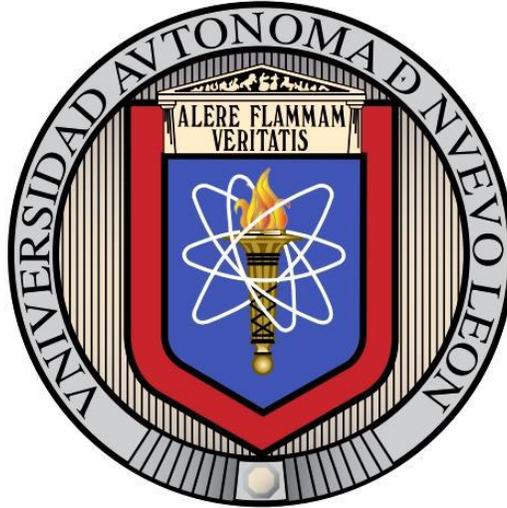


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**PAPEL DE LOS ELEMENTOS OLF-1 DEL PROMOTOR DEL GEN DE
OREXINA (HCRT) EN LA REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN**

POR

GRISELDA AIDÉ CABRAL PACHECO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

OCTUBRE, 2017

"Papel de los elementos olf-1 del promotor del gen de orexina (HCRT) en la regulación de su expresión".

Aprobación de Tesis



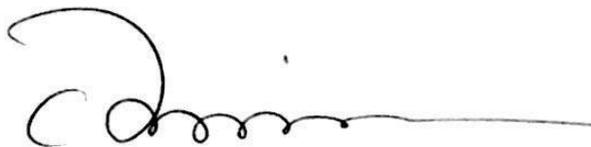
Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Directora de Tesis



Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez
Co-director de Tesis



Dr. C. Carlos Córdova Fletes
Miembro de la Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA.

A mis padres y a mis hermanos, quienes han sido los pilares fundamentales para yo poder llegar a este punto de mi carrera, porque con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento me motivaron e impulsaron siempre para lograr mis objetivos. A Dios y a mis abuelitos que aunque algunos ya no están aquí, desde el cielo guían mi camino y me tienen siempre en sus oraciones. A todos y cada uno de ellos dedico esta tesis con mucho cariño.



AGRADECIMIENTOS.

- ❖ Agradezco infinitamente a mis padres Ma. Felix Pacheco y Griseldo Cabral por el apoyo incondicional, por la motivación, el sacrificio y todo lo que me brindaron para poder cumplir esta meta, los quiero y admiro mucho. Este esfuerzo es de ustedes y para ustedes.
- ❖ A mis hermanos E. Giovanni Cabral y G. Jazmín Cabral por los consejos, los regaños, el apoyo, el cariño y por sus palabras de aliento. Los quiero hermanos.
- ❖ A mi novio Eduardo Muñoz por todo el apoyo brindado durante este periodo, por formar parte de este proyecto tan importante para mí, por la paciencia, el cariño y la confianza brindadas, muchas gracias, te quiero mucho (mors).
- ❖ A mi comisión de tesis, el Dr. Román Vidal-Tamayo y la Dra. Viviana C. Zomosa por la confianza brindada, el apoyo, la motivación, los consejos, el conocimiento compartido de su parte a mi persona, por el afecto, la colaboración en equipo y por todo lo que me brindaron en esta etapa de mi formación, por siempre mi admiración y respeto para ustedes. De igual manera le agradezco al Dr. Carlos Córdova por formar parte de mi comisión, por el conocimiento brindado y por el apoyo durante el proyecto. Muy orgullosa de que todos hayan formado parte de mi comisión. Muchas gracias.
- ❖ A mis amigos que se convirtieron en mi familia durante esta estancia en Monterrey, por sus consejos, su apoyo, su confianza, por todos los buenos y malos momentos compartidos, aprendí mucho de todos y cada uno de ustedes, muchas gracias, los quiero y admiro mucho: Edwin, Florencia (Jirafita), Stephen (Papá Stephen), Montse (red pillow), Frecia (remolino), Juan (Little Jonhy), Ana Itzel (mulán), Iris, Enrique (kaiki), Isaac (bebecito) y Alejandro (alexander).
- ❖ A mis compañeros de laboratorio que también se convirtieron en mis amigos y familia de B. Estructural, muchas gracias por todo el apoyo que me brindaron, por estar al pendiente de mi formación y hacer más amena la maestría muchas gracias a todos: Ana Estrada, Anita 2, Alejandro 1, Xico. Gracias también a las personas que conocí a lo largo de la maestría y que me brindaron su ayuda y conocimiento: Adriana, Elsa, Alex (papá), Irma, Carlos (Luis), Robbi y José Luis (cuerna).
- ❖ A todos y cada uno de los maestros que formaron parte de mi crecimiento académico muchas gracias por el conocimiento brindado. A Juani y Ariadna por siempre apoyarnos en este transcurso, por la confianza y el gran trabajo realizado por ustedes pese a todas las dificultades, las admiro mucho, mi afecto y agradecimiento por siempre para ustedes.
- ❖ Finalmente extendiendo mis agradecimientos a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y a Conacyt por la oportunidad y el apoyo económico brindados para poder llevar a cabo este proyecto de investigación.

TABLA DE CONTENIDO.

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
LISTA DE TABLAS.	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
NOMENCLATURA	ix
RESUMEN	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.	1
CAPÍTULO II: ANTECEDENTES	2
2.1 Historia de las hipocretinas (orexinas)	2
2.2 Generalidades de las orexinas.	4
2.2.1 Las orexinas y sus receptores.....	4
2.3 Vías de señalización de las orexinas.	5
2.4 Vías de innervación de las neuronas orexinérgicas.	7
2.5 Aferencias hacia las neuronas de orexina.	10
2.5.1 Aferencias del sistema límbico.....	10
2.5.2 Aferencias de áreas preópticas.....	11
2.5.3 Aferencias del tallo cerebral.....	12
2.6 Efectos de las orexinas	12
2.6.1 Efectos fisiológicos.....	13
2.6.2 Otros efectos (fisiopatológicos).....	17
2.7 Factores de regulación que influyen en la actividad de las orexinas.	20
2.7.1 Factores humorales periféricos.....	20
2.8 Niveles de regulación de las orexinas	21
2.8.1 Nivel local y sistémico.....	21
2.8.2 Nivel molecular.....	21
2.9 Biología molecular de las orexinas	22

2.9.1	Gen <i>HCRT</i>	22
2.9.2	Regulación del gen <i>HCRT</i>	23
2.9.3	Expresión y regulación transcripcional del gen <i>HCRT</i>	24
2.10	Antecedentes directos	27
	Pregunta de investigación	29
CAPÍTULO III: JUSTIFICACIÓN		30
CAPÍTULO IV: HIPÓTESIS		31
CAPÍTULO V: OBJETIVOS		32
	General.....	32
	Particulares.....	32
CAPÍTULO VI: ESTRATEGIA GENERAL		33
6.1	Diseño de estudio.....	33
CAPÍTULO VII: MATERIALES		34
7.1	Muestras.....	34
7.2	Material.....	34
7.3	Reactivos.....	34
7.4	Equipos.....	36
CAPÍTULO VIII: MÉTODOS		38
8.1	Cultivo celular	38
8.1.1	Transfección.....	39
8.1.2	Ensayo reportero de luciferasa.....	40
8.2	PCR en tiempo real	40
8.2.1	Extracción de RNA.....	40
8.2.2	RT-PCR.....	40
8.2.3	qPCR.....	43
8.3	Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)	44
8.3.1	Elección de la concentración de los oligos previamente sintetizados.....	44
8.3.2	Purificación de las proteínas.....	44
8.3.3	Cuantificación de proteínas.....	45
8.3.4	Ensayo final (EMSA).....	45
8.4	Análisis estadístico	48

CAPÍTULO IX: RESULTADOS	49
9.1 Ensayo reportero de luciferasa.....	49
9.2 PCR en tiempo real.....	55
9.2.1 Extracción de RNA.	55
9.2.2 RT- PCR.	57
9.2.3 qPCR.	58
9.3 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	65
CAPÍTULO X: DISCUSIÓN.....	70
CAPÍTULO XI: CONCLUSIÓN.....	77
CAPÍTULO XII: PERSPECTIVAS.....	78
CAPÍTULO XIII: BIBLIOGRAFÍA.....	79
CAPÍTULO XIV: APÉNDICES	92

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Antecedentes sobre las orexinas	3
Tabla II. Estudios de la expresión y regulación transcripcional del gen HCRT.....	26
Tabla III. Características de los oligos utilizados.	36
Tabla IV. Sondas y primers utilizados.....	37
Tabla V. Desnaturalización de ARN y primers.....	41
Tabla VI. Alineamiento de primers y síntesis de ADNc.....	41
Tabla VII. Condiciones de termociclado para la RT-PCR	42
Tabla VIII. Componentes de reacción para la qPCR.	43
Tabla IX. Reactivos empleados para la purificación de proteínas.	44
Tabla X. Reactivos empleados para la cuantificación de proteínas.....	45
Tabla XI. Reactivos empleados para el EMSA.	46
Tabla XII. Reactivos empleados para los geles de poliacrilamida.	46
Tabla XIII. Parámetros de calidad del RNA en la línea celular C6/ebf2.....	55
Tabla XIV. Parámetros de calidad del RNA en la línea celular HEK293/ebf2.....	56
Tabla XV. Curvas de eficiencias para las sondas de estudio.	59

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Descripción general del sistema de orexinas.....	5
Figura 2. Cascadas de señalización para las orexinas.....	6
Figura 3. Proyecciones excitatorias de las orexinas.....	8
Figura 4. Reguladores de las neuronas orexinérgicas.....	9
Figura 5. Aferencias de las orexinas.....	14
Figura 6. Regulación del ciclo de vigilia y sueño.....	16
Figura 7. Diagrama del gen <i>HCRT</i>	22
Figura 8. Análisis <i>in silico</i> del promotor del gen <i>HCRT</i> en 4 especies diferentes.....	27
Figura 9. Definición del promotor del gen <i>HCRT</i> murino y sus derivados sintéticos.	28
Figura 10. Expresión relativa del factor de transcripción <i>ebf2</i>	49
Figura 11. Expresión del gen reportero de luciferasa inducida por los diferentes derivados sintéticos del promotor del gen <i>HCRT</i> murino después de 48h.	53
Figura 12. Expresión del gen reportero de luciferasa inducida por los diferentes derivados sintéticos del promotor del gen <i>HCRT</i> murino después de 4 semanas.....	54
Figura 13. Gel de agarosa (2%).	57
Figura 14. Derivados sintéticos del promotor del gen <i>HCRT</i> murino.	58
Figura 15. Curvas de amplificación en las líneas celulares de estudio.....	60
Figura 16. Expresión relativa inducida por los distintos derivados sintéticos del promotor del gen <i>HCRT</i> murino en la línea celular C6/ <i>ebf2</i>	62
Figura 17. Expresión relativa inducida por los distintos derivados sintéticos del promotor <i>HCRT</i> murino en la línea celular HEK293/ <i>ebf2</i>	63
Figura 18. Proporción de relación entre el sitio de inicio de la transcripción presuntivo respecto al original.	64
Figura 19. Curva de calibración Bradford.....	65
Figura 20. Gel de poliacrilamida (10%).	66
Figura 21. Curva de concentraciones para el oligo <i>olf-1</i> distal marcado con biotina.	67
Figura 22. EMSA representativo de la interacción del factor de transcripción <i>ebf2</i> con el sitio <i>olf-1</i> distal en las líneas celulares C6/ <i>ebf2</i> y HEK293/ <i>ebf2</i>	69

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	2 elevado a la delta delta Ct
Abs	Absorbancia
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	ARN mensajero
ANOVA	Análisis de varianza
AUG	Codón de inicio de la traducción
cDNA	ADN complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
β	Beta
BSA	Albumina sérica bovina
C6	Línea celular de Glioblastoma de rata (parental)
C6/ebf2	Línea celular C6 que sobre-expresa ebf2
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
Ct	Ciclo umbral
DMEM	Medio de cultivo Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium
ebf2	Factor 2 para el desarrollo temprano de células B
EEG	Electroencefalograma
EMSA	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
°C	Grados centígrados
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CO ₂	Dióxido de carbono
COE	Collier/Olf/Ebf
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAM	6-carboxifluoresceína
fmol	femtomoles
Foxa2	Factor de transcripción, Forkhead box A2
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G

GTP	Guanosín trifosfato
h	Horas
HCRT	Gen de la prepro-hipocretina (prepro-orexina)
HEK-293	Línea celular de Riñón de Embrión Humano (parental)
HEK-293/ebf2	Línea celular HEK-293 que sobreexpresa ebf2
5'HEX	5'-hexafluoresceína
bHLH	Hélice-bucle-hélice
IFN	Interferón
Igfbp3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
IP3	Inositol trifosfato
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltones
KO	Knock-out
M	Molar
MCH	Hormona concentradora de melanina
min	Minutos
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NPY	Neuropéptido Y
Nr6a1	Receptor nuclear subfamilia 6 grupo A miembro 1
NREM	No REM
NurRE	Elementos de respuesta a receptores nucleares
OE1	Elemento regulador de orexina 1
OE2	Elemento regulador de orexina 2
OptiMEM	Medio reducido en suero modificado
Ox ₁ R	Receptor de orexina 1
Ox ₂ R	Receptor de orexina 2
OxA	Orexina A
OxB	Orexina B
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa

PSA	Persulfato de amonio
REM	Movimiento ocular rápido
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
seg	Segundos
BFS	Suero fetal bovino
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SNC	Sistema Nervioso Central
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA
TBS	Tris-Buffer-Salino
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TSS	Sitio de inicio de la transcripción.
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrometros
µM	Micromolar
U	Unidades internacionales
URL	Unidades Relativas de Luminiscencia
UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta
V	Volts
VLPO	Área preóptica ventrolateral
Vs	Versus
WT	Wild-type, silvestre

RESUMEN

Papel de los elementos *olf-1* del promotor del gen de orexina (*HCRT*) en la regulación de su expresión.

Introducción. Las hipocretinas u orexinas son neurotransmisores peptídicos involucrados principalmente en la regulación del ciclo de vigilia / sueño y el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo. Estos péptidos son originados a partir de la prepro-orexina, cuya expresión se delimita al hipotálamo lateral (LH). Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado que la deficiencia de células orexinérgicas se asocia con el desarrollo de un fenotipo narcoléptico en ratones knock-out al factor de transcripción *ebf2* y que el promotor del gen de prepro-orexina (*HCRT*) contiene dos sitios potenciales de unión (sitios *olf-1*) para *ebf2*. Sin embargo, la regulación de la biosíntesis de los niveles de prepro-orexina a nivel molecular no ha sido completamente esclarecida, en el presente estudio se resaltan elementos moleculares claves en la regulación transcripcional del gen de prepro-orexina.

Objetivo. Evaluar el papel de los elementos *olf-1* del promotor mínimo del gen *HCRT* murino en la regulación de su transcripción.

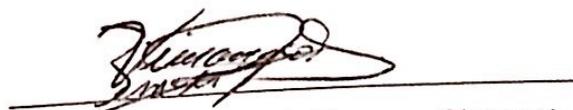
Material y métodos. Se obtuvieron líneas celulares que expresan de manera semiestable el gen reportero *lucifera*, que codifica una luciferasa secretable. Estas líneas corresponden a linajes neuronales y no neuronales, que además sobre-expresan *ebf2* con el fin de analizar la participación de dicho factor de transcripción sobre la regulación de la expresión de luciferasa inducida por el promotor del gen *HCRT* murino y sus distintos derivados sintéticos. Se utilizó RT-qPCR para evaluar la expresión de luciferasa a nivel de mRNA inducida por cada una de las variantes del promotor en cada una de las líneas celulares semiestables. Finalmente, mediante un ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA) se determinó la interacción *in vitro* de *ebf2* con los sitios *olf-1* presentes en el promotor mínimo del gen *HCRT*.

Resultados. En las líneas celulares que sobre-expresan *ebf2* transfectadas con las variantes del promotor con mutaciones en un sitio *olf-1* proximal al sitio de inicio de transcripción (TSS) del gen *HCRT* se incrementa la actividad de luciferasa con respecto a las células que contienen la secuencia silvestre del promotor. Esto correlaciona con un aumento del número de copias de mRNA que codifica para luciferasa. En las células no neuronales que sobre-expresan *ebf2*, con mutaciones en un sitio *olf-1* distal al TSS disminuyen la actividad de luciferasa y los niveles de su mRNA, y también parece cambiar el TSS hacia una posición río abajo del sitio original. Los ensayos de EMSA demuestran que la secuencia *olf-1* distal es un sitio de unión para *ebf2*.

Conclusiones.

Los sitios *olf-1* proximal y distal presentes en la región promotora del gen *HCRT* murino participan regulando la transcripción del gen reportero y modificando su expresión en líneas celulares neuronales y no neuronales. Este efecto es dependiente del contexto celular. El sitio *olf-1* distal parece ser un regulador positivo del promotor del gen *HCRT* murino y es sitio diana para el factor de transcripción *ebf2*.

No. de registro de Comité de Ética: Este trabajo fue apoyado por donativo Conacyt No. 220342. No. de registro de Comité de Ética: BI12-006.



Dra. C. Viviana C. Zomosa Signoret

Director de Tesis

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.

La narcolepsia es un trastorno neurológico crónico del sueño que se caracteriza por somnolencia diurna excesiva, cataplejía y parálisis del sueño, se ha reportado que afecta del 0.02 al 0.18% de la población [1, 2].

El control de sueño y la vigilia es un proceso complejo que implica la actividad coordinada de numerosos circuitos neuronales. Se cree que un papel fundamental en este fenómeno es jugado por las neuronas del hipotálamo que sintetizan y liberan orexinas (también conocidas como hipocretinas) [3]. En los seres humanos, la población de células orexinérgicas está formada por aproximadamente 70,000 neuronas que se localizan exclusivamente en el área hipotalámica lateral [4]. Por lo que su localización muestra una posición ideal para influir en el sueño y la vigilia. Las orexinas tienen un amplio espectro de efectos reguladores en el sistema nervioso central ya que modulan la excitabilidad celular a través de su interacción con dos receptores acoplados a proteínas G, OxR1 y OxR2 [5]. Las hipocretinas, son dos péptidos derivados de un único precursor producido en el hipotálamo lateral (LH). Durante la última década, el sistema de orexinas se ha asociado con numerosas funciones fisiológicas, incluyendo el ciclo vigilia-sueño [5], la homeostasis energética [6], sistema endócrino [7], y estados patológicos tales como la narcolepsia [8] y el abuso de drogas [9]. Se ha demostrado que la deficiencia de las neuronas orexinérgicas conduce al desarrollo de un fenotipo narcoléptico [8, 10-12]. Sin embargo, no se han definido completamente los mecanismos fisiológicos que regulan la expresión de orexinas durante el desarrollo ni durante las variaciones circadianas, por lo que es de gran interés la comprensión de los elementos moleculares clave en la regulación de la expresión de las orexinas, y cómo estos pueden servir para definir dianas potenciales con el fin de generar nuevas terapias dirigidas a diversos trastornos relacionados con el sueño, la alimentación y las adicciones.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES.

2.1 Historia de las hipocretinas (orexinas).

En 1998 de Lecea y cols., utilizando hibridación sustractiva generaron una biblioteca de cDNA para representar los mRNAs de mayor prevalencia en el hipotálamo. Esta lista, que contenía 43 secuencias diferentes, reveló que las neuronas del hipotálamo se especializan en la expresión de moléculas de señalización intercelular, y que el 40% de las clonas identificadas codifican para neuropéptidos transmisores. Identificando que la clona más frecuente codifica para la prepro-orexina o prepro-hipocretina [13].

De forma independiente, Sakurai y cols (1998), publicaron estudios que describieron una búsqueda bioquímica sistemática de ligandos peptídicos endógenos para múltiples receptores huérfanos acoplados a proteínas G (GPCR). Identificaron dos neuropéptidos que activan dos receptores huérfanos estrechamente relacionados y determinaron que el precursor de estos péptidos se expresa exclusivamente en el hipotálamo lateral (LH). También demostraron que el receptor de la orexina-A (Hcrt-1) tiene una afinidad más alta para la orexina-A, mientras que el receptor de la orexina-B (Hcrt-2) tiene una afinidad similar para ambos péptidos [14].

Estudios de hibridación *in situ* mostraron que el mRNA de la prepro-orexina se produce por un grupo discreto de neuronas (~5000 en roedores [15]; 50 - 80 000 en seres humanos) distribuidas de forma bilateral en el hipotálamo posterior lateral [10]. En la Tabla I se muestran algunos acontecimientos importantes en el estudio de las orexinas a lo largo de la historia.

Tabla I. Antecedentes sobre las orexinas

Año	Hallazgo	Autores
1998	Se reportó la identificación de las orexinas por dos grupos independientes que utilizaron diferentes estrategias (biología molecular y farmacología inversa). Se demostró que la administración de orexina A u orexina B en el ventrículo lateral intracerebroventricular (ICV) aumenta la ingesta de alimentos en ratas.	De Lecea y cols. Sakurai y cols.
1999	Se sugiere la importancia de las orexinas en la regulación del ciclo vigilia / sueño. Se identificaron mutaciones en el receptor de orexina-2, gen responsable de la narcolepsia y cataplejía canina.	Lin y cols.
2000	Se confirman las interrupciones del sistema de las orexinas (humanos) en la narcolepsia-cataplejía.	Peyron et al. Thannickal et al.
2003	Se demuestran las distintas funciones de cada receptor de las orexinas en la regulación del sueño y vigilia. Se indicó que las neuronas de orexina se activan bajo el balance energético negativo, y son necesarias para aumentar la excitación en la búsqueda de comida.	Willie y cols. Yamanaka y cols.
2006	Se identificaron las proyecciones de las neuronas de orexina A.	Sakurai y cols.
2007	Se encontró que la administración por vía oral de un antagonista de orexina (ACT-078573) bloquea los receptores de orexina en concentraciones nanomolares e induce el sueño.	Brisbane-Roch y cols.

2.2 Generalidades de las orexinas.

2.2.1 Las orexinas y sus receptores.

Las orexinas derivan del péptido precursor prepro-orexina, conformado por 130 aminoácidos (aa) en roedores y 131 aa en humanos, el cual es escindido por proteólisis, generando las orexinas A (33 aa) y B (28 aa) [14].

La orexina A (OxA) es un péptido de 3562 daltons, con un residuo piroglutamilo N-terminal y un residuo C-terminal amidado. Los cuatro residuos de cisteína de la orexina A forman en conjunto dos enlaces disulfuro dentro de la cadena. Esta estructura se encuentra completamente conservada entre varias especies de mamíferos (humano, rata, ratón, vaca, oveja, perro y cerdo) [16]. Por otro lado, la orexina B (OxB) es un péptido lineal de 2937 daltons, con un extremo C-terminal amidado, que es 46% idéntico en su secuencia a la orexina A, mientras que el extremo N-terminal es más variable (Figura 1) [16].

Los efectos de las orexinas A y B son mediados a través de dos receptores acoplados a proteínas G: receptor de orexina 1(OxR1) y receptor de orexina 2 (OxR2). El OxR1 es selectivo de OxA, mientras que OxR2 es un receptor sensible tanto para OxA como para OxB. El OxR1 se acopla exclusivamente a la subclase Gq de proteínas G heterotriméricas, mientras que OxR2 se acopla a $G_{i/o}$ y / o Gq.

Los receptores de orexina presentan patrones espaciales de expresión diferencial en el cerebro de rata [17, 18]. El OxR1 se expresa de manera abundante en el locus coeruleus (LC), mientras que el OxR2 lo hace en el núcleo tuberomamilar (TMN), ambos receptores comparten su expresión en el núcleo tegmental laterodorsal / pedunculopontino (LDT / PPT), el núcleo dorsal de rafe (DRN) y el área tegmental ventral (VTA) (Figura 3) [16, 19]. Los receptores de Ox1 son importantes para los efectos neurobiológicos que impulsan la búsqueda de drogas como la morfina, cocaína, nicotina, y el alcohol. En contraste, los receptores Ox2 han sido implicados con mas fuerza en la regulación del ciclo vigilia - sueño y excitación [20]. Mientras que algunos

estudios sugieren que los anteriores juegan un papel menor en la búsqueda de drogas durante la conducta adictiva [21].

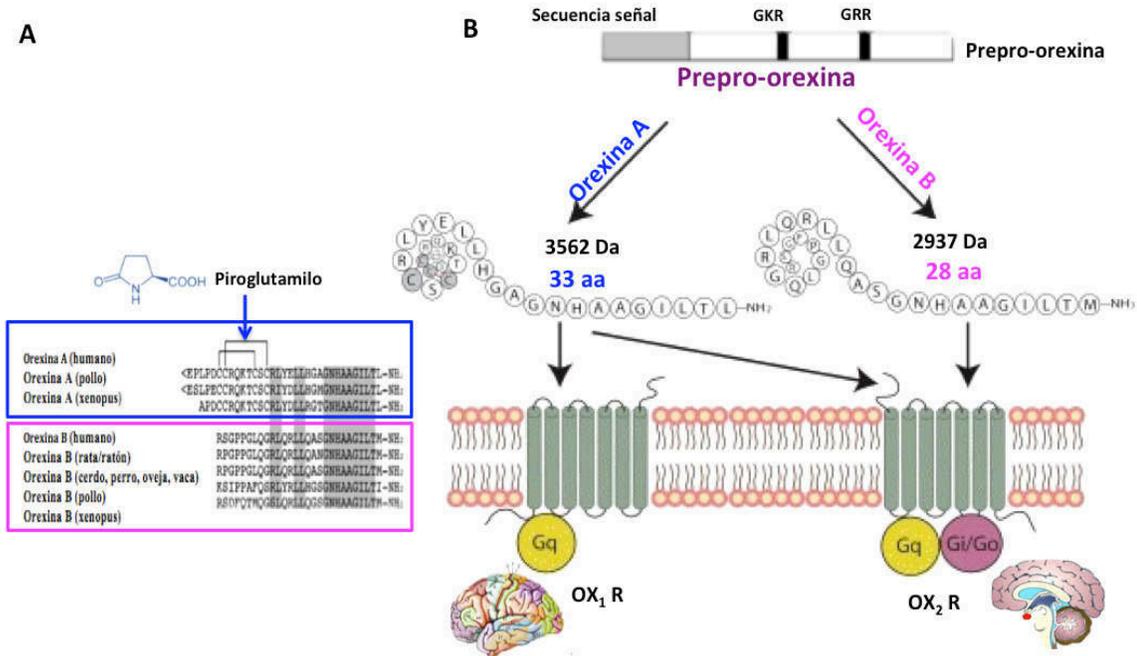


Figura 1. Descripción general del sistema de orexinas.

(A) se muestran las estructuras de los péptidos maduros de orexina A y orexina B. La topología de los dos enlaces disulfuro dentro de la cadena de la orexina A se indica encima de la secuencia. Las partes sombreadas indican la identidad de aminoácidos. Las secuencias de orexina A en mamíferos identificadas hasta ahora (humano, rata, ratón, cerdo, perro, ovejas y vacas) son todas idénticas. (B) se muestra una representación esquemática del sistema de las orexinas. Editada de Ohno, K. y T. Sakurai (*The Journal of biological chemistry*), 2008 [16].

2.3 Vías de señalización de las orexinas.

El principal efecto de las orexinas sobre sus células diana es la despolarización de las neuronas con incrementos en su excitabilidad y la tasa de disparo [22-24]. Esta despolarización se logra mediante la inhibición de los canales de K⁺ o la activación de canales catiónicos no específicos [25].

