



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

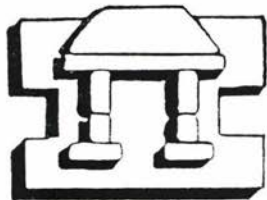
---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

SOBRE-EXPRESION DEL FACTOR NEUROTROFICO  
DERIVADO DE CEREBRO EN CELULAS GLIALES

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
P R E S E N T A :  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
ANA LETICIA ARREGUI MENA

DIRECTOR DE LA TESIS: DR. JOSE VICTOR SEGOVIA VILA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, T.LALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO

JULIO 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**U.N.A.M. CAMPUS**

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Carrera de Biología**

**Sobre-expresión del Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro en  
Células Gliales**

**Tesis que presenta**

**Ana Leticia Arregui Mena**

**Para obtener el título de  
Licenciado en Biología**

**Director de la tesis: Dr. José Víctor Segovia Vila**

**Los Reyes Iztacala, Estado de México**

**Julio del 2002**

Introducción	4
Enfermedad de Huntington (EH), epidemiología, etiología y alternativas terapéuticas	4
El Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF), características	7
Transducción de señales de BDNF	8
Las sinapsis y BDNF	11
Acción de BDNF en distintas poblaciones celulares	11
Acción de BDNF ante diferentes tipos de daños	12
Niveles de BDNF y sus receptores en la EH	12
BDNF y su efecto en la diferenciación y sobrevivencia de las células espinosas medianas del estriado	13
Evidencias contradictorias	14
Estrategia experimental para incrementar los niveles de BDNF en el estriado	14
Objetivos de la terapia génica en sistema nervioso central	15
Los objetivos de la terapia génica en este proyecto	15
Adenovirus recombinantes, características y ventajas	16
Sistema AdEasy	17
Astrocitos como plataforma de expresión de moléculas terapéuticas en el cerebro	20
Aumento de la expresión de GFAP en la EH y su relación con el control del transgen	20
Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Material y Métodos	22
Construcción del vector pgfa2-BDNF	22
Eliminación de los sitios de restricción PmeI y ClaI del vector pgfa2-BDNF	24
Construcción del vector pgShuttle-BDNF	24
Construcción del vector pgATBDNF	25
Verificación de la integridad de los plásmidos pgfa2-BDNF, pgShuttle-BDNF y pgATBDNF por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
Cultivo celular	27
Obtención de células C6-BDNF	27
Identificación del ARNm del transgen	28
Inmunocitoquímica de células C6-BDNF	28

Resultados y Discusión	30
Componentes de los vectores	31
¿Qué sentido tiene haber construido tres vectores tan semejantes?	32
Construcción de vectores	33
Reacción en cadena de la polimerasa para verificar la integridad del transgen	40
Obtención de las células C6-ATBDNF	41
Expresión del ARNm del transgen BDNF	43
Expresión de la proteína BDNF	44
Perspectivas	45
Conclusiones	47
Referencias	48

## Introducción

### **Enfermedad de Huntington, epidemiología, etiología y alternativas terapéuticas**

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurológico hereditario que afecta a 8 de cada 100,000 personas en todo el mundo (Conneally, 1984), y cuyos primeros síntomas aparecen generalmente entre los 30 a 40 años de edad. Existe una forma juvenil de la enfermedad, cuyos síntomas son generalmente más graves y tienen una esperanza de vida menor.

El síntoma característico de esta enfermedad es la corea, que se define como un estado de movimiento excesivo y espontáneo con un ritmo irregular, abrupto y al azar de las extremidades. La corea se intensifica progresivamente, mientras que las funciones cognitivas se deterioran hasta la demencia. Estos síntomas motores, son acompañados por cambios psiquiátricos como la depresión. Finalmente, los movimientos se reducen en intensidad y frecuencia, y el síndrome hipercinético es remplazado por un síndrome hipocinético, el cual termina 15 años después de los primeros síntomas con la muerte del paciente.

A nivel histopatológico, se observa una pronunciada muerte neuronal en el caudado putamen, dando como consecuencia un aumento en el tamaño de los ventrículos laterales. Todo esto acompañado de pérdida celular en la corteza cerebral y atrofia cerebral generalizada (Fig. A). La principal población neuronal que se pierde en el estriado son las neuronas espinosas medianas (Graveland et al., 1985), las cuales son GABA-érgicas y proyectan hacia el subtálamo, globo pálido y sustancia nigra, además de ser inmunoreactivas a DARP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc).

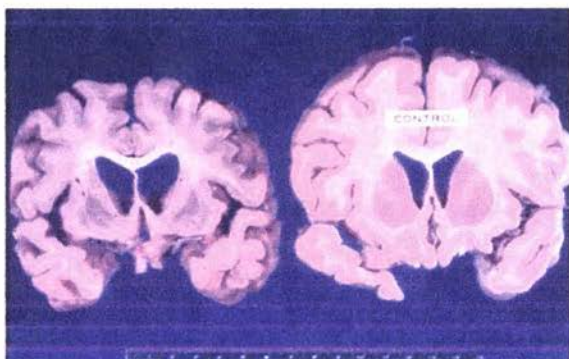


Figura A. Corte coronal de cerebros humanos *post mortem* al nivel del caudado-putamen. A la izquierda el cerebro de un paciente con EH y a la derecha el cerebro de un paciente control. En el cerebro con EH se observa la degeneración del núcleo caudado y el consecuente incremento en el tamaño de los ventrículos laterales ([pathology.mc.duke.edu/neuropath/CNSlecture4/hdgross.jpg](http://pathology.mc.duke.edu/neuropath/CNSlecture4/hdgross.jpg)).

A nivel genético, la EH es causada por un defecto en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3), que codifica para la proteína huntingtina de más de 3000 residuos de amino ácidos (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993) (Fig. B).

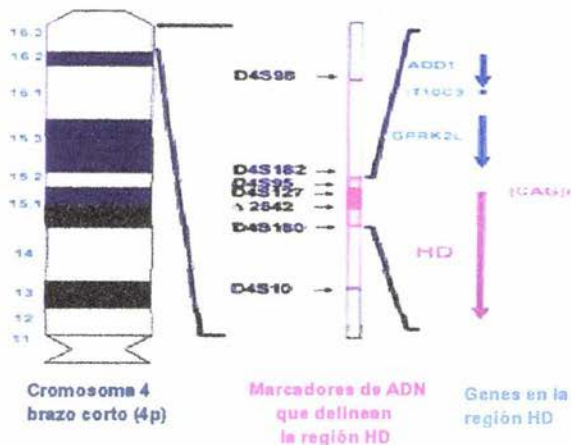


Figura B. Esquema representativo del brazo corto del cromosoma cuatro, en el cual se muestran los repetidos de CAG en el gen de la huntingtina ([www.gbhap.com/magazines/neuroscience/3-23-focus.htm](http://www.gbhap.com/magazines/neuroscience/3-23-focus.htm)).

El exón 1 del gen silvestre contiene un fragmento ininterrumpido de repetidos de CAG, el cual es traducido a glutaminas. Los individuos asintomáticos tienen 35 ó menos repetidos, mientras que la EH es causada por expansiones de 36 repetidos en adelante (Rubinsztein et al. 1996). Existe una relación inversa entre el número de repetidos de CAG y la edad de inicio de la enfermedad; a mayor número de repetidos de CAG, el inicio de la enfermedad es más temprana. Cuando la EH aparece hasta la edad adulta la mayoría de los pacientes presentan un número de repetidos entre 40 y 50, mientras que los pacientes que presentan esta enfermedad en la etapa juvenil presentan una expansión de más de 55 repetidos.

*Esta enfermedad se transmite de forma autosómica dominante: las personas homocigotas para la huntingtina mutante (Htt<sup>ex</sup>) no presentan diferencias en los síntomas o en el inicio de la enfermedad comparados con los heterocigotos (Fig. C).*

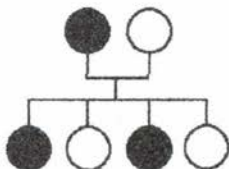


Fig. C. Pedigrí de una familia afectada por la EH, donde se observa el patrón de herencia *autosómico dominante*. Como se observa, el padre o madre heterocigoto afectado por la enfermedad, hereda a su progenie el defecto genético con 50 por ciento de probabilidad.



Los mecanismos por los cuales el incremento de repetidos de CAG daña y finalmente destruye a las neuronas, aún no está claro, pero algunas de las hipótesis incluyen la promoción de apoptosis; la toxicidad de agregados formados por la huntingtina mutante y otras proteínas; daños transcripcionales (aumento o disminución de la transcripción de otras proteínas); uniones catastróficas de la proteína mutante con otras proteínas impidiendo su función; compromiso metabólico (alteraciones energéticas); y "envenenamiento" del proteosoma por los agregados causados por la huntingtina mutante (Tobin y Signer, 2000) (Fig. D).

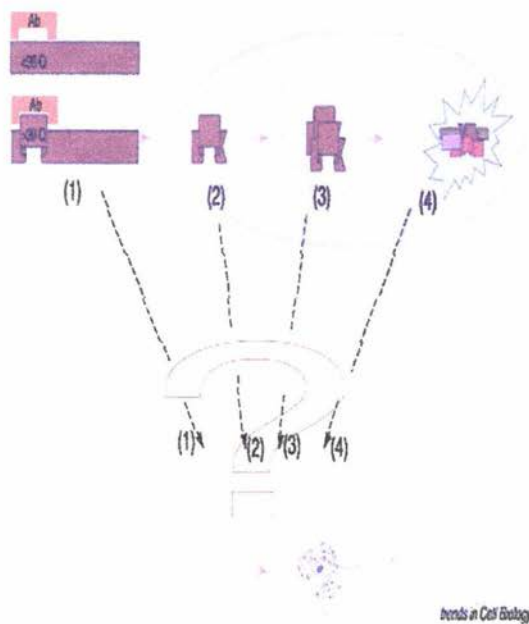


Fig. D. Posibles eventos celulares en la patogénesis de la EH. La huntingtina ( $Htt^{wt}$ , a la izquierda), se vuelve patogénica cuando el tracto de poliglutaminas excede 36 repetidos ( $Htt^{ex}$ , abajo a la izquierda). Anticuerpos monoclonales (amarillo) reconocen selectivamente la región expandida de repetidos, lo que indica que la expansión de poliglutaminas tiene una conformación diferente.  $Htt^{ex}$  puede desencadenar la patogénesis, o esta puede depender de la subsecuente agregación y procesamiento de la proteína (arriba a la derecha). Estos fragmentos (2) se pueden autoagregar (3), y luego formar inclusiones (4) que también pueden contener otras proteínas que pueden tener fragmentos de poliglutaminas. La función neuronal está comprometida (abajo), pero no se sabe cuál es la causa (centro), puede ser toda  $Htt^{ex}$  (1), un fragmento de  $Htt^{ex}$  (2), un agregado de fragmentos de  $Htt^{ex}$  (3), o una inclusión que contiene  $Htt^{ex}$  y otras moléculas (Tobin y Signer, 2000).

Existen evidencias que sugieren que en la neuropatología de la EH también está involucrado el estrés oxidativo, pero la mayoría de la evidencia es indirecta. Cerebros post-mortem de la EH muestran un incremento la oxidación de ADN, lo cual es un indicio del daño oxidativo (Browne et al., 1997). También se ha encontrado una disminución en las enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutasa) y la forma oxidada del glutatión en cerebros post-mortem (Sian et al., 1994). Además, en un protocolo clínico empleando el antioxidante  $\alpha$ -tocoferol en pacientes con EH, se mostró una pequeña disminución en la velocidad de declinación neurológica si este se administraba al inicio de la enfermedad (Peyser et al., 1995). Asimismo, en un modelo de la EH, empleando ratones transgénicos R6/1, se mostró que el aumento en el daño oxidativo medido por la peroxidación de lípidos ocurre de manera paralela que el aumento de los síntomas (Pérez-Severiano et al., 2000) y éste se ha asociado a alteraciones en el sistema antioxidante celular del estriado (Santamaría et al., 2001).

A pesar de que la enfermedad se puede diagnosticar desde una edad temprana (varios años antes de los primeros síntomas) ya que se conoce el defecto genético, actualmente el tratamiento de la EH se limita a controlar los síntomas. Sin embargo, todos estos medicamentos no detienen, ni disminuyen el proceso de la enfermedad.

Por lo anterior se han desarrollado diversas alternativas terapéuticas y diferentes modelos de estudio. Las estrategias terapéuticas que se han desarrollado para el tratamiento de la EH, son principalmente de dos tipos: restaurativas y preventivas.

Las estrategias restaurativas involucran los implantes intracerebrales de células estriatales fetales (Horellou y Mallet, 1998). Se ha encontrado que los implantes de tejido estriatal fetal humano pueden sobrevivir, desarrollarse y no son afectados por el proceso de la enfermedad, al menos por 18 meses luego de ser transplantado a un paciente con la EH (Freeman et al. 2000). La estrategia restaurativa a pesar de ser un tratamiento "esperanzador", no detiene o disminuye la continua degeneración del estriado, lo cual debe ser considerado en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En cambio, las estrategias preventivas tienen la finalidad de proteger a las células neuronales del proceso neurodegenerativo y así prevenir la aparición de los síntomas. Una de estas alternativas es el uso de factores tróficos, los cuales se espera que mantengan los sistemas originales del individuo y eviten la continua degeneración del estriado.

Varios factores tróficos han sido probados en la protección de las neuronas espinosas medianas estriatales de la muerte celular exitotóxica *in vivo*, con resultados positivos. Entre ellos el factor nervioso de crecimiento (NGF) (Martínez-Serrano y Björklund, 1996), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Anderson et al., 1996, Emerich et al., 1997) y el factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF) (Araujo y Hilt, 1997).

Otro factor neurotrófico que ha demostrado su efectividad en la protección de las neuronas espinosas medianas, es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), del cual se hablará con más detalle a continuación.

### ***El Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF), características***

BDNF forma parte de una familia de moléculas conocidas como neurotrofinas, que promueven la sobrevivencia y la especificidad fenotípica de las neuronas. Las neurotrofinas son proteínas, altamente básicas de aproximadamente 13 kDa que forman dímeros, los cuales son biológicamente activos (Lewin y Barde, 1996; Ip y Yancopoulos, 1996; McDonald y Chao, 1995) y tienen una estructura altamente conservada (Barde, 1994). Esta familia incluye a cinco miembros, el factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF), el factor neurotrófico

derivado del cerebro (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), la neurotrofina 3 (neurotrophin 3, NT3), la neurotrofina 4/5 (neurotrophin 4/5, NT4/5) y la neurotrofina 6 (neurotrophin 6), esta última sólo se ha identificado en peces.

