninguna región, se observa en algunas regiones como en corteza frontal, hipocampo y tallo que hubo unos amplificados, pero ninguno es de un tamaño específico, lo que nos indica que no estaba presente el plásmido. En la imagen 6 tenemos el gel de la PCR del grupo experimental donde observamos que tenemos un amplificado de 250 pb en todas las regiones, unas más intensa que otras, lo que nos hace suponer que nuestro plásmido llegó y pudo expresarse a todas las diferentes regiones del cerebro.

Grupo C2 (control)

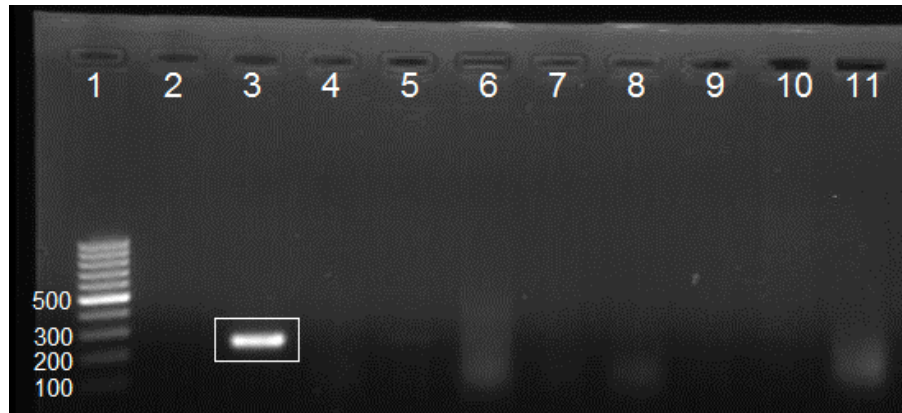


Imagen 5: Gel de agarosa de la PCR con oligos hrGFP del grupo control, solo se puede observar un amplificado aproximadamente a 250pb en el control positivo. Pozo: 1. Marcador 100 pb (GeneRuler), 2. Control negativo, 3. Control positivo, 4. Nervio óptico, 5. Bulbo olfatorio, 6. Corteza frontal, 7. Hipotálamo, 8. Hipocampo, 9. Amígdala, 10. Cerebelo, 11. Tallo.

Grupo E2 (experimental)

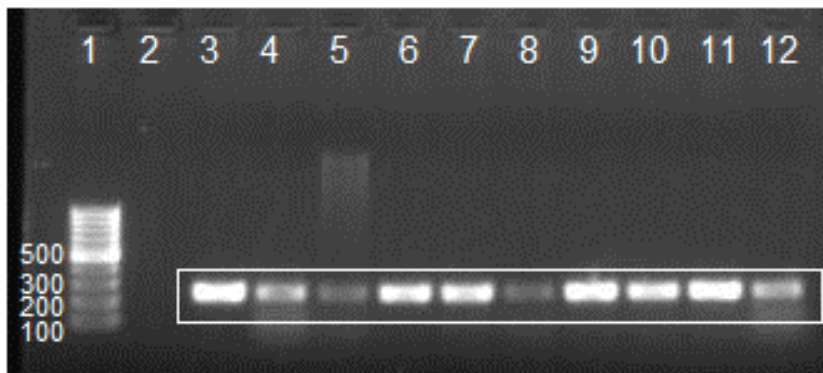


Imagen 6: Gel de agarosa de la PCR con oligos hrGFP del grupo experimental, se observa que hubo un amplificado de 250pb en cada una de las regiones que se trabajaron. Pozo: 1. Marcador 100 pb (GeneRuler), 2. Control negativo, 3. Control positivo, 4. Nervio óptico, 5. Nervio nasal, 6. Bulbo olfatorio, 7. Corteza frontal, 8. Hipotálamo, 9. Hipocampo, 10. Amígdala, 11. Cerebelo, 12. Tallo.

Extracciones de ADN

En los cuadros 22 y 23 se muestra el peso de los tejidos de cada región trabajada y la concentración que se obtuvo en el espectro después de extracción de ADN y el volumen ideal utilizado para realizar la PCR del grupo control y del grupo experimental respectivamente.

Cuadro 22: Peso de los tejidos, concentración del ADN extraído y volumen utilizados para la PCR del grupo control

Grupo C3 (control)			
Muestra	peso (mg)	Concentración ADN (µg/mL)	Volumen para PCR (µL)
Nervio óptico	324	678.8	1.0 µL
Nervio Nasal	33	226.6	3.0 µL
Bulbo olfatorio	49	193.5	3.4 µL
Corteza frontal	284	772.8	0.8 µL
Hipotálamo	58	210.5	3.2 µL
Hipocampo	120	298.6	2.9 µL
Amígdala	77	144.4	3.5 µL
Cerebelo	267	559.4	1.2 µL
Tallo	214	244.2	3.0 µL

Cuadro 23: Peso de los tejidos, concentración del ADN extraído y volumen utilizados para la PCR del grupo experimental

Grupo E3 (Experimental)			
Muestra	peso (g)	Concentración ADN (µg/mL)	Volumen para PCR (µL)
Nervio óptico	367	1123	0.5 µL
Nervio Nasal	63	281.3	2.9 µL
Bulbo olfatorio	99	241.9	3.1 µL
Corteza frontal	274	454.3	2.1 µL
Hipotálamo	100	278.1	2.9 µL
Hipocampo	202	417.6	2.0 µL
Amígdala	72	186.2	3.6 µL
Cerebelo	352	1057	0.7 µL
Tallo	338	710.2	1.1 µL

Gel del ADN extraído

Para verificar la buena integridad se corrieron 5 μ L del ADN extraído de cada región en un gel de agarosa, en la imagen 7 tenemos éste gel donde podemos observar que el ADN genómico extraído tiene buena integridad y es de alto peso molecular ya que hay mayor concentración de material genético en la parte superior del gel en todas las muestras.

