

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA
DE UNA LÍNEA DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE
EXPRESAN EL GEN CRE RECOMBINASA**

Por

M.C. ARNULFO VILLANUEVA OLIVO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Orientación en MORFOLOGÍA**

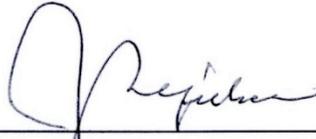
**Monterrey, N. L.
Enero, 2013**

Caracterización molecular y morfológica de una línea de ratones transgénicos que expresan el gen Cre Recombinasa

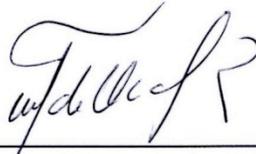
Aprobación de Tesis:



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Directora de Tesis



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra
Co-Director



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director



Dr. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña
Comisión de Tesis



Dra. María de Jesús Loera Arias
Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

Caracterización molecular y morfológica de una línea de ratones transgénicos que expresan el gen Cre Recombinasa

Presentado por:

M.C. Arnulfo Villanueva Olivo

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y bajo la co-dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

DEDICATORIA

A mi Madre Silvia, A mi Padre Arnulfo

A mis Hermanas Janette y Silvia y a mis nuevos Hermanos Javier y Joel

A mi Abuelo Elías Olivo Tovar

A la Familia

**A ti, Laura que a pesar del tiempo, y la distancia sigues dandome cariño, paciencia,
apoyo y compañía....**

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo jamás estaría completo sin agradecer a las instituciones y a las personas que brindaron su apoyo, algunas sin saberlo.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para realizar estos estudios de Doctorado.

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, mi Alma Mater.

A la **Facultad de Medicina, UANL**, por aceptarme en sus programas de posgrado.

Al **Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste (CIBIN) del IMSS** por el uso de instalaciones durante la realización de este trabajo.

Dra. Odila Saucedo Cárdenas y al **Dr. Roberto Montes de Oca Luna**, les agradezco por permitir el que entrara en su área de investigación, por continuar durante tanto tiempo, por aún seguir. Si fuera posible hacerlo todo de nuevo, sólo sería para aprovechar más el tiempo con ustedes.

Al Dr. **Julio Sepúlveda Saavedra**, el permitir entrar al posgrado y el confiar para volver a ingresar por segunda ocasión, por aceptar ser parte de la comisión de tesis, y por permitirme ser uno más del Personal del Departamento de Histología.

A la **Dra. María de Jesús Loera Arias** por aceptar el estar en esta comisión de tesis, poder permitirme ser su primer estudiante de Doctorado, y sobretodo por su apoyo todo este tiempo y los excelentes momentos compartidos, y los que faltan.

Al **Dr. Rodrigo E. Elizondo Omaña** por aceptar formar parte de la comisión de tesis, y por esas pláticas tranquilas, por las tardes.

Al **M. C. Víktor J. Romero Díaz**, por su gran ayuda con el material histológico.

Agradezco a esas personas de casa, de escuela, posgrado, laboratorio, que tuve la fortuna de conocer, que estuvieron, y están, durante todo este largo tiempo.

Las palabras aquí vertidas y el espacio utilizado no harán justicia ni permitirán definir lo que en realidad deseo que supieran.

Al Departamento de Histología, en toda su extensión, los que ya no están y los que permanecen.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------------|
| INDICE | i |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | v |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABLAS | ix |
| RESUMEN | 1 |
| 1. ANTECEDENTES | 2 |
| 1.1 NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS | 2 |
| 1.2 GENES QUE REGULAN LA DIFERENCIACIÓN DE NDAM | 3 |
| 1.3 SISTEMA CRE/LOXP | 5 |
| 1.4 APLICACIONES DEL SISTEMA CRE/LOXP | 8 |
| 1.5 EXPRESIÓN DE LA ENZIMA CRE RECOMBINASA EN NDAM | 9 |
| 1.6 PITX3 | 10 |
| 1.7 DELECIÓN EN LA REGIÓN 5' DEL GEN PITX3 | 11 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 15 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 4. MATERIAL | 17 |
| 4.1. SOLUCIONES | 17 |
| 4.2 MATERIAL CONSUMIBLE | 19 |
| 4.3 EQUIPO | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 ANIMALES DE LABORATORIO | 22 |
| 5. MÉTODOS | 24 |
| 5.1 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS <i>PITX3-CRE</i> | 24 |
| 5.2 MANEJO DE LOS RATONES EN EL BIOTERIO | 26 |
| 5.3 APAREAMIENTO DE RATONES <i>PITX3-CRE</i> CON RATONES <i>ROSA26R</i> | 28 |
| 5.4 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS | 29 |
| 5.4.1 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE TEJIDOS | 29 |
| 5.4.2 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO CON FENOL-CLOROFORMO | 30 |
| 5.4.3 CUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA | 30 |
| 5.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA | 31 |
| 5.4.4.1 Preparación de oligonucleótidos | 33 |
| 5.4.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA | 36 |
| 5.5 DETERMINAR SI EXISTE UN SOLO LOCUS DE INTEGRACIÓN PARA EL TRANSGÉN <i>PITX3-CRE</i> RECOMBINASA | 37 |
| 5.6 CARACTERIZACIÓN DEL TRANSGEN <i>PITX3-CRE</i> RECOMBINASA | 38 |
| 5.7 ANÁLISIS DE LOS RATONES DOBLE TRANSGÉNICOS <i>PITX3-CRE/ROSA26</i> | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 5.7.1 ANALIZAR EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA CRE-RECOMBINASA EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS <i>PITX3-CRE/ROSA26R</i> ADULTOS | 41 |
| 5.7.1-A PERFUSIÓN DE SOLUCIÓN FIJADORA CON BOMBA PERISTÁLTICA | 41 |
| 5.7.1-B DISECCIÓN Y POSTFIJACIÓN | 42 |
| 5.7.1-C TINCIÓN COMPLETA PARA LACZ | 44 |
| 5.7.1-D TÉCNICA HISTOLÓGICA POR CONGELACIÓN | 46 |
| 5.7.1-E TINCIONES ESPECIALES | 47 |
| 6. RESULTADOS | 48 |
| 6.1 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS <i>PITX3-CRE</i> | 48 |
| 6.2 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS | 51 |
| 6.3 DETERMINAR SI EXISTE UN SOLO LOCUS DE INTEGRACIÓN PARA EL TRANSGÉN <i>PITX3-CRE</i> RECOMBINASA | 53 |
| 6.4 CARACTERIZACIÓN DEL TRANSGEN <i>PITX3-CRE</i> RECOMBINASA | 56 |
| 6.5 ANÁLISIS DE LOS RATONES DOBLE TRANSGÉNICOS <i>PITX3-CRE/ROSA26</i> | 59 |
| 6.5.1 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN CRE-RECOMBINASA EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS <i>PITX3-CRE/ROSA26R</i> ADULTOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN LACZ | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 6.5.2 ANALIZAR EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN CRE-RECOMBINASA EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS <i>PITX3-CRE</i>/ROSA26R ADULTOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN LACZ A NIVEL DE MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO. | 67 |
| 6.5.2-A TINCIÓN DE NISSL | 68 |
| 6.5.2-B TINCIÓN DE KLUVER-BARRERA | 70 |
| 6.5.2-C IMPREGNACIÓN ARGENTICA DE BIELSCHOWSKY | 72 |
| 7. DISCUSIÓN | 76 |
| 8. CONCLUSIONES | 81 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|--|--|
| °C | Centígrados |
| cm | Centímetros |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP's | Desoxinucleósidos |
| dpc | Días postcoito |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Ácido Etilenglicoltetraacético |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| Fig. | Figura |
| gr | Gramos |
| KH₂PO₄ | Fosfato monobásico de potasio |
| K₃Fe(CN)₆ | Ferricianuro de potasio |
| K₄Fe(CN)₆ | Ferrocianuro de potasio |
| kb | Kilobases |
| KDa | Kilodaltones |
| KO | Knockout |
| LacZ | beta-galactosidasa |
| M | Concentración molar |
| mL | Mililitros |
| mM | Concentración Milimolar |
| μL | Microlitros |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaDoc | Deoxicolato de Sodio |
| Na₂HPO₄ | Fosfato dibásico de sodio |
| NDAm | Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas |
| ng | Nanogramos |
| NP-40 | Nonidet-P40 |

| | |
|------------|-------------------------------------|
| pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer Salino de Fosfatos |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PFA | Paraformaldehído |
| pH | $-\log[H^+]$ |
| Pol | Polimerasa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| UV | Ultravioleta |
| UTR | No traducible |
| V | Voltios |
| Wt | Silvestre |
| X | Veces la concentración |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Representación de los sistemas dopaminérgicos en el cerebro del ratón. | 3 |
| Figura 2. Sitio loxP. | 6 |
| Figura 3. Interacción de la enzima Cre recombinasa con los sitios loxP. | 7 |
| Figura 4. Mecanismo de recombinación de secuencias loxP. | 7 |
| Figura 5. Representación del locus del gen Pitx3. | 11 |
| Figura 6. Vector de expresión pPitx3-Cre. | 49 |
| Figura 7. Cassette de expresión Pitx3-Cre. | 50 |
| Figura 8. Genotipificación de los ratones F1 de la línea Pitx3-Cre. | 50 |
| Figura 9. Patrón de expresión de Cre recombinasa de la línea Pitx3-Cre. | 51 |
| Figura 10. Estandarización de la técnica de PCR para el gen Cre-Recombinasa. | 52 |
| Figura 11. Análisis de la transmisión del transgén por medio de cuadro de Punnett. | 55 |
| Figura 12. Estrategia general para la caracterización del transgén Pitx3-Cre. | 57 |
| Figura 13. Caracterización del transgén Pitx3-Cre. | 58 |
| Figura 14. Genotipificación de ratones doble transgénicos Pitx3-Cre/Rosa26R. | 60 |
| Figura 15. Tinción de LacZ en músculo esquelético. | 62 |
| Figura 16. Tinción de LacZ en glándulas salivales. | 63 |
| Figura 17. Tinción de LacZ en la glándula hipófisis. | 64 |
| Figura 18. Tinción de LacZ en bulbo olfatorio y epitelio olfativo. | 66 |
| Figura 19. Tinción de LacZ en la región periférica del bulbo olfatorio. | 67 |
| Figura 20. Tinción de Nissl | 70 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 21. Tinción de Kluver-Barrera | 72 |
| Figura 22. Impregnación argéntica de Bielschowsky | 74 |
| Figura 23. Tinción LacZ en epitelio olfativo | 76 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Oligonucleótidos para determinar el genotipo de los ratones transgénicos | 18 |
| Tabla 2. Reactivos necesarios para llevar a cabo el PCR de Cre recombinasa | 34 |
| Tabla 3. Reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de una región correspondiente a la fusión Pitx3-Cre recombinasa | 35 |
| Tabla 4. Reactivos necesarios para llevar a cabo el PCR de LacZ | 35 |
| Tabla 5. Programa utilizado para PCR | 35 |
| Tabla 6. Reactivos necesarios para llevar a cabo los PCR (reacción general) | 39 |

RESUMEN

Arnulfo Villanueva Olivo

Fecha de Graduación: Enero de 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Caracterización molecular y morfológica de una línea de ratones transgénicos que expresan el gen Cre recombinasa.

Número de páginas: 86

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología

Área de estudio: Morfología

Propósito y Método de estudio: El gen *Nurr1* es importante para la diferenciación y mantenimiento de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Su inactivación es letal, los ratones Knockout (KO) mueren al nacer y presentan pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Aún se desconoce cuál de las regiones donde se expresa *Nurr1* es la responsable de la letalidad. Una estrategia para dilucidar la función del gen *Nurr1* en las diferentes regiones donde se expresa, es mediante la generación de un ratón Knockout condicional. Para esto se necesita de un ratón con el gen *Nurr1* flanqueado por sitios loxP y que a la vez exprese la enzima Cre recombinasa bajo un promotor específico de tejido y de esta manera al recombinar los sitios loxP se inactivaría el gen *Nurr1*.

Previamente se generó una línea de ratones transgénicos que expresan cre-recombinasa bajo la regulación de una región promotora de 4.2 kb del gen *Pitx3*. En el presente trabajo se obtuvo la caracterización a nivel molecular y a nivel morfológico de esta línea de ratones transgénicos llamada *Pitx3-Cre*. Se realizaron cruza de la línea *Pitx3-Cre* para obtener la frecuencia del transgén a través de las generaciones. Mediante PCR se obtuvieron tanto el genotipo como la caracterización molecular de la integridad del transgén *Pitx3-Cre* recombinasa. Para la caracterización morfológica los ratones *Pitx3-Cre* se aparearon con ratones Rosa26R, un modelo para medir la actividad de Cre-recombinasa in vivo, que se basa en la expresión de lacZ dependiente de recombinación de sitios loxP, y que se observa por medio de una tinción para LacZ.

Contribuciones y conclusiones: Se logró establecer que la inserción del transgén ocurrió en un solo locus en base a la frecuencia observada de su transmisión a la descendencia. Además se confirmó la integridad del transgén, tanto de la secuencia promotora y codificante. En esta línea de ratones la expresión del transgén *Pitx3-Cre* se observó en base a la tinción positiva de lacZ en el epitelio olfativo, en la hipófisis, glándula salival submaxilar y músculo esquelético. El transgén no se expresa en el bulbo olfatorio, la tinción lacZ observada en esta estructura, es debido a la presencia de los axones del epitelio olfativo, cuyas neuronas si expresan el transgén. Esta expresión es dependiente del locus de integración del transgén y no de la especificidad de la secuencia reguladora 4.2 kb del gen *Pitx3*. Esta línea de ratones puede utilizarse para la inactivación condicional de genes en las regiones mencionadas y en particular para estudiar la importancia de la expresión de *Nurr1* en la hipófisis.

FIRMA DEL DIRECTOR:

Dra. Odila Saucedo Cárdenas

1. ANTECEDENTES

1.1 NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS

Las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDAm) residen en la parte ventral del mesencéfalo conteniendo aproximadamente el 90% del número total de neuronas dopaminérgicas (Chinta, 2005). En el mesencéfalo, se localizan tres subgrupos de NDAm en la sustancia negra (SN), el área tegmental ventral (ATV) y el campo retrorubral (CRR). Las NDAm de la SN originan el sistema nigroestriatal, sus fibras inervan la parte dorsal del cuerpo estriado y controla el movimiento motor voluntario; los sistemas mesolímbico y mesocortical se originan en el ATV y están involucrados en el comportamiento basado en las emociones y mecanismos de recompensa; el sistema mesolímbico proyecta sus fibras hacia el núcleo accumbens, bulbo olfatorio, septo, amígdala e hipocampo y el sistema mesocortical inerva la corteza prefrontal, cingulata y perirrinal (Fig. 1). La degeneración de la vía nigroestriatal está asociada a uno de los principales desórdenes neurodegenerativos, la enfermedad de Parkinson. La principal característica patológica de la EP es la pérdida progresiva de las NDAm localizadas en la SNc resultando en una severa reducción de dopamina en el cuerpo estriado. Los síntomas principales son el temblor en reposo, lentitud de movimientos, afasia y alteraciones posturales entre otras, llegando a la incapacidad total del individuo.

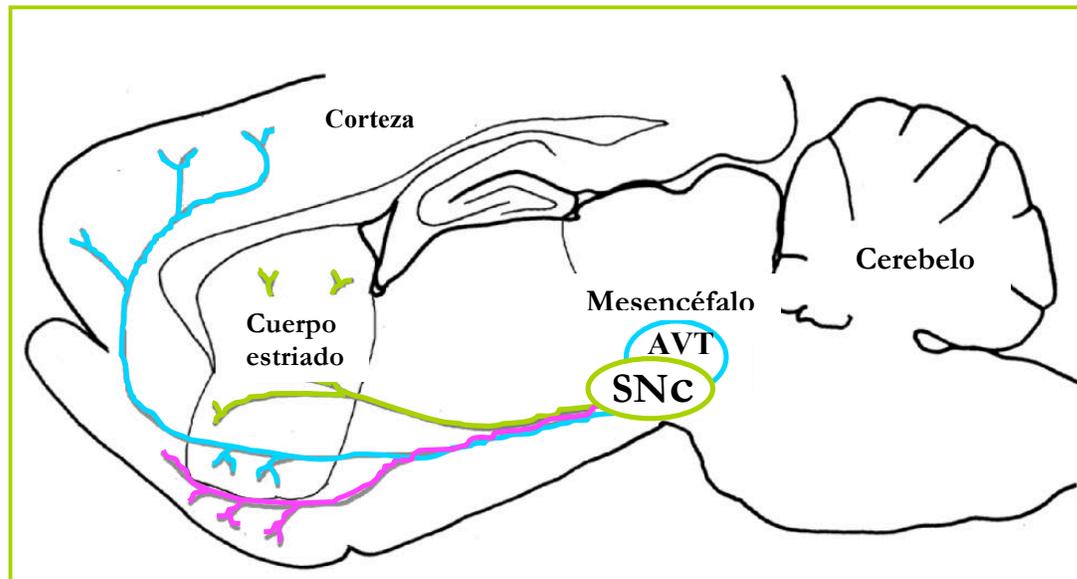


Figura 1. Representación de los sistemas dopaminérgicos en el cerebro del ratón. El sistema nigroestriatal originado en la sustancia negra (en verde); el sistema mesolímbico (en rosa) y el sistema mesocortical (en azul) originados en el área tegmental ventral.

1.2 GENES QUE REGULAN LA DIFERENCIACIÓN DE NDAm

La diferenciación de las NDAm a partir de células progenitoras neuronales implica la expresión de una cascada específica de genes que regulan dicha diferenciación. Entre los genes involucrados se encuentra el gen Tirosina hidroxilasa (TH) que inicia su expresión a los 11.5 días del desarrollo embrionario en el ratón y su función está implicada en la síntesis del neurotransmisor dopamina (Blanchard, *et al.* 1994). El gen Pitx3 es un factor de transcripción que se une a la región promotora del gen TH y promueve su transcripción (Lebel, *et al.* 2001; Cazorla, *et al.* 2000). Pitx3 comienza a expresarse en precursores

dopaminérgicos mesencefálicos y en el cristalino de embriones de ratón. Su expresión inicia a los 11 días del desarrollo embrionario del ratón y es mantenida hasta la etapa adulta (Smidt, *et al.* 1997).

Otro gen involucrado en la diferenciación de NDAm es el gen *Nurr1*, un factor de transcripción que se expresa a los 10.5 días del desarrollo embrionario de ratón (Saucedo-Cárdenas, *et al.* 1996; Zetterstrom, *et al.* 1996) y cuya función aún no es completamente entendida. Se considera que la expresión del gen *Nurr1* es básica para que las células adquieran un fenotipo dopaminérgico ya que su inactivación en ratones provocó la falta de expresión de marcadores dopaminérgicos y muerte celular por apoptosis en la región ventral del mesencéfalo (Zetterstrom, *et al.* 1997; Saucedo-Cárdenas *et al.* 1998; Castillo *et al.* 1998;). A pesar de que el gen *Nurr1* se expresa en varias regiones del SNC, únicamente la región ventral del mesencéfalo fue afectada. Las neuronas que mueren en el ratón knockout *Nurr1* (*Nurr1* $-/-$) son las mismas que se pierden en los pacientes con EP, por lo que el ratón *Nurr1* $-/-$ se consideró como un posible modelo animal de dicha enfermedad. A partir de ese momento el ratón *Nurr1* $-/-$ ha sido ampliamente utilizado en investigación para determinar la base molecular que conduce a la muerte neuronal con la finalidad de poder relacionarlo de forma directa con la EP. Sin embargo, para determinar el impacto del gen *Nurr1* específicamente en el mesencéfalo es importante eliminar de forma específica la expresión del gen *Nurr1* en las NDAm. Una de las estrategias utilizadas para controlar la expresión de un gen en tiempo y espacio es el sistema Cre/loxP.

