



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 574**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05707623 .4**
96 Fecha de presentación : **24.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1723234**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Compuestos de ARN de doble hebra específicos de VGLUT.**

30 Prioridad: **10.03.2004 DE 10 2004 011 687**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2010

73 Titular/es: **Grunenthal GmbH**
Zieglerstrasse 6
52078 Aachen, DE

72 Inventor/es: **Gillen, Clemens;**
Bahrenberg, Gregor;
Christoph, Thomas;
Weihe, Eberhard;
Schafer, K.-H., Martin y
Bender, Florian

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 347 574 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

COMPUESTOS DE ARN DE DOBLE HEBRA ESPECÍFICOS DE VGLUT

La invención se refiere a moléculas de ARN de doble hebra (ARNds) pequeñas, en particular a moléculas desencadenantes de interferencia dirigidas
5 contra miembros de la familia de los VGLUT, y a células huésped que contienen el ARNds según la invención. Los ARNds según la invención y las células huésped correspondientes son adecuados como medicamentos o para la producción de medicamentos, en particular para el tratamiento del dolor y de otros estados patológicos relacionados con miembros de la familia de los
10 VGLUT o con la expresión no fisiológica de éstos.

De acuerdo con la definición de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), el dolor es una “experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con una lesión aguda o potencial de un tejido o descrita en términos de este tipo de lesiones” (Wall y Melzack, 1999). El organismo
15 reacciona frente a un estímulo doloroso (nociceptivo) con una reacción compleja en la que intervienen componentes discriminadores sensoriales, cognitivos, afectivos, autónomos y motores. Mientras que el dolor agudo constituye una reacción protectora fisiológica y tiene una importancia vital para la supervivencia del individuo, el dolor crónico no tiene ninguna función biológica clara. El dolor
20 nociceptivo se desencadena a través de estímulos noxios, como calor, estimulación mecánica, protones o frío, en órganos sensoriales de umbral alto especializados, los nociceptores, y es transmitido en forma de actividad eléctrica al asta posterior de la médula espinal a través de fibras C no mielinizadas o fibras A δ poco mielinizadas. Para ello, los nociceptores están dotados de
25 receptores específicos y canales de iones (Scholz y Woolf, 2002).

El tejido herido o lesionado, las inflamaciones o las células tumorales pueden ser señales para los nociceptores, conduciendo a la liberación de mediadores químicos de células inflamatorias, vasos sanguíneos y terminales aferentes, que bien producen por sí mismos una activación de los nociceptores
30 (por ejemplo a través de la bradiquinina), bien modifican el comportamiento estímulo-respuesta de las fibras nerviosas aferentes, por ejemplo mediante la reducción del umbral de activación (por ejemplo a través de prostaglandinas, interleuquinas, NGF), provocando así una sensibilización de los nociceptores (Scholz y Woolf, 2002).

La intensidad del dolor viene determinada por la cantidad de impulsos por unidad de tiempo. En caso de una estimulación nociceptiva periférica, los componentes de respuesta sináptica rápida (5 - 20 mseg) y las respuestas reflejas monosinápticas están mediados principalmente por los receptores de AMPA y cainato, mientras que los receptores de NMDA y de glutamato metabotrópicos intervienen de forma especial en los componentes de respuesta tardíos más persistentes (20 - 150 mseg) y con mediación polisináptica (Tölle, 1997).

La liberación de glutamato en el asta posterior de la médula espinal desempeña un papel decisivo en el origen de dolores crónicos (Baranauskas y Nitri, 1998; Zhuo, 2001). La liberación de glutamato conduce a la activación de los receptores de glutamato (AMPA, cainato, mGlu-R, NMDA). Por consiguiente, las proteínas que intervienen en la liberación de glutamato son un objetivo interesante para la investigación del dolor.

El glutamato es uno de los neurotransmisores excitatorios más importantes del sistema nervioso de los vertebrados. El aminoácido no esencial glutamato no puede superar la barrera hematoencefálica y, por ello, se sintetiza en el cerebro a partir de glucosa y muchos otros precursores.

La enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) cataliza la formación de glutamato en las terminaciones nerviosas excitatorias a partir de glutamina. El transportador vesicular de glutamato (VGLUT) empaqueta el glutamato en vesículas y, después de la llegada de un potencial de acción despolarizadora por la afluencia de calcio, libera el glutamato de las vesículas en la fisura sináptica. Desde la fisura sináptica, el glutamato es transportado en parte a través de un transportador de membrana plasmática para aminoácidos excitatorios (EAATs) de vuelta a los terminales excitatorios, donde de nuevo es empaquetado en vesículas.

Por consiguiente, en el transporte de glutamato intervienen proteínas transportadoras de 2 superfamilias: transportadores de membrana plasmática y el transportador vesicular de membrana (Disbrow y col., 1982; Shioi y col., 1989; Tabb y col., 1992).

Se han identificado tres transportadores vesiculares de glutamato, el VGLUT1 (SLC17A6), el VGLUT2 (SLC17A7) y el VGLUT3 (SLC17A8) como miembros de la familia de los transportadores SLC-17 (transportadores vesiculares de glutamato/fosfato de tipo I), que median en el transporte de

aniones orgánicos y que en primer lugar se identificaron como transportadores de fosfato dependientes de Na⁺). El VGLUT1, el VGLUT2 y el VGLUT3 se denominan en conjunto como VGLUT. Las proteínas de la familia SLC17 consisten en proteínas transmembrana de varios intervalos con 6 a 12 dominios transmembrana hipotéticos, apareciendo los tres transportadores de glutamato arriba mencionados como subfamilia de la familia SLC17. Las secuencias de aminoácidos de los tres VGLUT arriba mencionados presentan una altísima homología entre sí (Takamori y col., 2002). La secuencia de ADNc del VGLUT2 humano se encuentra en los bancos de datos bajo el número de acceso de banco de genes NM_020346. La secuencia de aminoácidos del VGLUT2 humano se encuentra en los bancos de datos bajo el número de acceso NP_065079. La secuencia de ADNc del VGLUT2 de rata se encuentra en los bancos de datos bajo el número de acceso NM_053427. La secuencia de aminoácidos de VGLUT2 de rata se encuentra en los bancos de datos bajo el número de acceso NP_445879. La secuencia de ADNc del VGLUT2 de ratón se encuentra en los bancos de datos bajo el número de acceso BC038375. La secuencia de aminoácidos de VGLUT2 de ratón se encuentra en los bancos de datos bajo el número de acceso AAH38375.

Las capas corticales del cerebro presentan un fuerte nivel de expresión de ARNm de VGLUT1, mientras que el ARNm de VGLUT2 se puede detectar principalmente en la capa IV de la corteza. La expresión de VGLUT3 se localiza, por ejemplo, en las células inhibitoras en la capa II de la corteza parietal o en las interneuronas GAD-positivas del estrato radiado de CA1-CA3 del hipocampo. Además, VGLUT1 y VGLUT2 sólo se han podido detectar en las terminaciones nerviosas, mientras que VGLUT3 no sólo se ha detectado en las vesículas sinápticas, sino también en estructuras vesiculares de astrocitos y dendritas neuronales (Fremeau y col., 2002).

El VGLUT1 y el VGLUT2 se expresan en dos poblaciones independientes en el ganglio espinal, presentando una tercera subpoblación una coexpresión de VGLUT1 y VGLUT2. El ARNm de VGLUT2 es expresado principalmente por neuronas DRG pequeñas y medianas. En cambio, el ARNm de VGLUT1 es expresado principalmente por neuronas DRG medianas y grandes (ganglio de la raíz dorsal). Esporádicamente también se encuentran neuronas que expresan ARNm de VGLUT3 en el ganglio espinal (Oliveira y col., 2003; Tood y col., 2003).

Tanto el VGLUT1 como el VGLUT2 se pueden detectar a nivel proteínico en la sustancia gris de la médula espinal (Varoqui y col., 2002). La dominancia del VGLUT2 en el asta posterior superficial indica un papel destacado en la transmisión del dolor. La dominancia de VGLUT1 en el asta posterior profunda
5 indica un papel en la propiocepción. Por consiguiente, principalmente el VGLUT2, pero también el VGLUT1, constituyen un objetivo para la investigación del dolor (Varoqui y col., 2002).

El tratamiento eficaz del dolor es uno de los grandes retos de la medicina molecular. El dolor agudo y transitorio es una importante señal del cuerpo para
10 preservar a las personas contra daños graves producidos por el entorno o por sobrecarga del cuerpo. En cambio, el dolor crónico, que dura más que la causa del dolor y que el tiempo previsible de curación, no tiene ninguna función biológica conocida y afecta a cientos de millones de personas en todo el mundo. Sólo en Alemania, alrededor de 7,5 millones de personas padecen dolor crónico.
15 Por desgracia, el tratamiento farmacológico del dolor crónico todavía es insatisfactorio y, en consecuencia, sigue siendo un reto para la investigación médica actual. A menudo, los analgésicos existentes en la actualidad no son suficientemente eficaces y, en parte, tienen graves efectos secundarios.

Debido a su función y su perfil de expresión, las proteínas de VGLUT en
20 general y de VGLUT2 en especial constituyen un punto de partida interesante como objetivo para nuevos medicamentos contra el dolor (Varoqui y col., 2002).

De la investigación analgésica ya se conocen por ejemplo algunas sustancias que pueden modular la actividad o la expresión de los VGLUT (Carrigan y col., 2002; Roseth y col., 1995; Roseth y col., 1998). Sin embargo,
25 dichas sustancias no actúan de forma específica sobre el subtipo y las aplicaciones terapéuticas están limitadas tanto por la disponibilidad de los inhibidores del sistema nervioso y de las vesículas sinápticas, como por la acción no específica en los tres VGLUT.

El objetivo de la invención consiste en proponer otras sustancias que
30 puedan modular de forma selectiva y eficaz el efecto de los VGLUT, esto es por ejemplo VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3, y que en caso dado tengan permeabilidad celular. El objetivo de la presente invención también incluye la utilización de estas sustancias para fines terapéuticos, en particular para el tratamiento del dolor.

El objetivo arriba mencionado se resuelve mediante los objetos de la presente invención caracterizados en las reivindicaciones. De acuerdo con la invención, para resolver este objetivo se proponen ARNs específicos de VGLUT capaces de provocar el fenómeno de la interferencia de ARN.

- 5 La invención se refiere a moléculas de ARNsi específicas de VGLUT con una secuencia seleccionada entre

si-rVGLUT2 100-120 EGT

5'		GCA	GGA	UAA	CCG	AGA	GAC	CTT	3'
3'	TT	CGU	CCU	AUU	GGC	UCU	CUG	G	5'

si-rVGLUT2 100-120 AMB

5'		GCA	GGA	UAA	CCG	AGA	GAC	CTT	3'
3'	TT	CGU	CCU	AUU	GGC	UCU	CUG	G	5' y

si-rVGLUT2 166-186 AMB

5'		GGC	UCC	GCU	AUG	CGA	CUG	UTT	3'
3'	TT	CCG	AGG	CGA	UAC	GCU	GAC	A	5'.

- La estructura general consiste en un ARN de doble cadena con una macromolécula formada por ribonucleótidos, consistiendo el ribonucleótido en una pentosa (ribosa), una base orgánica y un fosfato. En este contexto, las bases orgánicas del ARN son las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas citosina (C) y uracilo (U). El ARNs contiene nucleótidos con una estructura dirigida con salientes. Los ARN de doble cadena de este tipo según la invención pueden provocar el fenómeno de la interferencia de ARN (ARNsi).
- 10
- 15

El fenómeno de la interferencia de ARN como sistema de defensa inmunológico se observó en el curso de la investigación inmunológica con eucariotas superiores.

En un primer momento, el sistema se describió en diferentes especies independientes entre sí, primero en *C. elegans* (Fire y col., 1998), antes de poder identificar que los mecanismos básicos en determinados planos de los procesos son idénticos: la resistencia a virus mediada por ARN en plantas (Lindbo y Dougherty, 1992), el PTGS (posttranscriptional gene silencing) en plantas (Napoli y col., 1990) y la interferencia de ARN en eucariotas se basan, en consecuencia, en un funcionamiento común (Plasterk, 2002).

La técnica *in vitro* de la interferencia de ARN (ARNi) se basa en moléculas de ARN de doble hebra (ARNds) que provocan la supresión específica de la secuencia de expresión genética (Zamore (2001), Nat. Strict. Biol. 9: 746-750; Sharp (2001), Genes Dev. 5:485-490; Hannon (2002), Nature 41: 244-251). La activación de la proteína quinasa R y RNAsa L provocó efectos no específicos en la transfección de células de mamífero con ARNds largos, por ejemplo una respuesta de interferón (Stark y col. (1998), Annu. Rev. Biochem. 67: 227-264; He y Katze (2002), Viral Immunol. 15: 95-119). Estos efectos no específicos se evitan con la utilización de los denominados ARNds más cortos, por ejemplo de 21 a 23 pb (en inglés "small interfering RNA"), ya que los ARNds más cortos de 30 pb no provocan efectos no específicos (Elbashir y col. (2001), Nature 411: 494-498). Recientemente también se han utilizado ARNds *in vivo* (McCaffrey y col. (2002), Nature 418: 38-39; Xia y col. (2002), Nature Biotech. 20: 1006-1010; Brummelkamp y col. (2002), Cancer Cell 2: 243-247).

En el marco de la presente invención se dan a conocer ARNds (moléculas de ARN-si) dirigidos contra miembros determinados de la familia de los VGLUT. De acuerdo con la invención, estos ARNds consisten en las secuencias arriba definidas. El ARNds se puede encontrar (i) en forma de un ARNsi, (ii) en forma de un ARNds largo, que incluye uno o más ARNsi idénticos o diferentes en la secuencia del ARNds largo, (iii) en forma de un ARN de horquilla basado en ARNsi o (iv) en forma de un ARNsi de horquilla basado en un ARNmi.

Mientras que el ARNsi (i) (típicamente obtenido por síntesis química y después incorporado intracelularmente en el complejo RISC eludiendo el paso "dicing", con lo que comienza una degradación de ARNm específico de secuencia (de la secuencia diana)) se describe a continuación, el caso (ii), es decir, un ARNds largo (ds doble hebra), consiste en un precursor del ARNsi (según (i)), que primero se procesa mediante un paso "dicing" (enzima: Dicer) para obtener ARNsi maduro. Este precursor de ARNsi, que típicamente primero

se transforma intracelularmente en ARNsi maduro, también cumple las condiciones para ser utilizado por ejemplo como medicamento o para la producción de un medicamento para el tratamiento de las indicaciones mencionadas en la presente solicitud.

5 Por consiguiente, a partir de moléculas de ARNds de VGLUT mayores, en particular moléculas de ARNds específicas de VGLUT-1, -2 o -3 (preferentemente > 30 pb, de forma especialmente preferente < 40 pb y en particular > 50 pb), después del procesamiento se obtienen diversos ARNsi distintos que pueden presentar diferentes eficacias. Las moléculas de ARNds
10 largas (en caso dado en forma de horquilla), que se transforman intracelularmente en diferentes ARNsi después del procesamiento con Dicer, también se pueden expresar en una célula (sin tener en cuenta la síntesis química) en base a vectores y bajo el control de un promotor Pol II. El promotor Pol II permite aquí una expresión específica inducible de un tipo de tejido o de
15 célula (Kennerdell y Carthew, 2000). Por consiguiente, esta forma de aplicación posibilita una expresión simultánea inducible y transitoria de una gran cantidad de ARNsi procedentes de un ARNds precursor.

Las moléculas de ARNds de este tipo pueden dar lugar a un fenotipo determinado mediante técnicas de manipulación genética, como recombinación
20 homóloga de células madre.

También se pueden utilizar modificaciones de ARNsi según (i), es decir bucles en horquilla basados en ARNsi (iii). Este tipo de horquillas puede aparecer preferentemente en uno de los extremos de la doble cadena de ARNsi, pero en caso dado también puede aparecer en los dos extremos. En este caso
25 se trata típicamente de al menos 5, preferentemente al menos 8 y de forma especialmente preferente al menos 10 nucleótidos que, debido a modificaciones y/o a una falta de complementariedad correspondiente, no forman ninguna cadena doble, sino que forman un bucle que al principio une las dos cadenas entre sí de forma covalente. Los ARN de horquilla de este tipo basados en
30 ARNsi se pueden procesar, por ejemplo intracelularmente, con las enzimas correspondientes (por ejemplo Dicer) para obtener un ARNsi activo. Por último, también son posibles ARN de horquilla basados en ARNmi (iv) dirigidos contra secuencias de la familia de los VGLUT.

En este caso se trata de ARNsi no perfectamente complementario,
35 preferiblemente con al menos una horquilla en el extremo (en los extremos).

Estas dobles cadenas de ARNm no perfectamente complementarias presentan al menos un emparejamiento erróneo, preferentemente entre 1 y 4 emparejamientos erróneos en la cadena doble. El efecto del ARN de horquilla basado en ARNmi se basa en su procesamiento enzimático (por ejemplo mediante Dicer) para obtener ARNmi, la incorporación subsiguiente de éste en RNPmi y finalmente la inhibición de su traducción.

Las longitudes correspondientes de las cadenas dobles según las formas de realización (i), (iii) y (iv) no se diferencian entre sí y todas las formas de realización se pueden sintetizar químicamente.

Para la preparación de un ARNm en una célula eucariótica, el gen se transcribe en toda su longitud, tanto intrones como exones, en una molécula de ARN larga, el transcrito primario. La estabilidad del ARNm celular se asegura mediante el procesamiento del transcrito primario en el extremo 5' mediante la adición de un nucleótido atípico con una guanina metilada y una poliadenilación en el extremo 3'. Antes de que el ARN abandone el núcleo celular, las secuencias intrónicas se eliminan mediante empalme de ARN y los exones se unen entre sí.

Las secuencias diana para el ARNs según la invención pueden consistir tanto en el transcrito primario como en el ARNm procesado. En lo sucesivo, el transcrito primario y el ARNm se designarán colectivamente como ARN(m).

Las moléculas de ARN-si según la invención están dirigidas contra regiones definidas en el área de codificación del ARN(m) de un miembro de la familia de los VGLUT.

Por ello, los ARNsi (de doble hebra) según la invención presentan en su extremo al menos una cadena de secuencia TT, preferentemente en posición saliente con respecto al extremo de la otra cadena complementaria. La otra cadena complementaria del ARNsi según la invención se corresponde en su secuencia en un extremo típicamente con las secuencias detrás de AA arriba mencionadas a modo de ejemplo (sustituyendo T con respecto a las secuencias diana arriba indicadas por U en el ARNsi según la invención), y en el otro extremo presenta típicamente un TT saliente (véase también el ejemplo de realización 4).

No obstante, el bloqueo y la disociación efectivos del ARN(m) de un miembro de la familia de los VGLUT preferiblemente se logra teniendo en

cuenta determinadas reglas de selección para elegir la secuencia diana de los ARNds según la invención.

Los ARNds según la invención presentan un contenido en GC de al menos un 30%, en particular del 30% al 70% y en especial del 40% al 60%.

- 5 Preferiblemente, los extremos del ARN de doble hebra (ARNds) se pueden modificar para impedir una degradación en la célula o una disociación en cadenas simples, en particular para evitar una degradación prematura por nucleasas.

Se produce la disociación de las cadenas simples del ARNds,
10 normalmente no deseada, especialmente cuando se utilizan concentraciones bajas o longitudes de cadena cortas. Para lograr una inhibición especialmente eficaz de la disociación, la cohesión de la estructura de doble cadena de los ARNds según la invención, causada por los pares de nucleótidos, se puede incrementar mediante al menos una y preferentemente 2 a 5 uniones químicas.
15 Un ARNds según la invención cuya disociación ha sido reducida presenta una mayor estabilidad frente a la degradación enzimática y química en la célula o en el organismo o *ex vivo*.

La unión química de las cadenas individuales de un ARNds según la invención se forma convenientemente mediante un enlace covalente o iónico, un
20 puente de hidrógeno, una interacción hidrófoba, preferentemente interacciones de van der Waals o interacciones de apilamiento, o mediante coordinación con iones metálicos. De acuerdo con una característica de configuración especialmente ventajosa, la unión química se puede establecer en al menos uno de los extremos, preferiblemente en los dos extremos. También se ha
25 comprobado que resulta ventajoso que la unión química se forme mediante uno o más grupos de unión, consistiendo los grupos de unión preferentemente en cadenas poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol. La unión química también se puede conseguir utilizando análogos de purina en la estructura de doble hebra en lugar de purinas. También resulta ventajoso que la
30 unión química se forme mediante la introducción de unidades de azabenceno en la estructura de doble hebra. También se puede conseguir utilizando análogos de nucleótidos ramificados en la estructura de cadena doble en lugar de nucleótidos.

Se ha comprobado que resulta conveniente utilizar al menos uno de los
35 siguientes grupos para la formación de la unión química: azul de metilo; grupos

bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)amina; N-acetil-N'-(p-glioxibenzoil)cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno. La unión química también se puede conseguir disponiendo grupos tiofosforilo en los extremos del área de doble hebra. Preferentemente, la unión química se forma en los extremos del
5 área de doble hebra mediante enlaces de triple hélice. La unión química se puede inducir convenientemente mediante luz ultravioleta.

La modificación de los nucleótidos del ARNs conduce a una desactivación de una proteína quinasa dependiente de ARN (de doble cadena) ("RNA-dependent") (PKR) en la célula. La PKR induce la apoptosis.
10 Ventajosamente, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos de los ARNs de la estructura de doble hebra se ha sustituido por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino o un grupo 2'-metilo. Al menos un nucleótido de al menos una cadena de la estructura de doble hebra también puede consistir en un, así llamado, "loked nucleotide" con un anillo de azúcar,
15 preferiblemente modificado de forma química mediante un puente de 2'-O, 4'-C-metileno. Ventajosamente varios nucleótidos consisten en "loked nucleotides".

Las modificaciones de los nucleótidos del ARNs según la invención se refieren en particular a la disociación de los nucleótidos mediante refuerzo del enlace por puente de hidrógeno. De este modo se aumenta la estabilidad de los
20 nucleótidos y éstos se protegen frente a un ataque por ARNasas.

Otra posibilidad para evitar una disociación prematura del ARNs según la invención en la célula se basa en la configuración del bucle de horquilla. En una forma de realización especial, un ARNs según la invención presenta una estructura de horquilla para retardar la cinética de disociación. En una estructura
25 de este tipo preferentemente se configura una estructura de bucle en el extremo 5' y/o en el extremo 3'. Una estructura de bucle de este tipo no presenta ningún puente de hidrógeno.

También se puede evitar una degradación prematura mediante la modificación del esqueleto del ARNs según la invención. Especialmente se
30 trata de un ARNs modificado (por ejemplo fosfotioato, 2'-O-metil-ARN, LNA, LNA/GAP-meros de ADN) de modo que presenta una vida media *in vivo* más larga.

Un ARNs según la invención está dirigido contra los ARN(m) de la familia VGLUT2, en particular de mamíferos, como humano, mono, rata, perro,
35 gato, ratón, conejo, cobaya, hámster, vaca, cerdo, oveja y cabra.

Preferentemente, una molécula de ARN-si según la invención inhibe la expresión de VGLUT2 en la célula al menos en un 50%, 60%, 70%, de forma especialmente preferente en al menos un 90%.

La medida de la inhibición puede realizarse mediante Northern-Blot, PCR
5 cuantitativa en tiempo real o a nivel proteínico con anticuerpos específicos de VGLUT2.

El ARNs se prepara mediante procedimientos conocidos por los especialistas. En este contexto se sintetizan nucleótidos, en particular también oligonucleótidos, por ejemplo según la síntesis de Merryfield, en un soporte
10 insoluble (H.G. Gassen y col., Chemical and Enzymatic Synthesis of Genefragments (Editorial Chemie, Weinheim 1982)) o de otro modo (Beyer/Walter; Lehrbuch der Organischen Chemie, 20 edición, (Editorial S. Hirzel, Stuttgart 1984), pp. 816 y siguientes). La obtención del ARNm de VGLUT se puede llevar a cabo por hibridación mediante bancos de datos genómicos y
15 de ADNc. Las moléculas de ARNs según la invención, en particular las moléculas de ARNsi, se pueden preparar por ejemplo sintéticamente y en caso dado también se pueden adquirir de diferentes proveedores, por ejemplo IBA GmbH (Göttingen, Alemania).

El ARN de doble hebra (ARNds) según la invención puede estar incluido
20 en estructuras micelares que influyen en la separación de grupos de sustancias *in vitro* e *in vivo*. En este caso, el ARNs está presente preferentemente en liposomas. Los liposomas consisten en membranas artificiales esféricas cerradas formadas por fosfolípidos en las que se pueden encapsular sustancias hidrófilas en el espacio interior acuoso e incorporar sustancias lipófilas en el
25 espacio interior de la membrana lipídica. La condición previa para la utilización de liposomas para fines experimentales o terapéuticos consiste en su compatibilidad con las células y tejidos. El ARNs, que preferentemente está presente en los liposomas, puede estar modificado con una secuencia peptídica, preferentemente con una secuencia rica en lisina y arginina, por ejemplo una
30 secuencia de la proteína TAT viral (que por ejemplo contiene AS 49-57), para después superar más fácilmente la membrana celular como péptido transportador.

El ARNs también puede estar incluido en cápsides virales naturales o en cápsides artificiales producidas por métodos químicos o enzimáticos o en

estructuras derivadas de éstas. Las características arriba indicadas permiten la introducción del ARNs en células diana predeterminadas.

Una configuración de los ARNs de VGLUT alternativa al ARNsi consiste en microARN (véase más arriba) con al menos un bucle de horquilla que une de forma covalente las dos cadenas no perfectamente complementarias (ARN de horquilla basado en ARNmi) (véase también Schwarz y col., 2002). Estos ARNmi de VGLUT son transcritos por las propias células y, después de una unión específica de secuencia con el ARNm, no conducen a una degradación del ARNm, sino que únicamente inducen una inhibición de la traducción. Los ARNmi de VGLUT según la invención se transcriben como precursores con una longitud de al menos 50, preferentemente entre 60 y 80, de forma especialmente preferente entre 65 y 75 nucleótidos, y constituyen una “estructura de horquilla” característica. La enzima Dicer recorta en la célula de estos precursores un área de doble hebra con una longitud de 21 a 23 nucleótidos, que se separa en otros pasos. Esto permite por ejemplo incorporar el ARNmi maduro en una partícula de RNPmi. Estas partículas pueden mediar entonces en la inhibición de la traducción específica del ARNm complementario. El grado de complementariedad con respecto al ARNm diana determina si el ADN dúplex formado actúa como ARNmi o como ARNsi.

De acuerdo con la invención, numerosos sistemas vectoriales posibilitan la utilización de ARNmi para una transcripción posterior estable y regulada de los ARNsi de VGLUT correspondientes. La transcripción de los ARNmi puede estar controlada por promotores de polimerasa III (por ejemplo promotores H1 o U6) y también promotores de polimerasa II (Brummelkamp y col., 2002; Lee y col., 2002; Miyagishi y Taira, 2002). En este contexto, las cadenas sentido y antisentido pueden ser leídas por diferentes promotores y se pueden condensar en la célula formando duplicaciones de 19-nt con salientes 4-nt (B) (Lee y col., 2002), o se utiliza la expresión de estructuras de horquilla (Brummelkamp y col., 2002).

Preferentemente, para estos sistemas de vectores se utilizan vectores virales, por ejemplo vectores retrovirales o vectores derivados de adenovirus. Los vectores virales tienen una transducción muy eficiente y selectiva de células específicas, incluyendo células primarias, y con ello posibilitan un espectro de aplicación más amplio, por ejemplo en la terapia del dolor.

De acuerdo con otra configuración especialmente ventajosa está previsto que el ARNds esté unido, asociado o rodeado por una proteína de envoltura viral procedente de un virus, derivada de éste o preparada sintéticamente. La proteína de envoltura se puede derivar de poliomavirus. Por consiguiente, se puede tratar por ejemplo de la proteína viral 1 (VP1) y/o la proteína viral 2 (VP2) de poliomavirus. La utilización de proteínas de envoltura de este tipo se da a conocer por ejemplo en el documento DE 19618797 A1. Las características arriba indicadas facilitan considerablemente la incorporación de los ARNds en la célula.

10 En una forma de realización preferente, la expresión de los ARNds según la invención tiene lugar estando el 1^{er} molde (ARNds sentido) y el 2^o molde (ARNds antisentido) bajo el control de dos promotores idénticos o diferentes. La expresión tiene lugar *in vivo* y se introduce en las células por terapia genética a través de vectores.

15 Otro objeto de la presente invención consiste en un medicamento que contiene al menos un ARNds según la invención y/o una célula que incluye dicho ARNds, y en caso dado también sustancias auxiliares y/o aditivos adecuados.

Medicamento: Sustancia correspondiente a la definición dada en el Artículo 1§2 de la Ley Reguladora del Tráfico de Medicamentos (AMG) alemana. Es decir, sustancias o preparados de sustancias concebidos para ser utilizados en el cuerpo humano o animal con el fin de

1. curar, mitigar, prevenir o reconocer enfermedades, dolencias, daños corporales o molestias patológicas;
- 25 2. permitir reconocer la condición, el estado o las funciones del cuerpo o estados anímicos;
3. sustituir principios activos o fluidos generados por el cuerpo humano;
4. rechazar, eliminar o hacer inocuos los agentes patógenos, parásitos o sustancias exógenas; o
- 30 5. influir en la condición, el estado o las funciones del cuerpo o estados anímicos.