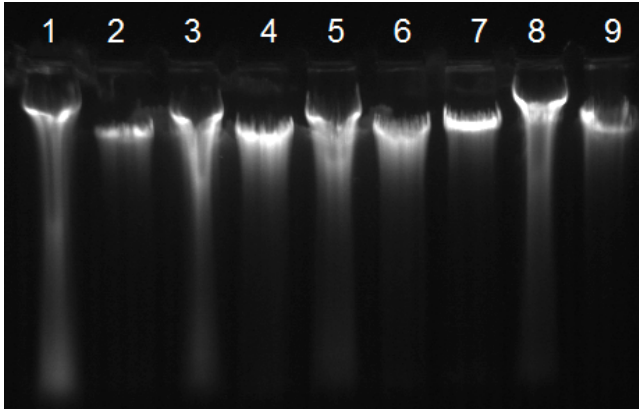


Imagen 7: Gel de agarosa con 5 μ L del ADN extraído. Pozo: 1. Nervio óptico, 2. Nervio nasal, 3. Bulbo olfatorio, 4. Corteza frontal, 5. Hipotálamo, 6. Hipocampo, 7. Amígdala, 8. Cerebelo, 9. Tallo.

PCR con primers 18s

Como control interno y para estandarizar la cantidad de muestra utilizada y su buen funcionamiento se corrió una PCR con oligos 18s que amplifica a 300 pb; en la imágenes 8 y 9 tenemos el gel de agarosa de esta PCR del grupo control y experimental respectivamente en donde se puede observar que en todas las muestras se obtuvo un amplificado de aproximadamente 300 pb a excepción del nervio óptico donde no se logró amplificar en ambos grupos.

Grupo C3 (control)

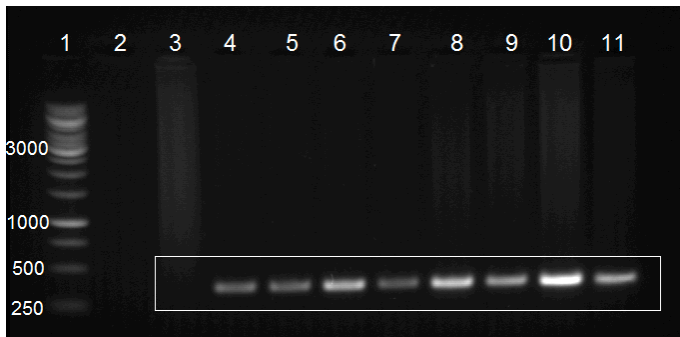


Imagen 8: Gel de agarosa de la PCR con oligos 18s del grupo control, se puede observar que se obtuvo un amplificado de aproximadamente 300 pb en todas la muestra excepto en nervio óptico. Pozo: 1. Marcador 1 kb (GeneRuler), 2. Control negativo, 3. Nervio óptico, 4. Nervio nasal, 5. Bulbo olfatorio, 6. Corteza frontal, 7. Hipotálamo, 8. Hipocampo, 9. Amígdala, 10. Cerebelo, 11. Tallo.

Grupo E3 (experimental)

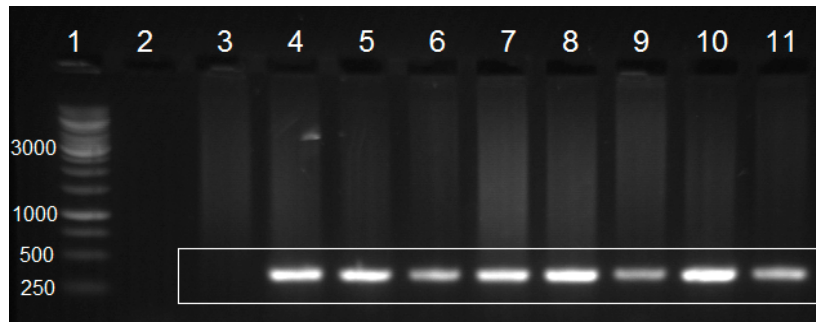


Imagen 9: Gel de agarosa de la PCR con oligos 18s del grupo experimental, se puede observar que se obtuvo un amplificado de aproximadamente 300 pb en todas la muestra excepto en nervio óptico. Pozo: 1. Marcador 1 kb (GeneRuler), 2. Control negativo, 3. Nervio óptico, 4. Nervio nasal, 5. Bulbo olfatorio, 6. Corteza frontal, 7. Hipotálamo, 8. Hipocampo, 9. Amígdala, 10. Cerebelo, 11. Tallo.

PCR con primers hrGFP

Una vez que teníamos las cantidades óptimas se procedió a realizar la PCR con los oligos hrGFP que amplifica a 250 pb para buscar a nuestro plásmido, en la imagen 10 tenemos el gel de la PCR del grupo control, donde se puede observar que en ninguna de las muestras se tuvo amplificado, y en la imagen 11 tenemos el gel de la PCR del grupo experimental en donde observamos un amplificado en las regiones Nervio óptico, bulbo olfatorio, hipotálamo y ligeramente en cerebelo y tallo, lo que nos indica que en el ADN extraído de estas regiones se encontraba el plásmido que administramos.

Grupo C3 (control)



Imagen 10: Gel de agarosa de la PCR con oligos hrGFP del grupo control, se puede observar que no hubo amplificado en ninguna de las muestras. Pozo: 1. Marcador 1 kb (GeneRuler), 2. Control positivo, 3. Nervio óptico, 4. Nervio nasal, 5. Bulbo olfatorio, 6. Corteza frontal, 7. Hipotálamo, 8. Hipocampo, 9. Amígdala, 10. Cerebelo, 11. Tallo.

