

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1. Estrategias moleculares en el estudio del Sistema Nervioso	12
3.2. Proteínas Fluorescentes	13
3.3. Vectores Virales	13
3.4. Vectores Adenoasociados recombinantes (AAVr).....	16
3.5. Vectores de expresión bicistrónica.....	19
3.6. Secuencias IRES	20
3.7. Bases moleculares de inicio de la traducción en eucariontes dependiente de CAP	21
3.8. Traducción dependiente de IRES	22
3.9. El rol de los factores de transactivación de secuencias IRES (ITAF)	27
3.10. Control transduccional del inicio de la traducción	28
3.11. Iniciación dependiente de IRES en neuronas	29
3.12. Secuencias shortIRES	31
4. OBJETIVOS E HIPOTESIS	35

4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos específicos	35
4.3. Hipótesis	36
5. MATERIALES Y METODOS	37
5.1. Preparación de reactivos	37
5.2. Plásmidos utilizados en esta tesis	37
5.3. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α	39
5.4. Purificación de plásmidos	40
5.5. Construcción de la secuencia	
GCaMP6s/f – shortIRES – tdTomato	41
5.5.1. Oligonucleótidos usados en esta tesis	42
5.2.2. Amplificación de la secuencia	
GCaMP6 f/s – shortIRES y shortIRES – tdTomato	
mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
5.2.3. Electroforesis de DNA en gel y fotodocumentación.....	45
5.2.4. Cuantificación de DNA mediante densitometría	46
5.2.5. Purificación de fragmentos de DNA desde gel de agarosa	46
5.2.6. Generación del fragmento GCaMP6 f/s – shortIRES – tdTomato	47
5.2.7. Digestión analítica con enzimas de restricción del	
fragmento GCaMP6 f/s – shortIRES – tdTomato	48

5.5.8. Amplificación mediada por PCR de los fragmentos	
GCaMP6 f/s – shortIRES – tdTomato purificados	49
5.5.9. Precipitación de DNA	49
6. RESULTADOS	51
6.1. Estandarización de carga de DNA para electroforesis	51
6.2. Cuantificación de los plásmidos pcDNA3.1 His – tdTomato, pCAG – Cyto – GCaMP6fast y pCAG – Cyto – GCaMP6slow	53
6.3. Amplificación de la secuencia shortIRES – tdTomato mediante PCR	56
6.4. Amplificación de las secuencias GCaMP6fast – shortIRES y GCaMP6slow – shortIRES mediante PCR	59
6.5. Purificación y cuantificación de los fragmentos shortIRES – tdTomato, GCaMP6fast – shortIRES y GCaMP6slow – shortIRES desde gel de agarosa preparativo.	62
6.6. Generación de los fragmentos GCaMP6fast – shortIRES – tdTomato y GCaMP6slow – shortIRES – tdTomato mediante el protocolo de SOEing	64
6.7. Análisis de restricción de los fragmentos híbridos generados mediante el protocolo de SOEing	65
6.8. Purificación y cuantificación de los fragmentos híbridos GCaMP6slow – shortIRES – tdTomato y GCaMP6fast – shortIRES – tdTomato desde gel de agarosa preparativo	69

6.9. Amplificación de los fragmentos híbridos de interés	
GCaMP6fast – shortIRES – tdTomato y	
GCaMP6slow – shortIRES – tdTomato mediante PCR	70
7. DISCUSIÓN	73
8. CONCLUSIÓN	78
9. PROYECCIONES	79
9. BIBLIOGRAFÍA	81

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1	14
Figura 1	23
Figura 2	27
Figura 3	33
Figura 4	51
Figura 5	53
Figura 6	54
Figura 7	56
Figura 8	57
Figura 9	59
Figura 10	60
Figura 11	62
Figura 12	63
Figura 13	65
Figura 14	67
Figura 15	68
Figura 16	70
Figura 17	71