Las neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores de superficie celular: el receptor de baja afinidad ó p75 que es miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral; y la familia de receptores de tirosina cinasa relacionados con la tropomiosina cinasa (tropomyosin-related kinase Trk) (Bothwell, 1995). Todas las neurotrofinas se unen al receptor p75, a diferencia de la familia de receptores de Trk, la cual comprende moléculas altamente relacionadas las cuales poseen un dominio de unión a ligando, y selectivamente interactúa con las especies de neurotrofinas. TrkA se une específicamente a NGF; TrkB interactúa con BDNF y NT 4/5; y TrkC se une preferentemente a NT3 (Fig. E).

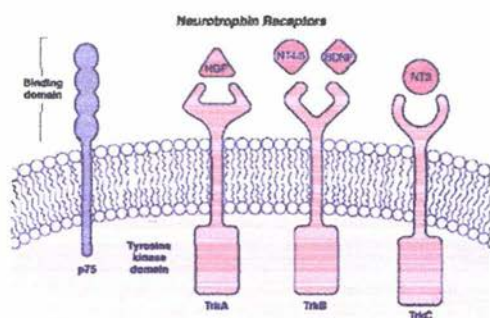


Fig. E. Esquema de los receptores de neurotrofinas. La familia de neurotrofinas se une específicamente a la familia de receptores Trk. El receptor de neurotrofinas p75 posee una baja afinidad y se une a todas las neurotrofinas. NT neurotrofina; BDNF brain-derived neurotrophic factor, NGF nerve growth factor (Siegel, et al. 1998).

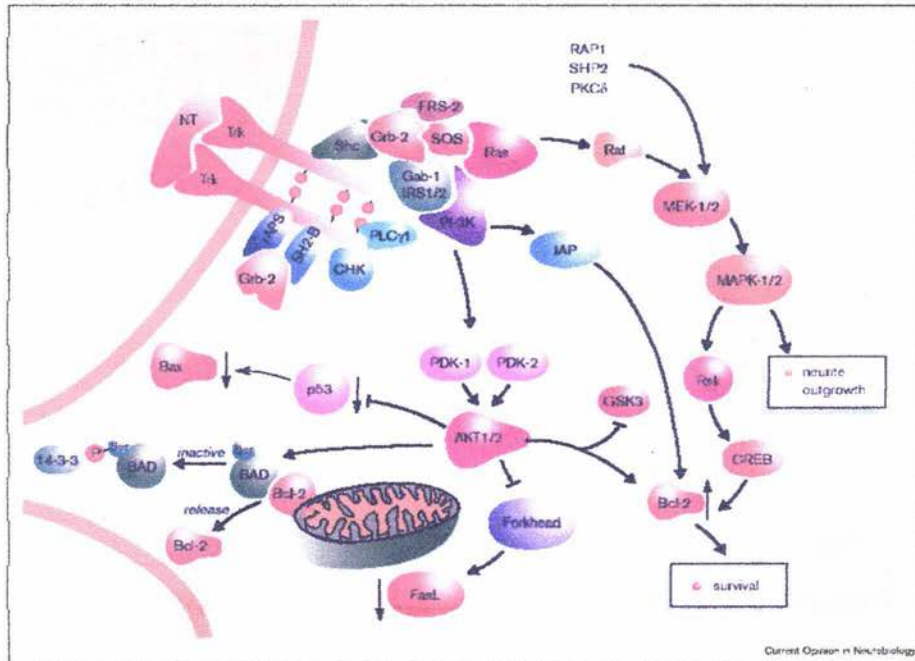
### Transducción de señales de BDNF

Una vez que las neurotrofinas se han unido a su receptor, los receptores se dimerizan y activan varias vías de transducción. Posteriormente, el complejo receptor-neurotrofina es internalizado y transportado retrógradamente del axón al soma de la neurona (McDonald y Chao, 1995).

A través de los receptores Trk, las neurotrofinas activan varias vías intracelulares, incluyendo las controladas por Ras, las de la familia Cdc42/Rac/RhoG, MAPK, PI3K y PLC- $\gamma$ , que afectan el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso (Patapoutian y Reichardt, 2001) (Fig. F).



U.N.A.M. CAMPUS



IZT.

Fig. F. Vías de señalización que regulan la sobrevivencia y el crecimiento de neuritas en las células neuronales. La neurotrofina (NT) se une a los receptores Trk estimulando la autofosforilación del receptor, que da como resultado el reclutamiento de varias proteínas de señalización en el receptor (Kaplan y Miller, 2000).

*p75 puede potenciar la actividad de Trk por la activación de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, en la mayoría de los casos, p75 actúa como un receptor que estimula la apoptosis mediante la unión del ligando, induciendo la actividad de la vía JNK-p53-Bax, y de otras proteínas que regulan la muerte celular como NRIF. (Fig. G)*

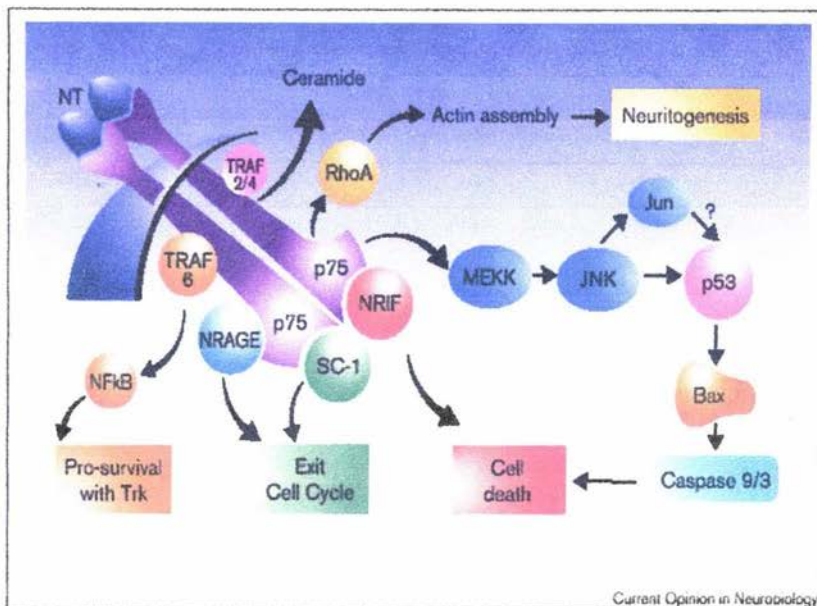


Fig. G. Las vías de señalización de p75. p75 interactúa con varias proteínas, incluyendo TRAF2, 4 y 6, NRAGE, SC-1, y RhoA, que participan en la supervivencia celular, regulación del ciclo celular y crecimiento de neuritas. p75 también incrementa los niveles de ceramida y activa la vía JNK-p53-Bax de muerte celular.

Trk, a través de Ras y probablemente PI-3K/Akt, puede interferir con la apoptosis mediada por p75, suprimiendo la vía JNK-p53-Bax, o inhibiendo la actividad de proteínas de muerte celular como Forkhead. p75, en cambio, puede suprimir las vías de supervivencia y crecimiento celular inducidas por Trk, posiblemente a través de la inhibición mediada por ceramidas de Akt y Raf.

Las vías funcionales de transducción entre Trk y p75 se entrecruzan y al parecer determinan el desarrollo y la reparación del sistema nervioso, luego de un daño o una enfermedad neurodegenerativa como la EH. Aunque ya se conocen varias vías de transducción de señales, como se mencionó anteriormente, se conoce muy poco acerca de su función durante el proceso neurodegenerativo. Por ejemplo, Canals y colaboradores en 1999, observaron un incremento en los niveles de ARNm de TrkB después de inyectar agonistas glutamatérgicos en el estriado de ratas, lo cual les llevó a pensar que este efecto era el resultado de procesos de plasticidad sináptica o de protección neuronal del daño excitotóxico.

### ***Las sinapsis y BDNF***

El descubrimiento de que las neurotrofinas tienen un efecto agudo en el sistema nervioso maduro y pueden modular la eficiencia sináptica, ha forzado a una reevaluación substancial del papel de estas moléculas en la modulación del comportamiento dinámico en el sistema nervioso. Ya que las neurotrofinas se descubrieron por su función en el desarrollo del sistema nervioso (Lo, 1995; Thoenen, 1995).

La aplicación directa de neurotrofinas al cerebro de animales resulta en la generación coordinada de potenciales de acción en grandes poblaciones de neuronas. La base de este efecto es el resultado de la liberación estimulada por neurotrofinas de neurotransmisores y el aumento de la eficiencia sináptica. Este efecto ha sido investigado usando neuronas en cultivo en las que la adición de BDNF en el medio de cultivo resulta en un incremento en la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas presinápticas. Por lo que BDNF puede actuar a intervalos cortos para regular la transmisión sináptica, un papel no atribuido anteriormente a estas moléculas.

Recíprocamente, la actividad sináptica puede provocar la liberación de neurotrofinas, y agudamente, regular la síntesis de estos factores. Es común que las concentraciones fisiológicas de neurotrofinas en el Sistema Nervioso Central (SNC) sean reguladas por la actividad neuronal del cerebro. Existen numerosos ejemplos que muestran claramente que la síntesis de las neurotrofinas, principalmente BDNF, es estimulada luego de la liberación de neurotransmisores. Un creciente cuerpo de evidencias sugieren que existe una intrincada interrelación entre la habilidad de las neurotrofinas para regular la actividad sináptica en el cerebro y el efecto de dicha actividad en la síntesis de neurotrofinas y su secreción. La estimulación sináptica aumentada de las neuronas puede entonces regular positivamente la síntesis de las neurotrofinas.

### ***Acción de BDNF en distintas poblaciones celulares***

El análisis de las acciones específicas de BDNF es notoriamente complejo, debido al hecho de que la neurotrofina 4/5 (NT4/5) también se une y activa el receptor TrkB. A pesar de esto, los ratones "knock out" han ayudado a discernir esta controversia: los animales en que el gen Trk B ha sido inactivado, mueren entre el primer y segundo día de nacidos, mientras que los ratones en los el gen del BDNF, fue eliminado mueren en la primera y segunda semanas de nacidos, en cambio los ratones "knock out" de la NT4/5 muestran un fenotipo poco alterado.

El espectro de blancos de BDNF en el sistema nervioso periférico comprende a las neuronas ganglionares sensitivas periféricas y a las neuronas parasimpáticas de los núcleos de los ganglios. En el SNC, BDNF permite la sobrevivencia y el

crecimiento de las neuronas colinérgicas de la base del cerebro anterior, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, las neuronas espinosas medianas del estriado, las células retinales ganglionares y algunas neuronas motoras.

Estudios *in vitro* han demostrado que BDNF actúa promoviendo la sobrevivencia de neuronas colinérgicas de la base del cerebro anterior, neuronas mesencefálicas dopaminérgicas y gabaérgicas, y neuronas granulares del cerebelo.

### ***Acción de BDNF ante diferentes tipos de daños***

Se ha demostrado que BDNF disminuye la degeneración neuronal inducida por diferentes tipos de daños. BDNF protege a las neuronas dopaminérgicas contra el daño producido por 6-hidroxidopamina y el ión N-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), mejorando la resistencia de neuronas cultivadas derivadas de varias regiones del SNC, incluidas las corticales, del septum, cerebelares e hipocampales, ante la hipoglicemia y/o daños excitotóxicos. Aún mas, inyecciones intraventriculares de BDNF disminuyen la muerte neuronal en la región hipocampal CA1 provocada por isquemia en ratas. (Nakao et al. 1995).

### ***Niveles de BDNF y sus receptores en la EH***

Para poder ejercer su efecto en el estriado, los receptores de BDNF deben estar presentes, mientras que la neurotrofina puede sintetizarse o no en este lugar. De manera endógena en las neuronas espinosas del estriado, se encuentra el receptor TrkB, el receptor de alta afinidad de BDNF, el cual media los efectos benéficos de BDNF. La mayoría del BDNF en el estriado, es suministrado por transporte anterogrado desde la corteza y las neuronas de la sustancia nigra (Altar et al. 1997). Esto se ha corroborado por los bajos niveles de ARNm de BDNF en el estriado, aunque los niveles de proteína BDNF son considerables en esta región (Kolbeck et al. 1999).

BDNF es transportado anterogradamente desde la corteza, en donde la transcripción de BDNF se encuentra regulada de forma positiva por la huntingtina silvestre y de forma negativa por la huntingtina mutada, disminuyendo así la producción de BDNF en la corteza y por tanto sus niveles en el caudado putamen (Zucato et al. 2001). La disminución transcripcional de BDNF en la corteza por la huntingtina mutante explica porque Ferrer y colaboradores (2000) al examinar la expresión de BDNF por ensayo de western blot e inmunohistoquímica en cerebros de pacientes *post-mortem*, que sufrieron la EH y al compararlos con pacientes control de la misma edad, encontraron que BDNF se encuentra reducida en un 52-82% en el caudado y putamen de los enfermos. Sin embargo, no observaron diferencias en la corteza parietal y temporal, ni en el hipocampo. Esto demuestra una disminución selectiva de BDNF en las regiones vulnerables a la EH, y sugiere que la sobreexpresión de BDNF puede tener efectos benéficos en el tratamiento de la EH.

### ***BDNF y su efecto en la diferenciación y sobrevivencia de las células espinosas medianas del estriado***

Además de las evidencias anteriores, en las que se relaciona de forma indirecta la disminución de BDNF en las zonas mayormente afectadas en la EH, existen evidencias directas respecto a los beneficios inducidos por este factor neurotrófico a las células espinosas medianas.

BDNF en cultivos primarios de estriado promueve la diferenciación de las neuronas GABAérgicas ya que incrementa el contenido celular de GABA (gama amino butírico acid) resultado de un incremento en la actividad de la holoenzima que sintetiza GABA, la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), así como una elevación en la recaptura de GABA. También, las neuronas recién diferenciadas presentaron elaboradas neuritas y una fuerte inmunoreactividad a GABA; estas alteraciones fueron causadas por una regulación positiva del ARNm de GAD67 y el transportador neuronal, GAT-1. Además BDNF incrementa la frecuencia de las neuronas inmunoreactivas a parvalbumina y calbindina, así como el contenido del neuropéptido Y y la somatostatina (Mizuno et al. 1994). Ventimiglia y colaboradores en 1995 confirmaron que BDNF incrementa la sobrevivencia y diferenciación de las células estriatales gabaérgicas inmunopositivas a calbindina, aumentando además el número de neuritas, el área total de arborización y el soma.

El efecto neuroprotector de BDNF ha sido demostrado en dos modelos *in vitro* de la EH: en el primero, BDNF protegió a las células estriatales en cultivo expuestas a estrés excitotóxico, además de aumentar su sobrevivencia y diferenciación morfológica (Nakao et al., 1995); en el segundo, BDNF abolió completamente la apoptosis observada en células estriatales transfectadas con la Huntingtina mutante (Sadou et al., 1988). Estos resultados sugieren que BDNF ejerce un papel neuroprotector ante daños citotóxicos y apoptosis.