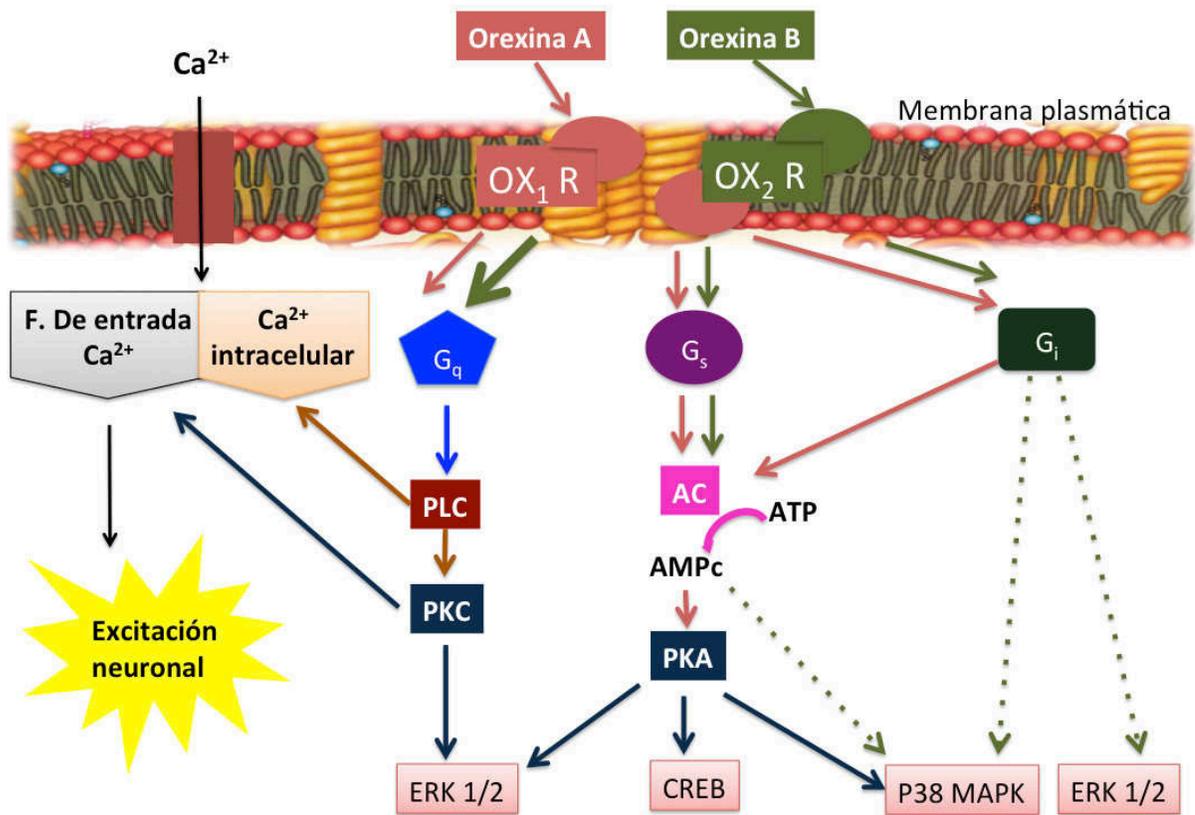


Figura 2. Cascadas de señalización para las orexinas.

La unión de OxA (flechas rojas) y OxB (flechas verdes) a los receptores OXR1 y OXR2 respectivamente, activan las cascadas de señalización G_q / PLC / PKC / ERK, G_s / AC / cAMP / PKA / ERK (y / o CREB, p38 MAPK) y G_i (vía inhibitoria). La señalización del OXR2 a través de la vía G_q / PLC / PKC parece ser más fuerte (flecha verde gruesa) que la que desencadena el OXR1. Las activación de los receptores de Ox también desencadena un flujo de calcio mediado por PKC a través de la membrana plasmática. También se libera calcio a partir de almacenes intracelulares a través de una vía mediada por PLC. El nivel elevado de calcio produce una excitación sostenida de las neuronas. Editada de T.- R. Xu. *Cellular Signalling*, 2013 [26].

Se han explorado diversos mecanismos de señalización río abajo de la interacción de orexinas sobre sus receptores. Las uniones se deben a los cambios en la estructura de los receptores [27], que desencadenan la entrada de calcio mediada por la proteína cinasa C (PKC) a través de la membrana plasmática.

El acoplamiento del OxR1 para la activación del canal de Ca^{2+} se encuentra río arriba de muchas otras vías de señalización, que incluyen la activación de varias proteínas tales como, la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), p38, la proteína de unión al elemento de respuesta para cAMP (CREB), la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC). Se libera también calcio a partir de almacenes intracelulares a través de una vía mediada por PLC. El nivel elevado de calcio produce una excitación sostenida de las neuronas [28-32] (Figura 2).

2.4 Vías de inervación de las neuronas orexinérgicas.

Se puede observar la presencia de fibras orexinérgicas casi en todo el SNC, excluyendo el cerebelo [4, 33, 34]. Estas observaciones sugieren que las principales regiones de salida de las neuronas orexinérgicas son las correspondientes al tallo cerebral (LC, TMN y LDT / PPT). Las neuronas orexinérgicas también proyectan sus axones desde el hipotálamo lateral hacia muchas áreas de la vía de recompensa mesolímbica, incluyendo el VTA y el núcleo accumbens (NAc) [21, 35]. Es a través de estas conexiones que las orexinas ejercen sus funciones fisiológicas (Figura 3).

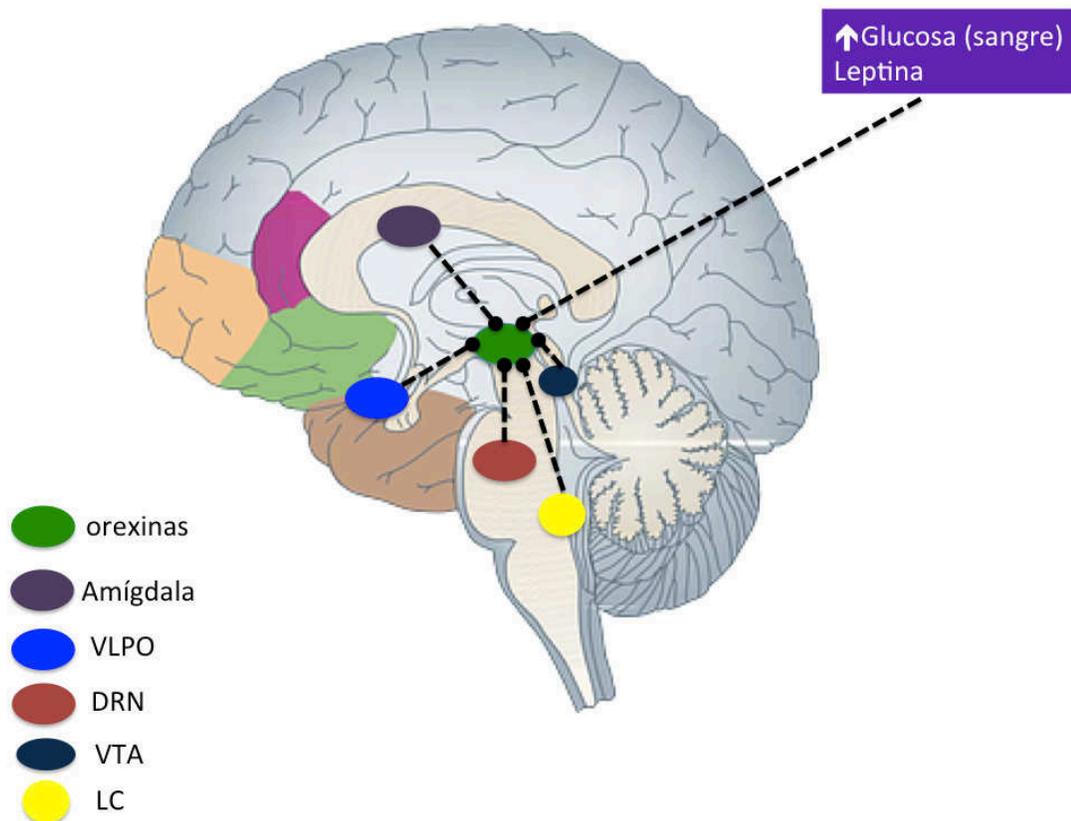


Figura 4. Reguladores de las neuronas orexinérgicas.

Las neuronas de orexina se conectan con regiones reguladoras autónomas (amígdala, DRN, VTA y LC) para incrementar o disminuir la salida simpática en respuesta a señales o contextos destacados. Estas neuronas también monitorean los factores que reflejan el estado metabólico del cuerpo, tales como la leptina y la glucosa. El área preóptica ventrolateral (VLPO) es una región importante para la inhibición de las neuronas orexinérgicas durante el proceso de sueño. Editada de Sakurai T. *Ann N Y Acad Sci*, 2010 [36].

Las neuronas orexinérgicas regulan procesos fisiológicos descritos más adelante, y mantienen la excitación mediante el envío de proyecciones excitatorias a los núcleos LDT / PPT (neuronas acetilcolinérgicas, Ach), al LC (neuronas noradrenérgicas, NA), al núcleo DR (neuronas serotoninérgicas, 5-HT), al VTA (neuronas dopaminérgicas, DA), y al TMN (neuronas histaminérgicas, HA) [36-39] (Figura 3).

El sistema de orexina en el SNC puede afectar indirectamente también al sistema de orexina periférico, este último se encuentra en el tejido adiposo, el tracto gastrointestinal (yeyuno), las glándulas suprarrenales (principalmente la corteza), las gónadas (testículos, los ovarios) y el páncreas [14, 40-43].

2.5 Aferencias hacia las neuronas de orexina.

Ha sido difícil estudiar las aferencias neuronales de las orexinas porque son escasas y están dispersas dentro del LH (Figura 3). Para abordar este punto, se han realizado estudios de rastreo retrógrado, donde el fragmento no tóxico C-terminal de la toxina tetánica (TTC) se utilizó para transferir retrógradamente la proteína fusionada a las neuronas interconectadas y posteriormente hacia los cuerpos celulares de las neuronas de orden superior, logrando identificar varias aferencias cerebrales, incluyendo a las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, las neuronas gabaérgicas en el núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) y las neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal de rafe [44, 45].

2.5.1 Aferencias del sistema límbico.

Algunos estudios han evidenciado que el sistema límbico (implicado en las emociones) desempeña un papel importante en la regulación de las neuronas orexinérgicas [45-47]. La importancia de esta conexión es evidente en la respuesta defensiva ("lucha o huida"), pues los ratones sometidos a pruebas conductuales en un ambiente intruso / residente muestran respuestas cardiovasculares y locomotoras frente al estrés emocional, mientras que estas respuestas se encuentran disminuidas en los ratones knock-out (KO) al gen *HCRT* [48]. Recientemente, se han reportado anomalías del funcionamiento de la amígdala en pacientes con narcolepsia humana, utilizando imágenes de resonancia magnética funcional [49].

Estos hallazgos sugieren que la narcolepsia se acompaña de un aprendizaje emocional anormal y que de acuerdo a los datos obtenidos en modelos animales, el sistema de orexina es crucial para la función de la amígdala en dicho proceso. La entrada neural del sistema límbico hacia las neuronas orexinérgicas también ha sido implicada en la fisiopatología de la cataplejía, ya que es bien conocido que los estímulos emocionales fuertes, generalmente positivos, desencadenan la cataplejía en los pacientes con narcolepsia-cataplejía [50].

Se ha demostrado que la inyección local de orexina en el núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) inhibe fuertemente la atonía relacionada con el sueño REM en los gatos [51]. Por otra parte, las aferencias límbicas hacia las neuronas orexinérgicas se han encontrado involucradas en la regulación del comportamiento alimenticio. Parte del contenido afectivo en la percepción de los alimentos se piensa que se procesa en la amígdala y el sistema límbico [52], la percepción de los alimentos evoca la cataplejía en los perros narcolepticos [53], esto sugiere que la señalización de orexina es fisiológicamente activada en la percepción de los alimentos, y que este sistema es necesario para sostener un comportamiento adecuado en la alimentación, incluyendo el mantenimiento de la actividad motora.

2.5.2 Aferencias de áreas preópticas.

El área preóptica, especialmente el VLPO, juega un papel crítico en la iniciación del sueño no REM y su mantenimiento [54], debido a la presencia de proyecciones inhibitorias hacia las neuronas orexinérgicas para el mantenimiento de la vigilia [45, 55]. Algunas neuronas en el VLPO, son neuronas activas (gabaérgicas) durante el sueño y muestran una atenuación en su disparo durante la vigilia [56]. El ácido γ -aminobutírico (GABA) y la galanina son los principales neurotransmisores inhibidores del VLPO, que envían múltiples proyecciones inhibitorias hacia el LC, el TMN y el DR [54, 56] (Figura 4).

2.5.3 Aferencias del tallo cerebral.

Se conoce que las actividades de las neuronas monoaminérgicas en el tallo cerebral y el hipotálamo están asociadas con los estados de vigilia y sueño. Estas neuronas en regiones tales como el DRN, LC y TMN expresan receptores de orexinas y están densamente inervadas por las neuronas orexinérgicas. Sugiriendo que dichas regiones median los efectos de las orexinas. Se ha demostrado que las neuronas noradrenérgicas del LC, las neuronas serotoninérgicas del DRN [57], y las neuronas histaminérgicas del TMN [58] son activadas por las orexinas, para favorecer el proceso de vigilia. Las orexinas también tienen un fuerte efecto excitador directamente sobre las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal [45, 59-61].

2.6 Efectos de las orexinas.

Inicialmente, estos neuropéptidos fueron reconocidos como reguladores de la conducta alimentaria [14]. Posteriormente, varios estudios [62] sugirieron que la deficiencia de las orexinas causa la narcolepsia en humanos y otras especies de mamíferos, destacando las funciones de este neuropéptido hipotalámico en la regulación del sueño y la vigilia [62]. Los estudios de sistemas eferentes y aferentes de neuronas productoras de orexina han demostrado que el sistema neuronal de éstas presenta estrechas interacciones con sistemas que regulan las emociones, la homeostasis energética, la recompensa y la excitación [45, 46, 63-67]. Los efectos excitatorios de estos neuropéptidos están mediados por múltiples mecanismos de interacciones iónicas [68, 69] que, combinados con su capacidad de neuromodulación [23, 70], sugieren una implicación importante directa e indirecta sobre sistemas fisiológicos. Todas estas observaciones demuestran que las neuronas orexinérgicas están involucradas en la detección de los ambientes externos e internos del cuerpo, y en consecuencia regulan los estados de vigilancia (Figura 5).

2.6.1 Efectos fisiológicos.

2.6.1.1 *Ciclo de vigilia y sueño.*

Se ha demostrado que las orexinas juegan un papel importante en la regulación del sueño [71]. El sistema de orexinas regula el ciclo de vigilia y sueño a través de interacciones con sistemas que regulan las emociones, la recompensa y la homeóstasis energética (Figura 6) [72]. El papel de las neuronas orexinérgicas en la regulación del sueño y la excitación ha sido reportado repetidamente. Se conoce que la inyección intracerebroventricular (ICV) de OxA u OxB durante el período de luz incrementa el tiempo de vigilia y recíprocamente disminuye el tiempo del sueño REM y no REM [73, 74]. Se ha establecido que la expresión constitutiva de orexina en cerebros de ratones transgénicos, genera patrones anormales de sueño y vigilia, incluyendo el sueño NREM fragmentado en el período de luz y la atonía incompleta en el sueño REM [75].

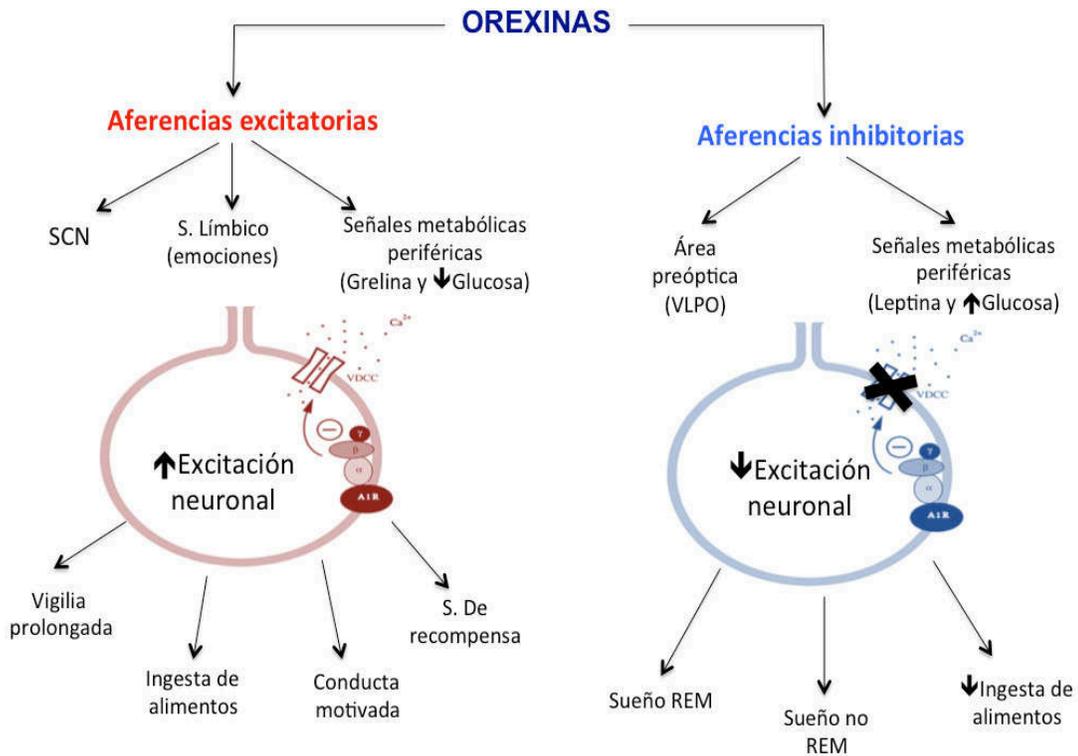


Figura 5. Aferencias de las orexinas.

A partir de aferencias excitatorias e inhibitorias provenientes de señales metabólicas periféricas y regiones locales del SNC, las neuronas orexinérgicas, regulan diversos fenómenos fisiológicos tales como la vigilia, la alimentación, la recompensa y la termogénesis, para coordinar el estado de alerta y la homeostasis energética. Editada de T. Sakurai (*Nature Review Neuroscience*), 2003 [76].

Se ha comprobado que la expresión de Fos (un marcador de la actividad neuronal) en las neuronas orexinérgicas de ratas, se incrementa durante la oscuridad, período activo en el que la vigilia es dominante [77]. Estudios *in vivo* realizados en ratas y ratones demostraron que las neuronas orexinérgicas se disparan durante la vigilia activa, disminuyen su descarga durante la vigilia inactiva y prácticamente cesan el disparo durante el sueño REM y NREM [78, 79].

2.6.1.2 Alimentación y homeostasis energética.

Estudios anteriores han demostrado que las orexinas incrementan tanto la ingesta de alimentos como la tasa metabólica [80]. La administración de orexinas vía ICV durante el período de luz induce a la conducta ingestiva en ratas y ratones [14, 81].

Los estudios genéticos también han demostrado que las orexinas juegan un papel en la regulación de la homeostasis energética pues se ha establecido que la ausencia de neuronas orexinérgicas en ratones transgénicos genera hipofagia y obesidad de inicio tardío [82], aunque la gravedad del fenotipo obeso depende de manera crítica del fondo genético [83].

Se ha demostrado que las hipocretinas afectan el perfil de lipoproteínas plasmáticas y la homeostasis de insulina – glucosa [84]. Las orexinas estimulan la liberación de insulina proveniente de células pancreáticas *in vivo* e *in vitro* [85]. La orexina A controla la producción y utilización de glucosa en los tejidos periféricos a través del sistema nervioso autónomo [86], demostrando que este neuropéptido está implicado en el control de las acciones hormonales centrales y periféricas para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Existen pruebas que sugieren que las orexinas inducen la producción de glucosa en el hígado [87], ayudan a la captación de glucosa en el músculo esquelético [68] y regulan diferencialmente la liberación de glucagón a partir del páncreas [88].

Por otra parte, se ha demostrado que las proyecciones de las orexinas desde el HL hasta el VTA aumentan la excitabilidad de las neuronas pre-motoras simpáticas que controlan el flujo simpático y la termogénesis del tejido adiposo café (BAT), que es el principal productor de calor en mamíferos cuando se disipan calorías en exceso, afectando a largo plazo la regulación de la adiposidad [89, 90].

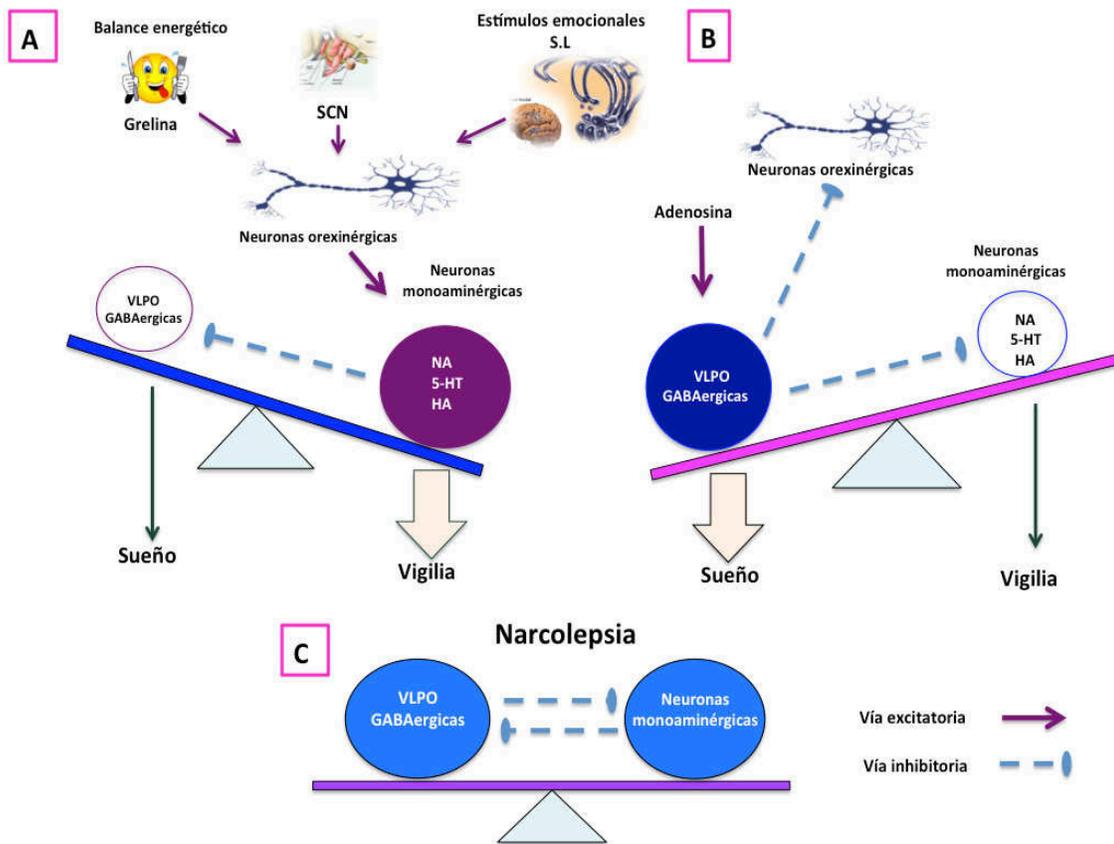


Figura 6. Regulación del ciclo de vigilia y sueño.

Las orexinas se activan durante la vigilia induciendo la activación de neuronas colinérgicas y monoaminérgicas en hipotálamo (A) mientras que en el periodo de sueño las orexinas son inhibidas por la activación de neuronas gabaérgicas (B). En la Figura 2C se observa que la ausencia de orexinas en el ciclo de vigilia y sueño provoca un estado patológico conocido como narcolepsia. Editada de: Inutsuka, A. y A. Yamanaka (*Front Endocrinol Lausanne*), 2013.

2.6.1.3 Sistema de recompensa.

El VTA, ampliamente considerado como la región cerebral crítica para la motivación y los comportamientos relacionados con la recompensa, recibe entrada moduladora de las neuronas orexinérgicas. Existen proyecciones anatómicas densas del hipotálamo lateral al VTA [4] que interfieren fuertemente con el comportamiento de búsqueda de drogas [91].

La activación de las neuronas orexinérgicas está fuertemente asociada con las preferencias por las señales que indican la recompensa de fármacos y alimentos [67]. Las neuronas orexinérgicas también proyectan al NAc, otro núcleo dopaminérgico implicado en la motivación y la recompensa [92].

2.6.1.4 Sistema neuroendocrino.

Las orexinas, principalmente la OxA, activan la corteza suprarrenal para aumentar la producción de corticosterona a través del eje hipotalámico - hipofisiario – adrenal (HPA) [93, 94]. Las orexinas estimulan la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo y afectan los niveles plasmáticos de estrógenos a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal [95, 96]. Las neuronas orexinérgicas también juegan un papel crítico en la estimulación del flujo simpático al páncreas y en algunas circunstancias ayudan al incremento de la glucosa en sangre, que a su vez genera una inhibición por retroalimentación negativa a dichas neuronas [97].

2.6.2 Otros efectos (fisiopatológicos).

2.6.2.1 Narcolepsia.

La narcolepsia es un trastorno del sueño caracterizado por una desorganización primaria en el ciclo de vigilia / sueño. Los pacientes narcolépticos sufren de somnolencia diurna excesiva, anormalidades del sueño REM y ataques repentinos de atonía muscular durante la vigilia, conocida como cataplejía, la cual se activa principalmente por estímulos emocionales "positivos" que son procesados por el sistema límbico [50, 98]. Se ha demostrado que la deficiencia en la neurotransmisión de orexinas conduce al desarrollo de la narcolepsia en ratones, perros y seres humanos [99].

En la patología de la narcolepsia existe un componente genético clave para su identificación tanto en humanos como en perros. Un estudio realizado en perros narcolépticos, demostró que el gen *CANARC-1* conduce al desarrollo del

fenotipo narcoléptico debido a una mutación en el gen *HCRTR-2*, que codifica al Ox-R2 generando una proteína trunca no funcional [100], también en ratones se ha demostrado que la ausencia del gen *HCRT* conduce al desarrollo de dicho fenotipo [101]. En humanos, se ha comprobado que el alelo HLA específico, DQB1 *0602 está presente en más del 85% de los pacientes narcolepticos con cataplejía, pero tan sólo de un 12% - 38% de la población general [102]. Esta estrecha asociación con el sistema HLA llevó a la sugerencia de que la narcolepsia puede ser una enfermedad autoinmune [103, 104]. Se ha establecido que los pacientes narcolépticos presentan niveles indetectables de Hcrt-1 en el líquido cefalorraquídeo (CSF) [105]. En este sentido, estudios postmortem en cerebros humanos narcolépticos, revelan la ausencia de prepro-orexina y el decremento en el número de células (85% - 95%) que expresan dicho producto génico [106]. Diversos estudios han propuesto que la pérdida de células que expresan prepro-orexina puede conducir a la narcolepsia humana. De acuerdo con esto, en modelos animales ya se ha inducido la pérdida de las neuronas orexinérgicas mediante neurotoxinas selectivas, encontrando también que esta pérdida conduce a un fenotipo narcoléptico [82, 107, 108]. Los ratones de orexina / ataxina-3 son un modelo *in vivo* conocido de narcolepsia [10]. Se ha demostrado que roedores y perros KO al gen *HCRT* o al gen *HCRT-R2* desarrollan el fenotipo de la narcolepsia humana. Por lo tanto, OxR2 parece ser más importante que OxR1 en la regulación del ciclo de vigilia / sueño. La fragmentación del sueño observada en ratones knockout a las orexinas [101], ratones knockout a los receptores de orexina [20] y ratones transgénicos con pérdida de neuronas orexinérgicas [109] nos muestran la importancia de sus funciones fisiológicas. Estudios recientes han propuesto que las variaciones de las orexinas en pacientes narcolépticos se asocian con un aumento en el índice de masa corporal [110] y un mayor riesgo de diabetes mellitus tipo II [111].