1.3 SISTEMA CRE/LOXP

El sistema Cre/loxP fue descubierto en 1984 (Abremski, *et al.* 1984; Hoess, *et al.* 1984a; Hoess, *et al.* 1984b), pero a finales de los 80's y principios de los 90's se determinó que podía funcionar en células eucariotas en cultivo (Sauer, 1988). El sistema tiene la ventaja de no requerir cofactores o secuencias adicionales para que ocurra la recombinación ya que los únicos elementos requeridos son la enzima de recombinación, Cre recombinasa y dos sitios de reconocimiento llamados loxP (Sauer, 1993).

La enzima Cre recombinasa fue aislada del bacteriófago P1. Es una topoisomerasa tipo 1 que pertenece a la familia de las integrasas de recombinación sitio específico. La enzima de 38 kDa, está formada por dos dominios unidos por una secuencia corta aminoacídica. El dominio del extremo amino terminal contiene 5 hélices alfa. El dominio del extremo carboxilo terminal es principalmente helicoidal y contiene el sitio activo. Este último contiene tres residuos catalíticos conservados que son arginina, histidina y tirosina (Hoess, *et al.* 1990; Mack, *et al.* 1992).

El otro de los elementos requeridos para la recombinación es el sitio loxP que es una secuencia de 34 pb. El sitio loxP consiste en una región central asimétrica de 8 pb y es flanqueada por dos secuencias palindrómicas (repeticiones invertidas) de 13 pb. El centro asimétrico define la orientación de la secuencia loxP (Fig. 2).

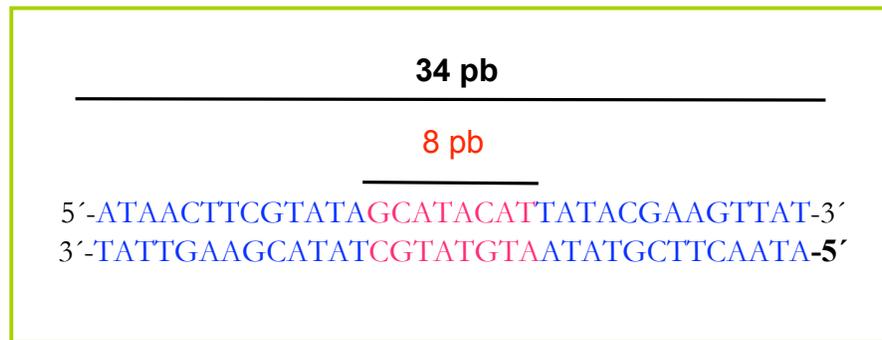


Figura 2. Sitio loxP. Secuencia nucleotídica del sitio loxP mostrando la región central asimétrica (8pb) y las regiones palindrómicas flanqueantes.

El mecanismo de recombinación consiste en la localización de dos sitios loxP flanqueando la secuencia de interés. La enzima Cre recombinasa se une a cada una de las mitades palindrómicas de un sitio loxP. En consecuencia, en el momento de la recombinación de los dos sitios loxP, se forma un tetrámero con las cuatro moléculas de la Cre recombinasa. En cada uno de los sitios loxP, una enzima corta el enlace fosfato entre la guanina y citosina del centro asimétrico del sitio loxP en dirección 5' a 3' en una de las cadenas complementarias de DNA. En la otra cadena complementaria y opuesta, la ruptura ocurre entre la primera adenina y timina del centro asimétrico del sitio loxP. La ruptura del enlace fosfodiéster ocurre cuando el aminoácido tirosina del sitio activo de la Cre recombinasa, se une al oxígeno 3' del enlace fosfato entre las bases GC y AT respectivamente (Fig. 3). Los grupos hidroxilos 5' liberados en el rompimiento del enlace forman un nuevo enlace fosfodiéster con el fosfato de la tirosina del otro sitio loxP, recombinando de esta forma ambos sitios. Como el rompimiento ocurre en cadenas opuestas en una doble hélice de DNA, el sitio loxP queda dividido a la mitad pero con extremos cohesivos. En el momento de la recombinación la cadena de DNA entre los dos

sitios loxP se dobla formando un asa (Fig. 4), permitiendo que cada mitad de un sitio loxP reaccione con una mitad del otro sitio loxP (Guo, *et al.* 1997).

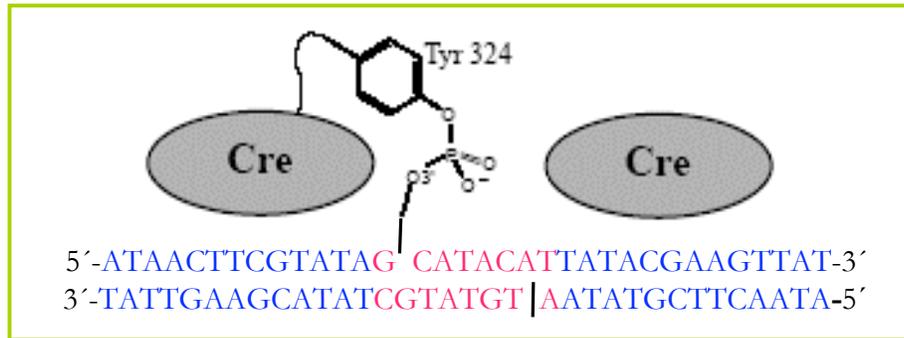


Figura 3. Interacción de la enzima Cre recombinasa con los sitios loxP.
La enzima Cre recombinasa reconoce los sitios específicos donde realiza un corte para separar las hebras de DNA.

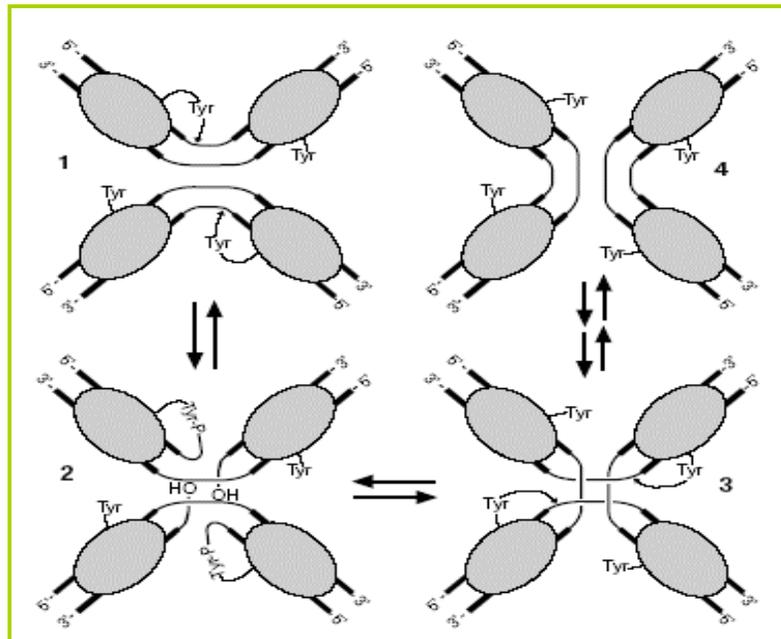


Figura 4. Mecanismo de recombinación de secuencias loxP.

Mediante este mecanismo se pueden eliminar secuencias importantes para la expresión de un gen. Secuencias tales como exones, pueden ser eliminadas o incluso invertidas si los sitios loxP se encuentran en direcciones opuestas.

1.4 APLICACIONES DEL SISTEMA CRE/LOXP

El sistema Cre/loxP ha sido ampliamente utilizado tanto en ensayos *in vitro* como en sistemas *in vivo*. En ratones transgénicos se utiliza para eliminar de forma específica un gen en una sola región sin alterar la expresión del gen blanco en el resto del animal y se le conoce como “knockout” condicional. Para producir un knockout condicional pueden utilizarse varias alternativas, por ejemplo, el alelo condicional puede ser expresado por un promotor específico de células o tejido, mientras que la expresión de la enzima Cre recombinasa puede ser regulada por otro promotor del mismo tejido o célula. También se puede expresar el transgén condicional en todo el organismo del animal y la Cre recombinasa bajo un promotor específico del sitio donde quiere alterarse la expresión del gen blanco. Lo importante es que el gen de interés sea flanqueado por los sitios loxP. Generalmente los sitios loxP son insertados en intrones, donde no producen ninguna alteración en el animal, pero también se pueden insertar en los extremos del gen e inducir la eliminación completa del mismo. Cuando los animales que portan el transgén condicional son apareados con los animales transgénicos que expresan la enzima Cre recombinasa en un tejido particular, en la progenie de esa cruce ocurre la delección, inversión ó translocación de material genético en el sitio donde la enzima Cre recombinasa sea producida.

El rango de corte de la Cre recombinasa es sorprendentemente grande, logrando eliminar regiones de hasta 400 Kb, lo que hacen que el sistema Cre/loxP sea una importante herramienta en el campo de la investigación biomédica (Li, *et al.* 1996; Nagy, 2000). Lo más interesante del sistema Cre/loxP es que se puede eliminar un gen en una tejido específico aunque ese gen se exprese en muchas regiones de forma normal. Lo importante es utilizar la región promotora de un gen específico del sitio donde se desea eliminar el gen blanco para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa. Por ejemplo, actualmente no existe un solo modelo animal de la EP, donde pueda desarrollarse la muerte de NDAm de manera progresiva. Sin embargo este tipo de estrategia representa una alternativa interesante.

1.5 EXPRESIÓN DE LA ENZIMA CRE RECOMBINASA EN NDAM

Para poder dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa específicamente en NDAm, es necesario utilizar la región promotora de un gen que se exprese únicamente en este tipo celular. En el mesencéfalo se expresan varios genes, entre ellos, AADH, Limx1, Nurr1, TH, Shh, FGF8, TGF- entre otros (Simon, *et al.* 2003; Wagner, *et al.* 1999; Wang, *et al.* 2004; Zetterstrom, *et al.* 2004; Roussa and Krieglstein, 2004). Sin embargo cada uno de ellos se expresa en otras regiones del sistema nervioso central. El gen que tiene un patrón de expresión restringido al mesencéfalo, es Pitx3. Por lo que, la región promotora del gen Pitx3 puede utilizarse para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa de manera específica en las NDAm del ratón.

1.6 PITX3

El gen Pitx3 pertenece a la familia de factores de transcripción y genes homeóticos Pitx. Otros miembros de esta familia son los genes Pitx1 y Pitx2. Ambos genes se expresan en la hipófisis, de allí deriva su nombre “pit-x” (pituitary homeobox) (Gage, *et al.* 1999). El homeodominio de estos genes es altamente conservado y difiere en uno o dos aminoácidos. La expresión de Pitx3 se localizó en el mesencéfalo, específicamente en la región ventral; posteriormente se descubrió que también se expresa en el cristalino y en músculo esquelético (Smidt, *et al.* 2004; Coulon, *et al.* 2007).

El gen Pitx3 mide 12.6 kb y está organizado en 4 exones y 3 intrones (Fig. 5). Los exones miden 125, 129, 210 y 927 pb. Los intrones son de 10729, 196 y 379 pb respectivamente. El homeodominio es interrumpido por un intrón en la posición 46. El codón de inicio de la traducción está situado en el exón 2 (Semina, *et al.* 1997). En la región 5' del gen, situada antes del punto de inicio de transcripción se localizaron las cajas TATA y la caja CAAT en la posición -86 a -80 y -205 a -200, así como algunos dominios de unión para factores de transcripción relacionados con el desarrollo del cristalino y la formación de la región cráneo-facial, entre ellos el de las proteínas AP-2 y Maf. Aunque en la región 5' del gen Pitx3 ya se han identificado secuencias propias de un promotor, la región promotora del mismo aún no ha sido delimitada. El gen Pitx3 es flanqueado por dos genes. En su región 5' UTR se localiza la región promotora del gen Gbfl, situado a 4.2 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen Pitx3. Ambos genes posiblemente tienen en común parte de sus secuencias promotoras. En la región 3' del gen Pitx3 se localiza el gen

Cig30 de quien al menos 10 nucleótidos de la región 3' UTR se traslapan con la secuencia del gen Pitx3 (Tvrđik, *et al.* 1999).

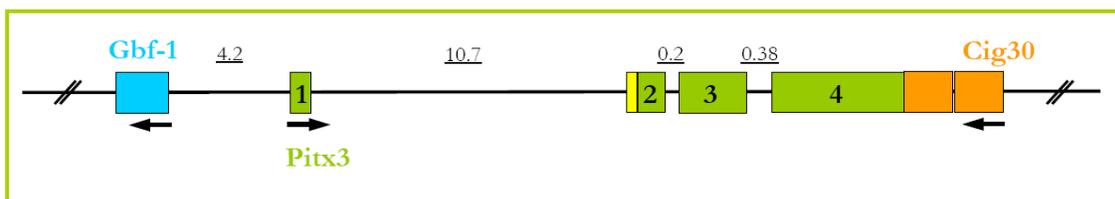


Figura 5. Representación del locus del gen Pitx3.

1.7 DELECIÓN EN LA REGIÓN 5' DEL GEN PITX3

El locus del gen Pitx3 se encontró en el cromosoma 19 del ratón, cerca de una región previamente identificada, cuya mutación provoca alteraciones morfológicas en ratones. El fenotipo de esos ratones conocidos como “*aphakia*” se caracteriza por alteraciones oculares durante el desarrollo embrionario. Posterior al nacimiento los ratones presentan ojos pequeños con ausencia del cristalino y párpados unidos (Semina, *et al.* 1997). En ese momento aún no se había determinado que gen o genes producían tales alteraciones, por lo que al identificar el locus del gen Pitx3 cercano a esa región se pensó que el gen podría estar involucrado en el fenotipo de los ratones *aphakia*. Cuando se analizó la secuencia codificante del gen Pitx3 en el genoma de los ratones *aphakia* no se encontró ninguna alteración. Sin embargo al analizar la región 5' UTR se encontró una delección de 652 pb situada a -2.5 kb del punto de inicio de la transcripción (Semina, *et al.* 2000; Rieger, *et al.* 2001). Posteriormente se encontró que los ratones *aphakia* también presentaban la pérdida del exón 1, sitio donde inicia el homeobox del gen Pitx3 (Rieger, *et*

al. 2001). En los ratones pudieron observar que las alteraciones no solo eran restringidas al ojo sino que también había una disminución considerable del número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo (van den Munckhof, *et al.* 2003; Smidt, *et al.* 2004a; Smidt, *et al.* 2004b; Smits, *et al.* 2005). Mostrando con ello que el gen Pitx3 y su región 5' UTR son esenciales en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas a nivel mesencefálico.

Por lo tanto la región 5' del gen Pitx3, es un candidato ideal para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa en NDAm. De tal forma que mediante técnicas de ingeniería genética, se obtuvo un cassette de expresión de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de la región promotora del gen Pitx3 de 4.2kb. Se logró demostrar la actividad promotora de esta región de 4.2 kb del gen Pitx3 en una línea celular de neuronas con fenotipo dopaminérgico mediante la funcionalidad de la enzima Cre recombinasa (Castillo-Carranza *et al.* 2008). En base a estos hallazgos, se decidió demostrar la funcionalidad *in vivo* del promotor de 4.2 kb. El cassette de expresión portando el gen de la Cre-recombinasa bajo la regulación del promotor del gen Pitx3 se utilizó para desarrollar un ratón transgénico. Sin embargo la línea de ratones transgénicos no presentó la expresión de Cre recombinasa en las NDAm. Se encontró una fuerte expresión en el bulbo olfatorio.

Es importante mencionar que este trabajo forma parte de un proyecto mayor que tiene como meta determinar el efecto de la inactivación condicional del gen Nurr1 en regiones específicas donde se expresa Nurr1, sin alterar la expresión del gen Nurr1 en otras

regiones del SNC. Con ello se podrá relacionar, si la muerte de los ratones *Nurr1*^{-/-} es provocada por la falta de expresión del gen *Nurr1* en determinada región.

De allí la importancia de esta línea de ratones *Pitx3-Cre* que expresan la Cre recombinasa en el bulbo olfatorio, donde también sabemos se expresa el gen *Nurr1*. Por medio de estos ratones se podría inactivar condicionalmente el gen *Nurr1* en el bulbo olfatorio, para demostrar si la falta del gen *Nurr1* en el bulbo olfatorio es responsable de la letalidad de los ratones *Nurr1*^{-/-}.

Por lo antes mencionado, este trabajo se enfocó en la caracterización molecular y morfológica de esta línea de ratones *Pitx3-Cre*.

2. JUSTIFICACIÓN

El gen *Nurr1* se expresa en varias regiones del sistema nervioso central. Los ratones con la inactivación del gen *Nurr1* (*Nurr1*^{-/-}) sufren pérdida en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas así como una letalidad a las primeras doce horas de vida. Sin embargo, aún se desconoce si la letalidad de los ratones *Nurr1*^{-/-} se debe a su falta de expresión en alguna otra de las regiones en donde se expresa el gen *Nurr1*.

Una forma de contestar esto es inactivando de manera condicional, por medio del sistema Cre/LoxP, el gen *Nurr1* en una región específica en donde se expresa, sin alterar su expresión en el resto de las regiones del SNC. Con ello se podrá relacionar si la muerte de los ratones *Nurr1*^{-/-} es provocada por la falta de expresión del gen *Nurr1* en determinada región.

El contar con la línea de ratones *Pixt3-Cre* que expresan la Cre recombinasa en el bulbo olfatorio podría permitir la inactivación del gen *Nurr1* en esta región del SNC.

Por lo tanto es importante realizar la caracterización de la línea de ratones *Pixt3-Cre*, a nivel molecular y morfológico.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecular y morfológicamente una línea de ratones transgénicos que expresan
el gen Cre-recombinasa

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Genotipificar la línea de ratones que portan el transgén Pitx3-Cre recombinasa
2. Determinar si existe un solo locus de integración para el transgén Pitx3-Cre recombinasa
3. Caracterizar el transgén Pitx3-Cre recombinasa
4. Determinar el patrón de expresión del transgén Pitx3-Cre recombinasa en los principales órganos de esta línea de transgénicos
5. Analizar la expresión del transgén Pitx3-Cre recombinasa en el SNC

4. MATERIAL

A menos que se indique lo contrario, los reactivos se adquirieron de las casas comerciales Sigma-Aldrich, New England Biolabs, Stratagene, Research Organics, US Biological, Merck, Fermentas, Corning, Promega, GeneScript, Fisher Scientific, Roche, GIBCO-BRL, Bioline, siendo el orden presentado indicador proporcional de la cantidad de reactivos adquiridos de cada una de ellas.

4.1 SOLUCIONES

Solución para el aislamiento del DNA

Solución de lisis (Tris-HCL 0.1M pH 8.0, EDTA 5mM, NaCl 0.2M, SDS 0.2%).