También se ha demostrado su efectividad *in vivo* en la protección de las neuronas estriatales, mediante la transducción adenoviral de BDNF en un modelo excitotóxico de rata de la EH. Las lesiones inducidas por QUIN (ácido quinólinico) se vieron disminuidas en un 55% y la sobrevivencia fue del 64% en el grupo tratado con los adenovirus de BDNF comparadas con el control (Bemelmans et al., 1999).

Otra evidencia *in vivo* que sugiere que BDNF puede ser útil en el tratamiento de la EH fue aportada por Perez-Navarro y colaboradores en el 2000. Este grupo construyó varias líneas celulares que expresan BDNF, neurotrofina 3 o neurotrofina 4/5 e implantaron éstas células en el estriado de ratas. Posteriormente inyectaron ácido quinolínico, el cual produce muerte gradual de las células estriatales. Los estriados implantados fueron protegidos de la muerte por la inyección de quinolínico, principalmente los implantados con células productoras de BDNF.



### ***Evidencias contradictorias***

A pesar de estos antecedentes, se han observado evidencias contradictorias. Martínez-Serrano y Björklund en 1996, encontraron que la modificación genética de células madre para producir BDNF no prevenía de forma significativa del daño excitotóxico al estriado; por el contrario células madre productoras de NGF sí previnieron del daño. Estos resultados pueden deberse a que las células productoras de NGF tenían una velocidad de secreción de 2 ng por hora por 10 000 células en cambio las células productoras de BDNF sólo secretaban 0.28 ng por hora por 10 000 células.

Anderson y colaboradores (1996), y Araujo y Hilt (1997), encontraron que la administración de BDNF mediante una bomba osmótica, no protegió a las neuronas estriatales de la muerte inducida por la inyección de ácido quinolínico. Ya que ambos grupos emplearon el mismo sistema de administración de BDNF, probablemente esta sea la causa de que sus resultados no hayan resultado favorables, pues otros investigadores empleando sistemas diferentes de administración han encontrado lo contrario como se mencionó anteriormente.

También Petersén y colaboradores (2001) en un cultivo primario de neuronas estriatales encontraron que BDNF no previene la muerte de las neuronas estriatales inducida por dopamina, a pesar de que sí inhibió la apoptosis y la producción de radicales libres, probablemente por que la dopamina activaba vías de muerte distintas. Este modelo considera que la dopamina en el estriado puede participar en la muerte selectiva de las neuronas espinosas medianas, pero como se mencionó anteriormente, actualmente no se conoce con precisión la causa de la muerte específica de esta población neuronal, por lo que estas evidencias, aunque son importantes no se pueden considerar definitivas.

### ***Estrategia experimental para incrementar los niveles de BDNF en el estriado***

La transferencia de genes es una nueva aproximación para la protección del SNC. Esta se basa en la idea de suplir con proteínas exógenas al cerebro, puede disminuir la neurodegeneración y/o estimular procesos de restauración en la región afectada del cerebro. En general, al proceso de transferencia de ácidos nucleicos con objetivos terapéuticos se le conoce como terapia génica.

### ***Objetivos de la terapia génica en sistema nervioso central***

Para que la terapia génica sea eficaz, la transferencia de genes al cerebro debe ser estable, regulable y segura. Para alcanzar estos objetivos, se deben considerar los siguientes puntos. Primero, se requiere de un vector de transferencia (viral o no viral) con una gran capacidad de clonación para poder incorporar los genes de interés con reguladores y/o promotores. Segundo, si el vector de transferencia es viral, es conveniente que presente una alta eficiencia en la transducción y un alto título viral, lo cual es importante para poder expresar genes en poblaciones específicas. Tercero, la expresión del gen terapéutico deberá ser a largo plazo, esto se ve afectado por la inactivación del promotor empleado. Cuarto, la inclusión de secuencias dentro del vector que regulen los niveles del transgen pueden ser necesarios para el control terapéutico. Quinto, la especificidad en la expresión del gen transferido en neuronas o glia, depende de la especificidad del vector o del uso de promotores específicos. Finalmente, la transferencia efectiva de genes deberá estar exenta de efectos citotóxicos y de la activación de la respuesta inmune (Costantini et al. 2000).

### ***Los objetivos de la terapia génica en este proyecto***

El objetivo a largo plazo de este proyecto es aumentar la sobrevivencia de las neuronas espinosas medianas del estriado, mediante la sobre-expresión de BDNF en los astrocitos del estriado de pacientes con EH. El transgen BDNF se encontrará regulado a nivel transcripcional por el promotor de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) y se empleará el sistema adenoviral como sistema de transferencia. Los detalles para alcanzar este objetivo, considerando los objetivos de la terapia génica antes mencionados son los siguientes.

Primero, se empleó un vector adenoviral, que presenta una gran capacidad de clonación, aproximadamente 7.5 kb. Esto permitió insertar el transgén BDNF de 1.08 kb, además del promotor de la proteína glial fibrilar ácida (gfa2) de 2.2 kb, y un fragmento de la protamina de ratón que provee de un intrón y un sitio de poliadenilación (0.5 kb).

Segundo, los vectores adenovirales son los sistemas de transferencia más eficientes en una gran variedad de tejidos y se pueden obtener a altas concentraciones hasta  $1 \times 10^{12}$  partículas virales por ml, lo cual favorece la transferencia de genes en volúmenes pequeños (Kay et al. 2001).

Tercero, la expresión a largo plazo del gen terapéutico BDNF, se logró con el promotor gfa2, el cual ha demostrado estar activo por al menos cuatro semanas (Cortez et al. 2000).

Cuarto, los niveles apropiados del producto fueron regulados por el mismo promotor. Se sabe que este promotor es regulado de forma positiva por daños físicos, químicos, así como daños etiológicos en los que se incluyen varias enfermedades entre ellas la EH (Besnard et al, 1991; Segovia 1998a).

Quinto, la especificidad también fue dada por el promotor, el cual se expresa específicamente en astrocitos (Segovia et al. 1998a,b).

Finalmente, en lo que respecta a la toxicidad, los adenovirus, representan una relativa desventaja pues pueden inducir una respuesta inflamatoria (Byrnes et al. 1995), aunque la expresión de BDNF puede proteger de la toxicidad del adenovirus (Bemelmans et al. 1999).

Existen diferentes antecedentes en la transferencia de factores tróficos al cerebro, en los cuales se han empleado técnicas *ex vivo* e *in vivo*. Las técnicas *ex vivo* consisten en la modificación genética de células, las cuales son posteriormente implantadas en el cerebro. En lo que respecta a la transferencia del transgen al cerebro de forma *ex vivo* se han utilizado líneas celulares tumorogénicas o cultivos primarios de fibroblastos. Pero recientemente, la generación de líneas inmortalizadas de células madre neurales derivadas del SNC han permitido la refinación de la transferencia genética *ex vivo* (Martínez-Serrano A y Björklund A, 1996). También se ha empleado la transferencia directa *in vivo* mediante la inyección intracerebral de adenovirus recombinantes, y se ha observado una mayor eficiencia en la transferencia *in vivo* que en la *ex vivo*. (Bemelmans et al. 1999).

### **Adenovirus recombinantes, características y ventajas**

Considerando más eficiente la transferencia *in vivo* que la *ex vivo*, en el presente trabajo de tesis se construyeron dos vectores que son el primer paso en la construcción de adenovirus recombinantes de BDNF utilizando el sistema adenoviral desarrollado por He y colaboradores en 1998.

Los adenovirus más empleados en terapia génica son los adenovirus humanos con serotipo número 5, pues su genoma es el más conocido y consiste en una molécula lineal de ADN de doble cadena de 36 kb, lo que permite la introducción de transgenes hasta de 7.5 kb .

El genoma de los adenovirus está dividido en unidades de transcripción para su estudio. Las unidades de transcripción de los adenovirus convencionalmente se dividen en tempranas (E1, E2, E3, y E4) o tardías según su expresión temporal durante el inicio de la replicación del ADN viral. Los genes que son manipulados para la recombinación generalmente son: E1, cuya supresión afecta la replicación e inhabilita la producción de partículas infecciosas en las células

blanco; E3, la cual codifica proteínas involucradas en evadir el sistema inmune del hospedero y es dispensable para la producción de virus. Los transgenes de interés son introducidos en el lugar de estos genes virales (E1 y E3) y los productos de estos genes son proporcionados por las células emparadoras, HEK293 (He et al. 1998).

Las ventajas del uso de adenovirus son múltiples. Tienen un amplio tropismo y una baja patogenicidad en humanos. La infección y su posterior expresión no dependen del estado de replicación de la célula como los retrovirus. Tienen una alta eficiencia de replicación y se pueden obtener a altos títulos virales en el laboratorio, lo cual es una gran ventaja para la terapia génica en cerebro. El sistema adenoviral que se empleó en este proyecto puede incluir hasta 7.5 kb de ADN transgénico. Finalmente, el ADN del adenovirus recombinante se mantiene de forma episomal en la célula, por lo que no ocurre mutagénesis por la inserción.

### ***Sistema Ad Easy***

El Sistema AdEasy es un método simplificado para la elaboración de adenovirus recombinantes creado por He y colaboradores en 1998. Este cuenta con todas las ventajas antes mencionadas. Los pasos implicados en este proceso están descritos en la figura H.

## Representación general del proceso de generación de adenovirus recombinantes

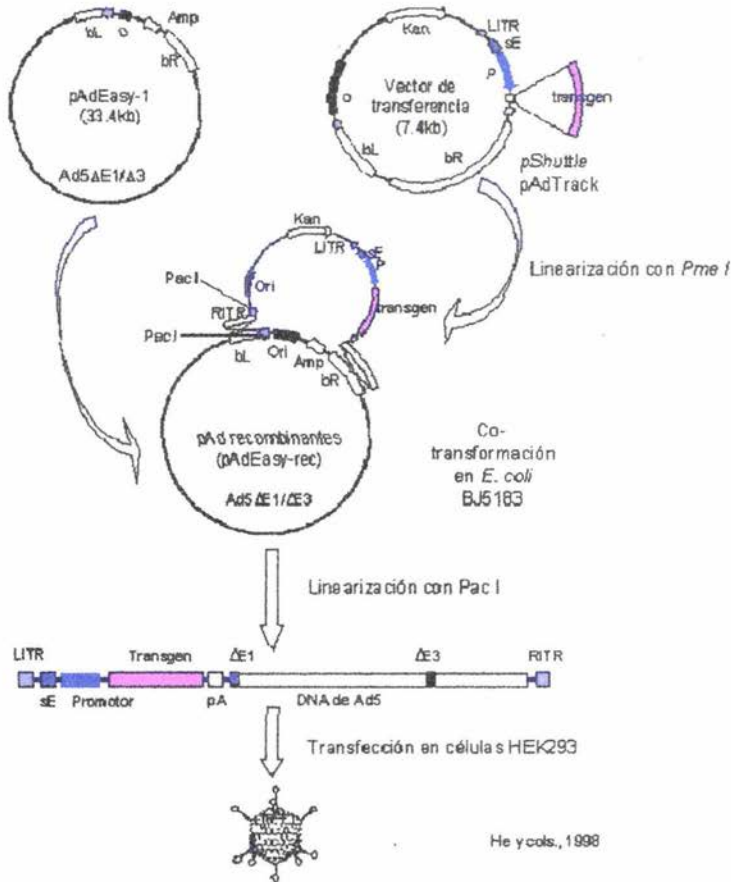


Fig. H. Esquema del sistema AdEasy. El gen de interés es clonado en un vector transportador (pShuttle o pAdTrack). El plásmido resultante es linealizado por digestión con la enzima Pme I, y posteriormente cotransformado en células de *E. coli* BJ5183 con el plásmido pAdEasy-1 el cual contiene la mayoría de los genes del adenovirus excepto E1 y E3. La recombinación homóloga se lleva a cabo en las bacterias. Posteriormente, se seleccionan las recombinantes por resistencia a kanamicina, y la recombinación se confirma por análisis de restricción con endonucleasas. Finalmente, los plásmidos recombinantes son linealizados y transfectados en una línea empacadora de adenovirus, las células HEK 293. bl y br representan las regiones homólogas que median la recombinación entre el vector transportador y el vector adenoviral. En rojo el transgén de interés (BDNF), en azul el promotor (gfa2) y en amarillo el sitio de poliadenilación (mp-1).

En el presente trabajo de tesis, se clonó el transgen BDNF en dos vectores de expresión distintos como primer paso en la construcción de adenovirus recombinantes específicos de células gliales, empleando el sistema pAdEasy. Este paso consistió en la subclonación del ADN complementario (ADNc) de BDNF en los vectores pShuttle y pAdTrack. Estos vectores son vectores de transferencia que contienen un sitio de clonación múltiple, donde se clonó el "cassette" de expresión gfa2-BDNF-mp1 (Fig. H). Estos vectores también poseen brazos homólogos de recombinación con el vector AdEasy. Además, contienen un origen de replicación, un gen de resistencia a kanamicina, y pueden ser empleados como vectores de expresión en células eucariontes, ya que poseen todos los elementos necesarios para que se lleve a cabo la transcripción y traducción de BDNF.

El vector AdEasy es un plásmido que contiene la mayoría del genoma del adenovirus serotipo 5, excepto las regiones E1 y E3. Con el vector AdEasy se puede realizar la recombinación homóloga con los vectores pShuttle o pAdTrack, en bacterias. Los plásmidos recombinantes generados, pueden ser transfectados en células empacadoras HEK-293, para generar adenovirus recombinantes que expresen el transgen BDNF de forma específica en células gliales.

En este proyecto se construyeron dos vectores adenovirales, el vector pgShuttle-BDNF y el vector pgATBDNF. Ambos vectores, como se mencionó anteriormente, también son vectores de expresión, pero tienen diferencias entre sí. El vector pAdTrack además del sitio de clonación múltiple, posee el ADN complementario de la proteína verde fluorescente, bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus. La expresión de GFP facilita la identificación de las células transfectadas. El vector pShuttle, sólo posee el sitio de clonación múltiple, lo cual permite observar la regulación transcripcional del promotor gfa2 sin la perturbación del promotor de citomegalovirus, como en el caso de pAdTrack; ya que posiblemente podría existir competencia entre promotores por los factores de transcripción.

Pero como ya se había mencionado anteriormente, los adenovirus que se pueden construir con los vectores elaborados en este trabajo, tendrán la característica de expresarse específicamente en astrocitos. Esta característica está dada por el promotor gfa2, el cual se expresa únicamente en astrocitos. Esto implica que aunque el transgén entre en otros tipos celulares, sólo los astrocitos podrán expresarlo. Las razones del por qué emplear a los astrocitos como plataforma de expresión se mencionan a continuación.

### ***Astrocitos como plataforma de expresión de moléculas terapéuticas en el cerebro***

Los astrocitos son una estirpe celular que forma parte del tejido nervioso y una de sus funciones es el mantenimiento de la sobrevivencia neuronal. Además son células con una vida media larga, son más resistentes al estrés oxidativo que las neuronas y poseen un eficiente sistema de secreción tanto en condiciones basales como durante la gliosis reactiva. Todas estas características aunadas a la capacidad de expresión específica de transgenes en este linaje celular por medio de promotores específicos de este tejido como gfa2, promotor de la proteína glial fibrilar ácida, hacen de los astrocitos una excelente plataforma de expresión de transgenes (Cortez et al. 2000).