Los medicamentos según la invención se pueden administrar como medicamentos líquidos en forma de soluciones para inyección, gotas o jugos,

como medicamentos semisólidos en forma de granulados, tabletas, pellets, parches, cápsulas, apósitos o aerosoles y, además de al menos uno de los objetos de la invención, dependiendo de la forma galénica, también puede contener en caso dado materiales vehículo, sustancias de carga, disolventes, diluyentes, colorantes y/o aglutinantes. La selección de los materiales auxiliares y de la cantidad a utilizar de los mismos depende de la forma de administración del medicamento, es decir, por vía oral, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intranasal, bucal, rectal o local, por ejemplo sobre infecciones en la piel, las mucosas y los ojos. Para la administración oral son adecuados los preparados en forma de tabletas, grageas, cápsulas, granulados, gotas, jugos y jarabes, y para la administración parenteral, tópica y por inhalación son adecuadas las soluciones, suspensiones, preparados secos de fácil reconstitución y los aerosoles. Los objetos de la invención en un depósito, en forma disuelta o en un apósito, dado el caso añadiendo agentes promotores de la penetración en la piel, son preparados adecuados para la administración percutánea. Los preparados a utilizar por vía oral o percutánea pueden liberar los objetos de la invención de forma retardada. La cantidad de principio activo a administrar a los pacientes varía en función del peso del paciente, del tipo de administración, de la indicación y del grado de la enfermedad. Normalmente se administran de 2 a 500 mg/kg de peso corporal de al menos un objeto de la invención. Si el medicamento se ha de utilizar principalmente para la terapia genética, como sustancias auxiliares o aditivos adecuados son recomendables, por ejemplo, soluciones fisiológicas salinas, estabilizadores, inhibidores de proteasa, inhibidores de ADNasa, etc.

Otro objeto de la presente invención se refiere a células huésped, excepto gametos humanos y células madre embrionarias humanas, que se transforman con al menos una molécula de ARNsi según la invención. Las moléculas de ARNs según la invención se pueden introducir en la célula huésped correspondiente a través de los métodos habituales, por ejemplo transformación, transfección, transducción, electroporación o pistola genética. En el caso de la transformación, se introducen en la célula al menos dos moléculas de ARNsi diferentes entre sí, siendo una cadena de cada molécula de ARNsi complementaria al menos por secciones al ARN(m) de un miembro de la familia VGLUT2. El área del ARNs complementaria al ARN(m) de VGLUT2 contiene menos de 25 pares de nucleótidos sucesivos.

Como células huésped entran en consideración todas las células procarióticas o eucarióticas, por ejemplo bacterianas, hongos, levaduras, células

vegetales o animales. Algunas células huésped preferentes son células bacterianas como *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, microorganismos eucarióticos como *Aspergillus* o *Saccharomyces cerevisiae* o las levaduras de panadería usuales (Stinchcomb y col. (1997) Nature 282: 39).

5 Sin embargo, en una forma de realización preferente, para la transformación mediante constructos de ARNds según la invención se eligen células de organismos multicelulares. En principio, como célula huésped se puede utilizar cualquier cultivo celular eucariótico superior, aunque son especialmente preferentes las células de mamíferos, por ejemplo de simio, rata,
10 hámster, ratón o humanas. Los especialistas conocen numerosas líneas celulares establecidas. En una relación, que de ningún modo es definitiva, se mencionan las siguientes líneas celulares: 293T (línea celular renal embrionaria) (Graham y col., J. Gen. Virol. 36: 59 (1997), BHK (células renales de hámster recién nacido), CHO (células de ovarios de hámster, Urlaub y Chasin, Proc. Natl.
15 Accad. Sci. EE. UU. 77: 4216, (1980)), HeLa (células de carcinoma humano) y otras líneas celulares establecidas, en particular para uso en laboratorio, por ejemplo células HEK293, SF9 o COS, wt-PC12 y cultivos primarios de DRG. De forma totalmente preferente se emplean células humanas, en particular células madre neuronales y células de la “vía del dolor”, preferentemente neuronas
20 sensoriales primarias. Algunas células humanas, en particular células autólogas de un paciente, después de la transformación (sobre todo *ex vivo*) con moléculas de ARNds según la invención son adecuadas de forma totalmente preferente como medicamentos, por ejemplo para fines de terapia genética, es decir, después de realizar una extracción de células, en caso dado una
25 expansión *ex vivo*, transformación, selección y finalmente retrasplante en el paciente.

Otro objeto preferente consiste también en la utilización de al menos una molécula de ARNsi o un preparado farmacéutico según la invención y/o una célula según la invención para producir un medicamento o analgésico para el
30 tratamiento del dolor, en particular del dolor crónico, alodinia táctil, dolor provocado térmicamente y/o dolor inflamatorio.

Los objetos según la invención son adecuados como medicamentos, por ejemplo para la inhibición de la nocicepción, por ejemplo mediante la reducción de la expresión de al menos un miembro de la familia VGLUT2 mediante las
35 moléculas de ARNsi según la invención.

Además se da a conocer la utilización de al menos una molécula de ARNsi según la invención y/o una célula según la invención para producir un medicamento para el tratamiento de la incontinencia urinaria, síntomas neurógenos de la vejiga, prurito, tumores, inflamaciones, en particular inflamaciones asociadas con VGLUT con síntomas como asma, y también de todos los síntomas patológicos relacionados con los miembros de la familia de los VGLUT.

Otro objeto de la invención consiste en un procedimiento para el tratamiento, en particular para el tratamiento del dolor, en un humano o un mamífero no humano que requiera un tratamiento contra el dolor, en particular dolor crónico, mediante la administración de un medicamento según la invención, en particular un medicamento que contiene una molécula de ARNsi según la invención. Otro objeto también consiste en los procedimientos correspondientes para el tratamiento del prurito y/o la incontinencia urinaria.

Otro objeto preferente consiste igualmente en la utilización de al menos una molécula de ARNsi según la invención, en particular ARNsi, y/o una célula según la invención para la terapia genética, preferentemente para la terapia genética *in vivo* o *in vitro*.

Otro objeto preferente consiste igualmente en la utilización de al menos una molécula de ARNsi según la invención y/o de una célula según la invención para la terapia genética, preferentemente para la terapia genética *in vivo* o *in vitro*. Por el concepto "terapia genética" se entiende una forma de terapia en la que, mediante la introducción de ácidos nucleicos en las células, se expresa por ejemplo un gen efector, en la mayoría de los casos una proteína, es decir, en el presente caso en particular el ARNds según la invención.

En principio se distingue entre procedimientos *in vivo* y procedimientos *in vitro*. En el caso de los procedimientos *in vitro*, se retiran células del organismo y se someten a transfección con vectores *ex vivo* para, a continuación, introducir las de nuevo en el mismo organismo o en un organismo diferente. En la terapia genética *in vivo* se administran vectores, por ejemplo para luchar contra tumores, de forma sistémica (por ejemplo a través de la vía sanguínea) o directamente en el tumor. De acuerdo con una forma de realización preferente, se administra un vector que mantiene tanto el elemento de transcripción para el ARNds sentido como el elemento de transcripción para el ARNds antisentido bajo el control de los promotores adecuados. De acuerdo con otra forma de

realización preferente, los dos elementos de transcripción se pueden encontrar en vectores diferentes.

Otro objeto preferente consiste en un sistema de diagnóstico que contiene al menos un ARNds y/o una célula según la invención, y en caso dado también aditivos adecuados. El concepto "sistema de diagnóstico" significa aquí 5 un compuesto o un procedimiento que puede ser utilizado para diagnosticar una enfermedad.

También se describe un procedimiento para identificar sustancias moduladoras del dolor. En un paso de procedimiento (a), preferentemente 10 previo, se lleva a cabo una sobreexpresión de VGLUT, preferentemente de VGLUT1, VGLUT2 o VGLUT3, en una célula de ensayo. Esta sobreexpresión en una célula de ensayo asegura una concentración elevada de VGLUT en estas células de ensayo manipuladas y utilizadas para la investigación posterior, lo que permite determinar con más precisión el grado de eficacia de las sustancias 15 potencialmente moduladoras del dolor por ampliación de escala. No obstante, para el procedimiento también se pueden utilizar en principio células que no han sido manipuladas de este modo, pero que expresan VGLUT de forma nativa.

Las células de ensayo preferentemente cultivables, obtenidas en caso dado mediante la ejecución previa del paso de procedimiento (a), se someten a 20 los pasos de procedimiento (b) y (b') (en particular paralelos), es decir: (b) una manipulación preferentemente por ingeniería genética de al menos una célula (célula de ensayo) con al menos un ARNds según la invención, y (b') un ensayo comparativo (ensayo control) (en particular paralelo) con al menos una célula idéntica (célula de control). Dependiendo de los conocimientos que se deseen 25 obtener, este ensayo comparativo de acuerdo con el paso de procedimiento (b') puede perseguir diferentes objetivos. Por ello, se pueden concebir diferentes formas de configuración. Por ejemplo, el ensayo comparativo se puede llevar a cabo con células de ensayo que, a diferencia del paso de procedimiento (b), se utilizan sin ningún tipo de manipulación por ingeniería genética con ARNds. No 30 obstante, alternativamente las células de control también pueden presentar un ARNds modificado, por ejemplo no correspondiente a la invención, o haber sido manipuladas con un ARNds determinado de efecto conocido en la expresión de VGLUT. Por último, en caso dado también se puede prescindir del paso de procedimiento (b'). En un paso de procedimiento (c) se lleva a cabo la 35 incubación de las células de ensayo que expresan VGLUT y, de acuerdo con el paso de procedimiento (b), también presentan la sustancia a ensayar, bajo

condiciones adecuadas. Típicamente, la incubación de las células de ensayo del paso de procedimiento (b) y la incubación de las células de control de acuerdo con el paso de procedimiento (b') se llevan a cabo en paralelo.

A continuación, en un paso de procedimiento (d) se mide por ejemplo la
5 unión de la sustancia de ensayo con el ARN(m) de VGLUT sintetizado por las células, preferiblemente bajo condiciones adecuadas. Para ello puede ser necesaria por ejemplo una preparación de las células de ensayo manipuladas con la sustancia de ensayo. Sin embargo es preferible medir al menos un parámetro funcional modificado por la unión de la sustancia de ensayo,
10 típicamente ARNs, por ejemplo con el ARN(m) de VGLUT. Este parámetro modificado puede consistir, por ejemplo, en un fenotipo cuantificable de la célula incubada, que se produce por la unión de la sustancia de ensayo con el ARN(m) de VGLUT, por ejemplo debido a la inhibición de la proteína de VGLUT causada por dicha unión. La medición también puede tener lugar, por ejemplo, mediante
15 métodos de inmunofluorescencia, con los que se determina la concentración de VGLUT en las células diana. No obstante, el VGLUT sobreexpresado en la célula de ensayo mediante el paso de procedimiento (a) puede estar configurado (adicionalmente) en caso dado con una función indicadora. De este modo se podría medir directamente en la célula por ejemplo una propiedad de
20 fluorescencia (o en caso dado su inhibición por la adición de una sustancia de ensayo positiva) vinculada con el VGLUT sobreexpresado mediante un constructo genético correspondiente. Después, en un paso de procedimiento (e) tiene lugar la identificación de las sustancias potencialmente moduladoras del dolor, por ejemplo según la magnitud de la diferencia entre el valor de medición
25 de la célula de ensayo y el valor de medición de la célula de control.

El ARNs introducido por transfección en las células de ensayo en forma de manipulación por ingeniería genética de acuerdo con el paso de procedimiento (b) o (b'), como sustancia típica de un procedimiento de este tipo, también se puede introducir por transfección a través de cualquier otro método
30 alternativo. Por ejemplo, la adición puede tener lugar de forma exógena en las células de ensayo, en caso dado junto con otras medidas químicas o físicas conocidas en el estado actual de la técnica, para asegurar la absorción del ARNs en las células, por ejemplo por electroporación, etc. Si las sustancias de ensayo de ARNs aplicadas exógenamente a las células de ensayo no pueden
35 atravesar como tales la membrana celular, su capacidad para atravesar la membrana celular se puede aumentar también mediante las formulaciones correspondientes, por ejemplo en liposomas o mediante el acoplamiento a

reforzadores conocidos por su penetración de membrana, por ejemplo polímeros correspondientes, o reactivos de transfección.

En este contexto, el concepto “modulador del dolor” se refiere a una influencia reguladora potencial del dolor fisiológico, en particular a un efecto
5 analgésico. El término “sustancia” incluye cualquier compuesto adecuado como principio activo medicinal, por consiguiente particularmente principios activos de bajo peso molecular, pero también otros como ácidos nucleicos, grasas, azúcares, péptidos o proteínas como anticuerpos. Por “incubación bajo condiciones adecuadas” se ha de entender aquí que la sustancia a examinar
10 puede reaccionar con la célula o con el preparado correspondiente en un medio acuoso durante un tiempo determinado antes de la medición. La temperatura del medio acuoso se puede regular, por ejemplo entre 4°C y 40°C, preferentemente a temperatura ambiente o a 37°C. El tiempo de incubación puede variar de unos segundos a varias horas, dependiendo de la interacción de la sustancia con la
15 proteína. No obstante son preferentes tiempos de incubación de 1 minuto a 60 minutos. El medio acuoso puede contener sales y/o sistemas tampón adecuados, de modo que durante la incubación el medio presente un pH por ejemplo entre 6 y 8, preferentemente un pH 7,0 - 7,5. También se pueden añadir al medio otras sustancias adecuadas, como coenzimas, nutrientes, etc. Los
20 especialistas pueden determinar fácilmente las condiciones adecuadas en función de la interacción examinada de la sustancia con la proteína basándose en su experiencia, en la literatura o en ensayos preliminares sencillos, con el fin de obtener el valor de medida lo más claro posible en el procedimiento. Una célula que ha sintetizado una proteína es una célula que ya ha expresado esta
25 proteína de forma endógena o una célula que ha sido modificada por ingeniería genética de tal modo que expresa dicha proteína y correspondientemente contiene la proteína desde el comienzo del procedimiento descrito. Las células pueden ser células de líneas celulares dado el caso inmortalizadas o células nativas procedentes de tejidos y aisladas de éstos, estando la agrupación
30 celular disuelta en la mayoría de los casos. El preparado de estas células incluye principalmente materiales homogeneizados de las células, el citosol, una fracción de membrana de las células con fragmentos de membrana, una suspensión de orgánulos celulares aislados, etc.

La escala por la cual el procedimiento permite hallar sustancias de interés
35 consiste bien en la unión con la proteína, que se puede comprobar por ejemplo mediante desplazamiento de un ligando conocido o mediante la proporción de sustancia unida, bien en la modificación de un parámetro funcional por la

interacción de la sustancia con la proteína. Esta interacción puede consistir principalmente en una regulación, inhibición y/o activación de receptores, canales de iones y/o enzimas. Los parámetros funcionales modificados pueden ser, por ejemplo, la expresión genética, el medio iónico, el pH o el potencial de membrana, o la variación de la actividad enzimática o de la concentración del 2º mensajero. En este contexto se han de tener en cuenta los siguientes significados:

- 10 - Manipulado por ingeniería genética: Manipulación de células, tejidos u organismos de tal modo que se introduce material genético en los mismos.
- Expresado de forma endógena: Expresión de una proteína que presenta una línea celular bajo condiciones de cultivo adecuadas, sin que dicha expresión de la proteína correspondiente haya sido inducida mediante manipulación por ingeniería genética.

15 En otra forma de realización de este procedimiento está previsto que la célula sea manipulada por ingeniería genética antes de los pasos de procedimiento (b) y (b').

20 En otra forma de realización de este procedimiento está previsto que la manipulación por ingeniería genética permita la medida de al menos uno de los parámetros funcionales modificados por la sustancia de ensayo.

En otra forma de realización de este procedimiento está previsto que, mediante la manipulación por ingeniería genética, se exprese una forma de un miembro de la familia VGLUT2 que no es expresada de forma endógena en la célula, o se introduzca un gen indicador.

25 En otra forma de realización de este procedimiento está previsto que la medición de la unión tenga lugar a través del desplazamiento de un ligando marcado conocido de un miembro de la familia VGLUT2.

30 En otra forma de realización de este procedimiento está previsto que entre los pasos de procedimiento paralelos (b) y (b') y el paso de procedimiento (c) transcurran ≥ 8 h, preferentemente ≥ 12 h, en particular ≥ 24 h.

La introducción de los objetos según la invención en la célula puede tener lugar del modo arriba descrito.

La presente invención se explica más detalladamente mediante las siguientes figuras.

Las figuras muestran:

5
10
Figura 1: estrategias para la técnica de interferencia de ARN. Las duplicaciones de ARNsi sintéticas se pueden transfectar directamente en las células, donde inducen la degradación de ARNm diana a través de la maquinaria de ARNi celular. Por otra parte, en el núcleo celular se forman ARNsi codificados por vector en forma de precursores en forma de horquilla, que se procesan en el citoplasma de Dicer, para obtener ARNsi.

15
Figura 2^a: ARNsi producidos *in vitro*. En principio existen varias posibilidades para aprovechar de la técnica de ARNi: existe la posibilidad de utilizar ARNsi sintetizado químicamente (véase la figura 2A) o la posibilidad de emplear métodos de biología molecular (por ejemplo figura 2B).

20
25
30
35
(A) el ARNsi sintetizado químicamente evita el paso “dicing”, se incorpora en el RISC y conduce a una degradación de ARNm específico de secuencia. (B) El ARNds largo se procesa mediante Dicer para obtener ARNsi activos. (C) El ARN de horquilla dúplex se puede procesar mediante Dicer para obtener ARNsi activos. (D) El ARN de horquilla dúplex incompleto se procesa mediante Dicer para obtener ARNmi, que se incorporan en RNPmi y conducen a una inhibición de la traducción. Las moléculas de ARNds largas (B) transfectadas en las células se procesan para obtener moléculas de ARNsi cortas, de 19 a 21 pb, que conducen a la degradación de las secuencias de ARNm complementarias. Los 21-meros de cadena simple sintetizables químicamente imitan los ARNsi hallados *in vivo* y, después de una formación de dúplex, se utilizan para efectos de ARNi relativamente cortos y transitorios *in vitro* e *in vivo* (Elbashir y col., 2001a; Holen y col., 2002; Yu y col., 2002). De este modo se describen cuatro formas de realización de ARNds según la invención contra miembros de la familia de los VGLUT. Otra posibilidad consiste en los plásmidos que expresan ARNds (en particular ARNsi) según la invención (figura 2b), es decir fragmentos cortos de ARN generados *in vivo*: (A) Un ARN de

horquilla largo expresado por ARN polimerasa II conduce, después de un procesamiento con Dicer, a varios ARNsi con las más diversas especificidades de secuencia. (B) Los promotores tándem Pol III provocan la expresión de cadenas sentido y antisentido individuales, que se condensan en la célula formando ARNsi activos. (C) Un promotor Pol III individual provoca la expresión de un ARN(sh) de horquilla corto, que se procesa mediante Dicer para obtener ARNsi activo. Con ayuda de promotores de ARN polimerasa III, como U6 o H1, es posible expresar intracelularmente ARNs y después moléculas de ARNsi y, de este modo, establecer sistemas de ARNi estables en células de mamífero (Brummelkamp y col., 2002; Lee y col., 2002; Miyagashi y Taira, 2002). En este contexto se pueden leer las cadenas sentido y antisentido de diferentes promotores y condensar en la célula formando duplicaciones de 19-nt con salientes de 4-nt, o se recurre a la expresión de estructuras de horquilla. En ambos casos se logra una supresión efectiva y estable de la expresión genética mediante el proceso de ARNi mediado por RISC. Aunque el menor tamaño de un transcripto que puede ser expresado por el promotor Pol III no es al principio contraproducente para la tecnología de ARNsi, sí limita la cantidad de ARNsi diferentes que pueden ser formados por un producto de transcripción (Myslinski, 2001).

Figura 3: producción de modelos de ADN para la síntesis de ARNsi.

Figura 4: transcripción e hibridación de los ARNsi.

Figura 5: ADNc de VGLUT1 con secuencia diana ARNsi; número de acceso del banco de genes U07609. Colores: codón de iniciación (amarillo), ARNsi si-rVGLUT1 739-759 EGT (rojo), cebador rVGLUT1(2_4)F (gris claro), cebador rVGLUT1(2_4)R (gris oscuro).

Figura 6: ADNc de VGLUT2 con secuencias diana ARNsi; número de acceso del banco de genes NM_053427. Colores: codón de iniciación (amarillo), ARNsi si-rVGLUT2 100-120 EGT (rojo), ARNsi si-rVGLUT2 100-120 AMB (verde), ARNsi si-rVGLUT2 166-186 AMB (azul), cebador rVGLUT2(8_9)F (gris claro), cebador rVGLUT1(8_9)R (gris oscuro).

- 5 Figura 7: ADNc de VGLUT3 con secuencia diana ARNsi; número de acceso del banco de genes AJ491795. Colores: codón de iniciación (amarillo), ARNsi si-rVGLUT3 220-240 EGT (rojo), cebador rVGLUT3(4_5)F (gris claro), cebador rVGLUT3(4_5)R (gris oscuro).
- 10 Figura 8: transfección de células PC12 MR-A con ARNsi marcado con Cy3. El ARNsi marcado con Cy3 (100 pmol) se sometió a transfección mediante LF2000 (1 µl) en células de la línea celular PC12 MR-A (B). En el caso del control (A) se prescindió del LF2000. Las células se fijaron 24 horas después de la transfección y los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI.
- 15 Figura 9: tasa de transfección en cultivos primarios de DRG. La determinación de la tasa de transfección en 250.000 células de un cultivo primario de DRG (P0, 1 T.i.v.) se llevó a cabo 24 horas después de la transfección mediante microscopía de fluorescencia en una placa de 24 pocillos utilizando diferentes cantidades de Lipofectamine™ 2000 (0,2 - 1,4 µl) y diferentes concentraciones de ARNsi-Cy3 (10 - 200 pmol).
- 20 Figura 10: tasa de transfección en células PC12 MR-A. La determinación de la tasa de transfección en 250.000 células PC12 MR-A se llevó a cabo 24 horas después de la transfección mediante microscopía de fluorescencia en una placa de 24 pocillos utilizando diferentes cantidades de LF 2000 (0,2 - 1,4 µl) y diferentes concentraciones de ARNsi-Cy3 (10 - 200 pmol).
- 25 Figura 11: tasa de transfección en células wt-PC12. Para ello se determinó la tasa de transfección en 250.000 células wt-PC12 24 horas después de la transfección mediante microscopía de fluorescencia en una placa de 24 pocillos utilizando diferentes cantidades de LF 2000 (0,2 - 1,4 µl) y diferentes concentraciones de ARNsi-Cy3 (10 - 200 pmol).
- 30
- 35 Figura 12: resultados del tratamiento de un cultivo primario de DRG con ARNsi marcado con Cy3 contra VGLUT2. La supresión de la expresión de proteínas VGLUT2 mediante ARNsi marcado con Cy3 en neuronas de un cultivo primario de DRG (P0, 2 T.i.v.) se determinó con ayuda de inmunofluorescencia 48 horas después de

la transfección con LF 2000 (1 µl/pocillo) en una placa de 24 pocillos. VGLUT2 (cobaya, 1:800, verde), Cy3-si-rVGLUT2 166 - 186 AMB (100 pmol, rojo) y representación superpuesta de las señales de VGLUT2 y ARNsi-Cy3 con núcleos celulares teñidos con DAPI (C, F, I).

5

Figura 13: expresión de proteínas VGLUT2 en células PC12 MR-A y supresión proteínica mediante ARNsi. La detección inmunocitoquímica de la expresión de proteínas VGLUT2 se llevó a cabo (A) en células de la línea celular PC12 MR-A y reducción del nivel de proteínas VGLUT2 mediante ARNsi contra VGLUT2 (si-rVGLUT2 100-120 EGT), 100 pmol ARNsi (C), 200 pmol ARNsi (D) y control negativo (B) sin anticuerpos primarios contra VGLUT2 (conejo 1:800).

10

Figura 14: detección de VGLUT2 en células wt-PC12 transfectadas. Mediante un proceso inmunocitoquímico se detectó proteína VGLUT2 con anticuerpos primarios contra VGLUT2 (conejo, 1:800) 24 horas después de la transfección de plásmidos rVGLUT2 mediante LF2000TM en células wt-PC12: (A) células VGLUT2-positivas (marcadas con A488, verde) en células transfectadas con rVGLUT2; (B) ninguna inmunorreactividad de VGLUT2 en células no transfectadas (control negativo).

15

20

Figura 15: tratamiento con ARNsi de células wt-PC12 cotransfectadas con VGLUT2. El recuento de las células wt-PC12 VGLUT2-positivas, marcadas de forma inmunocitoquímica, se llevó a cabo 24 horas después de la cotransfección del plásmido rVGLUT2 con ARNsi contra VGLUT2 (si-rVGLUT2 100-120 EGT, si-rVGLUT2 100-120 AMB, si-rVGLUT2 166-186), contra VGLUT1 (si-rVGLUT1 739-759 EGT) y contra VGLUT3 (si-rVGLUT3 220-240 EGT) y con un ARNsi desapareado (si-rVGLUT2 MM EGT). Representación de los valores medios \pm E.E.M. (error estándar de la media) para $n = 6$ por grupo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control sin tratamiento con ARNsi (ANOVA, Bonferroni-Test). Comparación de dos métodos de evaluación: (A) recuento manual, (B) recuento digital.

25

30

- Figura 16: eficiencia de los ARNsi en células wt-PC12. Las eficiencias de ARNsi (porcentaje de la reducción de células VGLUT2-positivas con respecto a la expresión de VGLUT2 sin ARNsi) se compararon 24 horas después de la cotransfección del plásmido rVGLUT2 y ARNsi en células wt-PC12. Representación de los valores medios \pm E.E.M. para $n = 6$ por grupo, *** $p < 0,001$ en comparación con el tratamiento con ARNsi desapareado (ANOVA, Bonferroni-Test).
- Figura 17: tratamiento con ARNsi de células wt-PC12 seis horas antes de la transfección con rVGLUT2. En este caso se recontaron las células wt-PC12 VGLUT2-positivas marcadas de forma inmunocitoquímica 24 horas después del tratamiento con ARNsi contra VGLUT2 (si-rVGLUT2 100-120 EGT, si-rVGLUT2 100-120 AMB, si-rVGLUT2 166-186), contra VGLUT1 (si-rVGLUT1 739-759 EGT) y contra VGLUT3 (si-rVGLUT3 220-240 EGT) y con un ARNsi desapareado (si-rVGLUT2 MM EGT). Las células se sometieron a transfección con el plásmido rVGLUT2 6 horas después del tratamiento con ARNsi. Representación de los valores medios \pm E.E.M. para $n = 6$ por grupo, ** $p < 0,01$ en comparación con el tratamiento con ARNsi desapareado (ANOVA, Bonferroni-Test).
- Figura 18: influencia del tratamiento con ARNsi 24 horas después de la transfección con rVGLUT2. Las células wt-PC12 VGLUT2-positivas marcadas de forma inmunocitoquímica se recontaron 24 horas después del tratamiento con ARNsi contra VGLUT2 (si-rVGLUT2 100-120 EGT, si-rVGLUT2 100-120 AMB, si-rVGLUT2 166-186), contra VGLUT1 (si-rVGLUT1 739-759 EGT) y contra VGLUT3 (si-rVGLUT3 220-240 EGT) y con un ARNsi desapareado (si-rVGLUT2 MM EGT). Las células se sometieron a transfección con el plásmido rVGLUT2 24 horas antes del tratamiento con ARNsi. Representación de los valores medios \pm E.E.M. para $n = 6$ por grupo, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con células no tratadas (ANOVA, Bonferroni-Test).
- Figura 19: eficiencia de los ARNsi 24 horas después de la transfección con rVGLUT2. Se compararon las eficiencias de ARNsi (proporción de la supresión de VGLUT2 con respecto a la expresión de VGLUT2 sin ARNsi) 24 horas después del tratamiento con ARNsi en células wt-PC12 que 24 horas antes del tratamiento con ARNsi habían

- Figura 24: expresión de VGLUT2 en neuronas TRPV1-positivas. A través de métodos inmunocitoquímicos se detectó la expresión de VGLUT2 en neuronas TRPV1-positivas de un cultivo primario de DRG: (A) VGLUT2 (cobaya, 1:800, verde); (B) TRPV (conejo, 1:250, rojo); (C) colocalización de VGLUT2 en neuronas TRPV1-positivas (señal amarilla); (D) ampliación de una sección de la imagen C: señales de VGLUT2 en soma celular (amarillo) y en el axón (amarillo, verde) de la neurona TRPV1-positiva; (E, F) distribución de frecuencias en relación con las superficies celulares de neuronas VGLUT2-positivas o TRPV1-positivas.
- Figura 25: sinopsis de las diferentes secuencias de VGLUT (humano, rata) (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3), incluyendo el código de acceso en el banco de datos correspondiente.
- Figura 26: secuencias diana de ADN de ARNsi específicos de isoformas de VGLUT. Las secuencias preferentes están representadas en negrita. Las homologías se ensayaron con el algoritmo de Smith-Waterman.
- Figura 27: secuencias de nucleótidos de VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3 (humanas en cada caso).
- Figura 28: resultados de los ensayos *in vivo* con ratas de acuerdo con el método de dolor de Bennett (véase el ejemplo de realización 4). Los ensayos se realizaron con tres dosificaciones diferentes. Las figuras 28 A, 28 B y 28 C muestran los resultados de los ensayos utilizando 1 ng, 10 ng y 100 ng de sustancia de ensayo (ARNsi de VGLUT2) y cantidades correspondientes de ARNsi de control. Además se administró a cada animal NaCl como control adicional. El efecto antialodínico del ARNsi de VGLUT2 (símbolo cruzado) se puede observar de forma especialmente clara en la figura 28A.