Grupo E3 (experimental)

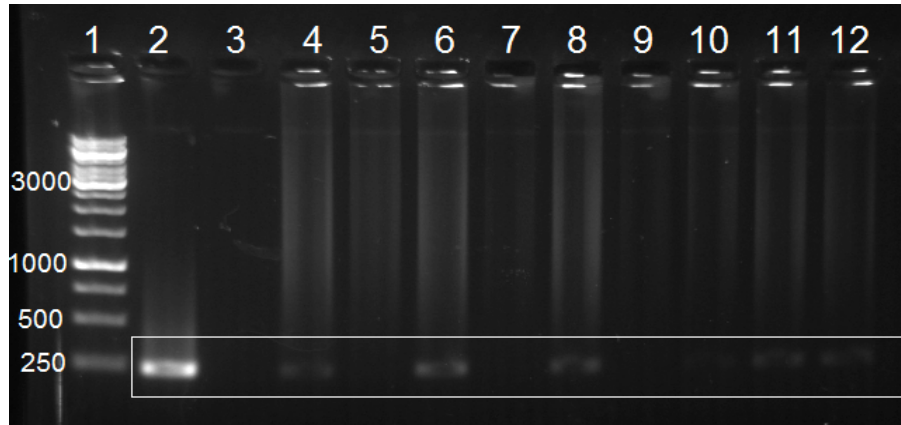


Imagen 11: Gel de agarosa de la PCR con oligos hrGFP del grupo experimental, se puede observar que hubo un amplificado de aproximadamente 250 pb en las regiones Nervio óptico, bulbo olfatorio, hipotálamo y ligeramente en cerebelo y tallo. Pozo: 1. Marcador 1 kb (GeneRuler), 2. Control positivo, 3. Control negativo, 4. Nervio óptico, 5. Nervio nasal, 6. Bulbo olfatorio, 7. Corteza frontal, 8. Hipotálamo, 9. Hipocampo, 10. Amígdalas, 11. Cerebelo, 12. Tallo.

Debido al tamaño de muestra no se cuenta con los datos suficientes para realizar alguna prueba estadística, esto debido a que no se contaba con el suficiente tejido de los órganos para realizar más de una extracción en ambas pruebas. Si se quisiera realizar una prueba más robusta se necesitaría elevar el número de ratones de tal manera que se tuviera suficiente tejido para realizar un mínimo de tres extracciones para que se contara con los datos suficientes para alguna prueba estadística.

Discusión de resultados

Hay un creciente cuerpo de evidencia para el valor terapéutico potencial de los vectores virales para el tratamiento de enfermedades oculares en diferentes modelos animales ^[45, 46, 47]. El desarrollo de la terapia génica ha estado limitado generalmente por la respuesta inmune del huésped al antígeno extraño en el transgén o vector. Aunque el ojo goza de una situación inmunoprivilegiada, la inflamación puede ser provocada por vectores de suministro de genes virales ^[37]. Los vectores virales tales como adenovirus, virus adeno-asociado (AAV) y retrovirus han sido ampliamente utilizados para la terapia génica ocular. Sin embargo, estos sistemas tienen riesgos potenciales asociados con su inmunogenicidad, mutagénesis o potencial de persistencia en el cerebro. Estos efectos secundarios obstaculizan aún más el desarrollo de estos sistemas y de su potencial de aplicación amplia para la terapia génica humana ^[48,49]. Los vectores no virales como los plásmidos son una alternativa prometedora para sustitución de genes y la terapia. Los sistemas no virales se han desarrollado con el fin de superar los inconvenientes de los vectores virales. Son relativamente no inmunogénicos, no provocar ningún respuestas inflamatorias oculares en tejidos importantes, son seguros y tienen baja toxicidad. Además, son fáciles de manejar y pueden ser producidos en grandes escalas, el principal inconveniente de estos sistemas es su eficacia de transfección inferior ^[36].

Antes de realizar este experimento fue necesario producir y purificar al plásmido *pIRES-hrGFP-1a*, se logró obtener buenas concentraciones de dicho plásmido, el cual al correrlo en un gel de agarosa al 1.5 % se observaron dos bandas, esto se debe a que cuando no se usan enzimas de restricción para cortar, los plásmidos pueden formar topoisómeros y corre a diferente velocidad. Al realizarle la PCR con oligos hrGFP específicos nos sirvió para conocer la integridad del plásmido extraído, como en el plásmido del tubo tres no amplifiqué este fue descartado para el experimento, por lo que se utilizó el tubo uno y dos para los experimentos. Para la correcta dosificación del plásmido fue necesario asegurarse que el plásmido fuera absorbido, por lo que se tenía que sujetar a los ratones por un tiempo prolongado lo que era incómodo para los animales, esto se pudo mejorar utilizando soluciones del plásmido más concentradas para que el tiempo de exposición fuera menos y la absorción fuera más rápida.

En el experimento se logró observar a la GFP en los cortes histológicos tanto en muestras en directo, como al realizarles inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos para la GFP; al observar en directo se lograba detectar regiones con fluorescencia solo que estas regiones eran escasas y era complicado encontrarlas a lo largo del corte.

Al realizarles inmunohistoquímicas con los anticuerpos específicos para la GFP se logró encontrar mucho más fácil a la GFP, ya que en estas laminillas se observaba muchas más regiones con fluorescencia y era más fácil ubicarlas; una desventaja es que en algunos cortes del grupo control también se observaban algunas regiones, aunque escasas, con fluorescencia; esto pensamos que se debe a que en algunas laminillas el anticuerpo se precipitaba y con los lavados no se eliminaba completamente por los que nos encontrábamos con estos falsos positivos. Se observó mayor presencia de la proteína cerca de vasos sanguíneos, pero no pudimos identificar que células expresaron la GFP ni saber la región específica donde se encontraba la fluorescencia o el acoplamiento con el anticuerpo, ya que solo fueron contrastadas con yoduro de propidio que tiñe todas las células cerebrales de rojo. Se podría identificar las regiones donde se encuentra y se mejoraría la identificación de las células que expresan la GFP si se realizaran inmunohistoquímicas de doble marcaje utilizando anticuerpos específicos para algunas células cerebrales.