Proteinasa K 10 mg/ml

Soluciones para PCR

Buffer para PCR 10X ROCHE

dNTP's 100mM (GENESCRIPIT)

Oligonucleótidos 100 ng/μL o 5μM (OPERON-QUIAGEN)

Tabla 1. Oligonucleótidos para determinar el genotipo de los ratones transgénicos.

| ID | Secuencia |
|----------|------------------------------|
| Cre-F | 5'-CCATCTTCCAGCAGGCGCAC-3' |
| Cre-R | 5'-GCGTTCGAACGCACTGATTTC-3' |
| FpitB3.1 | 5'-CGACAGCCGGGTTCTCTGTC-3' |
| R cre20 | 5'-CGATCCCTGAACATGTCCATC-3' |
| ROSA26-F | 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3' |
| ROSA26-R | 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3' |
| SA-R | 5'-GCCAAGAGTTTGTCTCAACC-3' |
| FpitA5 | 5'-CTGGGTATATGTGCCTGTCTC-3' |
| N2F | 5'-GGTCTTGGTCTCTAGGTCCAG-3' |
| N2R | 5'-CCTATTTGCTCTCCAACCTGAG-3' |
| RpitB3 | 5'-GACAGAGAACCCGGCTGTCCG-3' |
| Fcre20 | 5'-GATGGACATGTTTCAGGGATCG-3' |
| MtiR | 5'-GTTGGGGTCCATTCCGAGAT-3' |
| MtiF | 5'-ATCTCGGAATGGACCCCAAC-3' |
| N3R | 5'-CCAGAGTTAGACTCAAACAGG-3' |

Soluciones para Electroforesis

Jugo azul 6X

Azul de Bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25%, Glicerol 30%

TAE 1X

Tris-Base 40mM, EDTA 1mM, Acido acético glacial 0.1%, H₂O

Bromuro de etidio

0.5 µg/mL en H₂O

PBS 1X pH 7.4, pH 8.0

PBS 0.01M, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM

PFA 4% /PBS 1X pH 8.0

Solución para Tinción de LacZ

PBS 1X pH 8.0, MgCl₂ 2mM, NaDoc 0.01%, IGEPAL 0.02%, X-Gal 0.1% en DMF, K₃Fe(CN)₆ 5 mM, K₄Fe(CN)₆ 5mM.

4.2 MATERIAL CONSUMIBLE

Cajas de Petri de plástico

Cubreobjetos de vidrio

Cubetas para espectrofotómetro *Eppendorf*

Portaobjetos de vidrio

Viales de vidrio

Frascos de vidrio capacidad de 100, 500 y 1000 mL *Pyrex*

Probetas de vidrio de 10, 50, 100, 200, 250, 500 y 1000 mL.

Matraz de vidrio de 100, 200, 500 mL.

Puntillas para micropipeta de 10, 20, 200, 1000 μ L

Tubos *Eppendorf* de 0.2, 0.6, 1.5, 1.7 mL

Tubos *Falcon* capacidad 15, 50 mL

Guantes de latex

Guantes de nitrilo

Bolsas RPBI

Vaso de precipitado de vidrio de 100, 200, 500, 1000 mL.

Navaja para microtomo de perfil alto

4.3 EQUIPO

Autoclave *Felisa*

Balanza Analítica AND

Bomba peristáltica *Thermo*

Cámaras de electroforesis horizontal

Cámara fotográfica digital *Samsung*

Cámara de captura de imágenes *Leica*

Criostato

Esteroscopio de disección *Leica*

Espectrofotómetro photometer *Eppendorf*

Estuche de disección

Estufa

Fuente de poder

Horno de microondas

Incubadora con agitación y refrigeración

Microcentrífuga *Eppendorf*

Microcentrífuga refrigerada *Sigma*

Microaisladores

Micropipetas GILSON 20, 200, 1000 μ L.

Micropipetas LABNET 10, 20, 200, 1000 μ L.

Microscopio de campo claro *Leica DM1000*

Microscopio Estereoscópico *Leica*

Refrigerador

Congelador

Termociclador PTC 100

Transiluminador de luz UV

Ultracongelador

Vortex Maxi-Mix II

4.4 ANIMALES DE LABORATORIO

Ratones utilizados:

- *RATONES ROSA26R*. Creados en el laboratorio del Dr. Philippe Soriano, División de Ciencias Básicas, Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson Seattle, Washington. (Soriano, 1999). Estos ratones presentan el gen LacZ, que es un gen reportero histoquímico clásico, el cual codifica para la enzima beta galactosidasa. Puede ser detectado usando una variedad de substratos, entre ellos el X-GAL, el cual al ser procesado por la beta galactosidasa, produce un compuesto de coloración índigo, estable e insoluble. En estos ratones el gen LacZ se encuentra insertado en el locus ROSA26R y la expresión de este gen mimifica la del locus ROSA26, ocurriendo de manera ubicua en los tejidos del ratón.

Sin embargo la expresión del gen LacZ es condicional a la eliminación por recombinación homóloga de una secuencia de terminación de la transcripción que se encuentra entre la región promotora y el gen LacZ, y se encuentra flanqueada por sitios loxP. Por lo tanto, estos ratones ROSA26R presentan expresión del gen LacZ sólo en presencia de la enzima Cre recombinasa, siendo el tejido en el cual se encuentre su expresión, dependiente del promotor que dirige la transcripción del gen Cre recombinasa. Por esta característica de expresión condicional de LacZ, esta es una línea de ratones reportera de la expresión espacial y temporal del gen Cre recombinasa (Soriano, 1999).

- *RATONES PITX3-CRE RECOMBINASA*. Creados en colaboración con el Dr. Paul Overbeek. Forman parte del desarrollo del presente trabajo.

5. MÉTODOS

5.1 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS *PITX3-CRE RECOMBINASA*

La estrategia que se siguió para obtener ratones transgénicos fue el construir un vector para la expresión del transgén Pitx3-Cre recombinasa. El transgén fue conformado por el gen de interés Cre recombinasa bajo la regulación de una región (promotor) del gen Pitx3 y una región reguladora de la terminación de la transcripción (poli A). Posteriormente se microinyectan muchas copias del transgén en óvulos fecundados de ratón, los cuales se implantan en una hembra pseudopreñada para su desarrollo. Finalmente se analizan las crías para comprobar la presencia del transgén.

Este tipo de estrategia se le conoce como generación de transgénico clásico.

Para generar los ratones transgénicos Pitx3-Cre recombinasa el vector de expresión transgénica se diseñó, por un lado, a partir del plásmido pBS185 que contiene el gen de Cre recombinasa de 2.7 Kb, el cual se subclonó en el plásmido pBS KS y se denominó pBS-Cre. Por otro lado, se amplificó por PCR un fragmento de DNA de 4.2 Kb del gen Pitx3. Este fragmento se clonó posteriormente en el plásmido pBS-Cre generándose el vector pPitx3-Cre de 9.7 Kb que contiene un cassette de expresión que consta del promotor 4.2 Kb Pitx3 seguido del gen Cre recombinasa y la señal de poliadenilación del gen Mt1. Este

vector de expresión fue creado por la **Dra. Diana L. Castillo Carranza** (Tesis de Doctorado, 2006, Facultad de Medicina, UANL).

El cassette de expresión ahora denominado Pitx3-Cre se extrajo del vector por medio de digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *SpeI*. Este fragmento se purificó por el método de columnas de afinidad.

El fragmento *KpnI-SpeI* purificado se microinyectó en los pronúcleos de óvulos fecundados de ratón de 1 día de gestación de hembras de la cepa FVB. Los óvulos se colocaron quirúrgicamente en oviductos de hembras CD1 pseudopreñadas y se permitió que se desarrollaran las crías a término (este procedimiento de la microinyección fue realizado por el laboratorio del Dr. Paul Overbeek del Departamento de Biología Celular y Molecular, Colegio Baylor de Medicina, Houston, Texas). Se realizaron un total de cinco microinyecciones de manera independiente, por lo que se obtuvieron camadas de crías provenientes de cada microinyección. A los críos provenientes de cada camada se les denomina fundadores ya que son posibles ratones transgénicos y se podrían utilizar para originar o fundar una nueva cepa o línea de ratones en caso de portar el transgén y heredarlo a la descendencia.

Debido a lo anterior, se contaba con cinco posibles líneas de ratones transgénicos para Pitx3-Cre recombinasa ya que en cada microinyección la inserción del transgén en el genoma del ratón fue al azar y por tanto diferente e independiente.

A los 21 días de nacidos los ratones provenientes de cada microinyección se destetaron, se sexaron y se les realizó una biopsia de una porción de la cola para realizar extracción de DNA y poder determinar la presencia del transgén Pitx3-Cre recombinasa en

el genoma de los mismos (proceso denominado genotipificación). Individuos de las cinco líneas de ratones fueron positivos para la presencia del transgén por lo que se procedió a expandir cada una de ellas al realizar cruces con ratones silvestres de la cepa C57BL6 y así obtener más ratones transgénicos para poder llevar a cabo un primer análisis de la expresión del transgén Pitx3-Cre recombinasa.

Una de las líneas de ratones mostró un patrón de expresión del transgén Pitx3-Cre recombinasa en la región del bulbo olfatorio. A esta línea se le asignó, en un principio, el número 2230 y se dio el nombre *Pitx3-Cre*. (Tesis de Maestría, 2008, Facultad de Medicina, UANL).

Debido al patrón de expresión que presentó esta línea *Pitx3-Cre*, fue seleccionada para un análisis molecular y morfológico, el cual se presenta en el presente texto.

5.2 MANEJO DE LOS RATONES EN EL BIOTERIO

Los ratones se mantuvieron en el bioterio del departamento de Histología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Se utilizaron cajas denominadas microaisladores con aserrín limpio, tapa con filtro y una rejilla para colocar el recipiente del agua y la comida. Los ratones se mantuvieron a una temperatura de 23-25 °C y con un fotoperíodo de 8:00-20:00 horas luz. Se brindó agua y comida para roedores *ad libitum*.

Para los apareamientos, tres o cuatro días antes de llevarlos a cabo, se colocó en las cajas de las hembras aserrín con presencia de orina de los machos para exponer a las

hembras a feromonas de machos y así estimular el estro. Antes del apareamiento, el macho se colocó en una caja para que se aclimate. Después de esto, se colocó una hembra en la caja con el macho y se dejó el tiempo necesario según el tipo de apareamiento.

Se realizaron dos tipos de apareamientos.

El primero se llevó a cabo para formar y expandir la colonia de ratones. Este tipo de apareamiento se llevó a cabo durante el tiempo que se estuvo utilizando la línea de ratones. Las hembras colocadas con los machos se pueden dejar en la caja durante su gestación y nacimiento de las crías.

El segundo se realizó para obtener ratones de un cierto genotipo de interés y de una edad conocida, su posterior análisis e intentar contestar la hipótesis planteada. Las hembras utilizadas en éstas cruas se colocaron por las tardes alrededor de las 18:00 horas y se les revisó por la mañana del día siguiente, buscando un tapón vaginal que indica que hubo apareamiento y señala el día exacto en que se realizó. Estas hembras se colocaron en otra caja y se dejó que continuaran la gestación.

En los dos tipos de apareamientos que se llevaron a cabo, los ratones fueron heterocigotos para los genes de interés.

Las crías se dejaron con la madre hasta las tres semanas de edad. Después de este tiempo, se identificó el sexo de las crías y se mantuvieron en cajas separadas. Se les tomó una biopsia de la cola para realizar extracción de DNA y genotipificación de los genes de interés.

5.3 APAREAMIENTO DE RATONES *PITX3-CRE* CON RATONES ROSA26R

Para poder realizar experimentos posteriores con la línea de ratones *Pitx3-Cre*, se utilizó la línea de ratones transgénicos reportera ROSA26R, para monitorear la expresión del sistema Cre/loxP. Esta línea presenta un gen LacZ insertado en el locus ROSA26 y su expresión está sujeta a la presencia de Cre recombinasa. Ratones heterocigotos de esta línea se aparearon con ratones heterocigotos de la línea *Pitx3-Cre*. A los críos resultantes se les tomó una biopsia de cola, se genotipificaron por PCR y se diferenció entre ratones silvestres, sólo heterocigotos para *Pitx3-Cre* recombinasa, sólo heterocigotos para LacZ, y doble heterocigotos para *Pitx3-Cre* recombinasa y LacZ. Todos los genotipos antes mencionados se utilizaron, siendo los dobles heterocigotos para *Pitx3-Cre* recombinasa y LacZ los ratones necesarios para la obtención de la caracterización, y el resto como controles negativos.

A los ratones que se obtuvieron de los apareamientos se les denominó *Pitx3-Cre* /ROSA26R.

5.4 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

5.4.1 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE TEJIDOS

Con el fin de conocer el genotipo de los ratones, se obtuvo DNA a partir de una biopsia de tejido para su uso posterior en la técnica de PCR.

Se procedió a cortar aproximadamente 1 cm. de la cola de cada ratón a analizar. La biopsia se colocó en un tubo *Eppendorf* de 1.5 mL estéril, para ser procesada inmediatamente.

En los tubos *Eppendorf* de 1.5 mL con la biopsia de tejido, se agregaron 500 µl de solución de lisis y 10 µL de proteinasa K (10mg/mL). Se dejó en agitación (300-350 rpm) toda la noche a 55°C. Al observar digestión completa del tejido, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos para precipitar la mayoría de las proteínas. El sobrenadante (450-500 µL), donde se encuentra el DNA en solución, se transfirió a un tubo *Eppendorf* 1.5 mL limpio.

5.4.2 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO CON FENOL-CLOROFORMO

Al tubo de 1.5 mL que contiene el DNA en solución (450-500 μ L), se añadió medio volumen de fenol saturado (250 μ L) y se mezcló por inversión hasta ser homogéneo. Se agregó medio volumen de cloroformo y se mezcló por inversión hasta homogenizar. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 8 minutos. Se observaron dos fases, la superior contiene el DNA. Se extrajo la fase superior (aproximadamente 450 μ L) sin tomar la interfase con proteínas, se colocó en un tubo *Eppendorf* de 1.5 mL estéril. Se agregó al sobrenadante un volumen de isopropanol (450 μ L), y se mezcló por inversión hasta que se observó un agregado en forma de hebras del DNA. Los tubos se centrifugaron por 5 minutos; una pastilla blanca formada por el DNA se observó al fondo del tubo. Se extrajo el isopropanol sin remover la pastilla. Se añadieron 500 μ L de etanol 70%, se agitó hasta despegar la pastilla de DNA para lavarla, se centrifugó un minuto. Se extrajo el etanol 70%, el tubo se dejó secar boca arriba en un horno a 60 °C. La pastilla se resuspendió en 150 μ L de agua bidestilada estéril o en TE 1X.

5.4.3 CUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA

A partir de las soluciones de DNA realizadas de las biopsias de los ratones, se realizaron diluciones 1:10. Se tomaron 20 μ L de cada solución de DNA, se colocaron en un tubo de 0.65 mL y se agregaron 180 μ L de H₂O ultrapura. Para conocer la concentración de DNA (ng/ μ L) de las diluciones, se determinó la concentración de DNA en un

espectrofotómetro a una longitud de 260nm. Se utilizaron cubetas desechables que requieren un volumen mínimo de 50 µL. Se indicó en el espectrofotómetro la dilución realizada. Como blanco de la cuantificación se utilizó H₂O ultrapura con que se realizaron las diluciones. Se llevó a cabo la cuantificación de cada muestra de DNA. El espectrofotómetro muestra la siguiente información: Absorbancia a 230nm, 260nm, 280nm y 320nm y concentración en µg/mL corregida con el factor de dilución. Además muestra las relaciones 230/260 y 260/280, para ver la pureza del DNA. Una relación entre 1.8 y 2.0 de las absorbancias 260/280 de la solución de DNA indica una pureza adecuada para realizar PCR y digestiones enzimáticas.

5.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Los ratones transgénicos *Pitx3-Cre* /ROSA26R se genotipificaron, esto es, se diferenció entre la presencia o la ausencia del transgén *Pitx3-Cre* recombinasa y el transgén *LacZ* en su DNA genómico. Para llevar a cabo esto, se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permitió amplificar a partir de DNA genómico de cada ratón una región de cada transgén y esta amplificación o producto del PCR se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa como una banda de DNA fluorescente cuando el gel fue expuesto a luz ultravioleta de 260nm.

Para realizar el PCR de cada uno de los transgenes fue necesario utilizar uno o más juegos de secuencias cortas de DNA u oligonucleótidos, específicos para el transgén *Pitx3-Cre* recombinasa y *LacZ* respectivamente.

Para la genotipificación del transgén Pitx3-Cre recombinasa se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos específicos. Uno de estos juegos consiste de los oligonucleótidos Cre-F y Cre-R, que delimitan una región de 619 pb en la reacción de PCR obteniendo un producto del mismo tamaño. Si ocurrió la amplificación del producto de PCR indica que el DNA genómico que se utilizó contiene el transgén Cre-recombinasa y si no hubo amplificación indica su ausencia en el DNA genómico.

El segundo de los juegos está compuesto de los oligonucleótidos FpitB3.1 y R cre20, que se unen a dos regiones del transgén, el primero específico del promotor Pitx3 y el segundo del gen Cre recombinasa, delimitando una región de 948 pb en la reacción de PCR logrando un producto de ese tamaño. Si ocurrió la amplificación del producto de PCR indica que el DNA genómico que se utilizó contiene el transgén Cre-recombinasa y si no hay amplificación indica que no se encuentra en el DNA.

Para el transgén LacZ se utilizó un juego de tres oligonucleótidos, ROSA26-F, ROSA26-R y SA-R. Cabe mencionar que a diferencia de las reacciones anteriores para el gen Cre recombinasa donde en cada PCR sólo se utilizan dos oligonucleótidos y sólo existe un producto, para el gen LacZ con los tres oligonucleótidos se limitan dos regiones de aproximadamente 250 y 500 pb, obteniéndose en la amplificación del DNA genómico por PCR dos productos de los tamaños mencionados. Para este transgén se utilizan tres oligonucleótidos ya que se conoce el sitio de inserción en el DNA genómico que es el locus ROSA26 y con estos se puede diferenciar entre el locus con la inserción y el locus sin la inserción de LacZ.

Con los oligonucleótidos ROSA26-F y ROSA26-R se produjo la banda de 500 pb mientras que con el mismo oligonucleótido ROSA26-R y el tercer oligonucleótido SA-R se

produjo una banda de 250 pb, siendo el oligonucleótido ROSA-26R utilizado en común para las dos reacciones de PCR. Estos oligonucleótidos pueden funcionar juntos, amplificando en un solo PCR los dos productos.

El producto de 500 pb indica la ausencia del gen LacZ en el locus ROSA26 o la presencia de un alelo silvestre del locus. El producto de 250 pb indica la presencia de un alelo del gen LacZ en el locus ROSA26 también denominado alelo mutante o la ausencia de un alelo silvestre.

Por lo tanto, si se obtienen los dos productos del PCR se refiere a un estado heterocigoto del transgén LacZ, solamente la presencia del producto de 500 pb indica un estado silvestre, y sólo la presencia del producto de 250 pb del PCR se refiere a un estado homocigoto del transgén LacZ.