El promotor gfa2 tiene además características que lo hacen particularmente útil para la terapia génica, ya que es un gen que está activo en el sistema nervioso central durante toda la vida adulta de un organismo y es regulado de forma positiva por la gliosis causada por daños al cerebro como la EH (Segovia 1998a y 1998b).

### ***Aumento de la expresión de GFAP en la EH y su relación con el control del transgen***

La reacción glial al daño neuronal es una característica prominente durante el transcurso de la EH, que ocurre de manera paralela a la pérdida de las neuronas estriatales de proyección; estas reacciones también ocurren luego de lesiones excitotóxicas en el SNC. Observaciones realizadas por Martínez-Serrano A y Björklund A en el 1996, encontraron un masivo aumento de astrocitos reactivos a GFAP (proteína glial fibrilar ácida), así como microglia, ocupando la mayoría del área lesionada en un modelo excitotóxico de la EH.

El aumento de la proteína glial fibrilar ácida es reflejo del aumento en su transcripción, la cual ocurre como respuesta a la gliosis reactiva que forma parte de la enfermedad. En este proyecto se aprovechan estas características del promotor gfa2 para sobreexpresar a BDNF, de manera que a más daño neuronal mayor cantidad del factor protector, regulándose así los niveles de la proteína para evitar la neurodegeneración, así como los efectos contraproducentes que puede tener el exceso de la neurotrofina (Binder et al. 2001).

## Objetivos

### **Objetivo General**

Sobre-expresar el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) en un modelo *in vitro* de glioma murino (C6), regulado a nivel transcripcional por el promotor de la proteína glial fibrilar ácida (gfa2), como una futura alternativa de terapia génica en la EH.

### **Objetivos Particulares**

1. Construir el vector pgfa2-BDNF en el cual la transcripción de BDNF estará regulado por el promotor gfa2.
  - a. Subclonar el ADNc codificante de BDNF en el vector pgfa2-mcs
  - b. Demostrar su orientación por análisis de restricción
  - c. Demostrar la integridad del transgen por PCR

Este plásmido fue construido como intermediario para la construcción de los siguientes vectores, pero también puede ser empleado como vector de expresión.

2. Construir el vector pgShuttle-BDNF en el cual la expresión de BDNF estará regulado por el promotor gfa2.
  - a. Subclonar el fragmento gfa2-BDNF-mp1 en el vector pShuttle
  - b. Demostrar su orientación por análisis de restricción
  - c. Demostrar la integridad del transgen por PCR

Este vector es empleado para la construcción de adenovirus recombinantes y además puede ser usado como vector de expresión.

3. Construir el vector pgATBDNF en el cual la expresión de BDNF estará dirigida por el promotor gfa2.
  - a. Subclonar el fragmento gfa2-BDNF-mp1 en el vector pAdTrack
  - b. Demostrar su orientación por análisis de restricción
  - c. Demostrar la integridad del transgen por PCR

Este vector es empleado para la construcción de adenovirus recombinantes y además puede ser usado como vector de expresión que contiene la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero.

4. Transfectar de manera estable células C6 (derivadas de glioma murino) con el vector pgATBDNF.
5. Identificar el transcrito primario ARNm del transgén en células transfectadas por ensayo de RT-PCR.
6. Identificar la expresión de las proteínas BDNF y GFP por inmunocitoquímica (BDNF) o directamente utilizando microscopía confocal (GFP).



## Material y Métodos

### I. Construcción del vector pgfa2-BDNF

#### a) Amplificación del vector pCRII-BDNF y pgfa2-mcs

i. Transformación de bacterias competentes *E. coli* DH $\alpha$ 5 (Gibco BRL) con el vector pCRII-BDNF (amablemente donado por Mouradian Mary Maral, NINDS) y pgfa2-mcs (construido previamente por Cortez en preparación) por choque térmico.

Cincuenta microlitros de bacterias competentes *E. coli* DH $\alpha$ 5 (Gibco) se incubaron en hielo por 30min con 2 $\mu$ l del vector pCRII-BDNF ó 2 $\mu$ l de pgfa2-mcs. Inmediatamente después, se transfirieron a un baño maría a 42°C por 90s; y finalmente se incubaron en hielo por 5 min. A las bacterias transformadas se les adicionó 5ml de medio Lennox Broth Base (Gibco) y se incubaron en agitación constante a 250 rpm a 37°C por 1h.

#### ii. Selección de las bacterias transformadas con el plásmido pCRII-BDNF y pgfa2-mcs

Se sembraron 50 $\mu$ l de las bacterias previamente transformadas, en placas de agar-LB con 50 $\mu$ g/ $\mu$ l de ampicilina (Research Organics).

#### iii. Purificación del plásmido pCRII-BDNF y pgfa2-mcs

Se purificaron los plásmidos de una de las colonias seleccionadas y se amplificaron empleando columnas maxiprep según el protocolo del fabricante (Qiagen).

#### b) Restricción del plásmido pgfa2-mcs y del plásmido pCRII-BDNF con las enzimas EcoR V y Spe I

Se digirieron 10 $\mu$ g de cada plásmido con 10U de las enzimas de restricción(EcoR V y Spe I de New England Biolabs) por 1h a 37°C en 20 $\mu$ l de volumen final.

#### c) Purificación del vector pgfa-mcs previamente digerido y del fragmento liberado del plásmido pCRII-BDNF que contiene la secuencia de BDNF

La digestión del plásmido pgfa-mcs fue corroborada por electroforesis en un gel de agarosa al 0.5%.

El fragmento digerido de BDNF (1085 pb) con las enzimas previamente mencionadas, se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8%.

Posteriormente, el fragmento de BDNF y del plásmido pgfa2-mcs se purificaron empleando el sistema GeneClean (Bio 101 Inc) según las instrucciones del fabricante.

Se observó por electroforesis 0.5  $\mu$ g el plásmido purificado (pgfa2-mcs) y del fragmento (BDNF) en un gel de agarosa al 0.8%, para corroborar la pureza.

#### d) Ligación del vector pgfa2-mcs y BDNF para obtener pgfa2-BDNF

Se ligó el vector pgfa2-mcs y BDNF siguiendo las indicaciones descritas para la enzima T4 ADN ligasa (Gibco BRL) para extremos cohesivos.

e) Transformación de bacterias con la mezcla de ligación pgfa2-BDNF  
Se realizó el mismo procedimiento que en los incisos I.a.i y I.b.ii.

f) Obtención de ADN plasmídico de las colonias bacterianas transformadas con el vector pgfa2-BDNF

Se seleccionaron diferentes colonias de la reacción de ligación y se crecieron en 2 ml de medio LB con ampicilina (50µg/µl) toda la noche con agitación constante 250 rpm a 37°C.

Se realizaron ensayos de miniprep para la extracción del ADN plasmídico como se describe a continuación:

1.6ml del cultivo bacteriano se centrifugaron a 14 000rpm por 5min; se descartó el sobrenadante; se lisaron las bacterias con 350µl de solución STET (500 ml de STET contienen: 40g de sacarosa, 25ml de Triton X, 50ml de EDTA 0.5M pH 8, 25ml de Tris-HCl 1M pH 8 y agua) y 20µl de lisozima (Sigma). Se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. La mezcla anterior se calentó en un baño maría hirviendo por 2 minutos, se dejó enfriar y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 350 µl de isopropanol, se mezcló y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14 000rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla de ADN se resuspendió en 20µl de agua.

g) Selección de las colonias bacterianas transformadas con el vector pgfa2-BDNF

Se tomaron 2µl del ADN obtenido por el ensayo de minipreps y se digireron con 1.5U de Spe I (New England Biolabs) 1h a 37°C. La digestión se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.5% y se seleccionó la colonia bacteriana con el ADN del peso esperado (6624 pb).

h) Análisis de restricción para verificar la integridad y orientación del transgen

El ADN de la colonia bacteriana previamente seleccionada se digirió con las enzimas EcoR I y Not I-Xho I (New England Biolabs).

La restricción con EcoR I, consistió en digerir 2µl del ADN extraído con 1.U de enzima por 1h a 37°C y se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

La restricción con Not I-Xho I, consistió en digerir 2µl del ADN extraído con 1.5U de cada enzima de forma simultánea por 1h a 37°C y se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.9%.

i) Amplificación y purificación del vector pgfa2-BDNF

Se siguió el mismo procedimiento descrito en los incisos I.a.i, I.a.ii y I.a.iii.

## II. Eliminación de los sitios de restricción Pme I y Cla I del vector pgfa2-BDNF

- a) Se digirieron 10 $\mu$ g del vector pgfa2-BDNF con las enzimas Pme I y Cla I (New England Biolabs) simultáneamente. Se observó por electroforesis 0.5 $\mu$ g del vector restringido en un gel de agarosa al 0.5%, para corroborar la restricción. El resto del plásmido restringido se purificó con el sistema GeneClean (Bio 101 Inc) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se rellenaron los extremos cohesivos creados por la restricción con la polimerasa Klenow (Gibco) según las instrucciones del fabricante. Se recircularizó el vector con la enzima T4 ADN ligasa según las instrucciones para extremos romos.

Se transformaron bacterias *E. coli* DH $\alpha$ 5 como se indicó en el inciso I.a.i y se seleccionaron las clonas como se indica en el inciso I.a.ii. Se extrajo el ADN bacteriano de una colonia siguiendo el mismo procedimiento descrito en el inciso I.f. Se restringieron 0.5  $\mu$ g del vector con las enzimas Pme I y Cla I para confirmar la pérdida de estos sitios y se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.5%. Se purificó el resto del ADN plasmídico con el sistema GeneClean (Bio 101 Inc) según las instrucciones del fabricante. Finalmente se obtuvo el plásmido pgfa2-BDNF $\Delta$ Pme I-Cla I.

## III. Construcción del vector pgShuttle-BDNF

- a) Amplificación del vector pShuttle

Transformación de bacterias competentes *E. coli* DH $\alpha$ 5 con el vector pShuttle (amablemente donado por el Dr. B Vogelstein de la Universidad Johns Hopkins) mediante choque térmico.

Se realizó de la misma manera que en los incisos I.a.i, I.a.ii y I.a.iii.

- b) Restricción del plásmido pgfa2-BDNF $\Delta$ Pme I-Cla I y del plásmido pShuttle con la enzima BglII.

Diez microgramos de cada uno plásmido se digirieron con 10U de la enzima Bgl II (New England Biolabs) por 1h a 37°C.

- c) Purificación del vector pShuttle previamente digerido con la enzima BglII y del fragmento que contiene el cassette gfa2-BDNF-mp1 liberado del plásmido pgfa2-BDNF $\Delta$ Pme I-Cla I

Los 10 $\mu$ g digeridos del plásmido pgfa2-BDNF $\Delta$ Pme I-Cla I se observaron por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% y se purificó el fragmento correspondiente a la secuencia de gfa2-BDNF-mp1 por su peso.

Se visualizó por electroforesis 0.5 $\mu$ g del plásmido pShuttle previamente digerido en un gel de agarosa al 0.5% para corroborar la digestión.

Se purificaron, el fragmento (gfa2-BDNF-mp1) y el plásmido (pShuttle) previamente digeridos con el sistema GeneClean (Bio 101 Inc.) de según las instrucciones del fabricante.

Se visualizaron por electroforesis 0.5µg del plásmido purificado (pShuttle) y del fragmento (gfa2-BDNF-mp1) en un gel de agarosa al 0.8%, para corroborar su pureza.

- d) Ligación del vector pShuttle y del fragmento gfa2-BDNF-mp1 para obtener pgShuttle-BDNF

Se ligó el vector pShuttle y gfa2-BDNF-mp1 siguiendo las indicaciones de la enzima T4 ADN ligasa (Gibco) para extremos cohesivos.

- e) Transformación de bacterias con la ligación pgShuttle-BDNF

Se transformaron y seleccionaron las bacterias transformadas con el vector pgShuttle-BDNF, por el mismo procedimiento descrito en los incisos l.a.i y l.a.ii.

- f) Extracción del ADN de las colonias bacterianas transformadas con el vector pgShuttle-BDNF

Se siguió el protocolo experimental que del inciso l.f.

- g) Selección de las colonias bacterianas transformadas con el vector pgShuttle-BDNF

Se tomaron 2µl del ADN obtenido anteriormente y se digirieron con 1.5U de la enzima BamHI por 1h a 37°C. La digestión se visualizó en un gel de agarosa al 0.5% y se seleccionaron las colonias bacterianas por el peso esperado (10479 pb).

- h) Análisis de restricción para verificar la orientación del plásmido pgShuttle-BDNF

Dos microlitros de ADN de la colonia bacteriana previamente seleccionada se digirieron con la enzima XhoI (New England Biolabs) por una hora a 37°C y se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

- i) Amplificación y purificación del vector pgShuttle-BDNF

Se siguieron las indicaciones descritas en los incisos l.a.i, l.a.ii y l.a.iii.

#### **IV. Construcción del vector pgATBDNF**

- a) Amplificación del vector pAdTrack

Transformación de bacterias competentes *E. coli* DHα5 con el vector pAdTrack (amablemente donado por B Vogelstein) por choque térmico.

Se realizó de la misma manera que el inciso l.a.i, l.a.ii y l.a.iii.

- b) Restricción del plásmido pgfa2-BDNFΔPmeI-Clal y del plásmido pAdTrack con la enzima Bgl II

Diez microgramos de cada plásmido fueron digeridos con 10 U de la enzima Bgl II (New England Biolabs) por 1h a 37°C.

- c) Purificación del vector pAdTrack previamente digerido y del fragmento que contiene la secuencia gfa2-BDNF-mp1, liberado del plásmido pgfa2-BDNF $\Delta$ Pme I-Cla I

Se realizó de la misma manera que el inciso III.d.

- d) Ligación del vector pAdTrack y gfa2-BDNF-mp1 para obtener pgAT-BDNF

Se ligó el vector pAdTrack y gfa2-BDNF-mp1 de acuerdo a las indicaciones descritas para la enzima T4 ADN ligasa (Gibco) para extremos cohesivos.

- e) Transformación bacteriana con la mezcla de ligación pgAT-BDNF

Se transformaron y seleccionaron las bacterias que contenían el vector pgAT-BDNF como se describe en los incisos I.a.i y I.a.ii.

- f) Extracción del ADN de las colonias bacterianas transformadas con el vector pgAT-BDNF

Se siguió el mismo protocolo experimental que en el inciso I.f.

- g) Selección de las colonias bacterianas transformadas con el vector pgAT-BDNF

Se tomaron 2 $\mu$ l del ADN obtenido anteriormente y se digirieron con 1.5U de la enzima BamH I a 37°C por una hora. La digestión se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.5%, y se seleccionaron colonias positivas (12 126 pb).

