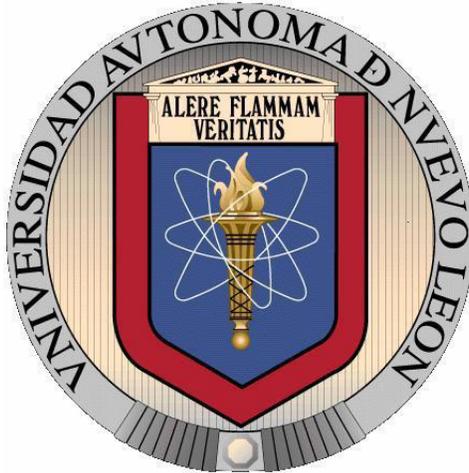


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ANÁLISIS DEL PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN EBF2 EN LA
REGULACIÓN DEL GEN DE OREXINA”**

PRESENTA

MC. ADRIANA SÁNCHEZ GARCÍA

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

NOVIEMBRE, 2016

Análisis del papel del factor de transcripción cbf2 en la regulación del gen de orexina.

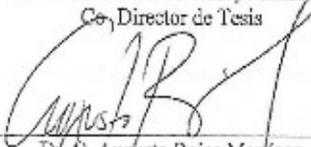
Aprobación de Tesis



Dra. C. Rocio Ortiz López
Directora de Tesis



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



Dr. E. Augusto Rojas Martínez
Miembro de la Comisión de Tesis



Dra. C. Viviana Chantal Zamosa Signoret
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. C. Gerardo Ruy mundo Padilla Rivas
Miembro de la Comisión de Tesis



Dra. med. Raquel Garza Guajardo
Subdirectora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortiz López, directora de esta tesis, por la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y de aprender tanto. Con gran respeto y admiración, mi ejemplo profesional a seguir.

Al Dr. Román Vidal Tamayo y a la Dra. Viviana C. Zomosa Signoret, por hacerme participe de las neurociencias y el enorme apoyo en el proyecto.

Al Dr. Augusto Rojas Martínez, por su valiosa crítica científica y ayuda en la realización de la tesis.

Al Dr. Gerardo R. Padilla Rivas, por su aportación al trabajo y su disposición a que todo saliera adelante.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por las facilidades prestadas siempre.

A mis compañeros de la Unidad de Genómica, los de antes y los de ahora, hicieron los días más amenos.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, por abrirme las puertas para realizar parte del proyecto en sus instalaciones.

Al Dr. Mario Simental Mendía, por la ayuda a lo largo del camino.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca Nacional otorgada.

DEDICATORIA

A Dios, que sigue llenando, sin duda, de bendiciones mi vida.

A mi esposo Mario, mi compañero, colega, amor y amigo, siempre conmigo.
Compartimos un logro más.

A mi pequeña Ady, porque sin saberlo todavía eres mi motivación para levantarme cada día y tratar de ser mejor. Siempre.

A mis padres Adriana y Vicente, por impulsarme a cumplir mis sueños, por su ejemplo de superación y entrega.

A mi hermana Mercedes y Romina, siempre están conmigo.

A mis suegros Rosa María y Luis, por estar conmigo y apoyarme como a una verdadera hija en la culminación de este objetivo profesional. Muchas gracias.

A toda mi familia.

RESUMEN

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Facultad de Medicina, UANL

Presenta: MC Adriana Sánchez García

Análisis del papel del factor de transcripción ebf2 en la regulación del gen de orexina

Introducción. Las orexinas o hipocretinas son neurotransmisores que se expresan en una pequeña población de neuronas del hipotálamo. Esta familia de péptidos se encarga de la modulación del ciclo de sueño-vigilia, el mantenimiento del estado de alerta, la ingesta de alimento y el sistema de recompensa. El creciente interés en entender su regulación se centra en el diseño de nuevas terapias para el tratamiento de trastornos del sueño, obesidad y adicciones. Nuestro grupo de investigación demostró previamente que la expresión de orexina disminuye en neuronas del hipotálamo de ratones con knock-out del gen para el factor de transcripción ebf2 y que el promotor de este gen contiene dos sitios potenciales de unión para ebf2 (sitios olf-1).

Objetivo. Analizar el papel del factor ebf2 en la regulación transcripcional del gen de orexina.

Material y Métodos. Se analizó la participación del factor de transcripción ebf2 sobre la regulación de la expresión controlada por el promotor murino del gen de orexina *in vitro* en un ensayo reportero de luciferasa, en donde se transfectaron plásmidos que portaban la secuencia original y modificada del promotor murino en líneas celulares que sobreexpresan ebf2. Por otra parte, se evaluó la unión *in vitro* usando un ensayo de retardo de movilidad electroforética para evidenciar el retraso en la migración de la secuencia del promotor murino original en presencia y ausencia del factor ebf2. Finalmente, se determinó el nivel de expresión relativa del factor de transcripción ebf2 y los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1, represores de la expresión de orexina, en células gliales, neuronales y no neuronales para correlacionar su expresión con los resultados del ensayo reportero de luciferasa.

Resultados. La transfección del promotor murino de orexina con la secuencia wild-type promueve la activación del gen reportero de luciferasa en los tres modelos celulares empleados. Se encontró que las deleciones y mutaciones en uno o ambos sitios olf-1 en la secuencia del promotor murino mínimo resultan en una modificación de la señal del gen reportero que difiere de acuerdo a la línea celular transfectada, probablemente por la expresión de factores de transcripción y proteínas accesorias adicionales diferentes entre

los tipos celulares. El ensayo de retardo de la movilidad electroforética reveló que el efecto del factor de transcripción ebf2 sobre el promotor de orexina se ejerce de manera indirecta al no evidenciar la unión *in vitro* en las condiciones experimentales probadas. El análisis de expresión indicó que la sobreexpresión de ebf2 disminuye el nivel de expresión de los receptores nucleares Nr6a1 y Nr4a1, represores previamente reportados, de la expresión de orexina.

Conclusiones. El factor de transcripción ebf2 promueve la activación del promotor de orexina murino en un ambiente neuronal y no neuronal *in vitro*. El efecto se debe a una regulación indirecta a nivel de locus de orexina, ya que no existe unión *in vitro* entre ebf2 y el promotor murino de orexina, bajo las condiciones experimentales ensayadas. Además, ebf2 induce una disminución en la expresión de los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1. De esta manera, ebf2 podría contribuir en el proceso de especificación del tipo neuronal orexigénico a través de su interacción con otros factores y cofactores. Esta investigación aporta información valiosa esclareciendo, en parte, la participación de ebf2 sobre la regulación de orexina, lo cual resulta trascendente por la probable aplicación en tratamientos de desórdenes del sueño, ingesta y adicciones.

Patrocinio del Trabajo. CONACYT No. 220342 y Vicerrectoría Académica-UDEM No. 14011 y 15027 otorgados a RVT, CONACYT No. 220006 otorgado a VCZS y Beca Nacional CONACYT 290733 otorgada a ASG.

ÍNDICE

1. Introducción	
1.1 Generalidades del sistema de orexina	17
1.2 Receptores de orexina	18
1.3 Neuronas del sistema de orexina e inervaciones	20
1.4 Función e implicación biológica	21
1.5 Aplicaciones del conocimiento de orexina	27
1.6 Factores de regulación que influyen en la actividad de orexina	29
1.7 Biología molecular de orexina	32
1.8 Expresión y regulación génica de orexina	32
1.9 Regulación del promotor del gen de orexina	33
2. Antecedentes	40
3. Justificación	43
4. Hipótesis	44
5. Objetivos	
5.1 Objetivo General	44
5.2 Objetivos Específicos	44
6. Material y Métodos	
6.1 General	
6.1.1 Consumibles	45
6.1.2 Reactivos	45
6.1.3 Materiales	45
6.1.4 Equipos de Laboratorio	46
6.1.5 Programas Computacionales	46
6.2 Lugar de realización	46
6.3 Estrategia General	47
6.4 Análisis del papel del factor de transcripción ebf2 sobre la regulación de la expresión controlada por el promotor del gen de orexina <i>in vitro</i>	
6.4.1 Diseño de secuencias	48

6.4.2 Construcción de vectores reporteros de expresión	48
6.4.3 Secuenciación de construcciones con el promotor de orexina	50
6.4.4 Cultivo celular	51
6.4.5 Ensayo reportero de luciferasa	52
6.4.6 Análisis de resultados	53
6.5 Determinación de la unión del factor de transcripción ebf2 a la región promotora del gen de orexina en un modelo <i>in vitro</i>	
6.5.1 Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)	53
6.5.2 Síntesis y marcaje del promotor del gen de orexina murino	54
6.5.3 Extracción de proteínas nucleares de la línea HEK-293/ebf2	55
6.5.4 Ensayo de retardo del sistema ebf2-promotor de orexina	56
6.6 Determinación del nivel de expresión relativa del factor de transcripción ebf2 y los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1 en células gliales, neuronales y no neuronales	
6.6.1 Extracción de RNA de cultivo celular	58
6.6.2 RT-qPCR	58
6.6.3 Análisis de resultados	60
7. Resultados	
7.1 Análisis del papel del factor de transcripción ebf2 sobre la regulación de la expresión controlada por el promotor del gen de orexina <i>in vitro</i>	61
7.2 Determinación de la unión del factor de transcripción ebf2 a la región promotora del gen de orexina en un modelo <i>in vitro</i>	72
7.3 Determinación del nivel de expresión relativa del factor de transcripción ebf2 y los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1 en células gliales, neuronales y no neuronales	78
8. Discusión	85
9. Conclusiones	91
10. Perspectivas	92
11. Referencias	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de Orx. Las isoformas A y B se derivan de un polipéptido común, la prepro-orexina. Orx actúa por medio de su unión a dos receptores acoplados a proteínas G, OX ₁ R y OX ₂ R.	17
Figura 2. Diagrama de la estructura general de un receptor acoplado a proteínas G, como los receptores de Orx. Todos los receptores de este tipo contienen 7 regiones transmembranales tipo α -hélice.	19
Figura 3. Vía de señalización de los receptores de Orx acoplados a proteínas G.	20
Figura 4. Proyecciones neuronales y localización de los receptores en el sistema nervioso central.	21
Figura 5. Organización estructural del gen humano de orexina, análogo al del ratón, y su mRNA. Los exones se muestran como recuadros sombreados.	32
Figura 6. Diagrama de la región promotora del gen de Orx. Se muestran los elementos OE1 y OE2 así como la región de 3.2 kb (sombreado claro) definida inicialmente que contiene los elementos necesarios para la expresión del gen y la porción de 450 pb (sombreado oscuro) con actividad promotora <i>in vitro</i> .	34
Figura 7. Región reguladora del gen humano de Orx reportada por Tanaka. Se observan dos porciones altamente conservadas OE2 y OE1, 5 repeticiones Alu y un elemento DR0, NurRE, sitio de unión putativo para el factor NR6A1.	36
Figura 8. Plásmido pNiFTy3-lucia que porta la secuencia del gen reportero de luciferasa y confiere resistencia a zeocina.	48
Figura 9. Estrategia de clonación seguida para la obtención de los siete constructos que portan las diferentes versiones del promotor de Orx evaluados en el trabajo.	50
Figura 10. Esquema de la secuencia del promotor murino de Orx y las modificaciones incluidas para la evaluación de la expresión controlada por el promotor <i>in vitro</i> .	62
Figura 11. Gel de agarosa al 2% representativo de la caracterización por restricción NotI + NcoI del plásmido pIDTSMART con los promotores de aproximadamente 400 pb.	63

Figura 12. Gel de agarosa al 2% representativo de la caracterización por restricción NotI + NcoI del plásmido pNiFTy3-lucia.	63
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% representativa de la reacción de ligación del promotor Delta-1.	64
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la transformación de colonias representativas con la reacción de ligación.	65
Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de DNA plasmídico por el método fluorescente con Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit.	65
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de los promotores de Orx para su posterior PCR de marcaje y secuenciación capilar.	66
Figura 17. Microscopias del cultivo celular de los modelos celulares de la línea humana HEK-293, de rata C6 y de ratón mHypoA-CLU450.	67
Figura 18. Señal del reportero de luciferasa al transfectar con las diferentes versiones de los promotores de Orx en las líneas celulares que sobreexpresan ebf2 HEK-293/ebf2 y C6/ebf2 así como en la de hipotálamo de ratón, el sistema celular de expresión natural. *P<0.001 <i>Vs</i> grupos indicados, **P<0.001 D1 <i>Vs</i> D2 y D1/D2.	69
Figura 19. Ensayo reportero de luciferasa de las líneas semiestables transfectadas con el promotor wild-type. *P<0.001 <i>Vs</i> C6/ebf2, ⁺ P<0.001 <i>Vs</i> C6/ebf2 e Hyp, P<0.001 24 h <i>Vs</i> 48 h <i>Vs</i> 72 h para todas las líneas.	71
Figura 20. EMSA del sistema control con extracto antigénico nuclear de Epstein-Barr (Extracto EBNA) y DNA al que se une (EBNA-DNA) revelado por quimioluminiscencia.	73
Figura 21. Amplificación en electroforesis en gel de agarosa al 2% separado en buffer TBE 1x del promotor wild-type de Orx de la PCR con y sin biotina.	73
Figura 22. Gel representativo de agarosa al 2% de la restricción de los amplicones con y sin marcaje de biotina del promotor de Orx murino wild-type de 390 pb, indicando la eliminación de las secuencias flanqueantes adicionales que pertenecen al plásmido reportero producto de la clonación.	74
Figura 23. Dot-blot manual (hand-spotting) para corroborar el marcaje con biotina del fragmento del promotor wild-type biotinilado (*WT).	74

Figura 24. Curva estándar de referencia para la cuantificación de las fracciones proteicas de citoplasma y núcleo de células HEK-293/ebf2.	75
Figura 25. SDS-PAGE al 12% de las proteínas citoplasmáticas y nucleares extraídas de la línea celular HEK-293/ebf2 teñidas con azul de Coomassie.	76
Figura 26. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética del promotor de Orx versión wild-type, donde se observa que la incubación con extracto nuclear no produce el retardo en la migración del fragmento del promotor.	76
Figura 27. Curva de eficiencia de la amplificación con la sonda Ebf2 en células HEK-293/ebf2 con 5 puntos de concentración.	78
Figura 28. Curva de eficiencia de la amplificación con la sonda Nr6a1 en células humanas HEK-293/ebf2.	79
Figura 29. Curva estándar de eficiencia de amplificación con la sonda Nr4a1 en células de hipotálamo de ratón mHypoA-CLU450.	79
Figura 30. Curva estándar que demuestra la eficiencia de la amplificación con la sonda de GAPDH, gen endógeno seleccionado, en células C6/ebf2 de rata. GAPDH se evaluó en cada organismo para verificar su amplificación.	79
Figura 31. Curva representativa de la amplificación de las muestras problema con las sondas de GAPDH, Ebf2, Nr6a1 y Nr4a1 en células HEK-293/ebf2.	80
Figura 32. Curva representativa de la amplificación de Ebf2, Nr6a1 y Nr4a1 en células C6 parentales y en células C6 que sobreexpresan el factor de transcripción ebf2.	81
Figura 33. Curva de la amplificación de Nr6a1 en las células de hipotálamo de ratón mHypoA-CLU450 leídas en el canal de fluorescencia de Cy5 (618-660 nm).	81
Figura 34. Análisis de expresión del factor de transcripción Ebf2 en todas las líneas celulares.	82
Figura 35. Expresión relativa del receptor nuclear Nr4a1 determinado por qPCR en los diferentes tipos celulares. *P<0.001 <i>Vs</i> todos los grupos, †P<0.001 <i>Vs</i> HEK-293/ebf2, ‡P<0.001 <i>Vs</i> líneas C6.	83
Figura 36. Análisis de expresión relativa para Nr6a1. *P<0.001 <i>Vs</i> todos los grupos, ‡P<0.001 <i>Vs</i> líneas C6.	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los antecedentes más recientes y relevantes en el estudio de la expresión y regulación transcripcional del gen de Orx.	41
Tabla 2. Reacción para la amplificación de los promotores de Orx insertados en los vectores de expresión construidos.	51
Tabla 3. Condiciones del marcaje con biotina de las secuencias de los promotores de Orx murinos.	54
Tabla 4. PCR para la síntesis del promotor de Orx incorporando el marcaje con biotina.	55
Tabla 5. Doble digestión NotI-NcoI usada en el corte del amplicón del promotor de Orx con y sin biotina.	55
Tabla 6. Gel de poliacrilamida al 10% empleado en el ensayo de retardo.	57
Tabla 7. Condiciones de reacción utilizadas en las reacciones de unión del ensayo de retardo, según las recomendaciones del kit LightShift Chemiluminescent EMSA.	57
Tabla 8. Condiciones recomendadas por el kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR para la síntesis de cDNA. La reacción se saturó con el máximo recomendado de RNA.	58
Tabla 9. RT-PCR de Ebf2, Nr4a1, Nr6a1 y Gapdh de acuerdo al inserto del kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR.	59
Tabla 10. Condiciones de qPCR especificando volúmenes y concentraciones finales. Todas las reacciones se prepararon de la misma manera con su sonda de hidrólisis.	59
Tabla 11. Comparación de las cuantificaciones de las midipreparaciones plasmídicas obtenidas por espectrofotometría UV y el método fluorescente de Picogreen.	66
Tabla 12. Luminiscencia registrada en células humanas y de rata que sobreexpresan el factor de transcripción ebf2. *P<0.01 <i>Vs</i> HEK-293, **P<0.01 <i>Vs</i> C6, ***P<0.01 <i>Vs</i> C6/ebf2.	68
Tabla 13. Eficiencias de amplificación determinados en 5 órdenes de magnitud (0.1-1000 ng de RNA).	80

ABREVIATURAS

%	Por ciento
2^{-dCt}	2 a la menos delta Ct
2^{-ddCt}	2 a la menos delta delta Ct
Abs	Absorbancia
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
AUG	Codón de inicio de la traducción
β	Beta
BSA	Albumina sérica bovina
C6	Glioblastoma de rata, línea celular parental
C6/ebf2	C6 que sobreexpresa ebf2
cbp	Cuanto baste para
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
Ct	Ciclo umbral
Cy5	Cianina 5
DMEM	Medio de cultivo Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBNA	Antígeno nuclear del virus Epstein-Barr
ebf2	Early b cell factor 2, factor de transcripción
EEG	Electroencefalograma
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
°C	Grados centígrados
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CO ₂	Dióxido de carbono
COE	Collier/Olf/Ebf
D1	Delta-1, promotor con delección en el 1er sitio olf-1 río arriba del TSS

D2	Delta-2, promotor con delección en el 2do sitio olf-1 río arriba del TSS
D1/D2	Delta-1,2, promotor con delección en ambos sitios olf-1
DMSO	Dimetilsulfóxido
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR0	Elemento de repetición directa 0
FAM	6-carboxifluoresceína
fmol	femtomoles
Foxa2	Forkhead box A2, factor de transcripción
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosín trifosfato
h	Horas
Hert	Hipocretina
HEK-293	Human Embryonic Kidney, línea celular parental
HEK-293/ebf2	HEK-293 que sobreexpresa ebf2
5'HEX	5'-hexafluoresceína
bHLH	Hélice-giro-hélice
mHypoA-CLU450	Hipotálamo de ratón, línea parental
Hyp	Línea celular mHypoA-CLU450
IFN	Interferón
Igfbp3	Insulin like growth factor binding protein 3, factor de transcripción
IP3	Inositol trifosfato
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltones
KO	Knock-out
M	Molar

MCH	Hormona concentradora de melanocitos
min	Minutos
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mut-1	Promotor con mutación en 1er sitio olf-1 río arriba del TSS
Mut-2	Promotor con mutación en 2do sitio olf-1 rio arriba del TSS
Mut-1,2	Promotor con mutación en ambos sitios olf-1
ng	Nanogramos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NPY	Neuropéptido Y
Nr6a1	Receptor nuclear subfamilia 6 grupo A miembro 1, factor de transcripción
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
Orex	Orexina
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
RNA	Ácido ribonucleico

mRNA	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SE	Error estándar
seg	Segundos
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SNC	Sistema nervioso central
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA
TBS	Tris-Buffer-Saline
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
tWT	Transfección semiestable con promotor de orexina wild-type
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	Núcleo preóptico ventrolateral
Vol	Volumen
<i>Vs</i>	Versus
WT	Wild-type, promotor con secuencia original reportada en Ensembl

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del sistema de orexina

Las orexinas (Orx), a menudo llamadas también hipocretinas (Hcrt), constituyen una familia de péptidos descritos recientemente que no presentan homología con alguno antes reportado. En 1998, su identificación se reportó por dos grupos independientes de investigadores que utilizaron estrategias completamente diferentes (Lecea *et al*, 1998; Sakurai *et al*, 1998). Su expresión se restringe al tejido cerebral, específicamente, a una pequeña población de neuronas del hipotálamo de la región lateral, aunque tienen numerosas proyecciones que inervan otras áreas del sistema nervioso central (SNC). La estructura de Orx pertenece a la familia de neuropéptidos de incretina, que se encuentra bien conservada en diferentes especies durante la evolución. A la fecha, se conocen dos tipos: orexina A y orexina B.

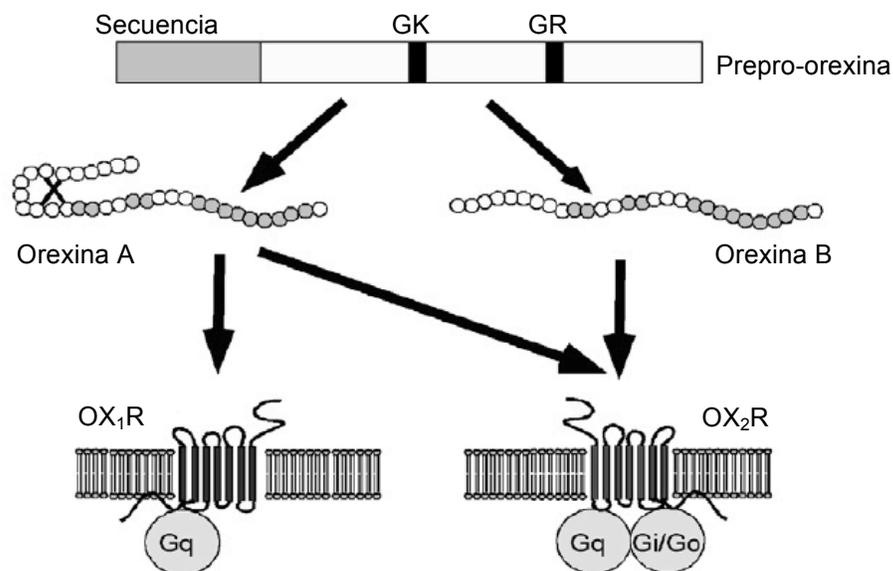


Figura 1. Sistema de Orx. Las isotformas A y B se derivan de un polipéptido común, la prepro-orexina. Orx actúa por medio de su unión a dos receptores acoplados a proteínas G, OX₁R y OX₂R. G: glicina, K: lisina, R: arginina. (Modificado de Ohno y Sakurai, 2008).

La orexina A (OxA) o hipocretina 1 (Hcrt1) es una cadena de 33 aminoácidos de 3.56 kDa y una estructura conservada entre varias especies de mamíferos, entre ellos humanos, ratas, ratones y perros. Posee residuos de glutamina en su N-terminal que se ciclan en un residuo piro-glutamil; una amidación, modificación post-trasduccional

común en los neuropéptidos, en el C-terminal producto de la proteólisis de la última glicina y dos puentes disulfuro intramoleculares en los aminoácidos Cys6-Cys12 y Cys7-Cys14. Por otro parte, la orexina B (OxB) o hipocretina 2 (Hcrt2) es un péptido de 28 aminoácidos de 2.93 kDa con un 46% de homología respecto a OxA, tiene en el C-terminal una amidación y consiste en dos α -hélices estables enlazadas por un pequeño conector. Ambas, provienen de un polipéptido precursor común, la prepro-orexina, de alrededor de 130 residuos en el humano y de 131, en el ratón. Este precursor tiene un péptido señal de secreción de 33 residuos en su extremo N-terminal, mientras que en el C-terminal se presentan la mayoría de las sustituciones de aminoácidos. Para dar lugar a las dos isoformas de Orx, el precursor se procesa en residuos específicos por enzimas especializadas (Ohno-Sakurai, 2008), como se muestra en la Figura 1.

1.2 Receptores de Orexina

OxA y OxB se unen y activan a dos receptores acoplados a proteínas G muy parecidos entre sí, llamados receptor de orexina-1 (OX₁R) y receptor de orexina-2 (OX₂R) (Sakurai *et al*, 1999). El receptor OX₁R es similar a otros receptores de neuropéptidos, posee una alta afinidad por OxA y una afinidad más baja por OxB. OX₂R tiene un 64% de homología con OX₁R; sin embargo, a diferencia de éste, es capaz de unirse con afinidad similar a OxA y OxB, por lo que no es considerado un receptor selectivo. Estos receptores se expresan en diferentes regiones del cerebro, siendo la principal el locus coeruleus en el caso de OX₁R y el núcleo tuberomamilar, en OX₂R y ambos se observan en el núcleo de raphe y el área tegmental ventral (Marcus *et al*, 2002). Los receptores son altamente específicos para Orx; neuropéptido Y, secretina, α -melanocortina y otros neuropéptidos no los activan. Además, la distribución que presentan es regionalmente específica y consistente con la localización de los axones neuronales y la expresión del mRNA de Orx, coincidiendo en algunas zonas pero complementándose en otras, lo que sugiere para cada uno un rol fisiológico diferente.

Para ejercer su función, OX₁R y OX₂R, se acoplan a un tipo especial de proteína que actúa como efectora desencadenando una cascada de señales intracelulares. Los receptores acoplados a proteínas G (GCPR), como los de Orx, son el tipo más diverso de receptor en la superficie celular (Figura 2). Sus funciones biológicas son muy diversas,

desde la visión y el olfato a la señalización neuronal y endocrina, que realizan a través del acoplamiento a proteínas G para la activación de segundos mensajeros, como el cAMP y el IP₃ (Lameh *et al*, 1990). Los GPCRs muestran características estructurales parecidas e incluyen receptores para hormonas y neurotransmisores. Aunque estos receptores son activados por diferentes ligandos y median diferentes respuestas celulares, todos intervienen en una vía de señalización similar (Lodish *et al*, 2000).