La presente invención se caracteriza más detalladamente mediante los siguientes ejemplos de realización.

Ejemplos de realización

Ejemplo de realización 1

A) Diseño de moléculas de ARNsi

El diseño de las moléculas de ARNsi según la invención utilizadas corresponde a las formas de realización según la invención. En la figura 5, la figura 6 y la figura 7 están representadas las secuencias codificadoras de los tres transportadores vesiculares de glutamato diferentes. En cada caso están marcados con colores el codón de iniciación (amarillo), y también los pares de cebadores utilizados para la determinación (cuantitativa) (gris claro y oscuro). Las secuencias diana de los diferentes ARNsi también están marcadas con colores (rojo, verde, azul).

B) Preparación del ARNsi

Los ARNsi utilizados por un lado fueron sintetizados por encargo por la firma Eurogentec (EGT) y, por otro, se obtuvieron mediante preparación propia con el *kit* de construcción de ARNsi de la firma Ambion (AMB). La síntesis de las siguientes moléculas de ARNsi se encargó a Eurogentec:

si-rVGLUT1 739-759 EGT

15 5' AGC GCC AAG CUC AUG AAC CTT 3' Contenido de GC: 52,4%
 3' TT UCG CGG UUC GAG UAC UUG G 5'

si-rVGLUT2 100-120 EGT (ARNsi activo)

 5' GCA GGA UAA CCG AGA GAC CTT 3' Contenido de GC: 42,8%
 3' TT CGU CCU AUU GGC UCU CUG G 5'

si-rVGLUT3 220-240 EGT

 5' GCG GUA CAU CAU CGC UGU CTT 3' Contenido de GC: 52,4%
 3' TT CGC CAU GUA GUA GCG ACA G 5'

20 **si-VGLUT2 MM EGT (ARNsi de control)**

 5' GGA CUA GCA AAG CGA GCC ATT 3' Contenido de GC: 42,8%
 3' TT CCU GAU CGU UUC GCU CGG U 5'

Con el *kit* de construcción de ARNsi SilencerTM de la firma Ambion se prepararon las siguientes moléculas de ARNsi:

si-rVGLUT2 100-120 AMB (ARNsi activo)

5' GCA GGA UAA CCG AGA GAC CTT 3' Contenido de GC: 42,8%
 3' TT CGU CCU AUU GGC UCU CUG G 5'

si-rVGLUT2 166-186 AMB

5' GGC UCC GCU AUG CGA CUG UTT 3' Contenido de GC: 57,1%
 3' TT CCG AGG CGA UAC GCU GAC A 5'

Una parte de los ARNsi de producción propia se marcó con el colorante
 5 Cy3 con el *kit* de marcado de ARNsi Silencer de la firma Ambion. Las
 secuencias arriba indicadas se utilizaron para los experimentos *in vitro* descritos
 más abajo.

Preparación de ARNsi mediante el *kit* de construcción de ARNsi Silencer™ (Ambion)

10 Para preparar modelos de transcripción eficientes para la síntesis de
 ARNsi, los oligonucleótidos sentido y antisentido se han de transformar en
 ARNds mediante el promotor T7 en el extremo 5'. Esto se logra hibridando los
 dos oligonucleótidos con el cebador de promotor T7 y prolongándolos mediante
 una reacción postrior de polimerización de ADN (véase también la figura 3).

15 Los moldes de ARNsi sentido y antisentido se transcriben durante dos
 horas en cargas de reacción independientes. A continuación se mezclan las
 cargas y la carga de reacción común se incuba durante una noche. Las cargas
 de transcripción independientes evitan una competencia potencial entre los
 moldes por los reactivos de transcripción, lo que podría limitar la síntesis de una
 20 de las dos cadenas del ARNsi. Mediante la mezcla de las cargas de
 transcripción se facilita la hibridación de las dos cadenas de ARNsi y así se
 permite una síntesis continua de ARN, lo que aumenta el rendimiento de los
 ARNds. El ARNsi obtenido mediante transcripción *in vitro* tiene en el extremo 5'
 "secuencias conductoras" salientes que han de ser eliminadas antes de una
 25 transfección. Esta "secuencia conductora" se digiere mediante una ribonucleasa
 específica de cadena simple. En la misma carga de reacción se elimina el molde
 de ADN mediante una digestión con DNAasa (véase también la figura 4).

El ARNsi resultante se purifica mediante columnas de ARN para eliminar
 la mezcla de nucleótidos, enzimas, oligómeros cortos y sales.

30 El ARNsi así purificado se somete a elución en agua libre de nucleasa y a
 continuación está listo para la transfección.

Realización

A partir de la solución madre 200 μM se preparó una solución 100 μM de cada ARNsi ONV. Para la hibridación de los ARNsi ONV con el cebador de promotor T7 se prepararon en cada caso las siguientes cargas de reacción para
5 sentido y antisentido:

Cebador de promotor T7	2 μl
Tampón DNA Hyb	6 μl
ARNsi ONV sentido / antisentido	2 μl

10 En primer lugar las cargas se calentaron durante 5 minutos a 70°C y después se mantuvieron durante 5 minutos a TA. A continuación se añadió a las cargas de reacción la siguiente mezcla de reacción, que se mezcló con cuidado y se incubó durante 30 minutos a 37°C:

15	10X tampón de reacción Klenow	2 μl
	10X mezcla dNTP	2 μl
	Agua libre de nucleasa	4 μl
	ADN polimerasa Exo-Klenow	2 μl

20 Para las dos cargas de ADN se preparó en cada caso una carga de reacción de transcripción a TA para sintetizar las cadenas de ARNss sentido y antisentido. Para ello se agruparon los siguientes componentes en el orden indicado, se mezclaron con cuidado, sin pipetear, y la mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C:

25	Molde de ADN sentido o antisentido	2 μl
	Agua libre de nucleasa	4 μl
	2X mezcla NTP	10 μl
	10X tampón de reacción T7	2 μl
	Mezcla de enzimas T7	2 μl

30 Después de estas 2 horas, las dos cargas de transcripción se juntaron por pipeteado y se incubaron a lo largo de la noche a 37°C.

Para la digestión de los ARNds hibridados con RNAasa y DNAasa se preparó la siguiente carga de reacción y se añadió con pipeta al ARNds, se mezcló con cuidado y se incubó durante 2 horas a 37°C:

5	Tampón de digestión	6 µl
	Agua libre de nucleasa	48,5 µl
	RNAasa	3 µl

Para la digestión de nucleasa se añadieron a continuación 400 µl de ARNsi y la carga se incubó durante 2 - 5 minutos a TA. Entre tanto, la membrana filtrante suministrada con el equipo se humedeció con 100 µl de tampón de lavado de ARNsi. Sobre el filtro humedecido se aplicó el ARNsi en el tampón de unión de ARNsi y el filtro se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 r.p.m. El caudal de circulación se desechó y la membrana filtrante se lavó 2 veces con 500 µl del tampón de lavado de ARNsi en cada caso y se centrifugó (2 minutos a 10.000 r.p.m.). A continuación, el ARNsi purificado se sometió a elución con 100 µl de agua libre de nucleasa a 75°C y se centrifugó en un recipiente colector limpio (2 minutos a 12.000 r.p.m.). El ARNsi se conservó a -20°C o -80°C hasta su utilización.

Síntesis en Eurogentec y formación de ARNsi dúplex

Con los oligonucleótidos de ARN sintetizados por Eurogentec se realizó una solución 50 µM mediante H₂O tratada con DEPC y la solución se dividió en partes alícuotas. En cada caso 30 µl de las soluciones de oligonucleótidos de ARN del mismo grupo se mezclaron con 15 µl de 5X tampón de reasociación (concentraciones finales: 20 µM ARNsi dúplex; 50 mM Tris pH 7,5-8,0; 100 mM NaCl en DEPC-H₂O). La solución se calentó durante 1 - 2 minutos en un baño de agua a 90 - 95°C y se dejó enfriar durante 45 - 60 minutos a TA. El ARNsi se conservó a -20°C hasta su utilización.

Marcado del ARNsi con Cy3

Para el marcado de ARNsi con el colorante de fluorescencia Cy3 se utilizaron tanto los ARNsi dúplex sintetizados por Eurogentec como los de producción propia. Para marcar 5 µg de ARNsi se preparó la siguiente carga de reacción, que se incubó durante 1 hora a 37°C:

	Agua libre de nucleasa	18,3 µl
	10x mezcla de marcado	5,0 µl

ARNsi dúplex 21-mero (20 μ M)	19,2 μ l
Reactivo de marcado Cy3	7,5 μ l

El ARNsi marcado con Cy3 se purificó mediante precipitación en etanol. Para ello se añadieron a la carga de reacción 0,1 volúmenes de NaCl 5M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, la carga se mezcló bien y se conservó durante 60 minutos a -80°C. El precipitado se pelletizó con 20 minutos de centrifugación (> 8.000 x g), el sobrenadante se retiró con cuidado, sin destruir la pella, y finalmente se lavó con 175 μ l de etanol al 70%. Después de otra centrifugación (5 minutos a > 8.000 x g) se retiró todo el sobrenadante, la pella se secó a TA durante 5 - 10 minutos y finalmente se disolvió en una cantidad correspondiente de agua libre de nucleasa (en este caso 19,2 μ l).

Ejemplo de realización 2

Utilización de los ARNsi de VGLUT en diferentes modelos *in vitro*

Para ensayar la efectividad de los ARNsi preparados, éstos se utilizaron en diferentes modelos *in vitro* y a continuación se determinó la expresión de las proteínas mediante inmunocitoquímica.

A) Optimización de las condiciones de transfección

Para lograr una alta eficiencia de la supresión de genes de ARNsi, además de la eficacia propia del ARNsi, también es necesaria una alta tasa de transfección de las células correspondientes. En este contexto desempeñan un papel importante la densidad celular, la cantidad del reactivo de transfección y la concentración de los ARNsi. La tasa de transfección (R_T = cantidad de células transfectadas / cantidad total de células) se determinó mediante ARNsi marcado con Cy3 bajo variación de estos diversos parámetros. Como reactivo de transfección se utilizó LipofectamineTM 2000.

La figura 8 muestra a modo de ejemplo los resultados de la localización de ARNsi marcado con Cy3 24 horas después de la transfección con LF2000TM. En las células PC12 MR-A aquí mostradas, el ARNsi marcado se acumula en el citoplasma, especialmente cerca del núcleo celular.

La transfección de células del ganglio espinal en un cultivo primario resultó sumamente difícil. Como muestra la figura 9, en la transfección de las células con ARNsi marcado con Cy3 mediante LF2000 sólo se logra una tasa de

transfección máxima ~2%. En este contexto no se pudo detectar ninguna preferencia de la transfección por un tipo de célula determinado, sino que tanto las células neuronales como las células no neuronales mostraban igualmente una señal de fluorescencia de Cy3. Sin embargo, dado que la proporción de neuronas era a lo sumo del 60%, el rendimiento de neuronas transfectadas con ARNsi fue muy bajo.

Las tasas de transfección más altas ($R_{Tmáx} \approx 80\%$) se alcanzaron con células de las líneas celulares PC12 MR-A y PC12 MR-B, como muestra la figura 10 a modo de ejemplo en el caso de la línea celular PC12 MR-A.

Las células wt-PC12 normales también se pueden transfectar bien con ARNsi. La figura 11 muestra las diferentes tasas de transfección para las diferentes condiciones de transfección. La tasa de transfección máxima fue ~28%.

B) Supresión de la expresión de VGLUT mediante ARNsi en diferentes modelos *in vitro*

1. Supresión de la expresión endógena de VGLUT en cultivos primarios de DRG

Las células de los cultivos primarios de DRG se transfectaron inmediatamente después de la disociación de los ganglios y purificación de la suspensión celular con el reactivo de transfección LF2000TM con diferentes ARNsi. Las células transfectadas se sembraron en bandejas de cultivo normales o se cultivaron en una placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos revestidos con poli-L-lisina.

Se fijaron los cultivos primarios de DRG, que se transfectaron con ARNsi marcado con Cy3 (Cy3-si-rVGLUT2 166 - 186 AMB) 48 horas después de la transfección y se caracterizaron inmunocitoquímicamente en cuanto a la expresión de proteínas VGLUT2. La figura 12 muestra el resultado de un tratamiento de este tipo con ARNsi.

Sobre los cubreobjetos tratados con ARNsi había aproximadamente un 2% de células transfectadas, que se podían reconocer por su coloración con Cy3. Ninguna de estas células transfectadas con ARNsi mostraba una señal proteínica clara para VGLUT2 después de un marcado inmunocitoquímico del transportador vesicular de glutamato VGLUT2. En cambio, ninguna de las células VGLUT2-positivas presentaba señales del ARNsi marcado con Cy3.

2. **Supresión de la expresión endógena de VGLUT en líneas celulares establecidas**

Las líneas celulares diferenciadas PC12 MR-A y PC12 MR-B expresan el transportador vesicular de glutamato VGLUT1 y VGLUT2. La figura 13 muestra la expresión de la proteína VGLUT2 en las células PC12 MR-A.

Estas células se transfectaron con ARNsi contra VGLUT2 (si-rVGLUT2 100-120 EGT) bajo condiciones optimizadas. Como muestra la figura 13, con 100 pmol de ARNsi (C) ya se logra una reducción de la inmunorreactividad de VGLUT2, con 200 pmol de ARNsi (D) la mayoría de las células carecen de inmunorreactividad de VGLUT2 o ya sólo presentan una inmunorreactividad de VGLUT2 muy pequeña.

3. **Supresión de la expresión de VGLUT2 en células wt-PC12 transfectadas transitoriamente**

Las células de la línea celular wt-PC12 normal sólo expresan VGLUT1 y no VGLUT2. Por este motivo, estas células endocrinas, producidas en vesículas, son adecuadas como sistema modelo para experimentos de supresión después de una transfección con VGLUT2 transitoria. Para la optimización de las transfecciones de ADN se utilizó un vector de EGFP cuyo producto genético, la proteína de fluorescencia verde (GFP), se puede detectar directamente mediante microscopía de fluorescencia. Mediante la optimización de las condiciones de transfección de ADN se alcanzó una tasa de transfección de EGFP ~ 40%. También se pudo lograr una tasa de transfección similarmente alta en el caso de las transfecciones con plásmidos rVGLUT2 (figura 14).

Los experimentos de supresión de ARNsi se configuraron de diferentes formas:

- Cotransfecciones de ARNsi y vector de ADNc.
- Transfección de ARNsi 6 horas antes de la transfección de ADNc.
- Transfección de ADNc 24 horas antes de la transfección de ARNsi.

En primer lugar se llevaron a cabo cotransfecciones con plásmidos rVGLUT2 y diferentes ARNsi. Para ello se utilizaron tres ARNsi contra VGLUT2, y también ARNsi contra VGLUT1, VGLUT3 y un ARNsi desapareado para el control de especificidad. Las células se fijaron 24 horas después de la transfección y se detectó inmunocitoquímicamente la expresión de proteínas

VGLUT2. La evaluación tuvo lugar en el microscopio de fluorescencia, realizándose el recuento de las células VGLUT2-positivas tanto manualmente como mediante análisis digital de imágenes (MCID).

La figura 15 muestra una comparación de la proporción de células VGLUT2-positivas después de transfecciones de plásmido rVGLUT2 con y sin cotransfección de ARNsi, y también una comparación de los dos métodos de evaluación. Los resultados del recuento digital (B), con el que se ahorra tiempo, coinciden en sus proporciones relativas con el recuento manual (A). Por ello, todos los experimentos posteriores se evaluaron digitalmente. Después del tratamiento con ARNsi dirigidos específicamente contra VGLUT2 se había reducido significativamente la proporción de células VGLUT2-positivas en comparación con células no tratadas con ARNsi ($24,92 \pm 1,9$) (si-rVGLUT2 100-200 EGT $11,4 \pm 2,2$ $p < 0,01$; si-rVGLUT2 100-200 AMB $9,84 \pm 1,1$ $p < 0,01$; sirVGLUT2 166-186 AMB $6,29 \pm 1,1$ $p < 0,001$).

En cambio, los ARNsi contra VGLUT1 o contra VGLUT3 y el ARNsi desapareado no influyen significativamente ($p > 0,05$) en la proporción de células VGLUT2-positivas (A).

Si a partir de estos resultados se calcula la eficiencia de los ARNsi utilizados como el porcentaje de la reducción de células VGLUT2-positivas con respecto a la expresión de VGLUT2 sin la influencia del tratamiento con ARNsi, se obtiene el resultado mostrado en la figura 16.

Se ha comprobado que los ARNsi dirigidos contra VGLUT2 presentan una alta eficiencia en comparación con el ineficaz ARNsi desapareado. Reducen la proporción de células que expresan el VGLUT2 en un 79 - 82%, siendo más eficaces los ARNsi de producción propia en las concentraciones utilizadas que el ARNsi sintetizado por Eurogentec. Mientras que el ARNsi contra VGLUT3 y el ARNsi desapareado no tienen ningún efecto significativo en la expresión de las proteínas VGLUT2, parece que el ARNsi dirigido contra VGLUT1 actúa de forma no específica sobre la expresión de VGLUT3 con una eficiencia $\sim 47\%$. No obstante, los ARNsi contra VGLUT2 son considerablemente más eficaces ($p < 0,001$) que el ARNsi contra VGLUT1.

A continuación se modificó el experimento de transfección: se trataron células wt-PC12 con diferentes ARNsi 6 horas antes de la transfección con el plásmido rVGLUT2, de modo que en el momento de la transfección de ADN los ARNsi ya estaban dentro de las células.

La figura 17 muestra la proporción de células VGLUT2-positivas en esta carga de ensayo. Como en el caso de las cotransfecciones, los ARNsi contra VGLUT2 conducen a una reducción significativa ($p < 0,01$) de células que expresan VGLUT2 en comparación con los cultivos tratados con ARNsi desapareado. En cambio, en el caso del tratamiento con ARNsi contra VGLUT1 o VGLUT3, la proporción de células VGLUT2-positivas no experimenta ninguna variación significativa ($p > 0,05$).

En otro experimento se analizó la influencia del nivel de proteínas VGLUT2 ya existente en la eficiencia de supresión de los ARNsi. Este modelo es el que más se corresponde con las células que expresan VGLUT2 de forma endógena y con la situación *in vivo*. Para ello, 24 horas antes del tratamiento con ARNsi, las células wt-PC12 se transfectaron con el plásmido rVGLUT2. Después de otras 24 horas se calculó la proporción de las células VGLUT2-positivas.

La figura 18 muestra la proporción de las células VGLUT2-positivas después de un marcado inmunocitoquímico. Como en los ensayos precedentes, los ARNsi de control (contra VGLUT1 y VGLUT3, ARNsi desapareado) no conducen a ninguna reducción significativa ($p > 0,05$) de la expresión de proteínas VGLUT2. En cambio, los ARNsi dirigidos específicamente contra VGLUT2 (de Ambion) reducen considerablemente la proporción de las células VGLUT2-positivas.

La figura 19 muestra la eficiencia de los ARNsi en esta carga de ensayo. Esta imagen muestra de nuevo claramente que los ARNsi dirigidos contra VGLUT2 reducen considerablemente la proporción de células VGLUT2-positivas y que este efecto es muy significativo en comparación con el ARNsi desapareado ($p < 0,001$).

Los resultados de estos ensayos prueban la eficacia específica de los ARNsi dirigidos contra VGLUT2 (si-rVGLUT2 100-120 EGT, si-rVGLUT2 100-120 AMB, si-rVGLUT2 166-186 AMB). En este contexto no existe ninguna diferencia entre los ARNsi de producción propia (si-rVGLUT2 100-120 AMB) y los sintetizados por Eurogentec (si-rVGLUT2 100-120 EGT). Los controles de ARNsi contra VGLUT1 (si-rVGLUT1 739-759 EGT) y contra VGLUT3 (si-rVGLUT3 220-240 EGT) no condujeron a ninguna reducción del nivel de proteínas VGLUT2. El denominado ARNsi desapareado (si-rVGLUT2 MM EGT), que tiene los mismos nucleótidos que los ARNsi específicos contra VGLUT2

pero en una disposición aleatoria y por consiguiente no complementaria, tampoco influye en el nivel de proteínas VGLUT2.

La eficiencia de los ARNsi específicos en estos ensayos oscila entre ~15 y ~80%. En el caso de las cotransfecciones simultáneas de ARNsi y ADN se logra una alta eficiencia (78-82%), mientras que en el caso de los ensayos de supresión con niveles de proteína VGLUT2 ya existentes en el momento de las transfecciones de ARNsi se alcanza una menor eficiencia (15-23%). De ello se puede deducir en primer lugar que los ARNsi específicos reducen la formación de proteínas VGLUT2 de forma muy eficiente y, en segundo lugar, que las proteínas VGLUT2 son muy estables o presentan un bajo nivel de renovación (*turnover*).

Ejemplo de realización 3

Caracterización de la expresión de VGLUT en cultivos primarios del ganglio espinal

Se prepararon ganglios espinales de ratas neonatas y se sometieron a un cultivo bajo las condiciones experimentales descritas más detalladamente en los ejemplos de realización. Para los cultivos se prepararon en cada caso 20 - 30 ganglios espinales de 8 - 16 ratas neonatas y se purificaron las células. La proporción de las neuronas en la cantidad total de células se aumentó claramente en comparación con el protocolo estándar mediante purificación a través de una columna BSA y también mediante la disposición en placas de la suspensión celular sobre materiales revestidos con poli-L-lisina (Grothe y Unsicker, 1987). Las neuronas, que son considerablemente más grandes y en consecuencia también más pesadas que las células no neuronales, se depositan con mayor rapidez sobre el fondo revestido. Mediante la retirada del sobrenadante después de transcurrir tan sólo 5 minutos se reduce la cantidad de células no neuronales, que se presentan principalmente como células fusiformes con ramificaciones. Después de 4 a 10 días *in vitro*, las células se fijaron y se caracterizaron inmunocitoquímicamente.

La figura 20 muestra las células cultivadas del ganglio espinal. Con el microscopio óptico (A) ya se pueden diferenciar los distintos tipos de células por su morfología. Las neuronas se reconocen por su forma esférica y por una refracción evidente, mientras que la inmensa mayoría de las células no

neuronales son fibroblastos fusiformes. Las neuronas también se pudieron preparar inmunocitoquímicamente con anticuerpos primarios contra el marcador panneuronal “Protein-Genprodukt 9.5” (PGP9.5) (B). En los cultivos también había algunas células de Schwann, que se identificaron con anticuerpos contra GFAP (C).

Dado que para los ensayos posteriores interesaban sobre todo las neuronas sensoriales primarias nociceptivas, se comprobó mediante marcadores inmunocitoquímicos que esta población de neuronas estaba presente en el cultivo primario y que se podía cultivar *in vitro* durante al menos 8 días. La figura 12 muestra estas neuronas: células peptidérgicas de ganglios espinales (A) con expresión de proteína CGRP y también neuronas sensibles al calor que expresan los canales de iones (B) TRPV1 y (C) TRPV2.

La figura 22 muestra la expresión de VGLUT2 (A-C, señal verde) en células del cultivo primario de DRG. El VGLUT2 es expresado en neuronas (B), siendo todas las células VGLUT2-positivas también positivas para el marcador neuronal PGP9.5 (señal amarilla). Sin embargo, no todas las células PGP9.5-positivas son VGLUT2-positivas (señal roja). La posibilidad de una coexpresión de VGLUT2 en células de Schwann se pudo excluir mediante marcado conjunto con los anticuerpos utilizados contra GFAP (C, señal roja).

La expresión de proteínas se desarrolla correspondientemente en el caso del VGLUT1 (no mostrado): el VGLUT12 es expresado en una subpoblación de neuronas PGP9.5-positivas y no está presente en células de Schwann.

A continuación se investigó la expresión de los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT1 y VGLUT22 en neuronas peptidérgicas CGRP-positivas (figura 23): la expresión de VGLUT1 (verde) y CGRP (rojo) tiene lugar en dos poblaciones celulares diferentes (C, F). En cambio, el VGLUT2 y el CGRP coexisten (I, M). Se observa que todas las neuronas inmunorreactivas de CGRP tienen el transportador vesicular de glutamato VGLUT2. Sin embargo, no todas las neuronas VGLUT2-positivas forman el neuropéptido CGRP.

Para investigar la expresión de VGLUT2 en nociceptores polimodios se llevó a cabo una inmunofluorescencia doble para VGLUT1 y VGLUT2. Como muestra la figura 24, todas las neuronas TRPV1-positivas utilizan el transportador vesicular de glutamato VGLUT2 (C, D). El VGLUT2 se localizó sobre todo en el soma celular y en el axón (D). En la figura 24 (E, F) están representadas las distribuciones de frecuencias de los tamaños celulares de las

neuronas VGLUT2-positivas (E) o de las neuronas TRPV1-positivas (F). Se puede observar que las neuronas TRPV1-positivas con un tamaño celular medio $\sim 180 \mu\text{m}^2$ constituyen una subpoblación de las neuronas VGLUT2-positivas pequeñas y medianas, que presentan un tamaño celular medio $\sim 200 \mu\text{m}^2$.

5

Ejemplo de realización 4

Ensayos *in vivo* para comprobar la eficacia del ARNsi contra el VGLUT2 en el tratamiento del dolor *in vivo*

Para estos ensayos se utilizó el modelo de dolor en la rata según Bennett.

10 El efecto analgésico del ARNsi según la invención se analizó en el modelo de rata *in vivo*. Para ello, como componente activo se utilizó un ARNsi dirigido contra la secuencia diana AAGCAGGATAACCGAGAGACC de VGLUT2. Las dos cadenas de este ARNsi de doble hebra tienen las siguientes secuencias:

15 r(GCAGGAUAACCGAGAGACC)dTT y
r(GGUCUCUCGGUUAUCCUGC)d(TT).

El ARNsi de control está dirigido contra la siguiente secuencia diana (AAGGACTAGCA-AAGCGAGCCA) (no se trata de una secuencia VGLUT2). Las cadenas del ARNsi de control de doble hebra tienen respectivamente las siguientes secuencias:

20 r(GGACUAGCAAAGCGAGCCA)d(TT) y
r(UGGCUCGCUUUGCUAGUCC)d(TT).

Todas las secuencias arriba mencionadas se sintetizaron químicamente (Xeragon, Germantown, EE. UU.) y su pureza se comprobó mediante análisis MALDI-TOF. Las secuencias se disolvieron en una disolución de NaCl al 0,9%.

25 El dolor neuropático se produce, entre otros casos, después de una lesión de los nervios periféricos o centrales y, en consecuencia, se puede inducir y observar en la experimentación animal mediante lesiones selectivas de nervios individuales. Un modelo animal consiste en la lesión nerviosa según Bennett (Bennett y Xie (1988) Pain 33: 87-107). En el modelo de Bennett se realizan ligaduras sueltas unilaterales en el nervio ciático. Se observa el desarrollo de

30 síntomas de dolor neuropático, que se puede cuantificar mediante alodinia térmica o mecánica.

Para ello, 5 ratas Sprague-Dawley (Janvier, Francia) con un peso de 140 a 160 gramos se anestesiaron primero con pentobarbital (50 mg por kg de peso

corporal de la rata, Nembutal®, intraperitoneal, Sanofi, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Hannover, Alemania). A continuación se realizaron múltiples ligaduras unilaterales en el nervio ciático principal derecho de las ratas. Para ello se descubrió el nervio ciático a la altura
5 del centro del muslo y se fijaron cuatro ligaduras sueltas (softcat®chrom USP 4/0, metric2, Braun Melsungen, Alemania) alrededor del nervio ciático de tal modo que no se interrumpió el riego sanguíneo epineural. El día de la operación fue el día 1. La medición se realizó 1 semana después de la ligadura nerviosa.

La alodinia se analizó en una placa metálica que se ajustó a una
10 temperatura de 4°C con ayuda de un baño de agua. Para comprobar la alodinia, las ratas se colocaron sobre la placa metálica fría, que se encontraba dentro de una jaula de plástico. Después, durante un período de dos minutos antes de la administración de la solución, se contó cuántas veces los animales retiraban impetuosamente su pata dañada de la placa metálica fría (valor previo). Luego
15 se administraron las soluciones, que contenían 3,16 µg (5 µl) de ARNsi según la invención en 15 µl de NaCl o 3,16 µg (5 µl) de ARN de control (cadena sentido del ARNsi) en 15 µl de NaCl i.t. o soluciones de NaCl (5 µl) para el control después de la administración intratecal aguda única bajo narcosis con éter, y en cada caso después de 60 minutos se contó de nuevo la cantidad de reacciones
20 de retirada de la pata durante 2 minutos (valor de ensayo). Las mediciones se realizaron durante 4 días seguidos, en cada caso con un intervalo de 24 h (días 2 a 5) y en cada caso con tres dosificaciones diferentes (0,001, 0,01 y 0,1 µg/animal). Los animales a los que se les administró solución de NaCl pura sirvieron tanto en los experimentos con ARNsi como con el ARN de control a
25 modo de grupo comparativo.