- h) Análisis de restricción para verificar la orientación e integridad del plásmido pgAT-BDNF

A partir de 2  $\mu$ l del ADN de la colonia bacteriana previamente seleccionada se realizó la digestión con las enzimas Xho I y EcoR V (New England Biolabs) por 1h a 37°C, y la digestión se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.5%.

- i) Amplificación y purificación del vector pgATBNDNF

Se siguieron las indicaciones descritas en los incisos I.a.i, I.a.ii y I.a.iii.

## V. Verificación de la integridad de los plásmidos pgfa2-BDNF, pgShuttle-BDNF y pgAT-BDNF por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- a) La integridad de los plásmidos se corroboró empleando la técnica de PCR, como se describe a continuación: en un volumen final de 50µl se contenía 300ng aproximadamente de cada uno de los siguientes vectores pgfa2-BDNF, pgShuttle-BDNF y pgAT-BDNF, 1U de Taq (Amersham), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de buffer de reacción, 0.5mM de dNTPs (Amersham), 1pM de cada primer, 10% de DMSO (Merck) y H<sub>2</sub>O bidestilada-desionizada. Y se emplearon las siguientes condiciones de reacción (PCR Sprint-Hybrid).

1' 30"	a 94°C	} 40 ciclos	1 ciclo
1'	a 94°C		
1'	a 55°C		
1'	a 72°C		
5'	a 72°C		1 ciclo

Los oligos empleados para la amplificación de la porción 3' del promotor y de la porción 5' del transgen BDNF (300 pb) fueron:

Extremo 3' del promotor: 5' CAT CGC CAG TCT AGC CCA CTC CT 3' (Segovia 1998a) y el extremo 5' de BDNF: 5' CTC TTC GAT CAC GTG CTC AAA AGT G 3'

Los oligos empleados para amplificar un fragmento interno del transgen BDNF, de 200 pb fueron: 5' TTG GCC TAC CCA GCT GTG CGG AC 3' y 5' CTC TTC GAT CAC GTG CTC AAA AGT G 3' (Bishop, et al. 1994).

Los oligos utilizados para amplificar la porción 3' de BDNF y la porción 5' de mp-1 (800 pb) fueron: 5' CTG GCG GTT CAT AAG GAT AGA C 3' y 5' GAC TTG CTA TTC TGT GCA TC 3' (Trejo, et al. 1999)

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis (15 µl de volumen de reacción) en un gel de agarosa al 2%.

## VI. Cultivo celular

Las células C6 se cultivaron a 37°C en con 5% de CO<sub>2</sub>, en una atmósfera de humedad. El medio de cultivo fue DMEM-F12 (Gibco) con 10% de suero fetal bovino (Hy Clone) pH 7.4, suplementado con ampicilina-estreptomicina (In vitro).

## VII. Obtención de las células C6-BDNF

- a) Transfección estable de células C6 (derivadas de glioma murino) con el vector pgAT-BDNF. En una caja de cultivo de 10cm de diámetro se cultivaron células C6 al 60% de confluencia. Las células fueron cotransfectadas empleando Lipofectamina plus (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los vectores empleados fueron pgAT-BDNF y pBABE-puro, este último posee un gen de resistencia a puromicina ya que el vector pgAT-BDNF no contiene gen de resistencia a antibióticos. La cotransfección se realizó en una relación 1:20, para evitar falsos positivos.

- b) Selección de las células transfectadas. Tres días después de la transfección, las células fueron seleccionadas con 5 $\mu$ g/ml de puomicina (Sigma), durante 15 días.
- c) Subclonación de colonias. Las colonias previamente seleccionadas fueron subclonadas como a continuación se describe: un círculo de papel filtro (Whatman 3) de aproximadamente 3 mm de diámetro, impregnados con tripsina-EDTA, fueron colocados sobre las colonias por 3min y posteriormente levantados y depositados en una caja de 24 pozos con medio de cultivo (Lowenstein y Enquist 1996). Las células fueron mantenidas bajo selección con puomicina (2 $\mu$ g/ml). Se seleccionó y expandió la colonia que presentó mayor intensidad de fluorescencia.

Las células obtenidas en este inciso se nombraron como C6-BDNF.

#### VII. Identificación del ARNm del transgen

- a) Extracción del ARNm. Se realizó por el método del ácido de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987) con modificaciones (Xie y Rothbum 1992).
- b) Transcripción reversa. El ADNc se obtuvo a partir de 5  $\mu$ g de ARN total, usando la transcriptasa reversa SuperScript RNAsa H (Gibco BRL) según las instrucciones del fabricante y usando como iniciador oligodT (Invitrogen).
- b) Reacción de PCR. Un décimo de la reacción de transcripción reversa se utilizó para amplificar la porción 3' de BDNF y 5' de mp-1 (800pb), como se describe a continuación: en un volumen final de 50 $\mu$ l se contenía 300ng aproximadamente de cada uno de los siguientes vectores pgfa2-BDNF, pgShuttle-BDNF y pgAT-BDNF, 1U de Taq (Amersham), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de buffer de reacción, 0.5mM de dNTPs (Amersham), 1pM de cada primer, 10% de DMSO (Merck) y H<sub>2</sub>O bidestilada-desionizada. Y se emplearon las siguientes condiciones de reacción (PCR Sprint-Hybaidd).
 

1' 30"	a 94°C	1 ciclo
1'	a 94°C	}
1'	a 55°C	
1'	a 72°C	
5'	a 72°C	

Los oligos utilizados para amplificar la porción 3' de BDNF y la porción 5' de mp-1 (800 pb) fueron: 5' CTG GCG GTT CAT AAG GAT AGA C 3' y 5' GAC TTG CTA TTC TGT GCA TC 3' (Trejo, et al. 1999)

Los oligos utilizados para amplificar un fragmento de la  $\beta$  actina (500pb) fueron los siguientes: 5' CACCACAGCTGAGAGGGAAATCGTGCGTGA 3' y 5' ATTTGCGGTGCACGATGGAGGGCCGGACT 3'.

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis (15  $\mu$ l de volumen de reacción) en un gel de agarosa al 2%.

## **IX. Inmunocitoquímica de células C6-BDNF**

a) Montaje y fijación de las células C6-BDNF. Una vez alcanzada una confluencia de aproximadamente de un 70%, las células fueron levantadas con tripsina-EDTA y sembradas en cubreobjetos. Al día siguiente las células fueron lavadas tres veces con PBS 1% a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 30 min. Finalmente, se lavaron con PBS 1%.

b) Las células fueron procesadas para inmunocitoquímica de la siguiente manera:

Las células se rehidrataron con PBS 1% por 10 min. Se permeabilizaron con 2 lavados de PBS Tritón al 0.2 % por 15min. Posteriormente, se bloquearon con PBS Tritón 0.2%, con suero normal de cabra al 10% y con BSA al 1% por 1h a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario en una relación 1:500 con suero normal de cabra al 3% (Vector) en PBS Tritón 0.1% toda la noche. Finalmente, se lavaron tres veces, por 10min; se incubaron con el anticuerpo secundario rodaminado de cabra anti conejo en una relación 1:70 por 1h a temperatura ambiente; se lavaron tres veces por 10min; y se montaron en portaobjetos con Vectashield (Vector).

c) Las células fueron observadas en un microscopio Nikon Diaphot acoplado al sistema confocal MRC-600 (BIORAD) con láser de criptón-argón. El mismo campo fue tomado en el canal para rodamina y para fluoresceína. Posteriormente las imágenes fueron sobrepuestas con el fotoeditor de Microsoft Office 2000, para obtener la colocalización.



## Resultados y Discusión

Actualmente no existe un tratamiento que ofrezca la posibilidad de curar la enfermedad de Huntington, a pesar de que se puede diagnosticar incluso *in utero* y los síntomas aparecen alrededor de los treinta y cinco años; lo que permite diseñar nuevas alternativas terapéuticas para prevenir la neurodegeneración. Las principales estrategias experimentales que se han empleado en esta enfermedad son dos: los trasplantes de tejido, que pretenden suplir el tejido degenerado, pero no detienen el proceso neurodegenerativo; y el uso de factores tróficos que impiden que las células degeneren y mueran. Esta última estrategia parece la más prometedora, ya que no requiere de la introducción de células exógenas, sino que protege las neuronas del paciente. Por lo anterior, se optó por abordar esta estrategia en este proyecto de tesis.

Varios factores neurotróficos han mostrado ser eficaces en la protección de las neuronas espinosas medianas del estriado, la población celular más vulnerable en esta enfermedad. Recientemente el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF), ha sido considerado como un buen candidato para la neuroprotección de esta población celular. Se ha encontrado que los niveles de ARNm de este factor se encuentran disminuidos en la corteza cerebral en ausencia de huntingtina silvestre, la cual normalmente favorece su transcripción; esto se ve reflejado en la disminución de BDNF en el estriado, lugar donde es transportado desde la corteza. Además, existen evidencias positivas de BDNF en las neuronas espinosas medianas del estriado, como son: una disminución de la apoptosis (Sadou et al., 1998); un aumento en la arborización de las neuronas; y un aumento en la inmunoreactividad de GABA (Nakao et al., 1995).

En lo que respecta a la efectividad de BDNF *in vivo*, se ha demostrado que la transducción adenoviral de BDNF protegió en un 64% a las neuronas estriatales con respecto al control en un modelo excitotóxico de la EH (Bemelmans et al., 1999). Así mismo, Perez-Navarro y colaboradores (2000), demostraron que el implante de una línea celular que expresaba BDNF protegió a las neuronas espinosas del estriado de daño excitotóxico.

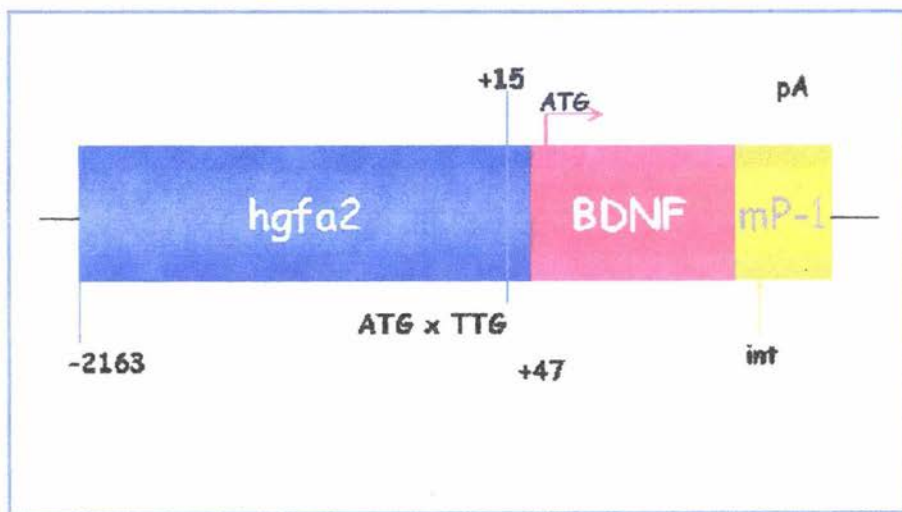
Otra alternativa en la protección de las neuronas espinosas medianas del estriado, del daño provocado por la EH, es inducir la expresión y liberación de BDNF en los astrocitos del estriado. Los astrocitos son células muy abundantes y son resistentes a los daños del cerebro; además, tienen la característica de presentar gliosis reactiva por daños en el cerebro, y se tiene evidencia de que este proceso ocurre en la EH (Martínez-Serrano y Björklund, 1996). En el proceso de gliosis, la proteína glial fibrilar ácida es sobreexpresada por un aumento en su transcripción (Binder et al. 2001).

Por lo anterior, en este proyecto se empleó el promotor de la proteína glial fibrilar ácida para regular la transcripción de BDNF en diferentes vectores de expresión. De esta forma el promotor específico de astrocitos regulará de forma positiva la transcripción de BDNF ante la neurodegeneración causada por la EH.

Para lograr una alta eficiencia en la transfección de los astrocitos, se utilizarán adenovirus recombinantes, los cuales son relativamente fáciles de construir y se pueden obtener a altos títulos.

### Componentes de los vectores

El objetivo general de este proyecto es la sobreexpresión de BDNF en células gliales como una alternativa de terapia génica de la EH. Para cumplir este objetivo, el primer paso fue la construcción de tres vectores de expresión, los cuales, como se observa en la figura 1 y 6, contienen el mismo promotor (*gfa2*), el mismo cDNA (BDNF) y el mismo fragmento de la protamina de ratón, que provee de un intrón y de un sitio de poliadenilación (*mp-1*).



**Fig. 1. Esquema del vector pgfa2-BDNF**

En azul se muestra el promotor de la proteína glial fibrilar ácida de humano (*hgfa2*), que comprende desde -2163 hasta +47; en +15 fue mutado el sitio de inicio de la transcripción ATG por TTG; en rojo se esquematiza el cDNA de BDNF; y en amarillo se muestra un fragmento de la protamina de ratón que contiene un intrón y un sitio de poliadenilación.

Cada fragmento tiene una razón de ser. El promotor de la proteína glial fibrilar ácida de humano, permitirá regular la expresión de BDNF a nivel transcripcional, manipulando los niveles de AMPc en cultivos celulares (Segovia et al. 1998). *In vivo* este promotor es activado ante cualquier daño al sistema nervioso (Gomes et al. 1999). Por otro lado, el cDNA de BDNF de rata, nos brindará la secuencia necesaria para llevar a cabo la transcripción y la traducción de BDNF, para poder observar los efectos tróficos de este factor. El cDNA de BDNF murino, puede ser empleado para la terapia génica de diferentes especies, ya que esta neurotrofina está altamente conservada en la escala filogenética. Finalmente, el fragmento de la protamina de ratón, además de brindar un sitio de poliadenilación para la traducción, también contiene un intrón que permite la correcta maduración del ARNm, y permite monitorear la transcripción. Las diferentes partes que conforman el cassette de expresión provienen de especies diferentes, lo cual permite reconocer el transcrito exógeno del endógeno.

### **¿Qué sentido tiene haber construido tres vectores tan semejantes?**

Las diferencias radican en los vectores, y en sus usos potenciales. En la primer subclonación (Fig. 2) se utilizó como esqueleto de clonación al vector pUC18 modificado, el cual contenía al promotor *gfa2*, un sitio de clonación múltiple (*mcs*) y el fragmento de la protamina de ratón *mp-1* (*pgfa2-mcs*). En el vector *pgfa2-mcs* se subclonó el transgen BDNF de manera dirigida utilizando las enzimas de restricción *SpeI* y *EcoRV*. De esta forma BDNF quedó bajo el control transcripcional de *gfa2*, además de llevar consigo un intrón y un sitio de poliadenilación; las características anteriores convierten a este vector en un vector de expresión. Este vector puede ser amplificado en bacterias, ya que pUC18 posee un origen de replicación para procariontes y un gen de resistencia a ampicilina. Sin embargo este vector no contiene un gen de resistencia para eucariontes, por ello se debe de cotransfectar con otro vector que provea de un gen de resistencia a antibióticos propios de eucariontes.