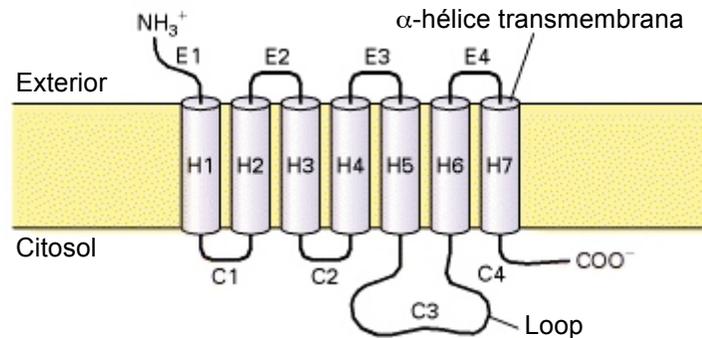


Figura 2. Diagrama de la estructura general de un receptor acoplado a proteínas G, como los receptores de Orx. Todos los receptores de este tipo contienen 7 regiones transmembranales tipo α -hélice. E1-E4: loops extracelulares; H1-H7: dominios transmembranales; C1-C4: loops citosólicos (Lodish *et al*, 2000).

El modelo básico de la señalización de GPCR radica en su capacidad de actuar como ligando activador de factores de intercambio del nucleótido guanina para proteínas heterotriméricas de unión a guanina que transmiten señales intracelulares a través de la activación de efectores, como enzimas o canales de iones (Figura 3). Los tres componentes principales de la señalización de GPCR son el receptor hepta-helicoidal, la proteína G heterotrimérica y la enzima efectora. El receptor detecta la presencia de la hormona o primer mensajero en el medio extracelular; la proteína heterotrimérica se disocia en una subunidad $G\alpha$ unida a GTP y un heterodímero $G\beta\gamma$ en respuesta a la interacción receptor-ligando. El efector, típicamente una enzima o canal iónico, es activado por el complejo $G\alpha$ -GTP o las subunidades $G\beta\gamma$ y produce un “segundo mensajero” que transmite la señal al interior de la célula (Luttrell, 2008). La presencia de múltiples etapas enzimáticas crea el potencial para la amplificación de la señal, con lo que la respuesta biológica se obtiene con sólo el 5% de la ocupación del receptor.

OX₁R acopla exclusivamente a proteínas G heterotriméricas de la subclase Gq/11, mientras OX₂R puede acoplarse con proteínas Gq/11 o Gi/o. La señalización a través de

la vía Gq resulta en la activación no selectiva de canales de cationes que lleva a la despolarización de la célula, mientras que la señalización por Gi/o activan canales interiores rectificadores de K^+ que producen hiperpolarización. Por lo anterior, se cree que la señal mediada por OX_1R es excitatoria a través de la estimulación mediada por Gq/11 de la fosfolipasa C, mientras que la señal de OX_2R puede ser excitatoria cuando se acopla a Gq/11 o inhibitoria por la inhibición de adenilciclasa cuando se acopla con Gi/o dependiendo de las neuronas postsinápticas (Nuñez *et al*, 2009).

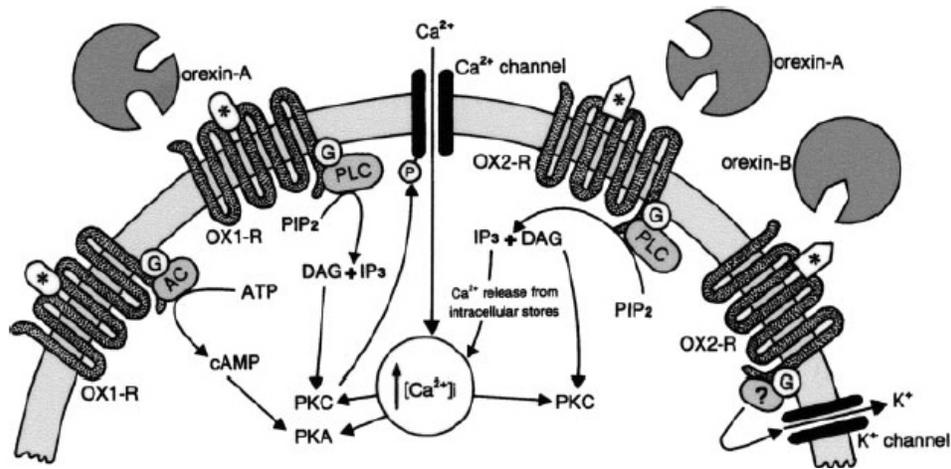


Figura 3. Vía de señalización de los receptores de Orx acoplados a proteínas G.

1.3 Neuronas del sistema de Orx e inervaciones

Las neuronas orexigénicas son de tamaño variable, con un diámetro del cuerpo celular de 15-40 μm y forma esférica, fusiforme o multipolar. Los axones son muy heterogéneos en su morfología, pueden ser gruesos y muy varicosos o delgados y ligeramente varicosos. Se ha estimado un total de 1 100 a 3 400 en el cerebro de la rata, 1500 en el ratón (DelaHerrán-Arita *et al*, 2011) y entre 50 00 y 80 000 en el cerebro humano (Ohno-Sakurai, 2008). Se sabe que las neuronas que expresan al precursor prepro-orexina, probablemente contienen tanto a OxA como a OxB. Los péptidos se encuentran dentro de vesículas secretorias en la terminal neuronal y esto ha sugerido que los dos tipos de Orx son liberados simultáneamente (Date *et al*, 1999).

Las neuronas productoras de Orx se ubican exclusivamente en la región del hipotálamo lateral, que se ha relacionado con una variedad de sistemas regulatorios de conductas como la alimentación, el sueño y el tono simpático, por lo que sugiere que participan en

estos procesos. En reportes previos, se ha observado que la inmunorreactividad a Orx en axones está ampliamente distribuida en el SNC incluyendo estructuras como el hipotálamo, séptum, tálamo, tallo cerebral y médula espinal (Martynska *et al*, 2005). Las neuronas hipotalámicas que expresan Orx han sido reconocidas como el origen de un sistema extenso y divergente de proyecciones que se ha corroborado inervan numerosas regiones (Marcus *et al*, 2001) y la distribución diferencial de sus receptores es consistente con los roles multifacéticos que se le atribuyen en la regulación de la homeostasis. Un diagrama general lo ilustra en la Figura 4.

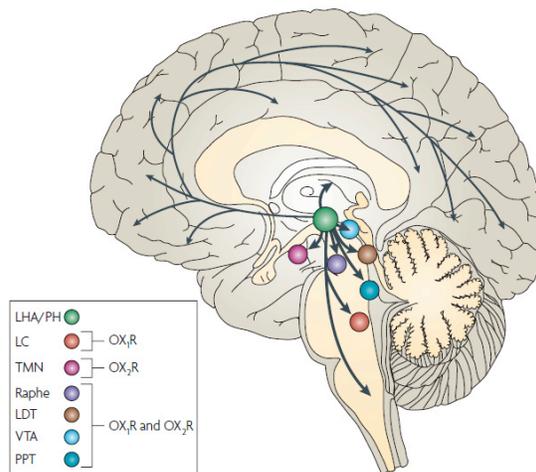


Figura 4. Proyecciones neuronales y localización de los receptores en el sistema nervioso central. Los círculos indican las regiones con alto número de receptores y las flechas, la proyecciones más densas que se conocen del sistema de orexina (Sakurai-Mieda, 2011).

1.4 Función e implicación biológica

La función del hipotálamo lateral se demostró con estudios de lesión y de estimulación eléctrica, poniendo de manifiesto su relevancia. Asimismo, las posibles funciones de Orx comenzaron a elucidarse desde su descubrimiento mediante la asociación de su deficiencia a un fenotipo en diversos modelos animales y a la relación anatómica de inervación y proyección aferente y eferente que se estableció con otras estructuras cerebrales, de las cuales se tenía información previa, con lo que se dio el punto de partida para la investigación de sus implicaciones biológicas. Ahora se sabe, que Orx está involucrada en la regulación de neurohormonas y en la secreción de hormonas pituitarias, la regulación autónoma y cardiovascular así como en el control de del ciclo del sueño-vigilia (Martynska *et al*, 2005), del cual se tiene amplio conocimiento al igual

que de la relación existente con la narcolepsia-cataplexia, un desorden del sueño. También se le ha atribuido un rol en el control de la ingesta de alimento, gasto de energía, mantenimiento del estado de alerta y termorregulación (Nuñez *et al*, 2009). Estudios recientes en neuronas productoras de Orx así como la caracterización fenotípica de ratones con alteraciones genéticas en el gen de Orx sugieren funciones adicionales en la coordinación emocional y el sistema de recompensa. A continuación, se describe individualmente algunas de las funciones más relevantes de Orx.

A. Sueño y vigilia

Al presente, Orx se considera como un péptido neuromodulador que promueve el estado de vigilia (Matsuki-Sakurai, 2008; Ohno-Sakurai, 2008). Aunque las neuronas orexigénicas son escasas, tienen una profusa proyección a regiones cerebrales involucradas en la promoción del despertar, el estado de vigilia activa y alerta así como la activación cortical. La evaluación de *Fos*, un marcador de actividad neuronal, durante los períodos de sueño y vigilia para determinar cómo cambia el patrón de las neuronas que expresan Orx, corroboró que la activación de estas neuronas está sincronizado y fuertemente asociado al estado de sueño o vigilia, presentando la mayor actividad en la vigilia y una menor actividad durante el sueño REM y NREM (Sakurai, 2007). Las neuronas orexigénicas también reciben un aporte importante del sistema límbico que podría ser fundamental para incrementar el estado de vigilia durante un estímulo emocional. La evidencia acumulada indica que el sistema de Orx regula el sueño-vigilia a través de interacciones con otros sistemas neuronales que, a su vez, regulan la emoción, el sistema de recompensa y la homeostasis de energía (Mieda-Sakurai, 2012). Debido a la conservación del sistema orexinérgico en diferentes especies, se cree que estas neuronas están involucradas en el monitoreo general del ambiente externo e interno del organismo, identificando lo que sea beneficioso para el individuo y reforzando un mecanismo adaptativo de alerta. Visto desde una perspectiva evolutiva, el mantenimiento de un estado de vigilia consolidado podría o pudo ser importante en la conducta de alimentación, ya que mantenerse despierto y en estado de alerta, especialmente, durante la búsqueda de comida y su ingesta era esencial para la supervivencia del animal (Sakurai, 2007).

Las neuronas de Orx regulan el sueño y la vigilia por medio de la recepción de señales neuronales aferentes y la activación de otros tipos neuronales como son las neuronas monoaminérgicas, histaminérgicas y colinérgicas en el hipotálamo y tallo cerebral. Dicha retroalimentación positiva tiene como objetivo mantener y consolidar la vigilia, especialmente, la activación de las neuronas monoaminérgicas (Sakurai, 2007). Las neuronas que contienen GABA, activas durante el sueño, envían proyecciones descendentes que se unen con las poblaciones neuronales promotoras de la vigilia. Durante el sueño, las neuronas activas en esta fase se encienden por acción de ciertas sustancias que promueven el sueño, como adenosina y, a su vez, las neuronas activas durante el sueño envían proyecciones inhibitorias a las neuronas de Orx. Tomando en cuenta lo anterior, se cree que agonistas del receptor de Orx podrían resultar útiles en el tratamiento de la narcolepsia y, al contrario, los antagonistas serían efectivos como inductores del sueño, hecho que ha comenzado a evaluarse con éxito para el tratamiento de desórdenes del sueño, como el insomnio (Hoever *et al*, 2012). Cuando se produce por alguna causa, ya sea en los niveles de Orx o en los receptores, una desregulación del sistema se presentan alteraciones en la consolidación de la vigilia y el sueño desencadenando un trastorno neurológico llamado narcolepsia (Chemelli *et al*, 1999; Lin *et al*, 1999; Sakurai *et al*, 2010; Tsujino-Sakurai, 2013). La interrupción del sistema orexigénico también se ha relacionado con otros desórdenes neurológicos e incluso, psiquiátricos como depresión, esquizofrenia y ansiedad (Li *et al*, 2016).

Orx como causa de narcolepsia. Probablemente, la función más estudiada y que cuenta con evidencia sustancial es la participación de Orx en la narcolepsia. La narcolepsia afecta al 0.02-0.16% de la población de Estados Unidos, Europa y Asia (Honda *et al*, 2009), se considera un desorden del sueño común debilitante y de por vida en el que se presenta una desorganización del estado de vigilia (Sakurai, 2003). El inicio de la enfermedad suele ser abrupto, ocurre típicamente en la adolescencia y se caracteriza por el excesiva somnolencia diurna, cataplexia (pérdida repentina del tono muscular activado por emociones) y manifestaciones anormales del sueño REM. Actualmente, se asume que la narcolepsia es una consecuencia directa de la hipofunción, probablemente, por degeneración de las neuronas que conlleva a un nivel bajo de Orx o

bien, a una falla en sus receptores. La narcolepsia se observa en humanos, perros y roedores, aunque la primera evidencia de esta relación vino de modelos caninos (Lin *et al*, 1999), para luego completarse con estudios en ratones KO y en humanos postmortem, teniendo como primeros hallazgos niveles indetectables de los péptidos de Orx en los sitios de proyección neuronal correspondiente así como una reducción de alrededor de 80-100% en el número de neuronas, sugiriendo la pérdida de estas células por degeneración o bien, atribuible a la falta de producción de Orx. Estudios realizados en pacientes narcolépticos sugieren que la neurotransmisión de Orx está alterada, hecho que concuerda con las anotaciones de modelos animales y el nivel de Orx en fluido cerebroespinal indetectable (Nishino *et al*, 2000). Sin embargo, a pesar del hecho que la deficiencia de Orx es reconocida como causa de narcolepsia, no está claro qué ocurre con las neuronas productoras de Orx. La razón de por qué dejan de expresar Orx, cómo se lleva a cabo este proceso degenerativo o apoptótico y qué mecanismo molecular se interrumpe son sólo algunas de las interrogantes que en futuros estudios se pondrá énfasis en responder.

B. Alimentación y homeostasis energética

Las orexinas se descubrieron en 1998, inicialmente, como reguladores de la ingesta de alimento (Girault *et al*, 2012). La región del hipotálamo lateral era considerada tradicionalmente como centro de ingesta por lo que, desde la localización anatómica de las neuronas orexigénicas en esta región, se hizo una asociación inmediata con la conducta de alimentación. Inicialmente, se realizaron lesiones en el hipotálamo de ratones y se observó como consecuencia hipofagia, somnolencia y falta de atención (Bernardis-Bellinger, 1996) y, a su vez, al administrar Orx se estimulaba el consumo de comida, hecho que respaldó la hipótesis de participación en la ingesta de alimento; adicionalmente, se evidenció un incremento en la actividad locomotora. De esta manera, se reconoció a Orx como reguladora de la conducta de ingesta, primeramente, por su exclusiva producción en el hipotálamo lateral y después, por la actividad farmacológica que se ha observado en modelos animales luego de su administración para la estimulación de ingesta o al revertir el efecto de la lesión. Se ha postulado la existencia de interacciones recíprocas entre los sistemas de Orx y límbico, el cual tiene un rol en la

regulación de la alimentación, papel sustentado en hallazgos de pacientes con narcolepsia que tienen una ingesta calórica disminuida pero un índice de masa corporal aumentado, indicando que la anormalidad que le da origen está conectada con una reducción en el gasto de energía o una tasa metabólica disminuida (Sakurai, 2007). Asimismo, las neuronas de Orx en la región lateral se conectan con las productoras del péptido relacionado con Agouti (CGRP) y neuropéptido Y (NPY); mediante métodos inmunohistoquímico se ha demostrado la interacción entre las terminales axonales de Orx y NPY (Ohno-Sakurai, 2008).

Las neuronas que expresan Orx son estimuladas también por la señal de hambre e hipoglicemia y se les atribuye un rol en la regulación de la tasa metabólica, al ser péptidos capaces de responder al nivel de lípidos circulantes (Pirnik *et al*, 2008). Las observaciones son consistentes con la hipótesis que las neuronas de Orx son activadas por un balance de energía negativo para evocar alteraciones de comportamiento adaptativo durante el ayuno.

Al establecer la participación del hipotálamo con la regulación de la ingesta de comida, por consiguiente, se planteó la afectación de la masa corporal y el balance de energía, aspectos íntimamente relacionados con la alimentación. El hallazgo de la ingesta calórica disminuida combinada con aumento en el índice de masa corporal apuntó a la existencia de anormalidades en la alimentación con un gasto metabólico menor (Schuld *et al*, 2000), anormalidad presentada en individuos con narcolepsia. Se sabe que las neuronas de Orx están involucradas en la regulación del circuito del apetito, que incluye la circulación de la hormona leptina, secretada por adipositos de acuerdo al total de tejido adiposo del cuerpo (Nuñez *et al*, 2009); también se regula por señales periféricas como grelina y glucosa que proveen una conexión entre la homeostasis de energía y el estado de alerta en la vigilia. Orx se ha relacionado con la regulación de la homeostasis de energía, promoviendo la reducción de la ingesta de alimento parcialmente mediada por la activación de las neuronas del NPY y la inhibición de las neuronas de pro-opiomelanocortina.

C. Neurohormonas

Orx tiene un rol en la regulación de la liberación de hormonas como la activación del eje pituitario-adrenal, afectando la liberación de glucocorticoides y un rol inhibitorio en la secreción de hormona de crecimiento (Sakurai, 2007), ya que la glándula pituitaria posee receptores de OxA y OxB tanto en adenohipófisis como en neurohipófisis (Kaminski-Smolinska, 2012). Orx participa en el control de la liberación de vasopresina, de la hormona liberadora de corticotropina y corticotropina (Spinazzi *et al*, 2006) en ratas, pero se piensa que las observaciones son aplicables a humanos. La expresión de los receptores de Orx así como su papel biológico en el eje hipotálamo-pituitaria, tracto gastrointestinal, páncreas endocrino y tejido gonadal han puesto al descubierto su acción global sobre sistemas que interactúan de forma indirecta.

D. Sistema nervioso autónomo

Algunos estudios han propuesto un rol en la regulación de la función autónoma de Orx demostrando que estimula fisiológicamente la actividad simpática, preparando al cuerpo para la acción mediante el aumento de la frecuencia cardíaca o la dilatación de las pupilas. La deficiencia de Orx podría disminuir el tono simpático, lo que podría resultar en una disminución del gasto de energía (Sakurai, 2007) con lo que se explicaría el índice metabólico disminuido observado en narcolépticos. Se ha demostrado que a través del sistema nervioso autónomo, Orx juega un rol clave en el control del metabolismo de glucosa y que estimula el flujo simpático para incrementar la temperatura corporal, ritmo cardíaco, presión sanguínea y actividad del nervio simpático (Girault *et al*, 2012; Mikulaskova *et al*, 2016).

E. Sistema de recompensa

Anatómicamente, las neuronas de Orx están bien localizadas para relacionarse con el sistema de recompensa de modo que han sido implicadas en su reforzamiento a través de la acción del sistema de dopamina del área mesolímbica (España, 2012). Algunas de las primeras evidencias que soportan esta teoría, vienen de estudios anatómicos que muestran proyecciones prominentes de Orx hacia las estructuras cerebrales implicadas en el sistema de recompensa (Peyron *et al*, 1998), como el núcleo accumbens y el área

tegmental ventral (VTA). En otros trabajos, se demostró que las neuronas dopaminérgicas del VTA contienen tanto OxA como OxB y que estos ejercen una acción excitatoria. Dadas estas observaciones, se ha puesto énfasis en definir la influencia de Orx en la conducta y la respuesta mediada por dopamina de la cocaína y otras drogas de abuso. También se ha demostrado que la actividad de las neuronas de Orx está fuertemente ligada a las preferencias por señales asociadas con drogas y recompensa de comida. La literatura indica que el sistema de Orx participa en el proceso de recompensa y conductas motivadas asociadas con sustancias adictivas, como cocaína. En una serie de estudios de varios grupos, se demostró que el uso de drogas de abuso resulta en la activación de las neuronas productoras de Orx. Por ejemplo, la aplicación aguda de metanfetamina o nicotina incrementa la inmunorreactividad a *Fos* en neuronas orexigénicas alrededor de un 300% en comparación al tratamiento con vehículo. Además, la exposición crónica a nicotina produce el incremento de los niveles de mRNA de Orx (España, 2012).

1.5 Aplicaciones del conocimiento de Orx

Se ha aprendido mucho acerca del papel de Orx en la regulación de la vigilia, el sueño, el control del peso corporal, metabolismo y la regulación de la conducta motivada, el sistema de recompensa y la adicción. De manera que, en un futuro cercano, un entendimiento más preciso de los mecanismos que regulan Orx se reflejarán en la aplicación en la práctica clínica. Con todos los hallazgos en la regulación del sueño y la vigilia por parte de Orx, se han traído la posibilidad de nuevas terapias para los desórdenes del sueño, incluyendo la narcolepsia y el insomnio, así como la posibilidad de innovar el tratamiento de las adicciones a drogas o la obesidad mediante el control de la ingesta de alimento como auxiliar en la dieta modulando el circuito de recompensa.

Ya se ha descrito un compuesto nuevo de administración oral que produce somnolencia a través del bloqueo selectivo de la señalización de Orx (Scamell-Saper, 2007). Almorexant es un antagonista dual, activo por vía oral y primero en su clase, de los receptores de Orx que se ha desarrollado recientemente para el tratamiento del insomnio primario (Neubauer, 2010). Con la información previa, se hipotetizó que con la disminución de la actividad de Orx tendría lugar un efecto promotor del sueño. Estudios

preclínicos y ensayos clínicos de fase I demostraron que almoxant disminuye el estado de alerta e incrementa el sueño en ratas, perros y humanos sanos cuando es administrado durante la fase activa del ciclo circadiano (Neubauer, 2010). No se ha encontrado problemas toxicológicos o de seguridad, ni evidencia de cataplexia. El reporte de eficacia y seguridad permitió el avance a ensayos clínicos de fase III sin resultados publicados aún. De acuerdo a otro reporte, almoxant mejora la calidad del sueño de manera dosis dependiente (Hoever *et al*, 2012).

Otro ejemplo es un antagonista de Orx (ACT-078573) que bloquea selectivamente ambos receptores a concentraciones nanomolares, aunque tiene poca afinidad por otros receptores acoplados a proteínas, por lo que no es completamente selectivo. El compuesto es activo vía oral y llega rápidamente al cerebro; cuando se administra a ratas durante el período de actividad, incrementa el sueño REM y NREM por, al menos, 12 horas. En un pequeño grupo de personas tratadas en ensayos clínicos con el mismo compuesto durante el día, varios se quedaron dormidos y cuando se permitió una siesta, se quedaron dormidos rápidamente. Muchos sedantes pueden dar una sensación de embriaguez o inestabilidad, pero estos efectos fueron extraordinarios con el antagonista. La somnolencia producida por este compuesto apunta que Orx promueve la vigilia, como se sugiere de la investigación en animales. Más importante, el compuesto podría tener otras aplicaciones clínicas. Las ventajas radican en que no produce los efectos de otras medicaciones para dormir, como las benzodiazepinas, ni cataplexia en tiempos cortos de administración. Aunque, por otro lado, parece no funcionar en todos los individuos tratados con la misma efectividad y partiendo el hecho que Orx no se libera en el sueño sino en la vigilia, se ha observado que no hay un efecto importante al administrarlo en el período de descanso (Scamell-Saper, 2007). Actualmente, en Estados Unidos se ha aprobado un antagonista del receptor de Orx para el tratamiento del insomnio (Chow y Cao, 2016).

Otros posible uso del antagonista de Orx se sugiere en la modulación del sistema de recompensa (Harris *et al*, 2005). El estímulo de recompensa como aquel que produce la cocaína, la morfina y la comida dispara la liberación de dopamina, cuya excesiva activación puede causar adicción. Orx potencia la señalización del sistema de recompensa; en ratones sin Orx, se ha visto que exhiben una menor conducta adaptativa

al ser tratados con morfina o anfetaminas. Así, al reducir la actividad del sistema de recompensa, un antagonista de Orx podría ser útil en el tratamiento de la obesidad o la adicción a drogas al reducir la ansiedad ante la comida o la droga en cuestión y el riesgo de recaída, como una medida complementaria a las terapias actuales incrementando el porcentaje de éxito del tratamiento. Sin embargo, en los animales tratados también se observó una disminución de actividad y falta de motivación que podría deberse a la somnolencia inducida por el antagonista o por la interrupción del sistema de recompensa. Así, antes de pensar en la administración como opción de tratamiento es necesario evaluar con más detalle qué otras vías podrían alterarse de forma secundaria a la interrupción del circuito de Orx y posibles efectos a mediano y largo plazo (Scamell –Saper, 2007).

1.6 Factores de regulación que influyen en la actividad de Orx

Al ser Orx un sistema complejo que recibe señales de múltiples orígenes para realizar una integración de ellas, se han enunciado diversos factores que intervienen en mediar su actividad. A manera de ordenar la información, se dividirán para su discusión en tres grupos: locales, sistémicos y moleculares. Los factores locales involucran aquellos que tienen origen en el mismo ambiente local de Orx, el SNC; los sistémicos, conciernen a señales generales del organismo que no sólo afectan a Orx, sino a la homeostasis en general y los moleculares, se centran en la regulación génica tejido-específica, sobre todo en el control de la transcripción y expresión de Orx, sobre los cuales se hace énfasis.

A. Factores locales

Con estudios de inmunorreactividad se ha visto la relación del sistema de Orx con otros mediante proyecciones densas que apuntan a la existencia de comunicación recíproca. La interacción resulta de interés para explicar mejor las funciones de Orx y definir qué otras áreas pueden influir en su regulación, siendo de particular interés:

1. Sistema límbico. Las neuronas de Orx reciben un aporte del sistema límbico, indicando un rol en la regulación y en la ingesta debido a que parte del contenido

afectivo de la percepción de la comida es procesado en la amígdala y el sistema límbico.