El ARNsi contra VGLUT2 mostró en este modelo de dolor un fuerte efecto analgésico, es decir, una clara inhibición de la alodinia por frío sin dependencia de la dosis, habiéndose logrado el mejor efecto con el grupo correspondiente a la dosis más baja (1 ng/animal). Con las dosis más altas, los animales mostraron
30 un incremento de la actividad espontánea tanto en el caso del control como en el experimento verdadero. Ésta podría ser la causa del efecto más débil en el grupo correspondiente a una dosis alta. No se produjeron otros efectos secundarios (véase también la figura 28).

A continuación se describen más detalladamente los materiales y
35 métodos, o las condiciones experimentales concretas, mencionados y utilizados en los ejemplos de realización arriba indicados.

1. Materiales utilizados

1.1 Animales de experimentación

Todos los animales de ensayo adultos eran ratas Wistar macho o hembra (300 g) y se obtuvieron de Charles River (Sulzfeld) o de la Deutschen Versuchstieranstalt (Hannover). Los animales se mantuvieron con un ritmo día-noche de 12h/12h, con acceso libre a comida y agua. Entre el suministro de los animales y el comienzo de los ensayos transcurrieron al menos 4 días, en los que se controló el estado de salud de los animales. Las ratas neonatas procedían de una cría propia de ratas Wistar macho y hembra, que se cubrían a intervalos regulares. Todos los animales neonatos fueron utilizados desde P0 (día posnatal 0) hasta P5 para la preparación de cultivos primarios.

1.2 Líneas celulares

wt-PC12

La línea celular tumoral inmortal PC12 se aisló en 1976 de un tumor de la médula suprarrenal de la rata (Greene y Tischler, 1976). Las células no crecen de forma adherente, producen tumores trasplantables en ratas y reaccionan de forma reversible al NGF (*nerve growth factor* - factor de crecimiento del tejido nervioso) con la formación de apéndices similares a neuronas. La línea celular PC12 fue puesta a disposición del laboratorio de la firma Grünenthal (Aquisgrán), que a su vez obtuvo la línea celular de ATCC. Las células se mantuvieron en cultivo en un medio DMEM modificado. En adelante, estas células PC12 se denominarán wt-PC12 (*wild type* - salvaje) para diferenciarlas mejor.

PC12 MR-A y PC12 MR-B

Estas dos líneas celulares consistían en variantes mutadas o diferenciadas de las células wt-PC12, obtenidas originalmente por el Dr. Reiner Westermann (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Marburg) de ATCC. A diferencia de sus mutantes salvajes, las células crecían de forma adherente, eran planas y fusiformes y formaban apéndices sin necesidad de añadir NGF. Las indicaciones dadas en la literatura dieron lugar a la suposición de que estas variantes podrían formar un fenotipo glutamatérgico (Jimenez y col., 2003; Zheng y col., 1996).

1.3 Cepas bacterianas

E. coli cepa DH5 α	Clontech (Heidelberg)
E. coli cepa XL-1 blue	Clontech (Heidelberg)

1.4 Aparatos

5 Centrifugadoras

Centrifugadora de mesa tipo Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Labofuge III	Heraeus (Hanau)
Centrifugadora refrigerada, 5403	Eppendorf (Hamburgo)
Centrifugadora JS21	Beckmann (Munich)

10

Incubadoras

Estufa de incubación (16/37°C)	WTB Binder (Reiskirchen)
Incubadora (37°C/5% CO ₂)	Heraeus (Hanau)
Incubadora (37°C/5% CO ₂)	Heraeus (Hanau)

15

Electroforesis

Accesorios de electroforesis en gel de agarosa	Kodak/Integra (New Haven)
Instalación de documentación de gel, Gel Doc	1000 BIO-RAD (Munich)

20 Microscopía y análisis digital de imágenes

Microscopio de exploración láser confocal	Olympus (Hamburgo)
Microscopio, AX70	Olympus (Hamburgo)
Microscopio, IX70	Olympus (Hamburgo)
Olympus SZH10 research stereo	Olympus (Hamburgo)
25 Sistema de análisis de imágenes MCID M4	Imaging Research (St. Catharines, Canadá)
Cámara SPOT	Diagnostics Instruments Inc. (Seúl, Corea)
30 SPOT image analyses (Version 3.4)	Diagnostics Instruments Inc. (Seúl)

Otros aparatos y materiales de consumo

	Dispositivo de aspiración	Neo-Lab, Vogel (Heidelberg)
	Autoclave	Integra BioSciences Inc. (Woburn, EE. UU.)
5	Cartucho de autorradiografía	Amersham (Little Chalfont, Inglaterra)
	Agitador de bacterias, Certomat H	Braun Biotech (Melsungen)
	Cubreobjetos	Menzei (Braunschweig)
	Pipetas de un solo uso	Greiner bio-one (Frickenhausen)
10	Frascos para cultivos de tejidos Cellstar®	Greiner bio-one (Frickenhausen)
	Placa calentadora	Medax (Kiel)
	Pipetas de émbolo	Eppendorf (Hamburgo)
	Criotubos	Nalge Nunc International (Rochester, EE. UU.)
15	Criostato CM 3050	Leica (Nussloch)
	Cámara de recuento Neubauer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
	Portaobjetos	Menzel (Braunschweig)
	Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research (Watertown, EE. UU.)
20	pH-Meter 766	Knick (Berlín)
	Placas Petri	Nalge Nunc International (Rochester, EE. UU.)
	Puntas de pipeta	Eppendorf (Hamburgo)
	Cubetas de plástico	Neolab (Heidelberg)
25	Instalación de agua purísima	(Milli-Q) Millipore (Billerica, EE. UU.)
	Speedvac (trampa fría)	Heraeus (Hanau)
	Aparato estereotáctico	David Kopf Instruments (Tujunga, EE. UU.)
30	Taumler Polymax 1040	MJ Research (Nueva York, EE. UU.)
	Termómetro	IKA Labortechnik (Staufen)
	Horno de ventilación forzada	Memmert (Schabach)
	Videoimpresora	Mitsubishi Electric (Tokio, Japón)
35	Vortex: VF2 y MS2 Minishaker	IKA (Staufen)
	Vortex Genie 2	Bender & Hohenheim AG (Zürich, Suiza)

	Balanza 1012 MP	Sartorius (Göttingen)
	Baño de agua Julabo 5	Julabo (Seelbach)
	Baño de agua	Memmert (Schabach)
	Placas de cultivo celular Nunclon™	
5	(6/24/96 pocillos)	Nalge Nunc International (Rochester, EE. UU.)

1.5 Productos químicos

10 Todos los productos químicos no mencionados aquí en detalle, siempre que no se indique otra cosa en la parte correspondiente a la descripción de los métodos, se han obtenido de las firmas Fluka (Buchs, Suiza), GibcoBRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roche (Basilea, Suiza), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) y Sigma (Deisenhofen).

	Bacto Agar	Difco (Detroit, EE. UU.)
15	Bacto Tryptone	Difco (Detroit, EE. UU.)
	Bacto Yeast Extract	Difco (Detroit, EE. UU.)
	Solución fijadora	Formamid BDH (Poole, Inglaterra)
	NaOH	Baker (Deventer, Holanda)
	Ketamina	Parke-Davis (Freiburg)
20	Parafina	Vogel Histo-Comp
	x-GAL	Invitrogen (Karlsruhe)
	Xilazina	Bayer (Leverkusen)

1.6 Tampones y soluciones

25	H ₂ O MilliQ	purificada y tratada en autoclave
	PBS (solución salina fosfatada):	6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,5 mM KCl
30		140 mM NaCl pH 7,25
	6x Tampón para muestras (ADN/ARN):	50 % (p/v) glicerina 1 mM EDTA 0,4 % (p/v) azul de bromofenol 0,4 % (p/v) xilencilanol
35		

- 45 -

TE (Tris EDTA):	10 mM Tris-Base 1 mM EDTA pH 8,0
5 TAE (Tris-acetato-EDTA):	1 x TAE 40 mM Tris- Base, 2m M EDTA 50x 242 g Tris base 57,1 ml ácido acético glacial 37,2 g Na ₂ EDTA x H ₂ O hasta 1 l H ₂ O pH 8,5

10

1.7 Medios y aditivos para medios

Medios básicos

Todos los medios se obtuvieron de GibcoBRL (Eggenstein):

15 DMEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco) con alta proporción de glucosa
Ham's F12
HBSS (10x) libre de Ca ²⁺ /Mg ²⁺
OptiMEM (con reducción de suero)
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

20 Aditivos para medios

Mezcla de antibióticos	GibcoBRL (Eggenstein)
Arabinósido de citosina	Sigma (Deisenhofen)
Suero bovino fetal (FCS)	Sigma (Deisenhofen)
HyClone FBS	GibcoBRL (Eggenstein)
25 HAT Supplement	GibcoBRL (Eggenstein)
Glutamina	GibcoBRL (Eggenstein)
Suero equino	GibcoBRL (Eggenstein)
Factor de crecimiento del tejido nervioso NGF 7S	Sigma (Deisenhofen)

30 Composición de los medios de crecimiento

Medio para células PC12:	RPMI con
	10% suero equino
	5% FCS
	1% Glutamina (200 mM)

1% Mezcla antibióticos (100x)

Medio para células del ganglio espinal:

DMEM con

5

10% FCS
1% Mezcla antibióticos (100x)
1% Glutamina
10 µM arabinósido de citosina
25 ng/ml NGF

10 **1.8 Enzimas y otras proteínas**

Colagenasa (267 U/ml)

Seromed, Biochrom (Berlín)

Dispasa

GibcoBRL (Eggenstein)

ADN polimerasa AmpliTaq Gold™

Applied Biosystems
(Foster City, EE. UU.)

15 ADNasa (LS002139)

Worthington

Poli-L-lisina, bromhidrato

Sigma (Deisenhofen)

Poli-D-lisina, MG > 300 kDa

Sigma (Deisenhofen)

Endonucleasas de restricción

Boehringer (Mannheim)

ARN polimerasas (SP6, T3, T7)

Boehringer (Mannheim)

20 ADNasa I libre de RNasa

Boehringer (Mannheim)

ARNasa (A, T1)

Boehringer (Mannheim)

ARNsin

Fermentas (Vilnius, Lituania)

Transcriptasa inversa Superscript™ II H

GibcoBRL (Eggenstein)

T4 ADN ligasa

Biolabs (Beverly, EE. UU.)

25 Tripsina/EDTA (0,5% / 0,2%)

GibcoBRL (Eggenstein)

Tripsina

GibcoBRL (Eggenstein)

1.9 Ácidos nucleicos y vectores

Ladder ADN 100 pb

GibcoBRL (Eggenstein)

30 Ladder ADN 1 kb

GibcoBRL (Eggenstein)

ATP, CTP, GTP, UTP

Boehringer (Mannheim)

Vector de transcripción (pGEM-T)

Promega (Madison, EE. UU.)

Vector de expresión (pCR3.1)

Invitrogen (Karlsruhe)

Cebador Oligo(dT)15-18

Boehringer (Mannheim)

35

1.10 Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Oligo 4.0, se comprobó con BLAST la posible presencia de homologías de secuencia no intencionadas y la síntesis de los mismos se encargó a MWG-Biotech (Ebersberg).

5 Cebadores para PCR:

rVGLUT1

rVGluT1 (2_4)F 5'-TCTGGGTTTCTGCATCAGC-3'

rVGluT1(2_4)R 5'-CCATGTATGAGGCCGACAGT-3'

Tamaño producto PCR: 153 pb

10 **rVGLUT2**

rVGluT2(8_9)F 5'-AAGACCCCATGGAGGAAGTT-3'

rVGluT2(8_9)R 5'-ATTGTCATGACCAGGTGTGG-3'

Tamaño producto PCR: 184 pb

rVGLUT3

15 rVGluT3(4_5)F 5'-ATCCAGAGACGGTGGGTCTT-3'

rVGluT3(4_5)R 5'-ATGACACAGCCGTAATGCAC-3'

Tamaño producto PCR: 185 pb

rGAPDH

rGAPDH(7_8)F 5'-ATCCTGGGCTACACTGAGGA-3'

20 rGAPDH(7_8)R 5'-ATGTAGCCATGAGGTCCAC-3'

Tamaño producto PCR: 162 pb

Cebadores para la síntesis de ARNsi mediante el *kit* de construcción de ARNsi (Ambion):

25 **para si-rVGLUT2 de ARNsi 100-120 AMB**

rVGluT2 TS10 as 5'-AAGCAGGATAACCGAGAGACCCCTGTCTC-3'

rVGluT2 TS10 s 5'-AAGGTCTCTCGGTTATCCTGCCCTGTCTC-3'

para si-rVGLUT2 de ARNsi 166-186 AMB

rVGluT2 TS14 as 5'-AAGGCTCCGCTATGCGACTGTCCTGTCTC-3'

rVGluT2 TS14 s 5'-AAACAGTCGCATAGCGGAGCCCCTGTCTC-3'

5 1.11 Kits

	qPCR Core kit for SYBR® Green	Eurogentec (Lieja, Bélgica)
	RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
	Silencer™ siRNA Construction Kit	Ambion (Austin, EE. UU.)
	Silencer™ siRNA Labeling Kit	Ambion (Austin, EE. UU.)
10	QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
	QIAprep Spin MAXiprep Kit	QIAGEN (Hilden)
	QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
	QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
	QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN (Hilden)
15	QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
	Vectastain Elite Avdin-Biotin-Blocking Kit	Vector Laboratories
	Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories

1.12 Anticuerpos y sistemas de detección

20 Los diferentes tipos de células se identificaron con anticuerpos primarios contra epítopes (marcadores) conocidos y bien caracterizados del tipo de célula correspondiente. Éstos son PGP9.5 en las neuronas, GFAP en los astrocitos y S100 en los oligodendrocitos. Además de los anteriores, también se utilizaron otros anticuerpos contra proteínas especiales. Las concentraciones óptimas de
25 los anticuerpos primarios se determinaron en cada caso por titulación. La Tabla 1 muestra una sinopsis de los anticuerpos primarios utilizados y también sus diluciones de trabajo.

La identificación de los anticuerpos primarios se llevó a cabo mediante anticuerpos secundarios acoplados con fluorocromo o estreptavidina acoplada
30 con fluorocromo (Tabla 2), que interactuaba con anticuerpos biotinilados específicos de especies. Como fluorocromos se utilizaron Cy3 (fluorescencia roja) o Alexa 488 (fluorescencia verde).

Tabla 1 Lista de los anticuerpos primarios utilizados

Antígeno	Denominación interna	Fuente	Dilución	Especie
β-III tubulina	Tubulina	DPC/Biermann (Bad Nauheim)	1:4	Ratón, monoclonal
CGRP	CGRP/Ste	Fred Nyberg, Stefan Persson	1:8000	Conejo
GFAP	GFAP-Dako	DakoCytomation (Dinamarca)	1:5000	Conejo
GFAP	GFAP	Boehringer (Mannheim)	1:4	Ratón, monoclonal
PGP9.5	PGP	UltraClone (Wellow, Inglaterra)	1:1500	Conejo, policlonal
S100	S100	Biogenesis (Poole, Inglaterra)	Dilución previa	Conejo, policlonal
Sustancia P	SP	Lee Eiden (NIH, EE. UU.)	1:1000	Conejo
TRPV1	Receptor caps. (SA 6583)	Eurogentec (Bélgica)	1:250	Conejo
TRPV2	VRL-1	Chemicon (Temecula, EE. UU.)	1:400	Conejo, policlonal
VGLUT1	BNPI/BC66	J. Erickson (Nueva Orleans) (Varoqui y col., 2002b)	1:600	Conejo
VGLUT1	BNPI/p437/7/01	J. Erickson (Nueva Orleans) (Varoqui y col., 2002b)	1:800	Cobaya
VGLUT2	DNPI/p438/7101	J. Erickson (Nueva Orleans) (Varoqui y col., 2002b)	1:800	Cobaya

VGLUT2	DNPI/DC68	J. Erickson (Nueva Orleans) (Varoqui y col., 2002b)	1:100	Conejo
VGLUT3	VGLUT3/447/bl9	J. Erickson (Nueva Orleans) (Schafer y col., 2002)	1:600	Cobaya policlonal

Además se utilizó Isolekyin B4 biotinilada (Sigma, Deisenhofen) en una concentración 1:20.

Tabla 2 Lista de los anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Fuente	Dilución	Donante
IgG-Cy3 anti-cobaya	Dianova (Hamburgo)	1:100	Asno
IgG-Cy3 anti-ratón	Dianova (Hamburgo)	1:100	Asno
IgG-Cy3 anti-conejo	Dianova (Hamburgo)	1:100	Asno
IgG-A488 anti-cobaya	Dianova (Hamburgo)	1:100	Asno
IgG-A488 anti-ratón	Dianova (Hamburgo)	1:100	Asno
IgG-A488 anti-conejo	Dianova (Hamburgo)	1:100	Asno
Avidin- biotin-peroxidasa	Boehringer (Mannheim)	1:500	Asno
Estreptavidin-Alexa 488	MoBiTec (Göttingen)	1:200	Asno

5

2. Métodos

2.1 Toma y preparación de tejidos

Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y decapitación subsiguiente. A continuación se tomó el tejido necesario para los diversos usos previstos de diferentes formas:

10

Extracción de ácido nucleico:

Después de retirar el tejido, éste se dividió sobre hielo, se introdujo en un criotubo y, después de la congelación ultrarrápida por nitrógeno líquido, el tejido primero se dispuso sobre hielo seco y después se conservó a -70°C.

15 Cultivo primario:

Para la preparación de cultivos primarios, el tejido (ganglios espinales) se recogió de forma continua sobre placas de preparación de producción propia

enfriadas con hielo y en primer lugar se reunió en medio 1x CMF hasta su posterior procesamiento. El medio 1x CMF libre de calcio y magnesio consistía en 10% HBSS (10x), 1% mezcla de antibióticos y 0,2% rojo de fenol (0,5%). El valor pH se tituló con bicarbonato (7,5%) y se podía identificar por el color rojo cereza del indicador.

2.2 Preparación de cultivos primarios

Para la preparación de los cultivos primarios se utilizaron ratas de los estadios P0 a P5 para el cultivo de células del ganglio espinal y P0 a P3 para los cultivos de cerebelo. Los animales fueron desinfectados con alcohol y sacrificados por decapitación con unas tijeras estériles.

2.2.1 Cultivos primarios neuronales de ganglios espinales

La preparación de los ganglios espinales se llevó a cabo de acuerdo con un protocolo modificado de C. Grothe (Grothe y Unsicker, 1987).

Disección de los ganglios espinales

El cuerpo de la rata sacrificada se fijó boca abajo sobre una placa de corcho y se descubrió la columna vertebral retirando la piel y la musculatura de la nuca y la espalda. A continuación se abrió la columna vertebral desde el extremo caudal hacia el extremo craneal y se dejó a la vista la médula espinal. En las ratas jóvenes, la médula espinal se dejó en el canal espinal y la columna vertebral abierta se extirpó *in toto* para fijarla a una placa de preparación fría. Sólo entonces se retiró la columna vertebral cuidadosamente paso a paso y se extrajeron los ganglios espinales de los agujeros intervertebrales que quedaron al descubierto.

Los ganglios espinales diseccionados se reunieron en una placa Petri fría con medio 1x CMF hasta la preparación fina. El ganglio espinal se limpió bajo el binocular eliminando nervios, tejido conjuntivo y restos de sangre y, a continuación, se trasladó a un tubo de ensayo lleno de medio 1x CMF y enfriado con hielo.

Disociación y purificación de las células de los ganglios espinales

Después de retirar el medio, para la disociación química los ganglios espinales se incubaron con una mezcla de enzimas formada por un 0,075% de colagenasa y un 0,15% de dispasa en medio CMF durante 30 a 45 minutos a 37°C y con un 5% de CO₂. Con la agitación repetida durante la incubación se

debía evitar que los ganglios de adhirieran entre sí. Una vez finalizada la incubación, se retiró la mitad de la mezcla de enzimas y a la parte restante se añadió un volumen igual de una solución de tripsina al 0,25%. Después de 15 a 25 minutos de incubación a 37°C y con un 5% de CO₂, se retiró la solución enzimática excepto 300 µl y los ganglios se disociaron mecánicamente en este volumen. Para ellos se utilizaron tres pipetas Pasteur estériles siliconadas con aberturas de pipeta de diferentes tamaños, que se prepararon bajo la llama de un mechero Bunsen. De este modo, mediante una reducción creciente del diámetro de abertura, se pudo preparar una suspensión celular uniforme de los ganglios espinales. Finalmente, la suspensión celular se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y la pella celular se resuspendió en ~ 1 ml CMF. Para enriquecer el cultivo con células neuronales, la suspensión celular se separó en capas a través de una columna BSA al 20% (20% BSA p/v en 0,5 ml medio CMF) y a continuación se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos. El medio se aspiró excepto ~ 100 µl y se resuspendió en 1 ml de medio fresco. Para ello se utilizó ya el medio de cultivo posterior (DMEM/FCS).

Preparación de los cultivos celulares en placas

Una vez determinada la cantidad de células, las células de ganglios espinales se distribuyeron en los recipientes de cultivo correspondientemente a su uso posterior y se cultivaron a 37°C y con un 5% de CO₂. Para el cultivo se utilizó un medio DMEM rico en glucosa con diferentes aditivos (composición exacta descrita bajo el apartado “Cultivo celular”). Además de glutamina y una mezcla de antibióticos, también se añadió el factor de crecimiento de tejido nervioso NGF 7S en una concentración de 25 ng/ml, ya que la supervivencia y la diferenciación de las neuronas neonatales del ganglio espinal dependen del NGF. También se añadió al medio citosin-arabinósido, un inhibidor de la mitosis, en una concentración de 10 µM para evitar una proliferación de las células no neuronales.

Las células de ganglios espinales dispuestas en placas se pudieron mantener en cultivo sin problemas hasta dos semanas cambiando el medio cada dos o tres días.

2.3 Cultivo celular de eucariotas

Cultivo y pasaje de células eucarióticas

Todas las líneas celulares se trataron en su medio de crecimiento correspondiente a 37°C en incubadora con una humedad relativa del aire del 95% y con un 5% de CO₂. Los medios y soluciones se calentaron a 37°C antes de su uso.

5 Las líneas celulares de crecimiento adherente (F-11, wt-PC12 MR-A, PC12 MR-B) se fraccionaron de forma rutinaria cada 4-6 días. Para ello se trataron durante unos minutos a 37°C con una solución de tripsina/EDTA (0,05% tripsina, 0,02% EDTA en PBS) (control microscópico). La tripsina es una enzima proteolítica que hidroliza los enlaces peptídicos de uniones célula-célula en los
10 que el grupo carbonilo está fijado por la lisina o la arginina. Unas pequeñas trazas de medio pueden influir negativamente en el efecto de la tripsina, por lo que fue necesario lavar las células con una solución salina fosfatada (PBS) libre de calcio y magnesio antes del tratamiento con tripsina. Posteriormente, la tripsina utilizada se inactivó mediante adición de medio conteniendo FCS. El
15 quelante EDTA se une al calcio, que es necesario para algunas uniones célula-célula.

Una vez disueltas las células, éstas se trasladaron en un medio conteniendo suero desde el recipiente de cultivo a un tubo Falcon. Después de centrifugar y aspirar el medio antiguo, las pellas celulares se resuspendieron en
20 5 ml de medio fresco y se dispusieron en placas en su medio de crecimiento en los recipientes de cultivo correspondientes.

En el caso de las células wt-PC12 se trata de células en suspensión. Para el pasaje, los recipientes de cultivo se colocaron inclinados, de modo que las células wt-PC12, que crecían en cúmulos en forma de uva, poco a poco se
25 fueron sedimentando en una esquina del recipiente. Se retiró el sobrenadante, en el que también se encontraban los detritus celulares más ligeros, y las células se trasladaron en un medio fresco a un tubo Falcon. A continuación, la suspensión se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se retiró y las células se dispusieron en placas en un medio de crecimiento fresco.

30 **Congelación de células eucarióticas**

Para el almacenamiento prolongado de las células, éstas se congelaron en un medio conteniendo DMSO en nitrógeno líquido, con el fin de protegerlas de los cambios genéticos y de reducir al mínimo el riesgo de contaminación. Sin la adición de reactivos que actúan como crioprotección de las células, la mayor
35 parte de las células de mamífero mueren con la congelación. La mortalidad de

las células se reduce al mínimo con DMSO en el medio, ya que disminuye el punto de congelación y de este modo se ralentiza el proceso de enfriamiento.

Después de su separación con una solución de tripsina/EDTA, las células primero se lavaron con PBS y luego se determinó la cantidad de células con ayuda de una cámara de recuento Neubauer. La cantidad de células a congelar se introdujo en un tubo Falcon y, después de centrifugación a 1.000 r.p.m., se desechó el sobrenadante. Finalmente, la pella celular se resuspendió en medio de congelación (90% medio de crecimiento, 10% DMSO) y se separó en partes alícuotas de 2 ml cada una (por ejemplo con 2 millones de células) en tubos Nunc. Los tubos se congelaron durante varias horas a -80°C en un criocongelador con una velocidad de enfriamiento de 1°C por minuto y a continuación se depositaron en nitrógeno líquido.

Revitalización de las células eucarióticas

En algunos casos se realizaron de nuevo cultivos con las células. Para ello, después de sacarlas del tanque de nitrógeno (-196°C), se calentaron rápidamente a 37°C en un baño de agua. Se retiró la suspensión celular, se trasladó a 5 ml de medio precalentado y se sedimentó en la centrifugadora (3 minutos, 200 x g). El medio se aspiró, la pella celular se resuspendió en medio fresco y se trasladó a una placa de cultivo celular. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se dispusieron en medio fresco.

Determinación de la cantidad de células

Para determinar la cantidad de células se utilizó una cámara de recuento Neubauer. Para ello se colocó una gota de la suspensión celular en la cámara de recuento Neubauer, se recontó bajo el microscopio la cantidad de células ($Z = \text{células} / 0,01 \text{ mm}^2$) de cuatro cuadrados, y se determinó la cantidad de células por ml (cantidad de células = $Z \times 2.500 = (\text{Amiri y col.})$).

Prueba de micoplasmas

Todas las líneas celulares se analizaron a intervalos regulares en cuando a la contaminación con micoplasmas. Los micoplasmas son bacterias inevitablemente parasitarias. Se trata de parásitos intracelulares sin pared, muy pequeños, y no se pueden reproducir independientemente de la célula huésped. Dado que sólo tienen una membrana celular, pero no una pared bacteriana de mureína, no tienen una forma fija y son insensibles a la penicilina. Su tamaño oscila entre 0,22 y 2 μm . Una filtración a través de una membrana con un

tamaño de poro de 0,1 μm permite realizar una separación de micoplasmas. El método más rápido para detectar las contaminaciones con micoplasmas consiste en la tinción del ADN de los micoplasmas con flurocromo DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato), que se une especialmente al ADN. Si un cultivo celular está contaminado con micoplasmas, se observan puntos fluorescentes independientes en el citoplasma y a veces también en el espacio intercelular.

Para la prueba de micoplasmas, una cantidad correspondiente de solución DAPI (1 mg/ml, 10 mg DAPI disueltos en 10 ml de agua, divididos en partes alícuotas y conservados a -20°C) se diluyó con metanol a una concentración de trabajo de 1 $\mu\text{g/ml}$ (estable durante aproximadamente 6 meses a 4°C). Para teñir las células, las células cultivadas sobre los cubreobjetos o placas Petri se lavaron una vez con la solución de trabajo y se incubaron durante 15 minutos a TA también con la solución de trabajo. A continuación se lavaron una vez con metanol y los cubreobjetos se evaluaron bajo el microscopio de fluorescencia después de su inclusión en una gota de glicerina o PBS.

Revestimiento de los recipientes de cultivo

En determinados ensayos, los recipientes de cultivo o los cubreobjetos se revistieron para lograr una mejor adherencia de las células. Como materiales de revestimiento se utilizaron poli-L-lisina (0,1 mg/ml) para las células wt-PC12 o poli-D-lisina (0,5 mg/ml) para el cultivo de cerebelo. Los recipientes de cultivo se incubaron durante al menos 2 horas a TA con poli-L-lisina o poli-D-lisina, a continuación se lavaron dos veces con H_2O y se conservaron a 4°C cubiertos con una capa de H_2O hasta su utilización. Mientras que los materiales revestidos con poli-L-lisina se utilizaron en húmedo, los materiales revestidos con poli-D-lisina no se utilizaron hasta después de secarlos bajo el banco estéril.