2.6.2.2 Adicciones.

Las adicciones son comportamientos continuos y compulsivos, que pueden desencadenarse por el uso de sustancias exógenas (conocidas como drogas de abuso) o conductas necesarias para la supervivencia y preservación de la especie (conocidas como conductas motivadas), que pueden producir alteraciones en el sistema de recompensa e incluso remodelar los circuitos neuronales [112].

La activación de las neuronas orexinérgicas en el LH está fuertemente vinculada a las señales asociadas con la recompensa de drogas y alimentos [113]. Estas neuronas actúan como una entrada al VTA y NAc para los efectos de comportamiento asociados con estímulos de recompensa, y son de gran importancia en el proceso adictivo [114]. La región del cerebro involucrada en el comportamiento de la recompensa de los alimentos y drogas se encuentra principalmente en el LH, sin embargo, en varios estudios se ha establecido que frente a distintas sustancias adictivas, diferentes regiones del cerebro se encuentran afectadas. Por ejemplo, las adicciones hacia la nicotina [115], etanol [116], y morfina están vinculadas al LH [117], mientras que la adicción a la cocaína lo está al VTA [31]. Por otra parte, se ha encontrado que la prepro-orexina inyectada en el VTA incrementa los niveles de dopamina en el NAc y que la delección del gen *HCRT* o el bloqueo del receptor Ox1 disminuyen los niveles de la misma frente a su inducción con morfina en el cerebro de ratón [118]. Lo anterior resalta al OxR1 como parte del circuito de recompensa mediado por la dopamina. Además, se ha demostrado que la señalización de orexina induce al neurotransmisor (glutamato) para estimular el efecto sobre el consumo de alcohol [119]. Esta activación promueve a la búsqueda de drogas a través de la vía PLC / PKC [31]. Por el contrario, otros estudios demuestran que en los ratones knock-out a la prepro-orexina, disminuye la dependencia a la morfina [120] y que los antagonistas de la orexina bloquean la búsqueda de drogas [113, 121].

2.7 Factores de regulación que influyen en la actividad de las orexinas.

Las vías orexinérgicas componen un sistema complejo que recibe señales de múltiples orígenes y se han descrito diversos factores que intervienen en la regulación de las variaciones circadianas de orexina. A manera de ordenar la información, en el presente estudio se dividen en tres grupos para su descripción: locales, sistémicos y moleculares. Los factores locales involucran a los que tienen origen en el mismo ambiente local de prepro-orexina (ya descritos en el capítulo II.6); los sistémicos, conciernen a señales generales del organismo que no sólo afectan a la prepro-orexina, sino a la homeostasis en general y los moleculares, se centran en la regulación genética, sobre todo en el control de la transcripción y la expresión de la misma.

2.7.1 Factores humorales periféricos.

Los comportamientos motivados como la búsqueda de alimentos están profundamente involucrados en el mantenimiento del estado de alerta. Los estudios electrofisiológicos han revelado que el aumento de la concentración de glucosa extracelular induce hiperpolarización, mientras que la disminución de la misma induce la despolarización y aumenta la frecuencia de los potenciales de acción de las neuronas orexinérgicas. Es importante destacar que este mecanismo es suficientemente sensible para responder a las fluctuaciones fisiológicas de la concentración de glucosa inducida por la alimentación normal [6, 122]. Por otra parte, la grelina (hormona segregada por el aparato digestivo) activa también a las neuronas orexinérgicas con la despolarización y aumento de la frecuencia en el potencial de acción. En contraste, la leptina (hormona producida por los adipocitos) robustamente inhibe las neuronas de orexina, causando hiperpolarización y la disminución de la frecuencia en el potencial de acción [6].

2.8 Niveles de regulación de las orexinas.

2.8.1 Nivel local y sistémico.

Se regulan los niveles de orexinas: a partir de su liberación vía local; mediante la interacción de diversos sistemas fisiológicos (sistema límbico, núcleo supraquiasmático, aporte neuronal general y áreas preópticas) o vía sistémica; mediante la participación de factores humorales periféricos implicados en el metabolismo energético (grelina, leptina, glucosa entre otros).

2.8.2 Nivel molecular.

A nivel molecular, se pueden regular los niveles de orexinas a partir de su producción, abordando específicamente: la transcripción del mRNA del gen *HCRT*, la síntesis de la proteína o bien la exocitosis de la proteína secretada. La regulación genética y molecular de las orexinas comprende un mecanismo complejo, por lo que es de gran importancia conocer los efectores que participan río arriba en la generación de cambios en los niveles de expresión del gen que las codifica, así como los posibles efectos río abajo que pudieran ser consecuencia posterior; por ejemplo, la regulación de la liberación de orexinas desde las vesículas que las contienen. En el presente estudio se hace énfasis en la regulación de la expresión de los niveles de prepro-orexina a nivel molecular, específicamente en la transcripción del gen *HCRT*.

2.9 Biología molecular de las orexinas.

2.9.1 Gen *HCRT*.

El gen de prepro-orexina humana (*HCRT*), que se localiza en el cromosoma 17q21, se compone de dos exones y un intrón distribuidos en 1,432 pb. El exón 1 de 143 pb incluye la región 5' no traducida y la región que codifica los primeros siete residuos del péptido señal. El intrón 1 es el único intrón que se encuentra en el gen prepro-orexina humana y abarca 818 pb de longitud. El exón 2 contiene la parte restante del marco de lectura abierta y la región 3' no traducida (Figura 7). Existe alta homología de la secuencia de dicho gen entre distintas especies, siendo de un 95% entre rata / ratón y un 82% entre ratón / humano [123]. La región río arriba del sitio de inicio de la transcripción contiene elementos esenciales para la correcta expresión hipotalámica [44, 124, 125] y para la unión de varios factores de transcripción tales como, *Foxa2*, *Irfp3* y los receptores nucleares *Nr4a1* (*Nur77*) y *Nr6a1* que participan en la regulación de la expresión del gen *HCRT* [125-127].

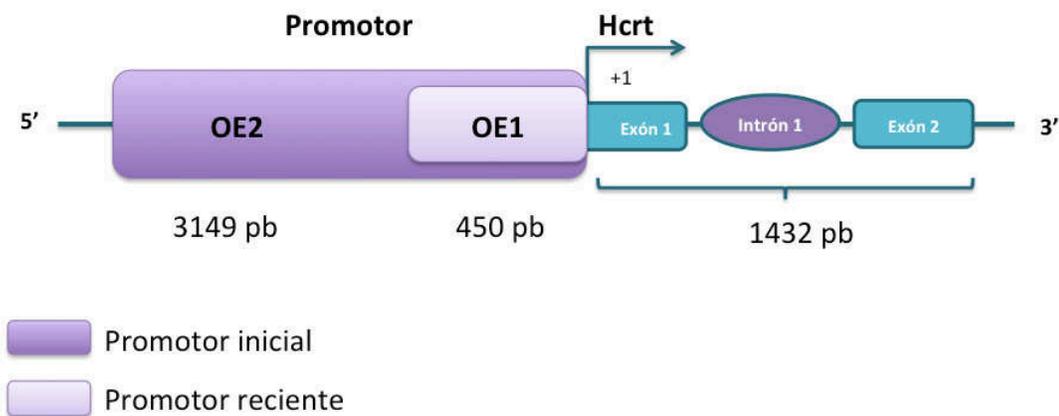


Figura 7. Diagrama del gen *HCRT*

En la figura se puede apreciar la organización estructural del gen humano, la región codificante (exones e intrón) así como el promotor que regula dicha región para la expresión del gen *HCRT*, resaltando con una flecha el sitio de inicio de la traducción (+1).

Dentro de esta región río arriba, se encuentran dos elementos conservados filogenéticamente, uno llamado OE1, que promueve la expresión directa del gen de la prepro-orexina en el LH, y otro denominado OE2, que reprime la expresión de gen *HCRT* en regiones fuera del LH [44].

2.9.2 Regulación del gen *HCRT*.

El promotor del gen *HCRT* es una secuencia en *cis* que participa de manera importante en el control de su expresión. Desde su identificación, se ha intentado definir la secuencia promotora mínima capaz de promover la expresión. Desde sus inicios, en un estudio realizado por Sakurai y cols. (1999) se delimitó una región extensa que flanquea al extremo 5' de 3149 pb y otra de 122 pb no codificante perteneciente al exón 1 que contiene los elementos necesarios para la expresión del gen *HCRT* humano. Posteriormente, se demostró que un fragmento de menor tamaño (450 pb) de la región flanqueante 5' del gen humano prepro-orexina tenía actividad promotora *in vitro* y que dicho fragmento de 450 pb contenía sitios potenciales de unión para factores de transcripción [124]. En un trabajo posterior, Moriguchi y cols. (2002) reportaron la presencia de dos elementos reguladores del gen de prepro-orexina, OE1 y OE2 de 287 y 2500 pb, respectivamente, situados en la región del promotor del gen humano, necesarios para la expresión de dicho gen en el hipotálamo lateral y para su represión fuera de dicha región en ratones transgénicos, mediante delecciones seriadas en el elemento OE1, se delimitó una secuencia de 57 pb crítica para la regulación espacial *in vivo* [44].

Por otra parte, se ha demostrado que diversos factores de transcripción considerados elementos en *trans* que actúan sobre el promotor del gen *HCRT*, también participan en la regulación de su expresión. Entre ellos, destacan *Foxa2* y *Nr6a1*, que se han propuesto como reguladores del gen *HCRT* apoyados en ensayos de actividad *in vitro* [125].

Sin embargo, se conoce muy poco sobre los componentes que reaccionan a los cambios en el ambiente y de los determinantes de la expresión de dicho gen dentro del hipotálamo lateral. Por lo que es de nuestro interés abordar un poco más sobre ello.

2.9.3 Expresión y regulación transcripcional del gen *HCRT*.

En el 2002 se realizó un estudio *in vivo* donde se delimitaron dos sitios en la región promotora del gen *HCRT* (río arriba del codón de inicio de la traducción) cuya función es específica para la regulación de la expresión del gen *HCRT* en el hipotálamo lateral. Se encontró que el elemento regulador de prepro-orexina tipo 1 (OE1) regula positivamente la expresión del gen dentro del hipotálamo lateral, mientras que el elemento regulador de prepro-orexina tipo 2 (OE2) funge como un regulador negativo de la expresión del gen fuera del hipotálamo, así como también se encontró que dentro de OE1 se encuentra una pequeña región a la cual se pueden unir distintos factores de transcripción que participan en la regulación de la expresión del gen *HCRT* [44].

Entre dichos factores de transcripción destacan: *Foxa2* (2009), que promueve la expresión del gen *HCRT* dentro del hipotálamo lateral en condiciones de ayuno provocando incremento de la ingesta de alimentos y conducta motivada, así como aumento del estado de alerta en ratones [127]. También se ha encontrado que el factor de transcripción *Nr6a1* (2010) participa como represor de la transcripción del gen *HCRT* en el hipotálamo en modelos *in vivo* e *in vitro* [125] (Tabla II).

En el 2009, Honda y cols., realizaron análisis de expresión génica a gran escala de ratones transgénicos que expresan ataxina 3, una proteína neurotóxica, bajo el control del promotor de *HCRT*, con el fin de provocar la pérdida de las neuronas orexinérgicas. Esto tuvo como resultado cambios en la expresión de varios genes, entre ellos el gen *EBF2*, que se encontró sub-expresado de manera significativa en el hipotálamo lateral de los ratones con deficiencia de neuronas orexinérgicas [126].

2.9.3.1 Ebf2.

El factor de transcripción *ebf2* (factor temprano de células B 2) pertenece a la familia EBF, y también es conocido como COE2. Dicho factor se localiza en el núcleo y codifica para una proteína de 575 aa (masa molecular = 62,650 Da). Se clasifica dentro de la familia hélice bucle hélice con un dominio de unión al ADN bien conservado, reconociendo la secuencia 5'-ATTCCCNNGGGAATT-3'. Interactúa con otros miembros de su misma familia formando homodímeros y heterodímeros. Inicialmente, se evidenció su participación, así como la de otros factores de la misma familia, en la diferenciación neuronal por estudios hechos en *Drosophila* que luego fueron extrapolados a mamíferos, con lo que se estableció su papel en la neurogénesis [128].

Se conoce que *ebf2* se expresa también en tejido adiposo y en células osteoblásticas inmaduras durante el desarrollo embrionario del ratón. En osteoblastos, regula la diferenciación a osteoclastos y actúa en sinergia con la vía de respuesta Wnt [129]. Otras funciones con las que se ha relacionado son el desarrollo de células B, la regulación génica olfatoria y el desarrollo y diferenciación neural [130-132].

Tabla II. Estudios de la expresión y regulación transcripcional del gen *HCRT*.

Autor	Hallazgo	Año
Moriguchi y cols.	Elementos OE1 y OE2 son necesarios para la expresión del gen <i>HCRT</i> en hipotálamo lateral.	2002
Silva y cols.	El factor de transcripción <i>Foxa2</i> se une al promotor del gen <i>HCRT</i> e induce su transcripción en condiciones de ayuno.	2009
Tanaka y cols.	El factor de transcripción <i>Nr6a1</i> se une al promotor del gen <i>HCRT</i> y reprime su actividad transcripcional en hipotálamo lateral <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	2010
Vidal -Tamayo y cols.	La ausencia del factor de transcripción <i>Ebf2</i> se relaciona con la disminución de neuronas que expresan <i>HCRT</i> dando lugar a un fenotipo narcoléptico.	2011
Sánchez – García, A., y cols.	<i>Ebf2</i> aumenta la actividad del promotor del gen <i>HCRT in vitro</i> en diferentes líneas celulares.	2016

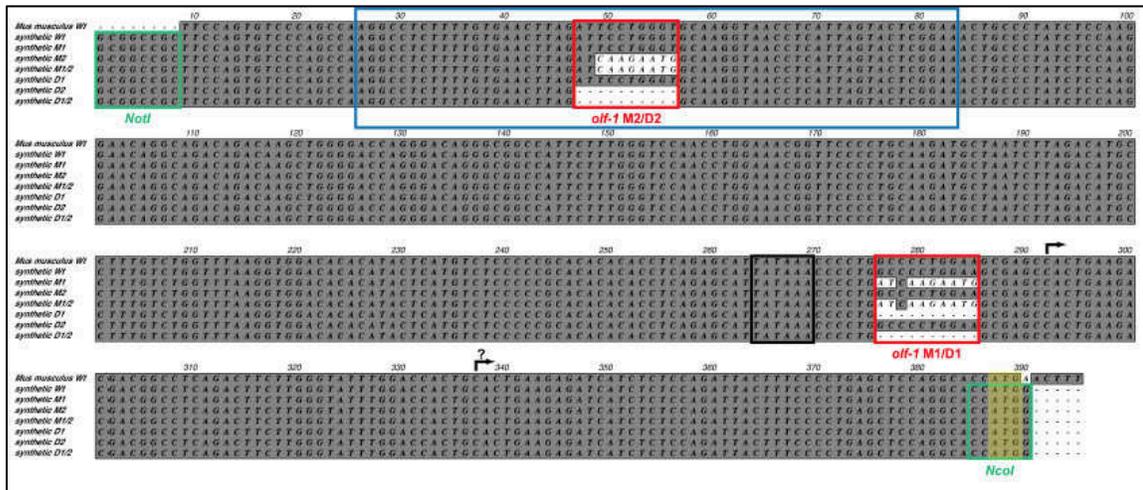


Figura 9. Definición del promotor del gen *HCRT* murino y sus derivados sintéticos.

Se generaron secuencias de ADN modificadas obtenidas de la base de datos Ensembl, basadas en la región 5' proximal, río arriba del sitio del codón de inicio de la traducción (390 pb). Dicha región comprende el OE1 (278pb) mencionado anteriormente (recuadro azul). Las mutaciones incluyen deleciones (D) o mutaciones (M) de los sitios *olf-1* previamente identificados (recuadros rojos), proximales (M1/D1) o distales (M2/D2) para el sitio de inicio de transcripción putativo (TSS) del mRNA de *HCRT* (marcado con una flecha). La caja TATA está en recuadro negro mientras que el codón de inicio de la traducción está resaltado en amarillo.

En este estudio se empleó el vector de expresión pNifTy33-Lucia y se substituyó el promotor original ($INF-\beta$) de dicho vector por el promotor mínimo del gen *HCRT* murino para inducir la expresión del gen reportero de luciferasa, Empleando un modelo *in vitro* en líneas celulares (parentales y con sobre-expresión de *ebf2*) de distinto estirpe neuronal, se encontró que el promotor mínimo (*HCRT*) que contiene los dos sitios *olf-1*, permite la expresión del gen reportero a niveles por encima del promotor $INF-\beta$ y que al sobre-expresar el factor de transcripción *ebf2*, dicha expresión inducida por el promotor mínimo *HCRT* incrementa en niveles superiores. Demostrando que *ebf2* juega un papel importante en la regulación del promotor mínimo del gen *HCRT* sin embargo, el mecanismo es desconocido.

Pregunta de investigación

¿Qué papel desempeñan los sitios *olf-1* del promotor mínimo del gen *HCRT* en la regulación de su transcripción? ¿Son estas secuencias *olf-1* sitios diana para *ebf2*?

CAPÍTULO III: JUSTIFICACIÓN.

Las orexinas son neurotransmisores peptídicos derivados de una proteína precursora común denominada prepro-orexina (hcrt). El sistema de orexinas regula principalmente el ciclo de vigilia y sueño a través de interacciones con sistemas importantes en la regulación de las emociones, la recompensa y la homeóstasis energética. Se han propuesto diversos mecanismos para la regulación de los niveles de prepro-orexina. Sin embargo, la regulación de su biosíntesis no ha sido completamente esclarecida.

Por esta razón, en el presente estudio surge el interés de estudiar y comprender los elementos moleculares claves en la regulación de la expresión a nivel transcripcional del gen de prepro-orexina (*HCRT*), específicamente el papel que desempeñan los sitios *off-1* (dianas para factores de transcripción de la familia EBF) de la región promotora de este gen.

Dilucidar el mecanismo de biosíntesis de la prepro-orexina a nivel molecular permitirá una mejor comprensión de ésta en el desarrollo neuronal del sistema nervioso, para generar nuevas terapias dirigidas a dianas potenciales importantes en los trastornos relacionados con el sueño, la alimentación y las adicciones.

CAPÍTULO IV: HIPÓTESIS

Los sitios *olf-1* del promotor mínimo del gen *HCRT* participan en la regulación de su transcripción y son sitios diana para el factor de transcripción *ebf2*.

CAPÍTULO V: OBJETIVOS.

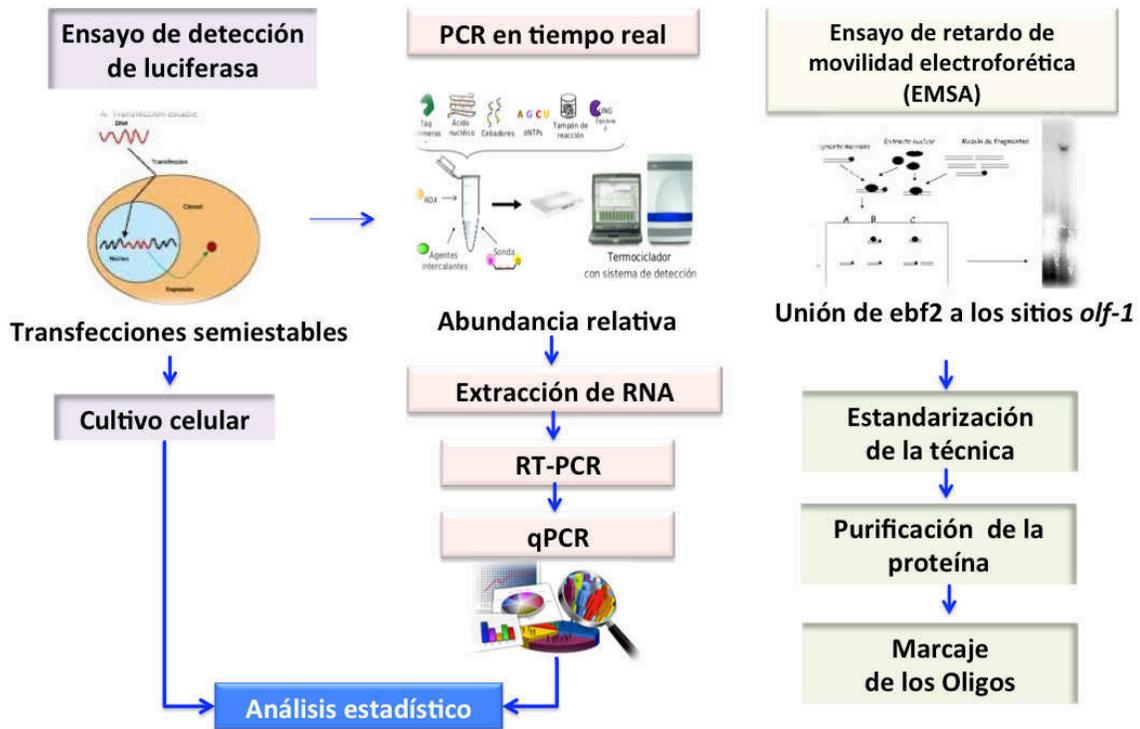
General.

Evaluar el papel de los elementos *olf-1* del promotor mínimo del gen de orexina (*HCRT*) en la regulación de su transcripción.

Particulares.

1. Evaluar la tasa de transcripción en mutantes con delección de los sitios *olf-1* del promotor del gen *HCRT* en distintas líneas celulares.
2. Determinar la unión de *ebf2* a los sitios *olf-1* de la región promotora del gen de la prepro-orexina (*HCRT*) en un modelo *in vitro*.

CAPÍTULO VI: ESTRATEGIA GENERAL.



6.1 Diseño de estudio.

Estudio experimental sobre la regulación transcripcional del gen *HCRT* murino, empleando líneas celulares de distinto estirpe mediante ensayos *in vitro*.

Para cada uno de los ensayos se utilizaron líneas celulares no neurales y neurales respectivamente: Células de Riñón de Embrión Humano (HEK-293) y Células de Glioblastoma de Rata (C6) sin la sobre-expresión de *ebf2* (parentales) y con la sobre-expresión de *ebf2* (HEK-293/*ebf2* y C6/*ebf2*) generadas a través de transducción lentiviral de la secuencia del cDNA de *ebf2* murino.

CAPÍTULO VII: MATERIALES.

7.1 Muestras

HEK-293 (ATCC CRL-1573, Manassas, VA, USA).

HEK-293/ebf2 (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

C6 (ATCC CCL-107, Manassas, VA, USA).

C6/ebf2 (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

Plásmidos

pNIFty-WT, pNIFty-D1, pNIFty-D2, pNIFty-M1, pNIFty-M2 (Invivogen, San Diego, CA, EUA).

7.2 Material.

Tubos eppendorf (0.4, 0.6, 1, 1.5 y 2 ml).

Tubos Falcon de 15 y 50 ml (Corning)

Placas de poliestireno, blancas y transparentes (Corning).

Placas de Petri (75 x 15 mm).

Criovales de 1 ml (Corning).

Puntas para micropipetas (1, 10, 200, 1000 ml).

Micropipetas de 10, 200, 1000 ml (BioRad).

Pipetas serológicas de 10, 5 y 1 ml (Costar).

Placas para tiempo real (96 pozos).

Columnas para PCR.

7.3 Reactivos.

Ensayo reportero de luciferasa.

Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Caisson Labs, North Logan, UT, EUA).

Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium, OptiMEM, Caisson Labs, North Logan, UT, EUA).

Suero fetal bovino (Corning, Manassas, VA, USA).

10000 U/mL de penicilina G, 10000 µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B.

Puromicina, 10 mg (10 x 1 ml), InvivoGen.

Zeocina, 100 mg (10 x 1 ml), InvivoGen.

Lipofectamine® Transfection Reagent (ThermoFisher scientific, Invitrogen).

Reactivo revelador de ensayo luminiscente QUANTI-Luc (Invivogen, San Diego, CA, USA).

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega).

PCR en tiempo real

RNA lader (Thermo Fisher Scientific).

Purezol RNA isolation Reagent (Bio-Rad)

Kit Go Taq Probe 2-Step RT-qPCR System (Promega).

RNeasy MinElute Cleanup kit 50 (Cat. No.74204).

EMSA

Oligos (Integrated DNA technologies, IDT).

Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Reagents (Thermo Scientific).

Quick Start™ Bradford (Bio-Rad).

kit LightShift® Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific).

Mini-PROTEAN® Precast Gels (Bio-Rad).

Poliacrilamida (Bio-Rad).

Tris-HCl (1.5N pH8.8).

Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega)

7.4 Equipos

Vórtex (Maxi Mix II, Thermolyne).

Balanza analítica.

Centrifuga en frío (4 ° C).

Microcentrifuga (Labnet).

Termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Fluorómetro (Glo-max Discovery, Promega).

LightCycler 480 Instrument II (Roche).

ChemiDoc XRS⁺ (Bio-Rad).

Trans-Blot SD Semi-Dry (Bio-Rad)

Cámara de electroforesis (Bio-Rad)

Las características de las sondas, primers y oligos utilizados se enlistan en las Tablas III y IV.

Tabla III. Características de los oligos utilizados.

Nombre	Cantidad (nmoles)	GC %	DNA (bases)	Secuencia
Promotor de orexina biotilado (sitio <i>olf-1</i> distal)	6.2	42.3	50	5'/BiodTGCCTCTTTTTGTGAACTTATTCCTGG GTGCAAGGTAACCTCATTAGTAC/BiodT/3'
Promotor de orexina no biotilado (sitio <i>olf-1</i> distal)	590.7	44	50	5'/GTACTAATGAGGTTACCTTGACCCAGGA ATCTAAGTTCACAAAAGAGGC/3'

Tabla IV. Sondas y primers utilizados.

Nombre	Inicio	Long.	Tm	GC%	Secuencia
Orx 1 (Sitio 1)	326	24	60.02	45.83	CCTCAGACTTCTTGGGTATTTGGA
	755	24	59.9	45.83	CACCTGCCAGGGATAAATTTCTTC
	589	20	59.96	55	/56-FAM/AACACAGATGCTGACAGGGG
Orx 2 (sitio 2)	368	25	60.45	48	CATCTCTCCAGATTACTTTCCCTG
	847	25	60.98	48	CCTTATCCTTGAAGCCAGGAATCTC
	589	20	59.96	55	/56-FAM/AACACAGATGCTGACAGGGG
Lucia B	825	25	60.98	48	GATTCCTGGCTTCAAGGATAAGGAG
	1011	25	61.38	48	GATTTGTCCACCCTACCCTGAATC
	917	20	59.89	50	/5HEX/TTGCCAATGTCCAGTGCTCT

CAPÍTULO VIII: MÉTODOS.