2. Áreas preópticas. El núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) tiene un rol crucial en el inicio y mantenimiento del sueño NREM. Debido a que las neuronas de Orx están inervadas por células del VLPO se cree que esta vía puede ser importante en el apagado de las neuronas de Orx durante el sueño.
3. Aporte neural general. Se han identificado poblaciones neuronales que envían inervaciones aferentes hacia la región de Orx en el cerebro como la de las neuronas colinérgicas, las que contienen GABA y las asociadas a la amígdala, entre otras. Los neurotransmisores y neuromoduladores secretados pueden activar o inhibir la actividad de Orx; las neuronas de Orx son tónicamente activadas por las neuronas glutamatergicas; noradrenalina y serotonina hiperpolarizan la membrana neuronal, con lo que se detiene la transmisión del impulso.
4. Sistema nervioso central. Aunque las proyecciones directas son escasas, hay una comunicación indirecta a través de ciertas estructuras que sí reciben inervación directa de SNC y se conectan con las neuronas de Orx, lo que indica que podrían recibirse influencias circadianas.

B. Factores sistémicos

Los factores humorales periféricos que están relacionados con el metabolismo de energía influyen en la actividad de Orx, consistente con la idea que las neuronas orexigénicas censan el estado nutricional del cuerpo. Las neuronas de Orx son necesarias para evocar la respuesta adaptativa durante el despertar en el ayuno, por lo que se cree que la depleción nutricional induce señales metabólicas que activan a las neuronas de Orx y éstas a su vez, incrementan el estado de vigilia activo reforzando las vías de búsqueda de comida y alimentación. Estos mecanismos son importantes en el mantenimiento de un estado de vigilia prolongado durante el período de actividad, en la regulación de la homeostasis de energía que ayuda a asegurar la supervivencia y, de manera interesante, podría obstaculizar los intentos para tratar la obesidad por medio de la restricción de comida. La transmisión de señales a larga distancia dentro del mismo líquido

cerebroespinal y las que se reciben de receptores extrasinápticos como leptina y glucosa son moduladores de Orx así como condiciones exógenas como privación de alimento, estrés y actividad física (Tanaka, 2012).

Se ha demostrado que el mRNA de prepro-orexina está sobreexpresado en condiciones de ayuno, indicando que las neuronas orexigénicas son capaces de censar el balance de energía del organismo. En un estudio hecho en 1999, se investigó el rol de Orx en la ingesta de alimento de la rata midiendo los niveles de mRNA de Orx en el hipotálamo bajo condiciones de ayuno, observando que los niveles de mRNA se incrementaban significativamente entre 90-170% luego de 48 h. En contraste, los niveles no se modificaron en condiciones de restricción crónica de comida, diabetes inducida, hipoglicemia cuando el alimento estaba disponible o mayor consumo voluntario de alimentos apetitosos. Por lo que se concluyó que la expresión de Orx no está relacionada con cambios en el peso corporal, insulina o leptina; sin embargo, se estimula con niveles bajos de glucosa en sangre en ausencia de alimento, sugiriendo que Orx podría participar en la regulación a corto plazo de la homeostasis de energía dando inicio a la respuesta de alimentación por disminución en la glucosa sanguínea (Cai *et al*, 1999). La disminución de la concentración de la glucosa extracelular produce despolarización e incrementa la frecuencia de los potenciales de acción de neuronas orexigénicas, mientras que un incremento induce una hiperpolarización y, con ello, el cese de los potenciales de acción (Sakurai, 2007). En otro reporte del mismo año se publicó, en contraste, la relación entre un nivel bajo de leptina y de glucosa en sangre con la sobreexpresión del mensajero (Griffon *et al*, 1999), por lo que es clara la influencia de estímulos múltiples de origen local y sistémico en la actividad de Orx siendo capaz de reaccionar a cambios en el ambiente interno (pH, glucosa, hormonas) y externo (actividad, ayuno, privación del sueño) regulando numerosas funciones fisiológicas a través de mecanismos de retroalimentación, incluso a nivel transcripcional (Tanaka, 2012) denotando los mecanismos moleculares que se activan en respuesta a los cambios para promover o suprimir a Orx.

1.7 Biología Molecular de Orx

El gen humano de prepro-orexina se localiza en el cromosoma 17q21 y posee dos exones y un intrón distribuidos a lo largo de 1432 pb (Figura 5). En el exón 1 se encuentra la región 5'-UTR y una pequeña porción de la región codificante de la señal de secretora; el intrón 1, el único en el gen, tiene una longitud de 818 pb y el exón 2 representa la porción restante que incluye la región 3'-UTR (Sakurai *et al*, 1999). El gen en el ratón tiene una organización idéntica por lo que se ha tomado como modelo de estudio, aunque se localiza en el cromosoma 11.

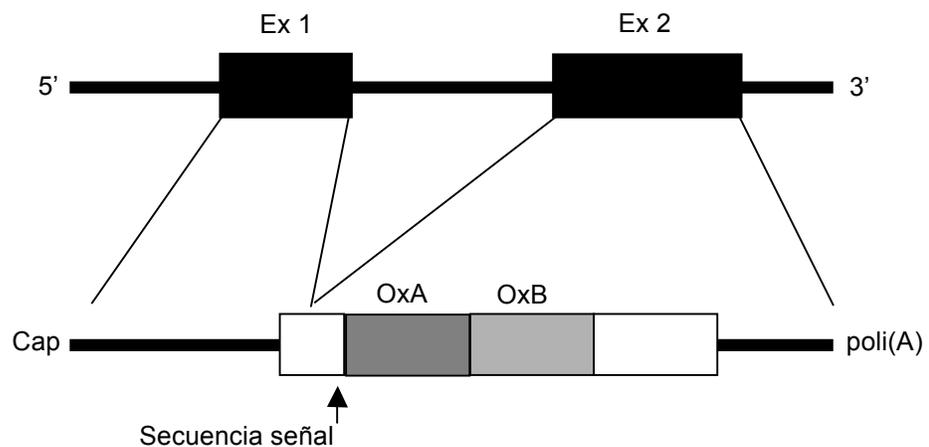


Figura 5. Organización estructural del gen humano de orexina, análogo al del ratón, y su mRNA. Los exones se muestran como recuadros sombreados.

1.8 Expresión y regulación génica

La expresión del gen de Orx se limita a neuronas del hipotálamo, específicamente, a las localizadas en la región lateral (Ohno-Sakurai, 2008; Sakurai *et al*, 2010), apuntando a la existencia de mecanismos moleculares que controlan la regulación en otras poblaciones neuronales distintas de esta área que no la expresan; estos mecanismos, resultan de particular interés para entender cómo se modulan las funciones de Orx. La regulación de este gen no está bien establecida, debido en parte a la multitud de factores que pueden influenciar su modulación.

Se cuenta con información extensa de la expresión y función en diferentes regiones del sistema nervioso en adultos; sin embargo, los datos acerca del desarrollo y maduración del sistema de Orx son contradictorios e insuficientes. En un estudio en el que se abordó el inicio de la expresión de Orx en embriones de ratas preñadas, se hizo el seguimiento

del desarrollo del hipotálamo determinando que la aparición de las neuronas que expresan Orx ocurría alrededor del día 12 del desarrollo (Amiot *et al*, 2005). Por otra parte, en embriones de ratones C57/BL6J, mediante RT-PCR, la transcripción del gen se detectó en el día 10, más pronto que lo reportado anteriormente. En otra investigación, la detección de Orx se determinó en el día 12, hecho consistente con el primer reporte (Tanaka *et al*, 2010); los autores sugieren entonces que algunas de las neuronas orexigénicas se originan de células progenitoras de la zona del tercer ventrículo entre los días 10 y 12 del desarrollo embrionario en ratones. Luego de la migración al área designada, estas células probablemente se diferencien en células productoras de Orx por la intervención de algunos factores de transcripción, como Sonic hedgehog (Shimogori *et al*, 2010) y Lhx9 (Liu *et al*, 2015), el más recientemente reportado como necesario en la especificación orexigénica. En otro reporte, que se avoca a la expresión en la fase postnatal, se investigó la distribución de cuerpos neuronales y fibras de OxA y OxB en tres diferentes etapas postnatales: una semana, dos semanas y adultos. Por medio de técnicas inmunohistoquímicas, se demostró que un pequeño grupo de células en el hipotálamo lateral y en áreas perifornical y periventricular fueron positivas a OxA y OxB a los 3 tiempos, lo que sugiere que Orx tiene un papel importante en el desarrollo cerebral temprano de la fase postnatal (Stoyanova *et al*, 2010).

1.9 Regulación del promotor del gen de Orx

El promotor del gen de Orx es un factor en *cis* que participa de manera importante en el control de su expresión que contiene otros elementos reguladores, blanco de efectores provenientes de los ambientes local y sistémico. Desde su identificación, río arriba del gen, se ha intentado definir la secuencia promotora mínima capaz de promover la transcripción (Figura 6).

Inicialmente, se delimitó una región extensa que flanquea al extremo 5' de 3149 pb y otra, de 122 pb no codificante en 5' perteneciente al exón 1 que contenía los elementos necesarios para la expresión del gen humano (Sakurai *et al*, 1999). Poco después, se demostró que un fragmento de menor tamaño (450 pb) de la región flanqueante 5' del gen humano de orexina tenía actividad promotora *in vitro* (Waleh *et al*, 2001). Deleciones subsecuentes en el extremo 5' de la posición -450 a -188 respecto al sitio de

inicio de la transcripción redujeron la actividad del promotor en un 50% y se encontró que dicho fragmento de 450 pb contenía sitios potenciales de unión de factores de transcripción, incluyendo el elemento de respuesta a IFN, el cual inhibe fuertemente la actividad de éste. En un trabajo más reciente (Moriguchi *et al*, 2002), se reportó la presencia de dos elementos reguladores de Orx (*orexin regulatory element*), OE1 y OE2 de 287 y 2500 pb, respectivamente, situados en la región del promotor del gen humano, necesarios para la expresión de Orx en el hipotálamo lateral y para su represión en la región media en ratones transgénicos y, mediante deleciones seriadas en el elemento OE1, se delimitó una porción de 57 pb crítica para la regulación espacial *in vivo*.

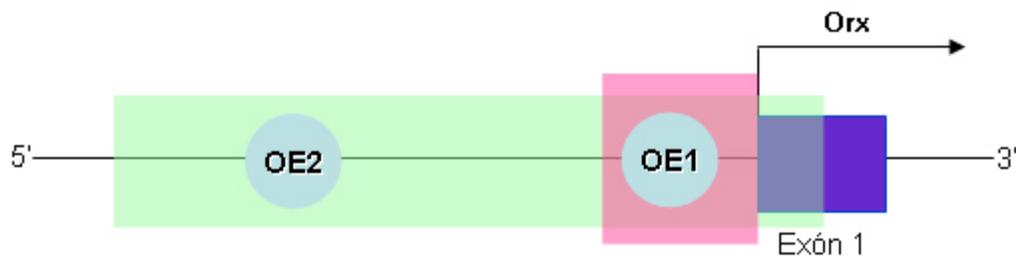


Figura 6. Diagrama de la región promotora del gen de Orx. Se muestran los elementos OE1 y OE2, la región de 3.2 kb (sombreado claro) definida inicialmente que contiene los elementos necesarios para la expresión del gen y la porción de 450 pb (sombreado oscuro) con actividad promotora *in vitro*. Se señala con una flecha el sitio de inicio de la transcripción y en un recuadro oscuro el exón 1.

Por lo que respecta a la región promotora del ratón, en una investigación hecha en 2007 se aisló una región de 22 kb que contiene la región 5' flanqueante del promotor de Orx determinando que el sitio de inicio de la transcripción (+1) se localizaba 96 nucleótidos río arriba del codón de inicio. El sitio de inicio contiene secuencias consenso del iniciador de la transcripción y la caja TATA. Un análisis subsecuente de la actividad promotora *in vitro* en células PC12 mostró que la región -13/+112 y -1,868/780 contienen elementos de respuesta positiva al factor de crecimiento nervioso (NGF) y un elemento de respuesta negativo (Kato *et al*, 2007). Actualmente, la región promotora del gen para diversas especies (ratón, rata, perro y humano) se ha reportado en bases de datos (Ensembl) y corresponde a una región de 1 kb situada río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Hubbard *et al*, 2009), por lo que los ensayos subsecuentes se han enfocado en esta región debido a la relevancia demostrada en trabajos anteriores.

Por otra parte, elementos en *trans* también actúan sobre el promotor como son factores de transcripción. Entre ellos, destacan Foxa2, Igfbp3 y Nr6a1, que se han propuesto como reguladores del gen de Orx apoyados en ensayos de actividad *in vitro* (Tanaka, 2012). Sin embargo, se conoce poco de los componentes que reaccionan a los cambios en el ambiente y de los determinantes de la expresión espacial del gen en el hipotálamo lateral.

El factor de transcripción FOXA2, con 475 aminoácidos, también conocido como HNF3B o TCF3B, es miembro de la clase “forkhead box” de proteínas de unión al DNA localizado en el núcleo y citoplasma de la célula que contribuye a la apertura de la cromatina compacta a través de interacciones con las histonas mediante unión a su secuencia consenso. Ha sido relacionado con funciones como el desarrollo neural, el establecimiento de la expresión génica específica de tejido y la regulación de la expresión en tejidos diferenciados. En un reporte de 2009, se propone a Foxa2 como un blanco río abajo de la señalización de insulina capaz de regular la expresión de Orx y MCH. Durante el ayuno, Foxa2 se une a los promotores de Orx y MCH estimulando su expresión; la activación constitutiva de Foxa2 en cerebro da como resultado un incremento en la expresión de Orx y MCH en neuronas, aumentando, además, el consumo de alimento, el metabolismo y la sensibilidad a insulina, por lo que Foxa2 puede actuar como un sensor en neuronas del hipotálamo lateral para integrar señales metabólicas y de la respuesta fisiológica (Silva *et al*, 2009), siendo un mecanismo factible por el cual las neuronas de Orx censan los niveles de glucosa. A través de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), se demostró que Foxa2 se une al promotor de Orx específicamente en tres sitios putativos, sólo en ratones en condiciones de ayuno, por lo que se ha propuesto como un potenciador de la señalización de la insulina (Tanaka, 2012).

La proteína IGFBP3 (*insuline-like growth factor binding protein 3*) se encontró subexpresada al comparar los perfiles de expresión génica de muestras del hipotálamo posterior de origen humano y de ratón de modelos con narcolepsia (Honda *et al*, 2009). IGFBP3 se coexpresó con la mayoría de las neuronas que expresan Orx tanto en cortes de tejido cerebral humano como de ratón, observando además una disminución del mRNA y Orx en hipotálamo y tallo cerebral en ratones, sugiriendo que podría tratarse de

un regulador metabólico de la fisiología celular de Orx. Esta proteína es miembro del factor de unión parecido a insulina (IGFBP), de la cual se han caracterizado varias isoformas; forma un complejo terciario que se une a IGF1 e IGF2 y circula en plasma, prolongando la vida media de los factores de crecimiento de insulina (IGFs).

Por otra parte, el factor NR6A1 (subfamilia de receptor nuclear 6, grupo A, miembro 1) codificado por el gen del mismo nombre, también llamado RTR, GCNF o GCNF1, es un miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción intracelular de 480 aminoácidos de longitud y con localización nuclear, posee varios productos de splicing alternativo y forma dímeros para su unión al DNA. Es un receptor nuclear huérfano que se une a un elemento de respuesta con la secuencia 5'-TCAAGGTCA-3'. Su patrón de expresión sugiere que tiene participación en la neurogénesis y en el desarrollo de células germinales. NR6A1 se reportó su colocalizado con las neuronas productoras de Orx en el hipotálamo de ratones y su unión al sitio putativo definido para NR6A1 en el promotor del gen, río arriba del elemento regulador OE1 (Figura 7), que corresponde a un elemento DR0 demostrando la regulación que ejerce en la expresión de Orx *in vitro* e *in vivo* (Tanaka *et al*, 2010).



Figura 7. Región reguladora del gen humano de Orx reportada por Tanaka. Se observan dos porciones altamente conservadas OE2 y OE1, 5 repeticiones Alu y un elemento DR0, NurRE, sitio de unión putativo para el factor NR6A1 (Modificado de Tanaka *et al*, 2010).

De la misma familia, el receptor nuclear NR4A1 (subfamilia de receptor nuclear 4, grupo A, miembro 1) se ha reportado como parte de la regulación de la expresión de Orx (Tanaka, 2012). También conocido como Nur77, es un factor de transcripción que se relaciona cercanamente con IGF3BP3. La translocación de la proteína del núcleo a la mitocondria induce apoptosis. Se sabe que NR4A1 se une al elemento de respuesta de receptores nucleares (NurRE) y es capaz de modular la actividad del promotor. Además, en estudios de inmunohistoquímica demostró tener un patrón de expresión similar en neuronas que expresan Orx, colocalizándose con ellas tanto en núcleo como en citoplasma. Ensayos de unión *in vitro* hechos en el mismo reporte, señalan un retraso en

la migración electroforética en presencia de extractos nucleares de células HeLa transfectados con un vector de expresión de Nur77. Sin embargo, no se encontró efecto de Nur77 al probar una región flanqueante al 5' de 3.2 kb en un ensayo reportero de luciferasa. Por lo que la contribución de NR4A1 no es concluyente y necesita ser explorada más detalladamente. Otros miembros de la familia de receptores con predicciones bioinformáticas y de bases de datos de ejercer efecto sobre la expresión de Orx son NR1H3 y NR2F6; en este trabajo nos enfocamos en investigar a NR6A1 y NR4A1, los miembros con evidencia más sólidas.

El factor de transcripción más recientemente reportado con efecto sobre las neuronas que expresan orexina es Lhx9. En un análisis de transcritos hecho en neuronas de hipotálamo de ratón, se identificaron transcritos relevantes característicos de las neuronas orexigénicas, particularmente el del factor de transcripción Lhx9 que al ser deletado, resulta en la pérdida de especificidad de estas neuronas aunque sin disrupción del circuito de orexina (Dalal *et al*, 2013). Mas aún, su sobreexpresión induce la aparición de neuronas ectópicas que expresan orexina pero fuera de la región hipotálica en un modelo de zebrafish.

La información obtenida a partir de ensayos *in vitro* se ha completado con el uso de modelos animales, especialmente, de ratones. En estos, se ha visto que las mutaciones nulas en el gen de orexina resultan en un fenotipo narcoléptico, como era de esperarse, al igual que en ratones en los que se induce la degeneración de las neuronas orexigénicas por medio de la neurotoxina ataxina-3 (Hara *et al*, 2001). En este último sistema, los niveles de expresión relacionados a la pérdida de las neuronas de Orx (Beuckmann *et al*, 2004) se han relacionado con la disminución de la expresión de diversos factores de transcripción, entre ellos, ebf2 (Honda *et al*, 2009). En el trabajo de 2009, mediante microarreglos de expresión se determinó el perfil del área perifornical en ratones narcolépticos comparados con controles encontrando una subexpresión de alrededor de 2.6 veces del factor. Interesantemente, se ha descrito un modelo de ratón KO para el factor de transcripción ebf2 (Corradi *et al*, 2003), el cual exhibe una manifestación de narcolepsia-cataplexia similar a la descrita en ratones mutantes nulos al gen de Orx o tratados con ataxina-3 para inducir el fenotipo narcoléptico.

Mediante encefalograma (EEG), se determinaron transiciones directas del estado de vigilia a sueño REM en estos ratones KO a *ebf2*, característica crucial en la manifestación de narcolepsia. Una evaluación más detallada de las neuronas orexigénicas en el hipotálamo lateral mediante inmunohistoquímica mostró una reducción severa de hasta 80% al comparar con el ratón silvestre (1500 WT *Vs* 300 KO), apuntando que la pérdida del factor de transcripción *ebf2* lleva a una reducción severa en el número de neuronas productoras de Orx y sugiriendo que pudiera tener un papel importante en el correcto desarrollo y/o diferenciación el circuito (DelaHerrán-Arita *et al*, 2011). Adicionalmente, en un análisis *in silico* de la región del promotor putativo de Orx de cuatro especies separadas (ratón, rata perro y humano) realizado en este mismo artículo, identificó dos secuencias bien conservadas en todas las especies dentro de la región promotor que corresponden a elementos de respuesta a Olf-1, blanco de los miembros de la familia de factores de transcripción O/E, a la cual pertenece *ebf2*, apoyando la evidencia encontrada en el ratón KO. Tanaka en una revisión posterior enfatiza la importancia del estudio más profundo y detallado del rol de *ebf2* en la regulación de Orx (Tanaka, 2012); sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para definir si es un regulador que actúa directamente sobre el promotor o bien, un regulador indirecto que ejerce su acción sobre otro efector del complejo de inicio de la transcripción o a un nivel río arriba del proceso transcripcional.

El factor de transcripción *ebf2*, O/E3 o COE2, una proteína de 575 aminoácidos, es codificado por un gen que pertenece a la familia COE (Collier/Olf/EBF) de factores de transcripción, de localización nuclear, con motivos hélice-giro-hélice en los que se encuentra bien conservado el dominio de unión al DNA. Reconoce la variación de la secuencia palindrómica 5'-ATTCCCNNGGGAATT-3' y forma homodímeros o heterodímeros con otros miembros de su misma familia. Inicialmente, se evidenció su participación, así como la de otros factores de la misma familia, en la diferenciación neural por estudios hechos en *Drosophila* que luego fueron extrapolados a mamíferos, con lo que se estableció su rol en la neurogénesis (Guillermot, 1995; Kageyama *et al*, 1995). Ahora se sabe que se encuentra expresado en tejido adiposo y en células osteoblásticas inmaduras en el desarrollo embrionario del ratón; en osteoblastos, regula la diferenciación a osteoclastos y actúa en sinergia con la vía de respuesta Wnt. Otras

funciones relacionadas son el desarrollo de células B, la regulación génica olfatoria y el desarrollo y diferenciación neural (Garel *et al*, 1997; Corradi *et al*, 2003; Wang *et al*, 2003).

Otro reporte establece que los ratones deficientes en el factor *ebf2* también pierden un subconjunto de células de Purkinje durante el desarrollo y presentan un córtex cerebelar hipotrófico. Los ratones exhiben discapacidad motora y deficiencia de coordinación y aprendizaje motor (Hoxha *et al*, 2012). Experimentos de polarización mostraron que aunque en ratones con 10-20 días de vida postnatal no hubo diferencia significativa al comparar con los ratones *wild-type*, en los adultos sí se observó una diferencia en la hiperpolarización y despolarización neuronal, que corresponde a una señal cerebelar alterada, sugiriendo que la deficiencia motora exhibida por los ratones KO podría deberse, al menos en parte, a un defecto en la activación de las células de Purkinje restantes. Lo anterior resalta las implicaciones que podría tener la carencia de *ebf2* en diferentes funciones cerebrales, de las cuales, es necesario ampliar las investigaciones para definir por completo las características del modelo.

La investigación de posibles factores de transcripción implicados en la regulación del proceso continua y los estudios posteriores podrían enriquecer el panorama molecular de los componentes que integran el complejo de inicio de transcripción y los factores que son capaces de promoverla o reprimirla en respuesta a estímulos específicos.

Tomando en consideración los hallazgos derivados del ratón KO a *ebf2* que presenta un fenotipo narcoléptico acompañado de cataplexia y de la marcada reducción del número de neuronas que expresan Orx en hipotálamo, el presente trabajo se centrará en evaluar el papel del factor de transcripción *ebf2* en la expresión, desarrollo y regulación transcripcional de Orx *in vitro*.

2. ANTECEDENTES

La regulación génica y molecular de cualquier sistema es un tema complejo que debe ser estudiado extensamente para definir los mecanismos implicados, desentrañando los efectores que participan río arriba en la generación de una respuesta así como los posibles efectos río abajo que podrían ser consecuencia posterior. Además, se debe tomar en cuenta que el resultado global podría deberse, no sólo a un fenómeno, sino a un conjunto de fenómenos que interaccionan simultáneamente.

La regulación del sistema Orx, en la que se han visto cambios en respuesta a estímulos diversos, ha tratado de abordarse desde un punto de vista sistémico, identificando los cambios generales en mecanismos que modifican la expresión de Orx y, por otra parte, desde un enfoque molecular definiendo elementos que actúen en *cis* perteneciente a la región promotora o bien, proteínas o factores de transcripción que actúen en *trans* directamente sobre el promotor y/o elementos reguladores o, indirectamente, sobre el complejo de inicio de la transcripción. Numerosos estudios en diferentes condiciones y modelos con distintos abordajes experimentales se han llevado a cabo desde el descubrimiento de las orexinas aunque, a la fecha, no han sido establecidos del todo los componentes de la regulación de su expresión.

A nivel molecular, una vez que se identificó la ubicación y secuencia correspondiente al gen del precursor de ambas orexinas, las investigaciones se volcaron en definir los sitios cruciales involucrados en la regulación de la expresión altamente específica de Orx sólo en ciertas neuronas del hipotálamo de la porción lateral que, al mismo tiempo, restringen la expresión en otras poblaciones neuronales de la misma región. En la Tabla 1, se resumen los antecedentes publicados más relevantes en la regulación del sistema de Orx. Durante la realización de este trabajo, sólo se reportó a un posible nuevo regulador.

Inicialmente, en un reporte publicado en 2002, se delimitaron dos sitios de suma importancia involucrados con la expresión específica, necesarios para la expresión en hipotálamo, llamados elemento regulador de Orx-1 (OE1) y elemento regulador de Orx-2 (OE2). Posteriormente, se reportaron diversos factores de transcripción de diferentes familias que se ha demostrado se unen y promueven o reprimen la transcripción del gen.

Tabla 1. Resumen de los antecedentes más relevantes en el estudio de la expresión y regulación transcripcional del gen de Orx.