Transfección en células eucarióticas

Por el concepto “transfección” se entiende la introducción de ADN o ARN extraño en células eucarióticas mediante métodos físicos o químicos. El método químico más importante para la transferencia de ácidos nucleicos es la lipofección: reactivos de lípidos catiónicos forman en solución acuosa, bajo condiciones óptimas, liposomas unilaminares pequeños (100 - 400 nm). La superficie de estos liposomas tiene carga positiva y es atraída electrostáticamente tanto por el esqueleto fosfato de los ácidos nucleicos como

por la membrana celular, que tiene carga negativa (Garels y col., 1991; Gershon y col., 1993; Smith y col., 1993). Los ácidos nucleicos no están encerrados dentro de los liposomas, sino que se unen espontáneamente a los liposomas con carga positiva y forman complejos de ADN/ARN-lípido (Felgner y col., 5 1987). Existen indicios de que la absorción de los complejos se desarrolla por vía endosomal o liposomal (Coonrod y col., 1997).

Transfección de ADN mediante Lipofectamine™ 2000

Para la transfección de ADN en células eucarióticas se utilizó principalmente el reactivo lipídico catiónico Lipofectamine™ 2000 (LF2000™) y se observaron las siguientes recomendaciones generales del fabricante 10 Invitrogen:

Para preparar los complejos de ADN-LF2000™ se recomendaba una relación entre el ADN y el LF2000™ de 1:2 a 1:3. Además, en el momento de la transfección debía haber una densidad celular del 90-95% para alcanzar una 15 alta eficiencia y un alto nivel de expresión. Durante la transfección se prescindió de la adición de antibióticos, ya que éstos provocarían la muerte celular. Para optimizar la eficiencia de transfección se llevan a cabo transfecciones bajo diferentes condiciones con un vector de EGFP. Para medir la eficiencia de transfección se calculó semicuantitativamente la expresión proteínica de la 20 proteína de fluorescencia verde GFP mediante microscopía de fluorescencia.

Transfección de ADN en células wt-PC12

El día de la transfección se dispusieron $2,5 \times 10^5$ células wt-PC12 en 0,5 ml de medio sobre cubreobjetos revestidos con poli-L-lisina en una placa de 24 pocillos. El medio consistía en el medio de crecimiento normal para células wt- 25 PC12, pero sin adición de antibióticos. Para cada pocillo a transfectar se disolvieron 0,8 - 1 µg de ADN en 50 µl de OPTI-MEM®. Además, para cada pocillo se disolvieron 1 - 2 µl de LF2000™ en 50 µl de OPTI-MEM® y la solución se incubó durante 5 minutos a TA. Después, el ADN disuelto se mezcló con la solución de LF2000™ diluida y se incubó durante 20 minutos a TA para formar 30 los complejos de ADN-LF2000™, y a continuación se añadieron 100 µl de los complejos directamente a los pocillos correspondientes, que se mezclaron cuidadosamente por agitación. Las células se mantuvieron en cultivo bajo condiciones normales y en el mismo medio durante otras 24 - 72 horas hasta el análisis de la expresión.

Transfección de ADN en células de ganglios espinales

Para la transfección se utilizaron 5×10^5 células de la suspensión de DRG recién purificada, que se dispusieron en una placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos revestidos con poli-L-lisina en 0,5 ml de medio de crecimiento sin
5 adición de antibiótico. Para cada pocillo a transfectar se disolvieron 0,8 - 1 μg de ADN en 50 μl de OPTI-MEM®. Además, para cada pocillo se disolvieron 1 - 2 μl de LF2000™ en 50 μl de OPTI-MEM® y la solución se incubó durante 5 minutos a TA. Después, el ADN disuelto se mezcló con la solución de LF2000™ diluida y se incubó durante 20 minutos a TA para formar los complejos de ADN-
10 LF2000™, y a continuación se añadieron 100 μl de los complejos directamente a los pocillos correspondientes, que se mezclaron cuidadosamente por agitación. Las células se mantuvieron en cultivo bajo condiciones normales y en el mismo medio durante otras 24 - 72 horas hasta el análisis de la expresión.

Transfección de ARNsi

15 Las transfecciones de ARNsi en las células eucarióticas se llevaron a cabo mediante Lipofectamine™ 2000. La F2000™ ya ha sido utilizada con éxito por otros grupos para experimentos con ARNi en células de mamíferos (Gitlin y col., 2002; Yu y col., 2002). Como en el caso de la transfección de ADN, las condiciones de transfección óptimas se tuvieron que determinar
20 experimentalmente. Para ello se utilizó ARNsi marcado con Cy3.

Transfección de ARNsi en células wt-PC12

El día de la transfección se dispusieron $2,5 \times 10^5$ células wt-PC12 en 0,5 ml de medio sobre cubreobjetos revestidos con poli-L-lisina en una placa de 24 pocillos. El medio consistía en el medio de crecimiento normal para células wt-
25 PC12, pero sin adición de antibióticos. Para cada pocillo a transfectar se disolvieron 20 - 100 pmol de ARNsi en 50 μl de OPTI-MEM®. Además, para cada pocillo se disolvieron 1 - 2 μl de LF2000™ en 50 μl de OPTI-MEM® y la solución se incubó durante 5 minutos a TA. Después, el ARNsi disuelto se mezcló con la solución de LF2000™ diluida y se incubó durante 20 minutos a TA
30 para formar los complejos de ADN-LF2000™, y a continuación se añadieron 100 μl de los complejos directamente a los pocillos correspondientes, que se mezclaron cuidadosamente por agitación. Las células se mantuvieron en cultivo bajo condiciones normales y en el mismo medio durante otras 24 - 72 horas hasta el análisis de la expresión.

Transfección de ARNsi en células de las líneas PC12 MR-A y PC12 MR-B

El día de la transfección se dispusieron $2,5 \times 10^5$ células PC12 en 0,5 ml de medio sobre cubreobjetos en una placa de 24 pocillos. El medio consistía en el medio de crecimiento normal para células PC12 MR-A/B, pero sin adición de
5 antibióticos. Para cada pocillo a transfectar se disolvieron 20 - 200 pmol de ARNsi en 50 μ l de OPTI-MEM®. Además, para cada pocillo se disolvieron 1 - 2 μ l de LF2000™ en 50 μ l de OPTI-MEM® y la solución se incubó durante 5 minutos a TA. Después, el ARNsi disuelto se mezcló con la solución de LF2000™
10 de ADN-LF2000™, y a continuación se añadieron 100 μ l de los complejos directamente a los pocillos correspondientes, que se mezclaron cuidadosamente por agitación. Las células se mantuvieron en cultivo bajo condiciones normales y en el mismo medio durante otras 24 - 72 horas hasta el análisis de la expresión.

Transfección de ARNsi en células de los cultivos primarios de DRG

15 Para la transfección se utilizaron 5×10^5 células de la suspensión de DRG recién purificada, que se dispusieron en una placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos revestidos con poli-L-lisina en 0,5 ml de medio de crecimiento sin adición de antibiótico. Para cada pocillo a transfectar se disolvieron 10 - 200 pmol de ARNsi en 50 μ l de OPTI-MEM®. Además, para cada pocillo se
20 disolvieron 1 - 2 μ l de LF2000™ en 50 μ l de OPTI-MEM® y la solución se incubó durante 5 minutos a TA. Después, el ARNsi disuelto se mezcló con la solución de LF2000™ diluida y se incubó durante 20 minutos a TA para formar los complejos de ADN-LF2000™, y a continuación se añadieron 100 μ l de los complejos directamente a los pocillos correspondientes, que se mezclaron
25 cuidadosamente por agitación. Las células se mantuvieron en cultivo bajo condiciones normales y en el mismo medio durante otras 24 - 72 horas hasta el análisis de la expresión.

Estudio de toxicidad

Para analizar la influencia citotóxica de los reactivos de transfección
30 LF2000™ en las células se llevó a cabo un ensayo con azul de triptano. Para ello, 24 horas antes de la transfección se dispusieron $3,0 \times 10^4$ células en una placa de 24 pocillos. La transfección se llevó a cabo con controles ARNsi-negativos y diferentes cantidades de reactivos de transfección. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, todas las células se lavaron con PBS y se

tiñeron con un 10% de azul de triptano. La tasa de supervivencia se calculó de la siguiente manera:

Tasa de vitalidad = (cantidad total de células - cantidad de células teñidas) / cantidad total de células x 100.

5 Fijación de las células

Las células se fijaron bien con paraformaldehído al 3 - 4% (v/v) en PBS durante 20 minutos a TA, bien con metanol (-20°C) durante 15 minutos a TA.

2.4 Microbiología

Para la amplificación de los fragmentos de ADN de doble hebra se utilizaron bacterias competentes. Para ello, el ADN a amplificar se incorporó en plásmidos con marcadores de selección y se transformó en bacterias. Las bacterias se dispusieron sobre placas de agar selectivas, se tomaron los clones correspondientes y se cultivaron en medio LB conteniendo antibiótico. Más adelante se aislaron los plásmidos con inserción de las bacterias reproducidas y se continuó su procesamiento.

Preparación de células competentes para transformación

Un tratamiento con solución helada de cloruro de calcio y magnesio capacita a las bacterias para la absorción espontánea de ADN extraño (transformación). Para preparar las células bacterianas competentes se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 α o XL-1 blue. Para ello se realizó un cultivo de las células en medio TYM (medio LB + MgSO₄ 10 mM) y éste se incubó hasta que se alcanzó una densidad suficiente (OD_{600nm} = 0,4 - 0,6). Las células se debían encontrar en la fase log. Después de centrifugación breve y de desechar el sobrenadante, la pella se resuspendió en 40 ml de tampón Tfb1 (KAc 30 mM, MgCl₂ 50 mM x 2H₂O, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM x 2H₂O, 15% glicerol) por 100 ml de cultivo. Después de 45 minutos de incubación sobre hielo, las células se pelletizaron de nuevo y se recogieron en 1/10 volumen de tampón Tfb2 (Na-MOPS 10 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM x 2H₂O, 15% glicerol). Las células competentes se conservaron a -70°C en partes alícuotas de 100 μ l hasta su utilización.

Transformación de *E. coli*

Las bacterias competentes (aproximadamente 10⁸ clones por μ g de ADN-plásmido) se mezclaron con ADN-plásmido, se dispusieron sobre hielo durante

45 minutos y se incubaron apenas 1 minuto a 42°C. Después se añadió medio LB (Sambrook y col., 1989) y la mezcla se incubó bajo agitación durante otros 30 minutos a 37°C. Las bacterias se aislaron sobre placas de agar selectivas (Sambrook y col., 1989) y se incubaron durante una noche a 37°C. Se inocularon cultivos previos (5 ml de medio LB con un antibiótico adecuado) con colonias aisladas y se agitaron durante varias horas a 37°C. Se inocularon cultivos preparativos (100 ml de LB con un antibiótico adecuado) 1:1.000 con los cultivos previos y se incubaron a lo largo de una noche a 37°C.

Aislamiento analítico de plásmidos

10 Para aislar los plásmidos de las bacterias, éstas han de ser sometidas a lisis. A continuación, los plásmidos se separan de las proteínas y el ADN bacteriano genómico por centrifugación. La purificación de los plásmidos se llevó a cabo por cromatografía en columna con *kits* de QIAGEN comerciales.

15 Las bacterias se pelletizaron por centrifugación durante 5 minutos a 5.000 x g, el sobrenadante se desechó y la pella se resuspendió en 250 µl de tampón P1. Las bacterias se sometieron a lisis mediante la adición de 250 µl de tampón P2 y la solución se neutralizó mediante la adición de otros 350 µl de tampón N3. A continuación, la mezcla se centrifugó durante otros 10 minutos (siempre que no se indique otra cosa, los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a 20 velocidad máxima), el sobrenadante se retiró con cuidado y se trasladó a una columna QIAprep. Después de 1 minuto de centrifugación, la columna se lavó con 750 µl de tampón PE y de nuevo se llevó a cabo una centrifugación de 1 minuto. La elución del ADN-plásmido en un recipiente colector limpio se llevó a 25 cabo mediante adición de 30 - 50 µl de H₂O a la columna y centrifugación final durante 1 minuto. Una cantidad de 5 a 10 µl de esta carga se analizó mediante digestión de restricción y electroforesis subsiguiente en gel de agarosa para el control de calidad.

Aislamiento cuantitativo de plásmidos

30 Con ayuda del Qiagen Plasmid Maxi Kit se aislaron cantidades mayores de ADN plásmido con un alto grado de pureza para la realización de transfecciones. Durante el día se preparó un cultivo previo, es decir, una colonia bacteriana se inoculó en 3 ml de medio LB conteniendo ampicilina y se cultivó durante aproximadamente siete horas en la incubadora de agitación a 37°C. Este cultivo previo se trasladó después a 500 ml de medio LB y la mezcla se 35 agitó durante una noche a 37°C. A la mañana siguiente, la suspensión

bacteriana se centrifugó a 4°C a una velocidad de 3.000 r.p.m. La pella bacteriana resultante se utilizó para el aislamiento de plásmidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de recoger la pella de ADN en H₂O estéril se determinó la
5 concentración por fotometría y la calidad del ADN se comprobó mediante digestión de restricción y electroforesis subsiguiente en gel de agarosa.

2.5 Métodos biológicos moleculares

2.5.1 Ácidos nucleicos

Purificación de ADN

10 Con el fin de enriquecer los ácidos nucleicos de soluciones acuosas diluidas o para limpiarlos de sustancias no precipitables se puede llevar a cabo una salificación y precipitación subsiguiente en alcohol o una purificación en columnas de gel de sílice (QIAGEN). Una ventaja del primer método consiste por ejemplo en la posibilidad de concentrar los ácidos nucleicos en la recogida
15 en el producto de elución después del secado. Una ventaja de la purificación mediante columnas consiste en la facilidad de manejo.

Precipitación de ADN

A la solución de ADN se añadió una mezcla 1/10 en volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 3 volúmenes de etanol 100% y se conservó a -20°C
20 durante al menos 4 horas. A continuación, la mezcla se centrifugó a -4°C a 13.000 x g durante 30 minutos, el sobrenadante se desechó y la pella se resuspendió mediante adición de 500 µl de etanol 70% (-20°C). Después de otro paso de centrifugación durante 10 minutos (10 minutos, 13.000 x g, 4°C), el sobrenadante se desechó y la pella se secó durante 10 minutos en la trampa fría
25 previamente enfriada y finalmente se disolvió en una cantidad correspondiente de agua.

Purificación del ADN amplificado por PCR con el QIAGEN PCR Purification Kit

La mezcla de PCR se diluyó en 5 volúmenes de tampón PB y después de
30 entremezclar a fondo esta combinación se trasladó a la columna y se centrifugó durante 1 minuto. En la columna se introdujeron 500 µl de tampón de lavado PE y de nuevo se llevó a cabo una centrifugación. Los productos de amplificación

de ADN ligados se sometieron a elución en un recipiente colector limpio mediante adición de 30 - 50 µl de agua en la columna y centrifugación.

Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa con el QIAGEN Gel Extraction Kit

- 5 La banda de gel de agarosa con el ácido nucleico a aislar se recortó y se pesó y se añadió una cantidad correspondiente de tampón QX1 (3 volúmenes del peso del gel). El gel se disolvió con 10 minutos de incubación a 50°C y la solución se trasladó a una columna y se centrifugó. Después de una adición de 750 µl de tampón de lavado PE y centrifugación subsiguiente, el ácido nucleico
- 10 ligado se sometió a elución en un recipiente colector limpio mediante adición de 30 - 50 µl de agua en la columna y centrifugación posterior.

Aislamiento y purificación de ARN

- Para los análisis de expresión mediante RT-PCR se extrajo ARN de tejidos o de células. La extracción se llevó a cabo mediante el método de
- 15 TRizol-cloroformo con *kits* de aislamiento de ARN correspondientes de QIAGEN o de Roche.

Extracción del ARN mediante reactivo TRizol

- En el caso de la purificación de ARN de tejido, los fragmentos de tejido (< 100 mg) se pesaron y, después de añadir 1 ml de reactivo TRizol, se
- 20 homogeneizaron con un Glaspotter. En el caso de la purificación de ARN de células cultivadas se añadió 1 ml de reactivo TRizol para placas de cultivo monocapa de 3,5 cm² o 1 ml de reactivo TRizol para cultivo en suspensión centrifugada (5 - 10 x 10⁶ células) directamente sobre las células y la mezcla se homogeneizó recogiénola y soltándola con la pipeta. La mezcla de TRizol se
- 25 incubó durante aproximadamente 5 minutos a TA. Después de añadir 20 µl de cloroformo, la mezcla se agitó intensamente, se incubó durante otros 5 minutos y finalmente se centrifugó (20 minutos, 12.000 x g, 4°C), con lo que se formaron tres fases: (a) ARN en la fase acuosa superior, (b) ADN en la interfase media y (c) proteína en la fase orgánica inferior.

- 30 La fase acuosa se retiró con cuidado, sin tocar la interfase, y se mezcló con 100 µl de isopropanol al 100%. Después de un breve tratamiento en Vortex se llevó a cabo una incubación durante 10 minutos y a continuación una centrifugación (10 minutos, 16.000 x g, 4°C). El sobrenadante se desechó y la pella se lavó con 1 ml de etanol 70% (-20°C) y se pelletizó de nuevo (10

minutos, 12.000 x g, 4°C). El sobrenadante se desechó y la pella se secó en la trampa fría previamente enfriada. Por último, el ARN se disolvió en un volumen cualquiera de agua y se conservó a -80°C.

Extracción de ARN mediante el QIAGEN RNeasy Mini Kit

5 A la pella celular (aproximadamente 5×10^6 células) se añadieron 350 µl de tampón RLT y la pella celular se homogeneizó en columnas QIAGEN Shredder. Después de añadir 350 µl de etanol 70% y agitar la suspensión intensamente, ésta se trasladó a la columna y se centrifugó (30 segundos a 8.000 x g). El lavado de la columna se llevó a cabo por adición de 700 µl de
10 tampón RW1 y centrifugación (30 segundos a 8.000 x g). A continuación se realizaron dos lavados por adición de 500 µl de tampón RPE en cada caso y una centrifugación (30 segundos, 8.000 x g). Luego se secó la columna por centrifugación (2 minutos, 12.000 r.p.m.). El ARN ligado se sometió a elución mediante adición de 30 - 50 µl de agua y centrifugación (1 minutos a 8.000 x g).

15 Tratamiento con ADNasa-I

Para excluir la posibilidad de que el ARN purificado estuviera contaminado con ADN, la solución de ARN se trató enzimáticamente con ADNasa-I. Para ello, 50 µl de ARN se mezclaron con 4 µl de ADNasa-I y 6 µl de 10x tampón de transcripción y la mezcla se incubó durante 30 - 45 minutos a
20 37°C. A continuación se llevó a cabo una purificación del ARN mediante columnas QIAGEN RNeasy Mini.

Digestión de restricción

La digestión por restricción sirve para comprobar si un plásmido también contiene la inserción deseada. Ésta se puede separar mediante la digestión y se
25 puede identificar en función de su tamaño. Las digestiones de restricción se llevaron a cabo con enzimas y tampones de reacción de las firmas GibcoBRL/Eggenstein y Boehringer/Mannheim. Para ello, 1 µg de ADN plásmido se digirió en un volumen total de 20 µl. El tiempo de incubación fue de 1 a 2 horas a una temperatura correspondiente a la temperatura óptima de la enzima.

30 Cuantificación de los ácidos nucleicos

El registro de la concentración se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro de UV. La concentración se calculó a partir de la absorción a una longitud de onda λ específica (260 nm para ARN, oligonucleótidos y ADN).

$A = d \times e \times c$ (A = absorción; d = espesor de capa; e = constante de materia; c = concentración).

Una OD_{260} igual a 1 corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN, 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN o 30 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótido. La medición se realizó en
5 cubetas de cuarzo, que entre una medición y otra se lavaron a fondo con agua pasada por el autoclave.

Modelos de ADN-oligonucleótido para la preparación de ARNsi

Los modelos de oligonucleótido (ONV) se diluyeron en agua libre de nucleasas hasta una concentración final 200 μM y se midió la absorción A a 260
10 nm de una dilución 1:250. Con ayuda de la absorción medida se calcula la concentración de ONV B en $\mu\text{g/ml}$ y B' en μM :

$$A \times 5.000 = B [\mu\text{g/ml}]$$

(5.000 = dilución en un factor 250 x 20 μg de oligo / ml / unidad de absorción)

$$B [\mu\text{g/ml}] / 9,7 = B' [\mu\text{M}]$$

15 (29 nt x 0,333 $\mu\text{g/nmol}$ para cada nt = 9,7 $\mu\text{g/nmol}$)

ARNsi

Para cuantificar las soluciones de ARNsi se midió la absorción A a 260 nm de una dilución 1:25. Con ayuda de la absorción medida se calcula la concentración de ARNsi B en $\mu\text{g/ml}$ y B' en μM :

20 $A \times 1.000 = B [\mu\text{g/ml}]$

(1.000 = dilución en un factor 25 x 40 μg de ARNsi / ml / unidad de absorción)

$$B [\mu\text{g/ml}] / 14 = B' [\mu\text{M}]$$

(21 nt x 2 cadenas = 42 nt x 0,333 $\mu\text{g/nmol}$ para cada nt = 14 $\mu\text{g/nmol}$)

Control de calidad mediante electroforesis en gel de agarosa

25 Para la separación del ADN plásmido, el ADN plásmido digerido por restricción, los productos de PCR y ARN se utilizaron geles de agarosa TAE al 1 - 2 por ciento con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo en 1x tampón TAE (véase 2.1.3). Las muestras y 1 μg de marcadores de tamaño (“escalera de ADN 100 pb” “escalera de ADN 1 kb”) se mezclaron a 1/6

con un volumen de tampón de muestra y se separaron a 10 v/cm. Mediante el colorante intercalador bromuro de etidio, el ADN o ARN se hizo visible a la luz UV y se pudo documentar fotográficamente. Para evitar la degeneración durante la electroforesis de ARN, en primer lugar le limpió con etanol tanto la cámara
5 como el peine, y se preparó tampón de carrera fresco con DEPC-H₂O pasado por autoclave.

2.5.2 Reacción en cadena de polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR)

En la transcripción inversa se realiza una transcripción de ARN en ADNc.
10 Como lugar de aplicación de la transcriptasa inversa se utilizan por ejemplo cebadores oligo(dT)₁₅₋₁₈, que se unen específicamente a la cola poli-A del ARNm. Dependiendo del material de partida se mezclaron 0,5 - 2,5 µg de ARN (disueltos en 11 µl de agua) con 1 µl de oligo(dT)₁₅₋₁₈ 100 nM y la mezcla se desnaturalizó durante 10 minutos a 70°C. Después de enfriar a 4°C, se llevó a
15 cabo una adición de 4 µl tampón 5x RT, 2 µl DTT 2 µl, 1 µl mezcla dNTP 10 mM, 1 µl ARNsin y 1 µl Superscript™ II (200 u/µl) y una incubación a 42°C durante 1 hora. El ADNc se conservó a -20°C hasta su uso.

2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Con la reacción en cadena de polimerasa (PCR), desarrollada en 1987,
20 es posible realizar enzimáticamente *in vitro* millones de copias de determinadas secuencias de nucleótidos (Saiki y col., 1988). Este proceso, denominado amplificación, también permite analizar cantidades muy pequeñas de ADN. Para una reacción de PCR se preparó la siguiente carga de reacción:

	10x tampón	2,5	µl	(1x)
25	MgCl ₂ (25 mM)	3	µl	(3 mM)
	dNTPs (10 mM)	0,5	µl	(0,2 mM)
	Mezcla de cebadores (2 µM)	5	µl	(0,4 µM)
	ADNc/ARN	1	µl	
	Ampli-Taq polimerasa (5 u/µl)	0,1	µl	(0,5 U)
30	H ₂ O	12,9	µl	

La concentración óptima de $MgCl_2$ y la cantidad de ciclos de amplificación se determinaron individualmente para cada par de cebadores (la secuencia, la posición y el tamaño de cada amplímero están presentados bajo (0)). Antes de comenzar se llevó a cabo una desnaturalización a $94^\circ C$ durante 1 minuto y cada paso individual de un ciclo duró 20 segundos. Se utilizó el Thermozykler PTC-200 (MJ REsearch).

PCR estándar:

	95°C	2 minutos	
	95°C	30 segundos	40 x
10	57°C	30 segundos	
	70°C	30 segundos	
	70°C	5 minutos	
	+4°C	∞	

2.5.4 Ligación

Las ligaciones se realizaron con la T4 ADN ligasa (Promega). La T4 ADN ligasa es una enzima que une entre sí los extremos 3' y 5' de ADN lineal de forma covalente dependiente de la energía (ATP). En el caso de los salientes con extremos cohesivos ('cohesive-ended') se consume mucha menos energía que en los salientes con extremos romos ('blunt-ended'). Por ello, en el caso de los extremos cohesivos se realizó la ligación durante 1 hora a temperatura ambiente; en cambio, en los productos de PCR o ADN sin salientes se realizó la ligación durante una noche a $4^\circ C$. Como plásmido se utilizó el vector pGEM-T.

Bibliografia

- Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296, 1270-1273.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S.,
5 Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., y col. (2000). Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74, 2622-2625.
- Amiri, A., Keiper, B. D., Kawasaki, I., Fan, Y., Kohara, Y., Rhoads, R. E., and
10 Strome, S. (2001). An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* 128, 3899-3912.
- Andres, K. H. (1961). Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. *Z Zellforsch* A55, 1-48.
- Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P., and Amara, S. G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride
15 conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4155-4160.
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P., and Amara, S. G. (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 14, 5559-5569.
- Baccei, M. L., Bardoni, R., and Fitzgerald, M. (2003). Development of
20 nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *J Physiol* 549, 231-242.
- Bai, L., Xu, H., Collins, J. F., and Ghishan, F. K. (2001). Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 276, 36764-36769.
- 25 Bai, L., Zhang. X., and Ghishan, F. K. (2003). Characterization of vesicular glutamate transporter in pancreatic alpha- and beta -cells and its regulation by glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G808-814.
- Banerjea, A., Li, M. J., Bauer, G., Remling, L., Lee, N. S., Rossi, J., and Akkina, R. (2003). Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs In T
30 lymphocytes differentiated in SCIDhu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* 8, 62-71.

- Baranauskas, G., and Nistri, A. (1998). Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 54, 349-365.
- Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14943-14945.
- 5 Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235-238.
- Bellocchio, E. E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V. M., and Edwards, R. H. (1998). The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* 10 18, 8643-8659.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Fremeau, R. T., Jr., and Edwards, R. H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957-960.
- Bender, A. S., Reichelt, W., and Norenberg, M. D. (2002a). Characterization of 15 cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 37, 269-276.
- Bender, F. L. P., Mederos y Schnitzler, M., Li, Y., Ji, A., Weihe, E., Gudermann, T., and Schafer, M. K.-H. (2002b). Expression and functional characterization of the vanilloid receptor-like TRP channel VRL-1 in the primary sensory cell line F-11. 2002 Abstract Viewer Itinerary *Planner Program No. 48.23*.
- 20 Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Boland, L. M., and Dingledine, R. (1990). Expression of sensory neuron antigens by a dorsal root ganglion cell line, F-11. *Brain Res Dev Brain Res* 51, 259-266.
- 25 Bothwell, M. A., Schechter, A. L., and Vaughn, K. M. (1980). Clonal variants of PC12 pheochromocytoma cells with altered response to nerve growth factor. *Cell* 21, 857-866.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- 30 Burger, P. M., Mehl, E., Cameron, P. L., Maycox, P. R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P., and Jahn, R. (1989). Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high level of glutamate. *Neuron* 7, 287-293.

- Bushman, F. (2003). RNA interference: applications in vertebrates. *Mol Ther* 7, 9-10.
- Calderon-Martinez, D., Garavito, Z., Spinel, C., and Hurtado, H. (2002). Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique
5 combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C). *J Neurosci Methods* 114, 1-8.
- Carlton, S. M., Zhou, S., and Coggeshall, R. E. (1998). Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. *Brain Res* 790, 160-169.
- 10 Carrigan, C. N., Bartlett, R. D., Esslinger, C. S., Cybulski, K. A., Tongcharoensirikul, P., Bridges, R. J., and Thompson, C. M. (2002). Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular Glutamate transport. *J Med Chem* 45, 2260-2276.
- Casey, B. P., and Glazer, P. M. (2001). Gene targeting via triple-helix formation.
15 *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 67, 163-192.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., and Julius, D. (1999). A capsaicin receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D.,
20 and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- Chen, L., and Huang, M. L.-Y. (1992). Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356, 521-523.
- Chong, S. S., Kristjansson, K., Zoghbi, H. Y., and Hughes, M. R. (1993).
25 Molecular cloning of the cDNA encoding a human renal sodium phosphate transport protein and its assignment to chromosome 6p21.3-p23. *Genomics* 18, 355-359.
- Coburn, G. A., and Cullen, B. R. (2002). Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 76, 9225-
30 9231.
- Coonrod, A., Li, F. Q., and Horwitz, M. (1997). On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* 4, 1313-1321.

- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., y col. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**, 183-187.
- 5 Devroe, E., and Silver, P. A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* **2**, 15.
- Disbrow, J., Gershten, M., and Ruth, J. (1982). Uptake of L-[3H]glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **108**, 1221-1227.
- 10 Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003), siRNAs can function as miRNA. *Genes Dev* **17**, 438-442.
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., and Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 457-467.
- Eggert, C., and Fischer, U. (2003). RNA-Interferenz: Ein Werkzeug zur Analyse
15 der Genfunktion. *BIOspektrum* **9**, 372-274.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene
20 function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199-213.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001 b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**, 6877-6888.
- 25 Erdreich-Epstein, A., and Shackleford, G. M. (1998). Differential expression of Wnt genes in normal and flat variants of PC12 cells, a cell line responsive to ectopic Wnt1 expression. *Growth Factors* **15**, 149-158.
- Fagg, G. E., and Foster, A. C. (1983). Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian brain. *Neuroscience* **9**, 701-719.
- 30 Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., and Amara, S. G. (1995). An excitatory aminoacid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**, 599-603.

- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNAtransfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417.
- 5 Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: A neurotransmitter in the mammalian brain. *J Neurochem* 42.
- 10 Forth, W., Henschler, D., and Rummel, W. (2001). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8 ed n (Munich - Jena, Editorial Urban & Fischer).
- Francel, P. C., Harris, K., Smith, M., Fishman, M. C., Dawson, G., and Miller, R. J. (1 987). Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11. *J Neurochem* 48, 1624-1631.
- 15 Fremeau, R. T., Jr., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C. H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., y col. (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14488-14493.
- 20 Fremeau, R. T., Jr., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., and Edwards, R. H. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31, 247-260.
- Gareis, M., Harrer, P., and Bertling, W. M. (1991). Homologous recombination of exogenous DNA fragments with genomic DNA in somatic cells of mice. *Cell Mol Biol* 37, 191-203.
- 25 Gasnier, B. (2000). The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82, 327-337.
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B., and Minsky, A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 32, 7143-7151.
- 30

- Gil, J., and Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanisms of action. *Apoptosis* 5.
- Gitlin, L., Karelsky, S., and Andino, R. (2002). Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418, 430-434.
- 5 Gonzalez, M. P., Herrero, M. T., Vicente, S., and Oset-Gasque, M. J. (1998). Effect of glutamate receptor agonists on catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *Neuroendocrinology* 67, 181-189.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2002). A third vesicular glutamate
10 transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22, 5442-5451.
- Greene, G. C. (1949). *Gross anatomy in the rat in laboratory investigation.* (Philadelphia, J. B. Lippincott Company).
- Greene, L.A., and Rein, G. (1977). Release, storage and uptake of
15 catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor responsive pheochromocytoma cells. *Brain Res* 129, 247-263.
- Greene, L.A., and Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
- 20 Grothe, C., and Unsicker, K. (1987). Neuron-enriched cultures of adult rat dorsal root ganglia: establishment, characterization, survival, and neuropeptide expression in response to trophic factors. *J Neurosci Res* 18, 539-550.
- Grunweller, A., Wyszko, E., Bieber, B., Jahnel, R., Erdmann, V. A., and Kurreck, J. (2003). Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using
25 locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 31, 3185-3193.
- Grynfeld, A., Pahlman, S., and Axelson, H. (2000). Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int J Cancer* 88, 401-410.
- 30 Guerrero, I., Pellicer, A., and Burstein, D. E. (1988). Dissociation of c-fos from ODC expression and neuronal differentiation in a PC12 subline stably

- transfected with an inducible N-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 150,1185-1192.
- Guerrero, I., Wong, H., Pellicer, A., and Burstein, D. E. (1986). Activated N-ras gene induces neuronal differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Cell Physiol* 129, 71-76.
5
- Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 61 1-620.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
10
- Hayashi, M., Otsuka, M., Morimoto, R., Hirota, S., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2001). Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic system s. *J Biol Chem* 276, 43400-43406.
15
- Hayashi, M., Yamada, H., Uehara, S., Morimoto, R., Muroyama, A., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2003). Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278, 1966-1974.
- Hemann, M. T., Fridman, J. S., Zilfou, J. T., Hernando, E., Paddison, P. J., Cordon-Cardo, C., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003). An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet* 33, 396-400.
20
- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21, RC181.
25
- Hioki, H., Fujiyama, F., Taki, K., Tomioka, R., Furuta, T., Tamamaki, N., and Kaneko, T. (2003). Differential distribution of vesicular glutamate transporters in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 117, 1-6.
30
- Hisano, S., Sawada, K., Kawano, M., Kanemoto, M., Xiong, G., Mogi, K., Sakata-Haga, H., Takeda, J., Fukui, Y., and Nogami, H. (2002). Expression of inorganic phosphatelvesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2)

- in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 23-31.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E., and Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30, 1757-1766.
- 5
- Hu, W. Y., Myers, C. P., Kilzer, J. M., Pfaff, S. L., and Bushman, F. D. (2002). Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr Biol* 12, 1301-1311.
- Huber, K., Brühl, B., Guillemont, F., Olson, E. N., Ernsberger, U., and Unsicker, K. (2002a). Development of chromaffin cells depends on MASH1 function. *Development* 129, 4729-4738.
- 10
- Huber, K., Combs, S., Ernsberger, U., Kalcheim, C., and Unsicker, K. (2002b). Generation of neuroendocrine chromaffin cells from sympathoadrenal preogenitors: beyond the glucocorticoid hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 971, 554-549.
- 15
- Hunt, S. P., and Mantyh, P. W. (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neuroscience* 2, 83-91.
- Israel, M., Tomasi, M., Bostel, S., and Meunier, F. M. (2001). Cellular resistance to Evans blue toxicity involves an up-regulation of a phosphate transporter implicated in vesicular glutamate storage. *J Neurochem* 78, 658-663.
- 20
- Issack, P. S., and Ziff, E. B. (1998a). Altered expression of helix-loop-helix transcriptional regulators and cyclin D1 in Wnt-1-transformed PC12 cells. *Cell Growth Differ* 9, 837-845.
- Issack, P. S., and Ziff, E. B. (1998b). Genetic elements regulating HES-1 induction in Wnt-1-transformed PC12 cells. *Cell Growth Differ* 9, 827-836.
- 25
- Jacque, J. M., Triques, K., and Stevenson, M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418, 435-438.
- Jahn, R., and Südhof, T. C. (1993). Synaptic vesicle traffic: rush hour in the nerve terminal. *J Neurochem* 61, 12-21.
- 30
- Jimenez, A. L., Chou, A. H., Khadadadi, O., Palos, T. P., and Howard, B. D. (2003). Wnt-1 has multiple effects on the expression of glutamate transporters. *Neurochem Int* 42, 345-351.

- Jogi, A., Persson, P., Grynfeld, A., Pahlman, S., and Axelson, H. (2002). Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 277, 9118-9126.
- Jue, S. F., Bradlev. R. S., Rudnicki, J. A., Varmus, H. E., and Brown, A. M. 5 (1992). The mouse Wnt-1 gene can act via paracrine mechanism in transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 12, 321-328.
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., y col. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 10 421, 231-237.
- Kanai, Y., and Hediger, M. A. (1992). Primary structure and functional characterization of a highaffinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467-471-
- Kaneko, T., and Fujiyama, F. (2002). Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res* 42, 243-250.
- 15 Kapadia, S. B., Brideau-Andersen, A., and Chisari, F. V. (2003). Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2014-2018.
- Katoh-Semba, R., Oohira, A., Sano, M., Watanabe, K., Kitajima, S., and Kashiwamata, S. (1989). Glycosaminoglycan composition of PC12 20 pheochromocytoma cells: a comparison with PC12D cells, a new subline of PC12 cells. *J Neurochem* 52, 889-895.
- Keck, J. L., Roche, D. D., Lynch, A. S., and Berger, J. M. (2000). Structure of the RNA polymerase domain of *E. coli* primase. *Science* 287, 2482-2486.
- Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (2000). Heritable gene silencing in 25 *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 18, 896-898.
- Kish, P. E., Fischer-Bovenkerk, C., and Ueda, T. (1989). Active transport of GABA and glycine into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3877-3881.
- Kobayashi, S., and Millhorn, D. E. (2001). Hypoxia regulates glutamate 30 metabolism and membrane transport in rat PC12 cells. *J Neurochem* 76, 1935-1948.

- Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsan i, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 500-505.
- Lee, R. Y., Sawin, E. R., Chalfie, M., Horvitz, H. R., and Avery, L. (1999). EAT-4, a homolog of a mammalian sodiumdependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 19, 159-167.
- Levy, L. M., Warr, O., and Attwell, D. (1998). Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 18, 9620-9628.
- Li, H., Li, W. X., and Ding, S. W. (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319-1321.
- Li, J. L., Fujiyama, F., Kaneko, T., and Mizuno, N. (2003a). Expression of vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J Comp Neurol* 457, 236-249.
- Li, J. L., Xiong, K. H., Dong, Y. L., Fujiyama, F., Kaneko, T., and Mizuno, N. (2003b). Vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in the trigeminal ganglion neurons of the rat, with special reference to coexpression. *J Comp Neurol* 463, 212-220.
- Lindbo, J. A., and Dougherty, W. G. (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189, 725-733.
- Luqmani, Y. A. (1981). Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: Evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience* 6, 1011-1021.
- Mackenzie, B., and Erickson, J. (2003). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 family. *Pflugers Arch*.
- Macnaughton, T. B., Shi, S. T., Modahl, L. E., and Lai, M. M. (2002). Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J Virol* 76, 3920-3927.

- Manfras, B. J., and Boehm, B. O. (1995). Expression of a glutamate transporter cDNA in human pancreatic islets. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 Suppl 2, 95-98.
- Masson, J., Sagne, C., Hamon, M., and El Mestikawy, S. (1999).
5 Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51, 439-464.
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H., and Jorgensen, E. M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389, 870-876.
- 10 McMahan, A. P., and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (Int-1) proto-oncogen is required for development of brain. *Cell* 62, 1071-1085.
- McManus, M. T., and Sharp, P. A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3, 737-747.
- Mertz, K. D., Weisheit, G., Schilling, K., and Luers, G. H. (2002). Electroporation
15 of primary neural cultures: a simple method for directed gene transfer in vitro. *Histochem Cell Biol* 118, 501-506.
- Miyagishi, M., and Taira, K. (2002). U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 20, 497-500.
- 20 Moraleda, G., and Taylor, J. (2001). Host RNA polymerase requirements for transcription of the human hepatitis delta virus genome. *J Virol* 75, 10161-10169.
- Myslinski, E. (2001). An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1 RNA gene. *Nucleic Acids Res* 29,
25 2502-2509.
- Naito, S., and Ueda, T. (1985). Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 44, 99-109.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of
30 Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Nestler, E. J., Hyman, S. E., and Malenka, R. C. (2001). *Molecular Neuropharmacology*, 1 edn, McGraw-Hill Companies).

- Ni, B., Du, Y., Wu, X., DeHoff, B. S., Rosteck, P. R., Jr., and Paul, S. M. (1996). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 66, 2227-2238.
- 5 Ni, B., Rosteck, P. R., Jr., Nadi, N. S., and Paul, S. M. (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding a brainspecific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5607-5611.
- Ni, B., Wu, X., Yan, G. M., Wang, J., and Paul, S. M. (1995). Regional expression and cellular localization of the Na(+)-dependent inorganic phosphate
10 cotransporter of rat brain. *J Neurosci* 15, 5789-5799.
- Njus, D., Kelley, P. M., and Hardabek, G. J. (1986). Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* 853, 237-265.
- Noda, M., Ko, M., Ogura, A., Liu, D. G., Amano, T., Takano, T., and Ikawa, Y. (1985). Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature* 318, 73-75.
15
- Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P., and Sharp, P. A. (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8, 681-686.
- Oliveira, A. C. R., Hydling, F., Olsson, E., Shi, T., Edwards, R. H., Fujiyama, F.,
20 Kaneko, T., Hökfelt, T., Cullheim, S., and Meister, B. (2003). Cellular Localization of Three Vesicular Glutamate Transporter mRNAs and Proteins in Rat Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia. *Synapse* 50, 117-129.
- Oset-Gasque, M. J., Castro, E., and Gonzalez, A. M. (1990). Mechanisms of 3H-GABA release by chromaffin cells in primary culture. *J Neurosci Res* 26, 181-
25 187.
- Ottersen, O. P., and Storm-Mathisen, J. (1984). Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, A. Björklund, H. T., and M. J. Kuhar, eds. (Amsterdam, Elsevier), pp. 141-246.
- Ozkan, E. D., and Ueda, T. (1998). Glutamate transport and storage in synaptic
30 vesicles. *Jpn J Pharmacol* 77, 1-10.
- Paddison, P. J., and Hannon, G. J. (2002). RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell* 2, 17-23.

- Palauqui, J. C. e. a. (1997). Systemic acquired silencing: transgenespecific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J* 16, 4738-4745.
- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., and Viswanath, V. (2003).
5 ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neuroscience* 4, 529-539.
- Patapoutian, A., and Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11, 272-280.
- Pines, G., Danbolt, N. C., Bjaras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L.,
10 Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., and Kanner, B. I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360, 464-467.
- Plasterk, R. H. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 296, 1263-1265.
- Platika, D., Baizer, L., and Fishman, M. C. (1985). Sensory neurons
15 "immortalized" by fusion with neuroblastoma cells. *Trans Assoc Am Physicians* 98, 301-304.
- Qin, X. F., An, D. S., Chen, I. S., and Baltimore, D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 183-188.
- 20 Ramachandran, B., Houben, K., Rozenberg, Y. Y., Haigh, J. R., Varpetian, A., and Howard, B. D. (1993). Differential expression of transporters for norepinephrine and glutamate in wild type, variant, and WNT1-expressing PC12 cells. *J Biol Chem* 268, 23891-23897.
- Reimer, R. J., and Edwards, R. H. (2003). Organic anion transport is the primary
25 function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch*.
- Ren, K. (1994). Wind up and the NMDA-receptor: from animal studies to humans. *Pain* 59, 157-158.
- Romero, O., Figueroa, S., Vicente, S., Gonzalez, M. P., and Oset-Gasque, M. J. (2003). Molecular mechanisms of glutamate release by bovine chromaffin cells in
30 primary culture. *Neuroscience* 116, 817-829.

- Roseth, S., Fykse, E. M., and Fonnum, F. (1995). Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem* **65**, 96-103.
- Roseth, S., Fykse, E. M., and Fonnum, F. (1998). Uptake of L-glutamate into
5 synaptic vesicles: competitive inhibition by dyes with biphenyl and amino- and sulphonic acid-substituted naphthyl groups. *Biochem Pharmacol* **56**, 1243-1249.
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., and Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in
10 excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-686.
- Rozenberg, Y. Y., and Howard, B. D. (1994). Contrasting morphological changes in PC12 flat cells expressing two different forms of exogenous oncogenic ras. *Exp Cell Res* **211**, 59-67.
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., et al. (2003). A
15 lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**, 401-406.
- Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M.-F., Hamon, M., Henry, J.-P., Giros, B., and Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional GABA and glycine transporter by
20 screening of genome databases. *FEBS Lett* **417**, 177-183.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sassone-Corsi, P., Der, C. J., and Verma, I. M. (1989). ras-induced
25 differentiation of PC12 cells: possible involvement of fos and jun. *Mol Cell Biol* **9**, 3174-3183.
- Schafer, M. K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., and Erickson, J. D. (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol
30 Chem* **277**, 50734-50748.
- Scholz, J., and Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci* **5**, 1062-1067.

- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol Cell* 10, 537-548.
- Shackleford, G. M., Willert, K., Wang, J., and Varmus, H. E. (1993). The Wnt-1 proto-oncogene induces changes in morphology, gene expression and growth factor responsiveness in PC12 cells. *Neuron* 11, 865-875.
- Shen, C., Buck, A. K., Liu, X., Winkler, M., and Reske, S. N. (2003). Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* 539, 111-114.
- Shi, Y. (2003). Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 19, 9-12.
- 10 Shioi, J., Naito, S., and Ueda, T. (1989). Glutamate uptake into synaptic vesicles from bovine cerebral cortex and electrochemical potential difference of proton across the membrane. *Biochem J* 258, 449-504.
- Shuey, D. J., McCallus, D. E., and Giordano, T. (2002). RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov Today* 7, 1040-1046.
- 15 Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Sindrup, S. H., and Jensen, T. S. (1999). Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83, 389-400.
- 20 Skerry, T. M., and Genever, P. G. (2001). Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 22, 174-181.
- Smith, J. G., Walzem, R. L., and German, J. B. (1993). Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim Biophys Acta* 1154, 327-340.
- 25 Snider, W. D., and McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20, 629-632.
- Stark, G. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264.
- 30 Stewart, S. A., Dykxhoorn, D. M., Paliiser, D., Mizuno, H., Yu, E. Y., An, D. S., Sabatini, D. M., Chen, I. S., Hahn, W. C., Sharp, P. A., et al. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *Rna* 9, 493-501.

- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., and Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na (+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10955-10959.
- Stucky, C. L., and Lewin, G. R. (1999). Isolectin B(4)-positive and -negative
5 nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19, 6497-6505.
- Sung, B., Lim, G., and Mao, J. (2003). Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23, 2899-2910.
- Tabb, J., Kish, P., Vandyke, R., and Ueda, T. (1992). Glutamate transport into
10 synaptic vesicles - role of membrane potential, pH gradient and intravesicular pH. *J Biol Chem* 267, 15412-15418.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C., and Jahn, R. (2002). Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* 3, 798-803.
- 15 Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194.
- Tijsterman, M., Ketting, R. F., Okihara, K. L., Sijen, T., and Plasterk, R. H. (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans*
20 by short antisense RNAs. *Science* 295, 694-697.
- Timmons, L., Court, D. L., and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103-112.
- Todd, A. J., Hughes, D. I., Polgar, E., Nagy, G. G., Mackie, M., Ottersen, O. P.,
25 and Maxwell, D. J. (2003). The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17, 13-27.
- Toll, L., and Howard, D. B. (1980). Evidence that an ATPase and a proton-motive force function in the transport of acetylcholine. *J Biol Chem* 255, 1787-
30 1789.
- Tölle, T. R. (1997). Chronischer Schmerz. In *Klinische Neurobiologie: molekulare Pathogenese und Therapie von neurologischen Erkrankungen*, T. Herdegen, T.

R. Tölle, and M. Bähr, eds. (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag), pp. 307-336.

5 Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.

Tuschl, T. (2002). Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20, 446-448.

10 Vaistij, F. E., Jones, L., and Baulcombe, D. C. (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14, 857-367.

15 Vandenberg, R. J. (1998). Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25, 393-400.

Varoqui, H., Schafer, M. K., Zhu, H., Weihe, E., and Erickson, J. D. (2002). Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22, 142-155.

20 Wall, P. D., and Melzack, R. (1999). *Textbook of pain* (Edinburgh, Churchill Livingstone).

25 Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., et al. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27, 581-590.

Willis, W. D. (2001). Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann N Y Acad Sci* 933, 142-156.

30 Winston, W. M., Molodowitch, C., and Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295, 2456-2459.

Wood, P. M. (1976). Separation of functional Schwann cells and neurons from normal peripheral nerve tissue. *Brain Res* 115, 361-375.

Yu, J. Y., DeRuiter, S. L., and Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of shortinterfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6047-6052.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-
5 stranded RNA directs the ATPdependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

Zerangue, N., and Kavanaugh, M. P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634-637.

Zheng, S., Ramachandran, B., Haigh, J. R., Palos, T. P., Steger, K., and
10 Howard, B. D. (1996). The induction of ret by Wnt-1 in PC12 cells is atypically dependent on continual Wnt-1 expression. *Oncogene* 12, 555-562.

Zhuo, M. (2001). No pain, no gains. *ScientificWorldJournal* 1, 204-206.

Tabla de concordancias

SEQ ID NO:	Soporte
1-9	p.6 y p. 7
10-13	p.9
14-51	Figura 26
52-69	p. 12
70-72	p. 17
73-83	p. 36
84	p.37
85	p. 18
86-87	p. 18 y p. 48
88-91	p. 48
92-101	p. 56
102-103	p. 57
104	Figura 5
105	Figura 6
106	Figura 7
107	Figura 27a
108	Figura 27b
109	Figura 27c

110	Reivindicación 21
111	Reivindicación 22
112	Reivindicación 22

Listado de secuencias

- <110> Grünenthal GmbH
- <120> Compuestos de ARNs específicos de VGLUT
- <130> GR01P011WO
- 5 <160> 112
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 17
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> ARNs según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).
- 15 Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente N(21-23)
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(17)
- 20 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
- <400> 1
- nnnnnnnnnnn nnnnnnnn 17
- 25 <210> 2
- <211> 18
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>

<223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).

Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente N(21-23)

- 5 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(18)
- <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

10 <400> 2

nnnnnnnnnn nnnnnnnn

18

<210> 3

<211> 19

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).

Listado de secuencias

- <110> Grünenthal GmbH
- <120> Compuestos de ARNs específicos de VGLUT
- <130> GR01P011WO
- 5 <160> 112
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 17
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> ARNs según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).
- 15 Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente N(21-23)
- <220>
- <221> misc_feature
- 20 <222> (1)..(17)
- <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
- <400> 1
- nnnnnnnnnn nnnnnnn
- 17
- 25
- <210> 2
- <211> 18
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNs según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).

Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente N(21-23)

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

10

<400> 2

nnnnnnnnnn nnnnnnnnn

18

<210> 3

15

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> ARNs según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).

Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente N(21-23)

<220>

25

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

<400> 3

30

nnnnnnnnnn nnnnnnnnn

19

<210> 4
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).
 Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma
 especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente
 10 N(21-23)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 4
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 20
 <210> 5
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).
 Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma
 especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente
 N(21-23)
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 <400> 5

nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn n

21

<210> 6

<211> 22

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).

10 Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente N(21-23)

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

<400> 6

20 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nn

22

<210> 7

<211> 23

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).

30 Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente N(21-23)

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (1)..(23)

	<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros	
	<400> 7	
	nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnn	23
5		
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
10		
	<220>	
	<223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).	
	Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma	
	especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente	
15	N(21-23)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(24)	
20	<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros	
	<400> 8	
	nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnn	24
25	<210> 9	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> ARNds según la invención (pp. 6 y 9 de la descripción).	
	Estructura general: N(17-25), preferentemente N(19-25), de forma	
	especialmente preferente N(19-24), de forma aún más preferente	
35	N(21-23)	
	<220>	

<221> misc_feature

<222> (1) .. (25)

<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

5 <400> 9

nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnn

25

<210> 10

<211> 23

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Motivo de secuencia de un ARNds de VGLUT preferente según la
invención (p. 9 de la descripción).

El motivo de secuencia es AAN(19)TT

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (3) .. (21)

<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

<400> 10

aannnnnnnnn nnnnnnnnnnn ntt

23

25

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Motivo de secuencia de un ARNds de VGLUT preferente según la
invención (p. 9 de la descripción).

El motivo de secuencia es NAN(19)NN.

35

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

5 <400> 11
 nannnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnn 23

<210> 12
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Motivo de secuencia de un ARNds de VGLUT preferente según la
 15 invención (p. 9 de la descripción).
 El motivo de secuencia es NARN(17)YNN.

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(23)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros; y = c o t; r = a o g

<400> 12
 narannnnnnn nnnnnnnnnnn ynn 23

25
 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Motivo de secuencia de un ARNds de VGLUT preferente según la
 invención (p. 9 de la descripción).
 El motivo de secuencia es NANN(17)YNN.

35
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros; y = c o t.

<400> 13

5 nannnnnnnnn nnnnnnnnnn ynn 23

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(21)

15 <223> Una secuencia de ADN diana de VGLUT1 (Figura 26).

<400> 14

aacgtgcgca agttgatgaa c 21

20 <210> 15

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (21)

<223> Una secuencia de ADN diana de VGLUT1 (Figura 26).

30 <400> 15

aagttgatga actgaggagg c 21

<210> 16

<211> 21

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una secuencia de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

 <400> 16
 10 aatgccttta gctggcattc t 21

 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 20 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

 <400> 17
 aatggtctgg tacatgtttt g 21

 25 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

 35 <400> 18

aaagtcctgc aaagcatcct a 21

<210> 19
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

<400> 19
 aagtcctgca aagcatccta c 21

15

<210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

25

<400> 20
 aagaacgtag gtacatagaa g 21

<210> 21
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

5 <400> 21
 aattgtgca aactctgca g 21

<210> 22
 <211> 21

10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

<400> 22
 aaattagcaa ggttggtatg c 21

20

<210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

30

<400> 23
 aattagcaag gttggtatgc t 21

<210> 24

- <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
- 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).
- 10 <400> 24
 aaggttgga tgctatctgc t 21
- <210> 25
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
- <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).
- <400> 25
 aagcaagcag attcttcaa c 21
- 25
- <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
- 30
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).
- 35

	<400> 26	
	aaccacttgg atatcgctcc a	21
	<210> 27	
5	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).	
	<400> 27	
15	aa tgggcatt tcgaatggtg t	21
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
25	<223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).	
	<400> 28	
	aataagtcac gtgaagagtg g	21
30	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).
 5
 <400> 29
 aagtcacgt g aagagtgcca g 21

<210> 30
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

<400> 30
 20 aagagtgcca gtatgtcttc c 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 30 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

<400> 31
 aatattgcc tcaggagaga a 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).
 10
 <400> 32
 aagtcttatg gtgccacaac a 21

<210> 33
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

<400> 33
 25 aatggaggtt ggcttagtgg t 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 35 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT2 (Figura 26).

	<400> 34	
	aagactcaca tagctataag g	21
	<210> 35	
5	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).	
	<400> 35	
15	aatcttgag ttgccattgt g	21
	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
25	<223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).	
	<400> 36	
	aaccggaat tcagacagca c	21
30	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
35	<220>	

<221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

5 <400> 37
 aaacagtggg ccttatccat g 21

<210> 38
 <211> 21

10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

<400> 38
 aattccaggt ggtttcattt c 21

20

<210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

30

<400> 39
 aacatcgact ctgaacatgt t 21

<210> 40

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

10 <400> 40
 aaggttagt ggagggtgtg a 21

<210> 41
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

<400> 41
 aagaggtctt tggattgca a 21

25

<210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

35

	<400> 42	
	aataagtaag gtgggtctct t	21
	<210> 43	
5	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).	
	<400> 43	
15	aagtaaggtg ggtctcttgt c	21
	<210> 44	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
25	<223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).	
	<400> 44	
	aaggtgggtc tcttgcagc a	21
30	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).
 5
 <400> 45
 aatcgttgta cctattggag g 21

<210> 46
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

<400> 46
 20 aagacccgtg aagaatggca g 21

<210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 30 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

<400> 47
 aagaatggca gaatgtgttc c 21

<210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).
 10
 <400> 48
 aatcattgac caggacgaat t 21

<210> 49
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

<400> 49
 25 aactcaacca tgagagtttt g 21

<210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 35 <223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).

	<400> 50	
	aaagaagatg tcttatggag c	21
	<210> 51	
5	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> Una de las secuencias de ADN diana de VGLUT3 (Figura 26).	
	<400> 51	
15	aagagctgac atcctaccag a	21
	<210> 52	
	<211> 17	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 5' la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).	
25	Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)..(17)	
	<223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros.	
30	<400> 52	
	aanannnnnnn nnnnnnn	17
	<210> 53	

- <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Secuencia de un ARNds cuya secuencia diana presenta en el extremo 5' la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros.
- 15 <400> 53
 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn 18
- <210> 54
 <211> 19
- 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Secuencia de un ARNds cuya secuencia diana presenta en el extremo 5' la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)
- 25
- <220>
 <221> misc_feature
- 30 <222> (3)..(19)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros.
- <400> 54
 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn 19
- 35

<210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 5'
 la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(20)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 55
 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn 20

 <210> 56
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 5'
 la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN (15-23)

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (3)..(21)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

 <400> 56
 35 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn n 21

<210> 57
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 5'
 la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(22)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 57
 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn nn 22

 <210> 58
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 5'
 la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (3)..(23)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

 <400> 58
 35 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn nnn 23

<210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNds cuya secuencia diana presenta en el extremo 5'
 la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(24)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 59
 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn nnnn 24

 <210> 60
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Secuencia de un ARNds cuya secuencia diana presenta en el extremo 5'
 la sucesión de nucleótidos AA (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 5'AAN(15-23)

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (3)..(25)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

 <400> 60
 35 aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn nnnn 25

<210> 61
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 61
 nnnnnnnnnn nnnnntt 17

<210> 62
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 <400> 62
 35 nnnnnnnnnn nnnnntt 18

<210> 63
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 63
 nnnnnnnnnn nnnnnnntt 19

 <210> 64
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

 <400> 64
 35 nnnnnnnnnn nnnnnnntt 20

<210> 65
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 65
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnt t 21

 <210> 66
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros

 <400> 66
 35 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn tt 22

<210> 67
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 67
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ntt 23

<210> 68
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia de un ARNs cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 <400> 68
 35 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nntt 24

<210> 69
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de un ARNds cuya secuencia diana presenta en el extremo 3'
 la sucesión de nucleótidos TT (p. 12 de la descripción).
 Motivo de secuencia 3'TTN(15-23)
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> n = a, t/u, g, c, desconocido u otros
 15
 <400> 69
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnntt 25

 <210> 70
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Rattus norvegicus

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia diana del ARNm de VGLUT2 (p. 17 de la descripción).