8.1 Cultivo celular.

Se cultivaron las líneas celulares HEK-293 (ATCC CRL-1573, Manassas, VA, USA), HEK-293/ebf2 (GenScript, Piscataway, NJ, USA), C6 (ATCC CCL-107, Manassas, VA, USA) y C6/ebf2 (GenScript, Piscataway, NJ, USA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor para los procedimientos de propagación, congelación, descongelación y subcultivo (Anexo A). Se mantuvieron las células en medio (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Caisson Labs, North Logan, UT, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Corning, Manassas, VA, USA), 10000 U/mL de penicilina G, 10000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂ usando placas de 72 cm² y manteniendo la confluencia hasta un máximo de 80% antes de realizar el subcultivo.

Se mantuvieron las células C6/ebf2 y las células HEK-293/ebf2, adicionalmente, en 0.5 µg/mL de puromicina (antibiótico de selección) para mantener la expresión del factor de transcripción de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

8.1.1 Transfección.

Se obtuvieron distintos constructos a partir de la definición del promotor mínimo del gen *HCRT* murino (390 pb, sitios *olf-1*) por Sánchez-García, A. y cols. (2016), sintetizado artificialmente y subclonado en el vector de expresión: pNiFty33-Lucia, el cual expresa un gen reportero de luciferasa.

El promotor original del vector de expresión pNiFty33-Lucia (INF- β) se eliminó y se sustituyó por el promotor previamente definido (HCRT-pNiFTy). De este promotor se obtuvo el constructo WT-pNiFTy que comprende la secuencia parental del promotor mínimo del gen *HCRT*. Dicha secuencia se modificó posteriormente con deleciones y mutaciones en los sitios *olf-1* (proximal y distal al TSS) ya antes mencionados. Al igual que con el constructo WT, la secuencia modificada se clonó inicialmente en el plásmido pIDTSMART y posteriormente se subclonó en el vector de expresión pNiFty33-Lucia, se ligaron ambos plásmidos y se obtuvieron los distintos constructos de mutantes por deleción y mutación puntuales en cada uno de los sitios *olf-1* (plásmidos): D1-pNiFTy, D2-pNiFTy, D1/D2-pNiFTy, M1-pNiFTy, M2-pNiFTy y M1/M2 pNiFTy.

Con todo lo anterior en el presente estudio se realizaron las transfecciones (Anexo B) utilizando el inserto de Lipofectamine® Transfection Reagent (ThermoFisher scientific, Invitrogen). Se sembraron las células en placas de 6 pozos un día antes de la transfección (500,000 células por pozo), para posteriormente transfectarlas con los distintos plásmidos (2.5 μ g), empleando como agente transfectante el reactivo Lipofectamina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Luego se realizaron los complejos de ADN-lipofectamina en medio libre de suero (Opti-MEM). Se establecieron ensayos de luminiscencia (Anexo C) empleando el reactivo QUANTI-Luc (Invivogen, San Diego, CA, EE.UU.) para posteriormente evaluar la señal de luciferasa emitida por el gen reportero 48h después de la transfección en el fluorómetro de placa Glo Max Discovery de Promega. Finalmente, las células se sometieron a selección durante cuatro semanas empleando el antibiótico zeocina (100 μ g/mL) para obtener las líneas celulares semiestables a partir de las transfecciones transitorias iniciales.

8.1.2 Ensayo reportero de luciferasa.

En una placa blanca de 96 pocillos se sembraron distintas concentraciones de células por quintuplicado (2×10^4 , 4×10^4 y 8×10^4 células por pozo) a distintos tiempos (48, 24 y 3 h) respectivamente. Se determinó una curva estándar para normalizar todas las señales de luminiscencia por el número de células presentes en cada pocillo. Posteriormente, se determinó el número de células viables (Anexo D) en cada pocillo usando el kit CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se repitió el ensayo por 4 semanas para evaluar la estabilidad de las transfecciones y obtener las líneas celulares semiestables sin variaciones en la expresión del gen reportero.

8.2 PCR en tiempo real.

8.2.1 Extracción de RNA.

Se lisaron y recolectaron las células semiestables previamente obtenidas de cultivos independientes (distintos pasajes) con una confluencia del 80%, para posteriormente extraer el mRNA mediante PureZOL™ RNA Isolation Reagent (Bio-Rad), se realizó la purificación de dicho mRNA por columna empleando el Kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen) (Anexo E), bajo las condiciones del proveedor. Una vez obtenido dicho RNA, se realizó su cuantificación y evaluación tanto de calidad como de pureza mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo scientific).

8.2.2 RT-PCR.

A partir de 1000 ng por muestra se obtuvo el cDNA mediante el estuche comercial GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR (Promega) bajo las especificaciones del fabricante (Anexo F) empleando los reactivos enlistados a continuación:

Tabla V. Desnaturalización de ARN y primers.

Componentes para una reacción	
	1X
RNA (1000 ng)	variable
Primers Oligo dT (0.5 µg/µL)	1 µL
Primers Random (0.5 µg/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	variable
	Volumen final = 7 µL

Tabla VI. Alineamiento de primers y síntesis de ADNc.

Componentes para una reacción	
	1X
Agua libre de nucleasas	4.9 µL
Buffer de Rx 5X (Go script)	4 µL
MgCl ₂	1.6 µL
Mix PCR- nucleótidos	1 µL
Inhibidor de ribonucleasa	0.5 µL
Transcriptasa inversa	1 µL
	Volumen final = 13 µL

Finalmente, se procedió a montar las reacciones en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) bajo las condiciones enlistadas en la Tabla VII:

Tabla VII. Condiciones de termociclado para la RT-PCR

Proceso	Temperatura	Tiempo
Alineamiento	25 °C	5 min.
Extensión	42°C	2 h
Inactivación de la transcriptasa inversa	70 ° C	15 min.

8.2.3 qPCR.

Reconstitución de sondas de hidrólisis y primers.

Se realizó de acuerdo al Prime Time qPCR Assay Resuspension Protocol atendiendo las recomendaciones y usando 250 μL de TE (1X) para obtener una concentración 40X.

La PCR cuantitativa (Anexo F) se realizó empleando el kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR (Promega) bajo las condiciones del proveedor empleando los reactivos que se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Componentes de reacción para la qPCR.

Componentes para una reacción	
	1X
Go taq qPCR 2X (Master mix)	5 μL
Primers/sonda	0.25 μL
Templado de cDNA	1 μL
Agua libre de nucleasas	3.75 μL
	Volumen final = 10 μL

Para el corrimiento del ensayo final se empleó el equipo LightCycler 480 Instrument II (Roche).

8.3 Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).

8.3.1 Elección de la concentración de los oligos previamente sintetizados.

Concentración de trabajo (Oligo biotinilado).

6.2 nanomoles en total del dúplex marcado → 6200 pM se diluyeron en 620 µL de agua estéril (10 pM). De la concentración final se realizaron diluciones: 1:10,000; 1:1000; 1:500 y 1:100.

Concentración de trabajo (Oligo no biotinilado).

590.7 nanomoles en total del dúplex no marcado → 590,700 pM se diluyeron en 590 µL de agua estéril (1000 pM), de esta última concentración se realizaron diluciones: 1:500 y 1:100.

8.3.2 Purificación de las proteínas.

Se realizó la extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas mediante el estuche comercial NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Reagents (Thermo Scientific), de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Anexo G) empleando los reactivos que se enlistan en la Tabla IX:

Tabla IX. Reactivos empleados para la purificación de proteínas.

Paquete celular (µL)	CER I (µL)	CERII (µL)	NER (µL)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1000	55	500

8.3.3 Cuantificación de proteínas.

Se realizó la cuantificación de proteínas (Anexo G) mediante el método de Bradford empleando un estándar de BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final de 1 mg/ml. Posteriormente se añadieron los volúmenes de los reactivos que se enlistan en la Tabla X dentro de una placa de 96 pozos. Posteriormente, se leyó la absorbancia de cada pozo a 595 nm en un lector de placas. Finalmente, se obtuvo una curva de calibración y en ella se interpoló cada una de las muestras problema para determinar su concentración.

Tabla X. Reactivos empleados para la cuantificación de proteínas.

Curva de calibración				
Estándares	Conc. Final (µg/mL)	Volúmen Estándar (µL)	Agua destilada (µL)	Reactivo B. (RB, µL)
C1	5	10	150	40
C2	10	20	140	40
C3	20	40	120	40
C4	30	60	100	40
C5	40	80	80	40
Blanco	-	-	160	40
Muestra (1 µL)	-	-	160	40
Volumen final	200 µL			

8.3.4 Ensayo final (EMSA).

Se montó el ensayo final (Anexo G) empleando el estuche LightShift® Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific) de acuerdo con las especificaciones del manual (# 20148), empleando los reactivos que se enlistan en la Tabla XI.

Tabla XI. Reactivos empleados para el EMSA.

Componente	Concentración final	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3
Agua ultrapura	-	-	variable	variable
10X Buffer de unión	1 X	-	2 µL	2 µL
Poly (dI*dC) 1µg/ µL	50 ng / µL	-	1 µL	1 µL
ADN sin marcaje	4 pmol	-	-	variable
Extracto nuclear (Ebf2)	Sistema dependiente	-	variable	variable
DNA marcado (biotina)	20 fmol	variable	variable	variable
Volúmen final	20 µL			

*Incubar las reacciones por 20 minutos.

Preparación de los geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se prepararon empleando los siguientes reactivos (Tabla XII):

Tabla XII. Reactivos empleados para los geles de poliacrilamida.

	Gel separador	Gel concentrador
Agua miliQ estéril	2.85 ml	2.25 ml
Poliacrilamida	2.33 ml	0.672 ml
Tris-HCl pH 8.8	1.75 ml	0.98 ml
Persulfato de amonio	56 µL	40 µL
TEMED	7 µL	7.9 µL

Electroforesis.

Se montó el sistema de electroforesis bajo las especificaciones indicadas por el manual de Mini-PROTEAN® Precast Gels (Bio-Rad), empleando como buffer de corrida TBE 1X. Se utilizó el colorante de detección para DNA (Gel red 10X) diluido en el buffer de carga Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega). Posteriormente, se corrió el gel a 100 V durante 100 minutos, para finalmente revelarlo por quimioluminiscencia mediante el equipo: ChemiDoc XRS⁺ (Bio-Rad).

*Previo a la electroforesis final, se realizó un ensayo de pre-corrída sin muestras durante 45 minutos.

*Para la electroforesis final se incluyeron las muestras de interés, el marcador de peso molecular (DNA Ladder de Promega) y los controles (positivo y negativo).

Transferencia del gel a una membrana de Nylon.

Se realizó la transferencia empleando la cámara de transferencia semiseca: Trans-Blot SD Semi-Dry (Bio-Rad), de acuerdo con las especificaciones del manual Trans-Blot® SD cell (#170-3940). Se utilizó como buffer de transferencia, TBE 1X. El voltaje de transferencia empleado fue el siguiente: 15 minutos a 10 V, 10 minutos a 15 V y 5 minutos a 20 V. Finalmente, se reveló el gel para comprobar la transferencia mediante el equipo ChemiDoc XRS⁺ (Bio-Rad).

Entrecruzamiento.

Se expuso la membrana a luz ultravioleta por 15 minutos para fijar el DNA a la membrana.

Revelado de la membrana.

Se realizó el revelado de la membrana (Anexo G) empleando el estuche comercial Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Scientific) bajo las condiciones del proveedor (# 89880), para la detección del DNA marcado con biotina mediante el equipo ChemiDoc XRS⁺ (Bio-Rad).

8.4 Análisis estadístico.

Para el ensayo de luciferasa, los resultados de la señal de luciferasa se reportaron como distribuciones de frecuencias basada en medianas y cuartiles para posteriormente evaluar con una ANOVA Hol-Sidak post-hoc con corrección de Bonferroni en el programa estadístico Sigmastat 3.5, considerando un valor de $p \leq 0.01$ como significativo.

Para la PCR en tiempo real, se realizaron curvas de eficiencia con diferentes concentraciones estándar de RNA por triplicado en 5 órdenes de magnitud (0.1-1000 ng) para cada una de las sondas utilizadas. Calculando la ecuación de la recta se determinó la eficiencia de cada una de ellas. Los resultados de expresión se analizaron por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) para determinar la subexpresión o la sobreexpresión respecto al gen endógeno de referencia.

CAPÍTULO IX: RESULTADOS

9.1 Ensayo reportero de luciferasa.

Antes de realizar el ensayo, se comprobó la sobreexpresión de *ebf2* en las líneas celulares transducidas por lentivirus con respecto a las líneas celulares parentales (C6 y HEK293). Para ello, se extrajo RNA y se realizó PCR en tiempo real empleando sondas de hidrólisis (*ebf2*) tanto para rata como para humano dependiendo de la línea celular y utilizando como gen endógeno GAPDH. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10. En ésta se presenta un gráfico de cajas donde se observa el número de copias del mRNA para *ebf2* (eje de las ordenadas) entre los dos tipos de líneas celulares (eje de las abscisas), resaltando el incremento en el número de copias para la células transducidas frente a las parentales ($p < 0.01$) comprobando de esta manera la presencia de *ebf2* en las células transducidas y su ausencia en la parentales tanto en células C6 como en HEK293 (Figura 10A y 10B).

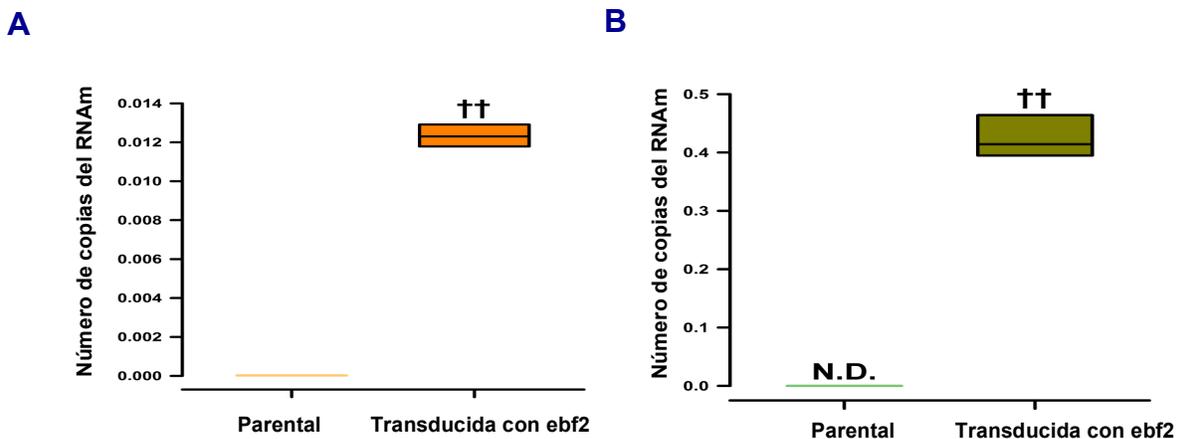


Figura 10. Expresión relativa del factor de transcripción *ebf2*.

Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de *ebf2* obtenidos mediante PCR en tiempo real y calculados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Figuras 10A y 10B). Las cajas oscuras muestran las líneas celulares transducidas con *ebf2* (mayor expresión) mientras que las cajas color claro pertenecen a las líneas celulares parentales (sin expresión) respectivamente. Las cajas color naranja pertenecen a la línea celular C6 (A) y las cajas color verde a la línea celular HEK293 (B). Diferencias significativas se representan como †† ($p < 0.01$).

Una vez comprobada la presencia y ausencia de *ebf2* en las líneas celulares transducidas y parentales respectivamente, se realizó el ensayo reportero de luciferasa, para el cual se emplearon las líneas celulares de distinta estirpe celular previamente establecidas, se realizaron transfecciones transitorias con los distintos derivados sintéticos del promotor mínimo del gen *HCRT* utilizando los siguientes plásmidos: Wt-pNIFty (secuencia silvestre del promotor), D1-pNIFty (secuencia mutada con delección del sitio *olf-1* proximal), D2-pNIFty (secuencia mutada con delección del sitio *olf-1*), M1-pNIFty (secuencia mutada por sustitución del sitio *olf-1* proximal) y M2-pNIFty (secuencia mutada por sustitución del sitio *olf-1* distal).

Inicialmente se comprobó la actividad del promotor mínimo del gen *HCRT* murino (WT-pNIFty) previamente definido por Sánchez García y cols., (2016) con respecto al promotor original de dicho vector de expresión (INF β -pNIFty). Posteriormente, la actividad de luciferasa generada por cada uno de los derivados sintéticos del promotor mínimo se evaluó por luminiscencia, en transfecciones transitorias (48 h después de la exposición a nanopartículas (lipofectamina) (Figura 11) y en líneas celulares semiestables, que fueron seleccionadas en presencia de puromicina y zeocina durante 4 semanas (Figura 12).

Las transfecciones transitorias (48 horas post-transfección) demuestran que la actividad del promotor mínimo del gen *HCRT* de secuencia silvestre es mayor ($p < 0.01$) que la actividad del promotor de INF β tanto en la línea celular C6 (Figura 11A) como en la línea HEK293 (Figura 11B). Además, en ambas líneas celulares, la sobreexpresión de *ebf2* incrementa la actividad de luciferasa dirigida por el promotor mínimo silvestre del gen *HCRT*. En la línea celular C6 portadora del promotor *HCRT* silvestre (WT) se observa que las células transducidas con *ebf2* incrementan la expresión de luciferasa 1.5 veces más de manera significativa ($p < 0.01$) versus las células parentales que no sobre-expresan *ebf2* (Figura 11A), este efecto es más evidente para la línea celular HEK293, donde la sobre-expresión de *ebf2* (HEK293/*ebf2*) incrementa la expresión de luciferasa 6 veces más ($p < 0.01$) respecto a las células HEK293 parentales sin *ebf2* (Figura 11B).

Al mutar el sitio *olf-1* proximal del promotor *HCRT*, tanto por delección (D1) como por mutación (M1) en la línea celular C6 (Figura 11A), y comparar el efecto de cada variante del promotor entre las células transducidas con *ebf2* y las células parentales, se observa que la expresión de luciferasa inducida por la variante D1 se incrementa 2.4 veces más ($p > 0.01$) en las células transducidas con *ebf2* versus las células parentales, no se observan diferencias significativas para la variante M1. Mientras que en la línea celular HEK293 (Figura 11B) la expresión de luciferasa inducida por la variante D1 se incrementa 12 veces más ($p < 0.01$), nuevamente en esta línea celular tampoco se observan diferencias significativas para el grupo M1.

Evaluando el efecto de cada variante (mutante D1, M1) del promotor *HCRT* con respecto al promotor silvestre en la línea celular C6/*ebf2* (Figura 11A) observamos que la expresión de luciferasa inducida por la variante D1 incrementa 6 veces más ($p < 0.01$) versus la expresión inducida por el promotor WT, la expresión de luciferasa inducida por la variante M1 se incrementa 4 veces más respecto al promotor WT ($p > 0.05$). Al evaluar este efecto en la línea celular HEK293/*ebf2* (Figura 11B) se observa un incremento mas notable en la expresión de luciferasa inducida por la variante D1 (11 veces más) y M1 (6 veces más) respecto al promotor WT, siendo solo significativo para la variante D1 ($p < 0.01$).

Por otra parte al mutar el sitio *olf-1* distal del promotor *HCRT*, tanto por delección (D2) como por mutación (M2) en la línea celular C6 (Figura 11A) y comparar el efecto de cada variante del promotor entre las células transducidas con *ebf2* y las células parentales se observa que hay una tendencia al incremento en la expresión de luciferasa inducida por cada una de las variantes sin embargo no hay diferencias significativas. Mientras que en la línea celular HEK293 observamos la misma tendencia sin diferencias significativas.

Evaluando el efecto de cada variante (mutante D2, M2) del promotor *HCRT* con respecto al promotor silvestre en la línea celular C6/*ebf2* (Figura 11A) observamos que la expresión de luciferasa inducida por la variante D2 disminuye versus la expresión inducida por el promotor WT sin embargo el efecto no es significativo.

La expresión inducida por la variante M2 no muestra cambios con respecto a la inducida por el promotor WT. Al evaluar este efecto en la línea celular HEK293/ebf2 (Figura 11B) se observa un decremento mas notable en la expresión de luciferasa inducida por la variante D2 (4 veces menos) respecto al promotor WT, para M1 no hay diferencias respecto al grupo WT.

Posterior a evaluar la señal de luciferasa 48h post-transfección, todas las líneas celulares (C6/ebf2 y HEK293/ebf2) previamente transfectadas con cada una de las variantes sintéticas del promotor mínimo *HCRT*, se sometieron a selección empleando el antibiótico zeocina durante cuatro semanas. Al término de la selección nuevamente se registraron los niveles de luciferasa emitida por el gen reportero mediante luminiscencia para evaluar la estabilidad de las transfecciones. Los resultados se muestran en la Figura 12, en esta se puede apreciar que en las líneas celulares C6/ebf2 (Figura 12A) transfectadas con cada una de las variantes del promotor, existen diferencias en la expresión de luciferasa con respecto al promotor silvestre (WT). Resaltando que al mutar el sitio *olf-1* proximal, la expresión de luciferasa inducida por las variantes D1 y M1 incrementa de manera significativa ($p < 0.01$) versus la expresión inducida por el promotor WT (6 y 4 veces más, respectivamente), mientras que en la línea celular HEK293/ebf2 (Figura 12B) la expresión de luciferasa inducida por las mismas variantes incrementa de manera más evidente ($p < 0.01$) versus la expresión inducida por el promotor WT (11 y 6 veces más, respectivamente).

Al mutar el sitio *olf-1* distal, en la línea celular C6/ebf2, la expresión de luciferasa inducida por las variantes D2 y M2 no difiere ($p > 0.05$) versus la expresión inducida por el promotor WT, mientras que en la línea celular HEK293/ebf2 (Figura 12B) la expresión inducida por la variante D2 se disminuye (4 veces menos) con respecto a la expresión del grupo WT, la expresión inducida por la variante M2 también disminuye (3 veces menos) versus la expresión inducida por el promotor WT.

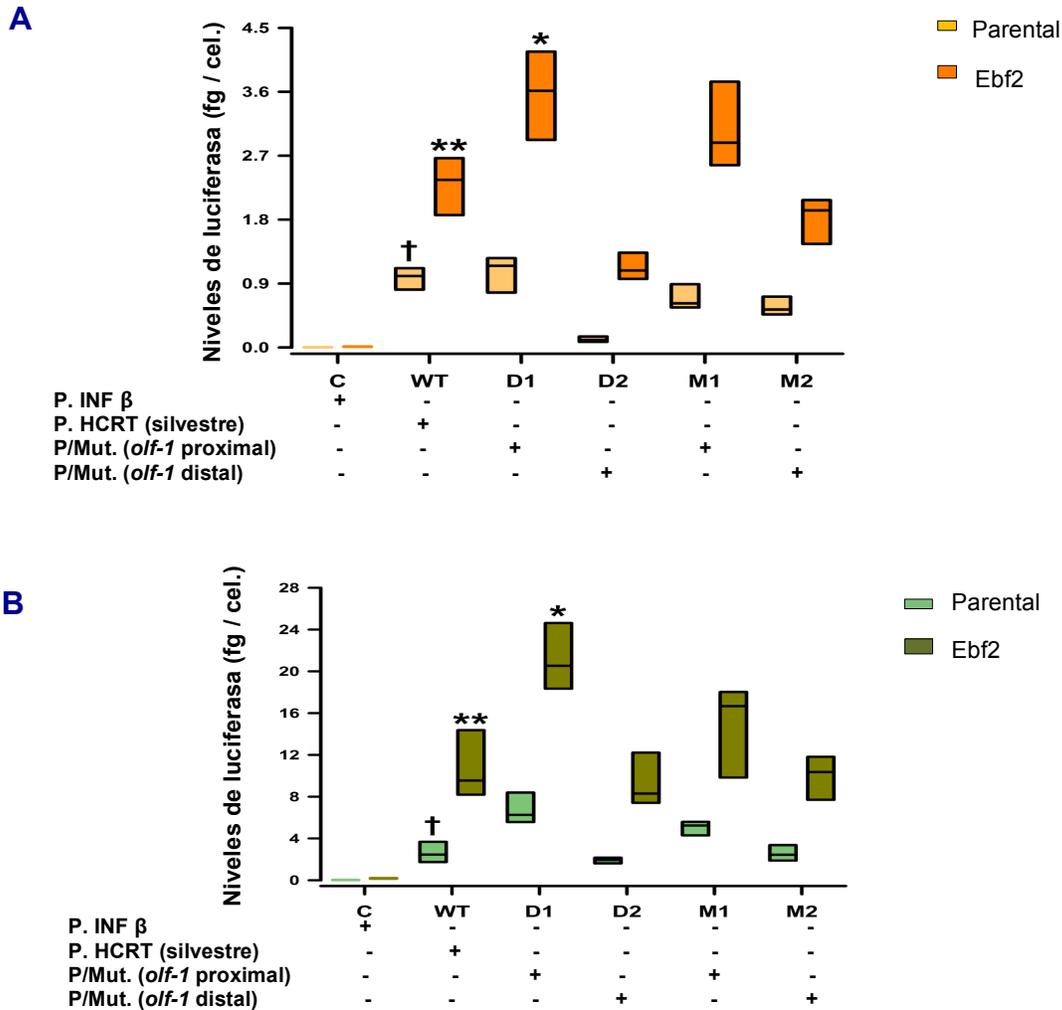


Figura 11. Expresión del gen reportero de luciferasa inducida por los diferentes derivados sintéticos del promotor del gen *HCRT* murino después de 48h.

Gráficos de los niveles de luciferasa obtenidos por la señal del gen reportero emitida, mediante el ensayo reportero de luciferasa a las 48 h. Se realizaron transfecciones transitorias mediante lipofectamina en las líneas celulares C6 (color naranja, A) y HEK293 (color verde, B) empleando distintos plásmidos (2.5 μ g), portadores de diferentes promotores para inducir la expresión del gen reportero (*Lucia*): INF β (C); HCRT (WT); y derivados sintéticos del promotor HCRT (D1, M1, D2 Y M2), los últimos obtenidos por mutaciones y deleciones en los sitios *olf-1* proximal y distal respectivamente. La presencia o ausencia de cada uno de los promotores en las diferentes líneas celulares se representan con los signos (+ / -). Las líneas celulares parentales (cajas de color claro, A y B) muestran bajos niveles de expresión de luciferasa respecto a las que sobre-expresan *ebf2* que muestran altos niveles de expresión (cajas de color oscuro, A y B). Diferencias significativas ($p < 0.01$), donde el signo † = expresión, ** = WT/*ebf2* vs C/*ebf2* y * = Wt-*ebf2* vs D1/*ebf2*.