5.4.4.1 Preparación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados y enviados liofilizados en viales por la compañía OPERON. Los oligonucleótidos se resuspendieron en buffer TE 1X. El volumen depende de la cantidad de picomoles de cada oligonucleótido que la compañía envía. La concentración final o de trabajo a la que se prepararon los dos juegos de oligonucleótidos para el transgén Pitx3-Cre recombinasa se basó en convertir los picomoles de cada vial a microgramos. A cada oligonucleótido se le agregó un volumen de TE1X para que quedara una concentración de 1 µg/µL, siendo esto la solución stock. A partir de esta concentración de oligonucleótido, se hizo una solución de trabajo en tubos *Eppendorf* de 0.6 mL, a una concentración de 100ng/µL (10 µL de oligonucleótido más 90 µL de agua estéril). Estas soluciones son las que se usaron para las reacciones de PCR.

La concentración final a la que se prepararon los tres oligonucleótidos para el transgén LacZ se basó en los picomoles que envió la compañía. A cada oligonucleótido se le agregó un volumen de TE 1X para que quedara una concentración de 100 μ M, siendo esta la solución stock. A partir de esta concentración de oligonucleótido, se hizo una solución de trabajo en tubos *Eppendorf* de 0.6 mL, a una concentración de 5 μ M (5 μ L de oligonucleótido más 95 μ L de agua bidestilada estéril). Estas soluciones son las que se usaron para el PCR.

Todas las soluciones de oligonucleótidos se guardaron a -20°C . En la tabla 2 se muestra los reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR para la amplificación del gen Cre recombinasa.

Tabla 2. Reactivos necesarios para la amplificación de Cre recombinasa.

| REACTIVO | CANTIDAD (μ L) | CONCENTRACIÓN FINAL |
|-------------------------|---------------------|---------------------|
| DNA | 2.0 | \approx 60ng |
| Cre-F 100ng/ μ L | 1.0 | 4ng/ μ L |
| Cre-R 100ng/ μ L | 1.0 | 4ng/ μ L |
| dNTP's 2.5 mM | 2.5 | 250 μ M |
| Buffer de PCR 10X | 2.5 | 1X |
| MgCl ₂ 10X | 2.0 | 2.0mM |
| Agua estéril | 13.5 | |
| Taq DNA Pol 1U/ μ L | 0.5 | 0.5 U |
| TOTAL | 25.0 | |

Tabla 3. Reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de una región correspondiente a la fusión Pitx3-Cre recombinasa.

| REACTIVO | CANTIDAD (μL) | CONCENTRACIÓN FINAL |
|-----------------------|---------------|---------------------|
| DNA | 2.0 | ≈ 60ng |
| FpitB3.1 100ng/μL | 1.0 | 4ng/μL |
| R cre20 100ng/μL | 1.0 | 4ng/μL |
| dNTP's 2.5 mM | 2.5 | 250μM |
| Buffer de PCR 10X | 2.0 | 0.8X |
| MgCl ₂ 10X | 1.5 | 1.5mM |
| Agua estéril | 14.5 | |
| Taq DNA Pol 1U/μL | 0.5 | 0.5 U |
| TOTAL | 25.0 | |

Tabla 4. Reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR para diferenciar los alelos mutantes de los silvestres LacZ.

| REACTIVO | CANTIDAD (μL) | CONCENTRACIÓN FINAL |
|-----------------------|---------------|---------------------|
| DNA | 2.0 | ≈ 60ng |
| ROSA26-F 5μM | 1.0 | 200nM |
| ROSA26-R 5μM | 1.0 | 200nM |
| SA-R 5μM | 1.0 | 200nM |
| dNTP's 2.5 mM | 2.5 | 250μM |
| Buffer de PCR 10X | 2.5 | 1X |
| MgCl ₂ 10X | 2.5 | 2.5mM |
| Agua estéril | 12 | - |
| Taq DNA Pol 1U/μL | 0.5 | 0.5 U |
| TOTAL | 25.0 | |

Tabla 5. Programa utilizado para PCR.

| Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) | Evento |
|------------------|---------------------|----------------------------------|
| 94 | 4 | <i>Desnaturalización inicial</i> |
| 94 | 1 | <i>Desnaturalización</i> |
| 60 | 1 | <i>Apareamiento</i> |
| 72 | 1 | <i>Extensión</i> |
| | 30 ciclos al paso 2 | |
| 72 | 7 | <i>Extensión prolongada</i> |
| | | |

5.4.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos que resultaron del PCR se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 0.8%, la cual es suficiente para resolver el tamaño de los productos de DNA. Para llevar a cabo la electroforesis se usó un voltaje de 80-100 V durante hora y media.

Al concluir la electroforesis, el gel se colocó por 10 minutos en una solución de bromuro de etidio (2 µg/mL) que tiñe el DNA y se observó posteriormente en un transiluminador de luz UV para revelar las muestras de DNA. Los geles expuestos en el transiluminador se fotodocumentaron y las imágenes se almacenaron en un equipo de cómputo para su posterior análisis.

5.5 DETERMINAR SI EXISTE UN SOLO LOCUS DE INTEGRACIÓN PARA EL TRANSGÉN PITX₃-CRE RECOMBINASA

Como ya se describió, se generó una línea de ratones transgénicos del tipo clásico, en donde el evento de integración del transgén Pitx3-Cre recombinasa en el DNA genómico del ratón fundador ocurrió al azar. Debido a esto existe la posibilidad de que la integración haya ocurrido en más de un lugar en el genoma, o locus. Esto puede dar por consiguiente que el transgén no se transmita con un patrón de herencia mendeliana, resultando en frecuencias de herencia de más del 50%, mostrando diferencia de expresión entre los críos de la primera generación (F1), dependiendo de cuál sitio de integración heredaron. Por lo anterior es necesario analizar la transmisión del transgén en la línea de ratones *Pitx3-Cre*.

Este análisis se llevó a cabo en un principio al realizar apareamientos de ratones F1, por lo tanto hemicigotos, con ratones silvestres. Los ratones resultantes se genotipificaron, y aquellos positivos para el transgén se aparearon nuevamente con ratones silvestres. Este tipo de apareamientos se cumplió a lo largo del tiempo que duró el proyecto. Todos los ratones que surgieron de estos apareamientos, se genotipificaron y sirvieron para observar el patrón de transmisión del transgén Pitx3-Cre recombinasa. Además se utilizaron ya fuera para mantener constante la línea de ratones o para alguno de los experimentos de análisis de expresión.

5.6 CARACTERIZACIÓN DEL TRANSGÉN PITX3-CRE RECOMBINASA

A partir de DNA genómico de ratones que resultaron positivos para la presencia del transgén como ya se describió, se procedió a comprobar que en el genoma del ratón existían copias íntegras del mismo. Para llevarlo a cabo, se diseñaron varios juegos de oligonucleótidos localizados a lo largo de la secuencia de transgén, que sirvieron para amplificar a partir del DNA genómico por medio de reacciones de PCR la extensión completa del transgén así como la diferentes secciones de que está compuesto.

Las amplificaciones o productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa como bandas de DNA fluorescente cuando el gel fue expuesto a luz ultravioleta de 260 nm.

Los juegos de oligonucleótidos utilizados fueron:

| | |
|-------------------|--------|
| FpitA5-N2F, | 1438pb |
| N2R-RpitB3, | 1812pb |
| FpitB3.1-R cre20, | 798pb |
| Fcre20-Cre-F, | 94pb |
| Cre-R-MtIR, | 960pb |
| MtIF-N3R | 1033pb |
| FpitA5-N3R | 6151pb |

Estos oligonucleótidos se prepararon a 100 ng/ μ L, como se describió anteriormente.

Tabla 6. Reactivos necesarios para llevar a cabo los PCR (reacción general).

| REACTIVO | CANTIDAD (μL) | CONCENTRACIÓN FINAL |
|-------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| DNA | 2.0 | $\approx 60\text{ng}$ |
| Oligo 1 $100\text{ng}/\mu\text{L}$ | 1.0 | $4\text{ng}/\mu\text{L}$ |
| Oligo 2 $100\text{ng}/\mu\text{L}$ | 1.0 | $4\text{ng}/\mu\text{L}$ |
| dNTP's 2.5 mM | 2.5 | $250\mu\text{M}$ |
| Buffer de PCR 10X | 2.0 | 0.8X |
| MgCl_2 10X | 1.5 | 1.5mM |
| Agua estéril | 14.5 | |
| Taq DNA Pol $1\text{U}/\mu\text{L}$ | 0.5 | 0.5 U |
| TOTAL | 25.0 | |

5.7 ANÁLISIS DE LOS RATONES DOBLE TRANSGÉNICOS *PITX3-CRE/ROSA26*

Los ratones que resultaron positivos para la genotipificación de *Pitx3-Cre* recombinasa y *LacZ*, de edades entre cuatro y seis meses, se utilizaron para llevar a cabo experimentos que muestren el patrón de expresión de la *Cre*-recombinasa.

Estos ratones presentan en su genoma el gen *Cre*-recombinasa así como al gen *LacZ*. En este último, la transcripción está condicionada a la presencia del producto proteico del gen *Cre*-recombinasa porque permitirá que inicie su expresión. La manera de detectar esta expresión del gen *LacZ* es por medio de su producto proteico la enzima Beta galactosidasa la cual, en presencia de la molécula X-GAL realiza una reacción histoquímica que dejará un precipitado color índigo en el tejido en que se exprese. Por lo tanto la expresión espacial y temporal de la *Cre*-recombinasa será indicada por el producto de *LacZ*. A continuación se muestran procedimientos para analizar ratones doble heterocigotos *Pitx3-Cre/LacZ*.

5.7.1 ANALIZAR EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA CRE-RECOMBINASA EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS *PITX3-CRE/ROSA26R* ADULTOS

5.7.1-A) PERFUSIÓN DE SOLUCIÓN FIJADORA CON BOMBA PERISTÁLTICA

Se prepararon tres recipientes cada uno con un volumen de 45 mL de H₂O, solución salina y la solución fijadora PFA 4%/ PBS 1X pH 8 fría respectivamente. Para realizar la perfusión se alistó una bomba peristáltica a un flujo de 5mL por minuto, con un tubo de grado alimenticio el cual llevaba una aguja hipodérmica en un extremo. El otro extremo del tubo se colocó en el recipiente con H₂O para lavarlo y sacar cualquier burbuja. Enseguida el tubo se colocó en el recipiente de solución salina, la cual se comenzó a pasar hasta que salió por la aguja, ahí se detuvo el flujo.

Cada ratón fue anestesiado con cloroformo. Se le pinchó una de las patas posteriores para comprobar que se encontrara anestesiado apropiadamente. El abdomen fue humedecido con alcohol. Se colocó el ratón en una rejilla, boca arriba y se sujetó con cinta adhesiva en las extremidades. Con unas pinzas se tomó de la piel al nivel del diafragma justo debajo de las costillas y se cortó para exponer el hígado. Se cortó lateralmente y luego en forma ascendente, cortando a través de las costillas. Se levantó la sección y se siguió cortando hasta tener acceso al corazón.

La aguja se colocó en el ventrículo izquierdo del corazón. Se realizó un corte de 1-2 mm. En la aurícula derecha y se prendió la bomba peristáltica que comenzó a pasar

alrededor de 30 mL de la solución salina, momento en el cual el hígado pasó de un color rojo intenso a uno café claro y el líquido que salía del ventrículo derecho era claro. Después de esto, se apagó la bomba, se retiró el tubo del recipiente de solución salina, se colocó en PFA 4%/PBS 1X pH 8 y se volvió a encender la bomba peristáltica. Se pasaron aproximadamente 45mL de la solución fijadora, se revisó la cola del ratón la cual presentó una rigidez que era indicador de una perfusión adecuada.

5.7.1-B DISECCIÓN Y POSTFIJACIÓN

A partir de los ratones perfundidos con solución fijadora, se realizó extracción de diversos órganos y tejidos para su uso en experimentos posteriores.

Se preparó un frasco de vidrio de 100 mL y dos frascos de vidrio de 10 mL etiquetados conteniendo PBS 1X pH 8.0 y colocados en hielo. Estos recipientes se utilizaron como contenedores de órganos y tejidos disecados de los ratones

a. Frasco de 100mL. #1: Caja torácica, lengua, tiroides, tráquea, esófago, corazón, pulmones, timo, bazo con páncreas, riñones con glándula adrenal, hígado con diafragma, tracto gastrointestinal, cola.

b. Frasco 10ml. #2: Piel, tracto reproductivo, extremidad posterior, oreja, glándulas salivales.

c. Frasco 10mL. 3: Cráneo con cerebro e hipófisis.

- Se removió piel de la caja torácica se colocó en PBS 1X.
- Se removió la oreja derecha y se separaron las dos capas de piel y se colocó en frasco 2
- Haciendo dos incisiones laterales paralelas en la caja torácica hasta la lengua, se obtuvieron las glándulas salivales y se colocaron en frasco 2.

- Desde la lengua se removieron los órganos hasta el diafragma al disecarlos del interior de la pared abdominal, y cortando el esófago arriba del diafragma. Se removió una sección transversa de un tercio de la lengua y se colocó en el frasco 1. Usando una navaja, se removió la cara ventral del corazón para exponer los ventrículos. Se colocó corazón, timo, pulmones, tráquea, esófago en frasco 1.
- Se removió todos los tejidos y órganos desde el diafragma hasta el colon, cortando el colon al final del recto.
- El bazo se obtuvo con parte del páncreas, así como riñones, hígado y diafragma. Se tomó una sección transversa del bazo que incluye páncreas y se colocó en el frasco 1. A un riñón se le hizo un corte sagital y en el otro un corte coronal. Todas las secciones junto con la glándula adrenal se colocaron en el frasco 1.
- Se realizaron cortes transversales en el hígado a cada lado de la vesícula biliar, y se colocó la sección en el frasco 1.
- El tracto gastrointestinal se colocó en el frasco 1.
- El trato genitourinario se obtuvo al disecar los órganos de la pared abdominal.
- La cabeza se separó del resto de cuerpo. En principio sólo se disecó el cerebro del resto de la cabeza.

Se cambió la manera de procesar esta región.

Se retiró la piel por completo. Se realizó un corte sagital dividiendo la cabeza. Las estructuras que incluía fueron: cerebro, hipófisis así como la cavidad olfativa y parte de la cavidad bucal. Se colocó en el frasco 3.

- Se removió la columna vertebral y se expuso aproximadamente 5 mm de la médula espinal. Se colocó en frasco 1.

- Se procedió a remover una extremidad posterior. Se le quitó la piel y se partió la pata en dos. Se colocó toda la extremidad en frasco 2.

Al terminar de diseccionar órganos y tejidos se descartó el PBS 1X en los frascos y se agregó PF4%/PBS1X pH8. Se dejaron 30 minutos en una incubadora con agitación a 4°C. Se retiró el PFA 4% y se lavó dos veces el contenido de los frascos en PBS 1X. Se lavó tres veces por 20 minutos cada uno en PBS 1X 4°C con ligera agitación.

Se mantuvo el PBS 1X en los frascos hasta que se inició la tinción completa para LacZ.

5.7.1-C) TINCIÓN COMPLETA PARA LACZ

Después de la perfusión y de la obtención de órganos y tejidos, se procedió a realizar la tinción completa de LacZ.

Se preparó la solución de tinción LacZ como sigue:

| Solución de Tinción LacZ | Para 100mL. |
|---|-------------|
| 2mM MgCl ₂ | 400μL |
| 0.01% NaDoc | 10mg |
| 0.02% IGEPAL | 20μL |
| 0.1% X-Gal en DMF | 2.5mL |
| 5mM K ₄ Fe(CN) ₆ | 5.0mL |
| 5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ | 5.0mL |
| 1X PBS pH 8.0 | 87.07mL |

La solución de tinción LacZ se agregó a los frascos 1, 2, 3, ocupando en cada uno aproximadamente dos terceras partes del espacio. Posteriormente se cubrieron los frascos con aluminio y se dejaron con agitación aproximada 100rpm y a 4°C 48 horas.

A las 24 se revisó y se terminó la incubación cuando el tejido presentó una tinción oscura. Si no se encontraba la coloración oscura a las 24 horas, se dejó las 48 horas.

Se enjuagó en PBS 1X pH8.0 y se lavó en dos veces en PBS 1X pH8.0 frío por 15 minutos con agitación ligera a 4°C. Después de lavado se postfijó con PFA4%/PBS1X pH7.4 en agitación aproximada a 100 rpm y a 4°C durante toda la noche. Después de esto, se lavó con PBS1X pH7.4 tres veces. A partir del último lavado se consideró terminada la tinción LacZ.

Dependiendo del análisis que se llevaría a cabo, los órganos procesados para la tinción completa de LacZ se dividieron en dos grupos:

- Un primer grupo de órganos se llevaron a terminar la técnica de tinción completa de LacZ.
 - Los órganos teñidos fueron aclarados con glicerol al 50% en PBS 1X pH7.4, con agitación a 100rpm y a 4°C toda la noche. Enseguida se realizó un aclaramiento final en glicerol al 70% con NaN₃ en PBS1X pH7.4 a temperatura ambiente y así se almacenaron. Posteriormente se documentaron con una cámara fotográfica digital en un estereoscopio.

- Un segundo grupo que constó solamente de los cerebros con tinción completa de LacZ, se sometió a la técnica histológica por congelación.

5.7.1-D) TÉCNICA HISTOLÓGICA POR CONGELACIÓN

- Los cerebros teñidos se colocaron en tubos de 50 mL con 30 mL de solución PBS1X/Sacarosa 15% para crioproteger durante dos horas. Se cambiaron los órganos a una solución de 30 mL de PBS1X/Sacarosa 30%, dejándose hasta que los cerebros se observaron en el fondo de los tubos, siendo esto indicador de que el cerebro había sido embebido por completo.

La crioprotección es llevada a cabo por la sacarosa al desplazar el agua de los tejidos, por lo tanto al congelarse en este caso el cerebro se evita la formación de cristales que dañen al tejido.

Después los cerebros se retiraron de la sacarosa y se colocaron en moldes en donde se agregó Tissue-Tek, como matriz de soporte y se colocaron a -80°C en un ultracongelador.

Cuando estuvieron listos los bloques de Tissue-Tek con los hemisferios de cerebros teñidos por LacZ, se colocaron dentro de un criostato previamente ajustado a -20°C . Se dejaron 20 minutos para que la temperatura del bloque alcance a -20°C . Se colocaron en el soporte de bloques, se colocó también la navaja desechable de perfil alto. Se realizaron cortes de $12\ \mu\text{M}$. Se dejaron a 37°C dos horas y se guardaron a -80°C de manera hermética para evitar desecación. Antes de usarse se dejaron llegar a temperatura ambiente.