Ya que la transfección por sistemas no virales tiene una eficiencia muy baja, se construyeron los vectores *pgShuttle-BDNF* y el vector *pgATBDNF*, como parte del sistema de producción de adenovirus recombinantes. Estos vectores utilizan como base los plásmido *pShuttle* y *pAdTrack* respectivamente, los cuales son parte del Sistema *AdEasy* (He et al. 1998). El sistema *AdEasy* tiene como finalidad la producción de adenovirus deficientes de replicación. La subclonación de *gfa2-BDNF-mp-1* en el vector *pShuttle* y en el vector *pAdTrack*, se realizó de manera dirigida. Este fragmento fue extraído del vector *pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-Clal* construido previamente en este proyecto, por eliminación de los sitios de restricción *PmeI* y *Clal* (Figura 3).

La eliminación de los sitios de restricción PmeI y ClaI del vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI fue necesaria, ya que como se describe en la figura H, estos sitios de restricción (dentro de los vectores pShuttle y pAdTrack) son empleados posteriormente en la elaboración de los adenovirus recombinantes, y la presencia de estas secuencias dentro del cassette complicarían el proceso.

Una vez eliminados estos sitios de restricción, se subclonó de manera dirigida el cassette de expresión gfa2-BDNF-mp-1, del vector pgfa2-BDNF, en los sitios cohesivos de BglII de los vectores pShuttle y pAdTrack. Ambos vectores pgShuttle-BDNF y pgATBDNF, poseen un gen de resistencia a kanamicina, y un origen de replicación para bacterias; y además, pueden ser empleados como vectores de expresión. Estos vectores tampoco poseen un gen de resistencia para eucariontes por lo que deben ser cotransfectados con un vector que brinde esta característica. Además, estos vectores poseen brazos de recombinación homóloga, que son empleados para la recombinación con el vector AdEasy-1 en bacterias. Posteriormente, el vector recombinante es transfectado en las células HEK-293 que empaquetarán a los adenovirus (figura H).

La diferencia entre los vectores pShuttle y pAdTrack, reside en la presencia del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), en el vector pAdTrack (Figura 6); lo cual es de gran utilidad para la identificación de las células que han sido transfectadas.

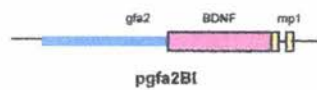
### **Construcción de vectores**

El vector pgfa2-BDNF fue construido como se observa en la figura 2. Brevemente, a partir del vector pCRII-BDNF, se extrajo el cDNA de BDNF por restricción con las enzimas EcoRV y SpeI. Por otro lado, se sometió a restricción, con las mismas enzimas el vector pgfa2-mcs. Se purificó el cDNA de BDNF del plásmido pCRII por diferencia de peso en una electroforesis. Se ligó el vector ya linearizado y con extremos cohesivos al cDNA de BDNF, de esta forma BDNF quedó bajo el control transcripcional de gfa2. Para corroborar la correcta ligación de BDNF al plásmido, se realizó una doble restricción con las enzimas NotI y XhoI. Con estas enzimas se pudo demostrar la correcta ligación del cDNA de BDNF dentro del nuevo vector, como se observa en el mapa circular, en el cual se encuentran marcados los sitios de corte de estas enzimas

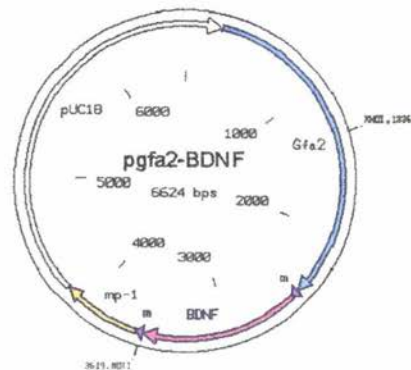
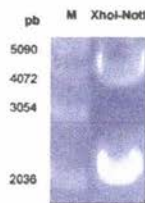
A



B



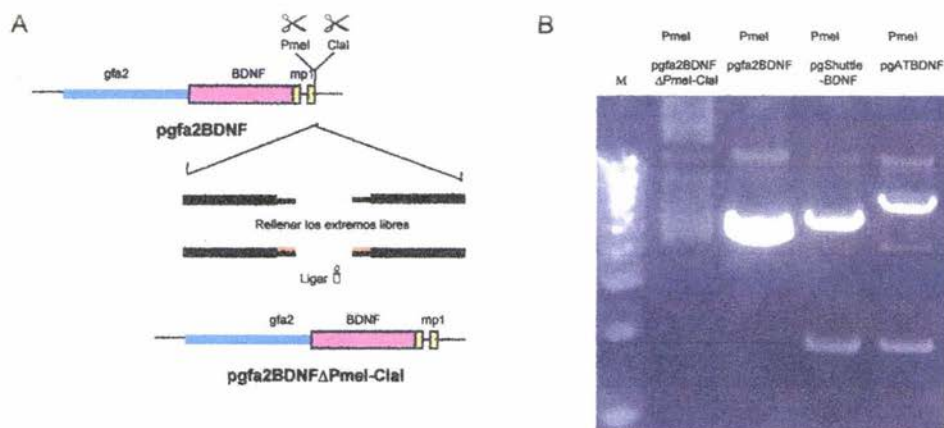
C



**Figura 2. Construcción del vector pgfa2-BDNF**

A, a la derecha se muestra un esquema del vector pgfa2-mcs y a la izquierda un esquema del vector pCRII-BDNF. En la parte inferior de la misma, se muestran las digestiones con las enzimas SpeI y EcoRV teñidas con bromuro de etidio y visualizadas por electroforesis en un gel de agarosa. En la electroforesis de la izquierda se observa el vector linealizado con extremos cohesivos obtenido con las enzimas indicadas (5.5 kb). En la electroforesis de la derecha se observa el fragmento liberado por las enzimas indicadas, el cual corresponde a BDNF (1 kb) con extremos cohesivos. B, esquema del vector obtenido por ligación del vector linealizado y el fragmento liberado (BDNF). C, a la derecha se observa el mapa circular del vector pgfa2-BDNF, en el cual se indican los sitios de corte de las enzimas NotI y XhoI, que fueron empleadas para restringir este plásmido y corroborar la orientación del inserto. A la izquierda se observa por electroforesis, los fragmentos obtenidos de la digestión con las enzimas antes mencionadas, que corroboran la orientación del inserto, al generar dos fragmentos uno de 2.2 kb y otro de 4.3 kb.

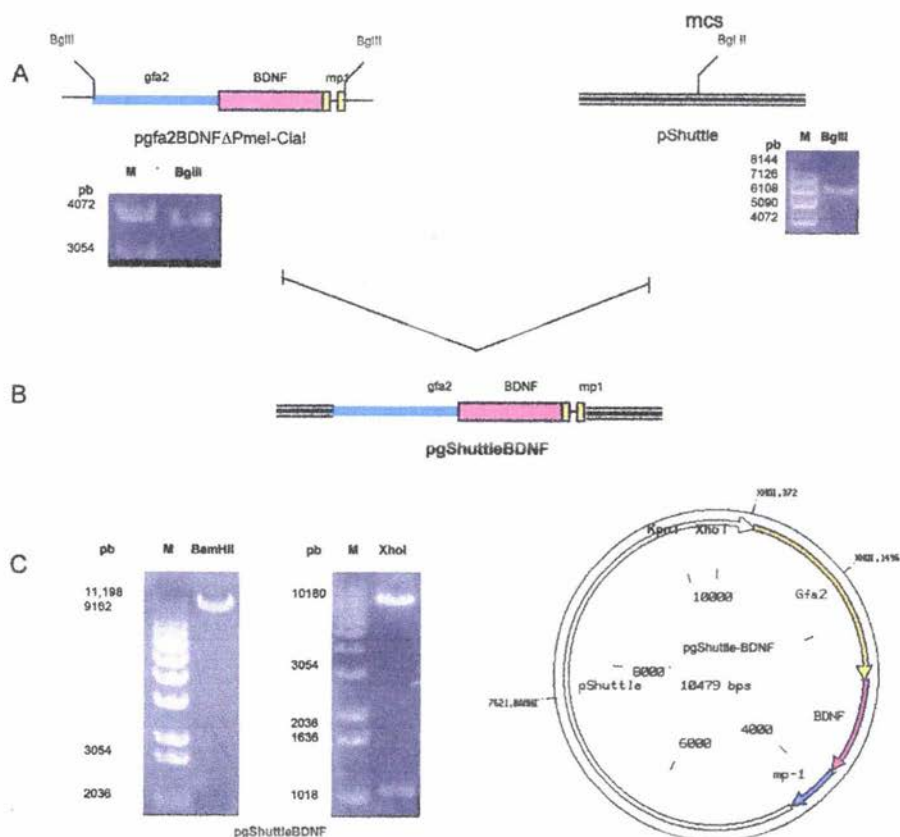
Para facilitar la producción de adenovirus recombinantes, se recomienda que no existan sitios de restricción para la enzima PmeI dentro del cassette de expresión; ya que los vectores pShuttle y pAdTrack, poseen un sitio de restricción para esta enzima, el cual es empleado para linearizar el vector y realizar la recombinación homóloga para elaborar los adenovirus (ver Fig. H). Por tanto, para la posterior construcción de los vectores pgShuttle-BDNF y pgATBDNF, se realizó una modificación en la construcción pgfa2BDNF, obteniendo el vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI (Fig. 3). Para esto, el vector pgfa2-BDNF se digirió con las enzimas PmeI y ClaI, generando extremos cohesivos para estas enzimas; los extremos cohesivos fueron rellenados, y el vector fue recircularizado, de esta forma se eliminaron los sitios de restricción PmeI y ClaI.



**Figura 3. Eliminación de los sitios de restricción PmeI y ClaI del vector pgfa2BDNF**

A, esquema de la restricción del vector pgfa2BDNF en los sitios de restricción PmeI y ClaI, los cuales liberan extremos cohesivos. Los extremos libres fueron rellenados y el plásmido fue recircularizado, eliminando estos sitios de restricción y generando el vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI, que posteriormente será llamado pgfa2-BDNF. B, el gel muestra las restricciones con PmeI de los vectores pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI, pgfa2-BDNF, pgShuttle-BDNF y pgATBDNF. Se puede observar que el vector pgfa2-mcs se lineariza ya que posee un sitio de restricción para esta enzima. Este sitio de restricción fue eliminado siguiendo los pasos del esquema, para obtener el vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI el cual no es afectado por esta enzima. Del vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI se tomó el fragmente gfa2-BDNF-mp1 que fue subclonado en los vectores pShuttle y pAdTrack, sin el sitio de restricción para PmeI, por lo que en sus carriles correspondientes se observa linearización debido a que sólo poseen el sitio de restricción PmeI, el cual forma parte de los vectores pShuttle y pAdTrack.

El vector pgShuttle-BDNF fue elaborado a partir del vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI y del vector pShuttle, como se observa en el esquema de la figura 4. Ambos vectores fueron sometidos a restricción con la enzima BglII. Esta enzima tiene dos sitios de corte en el vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI que liberan el fragmento gfa2-BDNF-mp1. El vector pShuttle, sólo posee un sitio de corte para esta enzima el sitio de clonación múltiple, lo que permitió la inserción del fragmento de forma sencilla, pues ambos extremos coinciden. Ya que el fragmento posee en ambos extremos las mismas secuencias, esto puede producir que el inserto se oriente de manera incorrecta, por lo que se realizó una restricción con la enzima XhoI para averiguar la orientación del transgen. Como se puede observar en el mapa circular, en el cual se marcan los sitios de corte de esta enzima. También se muestra el sitio de corte de la enzima BamHI, la cual lineariza el vector mostrando el tamaño final de la nueva construcción (10.5 kb).

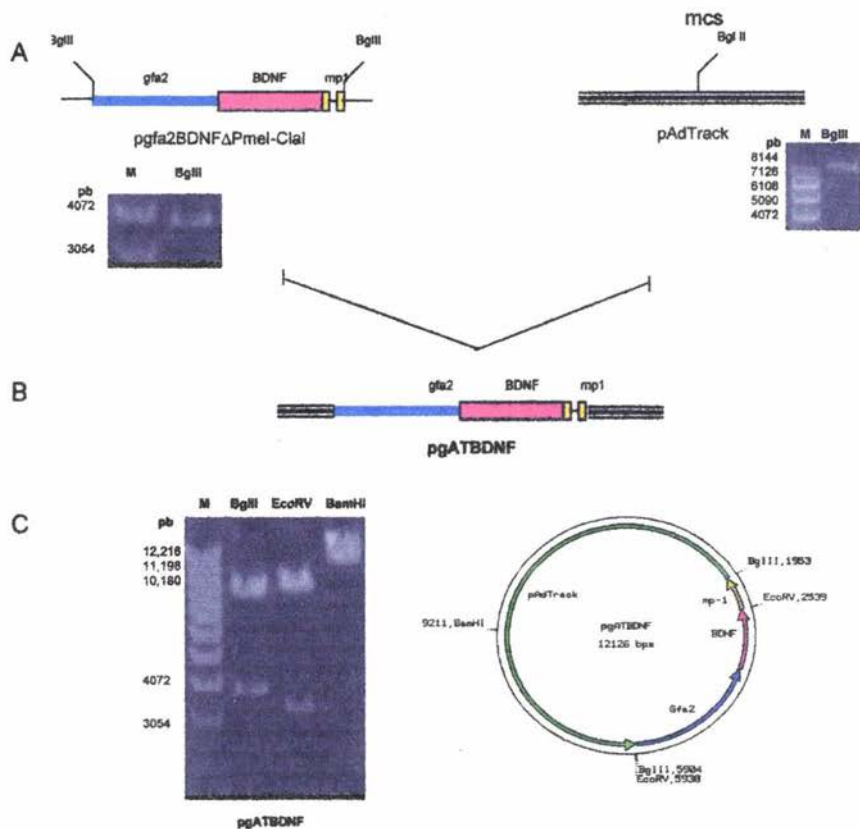


**Figura 4. Construcción del vector pgShuttleBDNF**

A, a la derecha se muestra el esquema del vector pgfa2BDNFΔPmeI-ClaI y a la izquierda el esquema del vector pShuttle; debajo de ellos, los productos de digestión con la enzima BglII teñidos con bromuro de etidio y observados por electroforesis en un gel de agarosa. En la electroforesis de la izquierda se observa el inserto liberado con extremos cohesivos (3.7 kb). En la electroforesis de la derecha se observa el vector linealizado con la enzima BglII (6 kb) con extremos cohesivos. B, esquema del vector obtenido de la ligación del vector linealizado y del fragmento liberado (gfa2-BDNF-mp1). C, a la derecha se observa el mapa circular del vector pgShuttle-BDNF, en el cual se indican los sitios de corte de las enzimas BamHI y XhoI, las cuales fueron empleadas para restringir este plásmido y corroborar la orientación del inserto. A la izquierda se observa por electroforesis, los fragmentos obtenidos de la digestión con las enzimas antes mencionadas, que muestran el tamaño del nuevo vector (BamHI, 10.4 kb) y corroboran la orientación del inserto (XhoI 1.2 y 9.2 kb).