 <400> 70
 30 aaggcuccgc uaugcgacug u 21

 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

- <220>
 <223> Cadena sentido del ARNs dirigido contra la secuencia diana arriba
 indicada del ARNm de VGLUT2 de rata (con un TT saliente en el extremo
 5 3') (p. 17 de la descripción).
- <400> 71
 ggcuccgcua ugcgacugut t 21
- 10 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> Cadena antisentido del ARNs dirigido contra la secuencia diana arriba
 indicada del ARNm de VGLUT2 de rata (con un TT saliente en el extremo
 3') (p. 17 de la descripción).
- 20 <400> 72
 acagucgcau agcggagcct t 21
- <210> 73
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> si-rVGLUT1 739-759 EGT (p. 36 de la descripción).
- 30 <400> 73
 agcgccaagc ucaugaacct t 21
- <210> 74

- <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> si-rVGLUT1 739-759 EGT (p. 36 de la descripción)
- <400> 74
 gguucaugag cuuggcgc t 21
- 10
- <210> 75
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 15
- <220>
 <223> si-rVGLUT2 100-120 EGT (ARNsi activo) (p. 36 de la descripción)
- <400> 75
 20 gcaggauaac cgagagacct t 21
- <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> si-rVGLUT2 100-120 EGT (ARNsi activo) (p. 36 de la descripción)
- 30 <400> 76
 ggucucucgg uuaucugct t 21
- <210> 77
 <211> 21

- <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 5 <223> si-rVGLUT3 220-240 EGT (p. 36 de la descripción)
- <400> 77
gcgguacauc aucgcuguct t 21
- 10 <210> 78
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>
<223> si-rVGLUT3 220-240 EGT (p. 36 de la descripción)
- <400> 78
gacagcgaug auguaccgct t 21
- 20
- <210> 79
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25
- <220>
<223> si-VGLUT2 MM EGT (ARNsi de control) (p. 36 de la descripción)
- <400> 79
- 30 ggacuagcaa agcgagccat t 21
- <210> 80
<211> 21
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> si-VGLUT2 MM EGT (ARNsi de control) (p. 36 de la descripción)

5

<400> 80

uggcucgcuu ugcuagucct t

21

<210> 81

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> si-rVGLUT2 100-120 AMB (ARNsi activo) (p. 36 de la descripción)

<400> 81

gcaggauaac cgagagacct t

21

20 <210> 82

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> si-rVGLUT2 100-120 AMB (ARNsi activo) (p. 36 de la descripción)

<400> 82

ggucucucgg uuaucugct t

21

30

<210> 83

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> si-rVGLUT2 166-186 AMB (p. 36 de la descripción)		
5	<400> 83		
	ggcuccgcua ugcgacugut t		21
	<210> 84		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> si-rVGLUT2 166-186 AMB (p. 37 de la descripción)		
15	<400> 84		
	acagucgcau agcggagcct t		21
	<210> 85		
20	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Rattus norvegicus		
	<220>		
25	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(21)		
	<223> Secuencia diana de VGLUT2 de rata (p. 18 de la descripción).		
	<400> 85		
30	aagcaggata accgagagac c		21
	<210> 86		
	<211> 21		
	<212> ARN		

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (1)..(21)

<223> Secuencia diana del ARNm de VGLUT2 de rata (p. 48 de la descripción).

<400> 86

aagcaggaua accgagagac c

21

10

<210> 87

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cadena sentido del ARNsi dirigido contra la secuencia diana de VGLUT2 arriba indicada o la secuencia diana de ARNm de VGLUT2 (pp. 18 y 48 de la descripción).

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> T = dT (desoxitimidina)

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> T = dT (desoxitimidina)

30

<400> 87

gcaggauaac cgagagacct t

21

<210> 88

35 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

- 5 <223> Cadena antisentido del ARNsi dirigido contra la secuencia diana de VGLUT2 arriba indicada o la secuencia diana de ARNm de VGLUT2 (pp. 18 y 48 de la descripción).

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> T = dT (desoxitimidina)

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> T = dT (desoxitimidina)

<400> 88

20 ggucucucgg uuaucugct t

21

<210> 89

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana (no es una secuencia de VGLUT2) del ARNsi de control en el ejemplo de realización 4. (p. 48 de la descripción).

30

<400> 89

aaggactagc aaagcgagcc a

21

<210> 90

35 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

- 5 <223> Cadena sentido del ARNsi de control de doble cadena dirigido contra la secuencia diana arriba indicada (p. 48 de la descripción).

<220>

<221> misc_feature

- 10 <222> (20)..(20)

<223> T = dT (desoxitimidina)

<220>

<221> misc_feature

- 15 <222> (21)..(21)

<223> T = dT (desoxitimidina)

<400> 90

ggacuagcaa agcgagccat t

21

20

<210> 91

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

- <223> Cadena antisentido del ARNsi de control de doble cadena dirigido contra la secuencia diana arriba indicada (p. 48 de la descripción).

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> T = dT (desoxitimidina)

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

	<223> T = dT (desoxitimidina)	
	<400> 91	
	uggcucgcuu ugcuagucct t	21
5		
	<210> 92	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10		
	<220>	
	<223> Cebador PCR: rVGluT1(2_4)F; (p. 56 de la descripción).	
	<400> 92	
15	tctgggtttc tgcatcagc	19
	<210> 93	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR: rVGluT1(2_4)R; (p. 56 de la descripción).	
25	<400> 93	
	ccatgtatga ggccgacagt	20
	<210> 94	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR: rVGluT2(8_9)F; (p. 56 de la descripción).	

- <400> 94
aagaccccat ggaggaagtt 20
- <210> 95
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
10 <223> Cebador PCR-Primer: rVGluT2(8_9)R; (p. 56 de la descripción).
- <400> 95
attgtcatga ccaggtgtgg 20
- 15 <210> 96
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Cebador PCR: rVGluT3(4_5)F; (p. 56 de la descripción).
- <400> 96
atccagagac ggtgggtctt 20
- 25
- <210> 97
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Cebador PCR: rVGluT3(4_5)R; (p. 56 de la descripción).
- <400> 97

	atgacacagc cgtaatgcac	20
	<210> 98	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador PCR: rGAPDH(7_8)F; (p. 56 de la descripción).	
	<400> 98	
	atcctgggct aactgagga	20
	<210> 99	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador PCR: rGAPDH(7_8)R; (p. 56 de la descripción).	
	<400> 99	
	atgtaggcca tgaggccac	20
25	<210> 100	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador rVGluT2 TS10 as; (p. 56 de la descripción).	
	<400> 100	
	aagcaggata accgagagac ccctgtctc	29

	<210> 101	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador rVGluT2 TS10 s; (p. 56 de la descripción).	
	<400> 101	
10	aaggtctctc ggttatcctg ccctgtctc	29
	<210> 102	
	<211> 29	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador rVGluT2 TS14 as; (p. 57 de la descripción).	
	<400> 102	
20	aaggctccgc tatgcgactg tcctgtctc	29
	<210> 103	
	<211> 29	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador rVGluT2 TS14 s; (p. 57 de la descripción).	
30	<400> 103	
	aaacagtcgc atagcggagc ccctgtctc	29
	<210> 104	

<211> 1683

<212> ADN

<213> Desconocido

5 <220>

<223> Secuencia codificadora de un VGLUIT1 con el número de acceso de banco de genes U07609 (figura 5).

<400> 104

```

atggagttcc ggcaggagga gtttcggaag ctggcggggc gcgccctggg gaggctgcac      60
cggttactgg agaagcggca ggaaggcgcg gagacattgg agctgagcgc cgacggggcg      120
ccagtgacca cacacacgcg ggaccgcgcg gtggtggact gcacttgett tggcctccct      180
cgccgctaca tcatcgcgat catgagcggc ctgggtttct gcatcagctt tggcatccgc      240
tgcaacctgg gcgtggccat cgtatccatg gtcaacaaca gtacaacca ccgtgggggc      300
cacgtggtgg tgcagaaagc ccagttcaac tgggatccag agactgtcgg cctcatacat      360
ggctcctttt tctgggggta cattgtcact cagattcctg gaggatttat ctgccaaaaa      420
ttcgcagcca acagggctct tggctttgcc attgtggcta cctccaccct aaatatgttg      480
atcccttcag cagcccgtgt tcaactatgg tgtgtcatct tcgtgaggat ccttcagga      540
ttggtggagg gggtcacata cctgcttgc catggcatct ggagcaaatg ggcccctccc      600
ttagaacgga gtcggctggc gacgacagcc ttttgcggtt cctatgccgg ggcagtggtt      660
gccatgcctc tggctggggc cctggtacag tattcaggat ggagttctgt cttctatgtc      720
tatggcagct togggatctt ttggtacctg ttctggttgc ttgtctccta cgagtcacct      780
gcactacacc ccagcatctc cgaggaggag cgcaaataca ttgaggatgc catcggagaa      840
agcgccaagc tcatgaacc tgttacgaag tttaacacac cctggaggcg cttctttacc      900
tccatgccgg tctatgcat cattgtcgc aacttttgc gcagctggac tttctacctg      960
ctcctcatct ccagcccgc ctactttgaa gaagtgttcg gctttgagat cagcaagggtg     1020
ggactggtgt cggcactgcc tcacctgtc atgactatca tcgtacccat cggaggccag     1080
atcgccgact tcctgocag tcgtcatata atgtccacga ccaatgtcgg aaagctgatg     1140
aactgcgggg gtttcgggat ggaagctacg ctgctgctgg tggtcggata ctcacactcc     1200
aagggcgtgg ccatctcctt cctggtcctg gctgtgggct tcagtggctt tgctatctct     1260
gggtttaacg tgaaccactt ggacatcgcc cctcgatatg ccagcatctt gatgggcatt     1320
tccaatggcg tgggcacact gtctgggatg gtgtgcccc tcatcgtggg tgcaatgacc     1380
aagcacaaga cgcgggagga gtggcagtac gtgttctca tagcctccct ggtgcactat     1440
ggagggtgca tcttctatgg ggtctttgct togggagaga aacagccgtg ggcagagccg     1500
gaggagatga gcgaggagaa gtgtggcttt gttggccacg accagctggc tggcagtgc     1560

```

```

gaaagtgaaa tggaaagacga ggttgagccc ccgggggca< cccccgcacc tccgccttcc 1620
tacggggcca cacacagcac agttcagcct ccaaggccc< caccctctgt ccgggactac 1680
tga 1683

```

<210> 105

<211> 1749

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1749)

10 <223> Secuencia codificadora de VGLUT2; número de acceso de bando de genes NM_053427 (figura 6).

<400> 105

```

atggagtcgg taaaacaaag gattttggcc ccgggggaaag aggggataaa gaattttgct 60
ggaaaatccc tcggacagat ctacagggtg ctggagaaag agcaggataa ccgagagacc 120
atcgagctga cagaggacgg caagcccctg gaggtgcctg agaagaaggc tccgctatgc 180
gactgtacgt gcttcggcct gccgcgccgc tacatcatag ccatcatgag cggcctcggc 240
ttctgcatct cctttggtat ccgctgtaac ctgggtgtgg ccattgtgga catggtcaac 300
aacagcacca tccaccgggg tggcaaagt atcaaggaga aagccaagtt taactgggac 360
cccgagactg tggggatgat tcacgggtcg ttcttctggg gctatatcat cacgcagatt 420
ccgggcggat acatcgcac gccactggct gctaaccggg tctttggggc tgccatactg 480
cttacctcta cctcaatat gctgatcca tctgcagcca gactgcatta tggatgcgtc 540
atctttgta gaatattgca aggacttggt gagggcgtca cctaccagc ctgtcacggg 600
atatggagca agtgggcccc tcctttggag aggagtgggt tggctaccac ctcttctgt 660
ggttcctatg ctggagcagt cattgcaatg ccctagctg gtatcctggg gcagtacact 720
ggatggtcct cagtatttta cgtatatgga agctttggta tggctcggta tatgttctgg 780
cttctggtgt cttacgagag ccccgcaaag catccaacca taacagacga agaacgtagg 840
tacatagaag agagcatcgg ggagagcgca aatctgttag gagcaatgga gaaattcaag 900
acccatgga ggaagtttt cacatccatg ccgctctatg cgataattgt tgcaaaacttc 960
tgcaggagtt ggacttttta ttactgctc atcagtcaac cagcttattt cgaggaggtt 1020
tttgatttg aatcagcaa ggttggcatg ttgtctcggg tccacacct ggtcatgaca 1080
atcattgtgc ctatcggggg gcaaattgca gactttctaa ggagcaagca aattctttca 1140

```

```

acaactacag tgcgaaagat catgaactgc gggggttttg gcatggaagc cacactgctt 1200
ctggttgttg gctactctca tactagaggg gtggccatct ccttcttggg gcttgcagtg 1260
ggattcagtg gatttgctat ctctggtttc aatgtgaacc acttgatata tgccccgaga 1320
tatgccagta tcttaatggg catttcaaat ggtgttgcca cgctgtcggg aatggtctgc 1380
ccgatcattg ttggtgcaat gacgaagaac aagtcccgtg aagaa tggca gtatgtcttc 1440
ctcatcgctg cactggtcca ctatggtgga gtcataatct atgca ctatt tgcctcagga 1500
gagaagcaac cttgggcaga ccctgaggaa acaagcgaag aaaagtgtgg cttcattcat 1560
gaagatgaac tggatgaaga aacgggggac atcactcaga attac ataaa ttacgggtacc 1620
accaaactct acggcgccac ctacacaggag aacggaggct ggcct aacgg ctgggagaaa 1680
aaggaagaat ttgtgcaaga aagtgcgcaa gacgcgtact cctat aagga ccgagatgat 1740
tattcataa 1749

```

<210> 106

<211> 1767

5 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

10 <223> Secuencia codificadora de un VGLUT3 con el número de acceso de banco de genes AJ491795 (figura 7).

<400> 106

```

atgccattta acgcatttga taccttcaaa gaaaaaattt tgaaa <cccgg gaaggaagga 60
gtgaagaatg ccgtgggaga ttcgctgggg atcttcaaaa gaaaa <ctoga tgggaccaac 120
gaggagggag atgccattga gctgagtgag gaaggaaggc ccgtg <cagac atccagagcc 180
cgagcccctg tgtgcgactg cagctgctgt ggcattccca agcgg <tacat catcgctgtc 240
atgagtggcc tgggattctg catttccttt gggattcggg gcaac <cttgg agtggccatt 300
gtggaaatgg tcaacaatag cactgtgtat gtggatggga aaccg <gaaat ccagacagca 360
cagtttaact gggatccaga gacgggtggg cttatccatg gatct <ttttt ctggggttat 420
attgtgacac aaattcccgg tggcttcatt tcaacaagt ttgct <gctaa cagggctttt 480
ggagotgcc tcttcttgac gtcaaccctg aacatgttca tccct <ccgc ggccagggtg 540
cattacggct gtgtcatgtg tgtgaggatt ttgcagggtc tggtg <gaggg tgtgacctac 600
ccagcctgcc acgggatgtg gagtaagtgg gcacctccc tggag <agaag tcgtctagcc 660
acaacctctt tttgtggttc ctatgccggg gcagtcgttg ctatg <cccct tgcaggagta 720

```

```

ttggtgcagt acattggctg ggcctctgtc ttttatattt acgggatggt tggaattatt 780
tggtacatgt tttggctgct gcaggcttat gagtgtccag cagttcacc aacaatatcc 840
aatgaagaac ggacctacat agagacaagt ataggagaag gcgccaaactt ggccagtctg 900
agcaaattca acacaccatg gagaaggttt ttcacatcct tgcctgtcta tgccattatt 960
gtggcaaaact tttgtagaag ctggaccttc tatttgctct taataagtca gcctgcttac 1020
tttgaagagg tctttgggtt tgcaataagt aagggtgggtc tcttgtcagc tgtccacac 1080

atggtgatga caatcgtggt acccattgga ggacaactgg ctgattattt aagaagccga 1140
aagattttga ccacaactgc tgtcagaaag atcatgaatt gtggaggctt tggcaatggag 1200
gcaaccttgc tcttggtggt tgggttttcc cataccaaag gagtggctat ctcttctctg 1260
gtgcttctg taggatttag tggctttgca atttcagggt tcaatgtcaa ccacctggac 1320
attgctccac gatatgccag catcctcatg gggatctcaa atggcgtggg aacctctct 1380
ggaatggtt gtccctcat tgttggtgca atgacaaagc acaagacctg ggaagraatgg 1440
cagaatgtgt tctcatagc agccctggtg cactacagtg gagtcatctt ctacggggtc 1500
tttgcttctg gggaaaaaca ggactgggct gatccagaga atctctctga ggagaaatgt 1560
ggaatcattg accaagatga attagccgag gaaacagAAC tcaaccacga ggcttctgta 1620
agtcccagaa agaagatgtc ttatggagcc accaccaga attgtgaggt ccagaagacg 1680
gatcggagac aacagagaga atccgccttc gagggggagg agccattatc ctaccagaat 1740
gaagaggact tttcagaaac atcttaa 1767

```

<210> 107

<211> 2959

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(2959)

<223> VGLUT1 (figura 27A)

<400> 107

```

acttgacgcc tccttcccc cgagcggagc tgcggggccg gccgggccgg ggcggraccc 60
gggaacccgg acgcggccgc ccgggccgcg gggcgggggg atcggcgggg gggacccgcg 120
gggtgaccgg eggcaggagc cgccaccatg gatttccgcc aggaggagtt tcggaagcta 180
gcgggtcgtg ctctcgggaa gctgcaccgc ctcttgagga agcggcagga aggcgcggag 240
acgctggagc tgagtgcgga tgggcgcccg gtgaccacgc agaccggga cccgc-cggtg 300

```

gtggactgca cctgcttcgg cctccctcgc cgctacatta tcgccatcat gagtggctctg	360
ggcttctgca tcagctttgg catccgctgc aacctgggcg tggccatcgt ctcca.tggtc	420
aataacagca cgaccaccg cggggggccac gtggtggtgc agaaagccca gttca.gctgg	480
gatccagaga ctgtcggcct catacacggc tcctttttct ggggctacat tgtca.ctcag	540
attccaggag gatttatctg tcaaaaattt gcagccaaca gagttttcgg ctttg.ctatt	600
gtggcaacat ccaactctaaa catgctgatc ccctcagctg cccgcgtcca ctatg.gctgt	660
gtcatcttcg tgaggatcct gcaggggttg gtagaggggg tcacataccc cgcct.gccat	720
gggatctgga gcaaatgggc cccaccctta gaacggagtc gcctggcgac gacag.ccttt	780
tgtggttcct atgctggggc ggtggtcgcg atgcccctcg ccggggctcct tgtgcagtac	840
tcaggatgga gctctgtttt ctacgtctac ggcagcttcg ggatcttctg gtacctgttc	900
tggctgctcg tctcctacga gtccccgcg ctgcacccaa gcatctcggg ggaggagcgc	960
aagtacatcg aggacgccat cggagagagc gcgaaactca tgaacccct cacgaagttt	1020
agcactccct gggggcgctt ctacacgtct atgccagtct atgccatcat cgtggccaac	1080
ttctgcgca gctggacgtt ctacctgctg ctcatctccc agcccgccta cttcgaagaa	1140
gtgttcggct tcgagatcag caaggtaggc ctggtgtccg cgctgcccc a.ctggtcatg	1200
accatcatcg tgcccatcgg cggccagatc ggggacttcc tggggagccg ccgcatcatg	1260
tccaccacca acgtgcgcaa gttgatgaac tgccggaggct tcggcatgga agccacgctg	1320
ctgttggttg tcggctactc gcactccaag ggcgtggcca tctccttctt ggtcctagcc	1380
gtgggcttca gggcttcgc catctctggg ttcaacgtga accacctgga catagccccg	1440
cgctacgcca gcatcctcat gggcatctcc aacggcgtgg gcacactgtc gggcatggtg	1500
tgccccatca tcgtgggggc catgactaag cacaagactc gggaggagtg gcagtacgtg	1560
ttcctaattg cctccctggt gcactatgga ggtgtcatct tctacggggg ctttgcttct	1620
ggagagaagc agccgtgggc agagcctgag gagatgagcg aggagaagtg tggcttcgtt	1680
ggccatgacc agctggctgg cagtgacgac agcgaatgg aggatgaggc tgagcccccg	1740
ggggcacccc ctgcaccccc gccctcctat ggggccaac acagcacatt tcagcccccc	1800
aggccccccac ccctgtccg ggactactga ccatgtgect cccactgaat ggcagtttcc	1860
aggacctcca ttccactcat ctctggcctg agtgacagtg tcaaggaacc ctgctcctct	1920
ctgtcctgcc tcaggcctaa gaagcactct cccttgctcc cagtgtgtc aaatcctctt	1980
tccttcccaa ttgcctctca ggggtagtga agctgcagac tgacagttc aaggataccc	2040
aaattccct aaaggttccc tctccaccg ttctgcctca gtggttcaa atctctcctt	2100

```

tcagggcttt atttgaatgg acagttogac ctcttactct ctcttggtt tttgaggcac 2160
ccacaccccc cgctttcctt tatctocagg gactctcagg ctaacctttg agatcactca 2220
gtcccatct cctttcagaa aaattcaagg tcctccteta gaagtttcaa atctotocca 2280
actctgttct gcatcttcca gattggttta accaattact tgtccccgcc attccaggga 2340
ttgattotca ccagcgtttc tgatggaaaa tggcggtttc aagtccccga ttccgtgcc 2400
acttcacatc tcccctacca gcagattctg cgaaagcacc aaatttotca agaccctctt 2460
ctccctagct tagcataatg tctgggaaa caacccaaat cgcaatttta acaatatgcc 2520
tctctacccc cgtgcacttt ttctgacatg gttttcaggt ctaaatagtg gctgctocag 2580
tccatgaact caaaggtttg aagctaccac cattgaactc ccccatggtg gtttcatgat 2640
gccccctccc caattcctcg cactttatc tctgggttg tttcgaacta ccctgtttot 2700
cagtgccat ttgttggtc cctcaggggc ttaatgactc aaaatctggg atccttcccc 2760
tctcagacac cctctttca gcttagaatt tggggaacct atagagaagt cacagaatcc 2820
catgaaaggg aatggggcag gagacagggg tgtttttcc cagtgcaggg ttgtgtcttt 2880
gtgtctctgt ctctgtgact gtaaatctg cctgccccca ctccaataa aagctttggt 2940
gtataggcaa aaaaaaaaaa 2959

```

<210> 108

<211> 3946

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(3946)

<223> VGLUT2 (figura 27B)

<400> 108

```

cgtttaaaag ccatcagatt tgagagcaat aagtcttcaa aaccgggaat ttacattggt 60
tttcagctga ccgacttcca ggaaaaggac tcaaccgat ctacccaaat accgtggcac 120
tgcttgctgt ctttgccacc ggatactccc ctccaatga gactttctga ttgtgtctac 180
caactctcct attaggaaac ccgtgggttg catgcagcta ttctgttgta ttctcattct 240
cactctccct ccctctctc actctcactc ttgctggagg cgagccaacta ccattctgct 300
gagaaggaaa agcccgaac tactttaaga gattaagaca atatgcgcaa tctctgcctt 360
tcctagcaat cactatttaa atctggcaag aactgacaac agtctttgca agaatggaat 420
ccgtaaaaca aaggatcttg gccccaggaa aagaggggct aaagaatctt gctggaaaat 480

```

cactcggcca	gatctacagg	gtgctggaga	agaagcaaga	caccggggag	acaatcgagc	540
tgacggagga	tgggaagccc	ctagaggtgc	ccgagaggaa	ggcgcgctg	tgcgactgca	600
cgtgcttcgg	cctgccccgc	cgctacatta	tcgccatcat	gagcggcctg	ggcttctgca	660
tctccttcgg	tatccgctgc	aacctgggcg	tggccattgt	ggacatggtc	aacaacagca	720
ccatccaccg	cgggggcaag	gtcatcaagg	agaaagccaa	attcaactgg	gacccggaaa	780
ccgtggggat	gatccacggt	tccttctttt	ggggctacat	catcactcag	attccgggag	840
gctacatcgc	gtctcggctg	gcagccaaca	gggttttcgg	agctgccata	cttcttacct	900
ctaccctaaa	tatgctaatt	ccatcagcag	ccagagtgca	ttatggatgt	gtcatctttg	960
tcagaatact	gcagggactt	gttgagggtg	tgacctaccc	agcatgtcat	gggatatgga	1020
gcaaatgggc	cccacctcta	gagaggagta	gactggcaac	cacctccttt	tgtggttcct	1080
atgccggagc	tgtgattgca	atgcctttag	ctggcattct	tgtgcagtac	actggctggt	1140
cttcagtgtt	ttatgtotac	ggaagctttg	gaatggtctg	gtacatgttt	tggcttttgg	1200
tgtcttatga	aagtcctgca	aagcatccta	ctattacaga	tgaagaacgt	aggtacatag	1260
aagaaagcat	tggagagagt	gcaaatcttt	taggtgcaat	ggaaaaattc	aagactccat	1320
ggaggaagtt	ttttacatcc	atgccagtct	atgcaataat	tgttgcaaac	ttctgcagaa	1380
gctggacttt	ttatttattg	cttattagtc	agccagcata	ttttgaggaa	gtctttggat	1440
ttgaaattag	caaggttggt	atgctatctg	ctgtgccaca	cttagtaatg	acaattattg	1500
tgccatttgg	gggacaaatt	gcagattttc	taagaagcaa	gcagattctt	tcaactacga	1560
cagtgagaaa	gatcatgaat	tgtggtggtt	ttggcatgga	agccacactg	ctcctggctg	1620
ttggctattc	tcatactaga	gggtagcaa	totcattctt	ggtacttgca	gtgggattca	1680
gtggatttgc	tatatctggt	ttcaatgta	accacttgga	tatcgctcca	agatatgcca	1740
gtatcttaat	gggcatttcg	aatggtggtg	gcacattgtc	aggaatggtt	tgtcctatca	1800
ttgttggtgc	aatgacaaag	aataagtcac	gtgaagagtg	gcagtatgtc	ttcctgatcg	1860
ctgccctagt	ccactatggt	ggagtatat	tttatgcaat	atttgcctca	ggagagaaac	1920
aaccctgggc	agaccocggag	gaacaagtg	aagaaaaatg	tggatttatt	catgaagatg	1980
aactcgatga	agaaacaggg	gacattactc	aaaattatat	aaattatggt	accaccaagt	2040
cttatggtgc	cacaacacag	gccaatggag	gttggcctag	tggttgggaa	aagaaagagg	2100
aatttgtaca	aggagaagta	caagactcac	atagctataa	ggaccgagtt	gattattcat	2160
aacaaaacta	attactggat	ttatttttag	tgtttgtgat	taaattcatt	gtgattgcac	2220
aaaaatttta	aaaacacgtg	atgtaaaactt	gcaagcatat	caaccaggca	agtcttgctg	2280
taaaaatgaa	aacaaaacaa	accatgagg	ttaccatcaa	gtgcaatctg	taaaattgtg	2340
aagttccatc	atttccattc	aagtcatcca	ttcttgcatt	tgtgacttaa	aggttgactg	2400

```

gtcaaaattg tagaaacaag tagttaccca ttggattcat atgagctaaa actcatcact 2460
atttactaaa gcacaacatc tcatcctaca aaagttaaga agccaaagct acttgatcat 2520
gcaaaatgca cttatatatt tgttacactg tattgcaaga tagcacacag aagttggctg 2580
cgtcaagtag aggcgacatt tattaagtga aaatcatgga gttgggatat ctctcaatta 2640
aagaaataca ttgtgaacta tcagctacaa agttgtactg aataactatt agaattgcat 2700
aatgtgagat attttgtag tctcmetaag gaatatcttg cagtgttttc tatgaaatgc 2760
ttgggcacaa acacttattt ctgtgaaaga gaacatgtaa gttgaggggt atgcttcatg 2820
ttcttccatc catttaccta atagtatgaa acagttcaca tttcaataaa atcaaacctt 2880
tcattgtagc tatcacataa cttttttgca aaaaataaa aaagaaataa acttcaatgt 2940
atfttttatt acaactttgt actggttgta acttgcatta gaaaaaaaa agagatatat 3000
aaaccacaaa gaatctaata agaaatttat tatggagata tagcccttaa aatgcaatat 3060
taagaacaaa gaaatagaaa atggttttaga tatctttctt ccttcataat taaatactat 3120
atgaaacttg tgccacagag ctatatgtaa tatgaaaaga ttaacttcat agagatattg 3180
taagtaggta attttattat ttaaagtcct attaagaaat atttgtctta aatatatagg 3240
acaatacatt atattaaaat ggtctctctc tatatatatc tgtatatctt atacatgtcc 3300
atacacagaa acataataaa caatcttcac acgaaaccaa aaatagcata cacctaattg 3360
tgggtaggg aattgcaatt tctactttca tagagtcata gaatttttag tggggaagag 3420
gcattttgct tgtcatttct taatataact caacaagaat tgcaacattt gtgtaccaag 3480
caataagtgc aatgcataaa atttcctgtc tgtatattac cttcattttg cttgtagtag 3540
ctgtttgggt ggttggaata attttattt tcttttaaaa aagctaacat cagaccctt 3600
tataatgtcc taaaattatg ataatacatt toccaattca actcaaaata ttattggtgt 3660
atfttgctta ttctggatat ttgatctgtt taatgtactg tgctagtgc tggaggccct 3720
gctactgcaa atataaaacc taaagtttgt taaaaaaaa gcaaatcatt ctttacctta 3780
agaaaaaaaa aataccctt gctttgtgcc tcaaagtgat gtaatgtgat cacagctttt 3840
gttggttga atgaaaatat gtggactgic atfttggtgc agcaaaaaag tgtaataaa 3900
atgctctatt tatcctttt taaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaa 3946

```

<210> 109

<211> 3838

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3838)

<223> VGLUT3 (figura 27C)