La extracción de ARN confirmó que nuestro plásmido llegaba al cerebro y era expresado por las células de las diferentes regiones cerebrales. Ya que en el nervio óptico también se encontró esta expresión creemos que el plásmido era transportado por esta vía. Se logró obtener una buena cantidad de material genético en éstas extracciones, las concentraciones se vieron dependientes de la cantidad de tejido con el que se disponía de cada región; después de realizar la extracción y cuantificación del ARN se le hizo un tratamiento con DNAsa y el volumen aumento por lo que se tuvo que ajustar la concentración y con las cantidades de este ajuste se calculó el volumen necesario para que al realizar la RT-PCR cada muestra contara con aproximadamente 2 µg de ARN, esto con el objetivo de que la cantidad de ADN complementario obtenido fuera el mismo; a pesar de esto al hacer las PCR's con los oligos 18s como control interno, se tuvo que ajustar el volumen, incluso realizando diferentes diluciones, para que el amplificado fuera homogéneo en cada muestra, tanto en el grupo control como en el grupo experimental. Tomando estos volúmenes como referencia se realizaron las PCR's con los primers hrGFP específicos para la proteína que expresa nuestro plásmido, pero para las muestras con muy poca concentración fue necesario aumentar hasta 42 ciclos, una desventaja de aumentar a tantos ciclos es que en algunas muestras del grupo control se observaba un leve amplificado, esto pensamos que se debe a que se sobreexpuso a muchos ciclos a los oligos o a que al realizar algunas PCR's se pudieron haber contaminado, por lo que solo se expuso a 42 ciclos las muestras con muy poca cantidad de material genético, siempre con controles negativos realizando las PCR's con la pulcritud necesaria para que no se contaminaran; para evitar este inconveniente al realizar las PCR's con el ADN se optó por correrlo a 24 ciclos que son los recomendados para estos oligos.

La extracción de ADN fue utilizada para buscar directamente la presencia del plásmido. La concentración de ADN extraído fue dependiente de la cantidad de tejido que se sometía a dicha extracción. Con la concentración obtenida de cada región se calculó el volumen necesario para que las PCR's con oligos 18s, como control interno, contaran con aproximadamente 600 µg de ADN, aunque en algunas fue necesario ajustar el volumen para obtener un amplificado homogéneo. Se partió del volumen conocido en el control interno para realizar las PCR's con oligos hrGFP, específicos para amplificar una región de nuestro plásmido; estas PCR's, a diferencia de las de ARN se sometieron a 24 ciclos solamente obteniendo un amplificado leve en: nervio óptico, bulbo olfatorio, hipotálamo, cerebelo y tallo. Un dato relevante es que para el caso del nervio óptico no se logró amplificar en ningún grupo (control y experimental) con los oligos 18s del control interno, pero con los primers de la hrGFP si se logró obtener un amplificado, esto pensamos que se debe a que el ADN extraído no tenía una buena integridad debido a que utilizamos no solo el nervio sino también los ojos ya que se contaba con muy poco tejido, pero se logró encontrar el plásmido en alguna parte de esta región. No se sometieron a más ciclos estas muestras debido a que no quisimos sobre exponer nuestras reacciones y que nos dieran falsos positivos.

En los últimos años se ha investigado la llegada de fármacos hacia el cerebro por medio de la administración ocular, un ejemplo es lo reportado por Calza, A. (2011), quienes administraron por esta vía factor de crecimiento nervioso a ratas y lo encontraron tan solo 4 horas después en diferentes regiones cerebrales por medio de inmunohistoquímicas e inmunofluorescencia ^[50]. Debido a su pequeño tamaño relativo las moléculas de los vectores génicos podrían verse favorecidas para ser transportadas hacia el cerebro por la vía ocular. Con nuestros resultados podemos decir que el ojo resulto ser una buena vía de entrada hacia el cerebro, siendo el vector transportado por medio del nervio óptico, estos resultados son concordantes con lo reportado por Lei, B. (2010), quienes encontraron presencia del Virus Adeno-Asociado-9 (VAA9) en las células ganglionares de la retina después de la administración subretinal en ratones por medio de inmunohistoquímicas ^[51]; y lo reportado por Provost, N. (2004), quienes evaluaron la biodistribución de vectores VAA después de la administración intraocular en primates, perros y ratas encontrando por medio de PCR's y inmunohistoquímicas al vector 15 min posteriores a la administración y hasta 25 días en algunos casos, a lo largo de toda la ruta (ojo, nervio óptico y cerebro) ^[45]. Existe pocos reportes de administración de vectores génicos por la vía ocular hacia el cerebro y la mayoría utilizan vectores virales, el más comúnmente utilizado de estos vectores para la transferencia génica tanto preclínica y clínica es el Virus Adeno-Asociado ^[39], por lo que el uso de vectores no virales (plásmidos) es algo innovador y dado los resultados que obtuvimos vale la pena seguir estudiando sobre esta línea de investigación.

Un método ideal de terapia génica debe suministrar genes altamente eficientes en las células diana específicas sin ser tóxicos o inmunogénicos, debe inducir la expresión del transgen a largo plazo sin tener potencial mutagénico y sin integrarse en el genoma del huésped. Por último, debe ser fácil de fabricar y aplicable clínicamente ^[36]. Se necesita una comprensión de los mecanismos implicados en la absorción y paso de los vectores hacia otros órganos.

En el presente trabajo se estudió la ruta de un vector no viral, el plásmido *pIRES-hrGFP-1a* administrado oftálmicamente hacia el cerebro en un modelo murino, mediante la búsqueda de su material genético y la proteína que expresa (GFP) a las 24 horas. El plásmido fue identificado desde el nervio óptico (que pensamos que es la vía que sigue) y en las diferentes regiones cerebrales, esto nos abre la posibilidad de pensar en nuevos enfoques utilizando construcciones plasmídicas como vectores para el envío de genes que expresen proteínas terapéuticas utilizando la vía ocular para su administración.

Conclusión

En este experimento se logró observar que 24 horas posteriores a la administración oftálmica, el plásmido *pIRES-hrGFP-1a* llegaba a diferentes regiones del cerebro, se considera que este plásmido puede funcionar como un vector al ser administrado por esta vía, ya que puede traspasar los epitelios oculares debido a sus características físico-químicas, transportado por el nervio óptico para posteriormente atravesar la BHE y finalmente llegar a las diferentes regiones del cerebro. El *pIRES-hrGFP-1a* puede funcionar como un transportador de genes, así mismo, el ojo resultó ser una excelente vía de entrada hacia el cerebro, lo cual permite el desarrollo de nuevos estudios de terapia génica para enfermedades que involucran estos órganos utilizando este tipo de construcciones como vectores.