5.7.1-E) TINCIONES ESPECIALES

○ **Tinción de Nissl**

- Violeta de cresilo 15 minutos
- Alcohol 96° dos cambios
- Alcohol 100°
- Alcohol/Xilol
- Xilol

○ **Tinción de Kluver-Barrera**

- Azul luxol toda la noche
- Alcohol 96° dos cambios
- Agua destilada tres cambios 3 minutos cada uno
- Carbonato de litio 0.05% tres inmersiones
- Agua destilada dos cambios hasta diferenciar
- Violeta de cresilo 30 minutos
- Alcohol 96° tres inmersiones
- Alcohol absoluto 30 segundos
- Alcohol/Xilol 30 segundos
- Xilol 30 segundos

6. RESULTADOS

6.1 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS *PITX3-CRE*

Se generó una línea de ratones que expresan el transgén Pitx3-Cre recombinasa (Tesis de Maestría, 2008, Facultad de Medicina, UANL). La estrategia para obtener ratones transgénicos fue la siguiente:

Se diseñó el vector pPitx3-Cre (Fig. 6), el cual se cortó con las enzimas de restricción *KpnI* y *SpeI* para liberar un fragmento de DNA que contenía el cassette de expresión Pitx3-Cre recombinasa de 6.9 Kb el cual está compuesto por el promotor de 4.2 Kb del gen Pitx3, el gen de la Cre recombinasa de 2.7 Kb y un terminador de la transcripción el gen MtI. El fragmento de 6.9 Kb se purificó de geles de agarosa por medio de columnas de afinidad (Fig. 7).

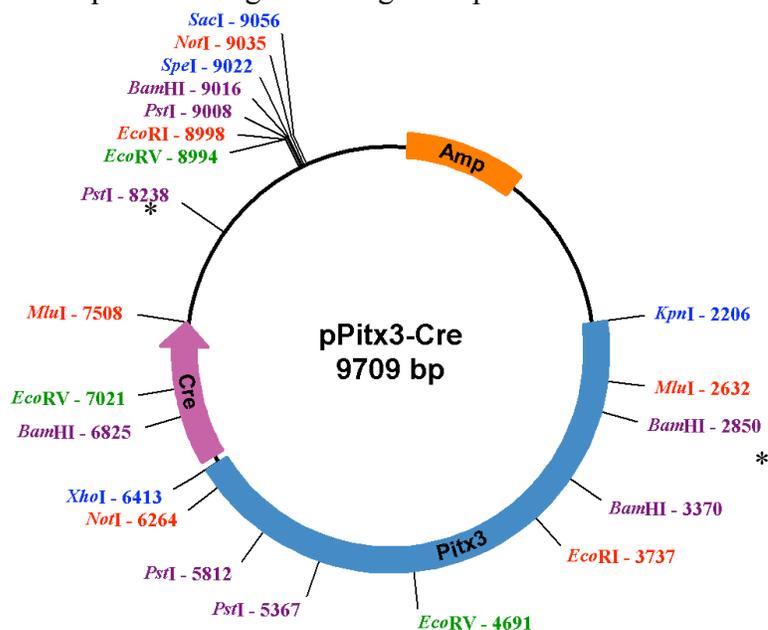


Figura 6. Vector pPitx3-Cre. Este vector permite la expresión de la Cre-recombinasa dirigido por el promotor 4.2 Kb del gen Pitx3. * Sitios de restricción utilizados para liberar el cassette de expresión.



Figura 7. Cassette de expresión Pitx3-Cre. El transgén fue liberado con las enzimas de restricción *KpnI* y *SpeI*. El fragmento contiene la secuencia codificante de la enzima Cre recombinasa y la secuencia de terminación de la transcripción del gen Mt1. La expresión de la enzima Cre recombinasa está dirigida por el promotor de 4.2 Kb del gen Pitx3.

El fragmento *KpnI-SpeI* se microinyectó en los pronúcleos de óvulos fecundados de ratón de 1 día de gestación de hembras de la cepa FVB y posteriormente fueron transferidos a ratonasceptoras pseudopreñadas. Se realizaron cinco eventos de microinyección, por lo que se obtuvo cinco líneas de posibles ratones transgénicos. Se dejó que las crías se desarrollaran a término. Cuando las crías cumplieron 21 días de edad, fueron separadas de la madre y se les hizo un corte de cola de 0.5 cm de donde se extrajo DNA genómico que se usó para la genotipificación por medio de una reacción de PCR que permitió detectar la presencia en su genoma del gen Cre recombinasa (Fig. 8).

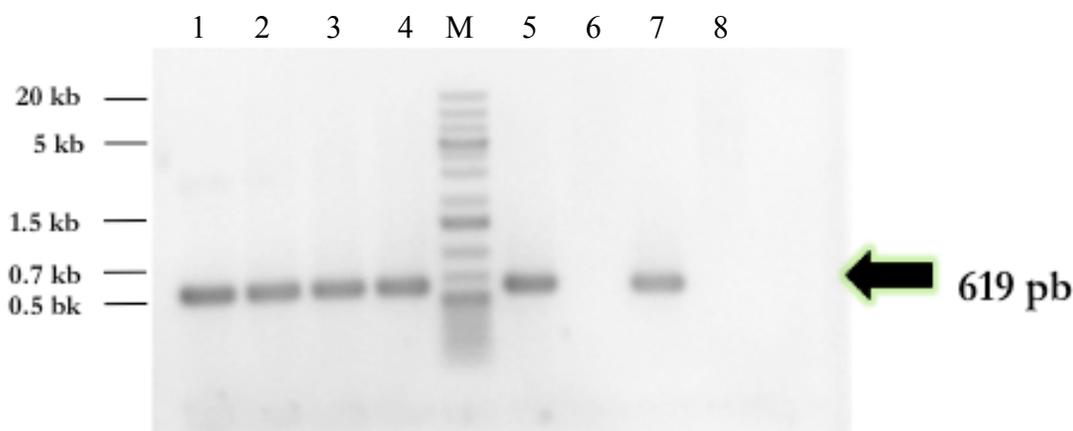


Figura 8. Genotipificación de los ratones F1 de la línea Pitx3-Cre. Carril 1 control positivo; carriles 2-5,7, ratones Cre-recombinasa +; carril 6, ratón Cre recombinasa -; carril 8, control negativo. Producto de PCR 619 pb. M. Marcador de peso molecular, 1kb.

Individuos de las cinco líneas de ratones fueron positivos para la presencia del transgén Pitx3-Cre recombinasa por lo que se procedió a aparear a los ratones fundadores de cada una de ellas al realizar cruza con ratones silvestres de la cepa C57BL6 y así obtener más ratones transgénicos para poder llevar a cabo un primer análisis de la expresión del transgén Pitx3-Cre recombinasa.

Los resultados mostraron que una de las líneas de ratones presentó un patrón de expresión del transgén Pitx3-Cre recombinasa en el bulbo olfatorio del cerebro. A esta línea se le asignó el número 2230 y se le dio el nombre clave *Pitx3-Cre* (Fig. 9) (Tesis de Maestría, 2008, Facultad de Medicina, UANL).

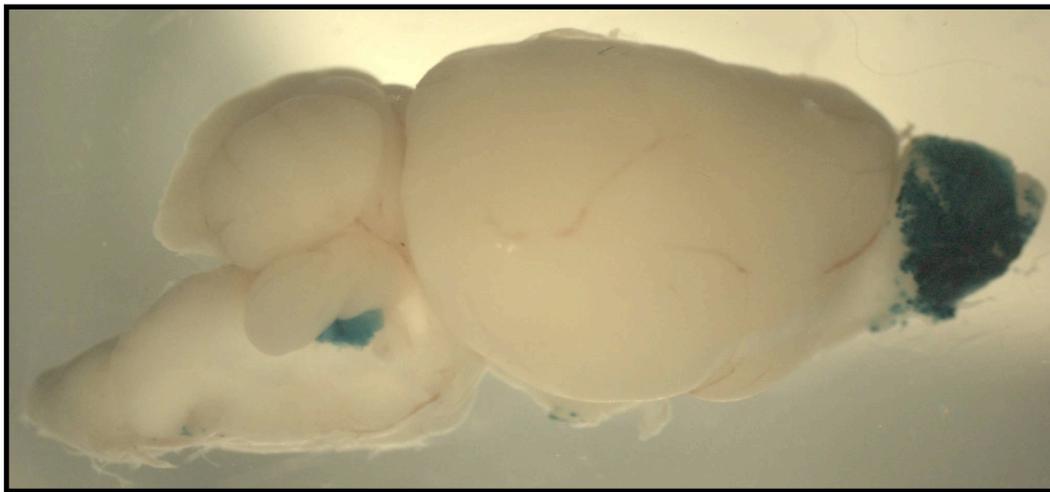


Figura 9. Patrón de expresión de Cre recombinasa de la línea *Pitx3-Cre*. Cerebro de ratón *Pitx3-Cre* con tinción LacZ específica en bulbo olfatorio y núcleo coclear.

Esta línea de ratones *Pitx3-Cre* se seleccionó para **caracterizar el transgén y analizar su transmisión y expresión**, objetivos del presente trabajo.

6.2 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

Para determinar los genotipos de los ratones transgénicos *Pitx3-Cre*, se tenía establecida una reacción de PCR que permitía determinar la presencia del gen Cre recombinasa en el genoma de cada uno de los ratones. Lo ideal, sería el poder determinar en una sola reacción de PCR que el gen Cre recombinasa está presente y además poder demostrar al mismo tiempo la presencia en su lado 5' del promotor Pitx3, y así identificar en cada ratón estas dos secciones del transgén en un solo paso.

Cabe recordar que ya se estableció a nivel bioinformático la secuencia del transgén y que ya se tienen varias reacciones de PCR establecidas que permitieron caracterizar la integridad del mismo. Sin embargo, no se pueden hacer todas estas reacciones a cada uno de los ratones, por lo que lo ideal es una reacción que abarque la unión entre los dos elementos ya mencionados, promotor y secuencia codificante. En vista del razonamiento anterior, se añadió una estrategia que consiste en utilizar dos oligonucleótidos para amplificar por PCR una región del transgén que abarque desde el promotor Pitx3 hasta el gen Cre recombinasa. Esto permitió monitorear el estado del transgén, de que existiera una región promotora Pitx3 junto a la secuencia codificante Cre recombinasa.

Esta estrategia de PCR produjo productos de 798 pb cuando los ratones fueron transgénicos (Fig. 10).

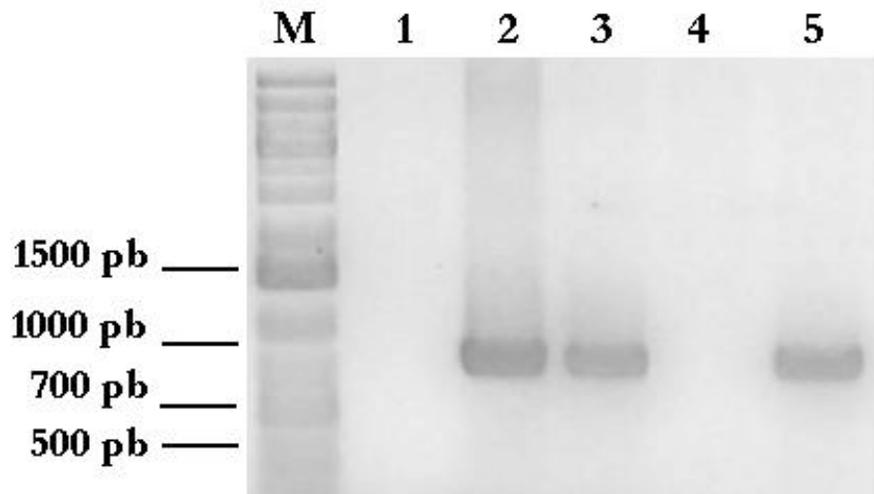


Figura 10. Estandarización de la técnica de PCR para el gen Cre-Recombinasa. Carril 1 control negativo; carriles 2, 3, 5, ratones Cre-recombinasa +; carril 4 ratón Cre (-). Producto de PCR 798 pb. Marcador de peso molecular, 1kb.

Los resultados de esta nueva estrategia de genotipificación se compararon con la estrategia anterior y al obtener 100% de coincidencia, se confirmaron dichos resultados, validando ambas estrategias.

6.3 DETERMINAR SI EXISTE UN SOLO LOCUS DE INTEGRACIÓN PARA EL TRANSGÉN PITX₃-CRE RECOMBINASA

Cuando se genera una línea de ratones transgénicos por microinyección del DNA de interés, denominados transgénicos clásicos, el transgén es integrado al azar en el genoma del ratón. Por lo tanto los ratones fundadores, aquellos que surgen de cada evento de microinyección, tendrán diferente sitio de integración. Cada ratón fundador debe ser tratado como una línea separada y aparearla independientemente de otros fundadores que tengan el mismo transgén.

El transgén integrado en el genoma del ratón fundador no necesariamente será transmitido en proporción mendeliana. Esto puede deberse a que el transgén esté integrado en más de un locus, resultando en una frecuencia de más del 50%, por lo que los niveles de expresión en la descendencia pueden variar dependiendo que locus de integración heredaron.

Para probar o demostrar la transmisión del transgén, se debe de obtener descendencia de cada fundador, y analizar la frecuencia con que se transmite a través de varias generaciones.

Debido a que la línea de ratones *Pitx3-Cre* se generó con microinyecciones de DNA que se integró al azar, se realizó un análisis de la transmisión del transgén en la descendencia del ratón fundador de esta línea, para conocer si el patrón de herencia se

comporta como una proporción mendeliana, en donde alrededor del 50% de las crías de la descendencia heredarán el transgén.

Este análisis se llevó a cabo al realizar apareamientos de ratones F1 (hemicigotos), con ratones silvestres C57BL/6. Los ratones resultantes se genotificaron y aquellos positivos para el transgén se aparearon nuevamente con ratones silvestres. Este tipo de apareamientos se cumplió por varias generaciones. Todos los ratones que surgieron de estos apareamientos, se genotificaron y sirvieron para observar el patrón de transmisión del transgén *Pitx3-Cre* recombinasa, ya que de encontrarse insertado en un solo locus su frecuencia de transmisión sería cercano al 50%, pero al estar insertado en más de un locus la frecuencia de transmisión del transgén cambiaría y sería mayor al 50%.

El análisis del patrón de transmisión del transgén en la descendencia de la línea transgénica *Pitx3-Cre* mostró una frecuencia del 50% a lo largo de las generaciones estudiadas (Fig. 11).

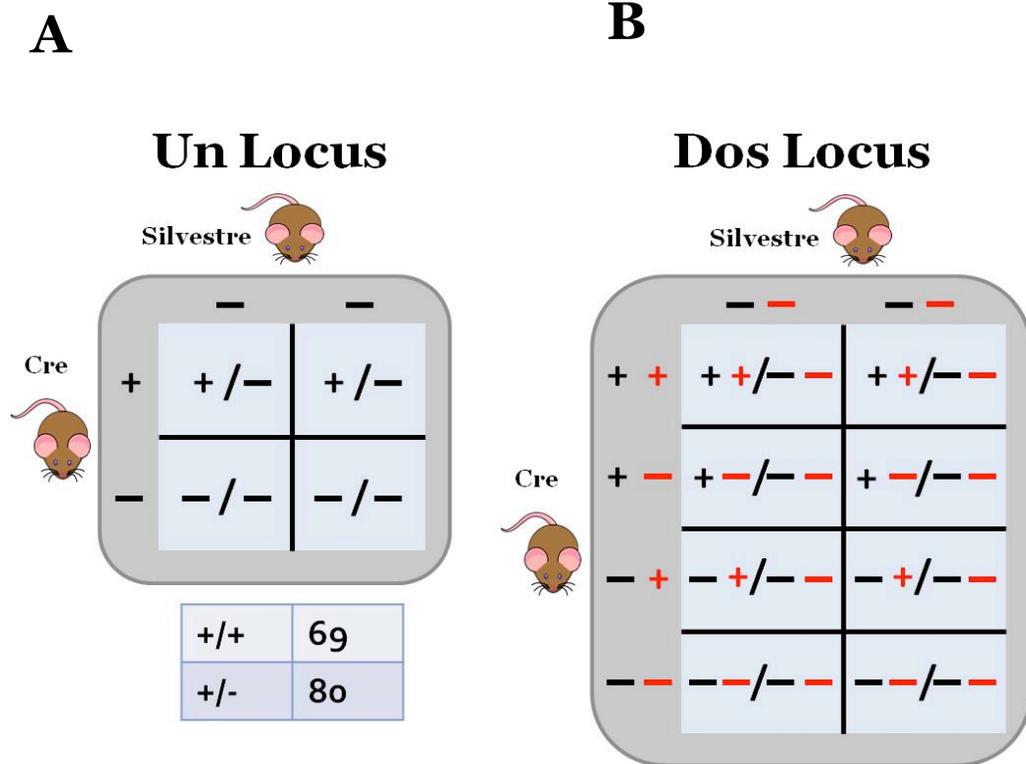


Figura 11. Análisis de la transmisión del transgén por medio de cuadro de Punnett. A. Cálculo de la relación que existiría si el transgén se encuentra en un solo locus. **B.** Distribución de los alelos del transgén si se encontrara en 2 locus.

6.4 CARACTERIZACIÓN DEL TRANSGÉN PITX3-CRE RECOMBINASA

Como ya se mencionó anteriormente, cuando se generan ratones transgénicos, está presente el elemento del azar en la integración del transgén en el genoma de ratón. Debido a esto, existe la posibilidad de que el transgén sufra una delección o inversión que afecte su expresión, por lo que se debe comprobar la integridad del transgén dentro del DNA genómico.

Previamente se tenía un conocimiento parcial de la secuencia del transgén Pitx3-Cre recombinasa, que permitió generar un par de oligonucleótidos para llevar a cabo un PCR e identificar una región del gen Cre recombinasa en los ratones. Sin embargo para poder cumplir con una caracterización y comprobar la integridad del transgén era necesario conocer todas las secuencias que lo comprenden. Por lo que realizar reacciones de PCR que abarcaran el transgén completo, así como diferentes secciones que se traslapanan, fue la estrategia a seguir.

Lo primero que se hizo para cumplir con esta comprobación, fue acceder por medio del internet a la base de datos Genbank del NCBI, para obtener los datos que representan las secuencias de DNA que comprenden toda la extensión del transgén, como son el promotor Pitx3, el gen Cre recombinasa, y el terminador de la transcripción del gen Mtl. Estas secuencias de datos se encuentran en formato de texto y representan combinaciones de letras, correspondientes a las iniciales de las cuatro nucleótidos presentes en el DNA.

Una vez obtenidas las secuencias se vaciaron al programa bioinformático DNA STAR para manipularlas y preparar una simulación del transgén.

Enseguida se diseñaron varios juegos de oligonucleótidos que abarcan secciones del transgén que se traslapan, así como un juego de oligonucleótidos que abarca toda la extensión del transgén (Fig. 12).

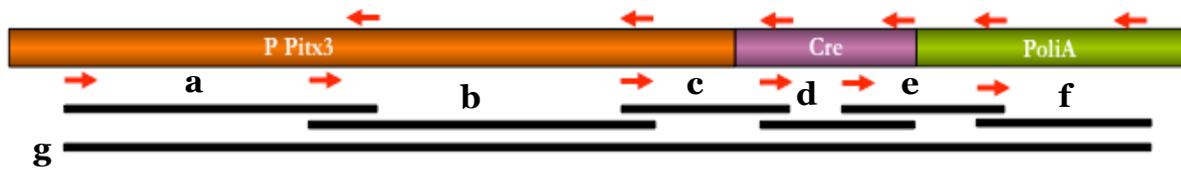


Figura 12. Estrategia general para la caracterización del transgén Pitx3-Cre. Las flechas inferiores representan oligonucleótidos sentido, mientras que las flechas superiores representan oligonucleótidos antisentido utilizados para amplificar diferentes regiones del transgén. Las bandas negras representan los fragmentos obtenidos por PCR (a-g) con el oligonucleótido sentido (lado izquierdo de cada banda) y el oligonucleótido antisentido (lado derecho de cada banda).