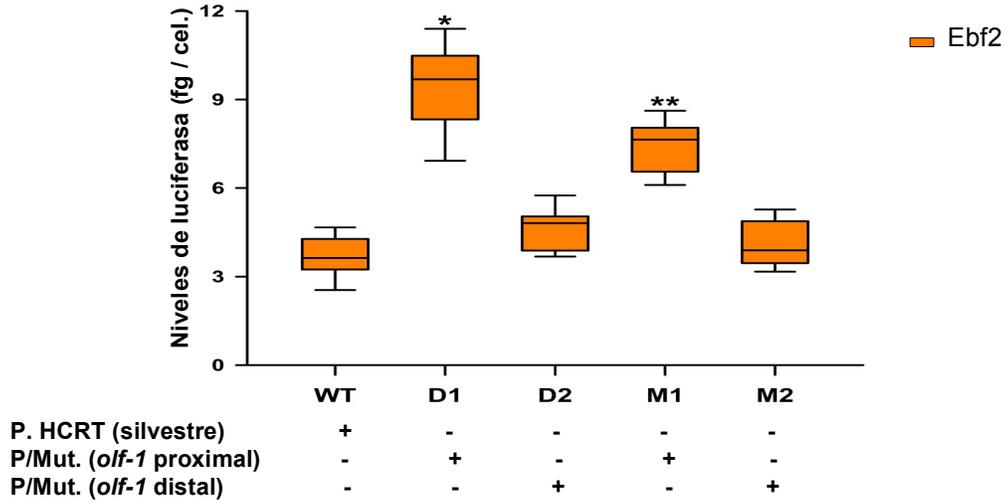
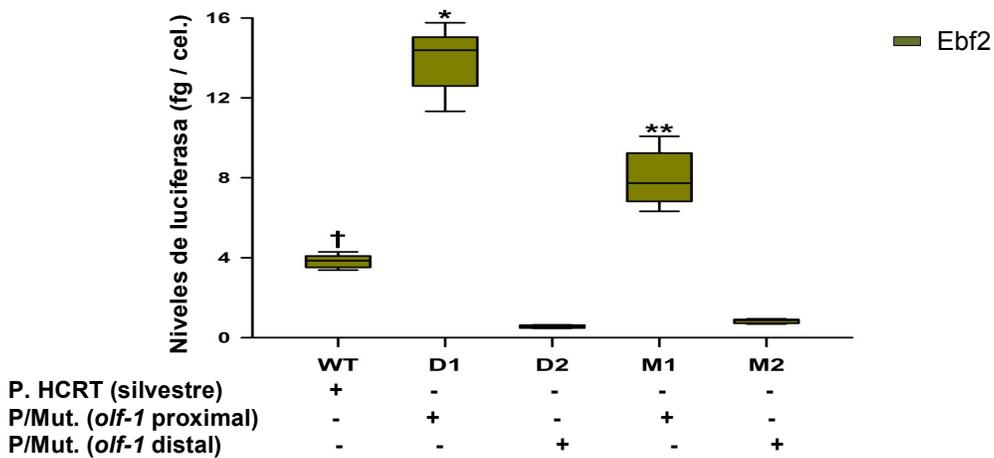
A**B**

Figura 12. Expresión del gen reportero de luciferasa inducida por los diferentes derivados sintéticos del promotor del gen *HCRT* murino después de 4 semanas.

Representación gráfica de los niveles de luciferasa obtenidos por la señal del gen reportero emitida, mediante el ensayo reportero de luciferasa a las 4 semanas para evaluar la estabilidad de la transfección transitoria inicial. Las líneas celulares que sobre-expresan *ebf2* (C6/*ebf2* y HE293/*ebf2*) transfectadas transitoriamente, fueron sometidas a selección mediante el antibiótico Zeocina (100 mg/mL) por cuatro semanas. Las células C6/*ebf2* (cajas naranjas, A) y HEK293/*ebf2* (cajas verdes, B) muestran la expresión de luciferasa inducida por los diferentes derivados de la secuencia promotora del gen *HCRT*, indicando la presencia (+) y la ausencia (-) de cada uno de ellos. Diferencias significativas ($p < 0.01$), donde el signo † = Wt vs M1 y M2, ** = Wt vs M1 y * = WT vs D1.

9.2 PCR en tiempo real.

9.2.1 Extracción de RNA.

Después de obtener las transfecciones semiestables de cada línea celular y comprobar la inserción del gen reportero al genoma de las células mediante el ensayo reportero de luciferasa, se realizó la extracción de RNA a partir de 3 cultivos independientes empleando el reactivo Purezol y su purificación mediante columna. En las Tablas XIII (C6/ebf2) y XIV (HEK293/ebf2) se muestran las concentraciones y las proporciones 260/280 obtenidas, para evaluar la calidad y la pureza de cada una de las muestras representativas, observando que cada una de ellas cumple con los parámetros de calidad establecidos ($260/280 = 1.8 - 2.2$) para poder ser utilizadas en la qPCR.

Tabla XIII. Parámetros de calidad del RNA en la línea celular C6/ebf2.

Muestra	Concentración (ng / μl)	260/280
pNiFty-WT	379.8	2.10
pNiFty-D1	311.1	2.10
pNiFty-D2	240	2.12
pNiFty-M1	437	2.08
pNiFty-M2	397.9	2.09

Tabla XIV. Parámetros de calidad del RNA en la línea celular HEK293/ebf2.

Muestra	Concentración (ng / μl)	260/280
pNiFty-WT	738.6	2.11
pNiFty-D1	803.8	2.09
pNiFty-D2	348.4	2.11
pNiFty-M1	617.9	2.1
pNiFty-M2	564.9	2.02

En la Figura 13, se muestra un gel de agarosa representativo (2%) para evaluar la integridad del RNA, observando que cada una de las muestras (carriles 1 - 6) presentan las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales (18s y 28S) características del ARN íntegro.

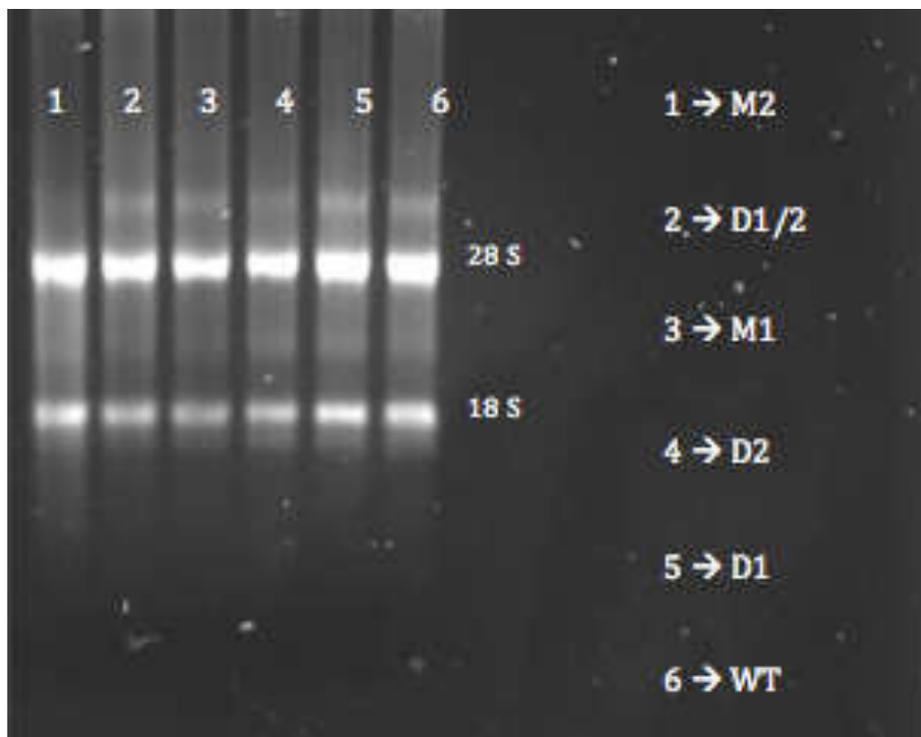


Figura 13. Gel de agarosa (2%).

Gel de agarosa al 2% (TBE 1X y SYBR Safe, voltaje de corrida = 100V / 60 minutos), donde se representa el RNA obtenido a partir de las líneas celulares C6/ebf2 ($\approx 20 \times 10^6$ células) transfectadas con los distintos derivados sintéticos del promotor del gen *HCRT* murino (D1, D2, M1, M2 y WT), mediante el reactivo PureZOL RNA isolation. Cada carril (1 - 6) representa los distintos RNAs obtenidos, en estos se pueden apreciar las subunidades ribosomales (18S y 28S), mostrando la integridad de cada uno de ellos.

9.2.2 RT-PCR.

Ya que se comprobaron los parámetros de calidad, concentración, pureza e integridad del ARN de cada una de las muestras, posteriormente se realizó su retro-transcripción mediante el Kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR (Promega) bajo las condiciones del proveedor para obtener el DNA complementario que luego sería utilizado en la qPCR.

9.2.3 qPCR.

Para el diseño de primers y sondas específicas, se tomó en cuenta la siguiente ilustración representativa del promotor mínimo (*HCRT* WT) previamente definido por Sánchez García y cols, (2016) como referencia para calcular la expresión del mRNA (luciferasa) de cada una de las líneas celulares transfectadas con los distintos derivados sintéticos (D1, M1, D2 y M2) del promotor del gen *HCRT* murino. En la Figura 14, se representan los sitios de inicio de la transcripción en la región promotora, tanto el sitio de inicio original (+1→) como el sitio de inicio presuntivo (+46→?), este último propuesto de acuerdo a las mutaciones y deleciones realizadas anteriormente en los sitios *olf-1* proximal y distal de la región promotora, para producir los distintos derivados sintéticos de dicha región. Es importante resaltar que ambos sitios de inicio de la transcripción se localizan cerca de la caja TATA y comprenden la misma secuencia de bases (CACTGAAGA).

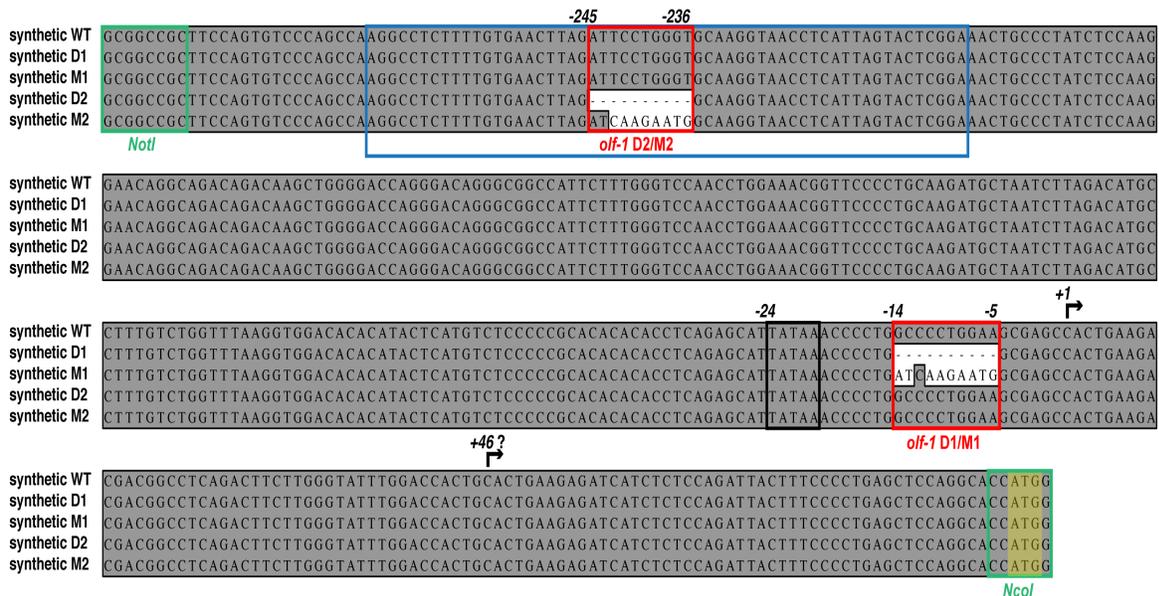
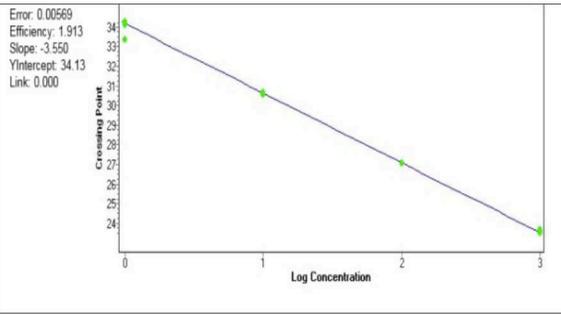
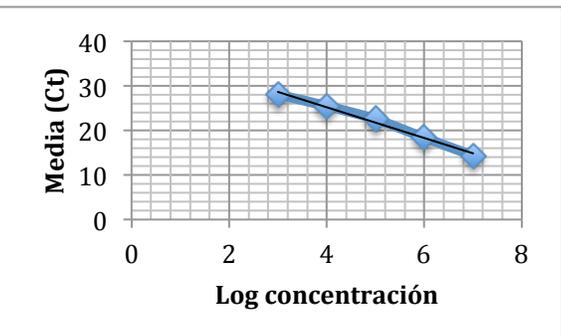
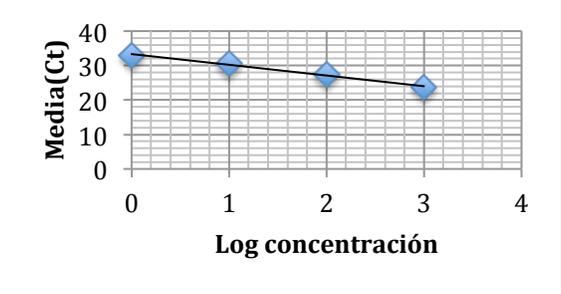


Figura 14. Derivados sintéticos del promotor del gen *HCRT* murino.

Región promotora del gen *HCRT* murino que abarca 390 pb (WT) río arriba del sitio del codón de inicio de la traducción (recuadro verde, sombreado amarillo) y sus respectivos derivados sintéticos (D1, M1, D2 y M2). Resaltando las deleciones y mutaciones en los sitios *olf-1* proximal y distal (recuadros rojos) a dicho codón de inicio así como los sitios de inicio de la transcripción (flechas negras) cercanos a la caja TATA (recuadro negro).

Posteriormente se diseñaron las sondas y primers específicos marcados con distintos fluoróforos mediante el programa MacVector para calcular la expresión relativa del mRNA que codifica para la luciferasa secretada (*Lucia*) en cada una de las muestras, empleando dos sondas para calcular la expresión (sitios 1 y 2) y una sonda como control (Luciferasa B), se utilizó como gen endógeno *GAPDH* para normalizar los niveles de expresión. En la Tabla XV se muestran las curvas de eficiencia calculadas para las distintas sondas, resaltando que todas ellas se encuentran dentro del rango de eficiencias requerido para la qPCR (87% – 100%).

Tabla XV. Curvas de eficiencias para las sondas de estudio.

Orx sitio 1		<p>E = 91.28% m = -3.550</p>
Orx sitio 2		<p>E = 95% m = -3.449</p>
Lucia B (control)		<p>E = 94.6% m = -3.458</p>

Para comprobar la funcionalidad de las sondas en las líneas celulares de estudio bajo las condiciones previamente descritas en la metodología, en la Figura 15 se ilustran dos curvas de amplificación representativas correspondientes a las líneas celulares C6/ebf2 y HEK293/ebf2 respectivamente, comprobando de esta manera su funcionalidad con un promedio de ciclos de amplificación igual a 20 en ambas líneas celulares.

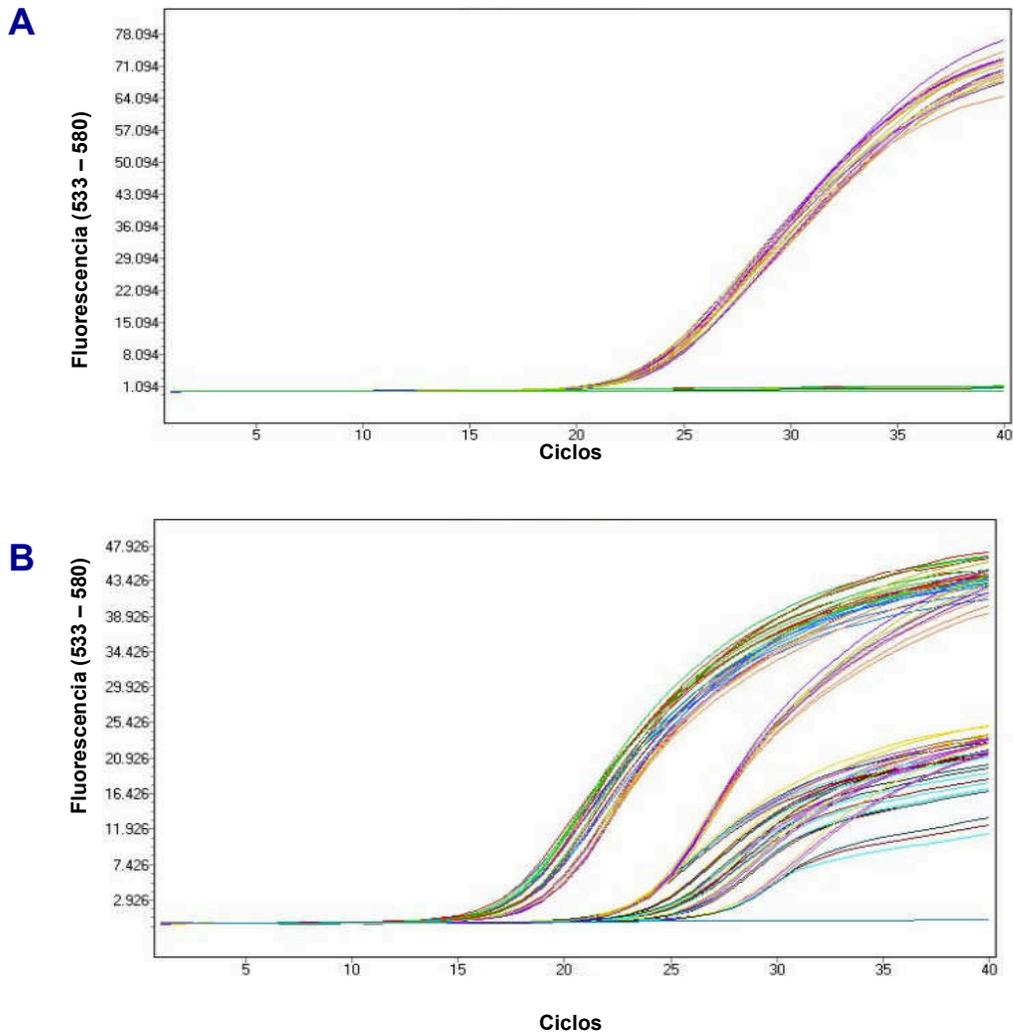


Figura 15. Curvas de amplificación en las líneas celulares de estudio.

Curvas de amplificación representativas para las líneas celulares C6/ebf2 (A) y HEK293/ebf2 (B), obtenidas por PCR en tiempo real a partir de 1000 ng de cDNA mediante el Kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR (Promega) empleando sondas de hidrólisis (IDT, 40X) marcadas con los fluoróforos FAM y HEX.

Para la cuantificación relativa del mRNA (luciferasa) a partir de los dos sitios de inicio de la transcripción (previamente descritos) en cada una de las líneas celulares transducidas con *ebf2* y transfectadas con las distintas variantes sintéticas del promotor mínimo *HCRT* murino se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados obtenidos se detallan en las Figuras 16 y 17, donde se aprecia el número de copias del mRNA (expresión relativa) entre los diferentes grupos en cada una de las líneas celulares. La Figura 16, muestra el efecto en la línea celular C6/*ebf2*, resaltando que al mutar el sitio *olf-1* proximal, hay un incremento significativo ($p < 0.01$) en el número de copias de las variantes D1 (5 veces más) y M1 (3 veces más) con respecto al número de copias del grupo WT (silvestre). Mientras que en la línea celular HEK293/*ebf2* (Figura 17) el incremento en el número de copias para dichas variantes (D1 y M1) es de 10 veces más y 5 veces más respectivamente. En la línea celular C6/*ebf2* (Figura 16) no se muestran diferencias en el número de copias de los grupos D2 y M2 (mutaciones en el sitio *olf-1* distal) versus el grupo WT, mientras que en la línea celular HEK293/*ebf2* (Figura 17), la variante D2 disminuye el número de copias (3 veces menos) con respecto al grupo WT. No se muestran diferencias del grupo M2 con respecto al grupo WT. La expresión relativa evaluada a partir de los dos sitios de inicio de la transcripción: original (Figuras, 16A y 17A) y presuntivo (Figuras, 16B y 17B) es semejante, observándose el mismo efecto a partir de ambos sitios.

Posterior a evaluar la expresión relativa inducida por las variantes sintéticas del promotor a partir de los dos sitios de inicio de la transcripción, a continuación se determinó la proporción de relación entre los dos sitios de inicio ($3'/5'$, presuntivo respecto al original). La Figura 18 muestra los resultados de dicha relación para cada una de las líneas celulares, donde en la línea celular C6/*ebf2* (Figura 18A) la proporción de relación en todos los grupos (variantes del promotor) es igual a 1, indicando que no hay cambios en el sitio de inicio de la transcripción. Mientras que en la línea celular correspondiente a HEK293/*ebf2* si se observa un cambio significativo ($p < 0.01$) en el sitio de inicio de la transcripción para la variante del promotor D2, (proporción $3'/5' = 2$). En el resto de los grupos no se observan cambios (Figura 18B).

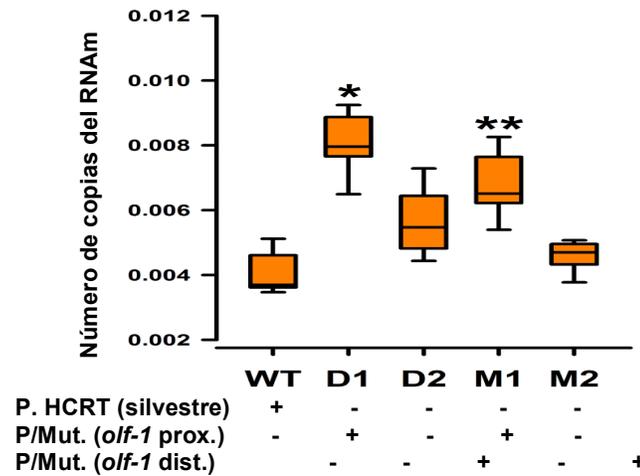
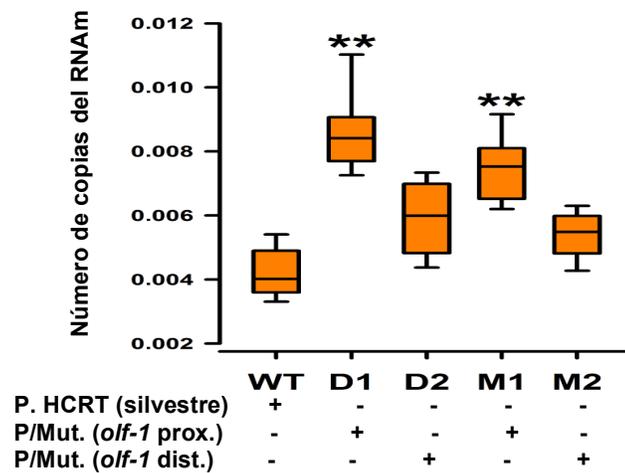
A**B**

Figura 16. Expresión relativa inducida por los distintos derivados sintéticos del promotor del gen *HCRT* murino en la línea celular C6/ebf2.

Representación gráfica de la expresión relativa del gen reportero (*Lucia*) calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los niveles de expresión se obtuvieron mediante qPCR empleado las sondas de hidrólisis 40X (Orx sitio 1, Orx sitio 2 y Lucia B) marcadas con los fluoróforos FAM y HEX, como gen endógeno se utilizó GAPDH (40X), el ensayo se realizó utilizando el Kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR (Promega) a partir de 1000 ng de cDNA. Las cajas color naranja representan el número de copias determinado por la presencia (+) o ausencia (-) de los diferentes derivados sintéticos del promotor a partir de los dos sitios de inicio de la transcripción: sitio 1 original (16A) y sitio 2 presuntivo (16B). Donde las diferencias significativas se representan: $p < 0.01$, * y **.

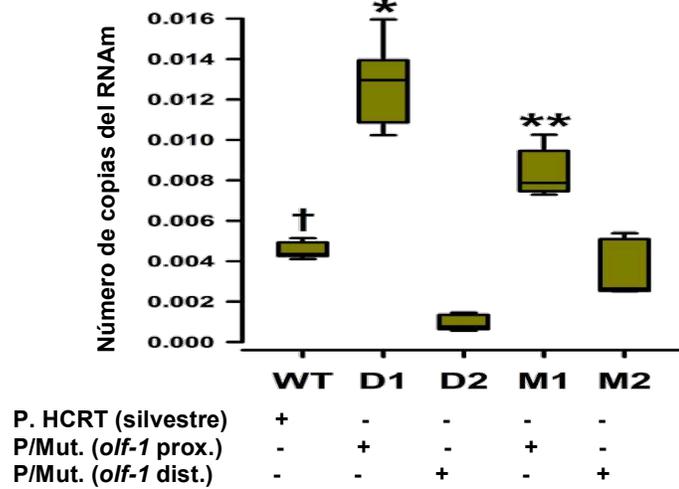
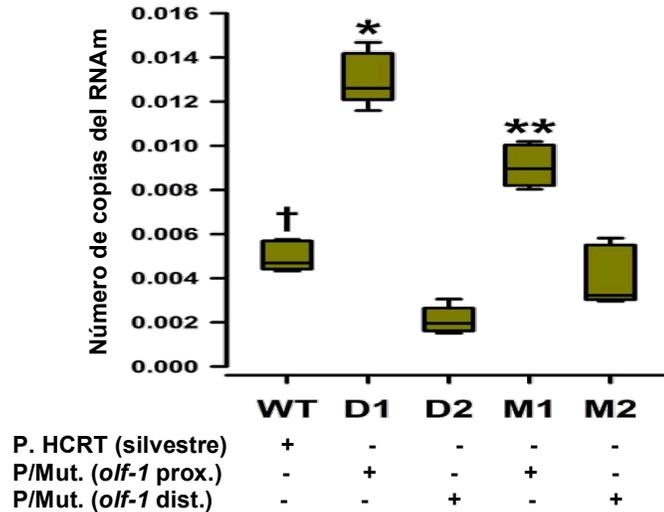
A**B**

Figura 17. Expresión relativa inducida por los distintos derivados sintéticos del promotor *HCRT* murino en la línea celular HEK293/ebf2.

Representación gráfica de la expresión relativa del gen reportero (*Lucia*) calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los niveles de expresión se obtuvieron mediante qPCR empleado las sondas de hidrólisis 40X (Orx sitio 1, Orx sitio 2 y Lucia B) marcadas con los fluoróforos FAM y HEX, como gen endógeno se utilizó *GAPDH* (40X), el ensayo se realizó utilizando el Kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR (Promega) a partir de 1000 ng de cDNA. Las cajas color verde representan el número de copias determinado por la presencia (+) o ausencia (-) de los diferentes derivados sintéticos del promotor a partir de los dos sitios de inicio de la transcripción: sitio 1 original (17A) y sitio 2 presuntivo (17B). Donde las diferencias significativas se representan: $p < 0.01$ (* y **).