Índice de Cuadros

Cuadro 1: Mezcla realizada por muestra.....	34
Cuadro 2: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo C2.....	35
Cuadro 3: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo E2.....	35
Cuadro 4: Condiciones de la PCR.....	36
Cuadro 5: Componentes para la PCR con primers hrGFP del Grupo C2.....	36
Cuadro 6: Componentes para la PCR con primers hrGFP del Grupo E2.....	37
Cuadro 7: Condiciones de la PCR.....	37
Cuadro 8: Cantidad por Reacción (Corning Axygen).....	38
Cuadro 9: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo C3.....	39
Cuadro 10: Componentes para la PCR con primers 18s del Grupo E3.....	39
Cuadro 11: Condiciones de la PCR.....	39
Cuadro 12: Componentes para la PCR con primer hrGFP del Grupo C3.....	40
Cuadro 13: Componentes para la PCR con primer hrGFP del Grupo E3.....	40
Cuadro 14: Condiciones de la PCR.....	40
Cuadro 15: Concentraciones de los plásmido producidos y purificados.....	43
Cuadro 16: Laminillas del grupo control (cortes transversales del cerebro).....	44
Cuadro 17: Laminillas del grupo experimental (cortes transversales del cerebro)....	45
Cuadro 18: Laminillas del grupo control (cortes coronales del cerebro).....	46
Cuadro 19: Laminillas del grupo experimental (cortes coronales del cerebro).....	47
Cuadro 20: Peso del tejido, concentración obtenida, ajuste de la concentración y volumen utilizado en la RT-PCR del grupo control.....	48
Cuadro 21: Peso del tejido, concentración obtenida, ajuste de la concentración y volumen utilizado en la RT-PCR del grupo experimental.....	48
Cuadro 22: Peso de los tejidos, concentración del ADN extraído y volumen utilizados para la PCR del grupo control.....	51
Cuadro 23: Peso de los tejidos, concentración del ADN extraído y volumen utilizados para la PCR del grupo experimental.....	51

Referencias

1. Soriano C, Guillazo-Blanch G, Redolar-Ripoll DM, Torras-García M & Vale-Martínez A. Fundamentos de Neurociencia. México: UOC; 2007.
2. Wiechers EG. Oftalmología en la práctica de la medicina general. 3rd ed. México: Mc GrawHill; 2009.
3. Peña L. Servicio de Oftalmología Hospital Sótero del Río [Internet]. Santiago de Chile: Agosto 2012. [Citado Enero 2012]; [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <http://anatomiadelojo.blogspot.mx/>
4. Alward MD, Wallace LM. Glaucoma Los requisitos en oftalmología. España: Harcourt; 2001.
5. Riordan-Eva P, Whitcher JP. Oftalmología general de Vaughan y Asbury. 14a ed. México: Manual Moderno; 2009.
6. Facultad de Medicina Universidad de la Frontera [Internet]. Chile: Temuco. [Actualizado 21 de enero de 2014; citado 22 de enero de 2014]. [Aprox. 1 pantallas]. Disponible en: http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/14_vias_aferentes_archivos/Page397.htm
7. Silbernagl S, Despopoulos A. Fisiología, texto y atlas. 7a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2009.
8. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomía, fisiología y patología del hombre. España: Reverté; 1993.
9. Fox SI. Fisiología humana. 12a ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
10. Rohkamm R. Neurología, texto y atlas. 3a ed. México: Médica Panamericana; 2011.
11. Waxman SG. Neuroanatomía correlativa. 11a ed. México: Manual Moderno; 2001.
12. Dugdale DC. Reid Hospital and Health Care Service [Internet]. Los Ángeles [Actualizado 29 de Agosto de 2012; citado 22 de enero de 2014]. [Aprox. 1 pantallas]. Disponible en: <http://reidhosp.adam.com/content.aspx?productId=39&pid=5&qid=001421&print=1>

13. Garg A, Sheppard JD, Donnenfeld ED, Friedlaender M. Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. Argentina: Médica Panamericana; 2007.
14. Streilein JW. Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18(3): 357-70.
15. Akpek EK, Gottsch JD. Immune defense at the ocular surface. *Eye (Lond)*. 2003; 17: 949-56.
16. Gilger BC. Immunology of the ocular surface. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2008; 38: 223–31.
17. Forrester JV, Xu H. Good news–bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol*. 2012; 3: 1-18.
18. Zierhut M, Dana MR, Stern ME, Sullivan DA. Immunology of the lacrimal gland and ocular tear film. *Trends Immunol*. 2002; 23(7): 333-5.
19. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy*. 2007; 92: 36–49.
20. Forrester JV, Xu H, Lambe T, Cornall R. Immune privilege or privileged immunity?. *Mucosal Immunol* 2008; 1(5): 372-81.
21. Stein-Streilein J. Immune regulation and the eye. *Trends Immunol*. 2008; 29(11): 548-54.
22. Streilein JW, Masli S, Takeuchi M, Kezuka T. The Eye's view of antigen presentation. *Human Immunol*. 2002; 63: 435-43.
23. McMenamin PG. Dendritic cells and macrophages in the uveal tract of the normal mouse eye. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83: 598-604.
24. Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin JE, Wilson CG. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 2010-32.