Las electroforesis de los productos de estas reacciones de PCR lograron identificar las diferentes secciones del transgén ya que se traslaparon a lo largo de su secuencia, y además mostraron la extensión del transgén por completo. Esto se realizó con DNA genómico proveniente de ratones de diferentes generaciones por lo que permitió determinar tanto la integridad del transgén al tiempo de mostrar que esto se mantiene a través de la descendencia (Fig. 13).

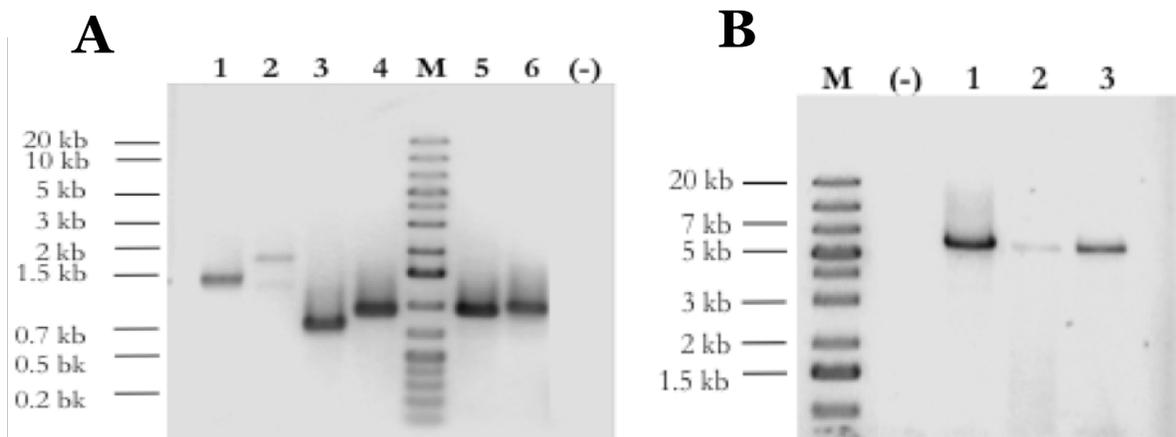


Figura 13. Caracterización del transgén Pitx3-Cre. **A.** Fragmentos amplificados de diferentes secciones del transgén. **Carril 1-6.** Productos de PCR que corresponden a las bandas a-f de la figura 12, respectivamente. **B.** Producto de PCR correspondiente al fragmento que abarca el transgén completo (banda g). **Carril 1-3.** Productos de PCR usando como templado el DNA de 3 ratones independientes.

6.5 ANÁLISIS DE LOS RATONES DOBLE TRANSGÉNICOS *PITX3-CRE/ROSA26*

Como paso final para analizar la línea de ratones *Pitx3-Cre* recombinasa se procedió a conocer en detalle el patrón de expresión de su transgén, más allá del análisis primario en el que se obtuvo el cerebro y principalmente su bulbo olfatorio, como el órgano en que el transgén se expresó.

Este análisis se llevó a cabo al aparear los ratones *Pitx3-Cre* con una línea de ratones transgénicos con el nombre ROSA26R. Generando ratones dobles transgénicos.

Estos ratones presentan el locus de expresión ubicua ROSA26 con la inserción del gen reportero LacZ. No obstante el tipo de expresión del locus ROSA26, el gen LacZ no presenta una expresión debido a una secuencia de paro de la transcripción que se encuentra flanqueada por sitios de recombinación LoxP, por lo que la expresión del gen LacZ es condicionada al mecanismo de recombinación homóloga llevado a cabo por el producto del gen Cre recombinasa. La manera de visualizar esta expresión condicionada es en base a la capacidad del producto del gen LacZ, beta galactosidasa, de procesar el substrato X-GAL y dejar un precipitado color índigo insoluble visible en los tejidos de los ratones.

Por lo tanto, ROSA26R es una línea de ratones reportera de la expresión espacial y temporal del gen Cre recombinasa. En el lugar donde se ubique expresión del gen LacZ se deduce la del gen Cre recombinasa y la manera de visualizar esto es por medio del precipitado color índigo insoluble que deja el X-gal al ser procesado por la enzima beta

galactosidasa. La técnica histoquímica que utiliza este sustrato se llama tinción completa para LacZ o tinción LacZ.

La manera de utilizar estos ratones ROSA26R consistió en realizar apareamientos de ratones transgénicos *Pitx3-Cre* con ratones ROSA26R. En principio, se seleccionaron ratones genotipificados, que ya fueron positivos para la presencia del transgén *Pitx3-Cre* y ratones ROSA26R heterocigotos para la presencia del transgén LacZ.

Estos dos grupos de ratones se aparearon entre sí, y de las crías resultantes se seleccionaron aquellos que fueron dobles heterocigotos *Pitx3-Cre/Rosa26R* (Fig. 14).

De estos apareamientos se seleccionaron nuevamente los dobles heterocigotos *Pitx3-Cre/Rosa26R*. La mitad se utilizó para nuevos apareamientos. La otra mitad de los ratones los dobles heterocigotos *Pitx3-Cre/Rosa26R* se utilizó para llevar a cabo los siguientes experimentos.

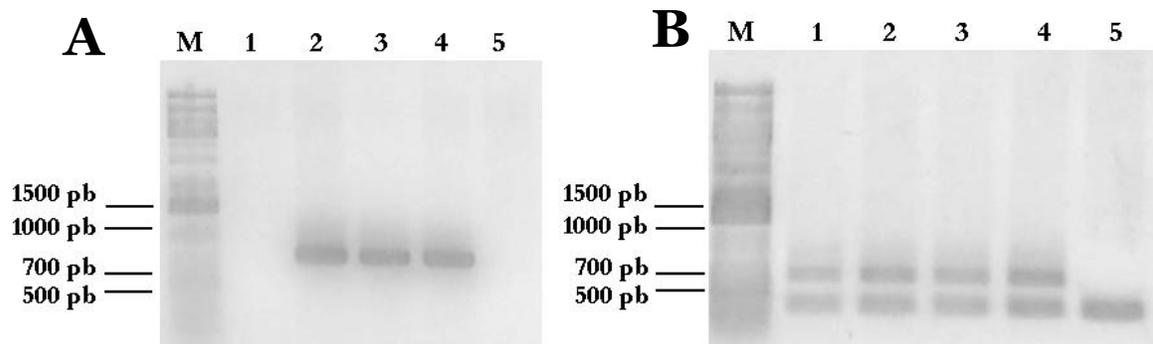


Figura 14. Genotipificación de ratones *Pitx3-Cre/Rosa26R*. **A.** Carril 1 y 5 ratones Cre (-); carriles 2-4, ratones Cre-recombinasa (+). Producto de 798 pb **B.** carriles 1-4 ratones heterocigotos para LacZ; carril 5 ratón homocigoto para LacZ. Producto de 500 pb y 250 pb. Marcador de peso molecular, 1kb.

6.5.1 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN CRE-RECOMBINASA EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS *PITX3-CRE/ROSA26R* ADULTOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN LACZ

Se utilizaron ratones adultos dobles heterocigotos *Pitx3-Cre/Rosa26R* para llevar a cabo un análisis de expresión del transgén *Pitx3-Cre* recombinasa.

Los ratones se anestesiaron, se perfundieron con solución salina y posteriormente con PFA4%/PBS1X y se disecaron órganos y tejidos. Posterior a esto se realizó la tinción histoquímica para LacZ, para encontrar cada tejido en el que ocurra la expresión de la Cre recombinasa por medio de la coloración índigo. La tabla 7 muestra los órganos de ratón adulto transgénico que mostraron tinción LacZ.

Tabla 7. Expresión de cre-recombinasa en órganos de ratón adulto.

| Tejidos | T. LacZ | |
|----------------------------------|-----------------|------------------------|
| Bazo y páncreas | Negativo | |
| Cerebro | Positivo | Bulbo olfatorio |
| Corazón | Negativo | |
| Costillas | Negativo | |
| Esófago | Negativo | |
| Extremidad posterior | Positivo | Músculo esquelético |
| G. Salivales Submaxilares | Positivo | |
| Hipófisis | Positivo | |
| Hígado | Negativo | |

| Tejidos | T. LacZ | |
|------------------------|----------|---|
| Lengua | Negativo | |
| Pulmones | Negativo | |
| Timo | Negativo | |
| Tiroides | Negativo | |
| Intestino | Positivo | ? |
| Médula espinal | Negativo | |
| Aparato Reproductor M. | Positivo | ? |
| Riñones | Negativo | |

Como se muestra en la tabla anterior, sólo algunos de los órganos y tejidos sometidos a la técnica de tinción LacZ fueron positivos o mostraron coloración índigo: Cerebro, hipófisis, glándula submaxilar, intestino, aparato reproductor masculino y músculo esquelético de una extremidad o posterior.

La tinción que mostraron el intestino y el aparato reproductor masculino esta reportada como tinción endógena por lo que no se siguió analizando.

Se procedió a revisar con atención los órganos y tejidos teñidos y se observaron que existían regiones en particular en los órganos y tejidos en las que se ubicó la coloración índigo.

En el músculo esquelético se observó la tinción únicamente en la región posterior de la extremidad, cubriendo el peroné, pero no se observó en el músculo que cubre la tibia (Fig. 15).

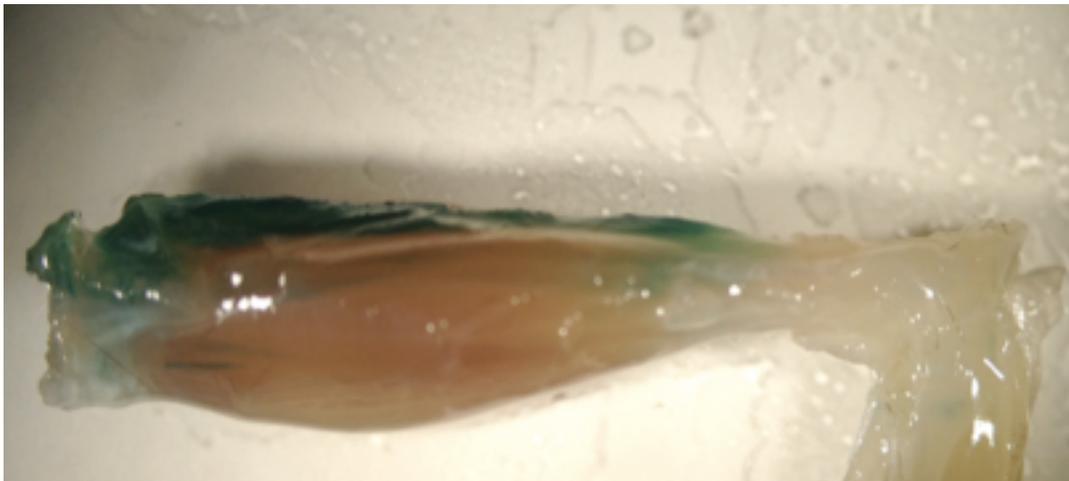


Figura 15. Tinción de LacZ en músculo esquelético. La imagen corresponde a tejido (músculo esquelético) obtenido de un ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*.

En las glándulas salivales, la tinción se observó en la región que corresponde a la glándula submaxilar (Fig. 16).

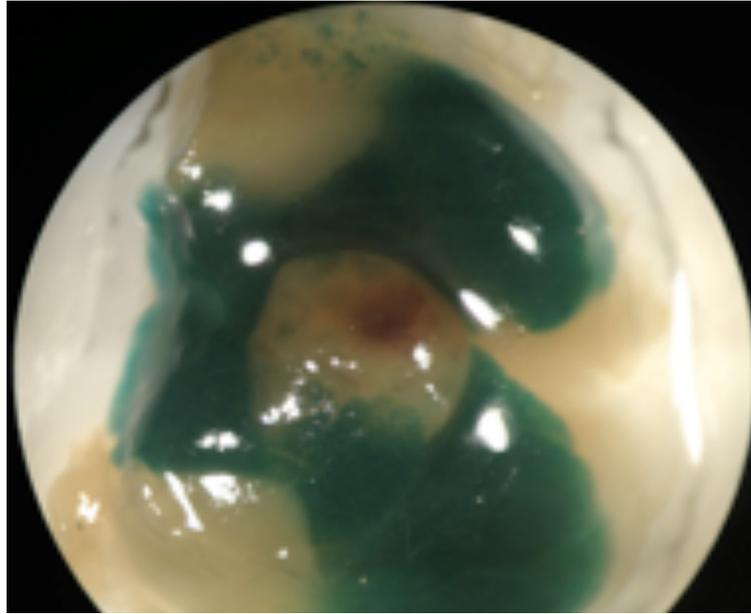


Figura 16. Tinción de LacZ en glándulas salivales. La imagen corresponde a tejido (glándulas salivales) obtenido de un ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*.

La glándula hipófisis se encontró en la base de los cerebros sometidos a la tinción. La coloración se observó en la totalidad de la glándula, pero con mayor intensidad en la parte anterior (Fig. 17).

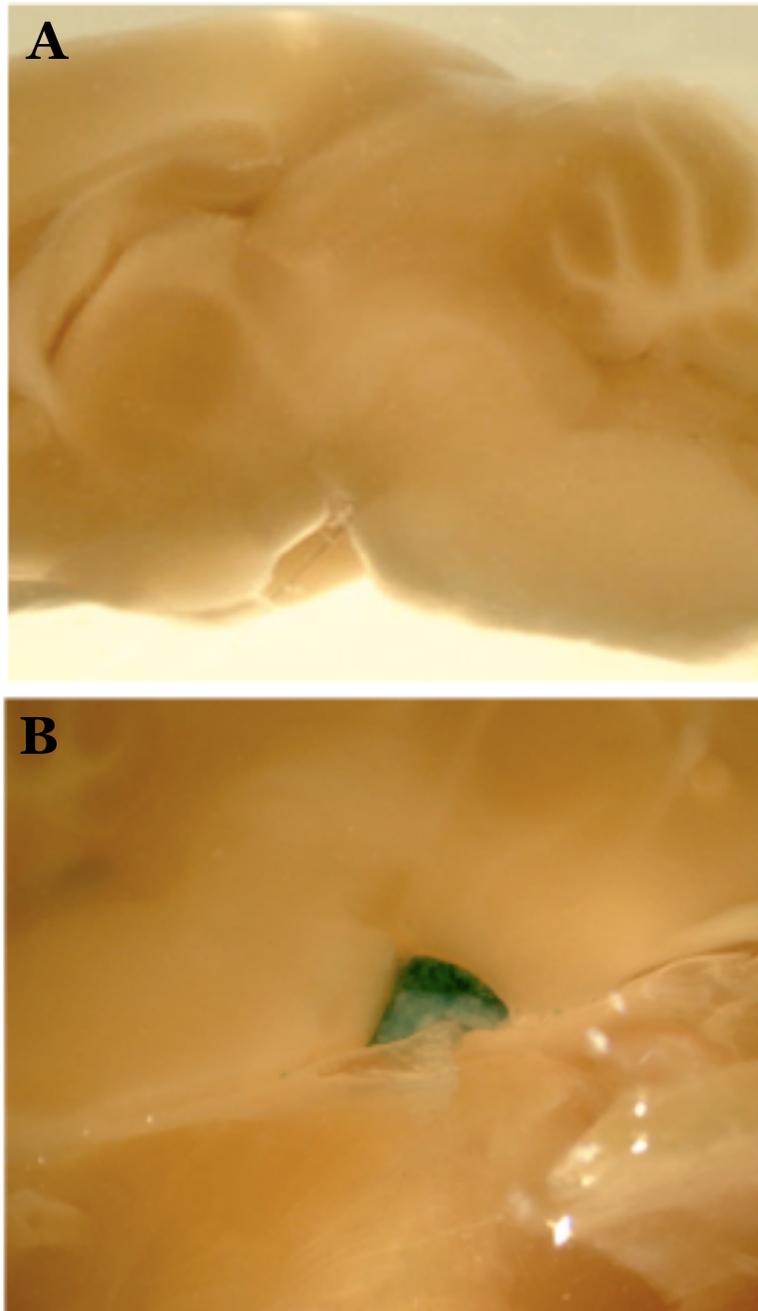


Figura 17. Tinción de LacZ en la glándula hipófisis. **A.** vista lateral de un cerebro cortado sagitalmente y obtenido de un ratón silvestre. **B.** vista de la glándula hipófisis localizada en la base de un cerebro obtenido de un ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*.

El cerebro mostró una tinción en la parte anterior que corresponde al bulbo olfatorio, cubriéndolo parcialmente (Fig. 18). Al realizar un corte transversal del bulbo olfatorio se observó que la tinción se encontraba en la periferia, área comprendida por las fibras olfativas y por los glomérulos, principalmente (Fig. 19).

Debido a esto, se procedió a realizar un análisis a nivel de microscopía de campo claro para confirmar a que capa del bulbo olfatorio correspondía la localización de la tinción LacZ.

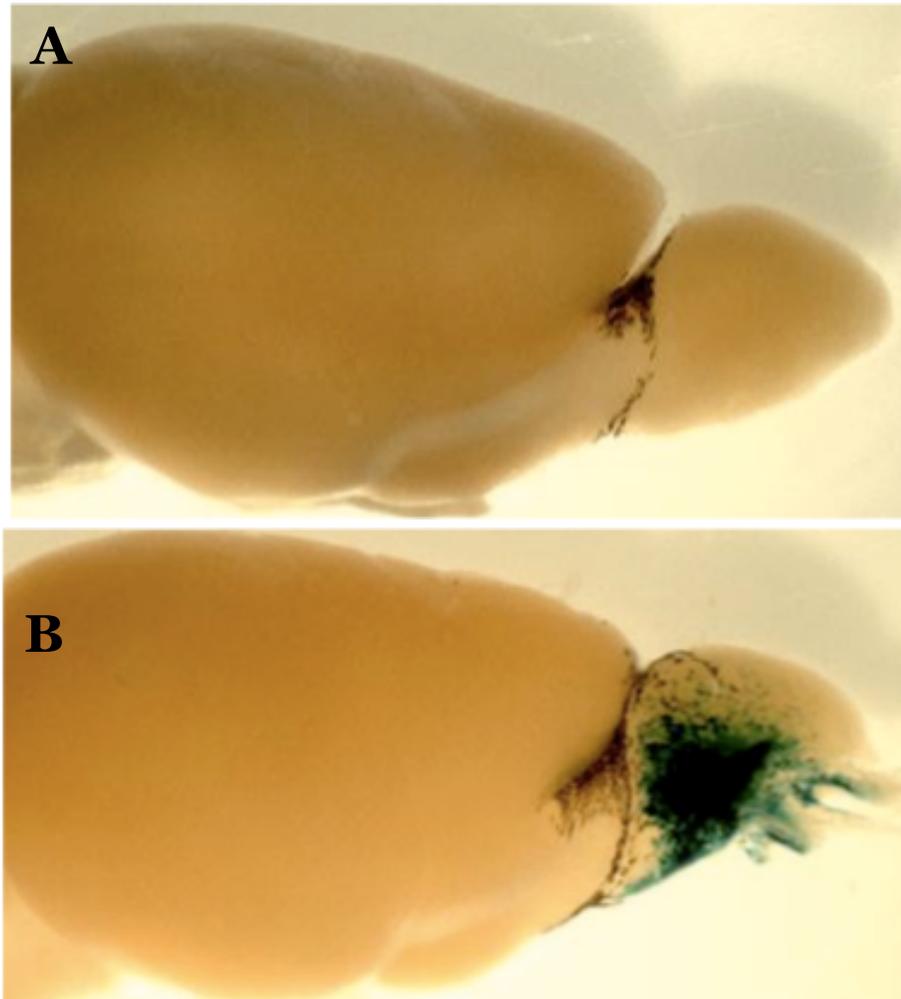


Figura 18. Tinción de LacZ en bulbo olfatorio y epitelio olfativo. A. vista lateral de un cerebro obtenido de un ratón silvestre. B. vista lateral de un cerebro obtenido de un ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*.