Autor	Estudio	Hallazgo	Año
Moriguchi y cols	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	Elementos OE1 y OE2 son necesarios para la expresión de Orx en hipotálamo lateral	2002
Silva y cols	Regulation of adaptive behavior during fasting by hypothalamic Foxa2	El factor de transcripción Foxa2 se une al promotor de Orx en ratones en condiciones de ayuno	2009
Honda y cols	IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin	Se identifica a IGFBP3 como regulador de la fisiología de Orx	2009
Tanaka y cols	Transcriptional regulation of the orexin/hypocretin gene by NR6A1	Nr6a1 regula el promotor del gen de Orx <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	2010
Vidaltamayo y cols	Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mutant mice	La ausencia de ebf2 se relaciona con la disminución de neuronas que expresan Orx	2011
Dalal y cols	Translational profiling of hypocretin neurons identifies candidate molecules for sleep regulation	Perfil de expresión de neuronas orexigénicas. Lhx9 es un factor para especificación y supervivencia neuronal	2013
Liu y cols	Evolutionarily conserved regulation of hypocretin neuron specification by Lhx9	Lhx9 conduce a especificación neuronal orexigénica en zebrafish	2015

Como antecedentes directos de este trabajo y únicos reportes publicados disponibles que relaciona al sistema de Orx y al factor de transcripción ebf2, se tiene el hecho por Honda y colaboradores en el 2009 y Vidaltamayo y colaboradores en 2011.

En el primer trabajo, se realizó un análisis de expresión génica a gran escala de ratones tratados con la neurotoxina ataxina-3, metodología empleada para lograr la degeneración

de las neuronas orexigénicas que da como resultado animales que carecen de prácticamente todas las neuronas de orexigénicas. En este análisis, se reporta los cambios de expresión de algunos genes, mencionando a *ebf2* como uno de los genes subexpresados. Este estudio se centra en el factor de transcripción *Igfbp3* y lo propone como un nuevo regulador de la fisiología celular orexigénica y del sueño en individuos sanos.

En el estudio de Vidaltamayo los hallazgos encontrados en el modelo de ratón KO a *ebf2*, involucran la disminución de neuronas que expresan *Orx* en ratones KO adultos al compararse con los ratones *wild-type* adultos, además de un fenotipo narcoléptico. En el mismo reporte, se presenta un análisis *in silico* del promotor del gen de *Orx* de cuatro especies en el que se identificaron dos sitios Olf-1, los cuales son blanco de la familia de factores de transcripción bHLH a la que pertenece *ebf2*. Mas aún, uno de estos sitios se encuentra localizado dentro de la región de regulación OE1 previamente reportada por lo que, tomando en conjunto estos hallazgos, se sugiere fuertemente que *ebf2* pudiera estar implicado en la regulación transcripcional del promotor del gen de *Orx*. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para definir si es un regulador que actúa directamente sobre el promotor o un regulador indirecto que ejerce su acción sobre otro efector del complejo de inicio de la transcripción o a un nivel río arriba del proceso transcripcional.

3. JUSTIFICACIÓN

Orx participa en diversas funciones que colaboran en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, especialmente, en la regulación del ciclo de sueño y vigilia; sin embargo, su regulación es un proceso complejo que no ha sido esclarecido por completo. La investigación de cómo se lleva a cabo la expresión y regulación del sistema orexigénico permitirá contribuir al entendimiento de éste identificando, particularmente, el papel que desempeña el factor de transcripción ebf2. Su identificación como regulador a nivel transcripcional aportará información para definir un mecanismo que justifique la falta de Orx en ausencia de ebf2.

El estudio de los mecanismos de control que regulan a Orx resulta de interés debido a su potencial aplicación en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para trastornos de sueño, ingesta y conductas adictivas, a manera de brindar un complemento a las opciones disponibles actualmente.

4. HIPÓTESIS

El factor de transcripción ebf2 es un regulador de la actividad transcripcional del gen de orexina.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar el papel del factor ebf2 en la regulación transcripcional del gen de orexina.

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar el papel del factor de transcripción ebf2 sobre la regulación de la expresión controlada por el promotor del gen de orexina *in vitro*.
2. Determinar la unión del factor de transcripción ebf2 a la región promotora del gen de orexina en un modelo *in vitro*.
3. Determinar el nivel de expresión relativa del factor de transcripción ebf2 y los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1 en células gliales, neuronales y no neuronales.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 General

6.1.1 Consumibles

Tubos de plástico de 0.2, 0.6, 1.5 y 2 mL (Eppendorf), puntillas de 10, 200 y 1000 μ L (Corning), tubos falcon de 15 y 50 mL (Corning), botellas de cultivo 25 y 50 cm^2 (Corning), placas Petri (Corning), placa de cultivo de 96 pozos transparente (Corning), placa blanca 96 pozos (Corning), pipetas graduadas estériles 5 y 10 mL (Costar), raspadores (Corning), placas blancas multipozos 96 LightCycler^R480 (Roche) y LightCycler^R480 Sealing Foils (Roche).

6.1.2 Reactivos

Los reactivos generales usados fueron: agua destilada, etanol (CTR01160, CTR Scientific), metanol (179337-4L, Sigma-Aldrich), isopropanol (9084-03, JT Baker), medio LB (sigma-Aldrich), ampicilina (Sigma-Aldrich), NotI-HF (NEB), NcoI-HF (NEB), agarosa (161-3101, Bio-Rad), TEMED (161-0800, Bio-Rad), Tris (161-0719, Bio-Rad), EDTA (161-0729, Bio-Rad), ácido bórico (0588-1KG, Amresco), glicina (161-0724, Bio-Rad), acrilamida 99.9% (161-0101, Bio-Rad), bisacrilamida (161-0201, Bio-Rad), persulfato de amonio (A4418-100G, Sigma-Aldrich), PBS (P4417- Sigma-Aldrich), SDS (0227-1KG, Amresco), albúmina sérica bovina (Amresco), zeocina (Invivogen) y puromicina (Invivogen). Los reactivos especiales y kits de cada técnica se mencionan en detalle en cada sección.

6.1.3 Materiales

Micropipetas 0.1-2.5 μ L, 0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L (Eppendorf), matraces Erlenmeyer y vasos de precipitados (Pyrex), agitador magnético, cámara Neubauer 0.0025 mm^2 (Superior), bandejas de plástico, pinzas metálicas punta fina (165-4070, Bio-Rad), peine 10 pozos 1 mm de grosor (165-3359, Bio-Rad), papel filtro para transferencia (170-3965, Bio-Rad), esponjas de transferencia (Bio-Rad), vidrios separadores 1 mm de grosor (165-3311, Bio-Rad), vidrios cortos (165-3308, Bio-Rad) y papel parafilm (Pechiney Plastic Packaging).

6.1.4 Equipos

Los equipos generales de laboratorio empleados en la realización de esta tesis fueron: campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Labconco), baño maría digital (Polyscience), incubadora Series 8000 WJ (Thermo Scientific), microscopio invertido PrimoVert (Carl Zeiss), microscopio de luz Axio (Carl Zeiss), cámara AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss), microcentrifuga refrigerada 5417R (Eppendorf), cámara de electroforesis Mini-SUB Cell GT (Bio-Rad), cámara de electroforesis Mini-PROTEAN^R Tetra System (Bio-Rad), Mini Trans-Blot^R Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), fuentes de poder PowerPacTM Basic y PowerPacTM HC (Bio-Rad), termómetro -20°C a 110°C (Brannan), cabina UV2 Sterilizing PCR Workstation (UVP), microcentrífuga D1008 (Scilogex), centrífuga refrigerada 5810R (Eppendorf), placa de calentamiento y agitación digital con cerámica CIMAREC^R (Barnstead Thermolyne), balanza digital GX-2000 (AND), balanza analítica GR-200 (AND), agitador con temperatura MaxQ 4000 (Thermo Scientific), vórtex Genie-2 (Scientific Industries) y fluorómetro QubitTM 2.0 (Life Technologies). Los equipos particulares se refieren en el apartado correspondiente.

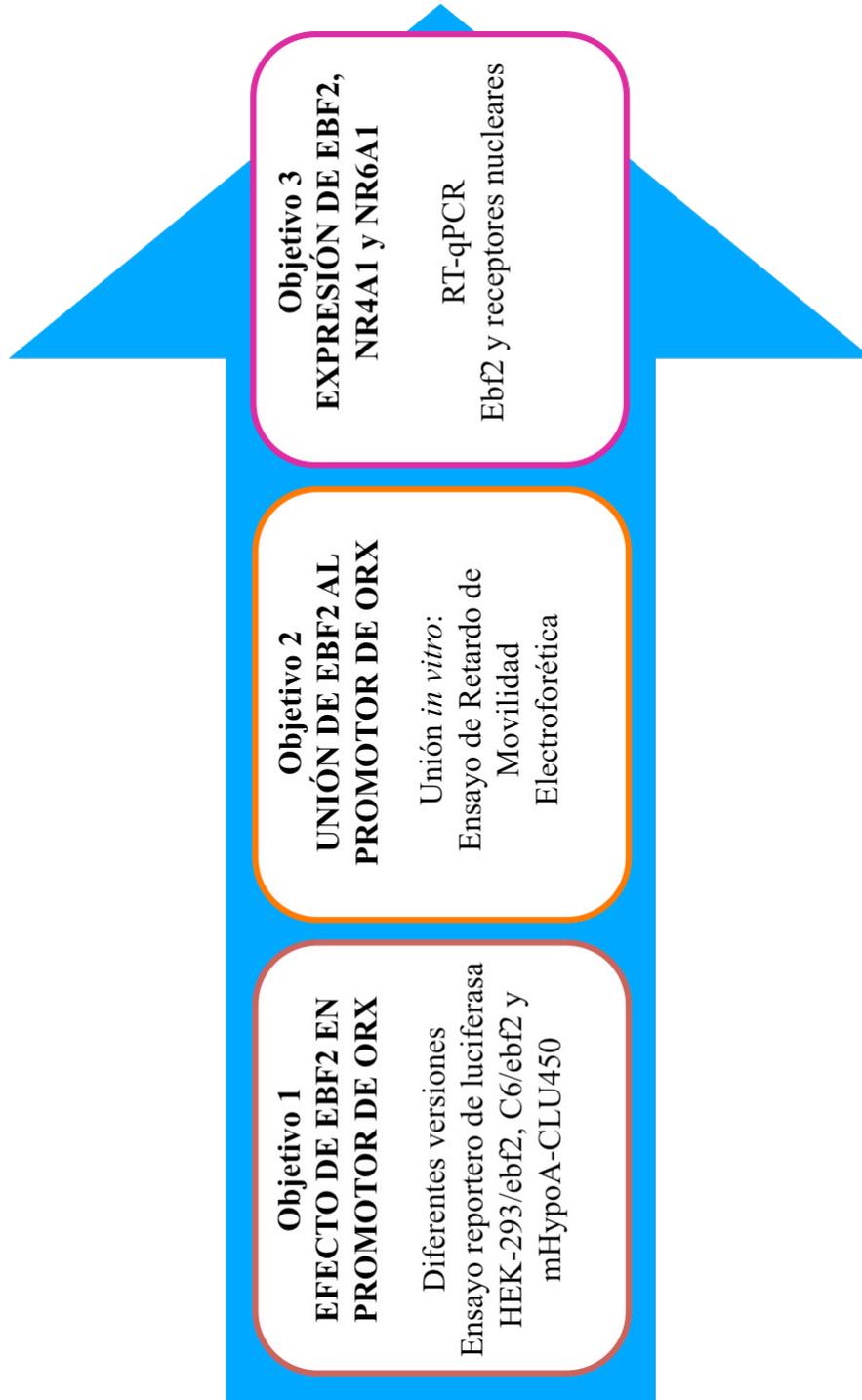
6.1.5 Programas computacionales

Software de captura y análisis de geles Quantity One V4.6.7 (Bio-Rad), PrimerQuest (IDT Technologies) y Amplify (iOS) para diseño de primers de PCR, MacVector V12.8 en análisis de secuencias y programa estadístico Sigmastat 3.5.

6.2 Lugar de realización

Esta tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de Monterrey.

6.3 Estrategia general



6.4 Análisis del papel del factor de transcripción Ebf2 sobre la regulación de la expresión controlada por el promotor del gen de Orx *in vitro*

6.4.1 Diseño de secuencias

La secuencia del promotor putativo del gen murino de prepro-orexina se obtuvo de la base de datos Ensembl (Hubbard *et al*, 2009). El fragmento reportado de 390 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción se sintetizó artificialmente (IDT, Coralville, IA, EUA) e insertó en el plásmido pIDTSMART para su propagación inicial. La secuencia original se modificó con deleciones y mutaciones en uno o ambos sitios olf-1 definidos anteriormente con el objeto de evaluar el efecto de estos cambios. Se incluyeron sitios de corte para las enzimas *NotI* y *NcoI* que fueron de utilidad en la clonación posterior del fragmento en otro vector de expresión.

6.4.2 Construcción de vectores reporteros de expresión

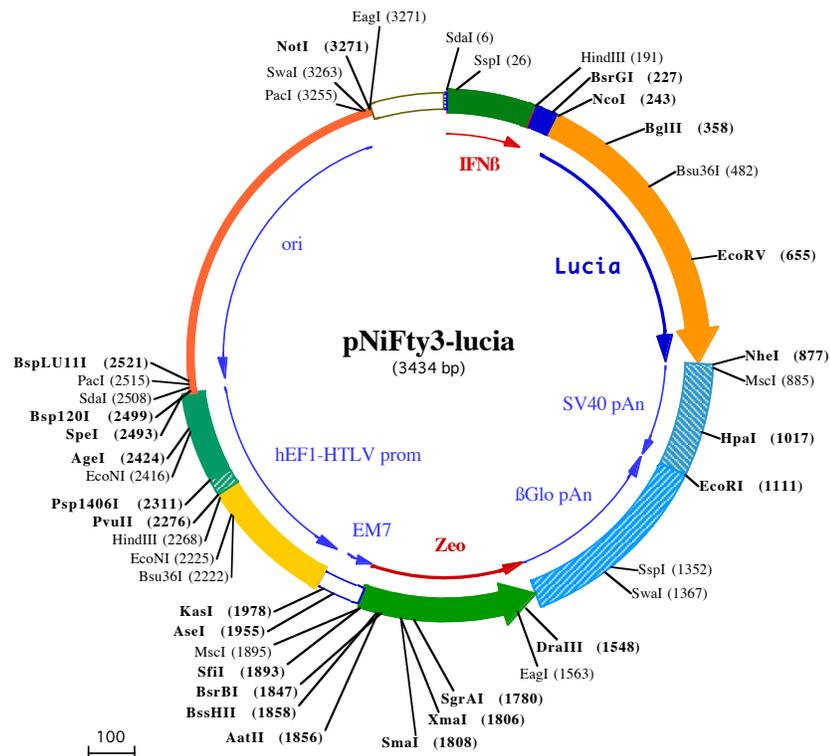


Figura 8. Plásmido pNiFty3-lucia que porta la secuencia del gen reportero de luciferasa y confiere resistencia a zeocina.

Siete plásmidos pIDTSMART (2508 pb) (IDT, Coralville, IA, EUA) portando las diferentes versiones de la secuencia del promotor mínimo fueron propagados en bacterias *E. coli* DH5 α mediante la técnica optimizada de choque térmico reportada por Li (Li *et al.*, 2010). Los plásmidos conferían resistencia a ampicilina como antibiótico de selección. Con el cultivo obtenido, se realizó la extracción del DNA plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Venlo, Holanda) y su cuantificación por espectrofotometría UV en el equipo NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). El plásmido fue digerido con las enzimas NotI-HF y NcoI-HF (NEB Biolabs, Ipswich, MA, EUA) para verificar el patrón esperado de restricción en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 30-40 min y purificar el fragmento de interés con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Venlo, Holanda). Por otro lado, se siguió este mismo proceso con el plásmido pNiFty3-Lucia (Invivogen, San Diego, CA, EUA), vector de expresión con el gen de luciferasa que producirá la señal en el ensayo reportero (Figura 8). Este plásmido codifica una luciferasa coelenterizada y la resistencia al antibiótico zeocina. La digestión se hizo con las mismas enzimas, eliminando el promotor original de IFN- β para obtener y purificar un fragmento de 3028 pb, separado en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 40 min.

Una vez obtenidos los fragmentos con la diferentes versiones del promotor de prepro-reoxina y el vector de expresión donde se subclonaría, se procedió a la ligación de cada fragmento con el vector pNiFty3-Lucia siguiendo el protocolo del Quick Ligation Kit (NEB Biolabs, Ipswich, MA, EUA), transformando y purificando el DNA plasmídico tal como se describió anteriormente (Figura 9). El patrón de corte se verificó con digestión enzimática en gel de agarosa; una vez corroborado se procedió a transformar nuevamente para obtener las siete construcciones buscadas en una midipreparación de DNA plasmídico con el Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EUA). Los plásmidos purificados se cuantificaron con el método fluorescente Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

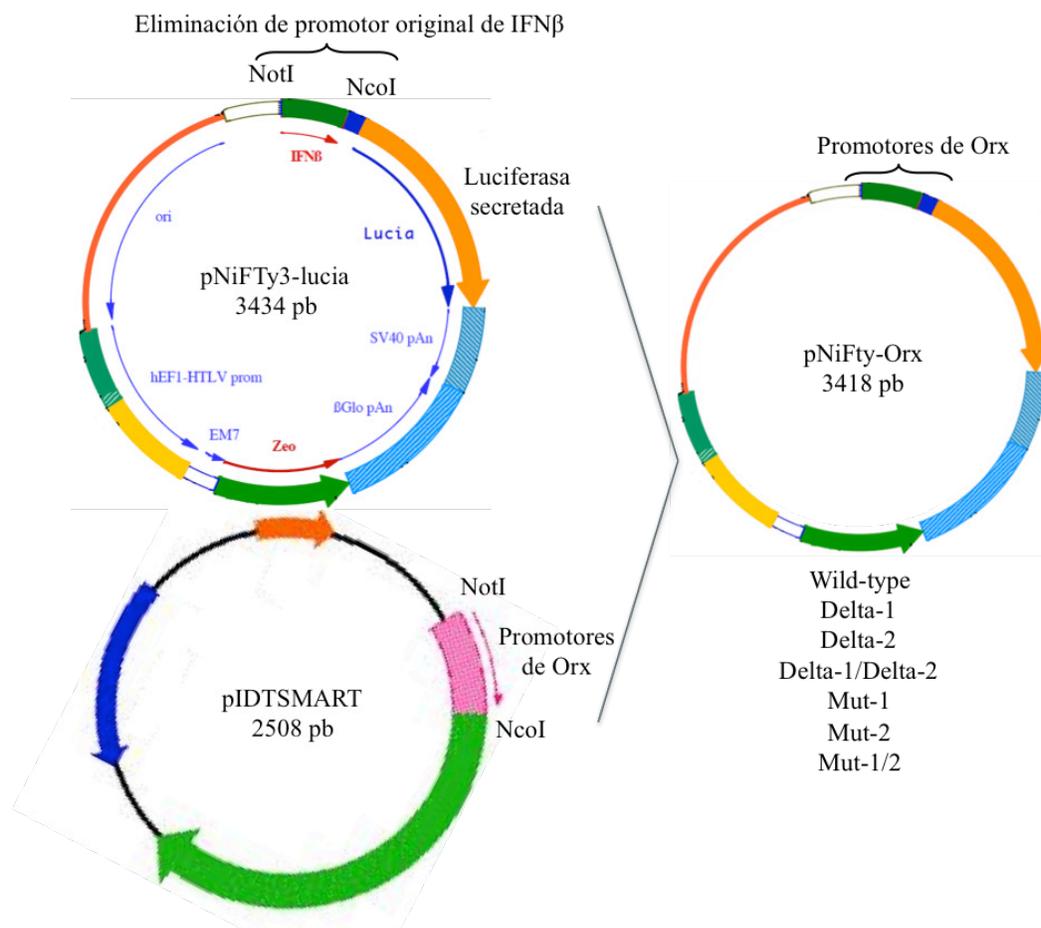


Figura 9. Estrategia de clonación seguida para la obtención de los siete constructos que portan las diferentes versiones del promotor de Orx evaluadas en el trabajo.

6.4.3 Secuenciación de construcciones con el promotor de Orx

Las construcciones se secuenciaron para verificar que portaran la secuencia del promotor correcta con las respectivas deleciones o mutaciones. Para ello, se diseñaron primers que flanquearan la región del promotor para amplificar mediante PCR punto final. El diseño se realizó en la aplicación PrimerQuest (IDT, Coralville, IA, EUA) y en el programa Amplify (MacOS). La secuencia del primer forward fue CTCTTGATCCGGCAAACAAAC-M13 y la del primer reverse GAGGCCACAGCAGCTATATT-M13, adicionando la secuencia genérica M13 útil en la PCR de marcaje posterior. Se utilizó el kit GoTaq PCR Core Systems (Promega, Madison, WI, EUA). Las condiciones usadas en la reacción se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Amplificación de los promotores de Orx insertados en los vectores de expresión construidos.

Componente	Volumen (μL)	[Final]
MgCl ₂ 25 mM	1.5	1.5 μM
Buffer PCR 10x	5	1x
dNTPs 10 mM cada uno	0.5	200 μM
Primer Forward	1.72	0.5 μM
Primer Reverse	1.63	0.5 μM
Taq DNA Pol 5 U/ μL	0.125	1.25 U
DNA	Variable	1 ng
Agua	cbp	-
Volumen final	25 μL	

El programa de amplificación empleado se estableció como sigue: desnaturalización inicial a 95°C por 1 min, desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 62°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 2 min con 25 ciclos en el equipo Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Los amplicones de la región promotora insertada en los vectores de expresión se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 2%. De esta PCR, se realizó una segunda PCR de marcaje con el kit BigDye Direct Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) y se secuenció el amplificado en el equipo ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). El análisis de secuencias se hizo en el programa MacVector V12.8 para rectificar las secuencias obtenidas, las mutaciones y las deleciones inicialmente propuestas.

6.4.4 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), C6/ebf2 (GenScript, Piscataway, NJ, USA) y mHypoA-CLU450 (CLU450-P, Tebu-bio, France) de acuerdo con las instrucciones del proveedor para los procedimientos de propagación, congelación, descongelación y subcultivo. Las células

se mantuvieron en 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 estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂ usando botellas de 75 cm² y manteniendo la confluencia hasta un máximo de 80% antes de realizar el subcultivo. Las células de glioblastoma de rata (C6/ebf2) y las HEK-293 que sobreexpresan ebf2 (HEK-293/ebf2) se mantuvieron, adicionalmente, en 0.5 µg/mL de puomicina como antibiótico de selección para mantener la expresión del factor de transcripción de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

6.4.5 Ensayo reportero de luciferasa

El experimento se trabajó en el formato de placa de 96 pozos. Se definió el número de células apropiado para cada línea para sembrar en la transfección para confluencia de 70-80%, determinando un número de células de 23,000/pozo para las células HEK-293, 30,000/pozo para las HEK-293/ebf2, 15,000 en el caso de las C6 y C6/ebf2 y de 10,000 células/pozo para las células de hipotálamo de ratón. El conteo se llevó a cabo recolectando las células mediante digestión con tripsina 1x (Gibco, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) y realizando la dilución y el conteo en cámara de Neubauer para determinar el número de células por mL.

Se ensayaron las condiciones a seguir en la transfección determinando como óptimo la mezcla de 0.3 µL de lipofectamina/pozo y 100 ng de plásmido tomando como referencia las instrucciones del proveedor (Lipofectamine Reagent, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), la observación celular microscópica y la medición de viabilidad hecha con el CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, EUA) para descartar toxicidad así como a la medición de la señal del reportero.

Para el ensayo reportero de luciferasa, se sembraron las células en placas de 96 pozos un día antes de la transfección con el número de células determinado con los pozos suficientes para transfectar por triplicado las siete construcciones de los vectores de expresión con las diferentes versiones del promotor de orexina. Las células se transfectaron con lipofectamina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) según las recomendaciones del inserto mezclando con medio OptiMEM (Gibco, Thermo

Scientific, Wilmington, DE, EUA) para obtener la mezcla de transfección. A cada pozo se le adicionaron 90 μ L de medio OptiMEM y 10 μ L de la mezcla de transfección, se agitaron suavemente por 5 min y se comenzó la incubación a 37°C, retirando el medio anterior. La señal del gen reportero se leyó 48 h postranfección en el luminómetro Veritas (Turner Biosystems, Promega, Madison, WI, USA) usando el reactivo QUANTI-Luc (Invivogen, San Diego, CA, USA). Las lecturas de los pozos independientes se hicieron con un tiempo de integración de 0.5, agregando 50 μ L del reactivo revelador a 10 μ L del sobrenadante de cada pozo transfectado para determinar la luminiscencia. Se incluyeron los controles de medio de cultivo, lipofectamina y control negativo de transfección para registrar las señales basales de luminiscencia.

6.4.6 Análisis de resultados

Los resultados de la señal de luciferasa se reportan como el promedio de las observaciones \pm error estándar (media \pm SE). Los datos se evaluaron con un ANOVA seguida de la corrección con el test post-hoc Bonferroni y Hol-Sidak en el programa Sigmastat 3.5. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

6.5 Determinación de la unión del factor de transcripción ebf2 a la región promotora del gen de Orx *in vitro*

6.5.1 Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética (EMSA)

Se inició estandarizando las condiciones de la prueba con un control positivo del ensayo de retardo para garantizar que la metodología de las diferentes etapas fuera correcta. Para ello, empleamos el LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) siguiendo el protocolo recomendado. En esta prueba, se analiza el retraso del control positivo incluido, la proteína del antígeno de superficie del virus Epstein-Barr y una secuencia de unión. La membrana resultante se reveló mediante quimioluminiscencia con el Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) en el equipo ChemiDoc XRS⁺ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

6.5.2 Síntesis y marcaje del promotor del gen de Orx murino

Las secuencias del promotor de orexina murino se sintetizaron de acuerdo a la PCR descrita en la sección 6.4.3. La amplificación correcta se verificó en electroforesis en gel de agarosa al 2% separado en buffer TBE 1x a 100 V por 35 min. Los amplicones se marcaron con biotina para detectarse luego con una reacción quimioluminiscente usando el Biotin 3' End Labeling Kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), de acuerdo a la Tabla 3. Además, se incluyó DNA control sin biotina como control interno del kit. Para estimar la eficiencia del marcaje, se realizó un dot-blot manual con los estándares (0.8-25 fmol) y las secuencias del promotor (20 fmol). La aplicación en la membrana y el revelado se hizo con la técnica probada en la sección 3.1. Esto nos permitió establecer que el marcaje se haya logrado eficientemente.

Tabla 3. Condiciones del marcaje con biotina de las secuencias de los promotores de orexina murinos.