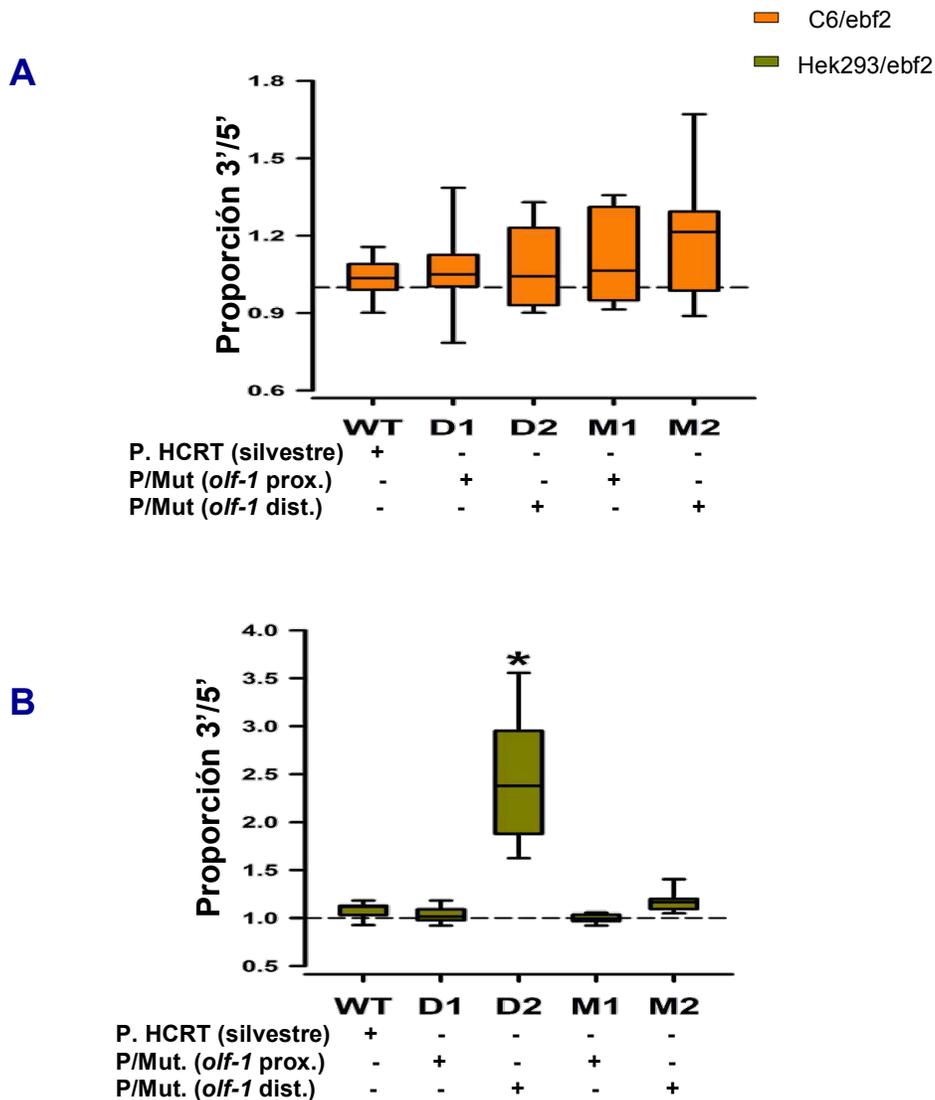


Figura 18. Proporción de relación entre el sitio de inicio de la transcripción presuntivo respecto al original.

Gráficos representativos de las proporciones de relación entre la expresión del sitio de inicio de la transcripción presuntivo (3') y la expresión del sitio original (5'). Lo anterior se calculó a partir de los niveles de expresión del gen reportero obtenidos para ambos sitios mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en el ensayo de qPCR. Las cajas color naranja (18A) representan las proporciones de relación entre un sitio y otro en la línea celular C6/ebf2 y las cajas color verde (18B) representan las proporciones de relación para la línea celular HEK293/ebf2. Cada una de las proporciones se determinó por la expresión inducida en presencia (+) o ausencia (-) de los diferentes derivados sintéticos del promotor del gen *HCRT* murino respecto al promotor original (eje de las abscisas). Diferencias significativas (*, ** $p < 0.01$).

9.3 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

El EMSA se realizó para comprobar la unión de *ebf2* a cualquiera de los dos sitios *olf-1* proximal y distal con respecto al sitio del codón de inicio de la traducción. Para ello se realizó primero la estandarización de la técnica bajo las condiciones previamente mencionadas en la metodología. Al realizar la extracción de proteínas nucleares (*ebf2*) y parentales (sin *ebf2*) de cada una de las líneas celulares empleadas (C6 y HEK293) mediante el Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic (Promega), se determinaron las concentraciones de las proteínas presentes en cada línea celular haciendo uso de la ecuación de la recta, ésta obtenida en la curva de calibración Bradford que se muestra en la Figura 19, en la cual se observan los siguientes valores: una pendiente igual a 0.0187, una ordenada al origen igual a 0.4294 y un coeficiente de correlación cercano a 1 (0.99157). Las concentraciones calculadas a partir de dicha curva de calibración fueron de 2.09 ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$) para la línea celular C6/*ebf2* y 2.52 para la línea celular HEK293/*ebf2*.

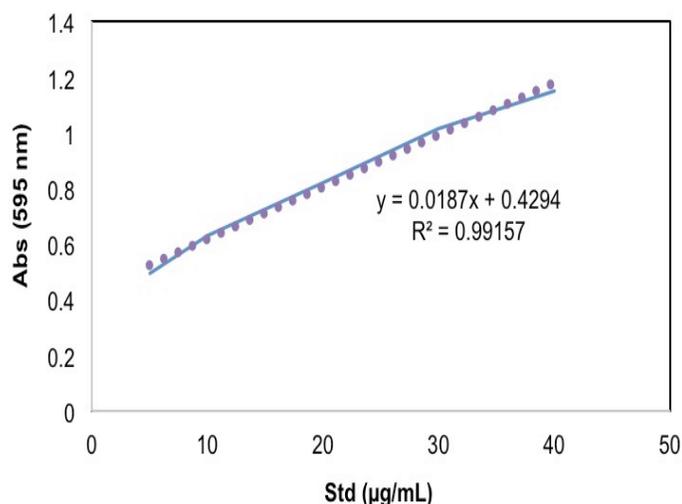


Figura 19. Curva de calibración Bradford.

Representación gráfica de la curva de calibración obtenida mediante el método Bradford para la cuantificación de proteínas. Indicando las absorbancias (eje de las ordenadas) y las concentraciones de distintos estándares de albúmina (1 mg/mL) en el eje de las abscisas. Resaltando la ecuación de la recta como $y = 0.0187x + 0.4294$.

Se sintetizaron oligos dúplex de 50 pb marcados con biotina y sin marcar (controles) mediante el programa MacVector, diseñados para la secuencia del sitio *olf-1* distal debido a los resultados observados en los ensayos anteriores, las características de estos se enlistan en la sección de materiales. La síntesis de dichos oligos se realizó para evaluar la unión de *ebf2* a dichos oligos, Para comprobar el tamaño de dichos oligos y su integridad, se realizó un gel de poliacrilamida al 10% (Figura 20), resaltando las bandas correspondientes al tamaño de 50 pb con respecto al marcador de peso molecular.

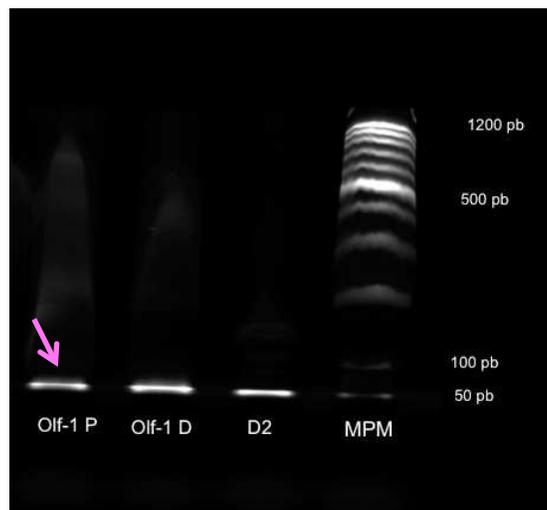


Figura 20. Gel de poliacrilamida (10%).

Gel de poliacrilamida al 10% (Tris-HCl pH 8.8, persulfato de amonio 1X, TEMED, GelRed 10X, Blue/orange 6X, electroforesis en buffer TBE 1X a 100V / 100 minutos). Representación del tamaño e integridad de los oligos: *olf-1* P (WT); *olf-1* D (WT) y *olf-1* (D2), marcados con biotina y D2 sin marcar (control), así como el marcador de peso molecular (MPM, 100bp DNA Ladder) indicando con una flecha color rosa las bandas representativas correspondientes a 50 pb.

Posteriormente, se determinó la concentración de trabajo adecuada para cada uno de los oligos previamente descritos con respecto a las condiciones requeridas. Para ello se realizaron distintas diluciones a partir de las concentraciones originales de los oligos (marcado, 10 pmol / μ L y sin marcar, 1000 pmol / μ L). Con el fin de escoger la concentración necesaria para comprobar la funcionalidad de los oligos marcados con biotina, se realizó un EMSA bajo las condiciones ya descritas en la metodología.

Determinando que la concentración mínima requerida para la detección de biotina mediante quimioluminiscencia fue de 0.02 pmol / μ L (Figura 21) que corresponde a la dilución 1:500, mientras que la concentración mínima requerida de oligo sin marcar fue de 2 pmol / μ L (1:500).

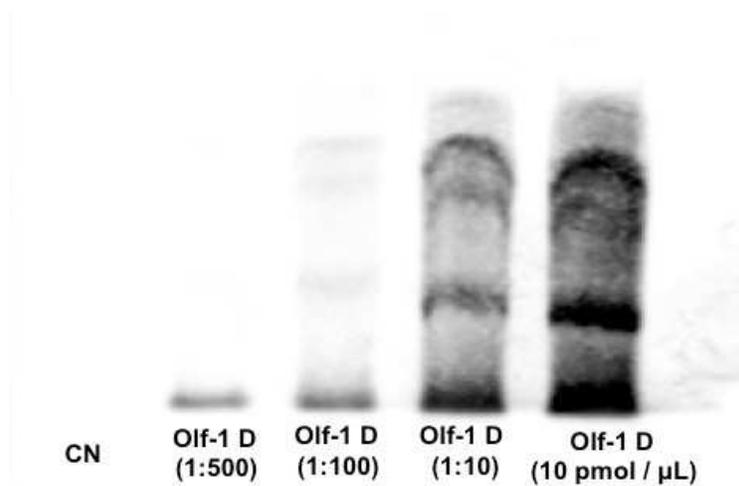


Figura 21. Curva de concentraciones para el oligo *olf-1* distal marcado con biotina.

Ensayo de retardo de movilidad electroforética representativo: gel nativo de poliacrilamida al 10%; electroforesis en buffer TBE 1X a 100V / 100 minutos; reacciones de EMSA (LightShift EMSA Optimization); transferencia del gel a una membrana Zeta-Probe Blotting; fijación del DNA por luz UV; y revelado (kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection), para la determinación de la concentración mínima óptima en la detección de biotina mediante quimioluminiscencia. Los carriles corresponden a la señal detectada en cada una de las diluciones realizadas (1:10, 1:100 y 1:500) a partir de la concentración original del oligo distal (*olf-1 D*) marcado con biotina (10 pM / μ L), así como la ausencia de dicha señal en el control negativo (oligo sin marcar, *olf-1 D2*).

Para los EMSA finales, una vez estandarizadas las condiciones de trabajo de acuerdo al manual del Kit LightShift Chemiluminescent EMSA, se llevaron a cabo todas las reacciones necesarias en cada una de las líneas celulares previamente utilizadas, la reacción positiva (control positivo) se basó únicamente en el uso de oligo marcado con biotina, la reacción de unión (Shift) se enfocó en el uso de oligo marcado con biotina + extracto nuclear (ebf2), la reacción de competencia consistió en el uso de oligo marcado con biotina + extracto nuclear + el exceso (200 veces más) de oligo sin marcar, así como el control negativo (oligo marcado con biotina + extracto nuclear sin ebf2).

Los resultados obtenidos al emplear el oligo marcado con biotina correspondiente a las secuencia *olf-1* distal y comprobar su interacción con ebf2 tanto en la línea celular C6/ebf2 como en la línea celular HEK293/ebf2 se muestran en la Figura 22A y 22B respectivamente.

En la Figura 22A se pueden observar los carriles correspondientes a las reacciones mencionadas anteriormente para la línea celular C6/ebf2, resaltando el retraso del oligo (migración) y la aparición de una banda extra en la reacción de unión (carril 2) con respecto al control positivo (carril 1), indicando la interacción entre el oligo marcado con biotina y el extracto nuclear (ebf2), mientras que en la reacción de competencia (carril 3) se observa la desaparición de dicha banda debido al exceso de oligo sin marcar.

En la Figura 22B se observan los carriles correspondientes a las reacciones para la línea celular HEK293/ebf2 donde se aprecia que en la reacción de unión (carril 2) hay retraso y aparición de una banda extra con respecto al control positivo (carril 4) indicando la interacción del oligo y ebf2, en la reacción de competencia (carril 3) se observa la desaparición de dicha banda (exceso de oligo sin marcar) y en el carril 1 se muestra el control negativo que indica la interacción del oligo marcado con biotina y el extracto nuclear sin ebf2 encontrando ausencia de bandas, pues no hay detección de la señal de biotina.

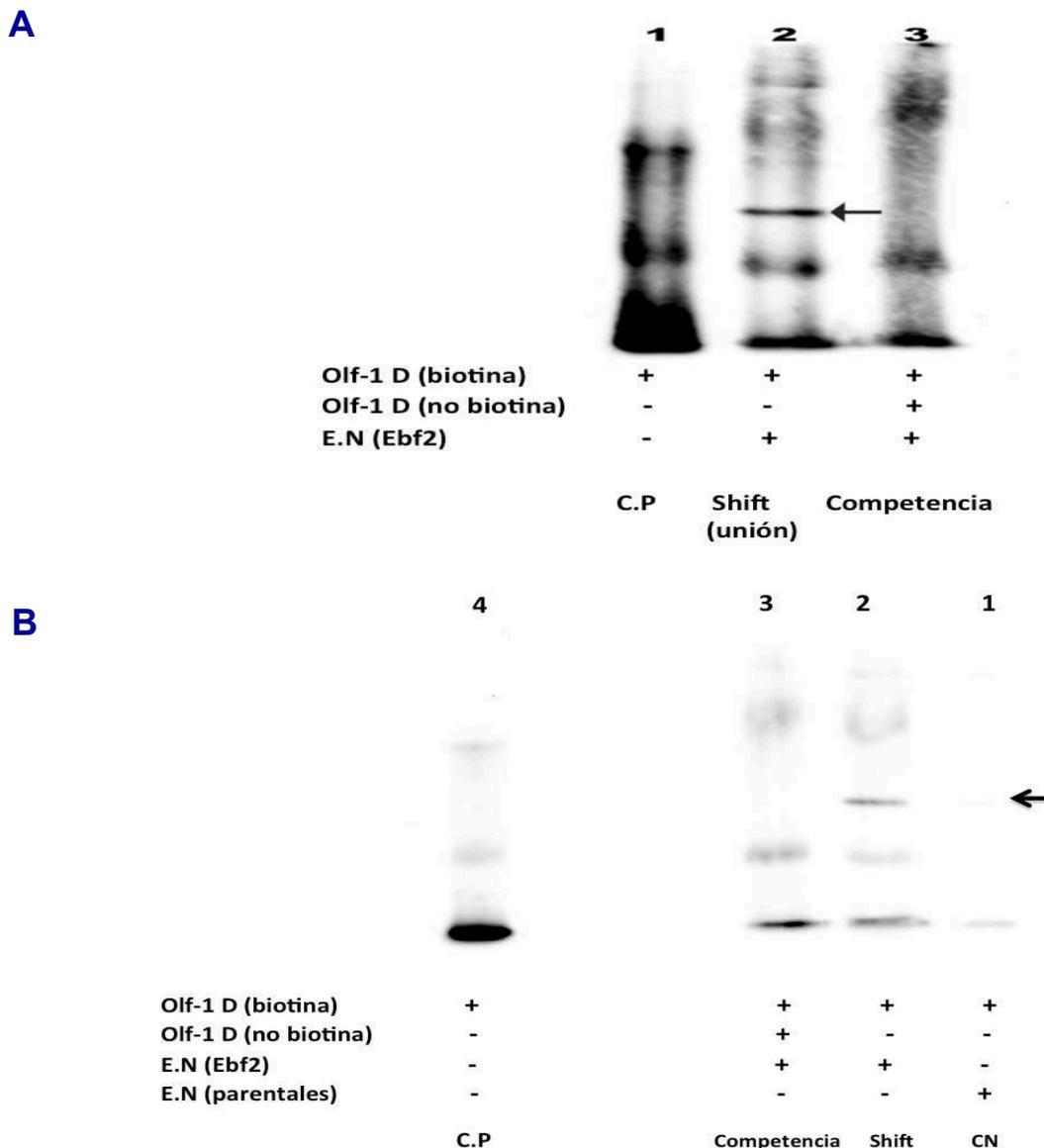


Figura 22. EMSA representativo de la interacción del factor de transcripción *ebf2* con el sitio *olf-1* distal en las líneas celulares C6/*ebf2* y HEK293/*ebf2*.

Ensayo de retardo de movilidad electroforética representativo: gel nativo de poliacrilamida al 10%; electroforesis en buffer TBE 1X a 100V / 100 minutos; reacciones de EMSA (LightShift EMSA Optimization); transferencia del gel a una membrana Zeta-Probe Blotting; fijación del DNA por luz UV; y revelado (kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection), para la detección de la interacción entre *ebf2* y el sitio *olf-1* distal mediante quimioluminiscencia. Los carriles muestran la señal de biotina detectada en cada una de las reacciones empleadas por la presencia (+) o ausencia (-) de: oligo biotinilado (*olf-1* D, 100 nM); oligo sin marcaje (*olf-1* D no biot, 20 000 nM) y extracto nuclear (*ebf2* y parental, 5-6 µg). Resaltando con una flecha la banda que indica la interacción entre el factor de transcripción *ebf2* y el oligo *olf-1* distal tanto en la línea celular C6/*ebf2* (Figura A) como en la HEK293/*ebf2* (Figura B).

CAPÍTULO X: DISCUSIÓN.

Las orexinas son neurotransmisores peptídicos derivados de la proteína precursora prepro-orexina, cuya expresión es exclusiva de HL por una pequeña población de neuronas orexinérgicas. Estas son de tamaño (15 a 40 μm) y forma (esférica y multipolar) variables, se estima que son alrededor de 80,000 en el cerebro humano. A partir de esta región, las neuronas orexinérgicas proyectan ampliamente a todo el sistema nervioso [10]. Dichas proyecciones regulan núcleos hipotalámicos implicados en la alimentación [14, 81]. Al mismo tiempo, que incrementan la excitación cortical y promueven la vigilia a través de los núcleos aminérgicos y otros núcleos relacionados con el sueño. La estimulación de las orexinas modula también los sistemas de recompensa, actividad motora y activación emocional mediante su interacción con neuronas particulares [36-39]. Los neurotransmisores orexinérgicos ejercen su efecto mediante su unión a receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas para la activación de diferentes vías de señalización [5, 10]. Se ha demostrado que la pérdida de las neuronas orexinérgicas conduce al desarrollo de efectos patológicos tales como la narcolepsia y las adicciones [8, 10-12, 113], debido a esto varios estudios se han enfocado en la evaluación de los factores locales y sistémicos involucrados en la regulación de los niveles de orexinas a partir de su liberación, analizando los agonistas (Ox A y Ox B) y sus receptores (OxR1 y OxR2) mediante modelos *in vitro* e *in vivo* [16-19, 21, 78, 79]; sin embargo, existen pocas evidencias sobre los factores moleculares intracelulares responsables de la producción de dichos neuropéptidos. La proteína precursora de las orexinas participa principalmente en la regulación del ciclo de vigilia-sueño y el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo [4, 72]. Se han propuesto diversos mecanismos para la regulación de los niveles de la misma; sin embargo, la regulación de su biosíntesis no ha sido completamente esclarecida.

Por esta razón, en el presente estudio surgió el interés de identificar los elementos moleculares claves en la regulación de la expresión del gen (*HCRT*) que codifica a la prepro-orexina. La secuencia codificante de este gen abarca 1432 pb (2 exones y 1 intrón) y se encuentra regulada por una región promotora localizada en el extremo 5' río arriba del sitio de codón de inicio de la traducción. Se ha demostrado que la secuencia de dicho gen presenta alta homología entre distintas especies [123]. La región río arriba del TSS de dicho gen contiene elementos esenciales para la correcta expresión hipotalámica [44, 124, 125] y para la unión de varios factores de transcripción importantes en la regulación de la expresión del gen *HCRT* [125-127]. Desde la identificación inicial de este gen se ha intentado definir una región promotora mínima capaz de inducir su expresión. Inicialmente Sakurai y cols., 1999 delimitaron una región extensa de 3149 pb que flanquea al extremo 5' y que contiene los elementos necesarios para la expresión del gen *HCRT* humano. Posteriormente, se demostró que un fragmento de menor tamaño (450 pb) de la región flanqueante 5' de dicho gen presentaba actividad promotora *in vitro* y que dicho fragmento contenía sitios potenciales de unión para varios factores de transcripción [124]. En un trabajo posterior, Yamamoto y cols. (2002) reportaron la presencia de dos elementos reguladores del gen de prepro-orexina, OE1 y OE2 de en las posiciones -287 y -2500 pb, respectivamente, situados en la región promotora de dicho gen, necesarios para su expresión en el hipotálamo lateral y para su represión fuera de dicha región, mediante delecciones continuas en el elemento OE1, se delimitó una secuencia de 57 pb crítica para la regulación espacial *in vivo* [44], encontrando que dicha secuencia funge como sitio de unión para diversos factores de transcripción tales como; foxa 2, identificado en el 2009 como un regulador positivo, que promueve la expresión del gen *HCRT* en condiciones de ayuno dentro del hipotálamo lateral provocando incremento en la ingesta de alimentos, conducta motivada y excitación, en ratones [127] y en el 2010, nr6a1 identificado como un regulador negativo que reprime la transcripción del gen *HCRT* en el hipotálamo tanto *in vivo* como *in vitro* [125].

Estudios realizados en ratones genéticamente modificados, han demostrado que las mutaciones por delección generadas en el gen *HCRT* dan como resultado el desarrollo de un fenotipo narcoléptico [101], por otra parte, se ha establecido que este fenotipo se desarrolla también en ratones inducidos a la pérdida de las neuronas orexinérgicas mediante el empleo de la neurotoxina (ataxina-3) [10]. Mediante análisis de expresión génica a gran escala se ha evidenciado que en estos animales dicha neurotoxina, provoca la expresión diferencial de varios genes expresados en las neuronas que residen en el HL, específicamente la disminución significativa de la expresión del gen *EBF2* [126]. Más tarde en el 2011 se demostró que los ratones knockout a dicho gen desarrollan una disminución en las células productoras de prepro-orexina dentro del HL, además de un deterioro grave en la inervación orexinérgica de la protuberancia, resaltando que *EBF2* juega un papel central durante el establecimiento de un circuito orexinérgico funcional mediante el control de la expresión de las orexinas y el correcto desarrollo de las fibras nerviosas derivadas del hipotálamo, pues la ausencia de dicho gen conduce al desarrollo de un fenotipo narcoléptico [133]. En este mismo estudio mediante un análisis *in silico* del promotor del gen *HCRT* se identificaron también dos sitios *olf-1* que se encuentran filogenéticamente conservados entre 4 especies diferentes (perro, rata, ratón y humano) y son considerados sitios diana para factores de transcripción de la familia de EBF2. Este pertenece a la superfamilia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice básicos implicados en el control de la expresión génica que determina el destino celular y/o diferenciación. El factor de transcripción *ebf2* pertenece a la familia EBF, y también es conocido como COE2, se localiza en el núcleo y codifica una proteína de 575 aa, presenta un dominio de unión al ADN bien conservado, reconoce la secuencia 5'-ATTCCCNNGGGAATT-3' e interacciona con otros miembros de su misma familia formando homodímeros y heterodímeros. Inicialmente, se evidenció su participación, así como la de otros factores de la misma familia, en la diferenciación neuronal por estudios hechos en *Drosophila* que luego fueron extrapolados a mamíferos, con lo que se estableció su rol en la neurogénesis [130-132].

Aún tomando en cuenta todo lo anterior, el conocimiento de cómo los miembros de la familia EBF contribuyen a la neurogénesis está limitado por la falta de comprensión detallada de los genes diana que son regulados transcripcionalmente por estos factores. A lo largo del desarrollo, muchos procesos ocurren de forma coordinada, incluyendo patrones de establecimiento, diferenciación y migración de células progenitoras. En el SN en particular, estos procesos son complejos y dependen de la expresión coordinada de un conjunto de varios genes, por lo que en este estudio se analizó la participación del factor de transcripción *ebf2* en la regulación transcripcional del gen *HCRT* y la importancia de los sitios *olf-1* presentes en la región promotora de dicho gen.

Nuestro estudio experimental analizó de manera general la actividad de un nuevo promotor mínimo (390 pb) del gen *HCRT* murino definido recientemente por nuestro grupo de investigación, el cual abarca los dos sitios *olf-1* (proximal y distal respecto al TSS) antes mencionados, dicho promotor fue construido mediante técnicas de ingeniería genética empleando el vector de expresión pNIFty que expresa el gen reportero, *Lucia* (Sánchez García y cols, 2016). En la presente investigación inicialmente se evaluó el efecto de dicho promotor en líneas celulares de estirpe neuronal y no neuronal transducidas con el factor de transcripción *ebf2*, se demostró que la actividad del promotor mínimo del gen *HCRT* murino portador de la secuencia silvestre, fue mayor (30 veces más) respecto a la actividad del promotor de $INF\beta$, inductor original del gen reportero en el vector de expresión pNIFty lo cual coincide con lo reportado por Sánchez García y cols., 2016.

Posteriormente mediante un ensayo reportero de luciferasa se evaluaron los niveles de la expresión del gen reportero, inducidos por cada uno de los derivados sintéticos obtenidos a partir del promotor mínimo silvestre del gen *HCRT* murino (D1-pNIFty, M1-pNIFty, D2-pNIFty, M2-pNIFty) producidos por delección y/o mutación en los sitios *olf-1* proximal y distal respecto al TSS (Sánchez García y cols, 2016). En dicho ensayo al realizar las transfecciones transitorias en cada línea celular con las distintas variantes del promotor, se comprobó la inserción del gen reportero al genoma de las células de acuerdo al efecto visto 4 semanas post-

transfección con respecto al observado a las 48h post-transfección, manteniendo la estabilidad de las transfecciones por dicho periodo. Resaltando que los niveles de expresión en dicho ensayo para la línea celular neuronal C6/ebf2 (sobre-expresa *ebf2*) incrementan de manera notoria en las células transfectadas con los promotores con delección y mutación en el sitio *olf-1* proximal (D1 y M1), 6 y 4 veces más respectivamente con respecto a las células transfectadas con el promotor de secuencia silvestre. Mientras que para la línea celular no neuronal HEK293/ebf2 (sobre-expresa *ebf2*) se observó el mismo patrón de incremento en los niveles de expresión del gen reportero en células transfectadas con dichos promotores (D1 y M1), siendo más evidente en esta línea celular por casi el doble de veces (11 veces y 6 veces más vs el promotor WT), sin embargo en esta línea celular también se apreció un efecto diferente, resultando en una disminución evidente de los niveles de expresión en el gen reportero de las células transfectadas con el promotor portador de la delección en el sitio *olf-1* distal (D2), siendo esta de 3 veces menos vs el promotor silvestre.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo reportero de luciferasa, se quiso comprobar si dichos efectos se mantenían a nivel de mRNA (gen reportero) empleando PCR en tiempo real para evaluar la regulación transcripcional de las distintas variantes del promotor mínimo del gen *HCRT* murino, se evaluaron los niveles de expresión del mRNA del gen reportero a partir de los dos sitios de inicio de la transcripción (original y presuntivo) cercanos a la caja TATA del promotor, se observó que a partir de ambos sitios de inicio de la transcripción los efectos observados en el ensayo reportero de luciferasa se siguen manteniendo pues la expresión inducida por los promotores D1 y M1 incrementa considerablemente tanto en la línea celular C6/ebf2 (5 y 3 veces más) como en la HEK293/ebf2 (10 y 5 veces más) con respecto a la expresión inducida por el promotor silvestre. Así como también se mantiene el decremento de la expresión inducida por el promotor D2 en la línea celular HEK293/ebf2 (3 veces menos). Interesantemente, el decremento en la expresión inducida por dicho promotor sugirió un posible cambio en el sitio de inicio de la transcripción, lo cual corroboramos ya que efectivamente encontramos que para ese promotor la proporción de relación entre el sitio

presuntivo (3') con respecto al original (5') se modificó de manera significativa respecto al resto de los grupos, resaltando un cambio en el sitio de inicio de la transcripción. De acuerdo a los resultados anteriores se propone que el sitio *olf-1* proximal funge como un regulador negativo del promotor del gen *HCRT* murino ya que al deletar dicho sitio, la expresión del gen reportero incrementa considerablemente, mientras que el sitio *olf-1* distal parece ser un regulador positivo de dicho promotor pues la delección de dicho sitio disminuye la expresión de dicho gen reportero.