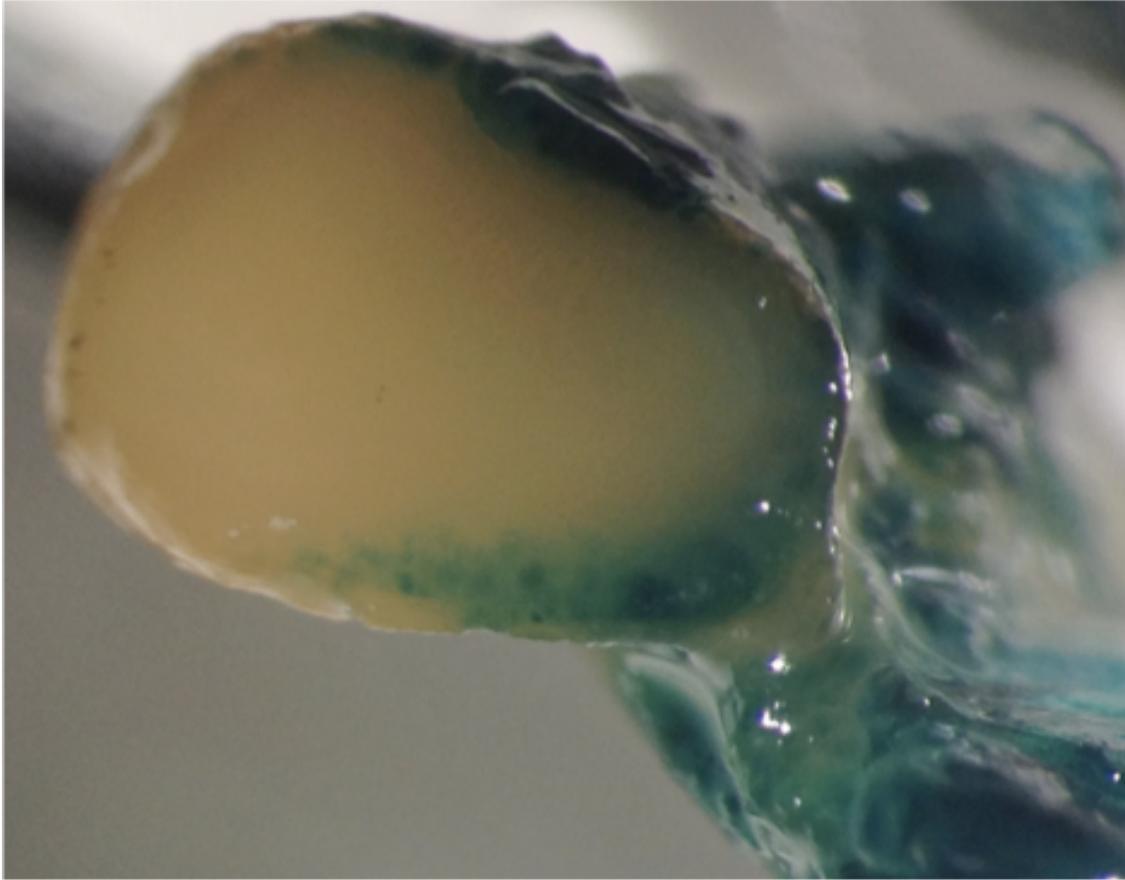


Figura 19. Tinción de LacZ en la región periférica del bulbo olfatorio.
Corte transversal del bulbo olfatorio obtenido de un ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*.

6.5.2 ANALIZAR EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN CRE-RECOMBINASA EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS *PITX3-CRE/ROSA26R* ADULTOS POR MEDIO DE LA TINCIÓN LACZ A NIVEL DE MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO.

Para continuar el análisis de expresión de la Cre recombinasa en los ratones *Pitx3-Cre/Rosa26R*, se procedió a realizar la técnica histológica por congelación de los bulbos olfatorios de cerebros sometidos previamente a la tinción LacZ.

Se obtuvieron cortes histológicos congelados con los que se llevó a cabo un análisis a microscopía de campo claro con dos tipos de tinciones especiales y una impregnación: Nissl, Kluver-Barrera y Bielschowsky respectivamente.

Este análisis se realizó para determinar la localización celular de la tinción LacZ observada en la periferia del bulbo olfatorio. Ya que los cortes coronales mostraban tinción periférica donde sabemos llegan los axones de las neuronas del epitelio olfativo y forman estructura llamadas glomérulos y también se encuentran diferentes tipos neuronales alrededor de ellos (neuronas periglomerulares, en penacho, neuronas mitrales, células granulares).

Los glomérulos del bulbo olfatorio son estructuras de sinapsis entre los axones de las neuronas del epitelio olfativo con las dendritas de las neuronas mitrales, que se encuentran en una capa interna del bulbo olfatorio. Si la tinción LacZ sólo se encuentra en los glomérulos, esto indicaría que la tinción es específica de las fibras provenientes del epitelio olfativo y dendritas participantes en las sinapsis que ocurren en los glomérulos.

6.5.2-A) TINCIÓN DE NISSL

A partir de los cortes histológicos por congelación del bulbo olfatorio de cerebros de ratones *Pitx3-cre/Rosa26R* teñidos con la técnica de tinción LacZ, se realizó la tinción de Nissl. Esta tinción se utiliza para ubicar cuerpos neuronales, ya que el colorante utilizado tiene afinidad por el RNA presente en la gran cantidad de ribosomas adheridos al retículo endoplásmico rugoso, el cual forma los cuerpos de Nissl que se encuentran solo en el cuerpo neuronal. En los cortes histológicos de bulbo olfatorio se observó la tinción LacZ solamente en la región de los glomérulos. La tinción de Nissl mostró que en la región de los glomérulos, donde se encontró la tinción LacZ, no se encontraron neuronas, sólo existían alrededor del glomérulo células periglomerulares, identificadas por observación directa. En los cortes de bulbo olfatorio de ratones silvestres no estaba presente la tinción de LacZ en los glomérulos, la tinción de Nissl solo permitió identificar los núcleos de células periglomerulares (Fig. 20).

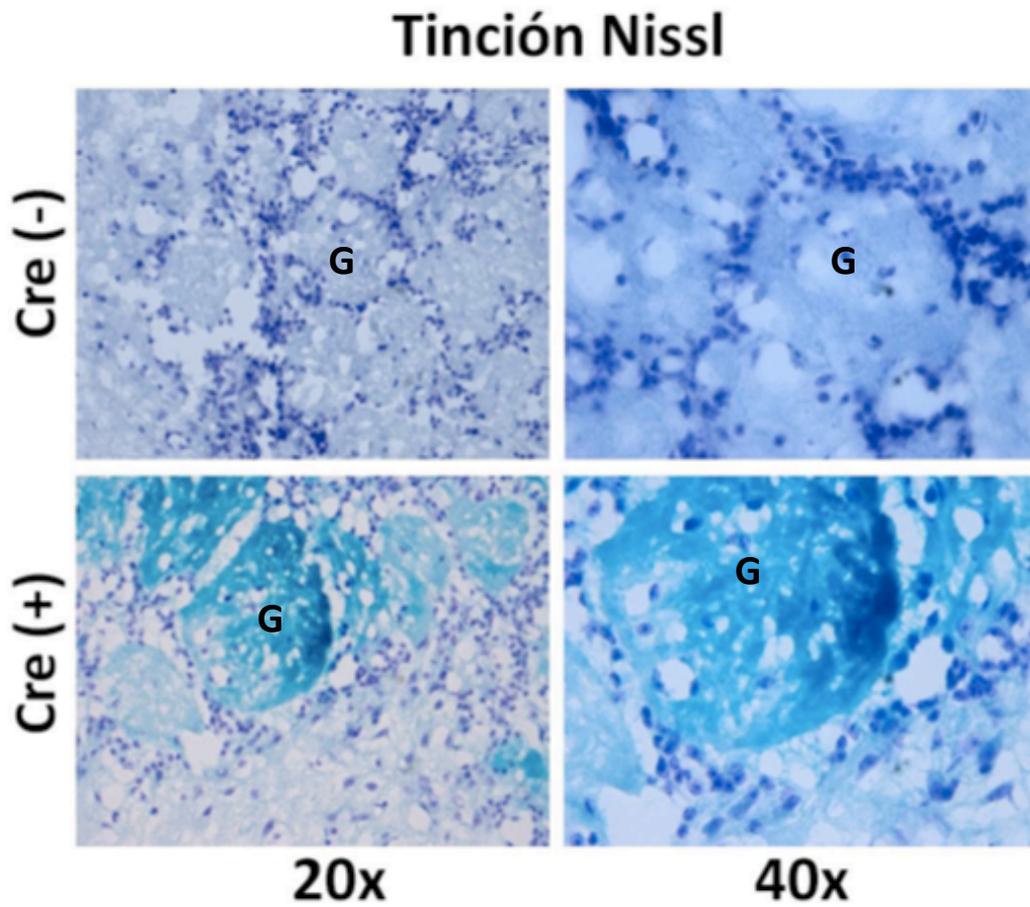


Figura 20. Tinción de Nissl. Cortes histológicos de ratones silvestres (Cre -) y transgénicos Pitx3-Cre/Rosa26R (Cre +) previamente procesados para la tinción LacZ. Imágenes tomadas con los objetivos de 20x y 40x. Glomérulos (G). Poner una G en los glomérulos

6.5.2-B) TINCIÓN DE KLUVER-BARRERA

A partir de los cortes histológicos por congelación del bulbo olfatorio de cerebros de ratones *Pitx3-cre/Rosa26R* teñidos con la técnica de tinción LacZ, se realizó la tinción de Kluver-Barrera. Esta tinción se utiliza para identificar la mielina de los axones con un color azul, detectando así tractos de fibras nerviosas.

En los cortes histológicos de bulbo olfatorio positivos para la tinción LacZ, en los glomérulos no se observa el color azul de la tinción de Kluver-Barrera, a pesar de que en esa región existen fibras nerviosas. Sin embargo al revisar los cortes de bulbo olfatorio de ratones silvestres, se observa el azul característico de la técnica de Kluver-Barrera en los glomérulos, por lo que en los cortes con tinción LacZ, ésta enmascara a la coloración de la técnica de Kluver-Barrera. Esto demuestra que la tinción LacZ se ubica en la estructura del glomérulo, que está compuesta de fibras nerviosas (Fig. 21).

Tinción Kluver-Barrera

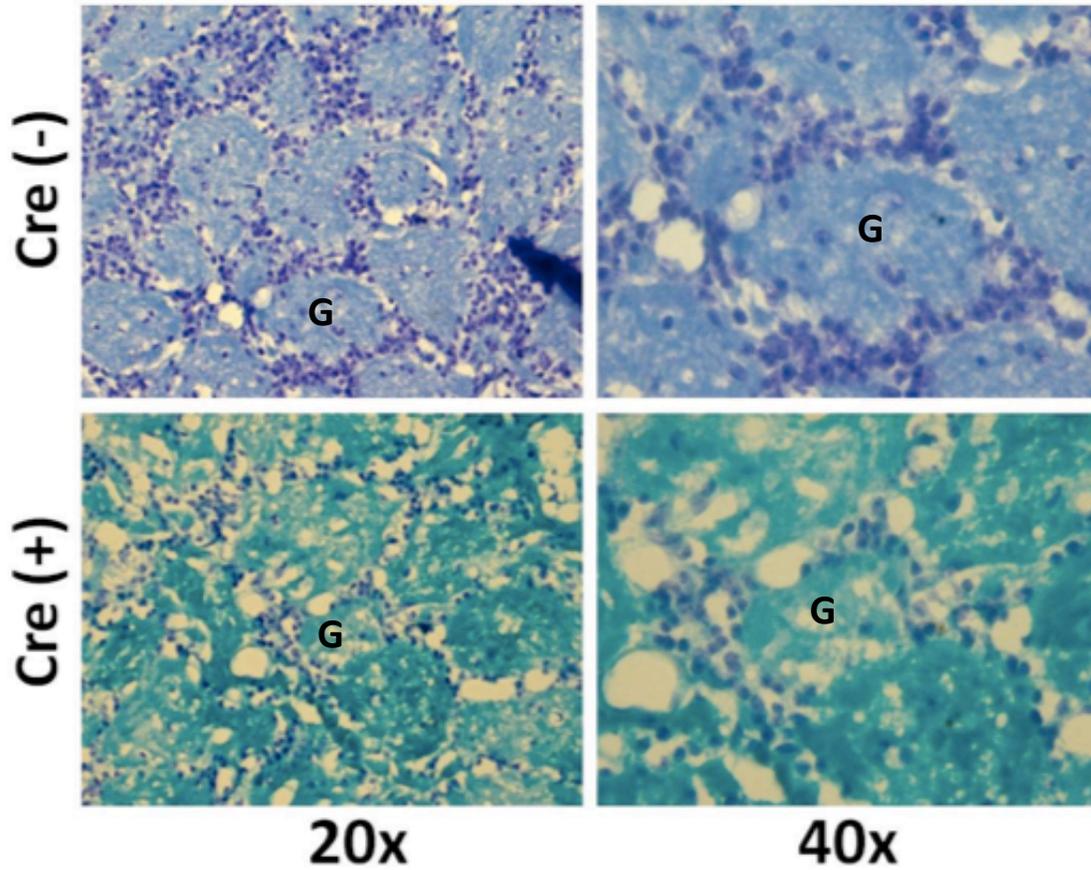


Figura 21. Tinción de Kluver-Barrera. Cortes histológicos de ratones silvestres (Cre -) y transgénicos Pitx3-Cre/Rosa26R (Cre +) previamente procesados para la tinción LacZ. Imágenes tomadas con los objetivos de 20x y 40x. Glomérulos (G).

6.5.2-C) IMPREGNACIÓN ARGENTICA DE BIELSCHOWSKY

A partir de los cortes histológicos por congelación del bulbo olfatorio de cerebros de ratones *Pitx3-cre/Rosa26R* teñidos con la técnica de tinción LacZ, se realizó la impregnación argéntica de Bielschowsky (Fig. 22). Este método de impregnación es específico para los procesos de las células nerviosas y neurofibrillas.

En los cortes histológicos de bulbo olfatorio positivos para la tinción LacZ, se encontró impregnación en las fibras que forman los glomérulos así como en las células periglomerulares. Esta impregnación en los glomérulos estaba acompañada de la tinción LacZ, observándose un traslape parcial de la impregnación y de la tinción en algunos glomérulos, mostrando que la tinción de LacZ en los glomérulos no es homogénea. Esta polaridad de la tinción LacZ se observó con más detalle al someterse los cortes histológicos positivos para la tinción LacZ a una sobreexposición de la impregnación argéntica.

Impregnación Argentica de Bielschowsky

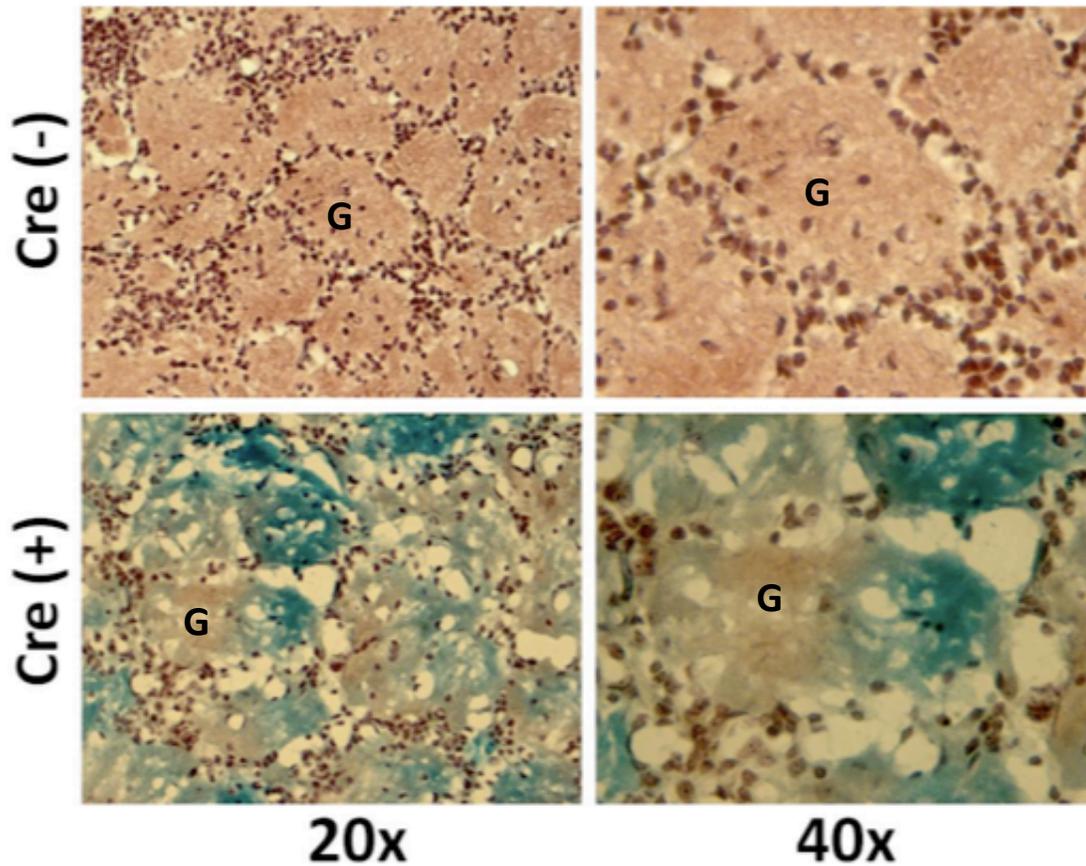


Figura 22. Impregnación argéntica de Bielschowsky. Cortes histológicos de ratones silvestres (Cre -) y transgénicos Pitx3-Cre/Rosa26R (Cre +) previamente procesados para la tinción LacZ. Imágenes tomadas con los objetivos de 20x y 40x. Glomérulos (G).

En el análisis de microscopía de campo claro en el bulbo olfatorio, se observó que la tinción LacZ se encontraba únicamente en la región que comprende los glomérulos. Esto sugiere que la expresión de LacZ ocurre en las fibras de axones que provienen del epitelio olfativo y que se conectan al bulbo olfatorio. En base a esta observación, se procesó la cabeza entera de los ratones dobles transgénicos *Pitx3-Cre/Rosa26R* para la tinción LacZ.