Componente	Vol (μL)	Concentración
Agua ultrapura	25	---
Buffer TdT 5x	10	1x
Oligo control sin marcaje (1 μ M)	5	100 nM
Biotina-11-UTP (5 μ M)	5	0.5 μ M
TdT diluida (2 U/ μ L)	5	0.2 U/ μ L
Volumen total	50	

Alternativamente, se realizó una PCR de marcaje para incorporar la biotina en la secuencia del promotor de orexina con el Biotin PCR Labeling Core Kit (Jena Bioscience, Jena, Alemania) en el equipo Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Las condiciones de reacción son las que se detallan en la Tabla 4, siguiendo el programa de amplificación de la sección 6.4.3.

Los amplicones con y sin marcaje fueron digeridos para obtener la secuencia de 390 pb del promotor de orexina. Para ello, se aprovecharon los sitios de restricción incluidos en el diseño inicial para las enzimas NotI y NcoI. La digestión se hizo de acuerdo a la Tabla 5, por 3 h a 37°C seguida de inactivación a 65°C por 20 min. La restricción se escaló

conservando la proporción de enzima para un corte completo y se evaluó en un gel de agarosa al 2% en TBE 1x a 100 V por 45 min. La banda de 390 pb se cortó y purificó con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Holanda). El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría UV en el NanoDrop 8000 (Thermo Sientific, Wilmington, DE, EUA).

Tabla 4. Condiciones de PCR para la síntesis del promotor de Orx incorporando el marcaje con biotina.

Reactivos	1x
10x PCR Labeling Buffer	2 μ L
Biotin PCR Labeling Mix	2 μ L
Forward Primer (0.5 μ M)	1 μ L
Reverse Primer (0.5 μ M)	1 μ L
Taq Polimerasa (2 U/ μ L)	0.5 μ L
DNA molde	1-10 ng
Agua grado PCR	cbp 20 μ L
	20 μ L

Tabla 5. Digestión con enzimas NotI-NcoI del promotor de Orx con y sin biotina.

Reactivos	1x
Agua ultrapura	cbp 20 μ L
Buffer 10x	2 μ L
DNA (300 ng)	variable
NotI	0.3 μ L
NcoI	0.3 μ L
	20 μ L

6.5.3 Extracción de proteínas nucleares de la línea HEK-293/ebf2

Para la obtención del factor de transcripción ebf2, se extrajeron proteínas nucleares de la línea celular que sobreexpresa ebf2, HEK-293/ebf2. Se realizó el cultivo de ambas líneas

en las condiciones enumeradas en el apartado 6.4.4, se cosecharon mecánicamente con un raspador y se procedió a la extracción de proteínas nucleares empleando el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Reagents (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Este kit permitió el enriquecimiento de las proteínas nucleares al retirar la mayoría de las proteínas citoplásmicas haciendo una lisis secuencial y selectiva, tanto de núcleo y citoplasma, con buffers de solubilización de proteínas. Obtenidos los extractos, se cuantificaron con el método de Bradford construyendo una curva estándar de referencia con albúmina sérica bovina en un rango de concentraciones de 5 a 40 $\mu\text{g/mL}$. Se empleó el reactivo de Bradford Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) y se leyó la absorbancia de cada muestra en el equipo iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 595 nm de longitud de onda. La curva se construyó para obtener la ecuación de la recta y estimar la concentración de las muestras.

6.5.4 Ensayo de retardo del sistema ebf2-promotor de Orx

El experimento de retardo de nuestro sistema se llevó a cabo siguiendo las condiciones anteriores estandarizadas con el kit LightShift Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). En este ensayo, usamos la secuencia del promotor de orexina wild-type marcado con biotina, el promotor wild-type sin marcaje con biotina y las proteínas nucleares extraídas de las células HEK-293/ebf2. Un exceso de DNA sin biotinilar se usó para demostrar la especificidad del retraso.

El gel de poliacrilamida al 10% se preparó mezclando los reactivos de la Tabla 6. Se permitió la polimerización por 30 min y se recorrió en buffer TBE 0.5x por 30-60 min a 100 V. Por otro lado, se realizaron las reacciones de unión con las condiciones de reacción de la Tabla 7, según las recomendaciones del kit, preparando reacciones con extracto nuclear con ebf2 y un control sin DNA biotinilado para demostrar la especificidad de la unión. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 20 min y se cargaron en el gel de poliacrilamida usando el buffer de carga Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5x (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó en TBE 0.5x a 100 V por 90 min.

Tabla 6. Preparación del gel de poliacrilamida al 10% empleado en el ensayo de retardo.

Ractivos	Volumen
Acilamida: bisacilamida (29:1)	2.33 mL
TBE 0.5x	1.75 mL
Persulfato de amonio al 10%	56 μ L
TEMED	7 μ L
Agua destilada	2.8 mL
	7 mL

Tabla 7. Condiciones de unión DNA-proteína del ensayo de retardo de movilidad electroforética.

Reactivos	Volumen
Agua ultrapura	cbp 20 μ L
10x Binding Buffer	2 μ L
Poly (dI•dC) 1 μ g/ μ L	1 μ L
DNA sin marcaje (150 ng)	variable
Extracto de proteínas nucleares (con ebf2)	3 μ L
DNA biotinilado (50 ng)	variable
	20 μ L

Una vez finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia del DNA a una membrana de nylon Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare, Reino Unido) cargada positivamente para optimizar la transferencia. Se transfirió usando buffer de transferencia TBS 1x a 100 V por 2 h. La membrana se entrecruzó inmediatamente terminada la transferencia por 15 min bajo luz UV de 254 nm. La detección de los ácidos nucleicos para evidenciar el retraso en la migración electroforética se hizo por quimioluminiscencia con los reactivos del Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) en el equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) usando el software Quantity One V7.0.1 en el modo Chemi-Hi en captura dinámica secuencial a diferentes tiempos de exposición (30-300 seg).

6.6 Determinación el nivel de expresión relativa del factor de transcripción ebf2 y los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1 en células gliales, neuronales y no neuronales.

6.6.1 Extracción de RNA de cultivo celular

Se extrajo el RNA total de células HEK-293, HEK-293/ebf2, C6, C6/ebf2 y mHypoA-CLU450 cultivadas en las condiciones antes descritas con la técnica de PureZol RNA Isolation Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) seguida de una purificación por columna usando el RNAeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Venlo, Holanda) y la cuantificación por espectrofotometría UV en el equipo NanoDrop 8000 (Thermo Sientific, Wilmington, DE, EUA).

6.6.2 RT-qPCR

La reacción de retrotranscripción se preparó con 1000 ng de RNA total de cada muestra siguiendo el protocolo del kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR (Promega, Madison, WI, EUA). Primero, se mezclaron los reactivos listados en la Tabla 8, se incubaron a 70°C por 5 min y se mantuvieron a 4°C hasta la adición del resto de la mezcla de la reacción de RT-PCR (Tabla 9). El programa de incubación seguido fue: alineamiento (25°C/5 min), extensión (42°C/2 h) e inactivación de la transcriptasa reversa (70°C/15 min) hecho en el equipo Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). La RT-PCR puede conservarse a 4°C hasta su uso.

Tabla 8. Condiciones de RT-qPCR para la síntesis de cDNA.

Componente	Volumen
RNA templado	1-5 μ L (hasta 1000 ng)
Oligo dT(15) Primer (0.5 μ g/ μ L)	1 μ L
Random Primers (0.5 μ g/ μ L)	1 μ L
Agua libre de nucleasas	cbp 7 μ L

Tabla 9. Condiciones de RT-PCR según el kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR.

Componente	Volumen por reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	4.9
Buffer GoScript 5x	4
MgCl ₂	1.6
Nucleótidos	1
RNasine	0.5
Transcriptasa reversa GoScript	1
	cbp 13 µL

La qPCR de Ebf2, Nr4a1, Nr6a1 y GAPDH para determinar su expresión relativa se hizo usando sondas de hidrólisis marcadas con los fluorocromos FAM, Cy5 y 5'HEX (IDT, Coralville, IA, USA) dirigidas específicamente para cada organismo (humano, rata y ratón) en el equipo LightCycler 480 Instrument II (Roche Life Sciences, Branford, CT, EUA) con las condiciones de la Tabla 10.

Tabla 10. qPCR de Ebf2, Nr4a1, Nr6a1 y GAPDH.

Componente	Volumen	[Final]
GoTaq Probe qPCR Master Mix 2x	10 µL	1x
Primer Forward (20x)	1 µL	900 nM
Primer Reverse (20x)	1 µL	900 nM
Sonda de hidrólisis (20x)	1 µL	250 nM
cDNA Templado	2-5 µL	≤250 ng
Agua libre de nucleasas	a 20 µL	

6.6.3 Análisis de resultados

Las curvas de eficiencia de amplificación para cada sonda se hicieron por triplicado en 5 órdenes de magnitud (0.1-1000 ng) para corroborar una eficiencia de amplificación cercana a 2 con las diferentes concentraciones de RNA. Con la amplificación de los estándares se calculó la ecuación de la recta para cada curva y la eficiencia de las sondas previo al experimento.

Las amplificaciones de los experimentos se realizaron por quintuplicado en la condiciones establecidas y los resultados se analizaron siguiendo el método 2^{-ddCt} (Livak y Schmittgen, 2001) para determinar la subexpresión o la sobreexpresión respecto al gen endógeno de referencia.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis del papel del factor de transcripción ebf2 sobre la regulación de la expresión controlada por el promotor del gen de orexina *in vitro*.

7.1.1 Diseño de secuencias

La secuencia del promotor murino del gen de orexina se tomó de la base datos Ensembl. Las deleciones y mutaciones puntuales realizadas se muestran en la Figura 10. Las modificaciones se enfocaron en los sitios olf-1 identificados previamente río arriba del sitio de inicio de transcripción. De esta manera, se trabajó con siete versiones del promotor murino de Orx:

Wild-type (WT)	Secuencia original reportada en Ensembl
Delta-1	Promotor con deleción en el 1er sitio olf-1 río arriba del TSS
Delta-2	Promotor con deleción en el 2do sitio olf-1 río arriba del TSS
Delta-1,2	Promotor con deleción en ambos sitios olf-1
Mut-1	Promotor con mutación en 1er sitio olf-1 río arriba del TSS
Mut-2	Promotor con mutación en 2do sitio olf-1 río arriba del TSS
Mut-1,2	Promotor con mutación en ambos sitios olf-1

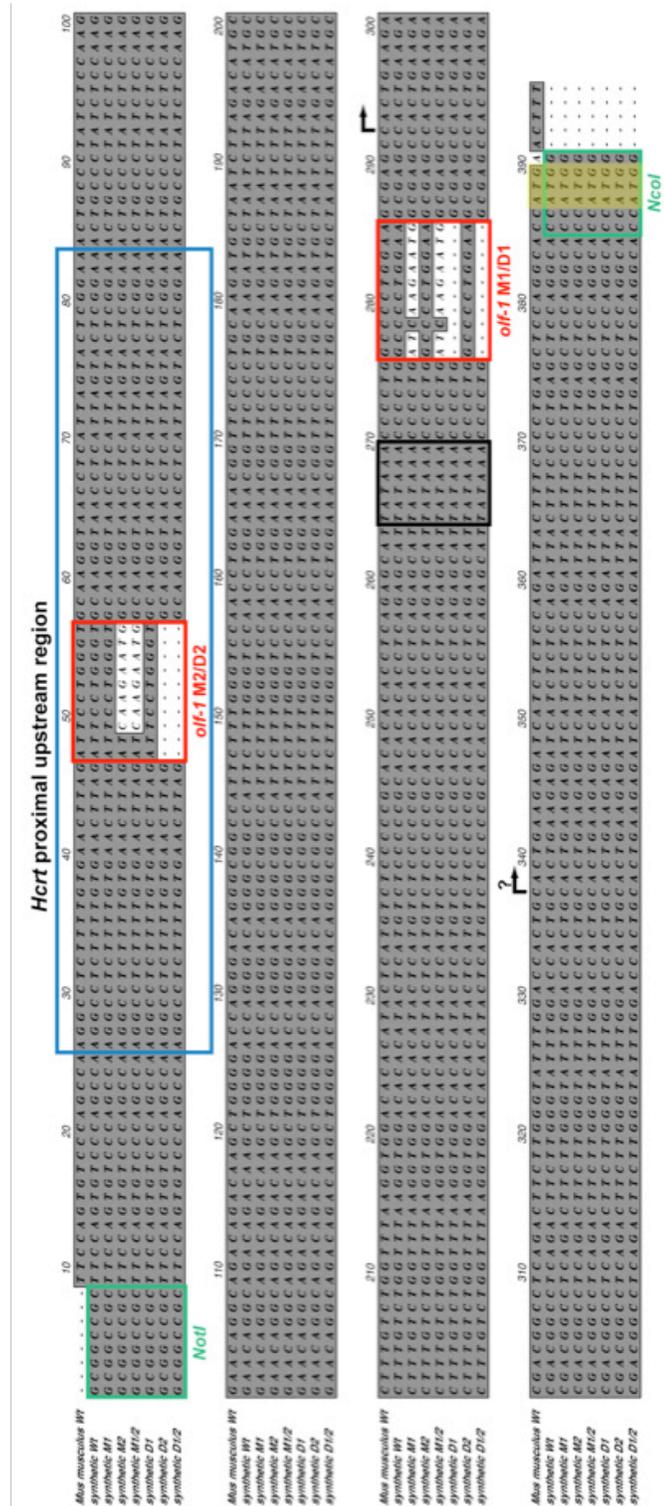


Figura 10. Esquema de la secuencia del promotor murino de Orx y las modificaciones incluidas para la evaluación de la expresión controlada por el promotor *in vitro*. El fragmento evaluado en este trabajo comprende 390 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS).

7.1.2 Construcción de vectores reporteros de expresión

Las secuencias sintéticas se recibieron en los plásmidos pIDTSMART (2508 pb), todos se propagaron transformando bacterias *E. coli* DH5 α con la técnica de choque térmico (Li *et al*, 2010) y seleccionando las clonas con resistencia a ampicilina. Se procedió a la extracción del DNA plasmídico y su caracterización con las enzimas de restricción NotI y NcoI (Figura 11).

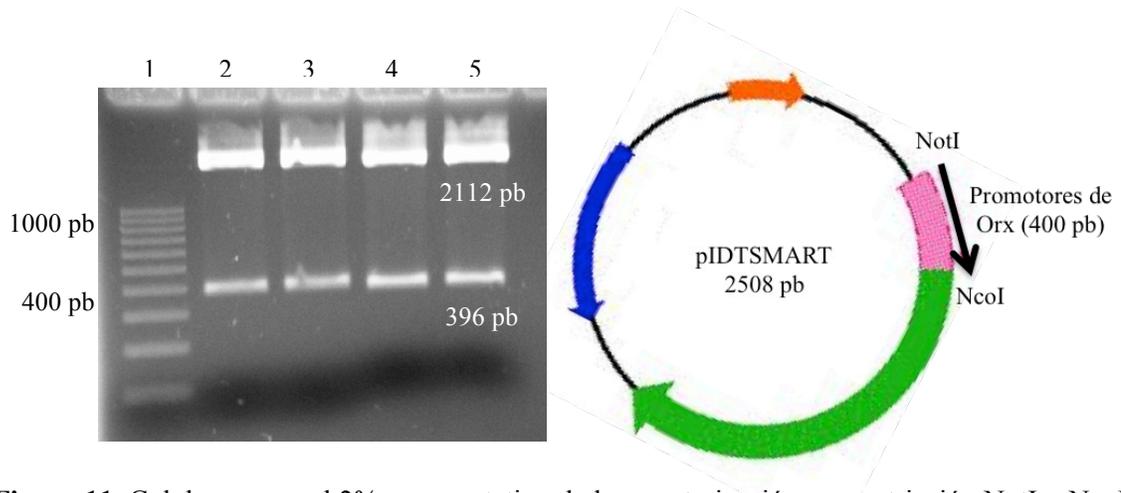


Figura 11. Gel de agarosa al 2% representativo de la caracterización por restricción NotI + NcoI del plásmido pIDTSMART con los promotores de aproximadamente 400 pb. Cada banda se purificó mediante columna. 1: Marcador de pb, 2: Promotor WT, 3: Promotor D1, 4: Promotor D2, 5: Promotor D1/D2.

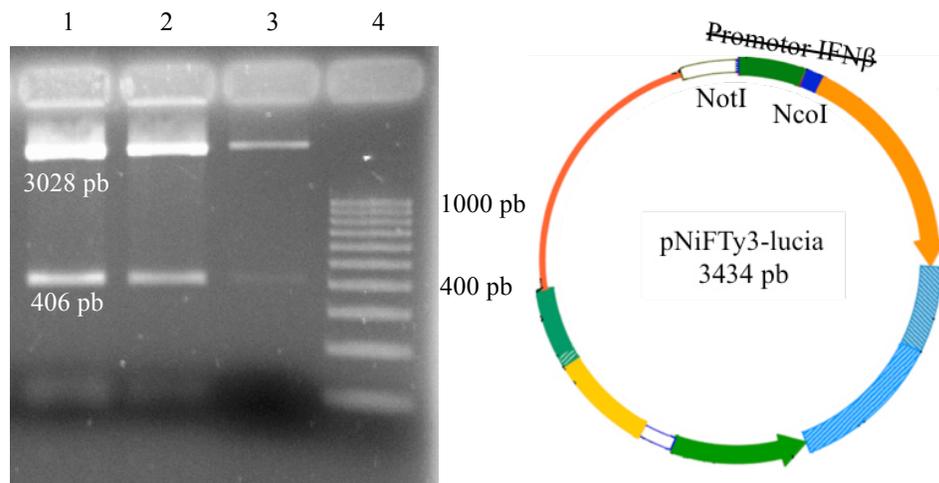


Figura 12. Gel de agarosa al 2% representativo de la caracterización por restricción NotI + NcoI de tres muestras del plásmido pNiFTy3-Lucia donde se logró la propagación y digestión correcta con diferentes rendimientos. La banda de 3028 pb se purificó para ligación con las distintas versiones del promotor de Orx. 1: Marcador de pb; 2, 3 y 4: Plásmido pNiFTy3-Lucia digerido.

El fragmento de interés se purificó para su posterior clonación. Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, se propagó también el plásmido pNiFTy3-Lucia, portador del gen reportero con resistencia al antibiótico zeocina. La caracterización con las mismas enzimas se muestra en la Figura 12 donde se observa el plásmido de 3028 pb al que se le eliminó el promotor original de IFN- β que sería sustituido por las diferentes versiones de los promotores del gen de Orx murino.

Se procedió a efectuar la ligación de los promotores de Orx al plásmido pNiFTy3-Lucia. La ligación y sus respectivos controles se verificaron (Figura 13) antes de proceder a transformar las bacterias competentes con la reacción de ligación, siguiendo el mismo procedimiento antes mencionado.

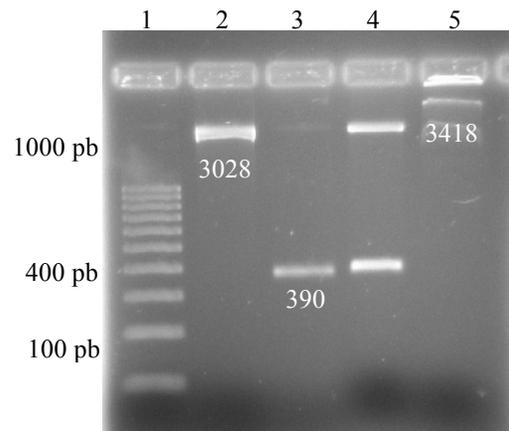


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% representativa de la reacción de ligación del promotor Delta-1. 1: Marcador de pb, 2: Plásmido pNiFTy (3028 pb), 3: Promotor Delta-1 (390 pb), 4: Control sin ligasa de plásmido pNiFTy + promotor Delta-1, 5: Ligación plásmido pNiFTy + promotor Delta-1 (3418 pb). La verificación se hizo con todos los promotores.

El DNA plasmídico obtenido se verificó con las enzimas de restricción NotI + NcoI para confirmar la inserción de los fragmentos en cada construcción (Figura 14). Cabe mencionar que las clonas correctas se transformaron nuevamente para obtener midipreparaciones plasmídicas para el resto del trabajo experimental.

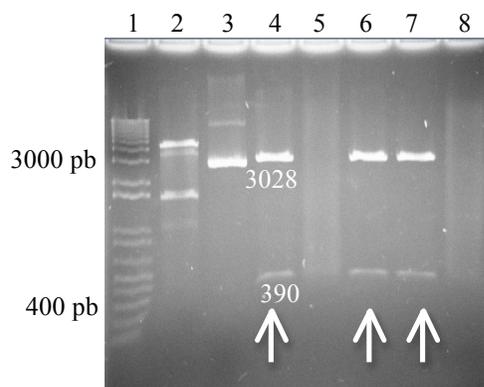


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la transformación de colonias representativas con la reacción de ligación. Se señalan las clonas que incorporaron el fragmento del promotor (390 pb). 1: Marcadir de pb; 2, 3, 5 y 8: Muestras sin el constructo esperado; 4, 6 y 7: Muestras que incorporaron el constructo correcto según el patrón de bandas.

Las midipreparaciones plasmídicas se cuantificaron por espectrofotometría UV y por un método fluorométrico, previa construcción de la curva de calibración con los estándares respectivos (Figura 15). El resultado de ambos métodos se comparó (Tabla 11) y se consideró el valor del método fluorescente para trabajar en experimentos posteriores.

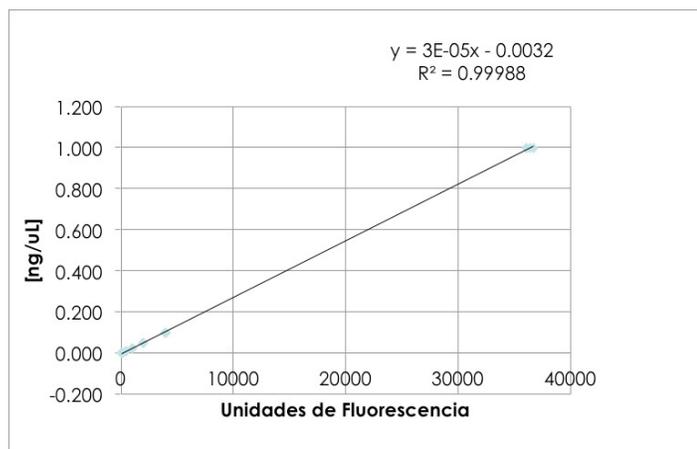


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de DNA plasmídico por el método fluorescente con Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit. Se presenta la ecuación de la recta utilizada y el valor de R^2 .

Plásmido	Nanodrop (ng/ μ L)	Picogreen (ng/ μ L)
WT-pNiFTy	815.8 (81.58 μ g)	472.56 (47.26 μ g)
D1-pNiFTy	443.7 (155.3 μ g)	196.45 (68.76 μ g)
D2-pNiFTy	388.2 (135.87 μ g)	164.87 (57.7 μ g)
D1D2-pNiFTy	143.2 (36.1 μ g)	57.45 (5.74 μ g)
Scr-pNiFTy	535.7 (53.57 μ g)	227.04 (22.7 μ g)

Tabla 11. Comparación de las cuantificaciones de las midipreparaciones plasmídicas obtenidas por espectrofotometría UV y el método fluorescente. Se aprecia una diferencia notable en la cantidad de DNA, el valor tomado para los experimentos es el del segundo método.

7.1.3 Secuenciación de las construcciones con el promotor de prepro-orexina

La PCR punto final con los primers diseñados se estandarizó y se sintetizaron los amplicones (Figura 16) optimizando las condiciones de amplificación antes de proceder a la PCR de marcaje previa a la secuenciación capilar. La electroforesis de los amplicones muestra una banda única del tamaño esperado según el diseño de los primers que flanquea la región del promotor e incluye una porción del plásmido reportero pNiFTy en los extremos para fines de secuenciación. Las secuencias obtenidas por el secuenciador Abi Prism 3130 Genetic Analyzer se analizaron en el programa McVector 12.8 corroborando que los promotores contenían las modificaciones incluidas inicialmente.

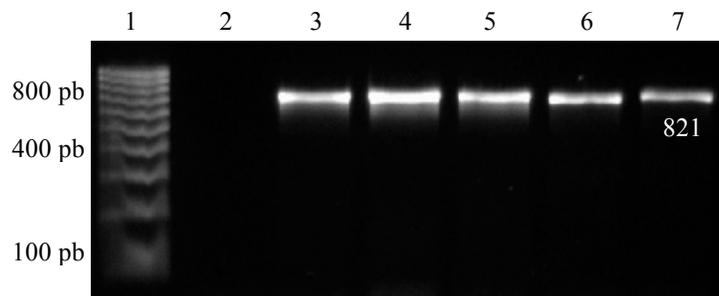


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación de los promotores de Orx para su posterior PCR de marcaje y secuenciación capilar. Las condiciones se optimizaron para minimizar trazas de primers y obtener una banda única de mediana intensidad. 1: Marcador pb, 2: Control negativo, 3: Promotor Wild-type, 4: Promotor Delta-1, 5: Promotor Delta-2, 6: Promotor Delta-1/Delta-2 y 7: Promotor Mutante1/Mutante2.

7.1.4 Cultivo celular

Se propagaron y cultivaron las líneas celulares HEK-293, HEK-293/ebf2, C6, C6/ebf2 y mHypoA-CLU450, según las condiciones descritas en métodos para propagar y conservar las líneas. Previo a los experimentos, las células se cultivaron hasta confluencia de 80-90% previo a su siembra en placa para cada experimento. Adicionalmente, se prepararon las líneas semiestables transfectadas con el promotor de orexina wild-type partiendo de HEK-293/ebf2, C6/ebf2 y mHypoA-CLU450. En el panel de la Figura 17, se muestran microscopias de los modelos celulares en cultivo activo que permiten observar la morfología característica de cada tipo celular.

7.1.5 Ensayo reportero de luciferasa

Se transfectaron las líneas celulares con el plásmido que portaba la secuencia del promotor de orexina wild-type. La señal del gen reportero de luciferasa se midió a las 48 h postransfección agregando el reactivo de revelado al sobrenadante de los pozos en cada condición. En la Tabla 12, se muestran los resultados de la señal para cada línea celular luego de la transfección.