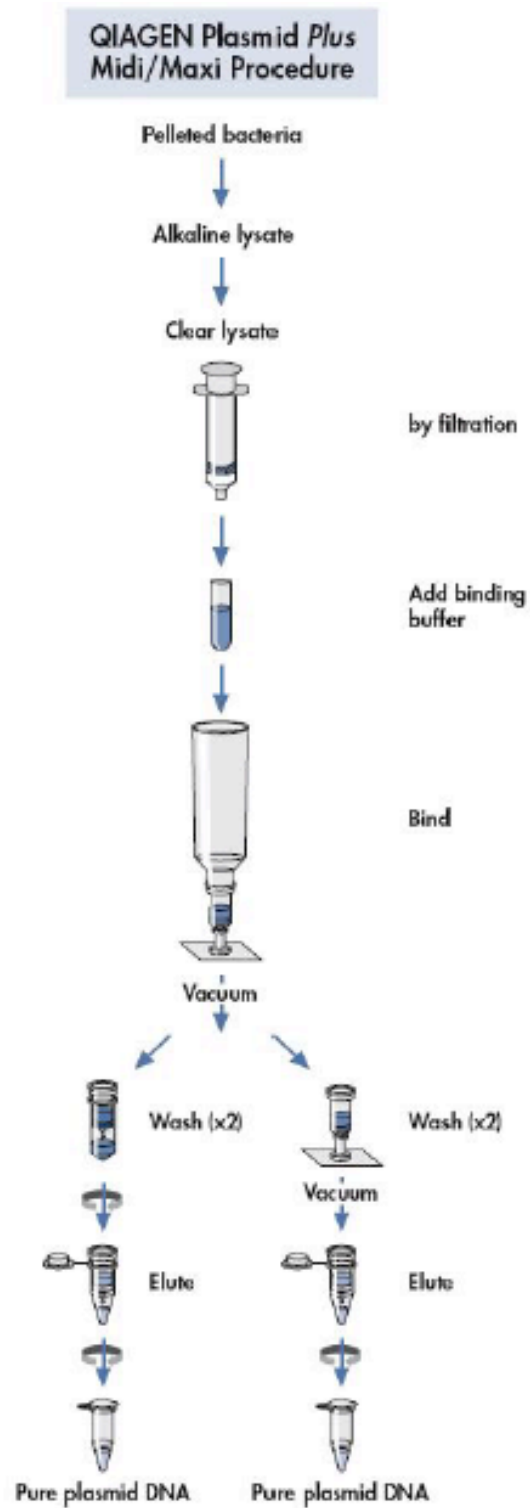
25. Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res*. 2009; 26(5):1197-216.
26. Thrimawithana TR, Young S, Bunt CR, Green C, Alany RG. Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discov Today*. 2011; 16(5): 270-7.
27. Järvinen K, Järvinen T, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1995; 16: 3-19.
28. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58:1131-5.
29. Geroski DH, Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(5): 961-4.
30. Hosoya K, Lee V, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005; 60: 227-40.
31. Mannermaa E, Vellonen KS, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood–retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58:1136-63.
32. Verstraelen J, Reichl S. Expression analysis of MDR1, BCRP and MRP3 transporter proteins in different in vitro and ex vivo cornea models for drug absorption studies. *Int J Pharm*. 2013; 441(1-2): 765-75.
33. Pleyer U, Ritter T. Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye. *Prog Retin Eye Res*. 2003; 22: 277-93.
34. Al-Saikhan FI, The gene therapy revolution in ophthalmology. *Saudi J Ophthalmol*. 2013; 27(2): 107-11.
35. Jiménez-Escrig A. Textbook of neurogenetics. España: Ediciones Díaz de Santos; 2007.

36. Bloquel C, Bourges JL, Touchard E, Berdugo M, Ben-Ezra D, Behar-Cohen F. Non-viral ocular gene therapy: Potential ocular therapeutic avenues. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58:1224-42.
37. Liu X, Brandt CR, Rasmussen CA, Kaufman PI. Ocular drug delivery: molecules, cells, and genes. *Can J Ophthalmol* 2007; 42:447-54.
38. Colella P, Cotugno G, Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. *Trends Mol Med*. 2008; 15(1): 23-31
39. Lipinski DM, Thake M, MacLaren RE. Clinical applications of retinal gene therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2013; 32: 22-47
40. Klausner EA, Peer D, Chapman RL, Multack RF, Andurkar SV. Corneal gene therapy. *J Control Release* 2007; 124: 107-13.
41. Mohan RR, Tovey JC, Sharma A, Tandon A. Gene therapy in the cornea: 2005-present. *Prog Retin Eye Res*. 2012; 31: 43-64.
42. Tsien RY, The green fluorescent protein. *Ann Rev Biochem*. 1998; 67:509-44.
43. Yang F, Moss LG, Phillips GN. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 1996; 14(10): 1246-51.
44. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. México: Diario oficial de la federación; 1999.
45. Provost N, Meur GL, Weber M, Mendes-Madeira A, Podevin G, Cherel Y, et al. Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Molecular therapy*. 2005; 11(2): 275-283.
46. Wen SF, Chen Z, Nery J, Faha B. Characterization of adenovirus p21 gene transfer, biodistribution, and immune response after local ocular delivery in New Zealand white rabbits. *Experimental Eye Research*. 2003; 77: 355–365.
47. Al-Saikhan FI. The gene therapy revolution in ophthalmology. *Saudi J Ophthalmol*. 2013; 27(2): 107–11.
48. Ali Y, Lehmussaari K. Industrial perspective in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006; 58: 1258–1268.

49. Bessis N, Garcia-Cozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy*. 2004; 11: S10–S17.
50. Calza A, Florenzano F, Pellegrini D, Tirassa P. Time-dependent activation of c-fos in limbic brain areas by ocular administration of Nerve Growth Factor in adult rats. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2011; 27(3): 209-218.
51. Lei B, Zhang K, Yue Y, Ghosh A, Duan D. Adeno-Associated Virus Serotype-9 mediated retinal outer plexiform layer transduction is mainly through the photoreceptors. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 664: 671-678.

Anexos

Anexo 1



TRI Reagent® Solution

RNA / DNA / Protein Isolation Reagent

Part Number AM9738 100 mL



Homogenization



1. Homogenize tissue samples in 10-20 volumes TRI Reagent solution. Homogenize cultured cells in 1 ml TRI Reagent solution per $5-10 \times 10^4$ cells, or per 10 cm^2 culture dish area.
2. Incubate the homogenate for 5 min at room temp.
3. (Optional) Centrifuge at $12,000 \times g$ for 10 min at 4°C and transfer the supernatant to a fresh tube.

RNA Extraction



DNA &
protein
isolation

4. Add 100 μL BCP per 1 ml of TRI Reagent solution, mix well, and incubate at room temp for 5-15 min.
5. Centrifuge at $12,000 \times g$ for 10-15 min at 4°C , then transfer the aqueous phase to a fresh tube.