Al llevar a cabo el análisis del patrón de la tinción LacZ en la cabeza de los ratones *Pitx3-Cre/Rosa26R* ésta se observó en la parte anterior de cerebro. A diferencia del patrón observado en la figura 18, se encontró que la tinción de LacZ iniciaba en la parte de la cavidad nasal de los cornetes etmoides, que se encuentra revestida de epitelio olfativo, y se continuaba hacia el bulbo olfatorio (Fig. 23).

Esta región con epitelio olfativo, contiene neuronas sensitivas cuyos axones se proyectan hacia el bulbo olfatorio.

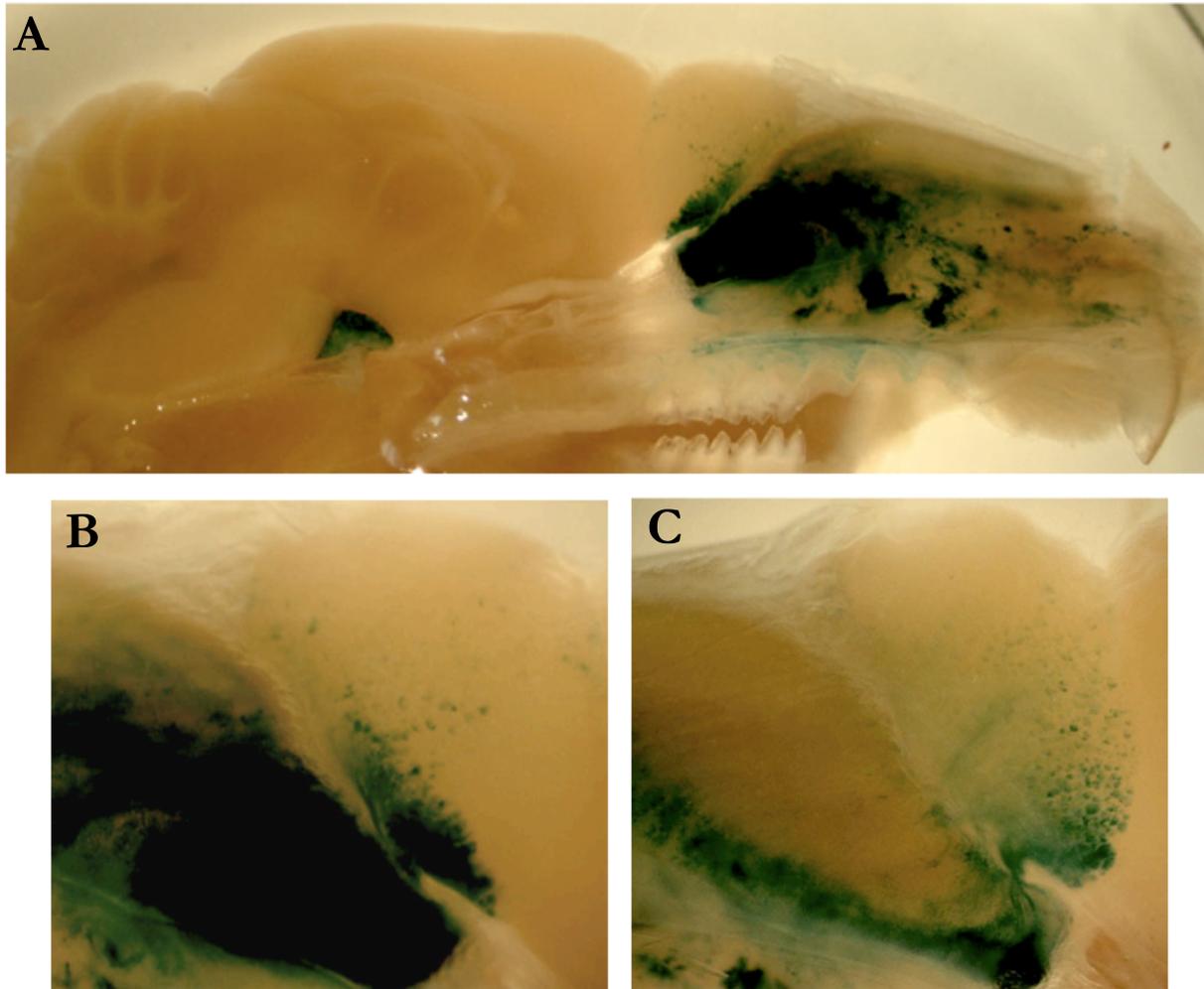


Figura 23. Tinción LacZ en epitelio olfativo. **A.** vista lateral de un cerebro cortado sagitalmente, obtenido de un ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*. **B.** corte sagital del bulbo olfatorio obtenido de un ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*. **C.** corte sagital del bulbo olfatorio (ratón transgénico *Pitx3-Cre/Rosa26R*).

7. DISCUSIÓN

El gen Pitx3 codifica para un factor de transcripción. La expresión de este gen en el ratón inicia a los 11 días del desarrollo embrionario en el cristalino, músculo esquelético y mesencéfalo. En la etapa adulta del ratón continúa su expresión exclusivamente en el mesencéfalo, ya que es necesario para el desarrollo, supervivencia y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Debido a su patrón de expresión específico de todas las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, el promotor del gen Pitx3 es un candidato ideal para generar un modelo murino de inactivación de genes por medio del sistema Cre/LoxP en el mesencéfalo.

El sistema Cre/LoxP es utilizado para controlar la expresión de un gen en tiempo y espacio al inactivarlo de manera condicional al sitio de expresión del promotor que dirige el gen de la Cre recombinasa.

Previamente demostramos la funcionalidad de un cassette de expresión que comprende el gen de la enzima Cre-recombinasa y una secuencia promotora del gen Pitx3 de 4.2 Kb en una línea celular con fenotipo dopaminérgico (Castillo-Carranza *et al.* 2008). Como los resultados *in vitro* del cassette de expresión fueron los esperados, se planteó demostrar la función del promotor de 4.2 Kb en un modelo animal, de manera que la expresión de Cre-recombinasa estuviera presente únicamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Para llevar a cabo esto, se generaron cinco líneas de ratones transgénicos que llevan en su genoma el transgén Pitx3-Cre. La diferencia entre

cada una de estas líneas es que el evento de integración del transgén en el genoma fue independiente.

En un primer abordaje de las cinco líneas de ratones para analizar la expresión de la Cre-recombinasa se utilizó la línea de ratones Rosa26R que fue diseñada especialmente para demostrar la actividad de la Cre-recombinasa por medio del gen LacZ. De cada una de estas líneas se obtuvo un patrón de expresión de Cre-recombinasa diferente, presente en diferentes regiones del cerebro, pero ninguna con especificidad para la región ventral del mesencéfalo.

En particular la línea llamada 2230 o *Pitx3-Cre* mostró un patrón de expresión restringido a el bulbo olfatorio. (Tesis de Maestría, 2008, Facultad de Medicina, UANL).

A partir de esos resultados se procedió a caracterizar esta línea de ratones ya que se necesitaba caracterizar el transgén *Pitx-3 Cre recombinasa* y conocer su transmisión y su expresión.

Se procedió por implementar la genotipificación de los ratones para presencia del transgén *Pitx3-Cre recombinasa*, por medio de PCR el cual amplificó una región que abarca del promotor *Pitx3* hasta el gen *Cre recombinasa*, de esta manera se tuvo la posibilidad de detectar cada ratón que sea transgénico y al mismo tiempo estar monitoreando la presencia de la unión del promotor *Pitx3* con la secuencia del gen *Cre recombinasa*.

La línea de ratones transgénicos se generó por microinyección de DNA, el cual se integra al azar en el genoma, y es importante conocer el número de integraciones del cassette de expresión. Ya que existe la posibilidad de integrarse en dos locus diferentes en el genoma, y hasta ser influenciada su expresión por las secuencias genómicas del locus. El

análisis se llevó a cabo al revisar los genotipos de apareamientos de ratones hemicigotos para el transgén con ratones silvestres. Se obtuvieron las proporciones de herencia mendeliana. Si existían dos locus para el transgén, los ratones positivos para la presencia del transgén serían más del cincuenta por ciento, pero si sólo tenían una integración del transgén, alrededor del cincuenta por ciento de los ratones serían positivos.

El análisis de los apareamiento mostró una tendencia al cincuenta por ciento, por lo que la proporción mendeliana de transmisión indicó que se trataba de un solo locus de integración del transgén *Pitx-3 Cre* recombinasa. Esto nos permitió continuar con el análisis de expresión del transgén.

Se utilizó la línea de ratones reportera *Rosa26R* para demostrar la actividad de la *Cre* recombinasa por medio de la actividad *LacZ*. Se realizaron las cruza de la línea *Pitx-3-Cre* con la línea *Rosa26R*, y los ratones dobles transgénicos se disecaron y se realizó la técnica de tinción *LacZ*. Esta técnica mostró que además de expresión de la *Cre* recombinasa en el bulbo olfatorio del cerebro se encontró también en el epitelio olfativo, músculo esquelético, glándula salival submaxilar e hipófisis. Se encontró también en intestino y aparato reproductor masculino, pero éste patrón ha sido reportado como tinción *LacZ* endógena, y no se consideró.

De estas regiones positivas para la tinción *LacZ* se prosiguió revisando el bulbo olfatorio, por ser de mayor intensidad. Un corte transversal del bulbo olfatorio mostró que la tinción sólo se encontró en la periferia, región en la cual se compone de las fibras de axones que provienen del epitelio olfativo. Esto se comprobó al realizar tinciones especiales en cortes histológicos del bulbo olfatorio previamente sujeto a la tinción *LacZ*. La revisión de estos cortes mostró que la tinción *LacZ* co-localizaba con la capa glomerular

en el bulbo olfativo, región que está compuesta por fibras de axones que provienen las neuronas sensitivas del epitelio olfativo y por las dendritas de las neuronas mitrales.

Para comprobar que la tinción LacZ provenían de una región externa al bulbo olfatorio, se procesó la cabeza completa de ratones dobles transgénicos para tinción LacZ y se cortó sagitalmente. Al observar el resultado de la tinción, se encontró que la coloración provenía de la región de los cornetes del epitelio olfativo y se extendía hasta el bulbo olfatorio.

El lugar de expresión del transgén fue en las neuronas sensitivas del epitelio olfativo cuyos axones se dirigen y conectan en la región de los glomérulos del bulbo olfatorio.

Sin embargo, a pesar de encontrar una expresión clara del transgén en el epitelio olfativo, aún se debe comparar con el resultado de la expresión en la hipófisis, glándula salival submaxilar y músculo esquelético.

Una posibilidad es que el transgén esté siendo controlado por posibles secuencias reguladoras que causen esta expresión en los cuatro lugares. No obstante, la expresión en el epitelio olfativo es similar a la reportada por los receptores odorantes, ya que estos son expresados por las neuronas sensitivas, y su expresión se ubica a lo largo de la neurona, desde el epitelio olfativo hasta la capa glomerular del bulbo olfatorio.

Puede ser también que las secuencias reguladoras que estén dirigiendo la expresión del transgén pertenezcan a un gen que se exprese en varios tejidos, y no sea específico de las neuronas sensitivas.

La expresión del transgén Pitx-3 Cre recombinasa en nuestra línea de ratones no mostró especificidad para las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas al igual que en el trabajo de Qiu y colaboradores en el 2008. Qiu y cols generaron ratones transgénicos para

la Cre-recombinasa insertando una forma inducible de la Cre-recombinasa en el locus del gen Pitx3 y no obtuvieron expresión de la Cre-recombinasa en cerebro, esto solo enfatiza que debe existir una secuencia reguladora exclusiva para el promotor del gen Pitx3 que le confiere la especificidad a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Recientemente Smidt M. P. y cols desarrollaron una línea de ratones que expresan el gen Cre recombinasa en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas mediante un knock-in en el locus del gen Pitx3. Insertaron el gen Cre recombinasa bajo el control de la secuencia promotora presente en el locus del gen Pitx3, demostrando una expresión de la Cre recombinasa muy similar a la expresión del gen Pitx3 en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Lo que indica que deben existir secuencias reguladoras exclusivas para el promotor del gen Pitx3 y que son las responsables del patrón de expresión altamente específico de este gen Pitx3 localizado únicamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Finalmente es importante mencionar la importancia de esta línea de ratones para el estudio del gen Nurr1, ya que mediante la cruce de esta línea de ratones con una línea de ratones condicionales para Nurr1, podremos inactivar el gen Nurr1 específicamente en la hipófisis.

8. CONCLUSIONES

1. La región promotora de 4.2 Kb del gen Pitx3 no confiere especificidad de expresión en la región mesencefálica.
2. La inserción al azar del gen Pitx3-Cre en un locus no identificado en el genoma murino, indujo expresión en el epitelio olfativo, hipófisis, glándula salival submaxilar y músculo esquelético.
3. El transgén Pitx3-Cre recombinasa no se expresa en el bulbo olfatorio, la tinción lacZ observada en esta estructura, es debido a la presencia de los axones del epitelio olfativo, cuyas neuronas si expresan el transgén.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abremski, K. & Hoess, R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* 259, 1509-14 (1984).
2. Adams, D. J. & van der Weyden, L. Are we creating problems? Negative effects of Cre recombinase. *Genesis* 29, 115 (2001).
3. Burbach, J. P., Smits, S. & Smidt, M. P. Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons. *Ann N Y Acad Sci* 991, 61-8 (2003).
4. Blanchard, V. et al. Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res* 22, 29-38 (1994).
5. Cazorla, P., Smidt, M. P., O'Malley, K. L. & Burbach, J. P. A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *J Neurochem* 74, 1829-37 (2000).
6. Castillo, S. O. et al. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci* 11, 36-46 (1998).
7. Castillo-Carranza D. L., Rodríguez-Rocha H., Montes-de-Oca-Luna R., Sepúlveda-Saavedra J., Martínez H. R., López-Vidal Y., & Saucedo-Cárdenas O. Pitx3 promoter directs Cre-recombinase specifically in a human neuroblastoma cell line. *Mol Cell Biochem* 309, 223-7 (2008).
8. Chinta S. J., Andersen J. K. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 942-6 (2005).
9. Coulon V., L'Honoré A., Ouimette J. F., Dumontier E., van den Munckhof P., Drouin J. A muscle-specific promoter directs Pitx3 gene expression in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 282, 33192-200 (2007).
10. Gage, P. J., Suh, H. & Camper, S. A. The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm Genome* 10, 197-200 (1999).
11. Guo, F., Gopaul, D. N. & van Duyne, G. D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389, 40-6 (1997).

12. Hadjantonakis, A. K., Purity, M. & Nagy, A. Cre recombinase mediated alterations of the mouse genome using embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 97, 101-22 (1999).
13. Hoess, R. H. & Abremski, K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1026-9 (1984).
14. Hoess, R., Abremski, K. & Sternberg, N. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 49, 761-8 (1984).
15. Hoess, R., Abremski, K., Irwin, S., Kendall, M. & Mack, A. DNA specificity of the Cre recombinase resides in the 25 kDa carboxyl domain of the protein. *J Mol Biol* 216, 873-82 (1990).
16. Lakso, M. et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6 (1992).
17. Lebel, M., Gauthier, Y., Moreau, A. & Drouin, J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *J Neurochem* 77, 558-67 (2001).
18. Lee, L. & Sadowski, P. D. Sequence of the loxP site determines the order of strand exchange by the Cre recombinase. *J Mol Biol* 326, 397-412 (2003).
19. Li, Z. W. et al. Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6158-62 (1996).
20. Loonstra, A. et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9209-14 (2001).
21. Mack, A., Sauer, B., Abremski, K. & Hoess, R. Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res* 20, 4451-5 (1992).
22. Maxwell, S. L., Ho, H. Y., Kuehner, E., Zhao, S. & Li, M. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev Biol* 282, 467-79 (2005).
23. Nagy, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109 (2000).

24. Orban, P. C., Chui, D. & Marth, J. D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-5 (1992).
25. Qiu H. Y., Guo C., Cheng X. W., Huang Y., Xiong Z. Q., Ding Y. Q. Pitx3-CreER mice showing restricted Cre expression in developing ocular lens and skeletal muscles. *Genesis*. 46, 324-8 (2008).
26. Rieger, D. K., Reichenberger, E., McLean, W., Sidow, A. & Olsen, B. R. A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics* 72, 61-72 (2001).
27. Roussa E., Kriegstein K. Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-beta. *Cell Tissue Res*. 318, 23-33 (2004).
28. Saucedo-Cardenas, O. & Conneely, O. M. Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 7, 51-63 (1996).
29. Saucedo-Cardenas, O. et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4013-8 (1998).
30. Sauer, B. & Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-70 (1988).
31. Sauer, B. Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol* 225, 890-900 (1993).
32. Semina, E. V., Reiter, R. S. & Murray, J. C. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet* 6, 2109-16 (1997).
33. Semina, E. V., Murray, J. C., Reiter, R., Hrstka, R. F. & Graw, J. Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum Mol Genet* 9, 1575-85 (2000).
34. Simon, H. H., Bhatt, L., Gherbassi, D., Sgado, P. & Alberi, L. Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors. *Ann N Y Acad Sci* 991, 36-47 (2003).
35. Smidt, M. P. van Schaick H. S., Lanctôt C., Tremblay J. J., Cox J. J., van der Kleij A. A., Wolterink G., Drouin J., Burbach J. P. A homeodomain gene Ptx3 has highly

- restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13305-10 (1997).
36. Smidt, M. P., Smits, S. M. & Burbach, J. P. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur J Pharmacol* 480, 75-88 (2003).
 37. Smidt, M. P., Smits, S. M. & Burbach, J. P. Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318, 35-43 (2004).
 38. Smidt, M. P., Smits, S. M., Bouwmeester H., Hamers F. P., van der Linden A. J., Hellemons A. J., Graw J., & Burbach, J. P. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131, 1145-55 (2004).
 39. Smidt MP, von Oerthel L, Hoehstra EJ, Schellevis RD, Hoekman MF. Spatial and temporal lineage analysis of a Pitx3-driven Cre-recombinase knock-in mouse model. *PLoS One* 7(8) (2012).
 40. Smits, S. M., Mathon, D. S., Burbach, J. P., Ramakers, G. M. & Smidt, M. P. Molecular and cellular alterations in the Pitx3-deficient midbrain dopaminergic system. *Mol Cell Neurosci* 30, 352-63 (2005).
 41. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-1 (1999).
 42. Tvrdik, P. et al. Cig30 and Pitx3 genes are arranged in a partially overlapping tail-to-tail array resulting in complementary transcripts. *J Biol Chem* 274, 26387-92 (1999).
 43. van den Munckhof, P. et al. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130, 2535-42 (2003).
 44. Wagner, J. et al. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 17, 653-9 (1999).
 45. Wang, X. et al. Forskolin cooperating with growth factor on generation of dopaminergic neurons from human fetal mesencephalic neural progenitor cells. *Neurosci Lett* 362, 117-21 (2004).
 46. Wierzbicki, A., Kendall, M., Abremski, K. & Hoess, R. A mutational analysis of the bacteriophage P1 recombinase Cre. *J Mol Biol* 195, 785-94 (1987).

47. Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L. & Perlmann, T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10, 1656-66 (1996).
48. Zetterstrom, R. H., Williams, R., Perlmann, T. & Olson, L. Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 41, 111-20 (1996).
49. Zetterstrom, R. H. et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276, 248-50 (1997).
50. Zhao, S. et al. Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 19, 1133-40 (2004).