La construcción de pgATBDNF (Figura 5) fue similar a la construcción de pgShuttle-BDNF. A partir del vector pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI se extrajo el fragmento gfa2-BDNF-mp1 con la enzima BglII. Con esta misma enzima, se linearizó el vector pAdTrack. El fragmento gfa2-BDNF-mp1 fue purificado por diferencia de tamaño en una electroforesis, y posteriormente, sometido a ligación con el vector linearizado. Ya que ambos extremos son iguales, se realizó una restricción con la enzima EcoRV para verificar la orientación, como se puede observar en el esquema del mapa circular, en el cual se indican los sitios de corte de las enzimas BglII y BamHI.

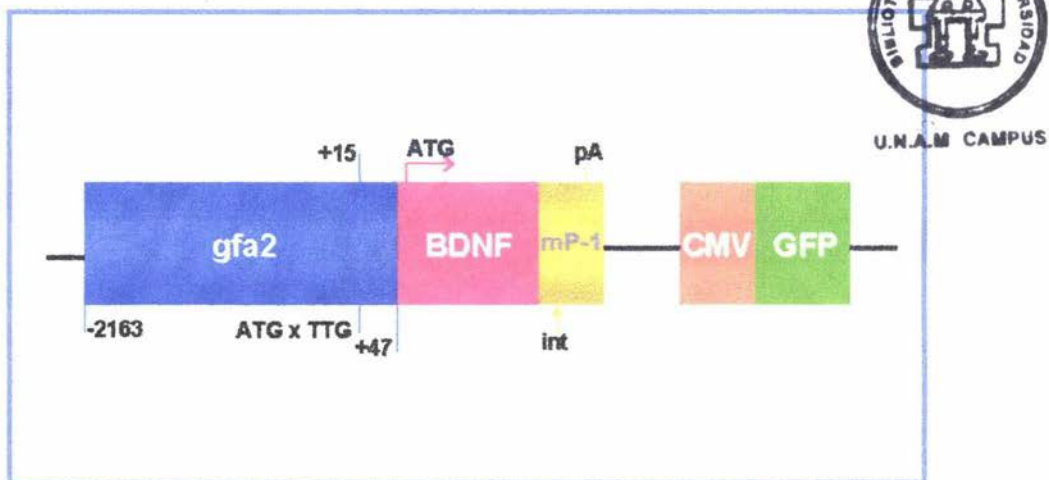


**Figura 5. Construcción del vector pgATBDNF**

A, a la derecha se muestra un esquema del vector *pgfa2BDNF $\Delta$ PmeI-ClaI* y a la izquierda un esquema del vector *pAdTrack*, en la parte inferior se muestran los productos de la digestión con la enzima *BglII*, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por electroforesis en un gel de agarosa. En la electroforesis de la izquierda se observa el inserto liberado con extremos cohesivos (3.7 kb). En la electroforesis de la derecha se observa el vector linearizado con la enzima *BglII* (8.5 kb) con extremos cohesivos. B,

esquema del vector obtenido por la ligación del vector linearizado y del fragmento liberado (gfa2-BDNF-mp1). En la parte inferior de la derecha, se observa el mapa circular del vector pgATBDNF, en el cual se indican los sitios de corte de las enzimas BglII, BamHI y XhoI, las cuales fueron empleadas para restringir este plásmido. C, a la izquierda, se observa por electroforesis, los fragmentos obtenidos de la digestión con las enzimas antes mencionadas, que muestran el inserto (BglII, 3.7 kb), corroboran la orientación del inserto (EcoRV 2.9 y 9.2 kb) y el tamaño del nuevo vector (BamHI, 12.1 kb).

Al inicio de los resultados, se mencionaron las características estructurales de los vectores, sin embargo, el vector pgATBDNF requiere una mención especial. Este vector posee además del promotor gfa2, el ADNc de BDNF, y el sitio de poliadenilación de mp-1, el promotor de citomegalovirus que dirige la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). La presencia de esta proteína fluorescente facilita la identificación de las células transfectadas (Figura 6).



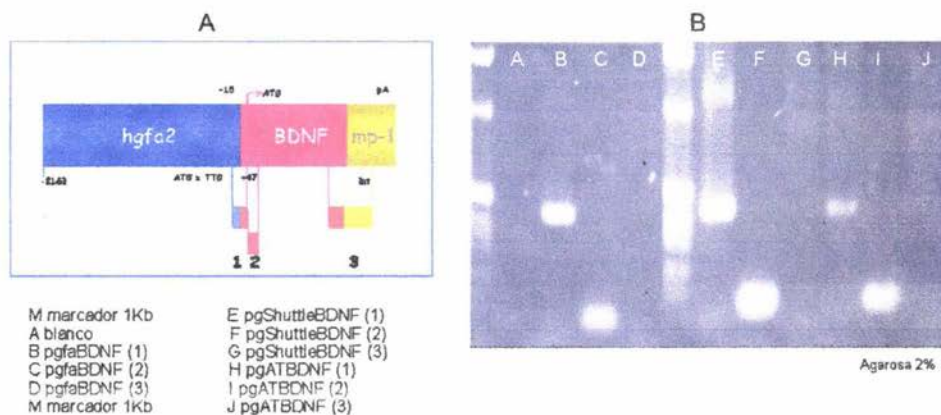
**Fig. 6. Esquema del vector pgAT-BDNF**

Este esquema muestra la presencia de las dos unidades de expresión en el mismo vector, la de BDNF dirigida por el promotor de gfa2 y la de GFP dirigida por el promotor de CMV. En azul se observa el promotor de la proteína glial fibrilar ácida (hgfa2) que comprende desde -2163 hasta +47, en +15 fue mutado la secuencia ATG por TTG (+1 es el inicio de la transcripción); en rojo se observa un cDNA para BDNF; y en amarillo el fragmento de la protamina de ratón que contiene un intrón y un sitio de poliadenilación. En verde el cDNA de la proteína verde fluorescente, con un promotor independiente, el promotor de citomegalovirus y su sitio de poliadenilación.

IZT.

## Reacción en cadena de la polimerasa para verificar la integridad del transgen

Para corroborar la integridad de los tres vectores (pgfa2BDNF, pgShuttle-BDNF y pgATBDNF) de manera indirecta, se realizó la amplificación de tres regiones distintas del inserto mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se observa en la figura 7.



**Fig. 7. Análisis por PCR de los vectores pgfa2-BDNF, pgShuttle-BDNF y pATBDNF**

A, esquema que muestra las regiones que se amplificaron para confirmar la integridad del inserto en los tres vectores. Abajo el orden de corrida de los productos de PCR teñidos con bromuro de etidio y visualizados por electroforesis en un gel de agarosa. B, productos de PCR obtenidos con los diferentes pares de oligos que amplifican el extremo 5', una región interna y el extremo 3' de BDNF en los tres vectores (pgfa2-BDNF, pgShuttle-BDNF y pgATBDNF). En B, E y H se observa el producto amplificado del extremo 3' del promotor hasta el extremo 5' de BDNF (0.3 kb). En C, F e I se muestra la región interna de BDNF (0.1 kb). En D, G y J se muestra el producto amplificado del extremo 3' de BDNF y el extremo 5' de mp-1 (0.8 kb).

Se amplificó el extremo 5' de BDNF junto con el extremo 3' del promotor; así mismo se amplificó una porción central de BDNF; y se amplificó el extremo 3' de BDNF junto con el extremo 5' de mp1. Esto permitió corroborar, la integridad de estas tres porciones del transgen en los tres vectores.

La amplificación del fragmento 5' de BDNF con el fragmento 3' del promotor, en un futuro puede ayudar a distinguir si el ADN transfectado (ADN quimérico) se ha integrado al genoma.

La amplificación del fragmento interno de BDNF, luego de estandarizar el número de ciclos de PCR en los cuales la reacción es lineal, puede servir para la semicuantificación comparativa entre el nivel de ARNm endógeno y del nivel de ARNm exógeno.

El producto obtenido de la amplificación del extremo 3' de BDNF y del extremo 5' de mp-1, permite de forma específica identificar el ARNm de cualquiera de las construcciones del ARNm endógeno, ya que en las células o en el organismo, no es posible que estas secuencias se encuentren contiguas debido a que son de especies diferentes.

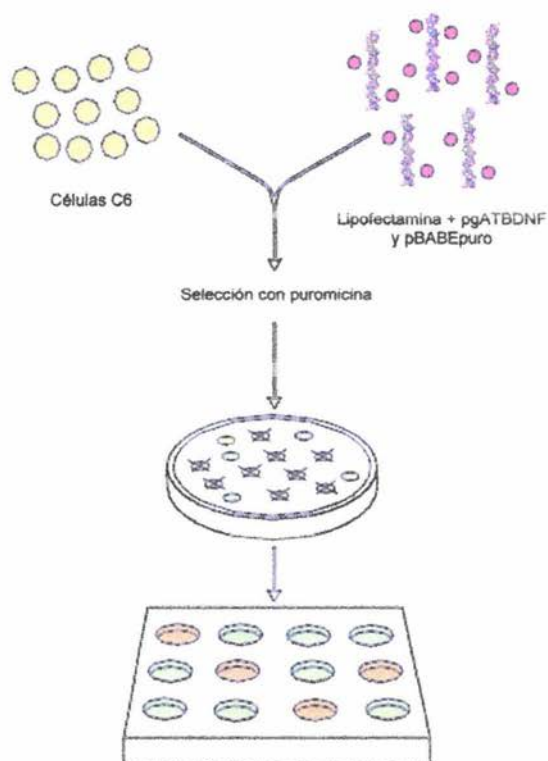
#### **Obtención de las células C6-ATBDNF**

Una vez demostrada la correcta orientación e integridad de los tres plásmidos, el siguiente paso fue demostrar la transcripción y traducción del transgen BDNF. Para ello se empleó exclusivamente el vector pgATBDNF, por ser este el vector más fácil de monitorear, por la presencia de la proteína verde fluorescente; además de ser el más relevante en posteriores aplicaciones por su facilidad para la identificación de las células transfectadas. La presencia de fluorescencia en las células, luego de haber sido transfectadas, indica específicamente cuales de esas células fueron transfectadas, y por tanto demuestra que se llevó a cabo la transcripción y traducción de la proteína verde fluorescente, por lo cual es muy probable que estos procesos también hallan ocurrido con BDNF.

Para probar el vector pgATBDNF se utilizó un modelo *in vitro*, empleando una línea celular de glioma murino (C6). Gracias a su origen glial, la expresión del promotor gfa2 es posible, y puede ser regulado con inductores de la enzima adenilato ciclasa, como la forskolina, ya que el promotor posee elementos de respuesta a AMPc (Gomes et al. 1999).

Como se había mencionado anteriormente, el vector pgATBDNF puede ser utilizado como vector de expresión en células eucariontes, pero debe utilizarse en combinación con otro vector que provea un gen de resistencia a algún antibiótico, para facilitar la selección de las células transfectadas. Considerando lo anterior, para realizar la transfección estable de las células C6, se empleo el vector pgATBDNF junto con el vector pBABE-puro en una relación 1:20 (Fig. 8). Esta relación evita falsos positivos.

Una vez transfectadas las células, fueron seleccionadas con puromicina, por varios días hasta que se formaron colonias derivadas de una sola célula. Posteriormente, las clonas fueron seleccionadas por inspección en un microscopio de fluorescencia en el canal de la fluoresceína; se eligió la clona que presentara mayor fluorescencia. De esta manera se obtuvieron las células C6-BDNF.



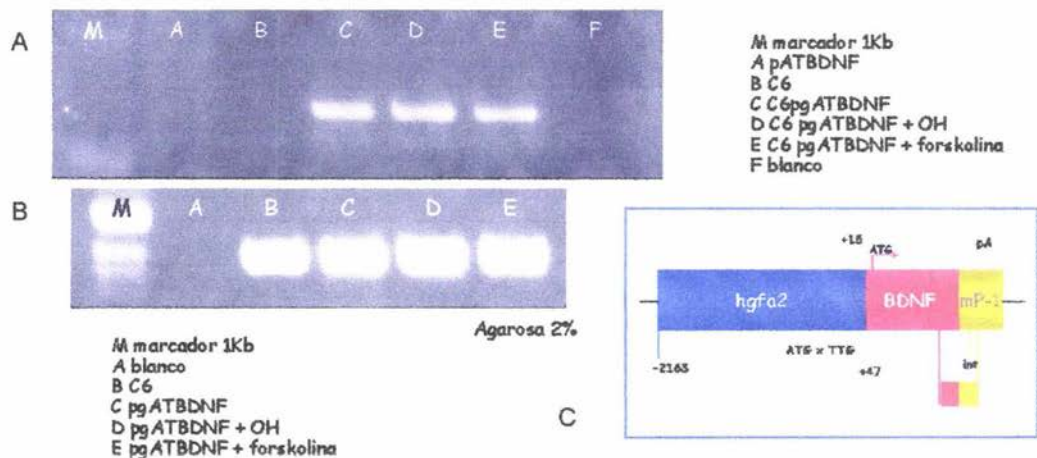
**Figura 8. Esquema del proceso de obtención de las células C6-ATBDNF**

A la izquierda un esquema de una población de células C6 en cultivo. A la derecha un esquema de la mezcla de liposomas y ADN plasmídico (pgATBDNF y pBABEpuro, 20:1). Dos días después se seleccionaron con puromicina y se mantuvieron por 20 días hasta que se formaron colonias. Se seleccionaron y se aislaron después de haber sido inspeccionadas bajo un microscopio de fluorescencia.

## Expresión del ARNm del transgen BDNF

La presencia de la proteína verde fluorescente en las células C6-BDNF, asegura que el vector pgATBDNF fue integrado en el genoma de las células, ya que el transgen de la proteína verde fluorescente se está expresando. Pero aun resta averiguar si el transgen de BDNF también se expresa; considerando como expresión de un transgen, tanto su transcripción (síntesis del ARNm), como su traducción (la proteína, en este caso BDNF).

Para ello, primero se identificó el ARNm del transgen BDNF, por transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa, RT-PCR (Fig. 9). La reacción de PCR se realizó utilizando el juego de oligos que amplifican el extremo 3' de BDNF y el extremo 5' de mp-1, previamente utilizados para verificar la integridad del transgen en los vectores (Fig. 7). Este juego de oligos, permite diferenciar el ARNm producto de la transfección con el vector pgATBDNF, del endógeno. La amplificación del extremo 5' de BDNF y el extremo 3' del promotor, no se realizó, pues en el ARNm no se encuentran secuencias del promotor, por lo que la reacción no se podría llevar a cabo. La amplificación de la porción central de BDNF, se realizó aunque no se muestran los resultados, ya que esta amplificación no es capaz de diferenciar entre el ARNm producto de la transfección del BDNF endógeno, debido a que las células C6 sin transfectar, expresan BDNF.