Para explicar un posible mecanismo de regulación transcripcional del sitio *olf-1* distal presente en la región promotora del gen *HCRT* murino de acuerdo a la disminución de la expresión del gen reportero y al cambio en el sitio de inicio de la transcripción, se realizó un ensayo de retardo de movilidad electroforética para evaluar la posible interacción entre el sitio distal y el factor de transcripción *ebf2*, demostrando en dicho ensayo que *ebf2* se une al sitio *olf-1* distal presente en la región promotora regulando transcripcionalmente la expresión del gen reportero. El sitio *olf-1* distal presente en la región promotora del gen *HCRT* murino se localiza dentro del elemento regulador de orexina tipo 1 (OE1), debido a esto nuestros resultados apoyan lo reportado por Yamamoto y cols. (2002) [44], delimitando un nuevo sitio que comprueba que OE1 participa como un regulador positivo del promotor del gen *HCRT* mediante la unión de un nuevo factor de transcripción (*ebf2*) al sitio diana *olf-1* distal presente en dicho elemento regulador. Las diferencias en los efectos vistos entre una línea celular y la otra, podrían deberse al contexto celular, ya que la línea celular C6, al ser de estirpe neuronal, de manera normal expresa el promotor del gen *HCRT*; así, el efecto observado podría estar influenciado por proteínas accesorias propias de la línea celular que participan en la regulación normal de dicho promotor. Por el contrario, la línea celular HEK293 de estirpe no neuronal, de manera normal no expresa el promotor del gen *HCRT*; por lo tanto, el efecto visto es consistente con el hecho de que no interfieren otros factores intracelulares en la regulación del promotor, sino únicamente las modificaciones genéticas inducidas, dando como resultado el efecto deseado, el cual no había sido previamente evaluado en otros estudios.

Aunque ya es bien conocido que el gen *EBF2* se expresa durante los periodos de diferenciación neuronal del SNC y regula claramente diversos aspectos del desarrollo neuronal [128], no se entiende cómo estas funciones se ejecutan ya que se conoce poco sobre la participación de este en la transcripción de genes diana implicados en el desarrollo neuronal. Este estudio es un primer abordaje sobre la participación del factor de transcripción *ebf2* en la regulación transcripcional del gen *HCRT* murino mediante su interacción con los sitios *olf-1* presentes en la región promotora de dicho gen.

Un detallado sistema de la regulación del gen *HCRT*, permitirá una mejor comprensión no solo de la participación de este factor de transcripción si no la jerarquía de un conjunto de factores de transcripción dirigidos a sitios diana específicos involucrados en su actividad transcripcional, esclareciendo un mecanismo de biosíntesis de la prepro-orexina para una mejor comprensión del desarrollo neuronal en el sistema nervioso con el fin de generar nuevas terapias dirigidas a dianas potenciales importantes en los trastornos relacionados con el sueño, la alimentación y las adicciones.

CAPÍTULO XI: CONCLUSIÓN.

La prepro-orexina comprende un sistema complejo de expresión dentro del hipotálamo lateral, cuya importancia radica principalmente en la regulación del ciclo de vigilia-sueño, por lo que en el presente estudio se estableció un nuevo mecanismo de regulación a nivel transcripcional del gen que codifica dicha proteína (*HCRT*), demostrando en un modelo *in vitro* que los sitios *olf-1* considerados dianas para factores de transcripción de la familia EBF, conservados en el promotor mínimo del gen *HCRT* murino, participan en la regulación de la transcripción del gen reportero (*Lucia*), incrementando la actividad promotora del mismo, y modificando su transcripción de manera significativa en presencia del factor de transcripción *ebf2*, en líneas celulares de distinto estirpe celular (neuronal y no neuronal), cuyo efecto es dependiente del contexto celular.

De acuerdo con la hipótesis se concluye que el sitio *olf-1* proximal al sitio de inicio de la transcripción (TSS), presente en el promotor mínimo del gen *HCRT* murino participa como un regulador negativo del mismo, mientras que el sitio *olf-1* distal interviene como un regulador positivo de dicho promotor y es sitio diana para el factor de transcripción *ebf2*, esclareciendo de esta manera un poco más el mecanismo de biosíntesis de la prepro-orexina en el desarrollo neuronal del sistema nervioso.

CAPÍTULO XII: PERSPECTIVAS.

Realizar inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) inicialmente mediante la fijación del factor de transcripción a la región promotora y fragmentación del DNA (cromatina), posteriormente realizar la inmunoprecipitación empleando un anticuerpo primario dirigido contra el factor de transcripción *ebf2* para evaluar su sitio específico de unión a la región promotora del gen *HCRT*, finalmente realizar la purificación del DNA (proteinasas K) y el análisis de la secuencia específica mediante PCR en tiempo real o microarreglos.

Realizar microarreglos de expresión empleando los estuches para rata y humano (SureTag DNA Labeling y LowInput QuickAmp Labeling, 8x60k, Agilent Technologies, etc.) para establecer los perfiles de expresión de *ebf2* en las líneas celulares C6/*ebf2* y HEK293/*ebf2* e identificar interacciones con nuevos genes o factores de transcripción reguladores (o regulados) del gen prepro-orexina, para ello inicialmente se realizará la purificación del RNA, posteriormente la construcción de la biblioteca de cDNA, marcaje del cDNA, generación de cRNA y finalmente la hibridación, lavado y escaneo de los microarreglos.

Generar un modelo de ratones knockout, los cuales contendrán la delección del sitio *olf-1* distal (promotor del gen *HCRT* murino), de manera inicial se diseñará el constructo de la secuencia deseada incluyendo un gen reportero (fluorescencia), a partir del blastocito de ratones silvestres se aislarán las células madre (*in vitro*), dichas células se combinarán con la nueva secuencia de interés mediante electroporación, las células portadoras de la nueva secuencia se insertarán en un blastocito de ratón pardo para luego implantarlo en el útero de una ratona (gestación), obteniendo ratones quimeras. Se realizarán cruces de las quimeras con los ratones silvestres y estos se someterán a cruzamiento endógamo (homocigotos para el alelo de interés). Se evaluarán los efectos *in vivo* de dichos ratones durante el ciclo de vigilia / sueño mediante electroencefalografía y electromiografía para finalmente, después de su sacrificio, evaluar el número de células orexinérgicas en cortes cerebrales de hipotálamo lateral (fluorescencia) y compararlo con el de ratones silvestres y ratones (fenotipo narcoléptico).

CAPÍTULO XIII: BIBLIOGRAFÍA.

1. Nishino S, Okura M, Mignot E: **Narcolepsy: genetic predisposition and neuropharmacological mechanisms. REVIEW ARTICLE.** *Sleep Med Rev* 2000, **4**(1):57-99.
2. Bastianini S, Silvani A, Berteotti C, Lo Martire V, Cohen G, Ohtsu H, Lin JS, Zoccoli G: **Histamine Transmission Modulates the Phenotype of Murine Narcolepsy Caused by Orexin Neuron Deficiency.** *PLoS One* 2015, **10**(10):e0140520.
3. Palasz A, Lapray D, Peyron C, Rojczyk-Golebiewska E, Skowronek R, Markowski G, Czajkowska B, Krzystanek M, Wiaderkiewicz R: **Dual orexin receptor antagonists - promising agents in the treatment of sleep disorders.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2014, **17**(1):157-168.
4. Peyron C, Tighe DK, Van Den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS: **Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems.** *The Journal of Neuroscience* 1998, **18**(23):9996-10015.
5. Ohno K, Sakurai T: **Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness.** *Frontiers in neuroendocrinology* 2008, **29**(1):70-87.
6. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K-i, Sugiyama F, Goto K: **Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice.** *Neuron* 2003, **38**(5):701-713.
7. Tsuneki H, Murata S, Anzawa Y, Soeda Y, Tokai E, Wada T, Kimura I, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T: **Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice.** *Diabetologia* 2008, **51**(4):657-667.
8. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y: **Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation.** *Cell* 1999, **98**(4):437-451.
9. Li J, Hu Z, de Lecea L: **The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions.** *Br J Pharmacol* 2014, **171**(2):332-350.
10. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM: **Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy.** *Neuron* 2000, **27**(3):469-474.
11. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E: **The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene.** *Cell* 1999, **98**(3):365-376.

12. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA: **Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes.** *Neuron* 2003, **38**(5):715-730.
13. De Lecea L, Kilduff T, Peyron C, Gao X-B, Foye P, Danielson P, Fukuhara C, Battenberg E, Gautvik V, Bartlett F: **The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, **95**(1):322-327.
14. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S: **Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior.** *Cell* 1998, **92**(4):573-585.
15. Kilduff TS, Peyron C: **The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders.** *Trends in neurosciences* 2000, **23**(8):359-365.
16. Ohno K, Sakurai T: **Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness.** *Front Neuroendocrinol* 2008, **29**(1):70-87.
17. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM: **Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain.** *FEBS letters* 1998, **438**(1-2):71-75.
18. Machaalani R, Hunt NJ, Waters KA: **Effects of changes in energy homeostasis and exposure of noxious insults on the expression of orexin (hypocretin) and its receptors in the brain.** *Brain research* 2013, **1526**:102-122.
19. Hervieu G, Cluderay J, Harrison D, Roberts J, Leslie R: **Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord.** *Neuroscience* 2001, **103**(3):777-797.
20. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA *et al*: **Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes.** *Neuron* 2003, **38**(5):715-730.
21. Baimel C, Bartlett SE, Chiou LC, Lawrence AJ, Muschamp JW, Patkar O, Tung LW, Borgland SL: **Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions.** *Br J Pharmacol* 2015, **172**(2):334-348.
22. Arrighi E, Mochizuki T, Scammell TE: **Activation of the basal forebrain by the orexin/hypocretin neurones.** *Acta physiologica* 2010, **198**(3):223-235.

23. Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK: **Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002, **22**(21):9453-9464.
24. Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L: **Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000, **20**(20):7760-7765.
25. Kukkonen JP: **Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012.** *American journal of physiology Cell physiology* 2013, **304**(1):C2-32.
26. Xu TR, Yang Y, Ward R, Gao L, Liu Y: **Orexin receptors: multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders.** *Cellular signalling* 2013, **25**(12):2413-2423.
27. Xu TR, Ward RJ, Pediani JD, Milligan G: **Intramolecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensors of the orexin OX1 and OX2 receptors identify slow kinetics of agonist activation.** *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(18):14937-14949.
28. Ekholm ME, Johansson L, Kukkonen JP: **IP3-independent signalling of OX1 orexin/hypocretin receptors to Ca²⁺ influx and ERK.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **353**(2):475-480.
29. Kohlmeier KA, Inoue T, Leonard CS: **Hypocretin/orexin peptide signaling in the ascending arousal system: elevation of intracellular calcium in the mouse dorsal raphe and laterodorsal tegmentum.** *Journal of neurophysiology* 2004, **92**(1):221-235.
30. Acuna-Goycolea C, van den Pol AN: **Neuroendocrine proopiomelanocortin neurons are excited by hypocretin/orexin.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009, **29**(5):1503-1513.
31. Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A: **Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine.** *Neuron* 2006, **49**(4):589-601.

32. Borgland SL, Storm E, Bonci A: **Orexin B/hypocretin 2 increases glutamatergic transmission to ventral tegmental area neurons.** *The European journal of neuroscience* 2008, **28**(8):1545-1556.
33. Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K: **Distribution of orexin neurons in the adult rat brain.** *Brain research* 1999, **827**(1-2):243-260.
34. Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M: **Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(2):748-753.
35. Wise RA, Rompre PP: **Brain dopamine and reward.** *Annu Rev Psychol* 1989, **40**:191-225.
36. Sakurai T, Mieda M, Tsujino N: **The orexin system: roles in sleep/wake regulation.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010, **1200**:149-161.
37. Saper CB, Chou TC, Scammell TE: **The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness.** *Trends in neurosciences* 2001, **24**(12):726-731.
38. Mieda M, Sakurai T: **Orexin (hypocretin) receptor agonists and antagonists for treatment of sleep disorders. Rationale for development and current status.** *CNS drugs* 2013, **27**(2):83-90.
39. Gotter AL, Webber AL, Coleman PJ, Renger JJ, Winrow CJ: **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVI. Orexin receptor function, nomenclature and pharmacology.** *Pharmacological reviews* 2012, **64**(3):389-420.
40. Randeve HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW: **Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2001, **86**(10):4808-4813.
41. Digby JE, Chen J, Tang JY, Lehnert H, Matthews RN, Randeve HS: **Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B.** *The Journal of endocrinology* 2006, **191**(1):129-136.
42. Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P: **Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats.** *Endocrinology* 2001, **142**(8):3324-3331.
43. Kirchgeßner AL, Liu M: **Orexin synthesis and response in the gut.** *Neuron* 1999, **24**(4):941-951.

44. Moriguchi T, Sakurai T, Takahashi S, Goto K, Yamamoto M: **The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(19):16985-16992.
45. Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K: **Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice.** *Neuron* 2005, **46**(2):297-308.
46. Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A, Scammell TE: **Afferents to the orexin neurons of the rat brain.** *The Journal of comparative neurology* 2006, **494**(5):845-861.
47. Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L: **Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004, **24**(50):11439-11448.
48. Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T: **Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2003, **285**(3):R581-593.
49. Ponz A, Khatami R, Poryazova R, Werth E, Boesiger P, Schwartz S, Bassetti CL: **Reduced amygdala activity during aversive conditioning in human narcolepsy.** *Annals of neurology* 2010, **67**(3):394-398.
50. Burgess CR, Oishi Y, Mochizuki T, Peever JH, Scammell TE: **Amygdala lesions reduce cataplexy in orexin knock-out mice.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013, **33**(23):9734-9742.
51. Takakusaki K, Takahashi K, Saitoh K, Harada H, Okumura T, Kayama Y, Koyama Y: **Orexineric projections to the cat midbrain mediate alternation of emotional behavioural states from locomotion to cataplexy.** *The Journal of physiology* 2005, **568**(Pt 3):1003-1020.
52. Berthoud HR: **Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance.** *Physiology & behavior* 2004, **81**(5):781-793.
53. Reid MS, Nishino S, Tafti M, Siegel JM, Dement WC, Mignot E: **Neuropharmacological characterization of basal forebrain cholinergic**

- stimulated cataplexy in narcoleptic canines.** *Experimental neurology* 1998, **151**(1):89-104.
54. Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB: **Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep.** *The Journal of neuroscience* 2002, **22**(11):4568-4576.
55. Steininger TL, Gong H, McGinty D, Szymusiak R: **Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups.** *Journal of Comparative Neurology* 2001, **429**(4):638-653.
56. Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB: **Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998, **18**(12):4705-4721.
57. Brown RE, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL: **Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline).** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002, **22**(20):8850-8859.
58. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P *et al*: **Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(19):10911-10916.
59. Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T: **Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT_{1A} receptor.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004, **24**(32):7159-7166.
60. Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T: **Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner.** *Journal of neurophysiology* 2006, **96**(1):284-298.
61. Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE, Muhlethaler M: **Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones.** *Neuroscience* 2001, **108**(2):177-181.
62. Aserinsky E, Kleitman N: **Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep.** *Science* 1953, **118**(3062):273-274.

63. Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF, de Lecea L: **Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(52):19168-19173.
64. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K *et al*: **Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice.** *Neuron* 2003, **38**(5):701-713.
65. Akiyama M, Yuasa T, Hayasaka N, Horikawa K, Sakurai T, Shibata S: **Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice.** *The European journal of neuroscience* 2004, **20**(11):3054-3062.
66. Mieda M, Williams SC, Sinton CM, Richardson JA, Sakurai T, Yanagisawa M: **Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004, **24**(46):10493-10501.
67. Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G: **A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking.** *Nature* 2005, **437**(7058):556-559.
68. Yi CX, Serlie MJ, Ackermans MT, Foppen E, Buijs RM, Sauerwein HP, Fliers E, Kalsbeek A: **A major role for perifornical orexin neurons in the control of glucose metabolism in rats.** *Diabetes* 2009, **58**(9):1998-2005.
69. van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB: **Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998, **18**(19):7962-7971.
70. Burlet S, Tyler CJ, Leonard CS: **Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002, **22**(7):2862-2872.
71. Beuckmann CT, Yanagisawa M: **Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation.** *Journal of molecular medicine* 2002, **80**(6):329-342.
72. Inutsuka A, Yamanaka A: **The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions.** 2013.

73. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P: **Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, **96**(19):10911-10916.
74. Bourgin P, Huitrón-Reséndiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, De Lecea L: **Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons.** *The Journal of Neuroscience* 2000, **20**(20):7760-7765.
75. Willie JT, Takahira H, Shibahara M, Hara J, Nomiya M, Yanagisawa M, Sakurai T: **Ectopic overexpression of orexin alters sleep/wakefulness states and muscle tone regulation during REM sleep in mice.** *Journal of molecular neuroscience : MN* 2011, **43**(2):155-161.
76. Sakurai T: **The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness.** *Nature reviews Neuroscience* 2007, **8**(3):171-181.
77. Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE: **Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001, **21**(5):1656-1662.
78. Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM: **Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons.** *Neuron* 2005, **46**(5):787-798.
79. Lee MG, Hassani OK, Jones BE: **Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005, **25**(28):6716-6720.
80. Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM: **Feeding response to central orexins.** *Brain research* 1999, **821**(2):535-538.
81. Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter RA, Arch JR: **A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats.** *Regulatory peptides* 2000, **96**(1-2):45-51.
82. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K-i, Goto K, Yanagisawa M: **Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity.** *Neuron* 2001, **30**(2):345-354.

83. Lubkin M, Stricker-Krongrad A: **Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice.** *Biochemical and biophysical research communications* 1998, **253**(2):241-245.
84. Muroya S, Uramura K, Sakurai T, Takigawa M, Yada T: **Lowering glucose concentrations increases cytosolic Ca²⁺ in orexin neurons of the rat lateral hypothalamus.** *Neuroscience letters* 2001, **309**(3):165-168.
85. Nowak KW, Mackowiak P, Switonska MM, Fabis M, Malendowicz LK: **Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies.** *Life sciences* 2000, **66**(5):449-454.
86. Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T: **Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis.** *Acta physiologica* 2010, **198**(3):335-348.
87. Stanley S, Pinto S, Segal J, Perez CA, Viale A, DeFalco J, Cai X, Heisler LK, Friedman JM: **Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(15):7024-7029.
88. Bass J, Takahashi JS: **Circadian integration of metabolism and energetics.** *Science* 2010, **330**(6009):1349-1354.
89. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D: **An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis.** *Adipocyte* 2012, **1**(2):116-120.
90. Tupone D, Madden CJ, Cano G, Morrison SF: **An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2011, **31**(44):15944-15955.
91. Zarepour L, Fatahi Z, Sarihi A, Haghparast A: **Blockade of orexin-1 receptors in the ventral tegmental area could attenuate the lateral hypothalamic stimulation-induced potentiation of rewarding properties of morphine.** *Neuropeptides* 2014, **48**(3):179-185.
92. Fadel J, Deutch A: **Anatomical substrates of orexin–dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area.** *Neuroscience* 2002, **111**(2):379-387.
93. Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR: **The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in**

- vivo and in vitro in male rats.** *Journal of neuroendocrinology* 2001, **13**(6):561-566.
94. Kagerer SM, Jöhren O: **Interactions of orexins/hypocretins with adrenocortical functions.** *Acta physiologica* 2010, **198**(3):361-371.
 95. Nurmio M, Tena-Sempere M, Toppari J: **Orexins and the regulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis.** *Acta physiologica* 2010, **198**(3):349-354.
 96. Russell SH, Small CJ, Kennedy AR, Stanley SA, Seth A, Murphy KG, Taheri S, Ghatei MA, Bloom SR: **Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis.** *Endocrinology* 2001, **142**(12):5294-5302.
 97. Karnani M, Burdakov D: **Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2011, **300**(1):R47-55.
 98. Oishi Y, Williams RH, Agostinelli L, Arrigoni E, Fuller PM, Mochizuki T, Saper CB, Scammell TE: **Role of the medial prefrontal cortex in cataplexy.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013, **33**(23):9743-9751.
 99. Monda M, Viggiano A, Viggiano A, Fuccio F, De Luca V: **Injection of orexin A into the diagonal band of Broca induces sympathetic and hyperthermic reactions.** *Brain research* 2004, **1018**(2):265-271.
 100. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E: **The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene.** *Cell* 1999, **98**(3):365-376.
 101. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y *et al*: **Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation.** *Cell* 1999, **98**(4):437-451.
 102. Mignot E: **Genetic and familial aspects of narcolepsy.** *Neurology* 1998, **50**(2 Suppl 1):S16-22.
 103. Mignot E, Tafti M, Dement WC, Grumet FC: **Narcolepsy and immunity.** *Advances in neuroimmunology* 1995, **5**(1):23-37.
 104. Partinen M, Kornum BR, Plazzi G, Jennum P, Julkunen I, Vaarala O: **Narcolepsy as an autoimmune disease: the role of H1N1 infection and vaccination.** *The Lancet Neurology* 2014, **13**(6):600-613.
 105. Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E: **Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy.** *Lancet* 2000, **355**(9197):39-40.

106. Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R: **A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains.** *Nature medicine* 2000, **6**(9):991-997.
107. Gerashchenko D, Kohls MD, Greco M, Waleh NS, Salin-Pascual R, Kilduff TS, Lappi DA, Shiromani PJ: **Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001, **21**(18):7273-7283.
108. Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, Tominaga M, Maruyama M, Takagi K, Minokoshi Y, Sakurai T, Kilduff TS, Yamanaka A: **Conditional ablation of orexin/hypocretin neurons: a new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2014, **34**(19):6495-6509.
109. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M *et al*: **Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity.** *Neuron* 2001, **30**(2):345-354.
110. Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmacher T: **Increased body-mass index in patients with narcolepsy.** *Lancet* 2000, **355**(9211):1274-1275.
111. Honda Y, Ninomiya R, Ninomiya C: **Increased frequency of non-insulin-dependent diabetes mellitus among narcoleptic patients.** *Sleep* 1985, **9**(1 Pt 2):254-259.
112. Luscher C, Malenka RC: **Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling.** *Neuron* 2011, **69**(4):650-663.
113. Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G: **A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking.** *Nature* 2005, **437**(7058):556-559.
114. Aston-Jones G, Smith RJ, Moorman DE, Richardson KA: **Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction.** *Neuropharmacology* 2009, **56 Suppl 1**:112-121.
115. Pasumarthi RK, Reznikov LR, Fadel J: **Activation of orexin neurons by acute nicotine.** *European journal of pharmacology* 2006, **535**(1-3):172-176.
116. Lawrence AJ, Cowen MS, Yang HJ, Chen F, Oldfield B: **The orexin system regulates alcohol-seeking in rats.** *Br J Pharmacol* 2006, **148**(6):752-759.

117. Kane JK, Parker SL, Li MD: **Hypothalamic orexin-A binding sites are downregulated by chronic nicotine treatment in the rat.** *Neuroscience letters* 2001, **298**(1):1-4.
118. Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S *et al*: **Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006, **26**(2):398-405.
119. Chen YW, Barson JR, Chen A, Hoebel BG, Leibowitz SF: **Glutamatergic input to the lateral hypothalamus stimulates ethanol intake: role of orexin and melanin-concentrating hormone.** *Alcoholism, clinical and experimental research* 2013, **37**(1):123-131.
120. Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, Mieda M, Willie JT, Eisch AJ, Yanagisawa M, Nestler EJ, DiLeone RJ: **Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003, **23**(8):3106-3111.
121. Gentile TA, Simmons SJ, Watson MN, Connelly KL, Brailoiu E, Zhang Y, Muschamp JW: **Effects of Suvorexant, a Dual Orexin/Hypocretin Receptor Antagonist, on Impulsive Behavior Associated with Cocaine.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2017.
122. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A: **Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ.** *The Journal of neuroscience* 2005, **25**(9):2429-2433.
123. Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, Kajiwara N, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K: **Structure and function of human prepro-orexin gene.** *J Biol Chem* 1999, **274**(25):17771-17776.
124. Waleh N, Apte-Deshpande A, Terao A, Ding J, Kilduff T: **Modulation of the promoter region of prepro-hypocretin by α -interferon.** *Gene* 2001, **262**(1):123-128.
125. Tanaka S, Kodama T, Nonaka T, Toyoda H, Arai M, Fukazawa M, Honda Y, Honda M, Mignot E: **Transcriptional regulation of the hypocretin/orexin gene by**

- NR6A1**. *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **403**(2):178-183.
126. Honda M, Eriksson KS, Zhang S, Tanaka S, Lin L, Salehi A, Hesla PE, Maehlen J, Gaus SE, Yanagisawa M: **IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin)**. *PloS one* 2009, **4**(1):e4254.
127. Silva JP, Von Meyenn F, Howell J, Thorens B, Wolfrum C, Stoffel M: **Regulation of adaptive behaviour during fasting by hypothalamic Foxa2**. *Nature* 2009, **462**(7273):646-650.
128. Moruzzo D, Nobbio L, Sterlini B, Consalez GG, Benfenati F, Schenone A, Corradi A: **The Transcription Factors EBF1 and EBF2 Are Positive Regulators of Myelination in Schwann Cells**. *Molecular neurobiology* 2016.
129. Kieslinger M, Folberth S, Dobрева G, Dorn T, Croci L, Erben R, Consalez GG, Grosschedl R: **EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts**. *Developmental cell* 2005, **9**(6):757-767.
130. Garel S, Marín F, Mattéi MG, Vesque C, Vincent A, Charnay P: **Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system**. *Developmental dynamics* 1997, **210**(3):191-205.
131. Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W, Amadio S, Maggi R, Quattrini A, Consalez GG: **Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice**. *Development* 2003, **130**(2):401-410.
132. Wang SS, Lewcock JW, Feinstein P, Mombaerts P, Reed RR: **Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection**. *Development* 2004, **131**(6):1377-1388.
133. De La Herrán-Arita A, Zomosa-Signoret V, Millán-Aldaco D, Palomero-Rivero M, Guerra-Crespo M, Drucker-Colín R, Vidaltamayo R: **Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mutant mice**. *Neuroscience* 2011, **183**:134-143.

CAPÍTULO XIV: APÉNDICES

1. Anexo A

Suplementación de medio DMEM para células HEK-293 y C6

HEK-293

Al medio DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Caisson Labs, North Logan, UT, EUA) agregar lo siguiente:

- 1) 10% SBF.
- 2) 1% de antibióticos-antimicóticos.
- 3) 1% de Glutamax
- 4) 1% de aminoácidos no esenciales (A+G)

Antibiótico de selección

Puromicina (0.5µg/mL) → 0.5µl/10 mL de medio.