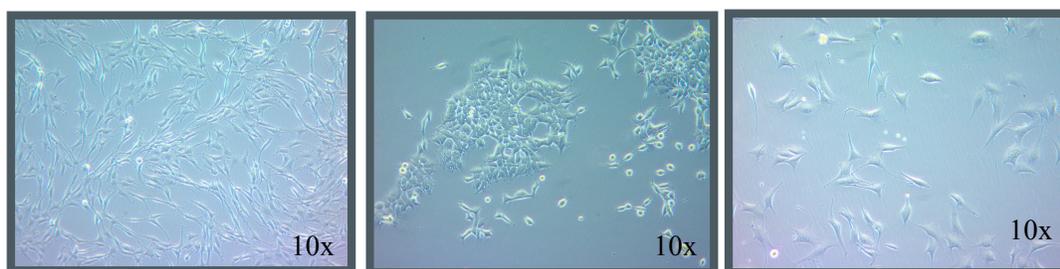


Figura 17. Microscopias del cultivo celular de los modelos celulares de la línea humana HEK-293, de rata C6 y de ratón mHypoA-CLU450, de izquierda a derecha, respectivamente. Las líneas HEK-293 y C6 originales se modificaron para sobreexpresar ebf2, HEK-293/ebf2 y C6/ebf2, de las cuales se generaron líneas semiestables transfectadas con el constructo wild-type. La selección se hizo con la combinación de los antibióticos puromicina y zeocina.

Tabla 12. Luminiscencia registrada en células humanas y de rata que sobreexpresan el factor de transcripción *ebf2*. Las células de hipotálamo de ratón, modelo natural del sistema de orexina, muestran también un incremento en la señal del reportero. * $P < 0.01$ *Vs* HEK-293, ** $P < 0.01$ *Vs* C6, *** $P < 0.01$ *Vs* C6/*ebf2*.

Línea celular	Luminiscencia (URL/10,000 cels)
HEK-293	169202 ± 34614
HEK-293/ <i>ebf2</i>	962642 ± 108946*
C6	3012 ± 485
C6/ <i>ebf2</i>	9093 ± 1334**
mHypoA-CLU450	29824 ± 3157***

Se encontró que en las células humanas HEK-293 que sobreexpresan *ebf2* hay un incremento significativo de la señal comparado con la señal de la línea parental. Lo mismo ocurre en la línea de rata C6 en presencia de *ebf2*. Decidimos entonces, probar el efecto en células de hipotálamo de ratón, las cuales son el modelo natural donde se expresa orexina y que, además, contiene factores y cofactores necesarios para modular su actividad. Al transfectar en células de hipotálamo de ratón con el promotor wild-type, igualmente se incrementa la señal de luminiscencia respecto al negativo y al blanco de las mismas células; también existe una diferencia significativa de la señal al comparar con las células C6/*ebf2*. De tal manera que la transfección con el promotor de orexina wild-type induce un incremento en la expresión del gen reportero en células no neuronales, gliales y neuronales de 3 organismos diferentes: humano, rata y ratón.

Con los resultados anteriores, se procedió a realizar la transfección de las diferentes versiones del promotor de orexina con las modificaciones en los sitios *olf-1* en las líneas celulares con y sin sobreexpresión de *ebf2* (Figura 18). En las células HEK-293/*ebf2*, se observó una diferencia estadísticamente significativa de la señal del reportero luego de la transfección con el constructo wild-type al comparar con la señal generada por los otros constructos, excepto Mut-1. Las transfecciones con los plásmidos Mut-2, Mut-1,2, Delta-2 y Delta-1,2 resultan en una disminución de la señal respecto al promotor wild-type.

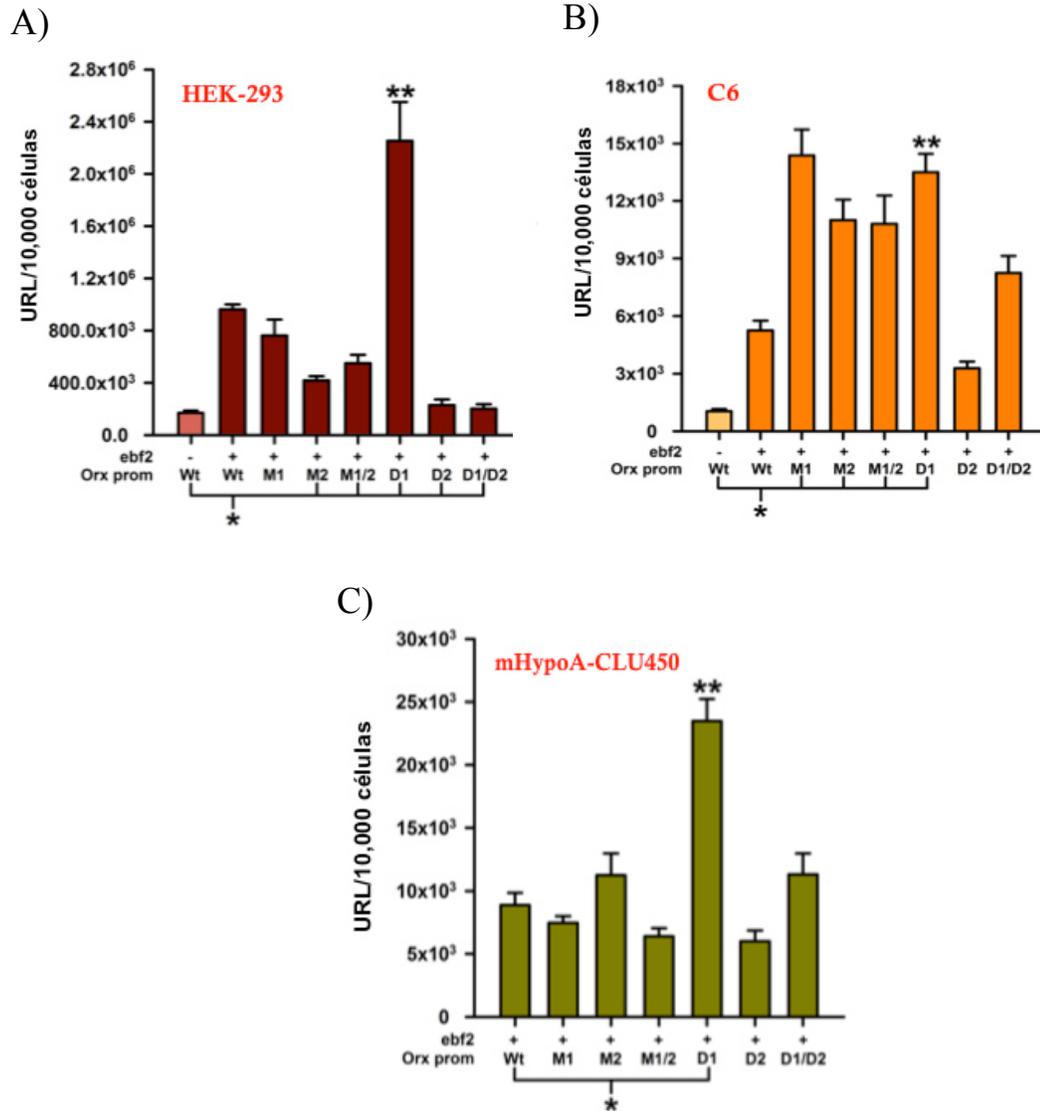


Figura 18. Señal del reportero de luciferasa al transfectar con las diferentes versiones de los promotores de Orx en las líneas celulares que sobreexpresan ebf2 HEK-293/ebf2 y C6/ebf2 así como mHypoA-CLU450, el sistema celular de expresión natural. La modificación de los sitios olf-1 produce un cambio en la señal del reportero, la construcción Delta-1 induce un aumento en las 3 líneas. El patrón del efecto es dependiente del contexto celular, no hubo ningún patrón general detectado. *P<0.001 Vs grupos indicados, **P<0.001 D1 Vs D2 y D1/D2. WT: Promotor Wild-type, M1: Promotor Mutante 1, M2: Promotor Mutante 2, M1/2: Promotor Mutante 1 y 2, D1: Promotor Delta 1, D2: Promotor Delta 2, D1/D2: Promotor Delta 1 y 2.

Interesantemente, la transfección con el plásmido que porta la secuencia Delta-1 incrementó la señal de luminiscencia de manera muy significativa, y la intensidad de esta señal se revierte con el constructo Delta-2 y la doble delección. En la transfección de

las células C6/ebf2, tampoco pudo establecerse un patrón en el efecto. Aquí, existe un incremento de la señal significativo excepto con las versiones del promotor Delta-2 y Delta-1,2; observamos también, un incremento importante y significativo con el promotor Delta-1, respecto al wild-type. En las células de hipotálamo de ratón, la transfección con los constructos wild-type, Mut-1, Mut-2, Mut-1,2 y Delta-1 tiene un aumento significativo de la señal luminiscente; Delta-2 y Delta-1,2 no muestran diferencia significativa. Es así como, en conjunto, se observó que la modificación de los sitios olf-1 afecta la expresión del gen reportero, destacando el incremento común en la transfección por Delta-1 encontrado en las tres líneas celulares.

Para estar seguros que el nivel de luminiscencia era inherente a cada tipo celular y no debido a diferencias en la eficiencia de transfección, preparamos líneas semiestables de las células HEK-293/ebf2, C6/ebf2 y mHypoA-CLU450 partiendo de la transfección transitoria con el promotor wild-type y seleccionando por 4 semanas con los antibióticos para, al cabo de este tiempo, determinar la señal del reportero en cada línea a diferentes tiempos. En la Figura 19, observamos que HEK-293/ebf2 fue la línea con la señal luminiscente más alta, en concordancia con nuestro ensayo previo. Siguiendo en intensidad de señal, encontramos a las células de hipotálamo y, finalmente, a las C6/ebf2. En todos los casos, la luminiscencia se incrementa conforme pasa el tiempo. La diferencia en la intensidad de la señal se redujo en las líneas semiestables respecto a las transfecciones transitorias, siendo el doble en las células HEK-293/ebf2 de la señal encontrada para las células de hipotálamo, mientras que C6/ebf2 tuvo aproximadamente la mitad que mHypoA-CLU450.

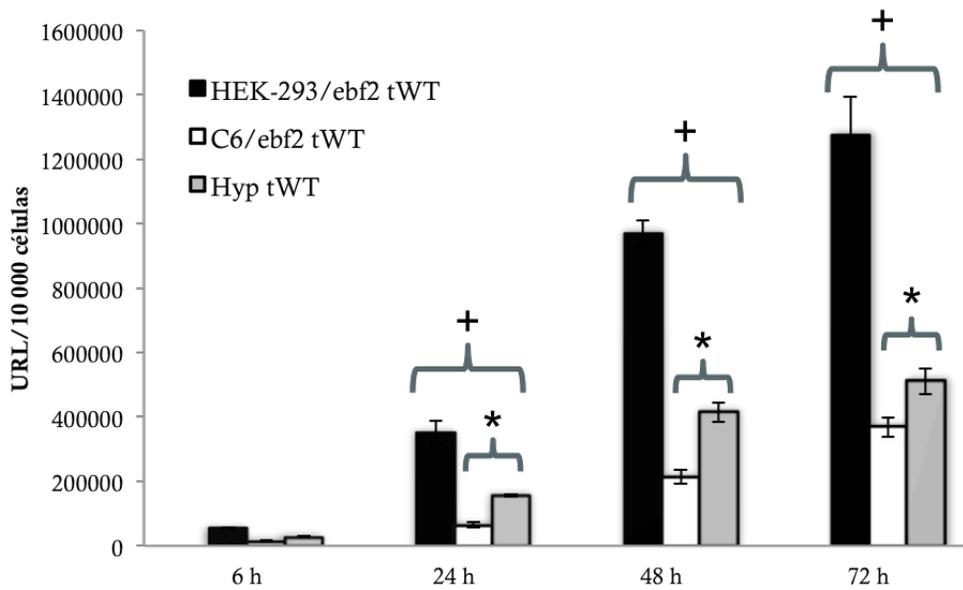


Figura 19. Ensayo reportero de luciferasa de las líneas semiestables transfectadas con el promotor wild-type. La señal de luciferasa se determinó 4 semanas luego de la transfección transitoria inicial y la selección con antibióticos. La señal se normalizó a un mismo número de células. * $P < 0.001$ Vs C6/ebf2, + $P < 0.001$ Vs C6/ebf2 e Hyp, $P < 0.001$ 24 h Vs 48 h Vs 72 h para todas las líneas. Hyp: línea mHypoA-CLU450, tWT: transfección estable con promotor wild-type.

7.2 Determinación de la unión del factor de transcripción ebf2 a la región promotora del gen de orexina en un modelo *in vitro*.

7.2.1 Estandarización del Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética (EMSA)

Se estandarizaron las condiciones de las diferentes etapas del ensayo de movilidad electroforética usando el control positivo incluido en el LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) siguiendo el protocolo del inserto. En esta prueba se analizó el retraso de la proteína del antígeno de superficie del virus Epstein-Barr. Las condiciones establecidas fueron:

- Electroforesis: Gel de poliacrilamida 8x8x0.1 cm al 10% en TBE 0.5x precorrado 45 min a 100 V. La electroforesis se hizo en TBE 0.5x por 90 min a 100 V.
- Transferencia: TBS 1x por 120 min a 100 V.
- Entrecruzamiento: 15 min bajo luz UV (254-312 nm) a 10 cm de la membrana.
- Revelado: quimioluminiscencia en el equipo ChemiDoc XRS⁺ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) por 5-60 seg de exposición.

El resultado de este control positivo se muestra en la Figura 20, donde es evidente el retraso en la migración del DNA control del antígeno nuclear del virus del Epstein-Barr (EBNA) biotinilado al unirse con el extracto del antígeno nuclear del Epstein-Barr. Al añadir un súper exceso de DNA EBNA sin biotina (200 M), se demuestra que la señal de retraso desaparece al ser prevenida por la competición del DNA EBNA no marcado que se agregó en exceso, lo que refiere que el retraso resulta de una interacción específica DNA-proteína.

7.2.2 Síntesis y marcaje de las secuencias del promotor del gen de orexina murino

Las secuencias del promotor de orexina murino en su versión wild-type se amplificaron para obtener suficiente cantidad con una reacción de PCR con y sin marcaje de biotina, útil en el revelado posterior por quimioluminiscencia. El amplicón de 790 pb se ilustra en la Figura 21. Los amplicones con y sin marcaje fueron digeridos con las enzimas NotI y NcoI para eliminar fragmentos de la secuencia del plásmido reportero y delimitar la secuencia del promotor wild-type que se evaluaría en el ensayo de retardo. El resultado de la restricción (Figura 22) muestra la liberación de un fragmento de 390 pb que

corresponde al promotor mínimo murino de orexina que se diseñó. La banda digerida de los amplicones con y sin biotina se purificó por columna y cuantificó.

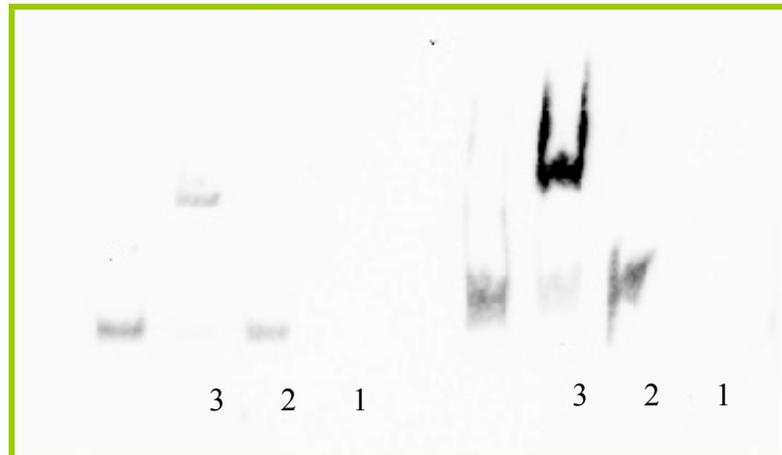


Figura 20. EMSA del sistema control con extracto antigénico nuclear de Epstein-Barr (Extracto EBNA) y DNA al que se une (EBNA-DNA) revelado por quimioluminiscencia. 1) Biotina-EBNA DNA Control, 2) Biotin-EBNA DNA Control + Extracto EBNA (SHIFT), 3) Biotin-EBNA DNA Control + Extracto EBNA + EBNA DNA sin biotina (200-fold molar excess). Derecha: 20 μ L de reacción; izquierda: 5 μ L de la misma reacción.

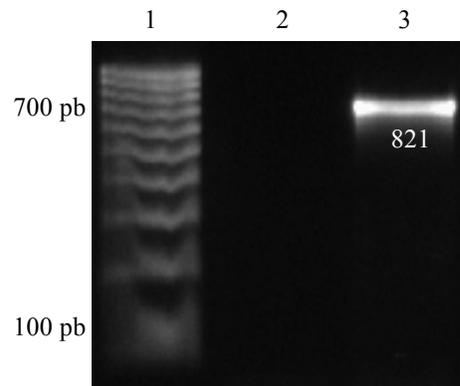


Figura 21. Amplificación en electroforesis en gel de agarosa al 2% separado en buffer TBE 1x del promotor wild-type de Orx de la PCR con y sin biotina. 1: Marcador de pb, 2: Control negativo y 3: Amplicón del promotor Wild-type (821 pb).

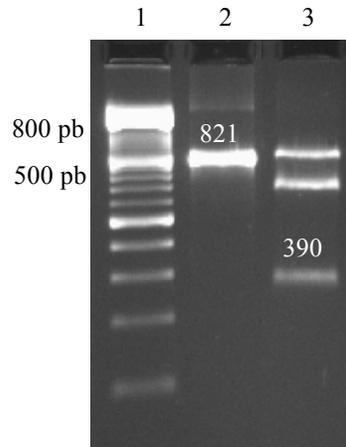


Figura 22. Gel representativo de agarosa al 2% de la restricción de los amplicones con y sin marcaje de biotina del promotor de Orx murino wild-type de 390 pb, indicando la eliminación de las secuencias flanqueantes adicionales que pertenecen al plásmido reportero producto de la clonación tras la digestión con NcoI + NotI. 1: Marcador de pb, 2: Amplicón sin digerir y 3: Amplicón digerido.

Por otra parte, la confirmación del marcaje se evaluó con un dot-blot manual (Figura 23) que incluyó estándares de 0.8-25 fmol obtenidos del kit Biotin 3' End Labeling Kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) y el promotor con y sin biotina purificado. La aplicación en la membrana y el revelado se hizo con la técnica probada en la sección 3.1. Esto nos permitió establecer que el marcaje se logró eficientemente.

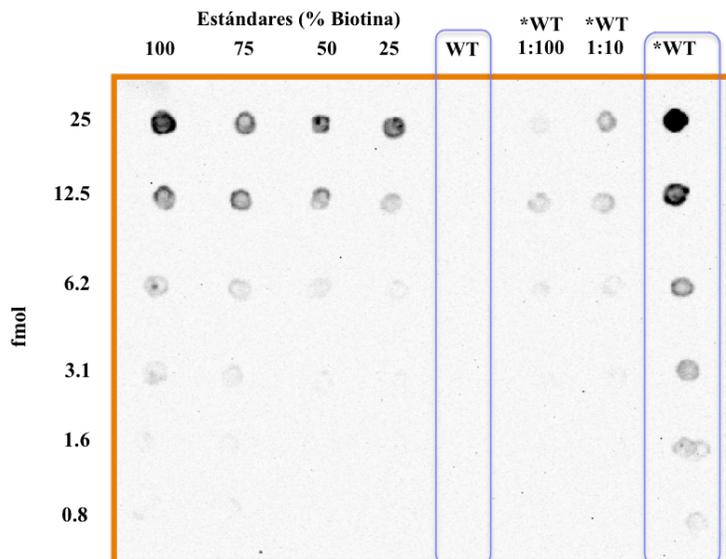


Figura 23. Dot-blot manual (hand-spotting) para corroborar el marcaje con biotina del fragmento del promotor wild-type biotinilado (recuadro *WT). No se encontró señal del promotor sin biotinilar (recuadro WT). La exposición se hizo por 60 seg para captar la señal de luminiscencia.

7.2.3 Extracción de proteínas nucleares de la línea HEK-293/ebf2

La extracción de proteínas nucleares se hizo a partir de células HEK-293 que sobreexpresan el factor de transcripción ebf2 para maximizar la cantidad de la proteína de interés para el ensayo de retardo. La extracción de proteínas se hizo con el kit NEPER Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Reagents (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) lisando primero el citoplasma y luego, el núcleo a manera de fraccionar el contenido proteico y conseguir su separación. La cuantificación del extracto nuclear y citoplásmico se hizo con el método de Bradford utilizando una curva de calibración (Figura 24) preparada con estándares de albúmina sérica bovina en un rango de 5 a 40 $\mu\text{g/mL}$ para determinar la ecuación de la recta a emplear para interpolar la concentración de las muestras problema.

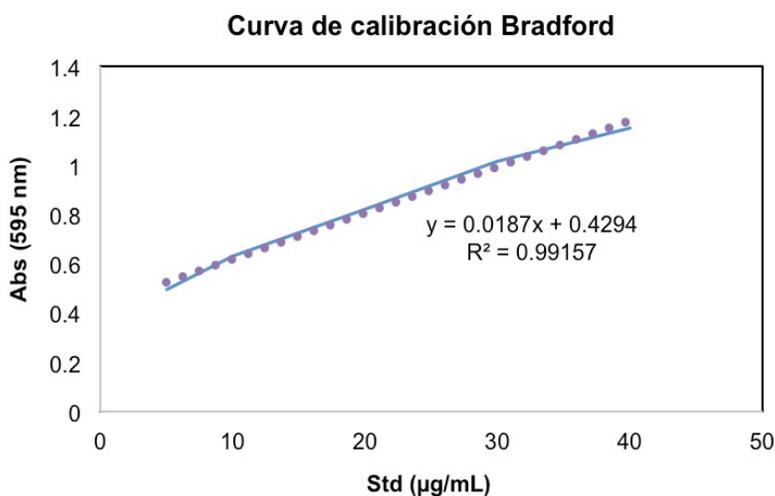


Figura 24. Curva estándar de referencia para la cuantificación de las fracciones proteicas de citoplasma y núcleo de células HEK-293/ebf2. Se leyeron 5 estándares por triplicado en cada punto de concentración. La ecuación de la recta se usó para calcular la concentración de las muestras.

Se obtuvieron, de acuerdo a la cuantificación realizada, 1274 μg y 205 μg de extracto proteico citoplásmico y nuclear, respectivamente, partiendo de alrededor de 4 millones de células. Además, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie para verificar la integridad de las proteínas nucleares (Figura 25). Las proteínas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

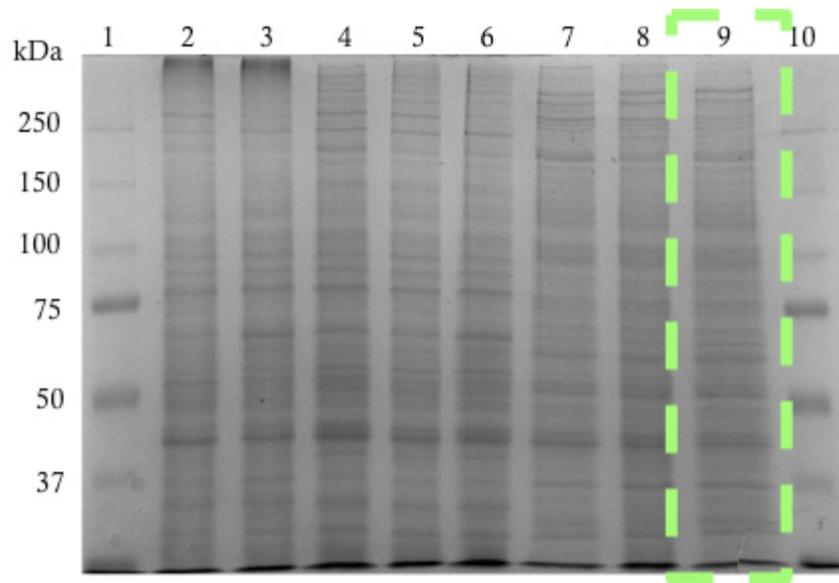


Figura 25. SDS-PAGE al 12% de las proteínas citoplasmáticas y nucleares extraídas de la línea celular HEK-293/ebf2 teñidas con azul de Coomassie. 1 y 10: Marcador de PM, 2: Proteínas totales HEK-293, 3: Proteínas totales HEK-293/ebf2, 4 y 5: Proteínas citoplasmáticas HEK-293, 6: Proteínas citoplasmáticas HEK-293/ebf2, 7 y 8: Proteínas nucleares HEK-293 y 9: Proteínas nucleares HEK-293/ebf2 (recuadro).

7.2.4 Ensayo de retardo del sistema ebf2-promotor de Orx

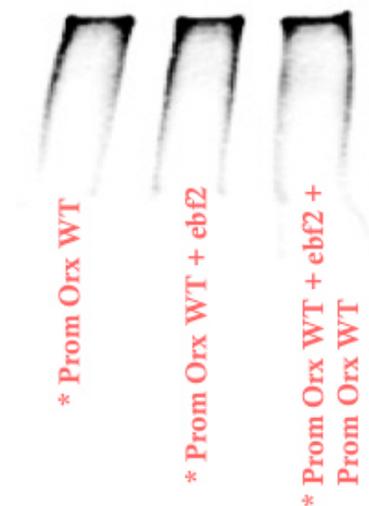


Figura 26. Ensayo de retardo de movilidad electroforética del promotor de Orx versión wild-type, donde se observa que la incubación con extracto nuclear no produce el retardo en la migración del fragmento del promotor.

El ensayo de retardo de movilidad electroforética se preparó, incubó y reveló según la metodología descrita. La señal de la membrana demostró que no existe un retraso en la migración del fragmento del promotor de Orx en su versión wild-type al ser incubado con extracto nuclear que contiene al factor de transcripción ebf2 (Figura 26). Además, la adición de un exceso de promotor sin marca de biotina para confirmar la especificidad de la unión no disminuyó la intensidad de la señal de la banda biotinilada que se observó a la misma altura de migración electroforética. De esta manera, el resultado del ensayo indica que no existe una unión directa *in vitro* entre el factor de transcripción ebf2 y el fragmento del promotor mínimo de Orx probado.