**Fig. 9. Determinación del ARNm de BDNF en células C6-BDNF**

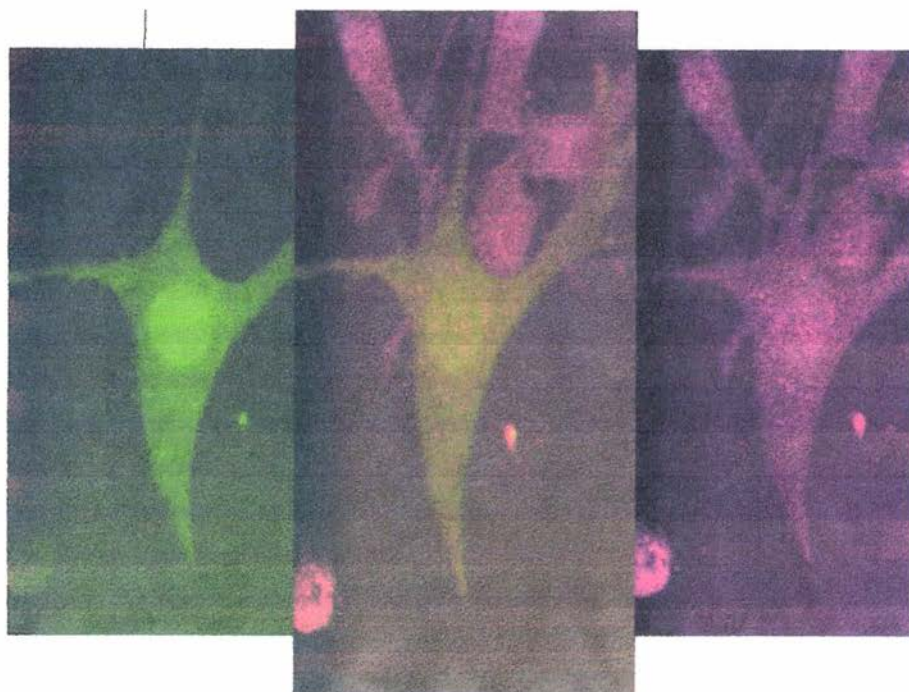
A, los productos de la amplificación por RT-PCR de la región 3' de BDNF a la región 5' de mp-1. El orden de los carriles está indicado en la parte superior de la sección C. En B, se muestra el control de actina, en el cual se observa la presencia del cDNA en las células C6. C, esquema de la región amplificada para distinguir el BDNF exógeno del endógeno. El orden de los carriles de la actina se muestra en la porción inferior del panel B.

Como se observa en la figura 9, no se observó la expresión del transgen en las células no transfectadas, como era de esperarse, pero si en las células transfectadas. A pesar de que las células fueron inducidas con forskolina, no se vio diferencia en los niveles de ARNm entre las células inducidas y las no inducidas. Estos resultados se deben probablemente, a que la reacción se llevó a cabo hasta 40 ciclos. Por lo anterior, este experimento debe de optimizarse, disminuyendo la cantidad de ciclos hasta llegar a la fase lineal de la reacción, para poder cuantificar la sobre-expresión de BDNF de exógeno.

### **Expresión de la proteína BDNF**

Para comprobar que las células C6-BDNF no sólo eran capaces de transcribir el transgen, sino también de traducirlo se realizó un ensayo de inmunocitoquímica (Fig. 10). Se utilizó un anticuerpo rodaminado para identificar la proteína de BDNF, en un microscopio confocal. Además, las células C6-BDNF expresan la GFP.

Como se observa en la figura 10, no todas las células C6-BDNF expresan la proteína verde fluorescente a pesar de haber sido seleccionadas con puromicina por varios días. Esto se debe posiblemente a que el promotor CMV, que dirige la expresión de GFP se inactiva en poco tiempo; o porque la vida media de la proteína es corta. Por el contrario todas las células expresaron BDNF. A diferencia del ARNm la proteína traducida a partir del vector transfectado no se puede diferenciar de la proteína endógena de BDNF.



**Fig. 10. Inmunofluorescencia de las células C6-BDNF**

Micrografías obtenidas con microscopía confocal. A, muestra una célula C6-BDNF en el canal de la fluoresceína, que expresa la proteína verde fluorescente. B, se muestra la proteína BDNF en el canal de la rodamina, empleando un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. C, muestra la colocalización de las imágenes del canal de rodamina y fluoresceína. Esto demuestra que las células que expresan la proteína verde fluorescente, coexpresan a BDNF, aunque con este ensayo no se puede diferenciar el BDNF exógeno del endógeno.

### **Perspectivas**

Hasta este momento presentamos resultados piloto, que comprueban las hipótesis originales, consideramos sin embargo que en este proyecto, por cuestiones de tiempo, aún quedan cosas por hacer con más detalle, es necesario repetir la técnica de RT-PCR empleando menor cantidad de ciclos, de manera que no se llegue a la saturación, para que se pueda apreciar la regulación positiva en el ARNm, que ejerce el aumento de AMPc mediado por la forskolina, en el promotor *gfa2*.



Este trabajo de tesis, forma parte de un proyecto mucho más ambicioso de terapia génica para la enfermedad de Huntington. Por lo que la siguiente fase consiste en la obtención de adenovirus recombinantes, con los vectores pgATBDNF y pgShuttle-BDNF. Una vez obtenidos los adenovirus, es necesario probar si estos vectores virales son capaces de infectar y llevar el transgen al núcleo; ver si este se expresa; y finalmente, ver si la expresión del transgen tiene un efecto terapéutico en un modelo experimental de la EH.

La Enfermedad de Huntington, posee muchas características que la hacen atractiva en el estudio de alternativas terapéuticas como:

- un solo gen responsable, ya identificado, lo que permite un fácil diagnóstico;
- daño a una población celular específica bien localizada, lo que permite un tratamiento bien delimitado; y
- un desarrollo tardío de la enfermedad, lo que permite proteger a las células de la degeneración.

A pesar de todo ello, aún no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad, por lo que es importante continuar con el estudio de posibles tratamientos para esta enfermedad y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es una buena alternativa para prevenir la neurodegeneración producto de esta enfermedad.

## Conclusiones

Se logró subclonar de forma correcta el ADNc de BDNF en los vectores:

pgfa2-BDNF

pgShuttle-BDNF

pgATBDNF

Se transfectaron de forma estable células C6 con el vector pgATBDNF obteniéndose las células C6-BDNF

Se demostró la expresión del vector pgATBDNF: la expresión específica del ARNm y la presencia de la proteína de BDNF en las células C6-BDNF

## Referencias

- Altar A C, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner J M, Acheson A L, Lindsay R M, y Wiegand S J. 1997. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 389:856-860.
- Anderson K D, Panayotatos N, Corcoran T L, Lindsay R M, and Wiegand S J. 1996. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:7346-7351.
- Araujo D M, and Hilt D G. 1997. Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the excitotoxin-induced behavioral and neurochemical deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 81:1099-1110.
- Barde Y A. 1994. Neurotrophic Factors: An Evolutionary Perspective. *J. Neurobiol.*, 25:1329-1333.
- Bemelmans A P, Horellou P, Pradier L, Brunet I, Colin P, and Mallet J. 1999. Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer. *Hum. Gene Ther.*, 10:2987-2997.
- Besnard F, Brenner M, Nakatani Y, Chao R, Purohit H J and Freese E. 1991. Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J. Biol. Chem.*, 266:18877-18883.
- Binder D K, Croll S D, Gall C M, Scharfman H E. 2001. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.*, 24:47-53.
- Bishop J F, Mueller G P, Mouradian M M. 1994. Alternate 5' exons in the rat brain-derived neurotrophic factor gene: differential patterns of expression across brain regions. *Mol. Brain Res.*, 26:225-232.
- Bothwell M. 1995. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 18:223-253.
- Browne S E, Bowling A C, Mac Garvey U, Baik M J, Berger S C, Muquit, M K, Bird E D, Beal M F. 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.*, 41:646-653.
- Byrnes A P, Rusby J E, Wood M J A and Charlton H M. 1995. Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neuroscience*, 4:1015-1024.
- Canals J M, Checa N, Marco S, Michels A, Pérez-Navarro E, Alberch J. 1999. The neurotrophin receptors trkA, trkB and trkC are differentially regulated after excitotoxic lesion in rat striatum. *Mol. Brain Res.*, 69:242-248.

Chomczynski, P and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 162:156-159.

Conneally P M. 1984. Huntington's disease: Genetics and epidemiology. *A. J. Hum. Genet.*, 36:506-526.

Constantini L C, Bakowska J C, Breakefield X O and Isacson O. 2000. Gene therapy in CNS. *Nature*, 7:93-109.

Cortez N, Trejo F, Vergara P and Segovia J. 2000. Primary astrocytes retrovirally transduced with a tyrosine hydroxylase transgene driven by a glial-specific promoter elicit behavioral recovery in experimental parkinsonism. *J. Neurosci. Res.*, 59:39-46.

Dode C, Dodge A, Frontali M, Ranen N G, Stine O C, Sherr M, Abbott M H, Franz M L, Graham C A, Harper P S, Hedreen J C, Jackson A, Kaplan J-C, Losekoot M, MacMillan J C, Morrison P, Trotter Y, Novelletto A, Simpson S A, Theilmann J, Whittaker J L, Folstein S E, Ross C A, and Hayden M R. 1996. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington's disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 59:16-22.

Emerich D F, Winn S R, Hantraye P M, Peschanski M, Chen E Y, McDermott P, Baetge E E, and Kordower J H. 1997. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature*, 386:395-399.

Ferrer I, Goutan E, Marín C, Rey M J y Ribalta T. 2000. Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res.*, 866:257-261.

Freeman T B, Cicchetti F, Hauser R A, Deacon T W, Li X-J, Hersch S M, Nauert G M, Sanberg P R, Kordower J H, Saporta S, Isacson O. 2000. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:13877-13882.

Gomes F C A, Paulin D, and Moura N V. 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *British J. Med. Biol. Res.*, 32:619-631.

Graveland G A, Williams R S and DiFiglia M. 1985. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science*, 227:770-773.

He T C, Zhou S, Costa L, Yu J, Kinzler K W and Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci.*, 95:2509-2515.

Horellou P, and Mallet J. 1998. Neuronal grafts for Huntington's Disease. *Nat. Med.*, 4:669-670.

Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72:971-983.

Ip N, and Yancopoulos G. 1996. The neurotrophins and CNTF: Two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19:491-515.

Kaplan D R, Miller F D. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion Neurobiol.*, 10:381-391.

Kay M A, Glorioso J C and Naldini L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of truning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.*, 7:33-40.

Kolbeck R, Bartke I, Eberle W, y Barde Y A. 1999. Brain-derived neurotrophic factor levels of wild-type and neurotrophin gene mutant mice. *J. Neurochem.*, 72:1930-1938.

Lewin G, and Barde Y A. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19:289-317.

Lo D. 1995. Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron*, 15:979-981.

Lowenstein P and Enquist L. 1996. Protocols for gene transfer in neuroscience. Towards gene therapy of neurological disorders. Chapter 2. Calcium phosphate, DEAE-dextran coprecipitation, and electroporation to transfer genes into neuronal and glial cell lines. Castro M G, Rowe J, Morrison E, Tomasec P, Murray C A, Shering A F y Lowenstein P R. USA. John Wiley-sons. p.p 18.

Martinez-Serrano A, and Björklund A. 1996. Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J. Neurosci.*, 16:4604-4616.

McDonald N, and Chao M. 1995. Structural determinants of neurotrophin action. *J. Biol. Chem.*, 270:19669-19672

Mizuno K, Carnahan J, and Nawa H. 1994. Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev. Biol.*, 165: 243-256.

Nakao N, Brundin P, Funa K, Lindvall O, and Odin P. 1995. Trophic and protective actions of brain-derived neurotrophic factor on striatal DARPP-32-containing neurons in vitro. *Brain. Res. Dev. Brain Res.*, 90: 92-101.

Patapoutian A, Reichardt L F. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiol.*, 272-280.

Perez-Navarro E, Canudas A M, Akerund P, Alberch J, Arenas E. 2000. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem.*, 75:2190-2199.

Pérez-Severiano F, Ríos C, Segovia J. 2000. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res.*, 862:243-247.

Petersén, Larsen K E, Behr G G, Romero N, Przedborski, Brundin P, y Sulzer D. 2001. Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet.* 12:1243-54.

Peysers C E, Fostein M, Chase G A, Starkstein S, Brant J, Cockrel J R., Bylsma F, Coyle J T, McHugh P R, Folstein S E. 1995. Trial of d- $\alpha$ -tocopherol in Huntington's disease. *Am. J. Psychiatry.*, 152:1771-1775.

Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman JJ, Chotai K, Connarty M, Crauford D, Curtis A, Curtis D, Davidson MJ, Differ AM, Dode C, Dodge A, Frontali M, Ranen NG, Stine OC, Sherr M, Abbott MH, Franz ML, Graham CA, Harper PS, Hedreen JC, Hayden MR, et al. 1996. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet.*, 59:16-22.

Santamaria A, Perez-Severiano F, Rodriguez-Martinez E, Maldonado P D, Pedraza-Chaverri J, Rios C, Segovia J. 2001. Comparative análisis of superoxide dismutase activity between acute pharmacological models and a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurochem Res.* 25:419-424.

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, and Greenberg M E. 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell.* 95:55-66.

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

Segovia J, Vergara P and Brenner M. 1998b. Astrocyte-specific expression of tyrosine hydroxylase after intracerebral gene transfer induces behavioral recovery in experimental parkinsonism. *Gene Ther.*, 5:1650-1655.

Sian J, Dexter D T, Lees A J, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden D D. 1994. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.*, 36:348-355.

Siegel G J, Agranoff B W, Albers R W, Fisher S K, Uhler M D. 1998. *Basic Neurochemistry*. Sixth edition. American Society for Neurochemistry.

Thoenen H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270:593-598.

Tobin Allan J. and Singer Ethan R. 2000. Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol.*, 10:531-536.

Trejo F, Vergara P, Brenner M, Segovia J. 1999. Gene therapy in a rodent model of parkinson's disease using differentiated C6 cells expressing a GFAP- tyrosine hydroxylase transgene. *Life Sciences*. 65:483-491.

Ventimiglia R, Mather P E, Jones B E, and Lindsay R M. 1995. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, 7:213-222.

Xie W Q, Rothblum L I, 1992. Rapid, small-scale RNA isolation from tissue and culture cells. *Biotechniques*, 11:324-327.

Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt B R, Goffredo D, Conti L, MacDonald M E, Friedlander R M, Silani V, Hayden M R, Timmusk T, Sipione S, y Cattaneo E. 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, 293:493-498.