RNA Precipitation and Wash



6. Add 500 μL of isopropanol per 1 ml of TRI Reagent solution, vortex for 5-10 sec, and incubate at room temp for 5-10 min.
7. Centrifuge at $12,000 \times g$ for 8 min at $4-25^\circ\text{C}$, and discard the supernatant.
8. Add 1 ml of 75% ethanol per 1 ml of TRI Reagent solution.
9. Centrifuge at $7,500 \times g$ for 5 min, remove the ethanol, and briefly air dry the RNA pellet.

RNA Solubilization



10. Dissolve RNA in the buffer of your choice.

Anexo 3

Preparing the 2× Reverse Transcription Master Mix

Prepare the 2× RT master mix using the kit components before preparing the reaction plate.

To prepare the 2× RT master mix (per 20-μL reaction):

1.	Allow the kit components to thaw on ice.																											
2.	Referring to the table below, calculate the volume of components needed to prepare the required number of reactions. Note: Prepare the RT master mix on ice. <table><tr><th>Component</th><th colspan="2">Volume/Reaction (μL)</th></tr><tr><th></th><th>Kit with RNase Inhibitor</th><th>Kit without RNase Inhibitor</th></tr><tr><td>10X RT Buffer</td><td>2.0</td><td>2.0</td></tr><tr><td>25X dNTP Mix (100 mM)</td><td>0.8</td><td>0.8</td></tr><tr><td>10X RT Random Primers</td><td>2.0</td><td>2.0</td></tr><tr><td>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</td><td>1.0</td><td>1.0</td></tr><tr><td>RNase Inhibitor</td><td>1.0</td><td>—</td></tr><tr><td>Nuclease-free H₂O</td><td>3.2</td><td>4.2</td></tr><tr><td>Total per Reaction</td><td>10.0</td><td>10.0</td></tr></table> IMPORTANT! Include additional reactions in the calculations to provide excess volume for the loss that occurs during reagent transfers.  WARNING CHEMICAL HAZARD. 10X Reverse Transcription Buffer may cause eye, skin, and respiratory tract irritation. Read the MSDS, and follow the handling instructions. Wear appropriate eyewear, clothing, and gloves.	Component	Volume/Reaction (μL)			Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor	10X RT Buffer	2.0	2.0	25X dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8	10X RT Random Primers	2.0	2.0	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0	RNase Inhibitor	1.0	—	Nuclease-free H ₂ O	3.2	4.2	Total per Reaction	10.0	10.0
Component	Volume/Reaction (μL)																											
	Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor																										
10X RT Buffer	2.0	2.0																										
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8																										
10X RT Random Primers	2.0	2.0																										
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0																										
RNase Inhibitor	1.0	—																										
Nuclease-free H ₂ O	3.2	4.2																										
Total per Reaction	10.0	10.0																										
3.	Place the 2X RT master mix on ice and mix gently.																											



Usage Information

I. Standard Application

Reagents to be Supplied by the User

template DNA	downstream primer
upstream primer	mineral oil (optional)

1. Thaw the GoTaq® Green Master Mix at room temperature. Vortex the Master Mix, then spin it briefly in a microcentrifuge to collect the material at the bottom of the tube.
2. Prepare one of the following reaction mixes on ice:

For a 25µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5µl	1X
upstream primer, 10µM	0.25–2.5µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	0.25–2.5µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	25µl	N.A.

For a 50µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25µl	1X
upstream primer, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	50µl	N.A.

For a 100µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	50µl	1X
upstream primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	100µl	N.A.

3. If using a thermal cycler without a heated lid, overlay the reaction mix with 1–2 drops (approximately 50µl) of mineral oil to prevent evaporation during thermal cycling. Centrifuge the reactions in a microcentrifuge for 5 seconds.
4. Place the reactions in a thermal cycler that has been preheated to 95°C. Perform PCR using your standard parameters.

II. General Guidelines for Amplification by PCR

A. Denaturation

- Generally, a 2-minute initial denaturation step at 95°C is sufficient.
- Subsequent denaturation steps will be between 30 seconds and 1 minute.

B. Annealing

- Optimize the annealing conditions by performing the reaction starting approximately 5°C below the calculated melting temperature of the primers and increasing the temperature in increments of 1°C to the annealing temperature.
- The annealing step is typically 30 seconds to 1 minute.

C. Extension

- The extension reaction is typically performed at the optimal temperature for Taq DNA polymerase, which is 72–74°C.
- Allow approximately 1 minute for every 1kb of DNA to be amplified.
- A final extension of 5 minutes at 72–74°C is recommended.

D. Refrigeration

- If the thermal cycler has a refrigeration or "soak" cycle, the cycling reaction can be programmed to end by holding the tubes at 4°C for several hours.
- This cycle can minimize any polymerase activity that might occur at higher temperatures, although this is not usually a problem.

E. Cycle Number

- Generally, 25–30 cycles result in optimal amplification of desired products.
- Occasionally, up to 40 cycles may be performed, especially for detection of low-copy targets.

III. General Considerations

A. GoTaq® Green Master Mix Compatibility

GoTaq® Green Master Mix is compatible with common PCR additives such as DMSO and betaine. These additives neither change the color of GoTaq® Green Master Mix nor affect dye migration.

If both agarose gel analysis and further downstream applications involving absorbance or fluorescence will be used, the two dyes can be removed from reactions using standard PCR clean-up systems such as the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Cat.# A9281).