7.3 Determinación del nivel de expresión relativa del factor de transcripción Ebf2 y los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1 en células gliales, neuronales y no neuronales.

7.3.1 Extracción de RNA de cultivo

La extracción de RNA se hizo de líneas celulares al llegar a 80-90% de confluencia, cosechadas mecánicamente y procesadas con la técnica de PureZol y purificación con columna. Las concentraciones de RNA de cada línea se detallan enseguida. En todos los casos, el RNA fue suficiente para los experimentos posteriores.

HEK-293	833.7 ng/ μ L
HEK-293/ebf2	2790 ng/ μ L
C6	208 ng/ μ L
C6/ebf2	718.8 ng/ μ L
mHypoA-CLU450	1604 ng/ μ L

7.3.2 RT-qPCR

Las curvas de eficiencia de las sondas de hidrólisis Ebf2, Nr4a1, Nr6a1 y el gen normalizador Gapdh (Figuras 27-30) se hicieron para cada organismo (rata, ratón y humano), obteniendo eficiencias aceptables (1.8-2) (Tabla 13) corroborando que la amplificación se lleva a cabo de manera similar con todas las sondas y la sub o sobreexpresión resultante es producto de la expresión endógena de la muestra.

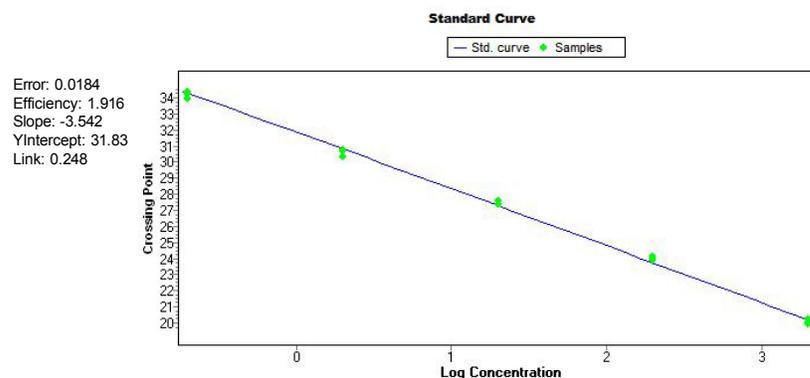


Figura 27. Curva de eficiencia de la amplificación con la sonda Ebf2 en células HEK-293/ebf2 con 5 puntos de concentración. La gráfica se obtuvo con el programa LightCycler 480 Software V1.5.

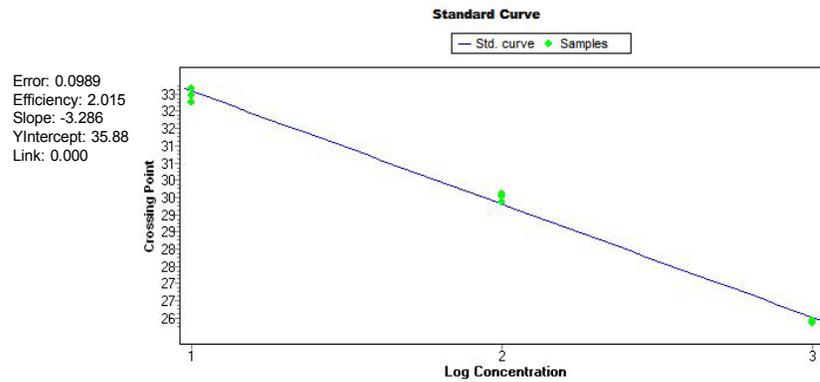


Figura 28. Curva de eficiencia de la amplificación con la sonda Nr6a1 en células humanas HEK-293/ebf2.

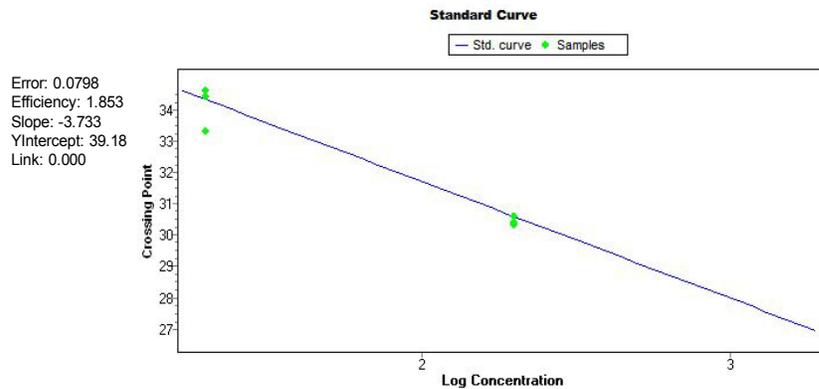


Figura 29. Curva estándar de eficiencia de amplificación con la sonda Nr4a1 en células de hipotálamo de ratón mHypoA-CLU450.

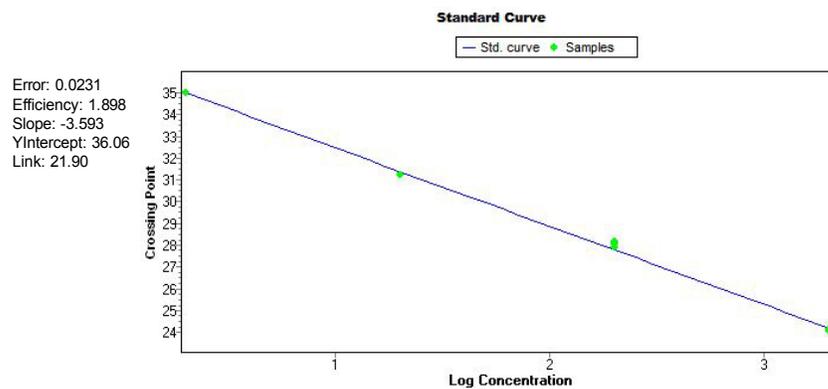


Figura 30. Curva estándar que demuestra la eficiencia de la amplificación con la sonda de Gapdh, gen endógeno seleccionado, en células C6/ebf2 de rata. Gapdh se evaluó en cada organismo para verificar su amplificación.

Tabla 13. Eficiencias de amplificación determinados en 5 órdenes de magnitud (0.1-1000 ng de RNA). La eficiencia mostrada se calculó en una curva de amplificación con 5 puntos de concentración por triplicado usando el programa LightCycler 480 Software V1.5.

	Eficiencias de amplificación		
	Rata	Ratón	Humano
Ebf2	1.991	1.975	1.916
Nr4a1	2.049	1.853	1.875
Nr6a1	2.076	2.149	2.015
Gapdh	1.898	1.817	1.751

La amplificación de las muestras problema se hizo para los blancos de interés Ebf2, Nr4a1 y Nr6a1 y el gen endógeno Gapdh por quintuplicado a partir de 1000 ng de RNA. Se ilustran las amplificaciones de las muestra problema con las curvas de amplificación respectivas (Figuras 31-33), donde se muestra la señal del canal de fluorescencia correspondiente al fluorocromo usado en cada sonda. La desviación estándar se mantuvo en límites aceptables en todos los experimentos.

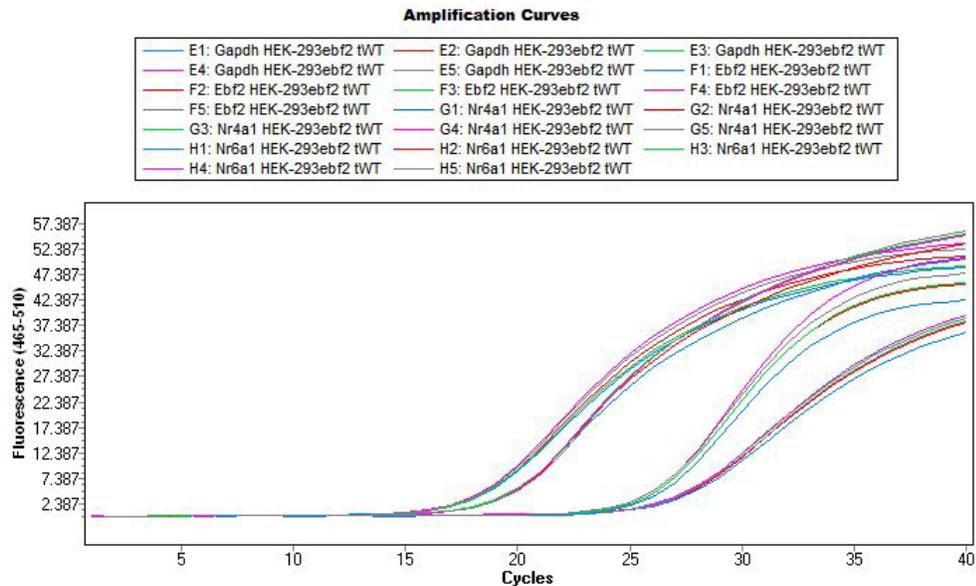


Figura 31. Curva representativa de la amplificación de las muestras problema con las sondas de Gapdh, Ebf2, Nr6a1 y Nr4a1 en células HEK-293/ebf2. La señal de fluorescencia registrada corresponde al fluoróforo FAM.

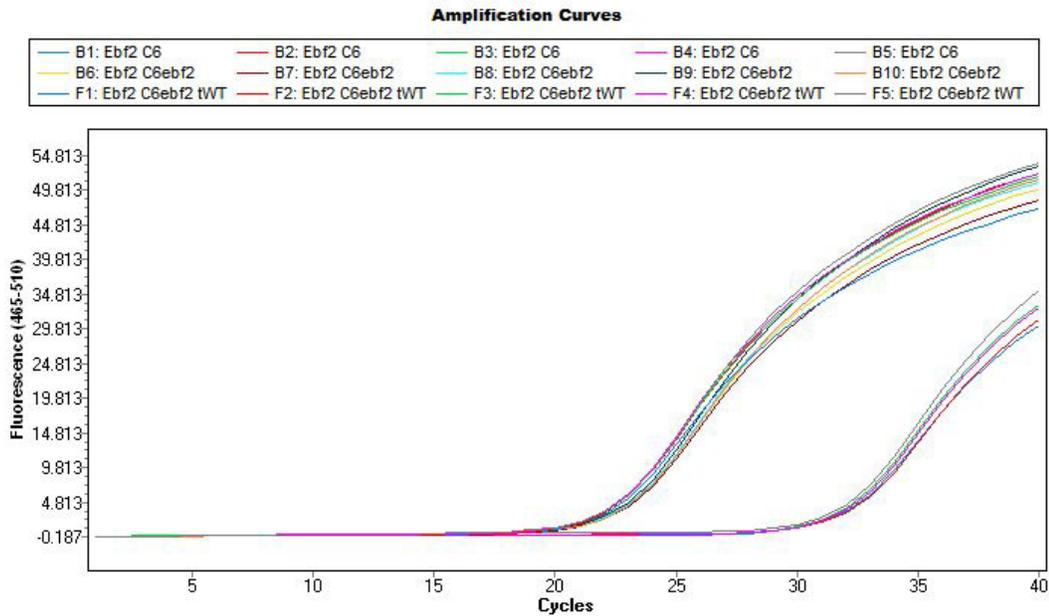


Figura 32. Curva representativa de la amplificación de Ebf2, Nr6a1 y Nr4a1 en células C6 parentales y en células C6 que sobreexpresan el factor de transcripción ebf2. La señal de fluorescencia es del compuesto FAM.

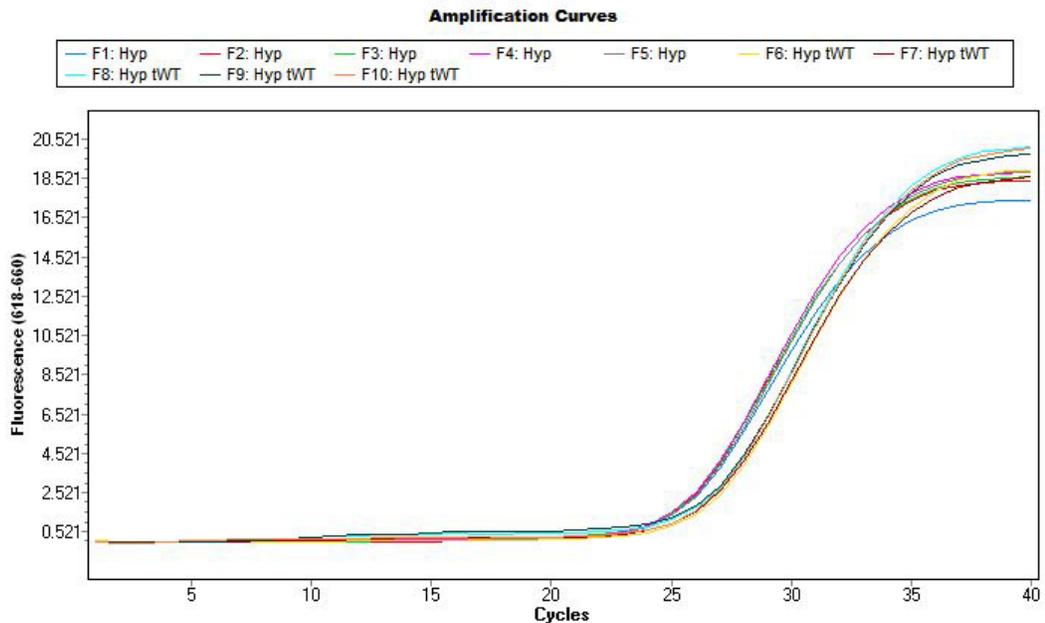


Figura 33. Curva de la amplificación de Nr6a1 en las células de hipotálamo de ratón mHypoA-CLU450 leídas en el canal de fluorescencia de Cy5 (618-660 nm).

7.3.3 Análisis de resultados

Los resultados 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.

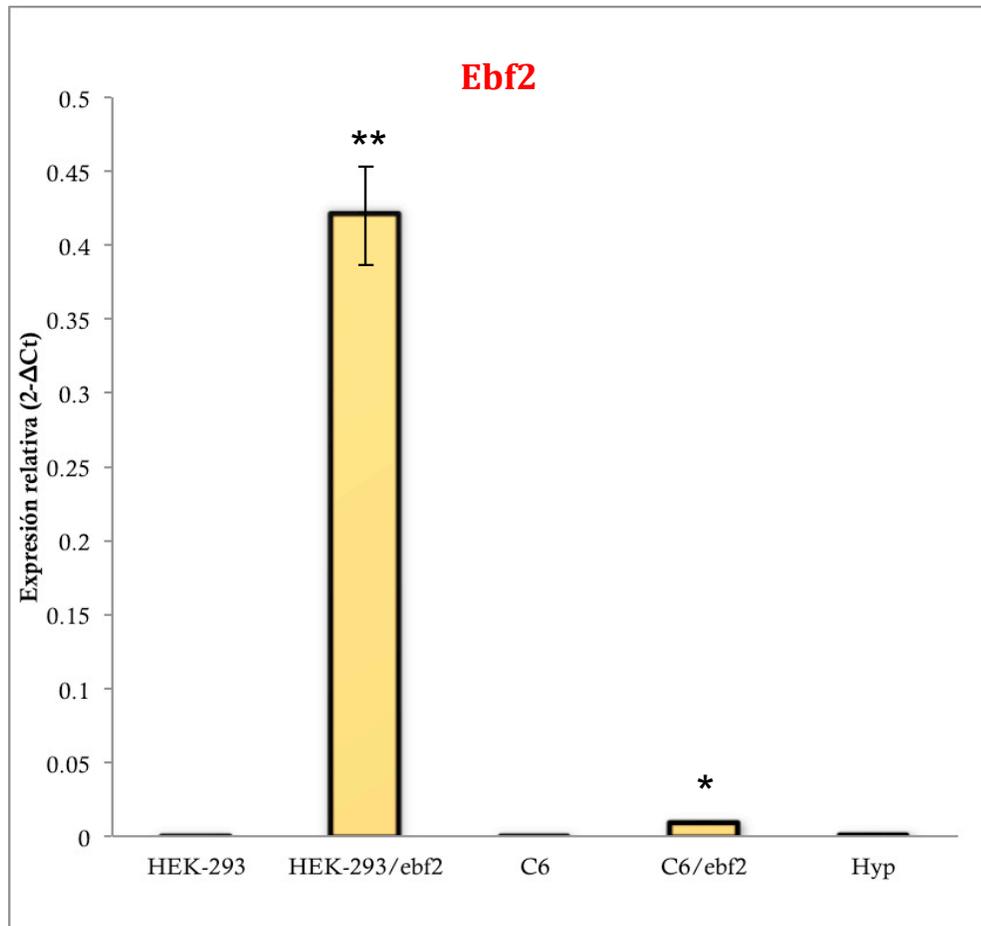


Figura 34. Análisis de expresión del factor de transcripción Ebf2 en todas las líneas celulares. El gen GAPDH se usó como normalizador. La expresión relativa fue mayor, como se esperaba, en las células HEK-293 y C6 modificadas para sobreexpresar Ebf2. El hipotálamo de ratón tiene niveles importantes de manera endógena y las líneas parentales HEK-293 y C6 exhiben una expresión prácticamente nula. **P<0.01 Vs todas las líneas, *P<0.01 Vs C6 e Hyp.

Se midió la expresión relativa de ebf2 en las líneas celulares para correlacionar su nivel de expresión con la señal del gen reportero obtenida en el ensayo de luciferasa (Figura 34). Encontramos que las células HEK-293 que sobreexpresan ebf2 presentan un nivel de expresión relativa muy alto respecto al resto de los tipos celulares, lo cual es estadísticamente muy significativo. Observando el resto de las líneas, en segundo lugar se encuentran las células C6 modificadas para sobreexpresar ebf2. Las células de

hipotálamo murino, por otra parte, expresan de manera endógena un nivel ligeramente mayor del mensajero de ebf2 al compararlas con las de glioblastoma de rata C6 parentales, lo que nos confirma que representan un modelo natural para la evaluación de orexina. Es de notar que en las células HEK-293 parentales, la expresión es indetectable.

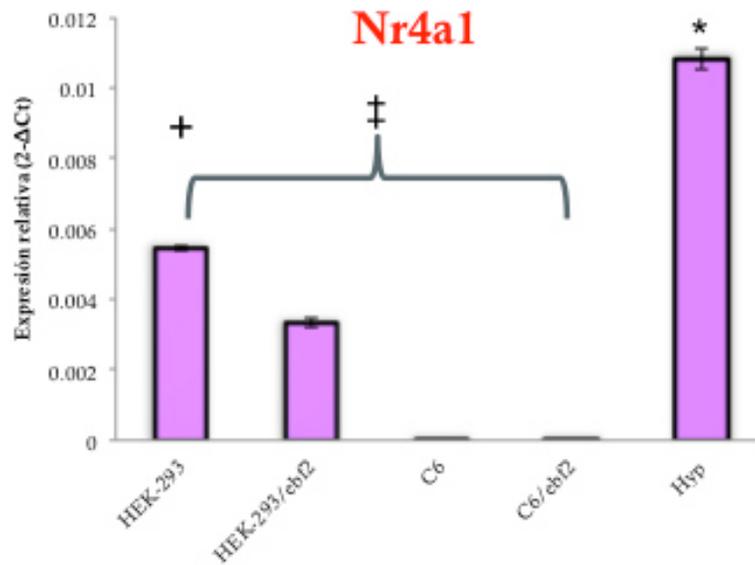


Figura 35. Expresión relativa del receptor nuclear Nr4a1 determinado por qPCR en los diferentes tipos celulares. *P<0.001 Vs todos los grupos, +P<0.001 Vs HEK-293/ebf2, ‡P<0.001 Vs líneas C6.

Finalmente, se investigó el nivel de expresión relativa de los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1 para determinar si su expresión tenía relación con el nivel del reportero en el ensayo reportero de luciferasa. Nr4a1 y Nr6a1 están previamente reportados como represores e inductores relacionados con la modulación de la expresión de orexina.

El análisis de Nr4a1 (Figura 35) demostró que tiene el nivel más alto de expresión relativa en células de hipotálamo en comparación con los demás tipos celulares. Las células humanas HEK-293 parentales y las modificadas para sobreexpresar ebf2 también mostraron niveles importantes y es de hacer notar, que la sobreexpresión de ebf2 induce una disminución estadísticamente significativa en la expresión de Nr4a1. Este efecto sólo se observó en células humanas. Las células gliales de rata C6 con y sin ebf2 poseen el menor nivel de mensajero.

La expresión de Nr61 (Figura 36) se encontró de manera similar en las diferentes líneas. Hipotálamo reportó los niveles más elevados seguido de HEK-293 donde, igualmente, se ve una disminución en la expresión de Nr61 al sobreexpresar ebf2; sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa. C6 y C6/ebf2 tuvieron los niveles más bajos registrados.

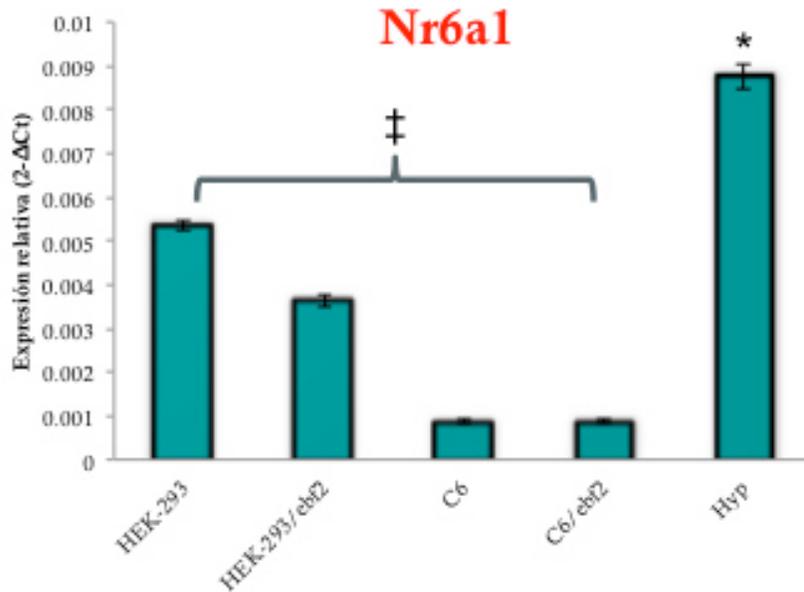


Figura 36. Análisis de expresión relativa para Nr61. La comparación se hace, igualmente, entre todas las líneas celulares y se observó un patrón de expresión muy similar al de Nr4a1. *P<0.001 Vs todos los grupos, ‡P<0.001 Vs líneas C6.

8. DISCUSIÓN

Las orexinas o hipocretinas son neurotransmisores que se encuentran en una pequeña población neuronal del hipotálamo. El sistema de Orx está involucrado en el control de funciones como el mantenimiento del estado de alerta, el sistema de recompensa, el ciclo de sueño-vigilia y la ingesta de alimento que dependen de su correcta regulación. La comprensión de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de Orx es clave para la generación de potenciales nuevas aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de desórdenes de las conductas motivadas (alimentación y adicción) y el sueño (insomnio). Mas aún, la capacidad de dar lugar a un fenotipo orexigénico *in vitro* es de interés en la terapia celular para reemplazar las neuronas perdidas en trastornos neurológicos como la narcolepsia (Arias-Carrión y Murillo-Rodríguez, 2014). Los niveles de Orx en el cerebro son dinámicos y varían durante el día de acuerdo a la actividad física y ritmo circadiano del individuo. Sin embargo, la modulación de su expresión y los factores y cofactores que dan lugar a la especificación del fenotipo orexigénico son procesos complejos controlados a varios niveles y no están completamente elucidados. Tampoco se ha establecido si estas variaciones se deben a cambios en la actividad de las neuronas que producen Orx o en su biosíntesis a nivel transcripcional o traduccional (Burt *et al*, 2011; Tanno *et al*, 2013; Arafat *et al*, 2014; Routh *et al*, 2014; Iwasa *et al*, 2015; Justinussen *et al*, 2015; Zhou *et al*, 2015).

Dentro de los elementos de control de Orx, el promotor del gen es clave para la modulación de la expresión sólo en ciertas neuronas del hipotálamo. Incluye sitios de control entre los que se encuentran el elemento regulador de orexina 1 (OE1) y el elemento regulador de orexina 2 (OE2), los cuales controlan la expresión específica de Orx en hipotálamo (Moriguchi *et al*, 2002). El elemento OE1 se sitúa río arriba de sitio de inicio de la transcripción del gen y se ha propuesto que previene la expresión fuera del hipotálamo, ya que constructos que contienen un fragmento de alrededor de 400 pb que está río arriba del gen de Orx e incluyen un gen reportero nuclear de β -galactosidasa, se expresan pobremente en el cerebro de ratones transgénicos (Moriguchi *et al*, 2002). El papel restrictivo se atribuye a la presencia de elementos de receptores nucleares (NurRE) que yacen próximos a OE1 (Tanaka *et al*, 2010), como a los que se

unen Nr6a1 y Nr4a1. Además, dentro de la secuencia promotora se encuentran sitios de unión a factores de transcripción como Foxa2 (Silva *et al*, 2009), Igfbp3 (Honda *et al*, 2009), Nr6a1 (Tanaka *et al*, 2010) y Lhx9 (Dalal *et al*, 2013; Liu *et al*, 2015) que inducen o reprimen su activación para lograr la fina regulación que resulta en su expresión específica.