C6

Al medio DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Caisson Labs, North Logan, UT, EUA) agregar lo siguiente:

- 1) 2.5% SBF.
- 2) 1% de antibióticos-antimicóticos.
- 3) 1% de Glutamax
- 4) 1% de aminoácidos no esenciales (A+G)

Descongelación de células

- 1.- Atemperar el vial de células por un minuto
- 2.- Adicionar 10 ml de medio DMEM (suplementado con SFB) a placas (plástico) de 72 cm²
- 3.- Verter el contenido del vial con células dentro de la placa, mezclar en forma circular lentamente.
- 4.- Colocar las células dentro la incubadora (37°C y 5% de CO²)

Subcultivo

- 1.- Decantar el medio de las cajas.
- 2.- Agregar a la caja tripsina y medio DMEM en volumen (1:1),
- 3.- Al adicionar la tripsina, incubar la caja a 37°C por 5 minutos
- 4.- Transcurrido el tiempo agregar el medio DMEM (mezclar)
- 5.- Succionar el contenido de la caja y agregar a un tubo nuevo.
- 6.- Centrifugar a 65 G (5 minutos).
- 7.- Decantar el sobrenadante.
- 8.- Agregar nuevo medio DMEM (resuspender)
- 9.- Contar las células
- 10.- Cultivar la cantidad de células requeridas por ml en nuevas placas complementar el volumen final con medio fresco.

Conteo celular

90 µl de células + 10 µl de azul tripano

No. Células = promedio (4 cuadrantes) X 10 (F.D) X Vf. → Vf= 10 mL

No. Células/ml → calcular

Células de interés/mL (1000) → células / µl

Congelación celular.

- 1.- Realizar el procedimiento de subcultivo.
- 2.- Para 1,000,000 de células por vial, agregar 10% DMSO, 90 % SBF (obteniendo un volumen final de 1 ml).
- 3.- Congelar las células 1 hora a 4°C, 2 horas a -20°C y posteriormente a -80°C.

2. Anexo B

Transfección con lipofectamina

Lipofectamine® Transfection Reagent (ThermoFisher scientific, Invitrogen).

Plásmido (5 µg / µL stock)

Para una reacción

- 1.-Un día antes de la transfección sembrar 500,000 células por pozo en una placa de plástico de 6.
- 2.-Colocar 97 µL de medio OptiMEM + 3 µL de plásmido D1-pNiFty en un tubo eppendorf (1 mL) → mezclar.
- 3.- Agregar 100 µL de medio OptiMEM + 10 µL lipofectamina → mezclar.
- 4.- Juntar el contenido de los tubos anteriores y mezclar muy bien con la micropipeta.
- 5.- Incubar a 37°C la mezcla de los tubos por 30 minutos para la formación de los complejos DNA-lipofectamina.
- 6.-Agregar nuevo medio a cada pozo (2 mL de medio OptiMEM).
- 7.-Adicionar 200 µL del tubo con los complejos a los pozo que se desean transfectar.
- 8.- Mezclar en el checker por 5 minutos
- 9.-Incubar a 37°C por 48 horas.

*Incluir un control negativo que solo contenga el contenido del tubo con 100 µL de medio OptiMEM + 10 µL lipofectamina (2 ml de medio OptiMEM), así como un blanco que solo contenga células y medio OptiMEM (sin lipofectamina).

Antibiótico de selección

Zeocina (100 µg/mL) → 10µl/10 mL de medio.

3. Anexo C

Ensayo reportero de luciferasa

Reactivo revelador de ensayo luminiscente QUANTI-Luc (Invivogen, San Diego, CA, USA)

*Preparación del reactivo QUANTI-Luc.

- Verter el contenido del sobre en un tubo Falcon de 50 ml
- Añadir 25 ml de agua estéril
- Remover el producto hasta que se disuelva.

1.- En placas blancas de 96 pozos sembrar células transfectadas durante distintos periodos (48 h, 24 h y 3h) diferente número de células (20,000; 40,000 y 80,000 células por pozo) respectivamente para cada periodo (5 repeticiones) en 100 μ L de medio DMEM.

2.- En el periodo de las 3 h (80,000 cel/pozo) sembrar también diferente número de células sin transfectar para el establecimiento de una curva estándar (10,000; 20,000; 40,000; 80,000; 160,000) por triplicado.

3.- Transcurridas las 3h de incubación. Tomar 10 μ L del sobrenadante de cada pozo y pasar a una nueva placa de 96 pozos.

4.- Agregar a cada pozo 50 μ L de QUATI-Luc.

5.- Inmediatamente registrar la luminiscencia en el equipo Glo-max Discovery de promega.

*Incluir un control negativo sin células que solo contenga 100 μ L de medio OptiMEM .

4. Anexo D

Viabilidad celular (normalización de la señal de luciferasa)

*Preparación del reactivo CellTiter-Glo®

- Atemperar el reactivo (1h – 5h)
- Agregar el buffer (1 x 10 ml) a la botella color ámbar (sustrato) para reconstituir
- Mezclar por agitación.

- 1.- En placas blancas de fondo transparente (96 pozos), retirar el sobrenadante de cada uno de los pozos sembrados en el anexo C y guardar.
- 2.- Sustituir dicho sobrenadante por nuevo medio fresco DMEM suplementado (100 µL)
- 3.- Añadir 100 µL del reactivo CellTiter-Glo® a 100 µL de medio DMEM.
- 4.- Mezclar la placa en el checker por 2 minutos (inducir lisis celular)
- 5.- Incubar la placa a temperatura ambiente/10 minutos (estabilizar la señal luminiscente)
- 6.- Registrar luminiscencia.

5. Anexo E

**Recolección de células*

De cajas de plástico de 72 cm² (duplicados) se decanta el sobrenadante y se obtiene el pellet de células por raspado. Por cada volumen de células obtenido se le agrega el mismo volumen de RNA lader en una proporción 1:1 para conservar el RNAm de las células.

Extracción de RNA con Purezol

- 1.- En un tubo eppendorf (1.5ml) se agrega directamente a la pastilla de células con RNA lader (100 µL) 500 µL de purezol a cada tubo (duplicados) para posteriormente concentrarlo todo en un mismo tubo (1ml). El contenido se mezcla por pipeteo.
- 2.- Se incuba 20 minutos a 55°C.
- 3.- Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Se agrega 200 µL de cloroformo y se mezcla por 15 segundos (inversión no pipeteo).
- 5.- Se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Se centrifuga a 12,000 G por 15 minutos 4 °C
- 7.- Se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo eppendorf estéril ya rotulado.

- 8.- Se añaden 500 µL de alcohol isopropílico, se mezcla por inversión y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 9.- Se centrifuga a 12,000 G por 10 minutos a 4 °C y se descarta el sobrenadante cuidadosamente usando la pipeta.
- 10.- Se lava la pastilla con 1 ml de alcohol etílico al 75% (en este paso se puede hacer alto y dejar a 4 °C por una semana o a -20 °C por un año).
- 11.- Se da vortex a la muestra y se centrifuga a 7500 G por 5 minutos a 4 °C y se descarta el sobrenadante.
- 12.- Se deja secar la pastilla por 5 minutos.
- 13.- Se resuspende la pastilla en 87.5 µL de agua DEPC.

Purificación del RNA con columna (RNeasy MinElute Cleanup kit (50) Cat. No.74204

- 14.- Se prepara el Mix DNasa y buffer (Kit Kiagen)
 - 87.5 µL (RNA resuspendido) + 100 µL de agua libre de nucleasas
 - 10 µL de buffer RDD
 - 2.5 µL de solución stock de DNasa I → Vf (Mix) = 200 µL
- 15.- Se mezcla todo el mix de DNasa y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 16.- Se agregan 350 µL de buffer RTL y se mezcla (por inversión).
- 17.- Se añaden 250 µL de alcohol etílico absoluto y se mezcla por pipeteo.
- 18.- Se transfiere la mezcla (700 µL) a la columna (previamente rotulada) dentro del tubo de 2 ml, se cierra la tapa de la columna y se centrifuga a 8000 G por 20 segundos. Se descarta el tubo y se coloca la columna en uno nuevo.
- 19.- Se añaden 500 µL de Buffer RPE, se cierra la tapa y se centrifuga a 8000 G por 20 segundos. Se decanta el líquido del tubo y se vuelve a colocar en la columna.
- 20.- Se añaden 500 µL de alcohol etílico (80%) . Se cierra la tapa de la columna, se centrifuga a 8000 G por 2 minutos. Se decanta el líquido del tubo y se coloca nuevamente en la columna.
- 21.- Con la tapa abierta se centrifuga la columna dentro del tubo a máxima velocidad (8000G) por 5 minutos. Se descarta el líquido, se rotulan nuevos tubos (1.5 ml) y en ellos se coloca la columna.
- 22.- Se agregan 25 µL de agua libre de RNasas en el centro de columna, se centrifuga por 1 minuto a 8000 G (hacerlo 2 veces), usando el mismo volumen de 25 µL → desechar la columna.
- 23.- Se almacena la muestra a -20 °C.

6. Anexo F

RT-qPCR en 2 pasos

Kit Go Taq Probe 2-Step RT-qPCR System.

Templado de RNA: 1000 ng

Desnaturalización de RNA y primers.

1) En hielo combinar el RNA y los primers de la siguiente manera:

Componentes para una reacción

	1X
RNA (1000 ng)	-
Primers Oligo dT (0.5 µg/µL)	1 µL
Primers Random (0.5 µg/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	-
	Vf = 7 µL

2) Cerrar cada tubo. Colocar los tubos en un baño maría (70 °C) por 5 minutos. Enfriar en agua inmediatamente con hielo durante 5 minutos. Centrifugar por 10 segundos los tubos. Mantener los tubos en hielo.

Alineamiento de primers y síntesis de cDNA

3) Preparar la mezcla de reacción inversa mediante la combinación de los siguientes componentes en tubos de 1.5 mL en hielo:

Componentes para una reacción

	1X
Agua libre de nucleasas	4.9 µL
Buffer de Rx 5X (Go script)	4 µL
MgCl ₂	1.6 µL
Mix nucleótido PCR	1 µL
Inhibidor de Ribonucleasa	0.5 µL
Transcriptasa inversa	1 µL

Vf = 13 µL

- 4) Determinar los volúmenes necesarios para cada componente. Dar vortex suavemente y mantener en hielo antes de colocarlos en los tubos de reacción.
- 5) Añadir 13 µL del Mix de reacción de transcripción inversa a cada tubo para PCR (Vf = 20 µL).
- 6) **Alineamiento.** Colocar los tubos en un termociclador a temperatura controlada. 25 °C por 5 minutos.
- 7) **Extensión.** Incubar los tubos en el termociclador a 42 °C por 45 minutos (hasta 2 h)
- 8) **Inactivación de la transcriptasa inversa.** Incubar los tubos en el termociclador a 70°C por 15 minutos.
- 9) Almacenar el cDNA a -20 °C.

qPCR

**Reconstitución de sondas y primers.*

Se realiza de acuerdo al Prime Time qPCR Assay Resuspension Protocol atendiendo las recomendaciones y usando 250 µL de TE (1X) para obtener una concentración 40 X.

- 1) Preparar la mezcla de reacción mediante la combinación de la sonda Go taq qPCR, Master mix, cebadores, sondas de hidrólisis de PCR y agua libre de nucleasas como se muestra a continuación:

Componentes para una reacción

	1X
Go taq qPCR 2X (Master mix)	5 µL
Primers/sonda	0.25 µL
Templado de cDNA	1 µL
Agua libre de nucleasas	3.75 µL
	Vf = 10 µL

- 2) Sellar placa, dar vortex y spin por 12 segundos.
- 3) Programar el equipo y diseñar plantilla.
- 4) Correr el ensayo.

7. Anexo G

Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

Estandarización

Oligos marcados con biotina

1nmol =1000 pM

1 pM = 1000 fM

- 1) Centrifugar los tubos antes de abrir para concentrar el contenido en el fondo del tubo.
- 2) Resuspender los oligos en agua estéril.

Concentración de trabajo (Oligo biotinilado)

6.2 nanomoles en total del dúplex marcado→6200 pM diluir en 620 μ L de agua estéril →10 pM→10,000 fM.

Realizar diluciones: 1:10,000; 1:1000; 1:500; 1:100.

Concentración de trabajo (Oligo no biotinilado)

590.7 nanomoles en total del dúplex marcado→590,700 pM diluir en 590 μ L de agua estéril →1000 pM.

Realizar diluciones: 1:500; 1:100.

PCR punto final

Estandarización

Para la amplificación de los promotores de los plásmidos de interés

- 1) Resuspensión de primers (1:10) → 13 y 11 pM/ μ L
- 2) Resuspensión de plásmidos (1:10)→ 3 ng / μ L
- 3) Amplificar con el kit para marcaje (Qiagen)

Componentes para una reacción

	1X
Buffer PCR 5X	5 μ L
MgCl ₂ 25 mM	1.5 μ L
Fwd primer	1 μ L
Rev Primer	1 μ L
dNTPs 10 mM	0.5 μ L
Taq DNA pol 5U/ μ L	0.125
DNA (1-10 ng)	3
Agua estéril	12.87 μ L
	Vf = 25 μ L

Amplificación con el kit para marcaje (Qiagen)**Componentes para una reacción**

	1X
10X PCR Labeling Buffer	2 μ L
Biotin PCR labeling Mix	2 μ L
Fwd primer	1 μ L
Rev Primer	1 μ L
Taq. Polimerasa	0.5 μ L
DNA (1-10 ng)	3
Agua estéril	10.5 μ L
	Vf = 20 μ L

Programa de amplificación

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	1 minuto
Desnaturalización	95 °C	30 segundos
Alineamiento	56 °C	1 minuto
Extensión	72 °C	1 minuto
Extensión final	4 °C	10 minutos
30 ciclos		

QI Aquick PCR Purification Kit # 28106 (Qiagen)

- 1) Añadir 5 volúmenes de buffer PB a un volumen del mix de reacción de PCR (tubo de 2ml)
 - Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 µL (3M acetato de sodio) pH 5.0. El color de la mezcla cambia a amarillo.
 - Si no cambia de color pues no agregar nada.
- 2) Colocar el volumen anterior al centro de la columna QIAquick encontrada dentro del tubo colector de 2 ml (rotular todo) .
- 3) Para unir el ADN a la membrana de la columna, centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm.
 - Desechar el fluido terminado y colocar la columna QIAquick de regreso al mismo tubo.
- 4) Para lavar, añadir 0.75 ml de buffer PE a la columna QIAquick y centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm.
 - Desechar el fluido terminado y colocar la columna QIAquick de regreso al mismo tubo.
- 5) Centrifugar la columna una vez más en el tubo colector de 2 m para eliminar el buffer de lavado residual.
- 6) Colocar cada columna en un tubo nuevo de centrifuga (1.5 ml).
- 7) Para eluir el DNA, añadir 50 µL de buffer EB o agua estéril en el centro de la membrana.
 - Para aumentar la concentración, añadir 30 µL del buffer de elución en el centro.
- 8) Dejar la columna en reposo por 1 minuto y después centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm.

- 9) La purificación del DNA puede ser analizado en un gel de agarosa (1 – 1.5 %) añadiendo 1 volumen del colorante indicado (Gel red) a 5 volúmenes de DNA purificado.

-Mezclar la solución por pipeteo (arriba y abajo). Posteriormente se puede observar el gel.

Extracción de proteínas nucleares

- Para células adherentes, levantar la cosecha con tripsina y luego centrifugar a 500 g por 5 minutos.
- Lavar las células resuspendiendo el sedimento celular con PBS.
- Transferir $1-10 \times 10^6$ a un tubo de microcentrifuga (1.5 mL) y precipitar mediante centrifugación a 500 g/2-3 minutos.
- Utilizar una pipeta para retirar el sobrenadante y desechar, dejando el sedimento celular lo mas seco posible.

(μ L)	CER I (μ L)	CERII (μ L)	NER (μ L)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1000	55	500

- 1) Dar vortex al tubo (máxima velocidad) por 15 segundos, para resuspender por completo el sedimento celular. Incubar el tubo en hielo por 10 minutos.
- 2) Añadir CER II (en hielo) al tubo.
- 3) Vortex al tubo por 5 segundos (alta velocidad). Incubar el tubo en hielo por 1 minuto.
- 4) Dar vortex al tubo por 5 segundos (alta velocidad). Centrifugar el tubo por 5 minutos a máxima velocidad (16,000 r.p.m)
- 5) Transferir el sobrenadante (extracto citoplasmático) a un tubo claro pre-enfriado, colocarlo en hielo (almacenar a -80°C).
- 6) Resuspender el sedimento (insoluble) del paso 4 que contiene los núcleos, en NER enfriado con hielo.
- 7) Dar vortex a máxima velocidad por 15 segundos. Colocar en hielo y continuar vortex por 15 segundos cada 10 minutos (repetir 4 veces).
- 8) Centrifugar a máxima velocidad (16,000 r.p.m) en microcentrifuga por 10 minutos.

- 9) Transferir el sobrendante (extracto nuclear) a un nuevo tubo helado. Colocar en hielo (almacenar a -80°C).

Cuantificación de proteínas

Método Bradford

Estándar BSA (albúmina sérica bovina) \rightarrow 1 mg/ml

Curva de calibración

Estándares	Conc. Final ($\mu\text{g/mL}$)	Volúmen Estándar (μL)	Agua destilada (μL)	Reactivo B. (RB, μL)
C1	5	10	150	40
C2	10	20	140	40
C3	20	40	120	40
C4	30	60	100	40
C5	40	80	80	40
Blanco	-	-	160	40
Muestra (1 μL)	-	-	160	40
Volumen final			200	

Una vez preparadas las concentraciones necesarias para la curva de calibración, muestras problema y blancos en una placa de 96 pozos (triplicado) mezclar por pipeteo, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y leer la absorbancia de cada pozo a 595 nm en un lector de placas.

Determinar el promedio de las absorbancias y crear una curva estándar mediante regresión lineal, obtener la ecuación de la recta y obtener la concentración de cada muestra problema (multiplicar por el factor de dilución, 200).

8. Anexo H. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

Ensayo final

Componente	Concentración final	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3
Agua ultrapura	-	-	variable	variable
10X Buffer de unión	1 X	-	2 µL	2 µL
Poly (dI*dC) 1µg/ µL	50 ng / µL	-	1 µL	1 µL
DNA sin marcar (biotina)	4 pmol	-	-	variable
Extracto nuclear (Ebf2)	Sistema dependiente	-	variable	variable
DNA marcado (biotina)	20 fmol	variable	variable	variable
Volúmen final			20 µL	

Preparación del gel de poliacrilamida

Reactivos

Poliacrilamida
Agua destilada
TBE 1X
Persulfato de amonio
TEMED

Materiales

Vasos pequeños de precipitado
Cristales para hacer el gel
Sistema de soporte
Espaciadores para ajustar los vidrios
Tanque de electroforesis
Fuente de poder
Peines

	Gel separador	Gel concentrador
Agua miliQ estéril	2.85 ml	2.25 ml
Poliacrilamida	2.33 ml	0.672 ml
Tris-HCl pH 8.8	1.75 ml	0.98 ml
Persulfato de amonio	56 μ L	40 μ L
TEMED	7 μ L	7.9 μ L

Instrucciones:

- 1) Preparar primero el gel separador, al termino de añadir el TEMED mezclar por pipeteo y colocar inmediatamente sobre el sistema ensamblado hasta la marca previamente delimitada (añadir Et-OH al 70% después de la marca para eliminar burbujas), dejar el gel polimerizando.
- 2) Una vez polimerizado el gel separador, remover el Et-OH al 70% (lavar con agua destilada) y añadir la mezcla del gel concentrador (mezclar por pipeteo) y colocar el peine para posteriormente dejar polimerizando dicho gel.
- 3) Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente y lavar todos los pocillos ya formados con agua destilada

Electroforesis

- 1) Sumergir el sistema con los geles polimerizados en un tanque que contiene buffer de electroforesis para DNA (TBE 1X). Dicho tanque lleva dos electrodos: uno positivo y otro negativo (frecuentemente representados por colores rojo y negro, respectivamente) que serán conectados a una fuente poder.
- 2) Cargar las muestras de interés en los pocillos, utilizar o no el colorante de detección para DNA (Gel red 2.5X) diluido en el buffer de carga Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega).
*Incluir marcadores de peso molecular y controles (positivo y negativo).
- 3) Una vez finalizada la colocación de las muestras en cada pocillo del gel, cubrir el tanque con la tapa y conectar los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder.
- 4) Encender la fuente de poder y proceder a seleccionar el voltaje (100 V) y correr el gel durante 80 minutos.
- 5) Revelado del gel.
 - **Pre-run.** Realizar la electroforesis pero sin colocar las muestras en los pocillos del gel, esto para asegurar la eliminación del persulfato de amonio que pudiera afectar posteriormente al corrimiento final de las muestras, el tiempo de corrida es de 45 – 60 minutos a un voltaje igual a 100V.

Transferencia del gel a una membrana de Nylon.

- a) Preparación del buffer de transferencia (TBE 1X)
- b) Montar el sandwich en la base de la cámara de transferencia semiseca como se muestra a continuación:
 - Se utilizan 2 papeles filtro (Extra thick)
 - Se coloca luego la membrana Z probe (nylon)
 - Posteriormente se coloca el gel de poliacrilamida
 - Luego se colocan nuevamente 2 papeles filtros (Extra thick)
- 6) Finalmente se ensambla la cámara de transferencia, se coloca la tapa y conectan los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder.
- 7) Encender la fuente de poder y proceder a seleccionar el voltaje de interés.
 - 15 minutos a 10 Volts
 - 10 minutos a 15 volts
 - 5 minutos a 20 volts
- 8) Revelado del gel para comprobar la transferencia.

Entrecruzamiento.

Exposición de la membrana a luz ultravioleta por 15 minutos para fijar el DNA a la membrana.

Revelado de la membrana

Emplear el kit Light Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific) para la detección del DNA marcado con biotina.

- 1) Atemperar el buffer de lavado y bloqueo 4X incluidos en el kit (37 °C – 50 °C) en un baño maría (para disolver todo el contenido).
 - *El buffer de equilibrio se puede usar a 4 °C o a temperatura ambiente.
- 2) Para bloquear la membrana se añaden 20 ml del buffer de bloqueo a un contenedor limpio y se incuba por 15 minutos con agitación suave.
- 3) Preparar la solución (conjugado/bloqueo) mediante la adición de 66.7 µL del conjugado (estreptavidina-peroxidasa de rábano estabilizada) a 20 ml de buffer de bloqueo (dilución 1:300).

- 4) Decantar el buffer de bloqueo y sustituir por el conjugado (estreptavidina-peroxidasa estabilizada con buffer de bloqueo) e incubar la membrana en dicha solución 15 minutos con agitación suave.
- 5) Preparar la solución de lavado 1X mediante la adición de 40 ml de buffer de lavado 4 X con 120 ml de agua ultrapura (10 ml de buffer de lavado y 30 ml de agua).
- 6) Colocar la membrana en un nuevo contenedor y añadir 20 ml de solución de lavado 1 X.
- 7) Repetir el procedimiento 4 veces e incubar por 5 minutos con agitación suave.
- 8) Colocar la membrana en un nuevo contenedor y añadir 30 ml de Buffer equilibrador e incubar la membrana por 5 minutos con agitación suave.
- 9) Preparar la solución sustrato de trabajo mediante la adición de 6 ml de luminol más 6 ml de solución de peróxido estable (solución potenciadora).
- 10) Retirar la membrana de la solución equilibradora de sustrato, secar el borde de la membrana. Colocar la membrana en un contenedor limpio (verter la solución del sustrato de trabajo de modo que se cubra por completo la superficie (boca a bajo). Incubar por 5 minutos. No secar completamente. Exponer a rayos X (2-5 minutos).

9. Anexo H

Preparación de reactivos y soluciones.

Buffer Tris-HCl 1.5 M

pH = 8.8

Tris base 18.15 g → 100ml)

H₂O desionizada → 80 ml

Ajustar pH 8.8 (HCL)

Completar con H₂O → V_f = 150 ml

TBE 10X (1Lt)

108 g Tris base

55 g ácido bórico

40 ml de EDTA (pH 8.0) disolver todo en 800 ml de H₂O

Agua desionizada → V_f = 1000 ml

*facilitar la disolución con plancha de agitación.



UANL

UNIVERSIDAD DE NUEVO LEÓN



La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Estudios de Posgrado

Otorga la presente

CONSTANCIA

a la

Q.F.B. Griselda Aidé Cabral Pacheco

Por su participación en el Simposio de Área Básica con el tema "Papel de los elementos OLF-1 del promotor del Gen de Orexina (HCRT) en la regulación de su expresión" para el Programa de Maestría en Ciencias.

Realizado en esta institución el 15 de junio de 2017

"Alere Flammam Veritatis"

Dr. med. Edelmario Perez Rodríguez

Director

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector



La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación otorga
la presente

CONSTANCIA

a:

QFB Aidé Cabral Pacheco

por su asistencia al



XXIX CONGRESO NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

**“Translational Medicine,
From Bench to Bedside”**

Llevado a cabo del 4 al 7 de Octubre de 2017
en Monterrey, N.L. México
“Alere Flammam Veritatis”



Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez
Director



Dr. C. Guillermo Elizondo Riojas
Secretario de Fomento a la Investigación



Dr. med. José Gerardo González González
Subdirector de Investigación



Dr. med. Consuelo Treviño Garza
Coordinadora XXIX Congreso Nacional
de Investigación en Medicina

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación otorga
la presente

CONSTANCIA

a:
Dr.C. Adriana Sánchez García, QFB Aidé Cabral Pacheco, Dr.C. Viviana Chantal Zomosa Signoret,
Dr.C. Román Vidal Tamayo

por la presentación en ORAL del trabajo titulado:

"PAPEL DE LOS ELEMENTOS OLF-1 DEL PROMOTOR DEL GEN DE PREPRO-OREXINA EN LA REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN"



XXIX CONGRESO NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

"Translational Medicine,
From Bench to Bedside"

Llevado a cabo del 4 al 7 de Octubre de 2017
en Monterrey, N.L. México
"Alere Flammam Veritatis"



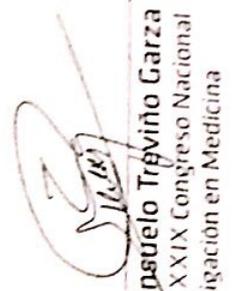
Dr. med. José Gerardo González
Subdirector de Investigación



Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez
Director



Dr. C. Guillermo Elizondo Riojas
Secretario de Fomento a la Investigación



Dr. med. Conatelo Traviño Garza
Coordinadora XXIX Congreso Nacional
de Investigación en Medicina

SPANDIDOS PUBLICATIONS UK LTD

5-6 Kings Street Cloisters

Clifton Walk

London W6 0GY

Tel +44 (0)20 7262 8050

Fax +44 (0)20 7262 9825

Registered Number 7341997 England

Av. Morones Prieto 4500 Pte
Mexico

August 09, 2017

Our reference: 189106

Journal: Molecular Medicine Reports

Title: Modular organization of a hypocretin gene minimal promoter.

Authors: Dr Adriana Sánchez-García, Ms Giselda Aidé Cabral-Pacheco, Dr Viviana Chantal Zomosa-Signoret, Dr Rocío Ortiz-López, Dr Alberto Camacho, Dr Paulo Miguel Tabera-Tarello, Mr José Alejandro Garnica-López, Dr Román Vidaltamayo

Dear Roman Vidaltamayo,

Thank you for your submission. The manuscript 'Modular organization of a hypocretin gene minimal promoter.' by Sánchez-García et al was provisionally accepted for publication in Molecular Medicine Reports on July 26, 2017. The submission should be considered to be formally accepted upon the receipt of proofs.

An author PDF file will be provided on publication.

Yours Sincerely,

Demetrios A. Spandidos

SPANDIDOS PUBLICATIONS UK LTD
5-6 KING STREET CLOISTERS
LONDON, W6 0GY, UNITED KINGDOM
VAT: 996278548
TEL: +442072628050 FAX: +442072629825