B. Primer Design

PCR primers generally range in length from 15–30 bases and are designed to flank the region of interest. Primers should contain 40–60% (G + C), and care should be taken to avoid sequences that might produce internal secondary structure. The 3'-ends of the primers should not be complementary to avoid the production of primer-dimers. Primer-dimers unnecessarily deplete primers from the reaction and result in an unwanted polymerase reaction that competes with the desired reaction. Avoid three G or C nucleotides in a row near the 3'-end of the primer, as this may result in nonspecific primer annealing, increasing the synthesis of undesirable reaction products. Ideally, both primers should have nearly identical melting temperatures (T_m); in this manner, the two primers should anneal roughly at the same temperature. The annealing temperature of the reaction is dependent upon the primer with the lowest T_m . For assistance with calculating the T_m of any primer, a T_m Calculator is provided on the BioMath page of the Promega web site at: www.promega.com/biomath/

C. Amplification Troubleshooting

To overcome low yield or no yield in amplifications (e.g., mouse tail genotyping applications), we recommend the following suggestions:

- Adjust annealing temperature. The reaction buffer composition affects the melting properties of DNA. See BioMath Calculator to calculate the melting temperature for primers in the GoTaq® reaction (www.promega.com/biomath/).
- Minimize the effect of amplification inhibitors. Some DNA isolation procedures, particularly genomic DNA isolation, can result in the copurification of amplification inhibitors. Reduce the volume of template DNA in reaction or dilute template DNA prior to adding to reaction. Diluting samples even 1:10,000 has been shown to be effective in improving results, depending on initial DNA concentration.
- Increase template DNA purity. Include an ethanol precipitation and wash step prior to amplification to remove inhibitors that copurify with the DNA.
- Add PCR additives. Adding PCR-enhancing agents (e.g., DMSO or betaine) may improve yields. General stabilizing agents such as BSA (Sigma Cat.# A7030; final concentration 0.16mg/ml) also may help to overcome amplification failure.

D. More Information on Amplification

More information on amplification is available online at the Promega web site: www.promega.com/products/pcr/

Anexo 5

AxygenTaq Polymerase

TAQ POLYMERASE KIT FROM AXYGEN BIOSCIENCE IS SUPPLIED COMPLETE WITH 10X STANDARD TAQ BUFFER with

magnesium, buffer without magnesium and magnesium chloride so it can be used for a range of applications. Taq is supplied at a concentration of 5 units/ μ l. Master Mixes and dNTPs are also available.

Reagents Supplied

- Standard Taq Polymerase - 500 units
- Taq Reaction Buffer - 1 ml
- Taq Reaction Buffer Mg, Free - 1 ml
- Magnesium Chloride - 1 ml

Source

An *E. coli* strain that carries the Taq DNA Polymerase gene from *Thermus aquaticus*.

Unit Definition

One unit is defined as the amount of enzyme that will incorporate 10 nmol of dNTP into acid-insoluble material in 30 minutes at 75°C.

PROTOCOL: STANDARD PCR

Taq DNA polymerase is a thermostable DNA polymerase that possesses a 5'→3' polymerase activity and a double-strand specific 5'→3' exonuclease activity.

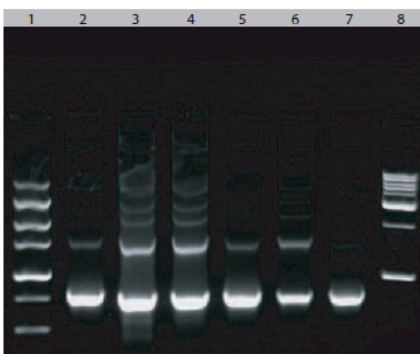
1. Add 1.0 to 2.0 units Taq DNA polymerase
2. Add 200 μ m of each dNTP
3. 0.2-0.5 μ m each primer

4. 2-50 pg plasmid or 50-500 ng genomic template
5. 1 x buffer (supplied at 10x concentration)
6. Denature at 94°C
7. Extend 1 minute/kb

Storage Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.5% Tween 20, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 50% Glycerol.

10x Taq Reaction Buffer: 500mM Tricine (pH 8.0), 120mM Potassium Acetate, 30 mM Magnesium Sulphate, 0.1% Triton X-100; and 50 μ g/ml BSA (DNA and RNA free).

10x Taq Reaction Buffer Magnesium Free: 500mM Tricine (pH 8.0), 20mM Potassium Acetate, 0.1% Triton X-100; And 50 μ g/ml BSA (DNA And RNA Free).



Axygen Taq – Proven quality: 756 bp PCR fragment was generated by using 50 ng of pUC vector (template DNA) and 5 units of Axigen TAQ. Primers concentration, dNTP and buffer were used as specified by different vendors.

From 100 μ l of PCR reaction mixtures, 10 μ l of reaction mixture was loaded in a gel to visualize the quality of PCR fragment.

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Lane 1. Standard DNA ladder | Lane 5. Company Q |
| Lane 2. Company P | Lane 6. Company C |
| Lane 3. Company N | Lane 7. Axigen Taq |
| Lane 4. Company B | Lane 8. Standard DNA ladder |

- Highly pure Taq polymerase from a recombinant source
- High activity for standard PCR applications; gives high yields
- Supplied with 10X buffer that has optimum levels of Mg^{++}
- Exceptional value compared to high price brands
- Can be stored at ambient temperatures for short periods

APPLICATIONS :

- ✓ Polymerase Chain Reaction (PCR)
- ✓ High-Throughput PCR
- ✓ Primer Extension
- ✓ DHPLC
- ✓ Microarray Analysis

Long Term Storage: -20°C
Shelf Life: 12 months at -20°C

License Notice: The PCR process is the subject of European Patent Nos. 201,184 and 200,262 owned by Hoffmann-La Roche and licensee Applied Biosystems. These PCR patents expired in March 28, 2006 and the corresponding PCR process patents in the United States expired on March 29, 2005. However some other applications of Taq polymerase may require a license. This depends on the application and it is the sole responsibility of the buyer to ensure that use of the product does not infringe the patent rights of third parties.



DESCRIPTION	QTY	CATALOG NO.	DESCRIPTION	QTY	CATALOG NO.
Taq Polymerase	500 Units	PCR-TAQ-R-5	dNTP mixture (100 mM total conc. 25 mM each dNTP)	100 μ mol/unit	PCR-DNTP-M-100
Taq Polymerase	1000 Units	PCR-TAQ-R-10	Taq Polymerase Master Mix 5X	1 ml/unit	PCR-TAQ-MX-1
dNTPset (25 μ mol/dNTP, 100 mM)	100 μ l	PCR-DNTP-S-254			
dUTP (25 μ mol, 100 mM)	25 μ mol	PCR-DUTP-R-25			