Nuestro grupo de investigación reportó en 2011 un fenotipo narcoléptico acompañado de la disminución de las neuronas que expresan Orx en el hipotálamo de ratones knock-out al factor de transcripción ebf2 (De la Herrán-Arita *et al*, 2011), sugiriendo un posible rol en la regulación de su expresión. Ebf2 es un factor de transcripción que pertenece a la familia de factores de transcripción hélice-giro-hélice (bHLH) y participa en el establecimiento de un perfil génico particular en procesos como neurogénesis, diferenciación, migración y especificación neuronal en el sistema olfatorio, el córtex y el cerebelo (Crocì *et al*, 2006; Chuang *et al*, 2011; Roby *et al*, 2012). Siguiendo el hallazgo anterior y con el objetivo de demostrar el efecto del factor de transcripción ebf2 sobre el promotor del gen de Orx *in vitro*, se realizó un ensayo reportero de luciferasa. En este experimento, se observó un incremento en la actividad del promotor de Orx en células no neuronales y gliales que sobreexpresan ebf2 y en células neuronales que contienen ebf2 de manera endógena en 3 diferentes especies (rata, ratón y humano). La transfección del constructo que porta la secuencia wild-type del promotor incrementó la señal del reportero en los modelos celulares probados. A nuestro conocimiento, ebf2 es el primer factor de transcripción reportado con un efecto positivo en la regulación del promotor murino del gen de Orx *in vitro* en células gliales de rata, hipotalámicas de ratón y no neurales humanas. El efecto de otros factores de transcripción sobre el promotor ha sido previamente reportado. En el 2009, un estudio describió al factor Foxa2 como un inductor de la actividad del promotor en células hepáticas (Silva *et al*, 2009); sin embargo, no citan un efecto en células neuronales. Otros factores de transcripción, al contrario, han mostrado disminuir la actividad del promotor *in vitro* en ensayos reporteros similares como Igfbp3 (Honda *et al*, 2009) y Nr6a1 (Tanaka *et al*, 2010) o bien, no tener efecto alguno *in vitro* como Lhx9 (Dalal *et al*, 2013) pero sí *in vivo*, al promover la aparición de neuronas ectópicas que expresan Orx fuera de la región hipotalámica (Liu *et al*, 2015).

Luego, modificamos la secuencia original (wild-type) del promotor murino incluyendo deleciones y mutaciones enfocadas en los sitios olf-1. También se observó un incremento en la señal del reportero transfectado con el constructo Delta-1. El incremento es común en las tres líneas. Por otra parte, la deleción del segundo sitio (Delta-2) disminuyó la actividad del promotor; sin embargo, la deleción de ambos sitios olf-1 no elimina la señal del reportero. La mutación de uno o ambos sitios olf-1 produce diferentes resultados, según el tipo celular.

Resultados diferentes se han obtenido de acuerdo al origen de las líneas celulares probadas para evaluar la actividad del promotor de Orx. Las células usadas en nuestro estudio son derivadas de sistema nervioso central y periférico y contienen los factores y proteínas necesarios para la expresión del sistema orexigénico. Las deleciones y mutaciones en los sitios olf-1 mostraron diferentes efectos en cada tipo celular que pueden atribuirse factores tejido-específicos. Además, las células poseen represores y proteínas reguladoras que complementan la expresión de Orx y el resultado individual parece depender de la línea celular reflejando que son necesarias proteínas específicas adicionales para incrementar o reprimir la actividad del promotor. Cabe hacer notar, que el hecho de que ebf2 sea capaz de activar el promotor de Orx en tres líneas celulares distintas provenientes de tres organismos diferentes sugiere un posible rol como regulador relevante en el proceso de transcripción.

La actividad represora enlistada en estudios previos se ha señalado como la causa de la pobre expresión de reporteros *in vitro* en ensayos con el promotor de Orx en diferentes líneas celulares. En contraste, nuestros datos muestran que un fragmento mínimo del promotor murino que contiene la secuencia hasta el elemento OE1 puede promover la expresión del reportero de luciferasa, alrededor de 30 veces con más intensidad que el promotor de IFN- β del constructo original. La sobreexpresión de ebf2 en HEK-293 y C6 aumentó la expresión del reportero 4 veces la señal original.

También, es factible que la regulación que ejerce ebf2 ocurra a través de otras secuencias o sitios de unión, no sólo los sitios olf-1 o la porción mínima del promotor putativo murino estudiados puesto que la mutación incluida que altera la secuencia core de unión (CCTGG) reportada para la familia de factores de transcripción no afecta ni

revierte la señal en HEK-293/ebf2 y mHypoA-CLU450. Además, la misma mutación incrementa la señal en C6 de manera similar a Delta-1.

Así, la deleción de un fragmento de 10 pb correspondiente a un sitio olf-1 7 pb río debajo de la caja TATA del promotor mínimo (Delta-1) incrementa la expresión del reportero en 2.5 veces en las 3 líneas celulares que expresan ebf2. El mecanismo por el que Delta-1 incrementa la señal del reportero está pendiente de elucidar. Entre las hipótesis plausibles se encuentra el acortamiento en la distancia entra la caja TATAA y el sitio putativo de inicio de la transcripción o el cambio en el uso preferencial de los nuevo sitios de la transcripción en la secuencia diseñada (Kovacs y Butterworth, 1986; Caninci *et al*, 2006; Ponjavic *et al*, 2006; Sandelin *et al*, 2007). Al menos una secuencia adicional con el contexto adecuado se visualiza río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Queda como perspectiva determinar si la mutación en el sitio proximal olf-1 desplaza el uso preferente del sitio de inicio de la transcripción hacia esta posición aunque esto acortaría la longitud de la región no traducida 5' del transcrito, lo cual podría conducir a un aumento en el traducción del gen reportero (Pal *et al*, 2011; Rojas-Durán y Gilbert, 2012).

La deleción del sitio distal olf-1 (Delta-2) revierte el efecto de Delta-1. Esta segunda deleción se encuentra dentro de la secuencia OE1, propuesta como restrictiva de la expresión de Orx, ya que deleciones en OE1 previenen o evitan la expresión del gen reportero en neuronas orexigénicas del hipotálamo y la expresión directa en neuronas fuera de esta región (Moriguchi *et al*, 2002; Tanaka *et al*, 2010). Sin embargo, estas conclusiones se apoyan en el análisis de una fracción de las células que coexpresan el transgen y en el nivel de Orx endógeno (Moriguchi *et al*, 2002). En conjunto, estas observaciones y nuestros resultados muestran que la integridad de OE1 es necesaria para obtener altos niveles de expresión.

La mutación de la secuencia core del sitio olf-1 distal (constructo Mut-2) no disminuye la señal en C6/ebf2 y mHypoA, pero sí lo hace en HEK-293/ebf2. Este resultado apunta que los sitios olf-1 no son blanco directo de ebf2 y que la interacción ebf2-promotor podría ser a través de otros elementos.

Nuestros datos muestran que el efecto de las modificaciones en el promotor son dependientes de la línea celular analizada y podrían deberse a la expresion de factores de

transcripción y proteínas accesorias. Las diferencias en la promoción de la expresión del gen reportero entre nuestros plásmidos y los de otros autores pueden deberse al diseño que usamos, el cual se limitó a la secuencia de OE1 evitando la inclusión de elementos de respuesta NurRE. Por otra parte, las construcciones usadas en las transfecciones conservaron el contexto original de los sitios de inicio de la transcripción y traducción y la distancia entre el sitio de inicio de transcripción y el codón AUG del mensajero de Orx. Los constructos de otros grupos usan en su diseño una región promotora más larga cambiando el contexto de estos sitios (Moriguchi *et al*, 2002; Tanaka *et al*, 2010) y aumentan la distancia entre los sitios de inicio de la transcripción y la traducción afectando directamente la eficiencia de transcripción y traducción, ya que se ha visto que a una distancia más corta es más eficiente la transcripción del mensajero (Pal *et al*, 2011; Rojas-Durán y Gilbert, 2012).

Por otro lado, en el ensayo de retardo no fue posible detectar un retraso en la migración electroforética del promotor wild-type incubado con extracto nuclear de células HEK-293/ebf2, apoyando la idea de que no existe interacción directa con el promotor bajo las condiciones probadas. Sin embargo, sería factible ensayar una nueva estrategia que incluya una secuencia del promotor más pequeña, otras secuencias potenciales de unión y cambios en las condiciones de reacción de unión para descartar cualquier interacción. También es necesario confirmar la presencia de la proteína ebf2 en el extracto nuclear; por el momento, los experimentos de qPCR sólo nos indican que hay abundante mensajero en las células HEK-293/ebf2, a partir de las cuales se preparó el extracto nuclear. La adición de un anticuerpo al ensayo para lograr un supershift aportaría evidencia definitiva de la interacción específica ebf2-promotor.

Finalmente, se determinó el nivel de expresión relativa de los factores nucleares Nr4a1 y Nr6a1, relacionados negativamente con la modulación de Orx (Tanaka, 2012). El análisis de expresión relativa reveló un mayor nivel de expresión de ambos receptores nucleares en células de hipotálamo de ratón, apuntando que éstas contienen elementos y factores que interactúan con el sistema orexigénico para su control y regulación. Las células HEK-293 con y sin ebf2 presentaron niveles intermedios de expresión e, interesantemente, la sobreexpresión de ebf2 resulta en una disminución en los niveles de Nr4a1 y Nr6a1 al comparar con la línea parental. Los niveles de expresión en ambos

tipos celulares HEK son mayores y estadísticamente significativos en relación a los de las células de glioblastoma de rata. Los menores niveles de expresión se encontraron en C6 y C6/ebf2.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el efecto podría ser atribuido a una regulación indirecta a nivel del locus de Orx. Ebf2 podría contribuir al proceso de especificación neuronal del fenotipo orexigénico en el hipotálamo lateral a través de su acción sobre otros reguladores de la expresión de Orx.

La hipótesis inicial planteada fue incorrecta, ya que ebf2 no es un regulador directo. Se encontró que ebf2 sí es capaz de activar el promotor de Orx *in vitro*, por lo que podría considerarse un participante importante capaz de interactuar con otros moduladores de la expresión de Orx, por lo que seguirlo eficazmente podría revelar nuevos candidatos reguladores. El ensayo de retardo indica que no hay unión ebf2-promotor de Orx y los resultados que obtuvimos apuntan a que ebf2 disminuye los niveles de dos inhibidores reportados de la expresión de Orx, Nr4a1 y Nr6a1.

Las observaciones apuntan que el factor de transcripción ebf2 es un nuevo regulador capaz de incrementar la actividad del promotor de Orx *in vitro*. El análisis de la región del promotor proximal de Orx reveló nuevas características de sus elementos regulatorios. Para detallar si ebf2 actúa a través de otros sitios, con otros cofactores o como proteína accesoria en el ensamblaje del complejo de inicio de la transcripción que modula la expresión de Orx durante el desarrollo embrionario o la etapa adulta son necesarios experimentos adicionales. De esta manera, ebf2 podría ser un regulador clave del desarrollo neuronal orexigénico uniendo a la red de factores de transcripción necesarios, incluyendo a Lhx9 (Dalal *et al*, 2013; Liu *et al*, 2015) y sonic hedgehog (Szabo *et al*, 2009) para establecer en conjuntos el fenotipo definitivo y maduro de la población orexigénica en el hipotálamo. Aún falta por determinar el orden en el que actúan o son reclutados los diferentes factores de transcripción durante el desarrollo y en las etapas posteriores.

9. CONCLUSIONES

El factor de transcripción ebf2 promueve la activación del promotor de Orx murino en un ambiente neuronal y no neuronal *in vitro* que se conserva en tres organismos diferentes: rata, ratón y humano.

Las deleciones y mutaciones en uno o ambos sitios olf-1 incluidos en la secuencia del promotor murino mínimo evaluado resultan en una modificación de la señal del gen reportero que depende de la línea celular.

El efecto se debe a una regulación indirecta a nivel de locus de Orx, ya que no existe unión *in vitro* entre el factor de transcripción ebf2 y el promotor murino de Orx, bajo las condiciones experimentales ensayadas.

Ebf2 induce una disminución en la expresión de los receptores nucleares Nr4a1 y Nr6a1.

Por lo tanto, ebf2 podría contribuir en el proceso de especificación del tipo neuronal orexigénico a través de su interacción con otros factores y cofactores.

10. PERSPECTIVAS

Ensayar nuevas condiciones de unión *in vitro* para promover la unión del factor de transcripción ebf2 al promotor putativo del gen de Orx murino.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para investigar la unión *in vivo* de ebf2 a otras secuencias génicas.

Investigar el mecanismo del aumento en la señal del gen reportero observado en la delección del sitio olf-1 proximal (constructo Delta-1).

Realizar microarreglos de expresión para determinar potenciales factores de transcripción reguladores del gen de Orx.

11. REFERENCIAS

1. Amiot C, Brischoux F, Colard C, Roche A, Fellmann D, Risold P. Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp Peak in the developing ventral diencephalon. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 531-34.
2. Arafat AM, Kaczmarek P, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmalek E, Kolodziejcki P, Adamidou A, Ruhla S, Szczepankiewicz D, Sassek M, Billert M, Wiedenmann B, Pfiffer AF, Nowak KW, Strowski MZ. Glucagon regulates orexin A secretion in human and rodents. *Diabetologia* 2014; 57(10): 2108-2116.
3. Arias-Carrión O, Murillo-Rodríguez E. Effects of hypocretin/orexin cell transplantation on narcoleptic-like sleep behavior in rats. *PLoS One* 2014; 9(4): e95342.
4. Bernardis L, Bellinger L. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Naueroscu Biobehav Rev* 1996; 20(2): 189-287.
5. Beuckmann C, Sinton C, Williams S, Richardson J, Hammer R, Sakurai T, Yanagisawa M. Expression of a polyglutamine-ataxine-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J Neurosci* 2004; 24(39): 4469-4477.
6. Burt J, Alberto CO, Parsons MP, Hirasawa M. Local network regulation of orexin neurons in the lateral hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 301(3): R572-580.
7. Cai X, Widdowson, Harrold J, Wilson S, Buckingham R, Arch J, Tadayyon M, Clapham J, Wilding J, Williams G. Hypothalamic orexin expression modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 1999; 48: 2132-37.
8. Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CA, Taylor MS, Engström PG, Frith MC, Forrest AR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M *et al.* Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* 2006; 38(6): 626-635.
9. Chemelli R, Willie J, Sinton C, Elmquist J, Scammell T, Lee C, Richardson J, Williams S, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch T, Nakazato M, Hammer R, Saper C, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98(4): 437-51.
10. Chow M, Cao M. The hypocretin/orexin system in sleep disorders: preclinical insights and clinical progress. *Nat Sci Sleep* 2016; 8: 81-86.
11. Chuang SM, Wang Y, Wang Q, Liu KM, Shen Q. Ebf2 marks early cortical neurogenesis and regulates the generation of cajal-retzius neurons in the developing cerebral cortex. *Dev Neurosci* 2011; 33(6): 479-493.
12. Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W, Amadio S, Maggi R, Quattrini A, Giacomo G. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development* 2003; 130: 401-410.
13. Croci L, Chung SH, Masserdotti G, Gianola S, Bizzoca A, Gennarini G, Corradi A, Rossi F, Hawkes R, Consalez GG. A key role for the LHL transcription factor EBF2/COE2/OE2/OE-3 in Purkinje neuron migration and cerebellar cortical topography. *Development* 2006; 133(14): 2719-2729.
14. Dalal J, Roh JH, Maloney SE, Akuffo A, Shah S, Yuan H, Wansley B, Jones WB, de Guzman Strong C, Gray PA, Holtzman DM, Heintz N, Dougherty JD. Translational profiling of hypocretin neurons identifies candidate molecules for sleep regulation. *Genes & Development* 2013; 27: 565-578.
15. 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: 748-753.

16. España R. Hypocretin/orexin involvement in reward and reinforcement. *Vitam Horm* 2012; 89: 185-208.
17. Garel S, Marín F, Mattéi M, 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: 191-205.
18. Girault E, Yi C, Fliers E, Kalsbeek A. Orexins, feeding and energy balance. *Prog Brain Res* 2012; 198: 47-64.
19. Griffon B, Risold P, Jacquemard C, Colard C, Fellmann D. Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 1999; 262(2): 77-80.
20. Guillermot F. Analysis of the role of basic helix-loop-helix transcription factors in the development of neural lineages in the mouse. *Biol Cell* 1995; 84(1-2): 3-6.
21. Hara J, Beuckmann C, Nambu T, Willie J, Chemelli R, Sinton C, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Genetic ablation of orexin neurons mice results in narcolepsy, hypophagia and obesity. *Neuron* 2001; 30: 345-354.
22. Harris G, Wimmer M, Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 2005; 437(7058): 556-559.
23. Herrán A, Zomosa V, Millán D, Palomero M, Guerra M, Drucker R, Vidaltamayo R. Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mutant mice. *Neuroscience* 2011; 183: 134-143.
24. Hoever P, Dorffner G, Benes H, Penzel T, Danker-Hopfe H, Barbanoj M, Pillar G, Saletu B, Polo O, Kunz D, Zeitlhofer J, Berg S, Partinen M, Bassetti C, Hogl B, Ebrahim I, Holsboer E, Bengtsson H, Peker Y, Hemmeter U, Chiossi E, Hajak G, Dingemans J. Orexin receptor antagonism, a new sleep-enabling paradigm: a proof-of-concept clinical trial. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 91(6): 975-85.
25. Honda M, Eriksson K, Zhang S, Tanaka S, Lin L, Saleh A, Hesla P, Maehlen J, Gaus S, Yanagisawa M, Sakurai T, Taheri S, Tsuchiyas K, Honda Y, Mignot E. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (Orexin). *PLoS One* 2009; 4(1): e4254.
26. Hoxha E, Tonini R, Montarolo F, Croci L, Consalez G, Tempia F. Motor dysfunction and cerebellar Purkinje cell firing impairment in Ebf2 null mice. *Mol Cell Neurosci* 2012; 52: 51-61.
27. Hubbard T, Aken B, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Fernández-Banet J, Gordon L, Graf S, Haider S, Hammond M, Holland R, Howe K, Jenkinson A, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Megy K, Meidi P, Overduin B, Parker A, Pritchard B, Rios D, Schuster M, Slater G, Smedley D, Spooner W, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wilder S, Zadissa A, Birney E, Cunningham F, Curwen V, Durbin R, Fernández X, Herrero J, Kasprzyk A, Proctor G, Smith J, Searle S, Flicek P. Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res* 37: D690-D697.
28. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhaya M, Tungalagsuvd A, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Developmental changes in the hypothalamic mRNA levels of prepro-orexin and orexin receptors and their sensitivity to fasting in male and female rats. *Int J Dev Neurosci* 2015; 46: 51-54.
29. Justinussen JL, Holm A, Komum BR. An optimized method for measuring hypocretin-1 peptide in the mouse brain reveals differential circadian regulation of hypocretin-1 levels rostral and caudal hypothalamus. *Neuroscience* 2015; 310: 354-361.
30. Kageyama R, Sasai Y, Akazawa C, Ishibashi M, Takebayashi K, Shimizu C, Tomita K, Nakanishi S. Regulation of mammalian neural development by helix-loop-helix transcription factors. *Crit Rev Neurobiol* 1995; 9(2-3): 177-88.

31. Kaminski T, Smolinska N. Expression of orexin receptors in the pituitary. *Vitam Horm* 2012; 89: 61-73.
32. Kato H, Hosoda H, Fukuda T, Masushige S, Kida S. Characterization of the promoter of the mouse preproorexin gene. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(3): 840-843.
33. Kovacs BJ, Butterworth PH. The effect of changing the distance between the TATA-box and cap site by up to three base pairs on the selection of the transcriptional start site of a cloned eukaryotic gene in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* 1986; 14(6): 2429-2442.
34. Lamah J, Cone R, Maeda S, Philip M, Corbani M, Nádasti L, Ramachandran J, Smith G, Sadée W. Structure and function of G protein coupled receptors. *Pharm Res* 1990; 7(12): 1213-21.
35. Lecea L, Kilduff T, Peyron C, Gao X, Foye P, Danielson P, Fukuhara C, Battenberg E, Gautvik V, Bartlett F, Frankel W, Van Den Pol A, Bloom F, Gautvik K, Sutcliffe J. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(1): 322-7.
36. Li SB, Jones JR, de Lecea L. Hypocretins, neural systems, physiology and psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep* 2016; 18(1): 7.
37. Li X, Sui X, Zhang Y, Sun Y, Zhao Y, Zhai Y, Wang Q. An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(50): 8549-8554.
38. Liu J, Merkle FT, Gandhi AV, Gagnon JA, Woods IG, Chiu CN, Shimogori T, Schier AF, Prober DA. Evolutionarily conserved regulation of hypocretin neuron specification by Lhx9. *Development* 2015; 142(6): 1113-1124.
39. Lin L, Faraco J, Li R, Kadoatin H, Rogers W, Lin X, Qiu X, Jong O, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999; 6(98): 365-76.
40. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
41. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Sección 20.3, G Protein –Coupled receptors and their effectors. *Molecular Cell Biology*. 4a edición. Nueva York. W H Freeman, 2000.
42. Luttrell L. Reviews in molecular biology and biotechnology: Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 2008; 39: 239-264.
43. Marcus J, Aschkenasi C, Lee C, Chemelli R, Saper R, Yanagisawa M, Elmquist J. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 435(1): 6-25.
44. Martynska L, Wolinska E, Chmielowska, Bik W, Baranowska B. The physiological role of orexins. *Neuroendocrinol Lett* 2005; 26(3): 289-292.
45. Matsuki T, Sakurai T. Orexins and orexin receptors: from molecules to integrative physiology. *Results Prob Cell Differ* 2008; 46.
46. Mieda M, Sakurai T. Overview of orexin/hypocretin system. *Prog Brain Res* 2012; 198: 5-14.
47. Mikulaskova B, MaletínskáL, Zicha J, Kunes J. The role of food intake regulating peptides in cardiovascular regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 436: 78-92.
48. 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): 16985-92.
49. Neubauer D. Almorexant, a dual orexin receptor antagonist for the treatment of insomnia. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11(1): 101-10.
50. Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers G, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 2000; 355(9197): 3940.

51. Nuñez A, Rodrigo M, De Andrés I, Garzón M. Hypocretin/Orexin neuropeptides: Participation in the control of sleep-wakefulness cycle and energy homeostasis. *Current Neuropharmacology* 2009; 7: 50-59.
52. Ohno K, Sakurai, T. Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2008; 29: 70-87.
53. Pal S, Gupta R, Kim H, Wickramasinghe P, Baubet V, Showe LC, Dahmane N, Davuluri RV. Alternative transcription exceeds alternative splicing in generating the transcriptome diversity of cerebellar development. *Genome Res* 2011; 21(8): 1260-1272.
54. Peyron C, Tighe D, van del Pol A, Lecea L, Heller H, Sutcliffe J, Kilduff T. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998; 18(23): 9996-10015.
55. Pirnik Z, Bundzikova J, Mikkelsen J, Zelezna B, Maletinska L, Kiss A. Fos expression in hypocretinergic neurons in C57B1/6 male and female mice after long-term consumption of high fat diet. *Endocr Regul* 2008; 42(4): 137-46.
56. Roby YA, Bushey MA, Cheng LE, Kulaga HM, Lee SJ, Reed RR. Zfp423/OAZ mutation reveals the importance of Olf/EBF transcription activity in olfactory neuronal maturation. *J Neurosci* 2012; 32(40): 13679-13688a.
57. Rojas-Duran MF, Gilbert WV. Alternative transcription start site selection leads to large differences in translation activity in yeast. *RNA* 2012; 18(12): 2299-2305.
58. Routh VH, Hao L, Santiago AM, Sheng Z, Zhou C. Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. *Front Syst Neurosci* 2014; 8: 236.
59. Ponjavic J, Lenhard B, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Sandelin A. Transcriptional and structural impact of TATA-initiation site spacing in mammalian core promoters. *Genome Biol* 2006; 7(8): R78.
60. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli R, Tanaka H, Williams S, Richardson J, Kozlowski G, Wilson S, Arch J, Buckingham R, Haynes A, Carr S, Annan R, McNulty D, Liu w, Terret J, Elshourbagy N, Bergsma D, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92(4): 573-85.
61. Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, Kajiwara N, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K. Structure and function of the prepro-orexin gene. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(25): 17771-17776.
62. Sakurai T. Orexin: a link between energy homeostasis and adaptive behavior. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6(4): 353-60.
63. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Reviews Neuroscience* 2007; 8:171-181.
64. Sakurai T, Mieda M, Tsujino N. The orexin system: roles sleep/wake regulation. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1200: 149-61.
65. Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 2007; 8(6): 424-436.
66. Scammell T, Saper C. Orexins: looping forward to sleep, back at addiction. *Nat Med* 2007; 13(2): 126-128.
67. Schulz A, Hebebrand J, Geller F, Pollmächer T. Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet* 2000; 355(9211): 1274-5.
68. Shimogori T, Ogawa M. Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain. *Dev Growth Differ* 2008; 50: 499-506.
69. Silva J, von Meyenn F, Howell J, Thorens B, Wolfrum C, Stoffel M. Regulation of adaptive behavior during fasting by hypothalamic Foxa2. *Nature* 2009; 462: 646-651.
70. Spinazzi R, Andreis P, Rossi G, Nussdorfer G. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacological Reviews* 2006; 58(1): 46-57.

71. Stoyanova I, Rutten W, Feber J. Orexin-A and orexin-B Turing the postnatal development of the rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30(1): 81-9.
72. Szabó NE, Zhao T, Cankaya M, Theil T, Zhou X, Alvarez-Bolado G. Role of neuroepithelial Sonic hedgehog in hypothalamic patterning. *J Neurosci* 2009; 29(21): 6989-7002.
73. Tanaka S, Kodama T, Nonaka T, Toyada H, Arai M, Fukazawa M, Honda Y, Honda M, Mignot E. Transcriptional regulation of the orexin/hypocretin gene by NR6A1. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 403(2): 178-183.
74. Tanaka S. Transcriptional regulation of the hypocretin/orexin gene. *Vitam Horm* 2012; 89: 75-90.
75. Tanno S, Terao A, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K. Hypothalamic prepro-orexin mRNA level is inversely correlated to the non-rapid eye movement sleep level in high-fat diet-induced obese mice. *Obes Res Clin Pract* 2013; 7(4): e251-257.
76. Tsujino N, Sakurai T. Role of orexin in modulating arousal, feeding and motivation. *Front Behav Neurosci* 2013; 7:28.
77. Waleh N, Apte-Deshpande A, Terao A, Ding J, Kilduff T. Modulation of the promoter region of prepro-hypocretin by alpha-interferon. *Gene* 2001; 262(1-2): 123-128.
78. Wang S, Lewcock J, Feinstein P, Mombaerts P, Reed R. Genetic disruptions of O/E2 and OE/3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development* 2003; 131: 1377-1388.
79. Zhou Y, Leri F, Cummins E, Kreek MJ. Individual differences in gene expression of vasopressin, D2 receptor, POMC and orexin: vulnerability to relapse to heroin-seeking in rats. *Physiol Behav* 2015; 139: 127-135.