<400> 109

5

```

tcttggaaga tccgagctgg gtttcatctc ctttttgatt ttgagtagtt ccctccacga      60
gaactgactt ccaggtgttc accaagggaa acaaggtggt tctcactg gaaatgagga      120
aggatgacag tttttgagac tgactgtaa cggctcagag gtgccctca ttcaaatgc      180
cttttaaagc atttgatacc ttcaaagaaa aaattctgaa acctgggaag gaaggagtga      240
agaacgccgt gggagattct ttgggaattt tacaagaaa aatcgatggg acaactgagg      300
aagaagataa cattgagctg aatgaagaag gaaggccggt gcagacgtcc aggccaagcc      360
ccccactctg cgaactgcaac tgggtggggc tccccagcg ttacatcatt gctatcatga      420
gtgggctggg attctgcatt tcttttggga tccggtgcaa tcttgagtt gccattgtgg      480
aatggtcaa caatagcacc gtatatgttg atggaaaacc ggaaattcag acagcacagt      540
ttaactggga tccagaaaca gtgggcctta tccatggatc ttttttctgg ggctatatta      600
tgacacaaat tccaggtggt ttcatttcaa acaagtttgc tgctaacagg gtctttggag      660
ctgccatctt cttaacatcg actctgaaca tgtttattcc ctctgcagcc agagtgcatt      720
acggatgctg catgtgtgtc agaattctgc aaggtttagt ggaggggtgtg acctaccag      780
cctgccatgg gatgtggagt aagtgggcac cacctttgga gagaagccga ctggccacaa      840
cctctttttg tggttcctat gcaggggagc tggttgccat gccctggct ggggtgttgg      900
tgcagtacat tggatggtcc tctgtctttt atatttatgg catgtttggg attatttggg      960
acatgttttg gctgttgagc gcctatgagt gccagcagc tcatccaaca atatccaatg     1020
aggagaagac ctatatagag acaagcatag gagagggggc caacgtggtt agtctaagta     1080
aatttagtac cccatggaaa agatttttca catctttgcc ggtttacgca atcattgtgg     1140
caaatttttg cagaagctgg accttttatt tgctcctcat aagtcagcct gcttattttg     1200
aagaggctct tggatttgca ataagtaagg tgggtctctt gtcagcagtc ccacacatgg     1260
ttatgacaat cgttgtaacct attggaggac aattggctga ttatttaaga agcagacaaa     1320
ttttaaccac aactgctgtc agaaaaatca tgaactgtgg aggttttggc atggaggcaa     1380
ccttactcct ggtggttggc ttttcgcata ccaaggggt ggctatctcc tttctggtac     1440
ttgctgtagg atttagtggc ttcgctatct caggttttaa tgtcaaccac ctggacattg     1500
ccccacgcta tgccagcatt ctcatgggga tctcaaacgg agtgggaacc ctctctggaa     1560
tggctctgcc cctcattgtc ggtgcaatga ccaggcacia gaccctgaa gaatggcaga     1620
atgtgttctt catagctgcc ctggtgcatt acagtgggtg gatcttctat ggggtctttg     1680
cttctgggga gaaacaggag tgggctgacc cagagaatct ctctgaggag aatgtggaa     1740
tcattgacca ggacgaatta gctgaggaga tagaactcaa ccatgagagt tttgogagtc     1800

```

ccaaaaagaa gatgtcttat ggagccacct cccagaattg tgaagtccag aagaaggaat 1860
 ggaaaggaca gagaggagcg acccttgatg aggaagagct gacatcctac cagaatgaag 1920
 agagaaactt ctcaactata tcctaattgtc tgagaggcac ttctgtcttc tccttacttt 1980
 agaaacagaa agtatccata cctattgcct ttcttgtagc ccagcttgcc agaggtccaa 2040
 atattgggag gggagaagat ctaaccagca acagggaaaa gagaaatatt atctttcaat 2100
 gacatgtata ggtaaggagc tgcgctcagt tgataacata gttgataata catatTTTT 2160
 gaattgacag ttgacccttc tctcaaagag ctaaacttat tcagaaagga atgactagaa 2220
 gaaaaaggag acaataccat gttgttcaaa gaaacattga aggaaattgg gatgtttggc 2280
 cagaaggaat gtaaacagta gtagtagctg ccaccacatc tctagggtag ccatgcagag 2340
 gagggcttca tattcccaat aaaccccacg ttgtggcagg tgctttataa acactcttat 2400
 ttaatctcca cacctttatg acacacattt cttatcccca ttttacaacc aaggcatcta 2460
 aagcaacaag aatgaactt gcccaaggtc atctgccagg gtcagtgtg agactgttga 2520
 agctctcaat agtgggcagt tttagggag atttccattc agttaggga agacatttgt 2580
 aataatgaaa actgaaaatg gagtaattgt gagtaactca ccactttagc aggtgttggg 2640
 gaagggaaac atttgggttg atgaggcaga ggggattcaa atgtgtgaga ggctagattc 2700
 aaagaccctc agtgttctat gttatctgaa gagtcaaatg gttttgtgac tccatagttt 2760
 ttaaagtaat aagggtcaaa gactacatca gagattcaaa taggttttta aagaaaagct 2820
 aagcaagaga gccaaatTTT tagaaatctg atggtcaaaa tagctgaaag cagtaaaaa 2880
 gagattggct attaaatTTc aactttccat aatattaaga atgtagctaa atgatgtccc 2940
 aaactactta caaactTTta agacatttaa taatttaaga agtaggttca tgtgttttct 3000
 taggtaaagt tcttctgaaa gaattttota ttttaaaa atgtatctct ttagcctttt 3060
 ctgctggaga ttatattagg aagtttcatc agattgtata aaattatgat tttgtatcaa 3120
 aagtattcat gatgactcta tttggaatga tattcagggg aatcacaata atatagcagt 3180
 agttatacag agaaatacta caatgaaaac atttggggca attagacctc cagttactgt 3240
 tgaaaaatTC acctttgatt gcataaggca attacatgga tactttttaga tatatttaaa 3300
 atTTtaacat tggcatctaa agtgttatTT gaaaaTaaaa ttattttcct gttcattgat 3360
 tTTaaacatt ttattcctac tttcagaaga aaaatataat acggaaaaaa ttatagattt 3420
 acttgtagct tattattgta aagtgttttt tttttttttc taatttctcc cacatgtatt 3480
 tctggTcccc agtgatacta gctgagttgt agtgtatTTT ataaatggaa taatcttggg 3540
 gaaaaattgc gattcttcat taaataatat tctttatgtc actagcatac aatttatgTT 3600
 agtagacatc tTTaaatctc tTTaatgagt gaatccatgc aagccccata aaacagttcc 3660

```

tagcatgcag aaaatgcccc cgtaaatagc tgcatacatc attatctttt aacattttgg 3720
gggactttcc agttgaaaag aaaacatgct atgtcatttt tatccattat ccttgggaact 3780
tattgtgaaa gttgtgctgt tttctaagta aaataaaaaa taaaaaatta gcaattta 3838

```

<210> 110

<211> 21

<212> ARN

5 <213> Desconocido

<220>

10 <223> Secuencia diana de un (ARN)m de un miembro de la familia de los VGLUT complementaria a la secuencia de ARNdc de la invención (reivindicación 21).

<400> 110

aaguguacuu uaggcaaagg g

21

15 <210> 111

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cadena sentido del ARNdc complementaria a la secuencia diana arriba indicada (reivindicación 22).

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> T = dT (desoxitimidina)

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> T = dT (desoxitimidina)

<400> 111

guguacuuua ggcaaagggt t

21

<210> 112

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena antisentido del ARNdc complementaria a la secuencia diana
arriba indicada (reivindicación 22).

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

15 <223> T = dT (desoxitimidina)

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

20 <223> T = dT (desoxitimidina)

<400> 112

cccuuugccu aaaguacact t

21

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de ARNsi específicas de VGLUT con una secuencia seleccionada entre

si-rVGLUT2 100-120 EGT

5' GCA GGA UAA CCG AGA GAC CTT 3'
3' TT CGU CCU AUU GGC UCU CUG G 5'

si-rVGLUT2 100-120 AMB

5' GCA GGA UAA CCG AGA GAC CTT 3'
3' TT CGU CCU AUU GGC UCU y G 5' und

si-rVGLUT2 166-186 AMB

5' GGC UCC GCU AUG CGA CUG UTT 3'
3' TT CCG AGG CGA UAC GCU GAC A 5'.

5

2. Célula aislada que contiene al menos una molécula de ARNsi según la reivindicación 1, a excepción de células madre embrionarias humanas.
3. Medicamento que contiene al menos una molécula de ARNsi según la reivindicación 1 y/o al menos una célula según la reivindicación 2 y en caso dado también sustancias auxiliares y/o aditivos adecuados.
- 10
4. Sistema de diagnóstico que contiene al menos una molécula de ARNsi según la reivindicación 1 y/o al menos una célula según la reivindicación 2 y en caso dado también aditivos adecuados.
5. Utilización de al menos una molécula de ARN-si según la reivindicación 1 y/o al menos una célula según la reivindicación 2 para la producción de un medicamento o un analgésico para el tratamiento del dolor, en particular del dolor crónico, alodinia táctil, dolor provocado térmicamente y/o dolor inflamatorio.
- 15
6. Utilización de al menos una molécula de ARNsi según la reivindicación 1 y/o al menos una célula según la reivindicación 2 para la producción de
- 20

un medicamento para el tratamiento de la incontinencia urinaria, síntomas neurógenos de la vejiga, prurito, tumores, inflamaciones, asma.

- 5
7. Molécula de ARNsi según la reivindicación 1 y/o célula según la reivindicación 2 para su utilización en la terapia genética, preferentemente en la terapia genética *in vivo* o *in vitro*.
8. Procedimiento *in vitro* para la inhibición de la expresión de al menos un miembro de la familia de los VGLUT en una célula, caracterizado porque se introduce una molécula de ARNsi según la reivindicación 1 en dicha célula.
- 10 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la molécula de ARNsi se incluye en estructuras micelares, preferentemente liposomas.
- 15 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 ó 9, caracterizado porque la molécula de ARNsi se incluye en cápsides virales naturales o en cápsides producidas por métodos químicos o enzimáticos o en estructuras derivadas de éstas.

Figura 1

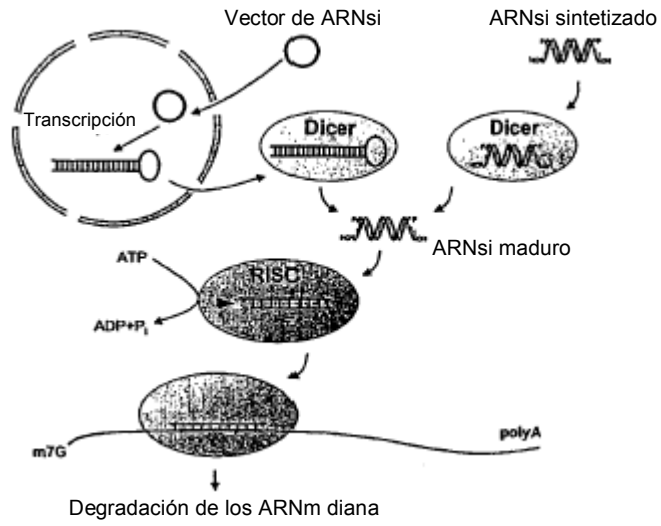


Figura 2

Figura 2a

A) ARNsi



B) ARNs largo



C) ARN de horquilla basado en ARNsi



D) ARN de horquilla basado en ARNmi



5

Figura 2b

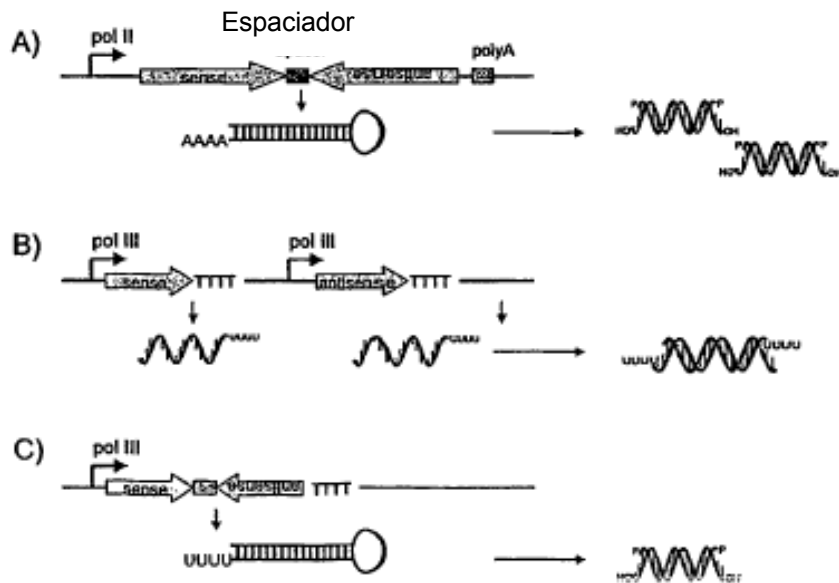


Figura 3

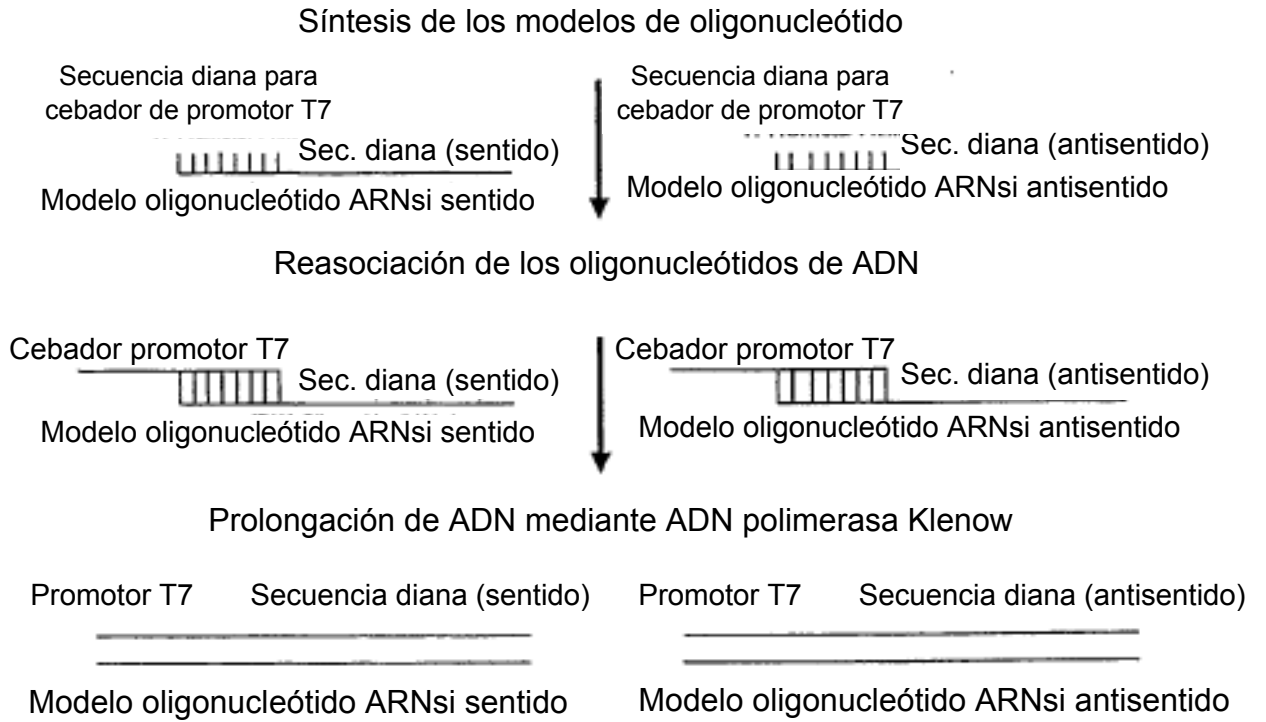


Figura 4

Modelo de transcripción ARNsi antisentido

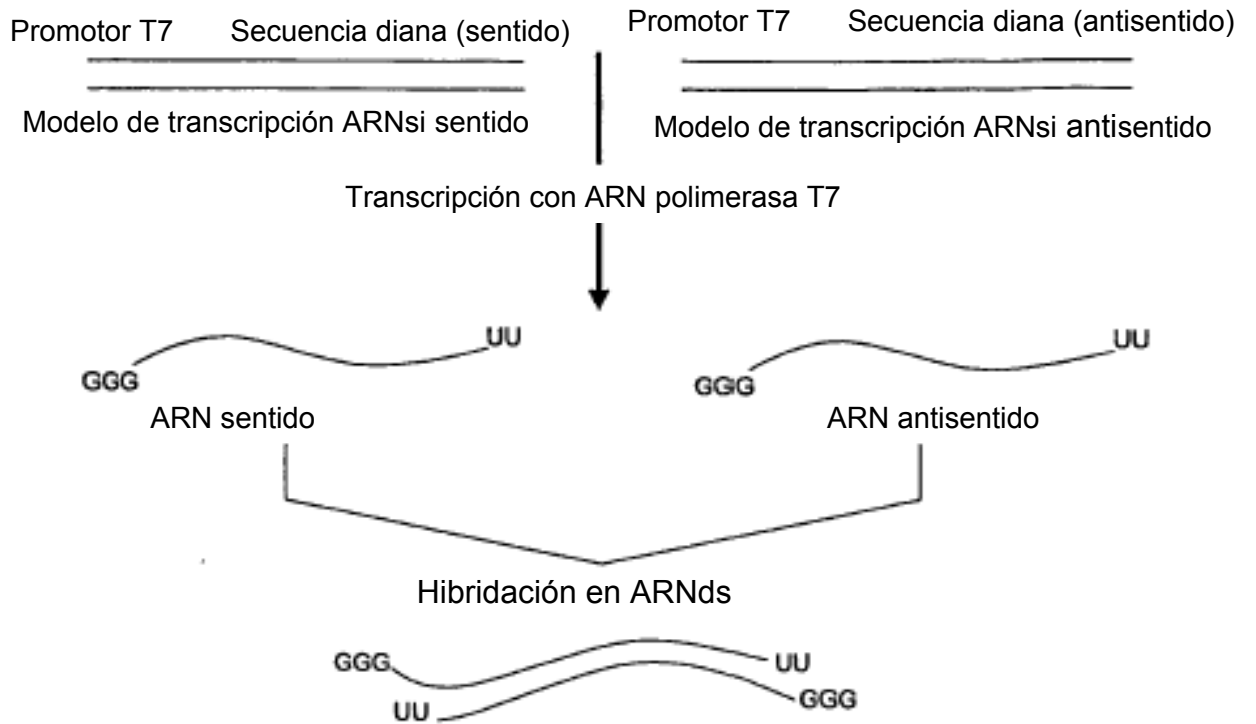


Figura 5

```

1 atggagttcc ggcaaggagga gtttcggaag ctggcggggc gcgccctggg gaggctgcac
61 cggttactgg agaa gcggca ggaaggcgcg gagacattgg agctqagcgc cgacggggcg
121 ccagtgacca caca cacgcg ggacccgccg gtggtggact gcacttgctt tggcctccct
181 cgccgctaca tca t cgcgat catgagcggc ctggggttct gcacagctt tggcatccgc
241 tgcaacctgg gcg t ggccat cgtatccatg gtcaacaaca gtacaacca ccgtgggggc
301 cacgtggtgg tgca gaaagc ccagttcaac tgggatccag agactgtcgg cctcatacat
361 ggctcctttt tctgggggta cattgtcact cagattcctg gaggatttat ctgcaaaaa
421 ttcgcagcca acag ggtctt tggctttgcc attgtggcta cctccaccct aaatatggtg
481 atcccttcag cag c ccgtgt tca ctatggc tgtgtcatct tcgtgaggat ccttcaggga
541 ttggtggagg ggg t cacata ccctgcttgc catggcatct ggagcaaatg ggccctccc
601 ttagaacgga gtcg gctggc gacgacagcc ttttgcgggt cctatgcccg ggagtggtt
661 gccatgcctc tgg c tggggc cctggtacag tattcaggat ggagttctgt cttctatgtc
721 tatggcagct tcgg gatctt ttggtacctg ttctggttgc ttgtctccta cgagtcacct
781 gcactacacc ccag catctc cgaggaggag cgcaaataca ttgaggatgc catcggagaa
841 agcgcceaagc tca t gaacct tgttacgaag tttaacacac cctggaggcg cttctttacc
901 tccatgcccg tca t gccat cattgtcgcc aacttttgcc gcagctggac tttctacctg
961 ctctcatct cca gcccgc ctactttgaa gaagtgttcg gctttgagat cagcaagggtg
1021 ggactggtgt cgg c actgcc tcacctgtc atgactatca tcgtacccat cggaggccag
1081 atcgccgact tcct gcgcag tcgtcatata atgtccacga ccaatgtgcg aaagctgatg
1141 aactgcgggg gtt t cgggat ggaagctacg ctgctgctgg tggtcggata ctcaactcc
1201 aagggcgtgg cca t ctctt cctggtcctg gctgtgggct tcagtggctt tgctatctct
1261 gggtttaacg tga a ccaact ggacatcgcc cctcgatatg ccagcatctt gatgggcatt
1321 tccaatggcg tgg c cacact gtctgggatg gtgtgcccc tcatcgtggg tgcaatgacc
1381 aagcacaaga cgc g ggagga gtggcagtac gtgttcctca tagcctccct ggtgactat
1441 ggaggtgtca tct t ctatgg ggtctttgct tcgggagaga aacagccgtg ggagagccg
1501 gaggagatga gcg a ggagaa gtgtggctt gttggccacg accagctggc tggcagtgac
1561 gaaagtgaaa tgg a agacga ggttgagccc ccggggggcac ccccgcacc tccgccttcc
1621 tacggggcca caca cagcac agttcagcct ccaaggcccc caccctctgt ccgggactac
1681 tga

```

Figura 6

```

1 atggagtcgg taaaacaag gatthttggcc ccggggaaag aggggataaa gaatthttgct
61 ggaaaatccc tcggacagat ctacaggggtg ctggagaaga agcaggataa ccgagagacc
      a agcaggataa ccgagagacc
121 atcgagctga cagaggacgg caagcccctg gaggtgcctg agaagaaggc tccgctatgc
181 gactgtacgt gcttcggcct gccgcgccgc tacatcatag ccatcatgag cggcctcggc
241 ttctgcatct cctttgggat ccgctgtaac ctgggtgtgg ccatgtgga catggtcaac
301 aacagcacca tccaccgggg tggcaaaagt atcaaggaga aagccaagt taactgggac
361 cccgagactg tggggatgat tcacgggtcg ttcttctggg gctatatcat cacgcagatt
421 ccgggaggat acatcgcatc gcgactggct gctaaccggg tctttggggc tgccatactg
481 cttacctcta ccctcaatat gctgatccca tctgcagcca gattcatta tggatgcgtc
541 atctttgtha gaatattgca aggacttgtg gagggcgtca cctaccagc ctgtcacggg
601 atatggagca agtgggcccc tcctttggag aggagtaggt tggctaccac ctcttctgt
661 ggttcctatg ctggagcagt cattgcaatg cccctagctg gtatcctggg gcagtaact
721 ggatggtctt cagtatttta cgtatatgga agctttggta tggctggtg tatgttctgg
781 cttctggtgt cttacgagag ccccgcaaag catccaacca taacagacga agaacgtagg
841 tacatagaag agagcatcgg ggagagcgca aatctgttag gagcaatgga gaaattcaag
901 accccatgga ggaagtthtt cacatccatg cccgtctatg cgataattgt tgcaaacttc
961 tgcaggagtt ggactthttt ttactgctc atcagtcaac cagcttatt cgaggaggt
1021 ttgggatttg aatcagcaa ggttggcatg ttgtctgagg tccacacct ggtcatgaca
1081 atcattgtgc ctatcggggg gcaaattgca gactttctaa ggagcaagca aattctttca
1141 acaactacag tgcgaaagat catgaactgc gggggthttg gcatggaagc cacactgctt
1201 ctggttgttg gctactctca tactagaggg gtggccatct ccttctggg gcttgcaagt
1261 ggattcagtg gatttgctat ctctggtttc aatgtgaacc acttgatgat tgccccgaga
1321 tatgccagta tctaatggg catttcaaat ggtgttggca cgctgtcggg aatggtctgc
1381 ccgatcattg ttggtgcaat gacgaagaac aagthcccgth aagaatggca gtatgtcttc
1441 ctcatcgtcg cactggtcca ctatggtgga qtcatathtt atgcaactt tgccctcagga
1501 gagaagcaac cttgggcaga ccctgaggaa acaagcgaag aaaagtgtgg cttcattcat
1561 gaagatgaac tggatgaaga aacgggggac atcactcaga attacataaa ttacgggtacc
1621 accaaatcct acggcgccac ctacagggag aacggaggct ggcctaaccg ctgggagaaa
1681 aaggaagaat ttgtgcaaga aagtgcgcaa gacgcgtact cctataagga ccgagatgat
1741 tattcataa

```

Figura 7

```

1 atgccattta acgcatttga taccttcaaa gaaaaaattt tgaaaccogg gaaaggaagga
61 gtgaagaatg ccgtgggaga ttcgctgggg atcttataaa gaaaactcga tggggaccaac
121 gaggagggag atgccattga gctgagtgag gaaggaaggc ccgtgcagac atccagagcc
181 cgagcccctg tgtgcgactg cagctgctgt ggcatcccca agcggtagat catcgctgtc
241 atgagtggcc tgggattctg catttccttt gggattcggg gcaaccttgg agtggccatt
301 gtggaatgg tcaacaatag cactgtgtat gtggatggga aaccggaaat ccagacagca
361 cagtttaact gggatccaga gacgggtggg cttatccatg gatcttttt ctgggggttat
421 attgtgacac aaattcccgg tggcttcatt tcaacaagt ttgctgctaa caggggtcttt
481 ggagctgcca tcttcttgac gtcaaccctg aacatgttca tccctccgc ggccaggggtg
541 cattacggct gtgtcatgtg tgtgaggatt ttgcagggtc tggtggaggg tgttgacctac
601 ccagcctgcc acgggatgtg gagtaagtgg gcacctcccc tggagagaag tcgtctagcc
661 acaacctctt tttgtggctc ctatgccggg gcagtcggtg ctatgcccc tgcaggagta
721 ttggtgcagt acattggctg ggcctctgtc ttttatattt acgggatgtt tggaattatt
781 tggtagatgt tttggctgct gcaggcttat gagtgtccag cagttcacc aacaatatcc
841 aatgaagaac ggacctacat agagacaagt ataggagaag gcgccaact ggccagtctg
901 agcaaatcca acacaccatg gagaaggttt ttcacatcct tgcctgtcta tgcattatt
961 gtggcaaaact tttgtagaag ctggaccttc tatttgcctc taataagtca gcctgcttac
1021 tttgaagagg tctttgggtt tgcaataagt aaggtgggtc tcttgtcagc tgtcccacac
1081 atggtgatga caatcgtggt acccattgga ggacaactgg ctgattattt aagagccga
1141 aagattttga ccacaactgc tgtcagaaag atcatgaatt gtggaggctt tggcatggag
1201 gcaaccttgc tctggtggt tgggttttcc cataccaag gagtggctat ctccttctg
1261 gtgcttgctg taggatttag tggctttgca atttcaggt tcaatgtcaa ccacctggac
1321 attgctccac gatatgccag catcctcatg gggatctcaa atggcgtggg aaccctctct
1381 ggaatggttt gtcccctcat tgttgggtgca atgacaaagc acaagacccg ggaagaatgg
1441 cagaatgtgt tcctcatagc agccctgggt cactacagt gagtcatct ctacggggctc
1501 tttgcttctg ggaaaaaca ggactgggct gatccagaga atctctctga ggagaaatgt
1561 ggaatcattg accaagatga attagccgag gaaacagaac tcaaccagga ggctttctgta
1621 agtcccagaa agaagatgtc ttatggagcc accaccagaa attgtgaggt ccagagagcg
1681 gatcggagac aacagagaga atccgccttc gagggggagg agccattatc ctaccagaat
1741 gaagaggact tttcagaaac atcttaa

```

Figura 8

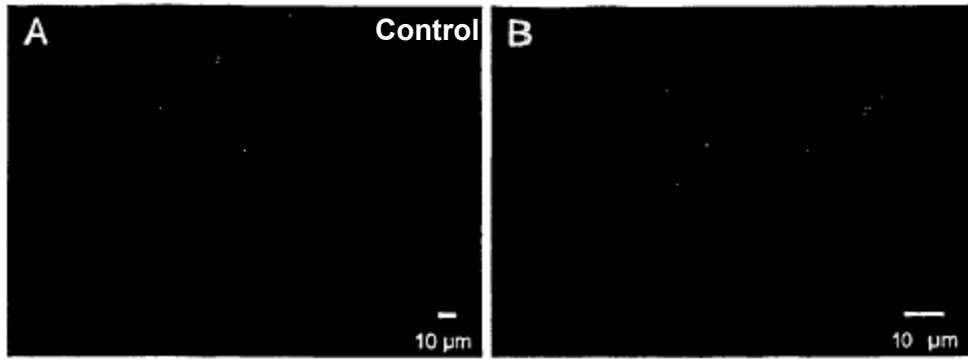


Figura 9

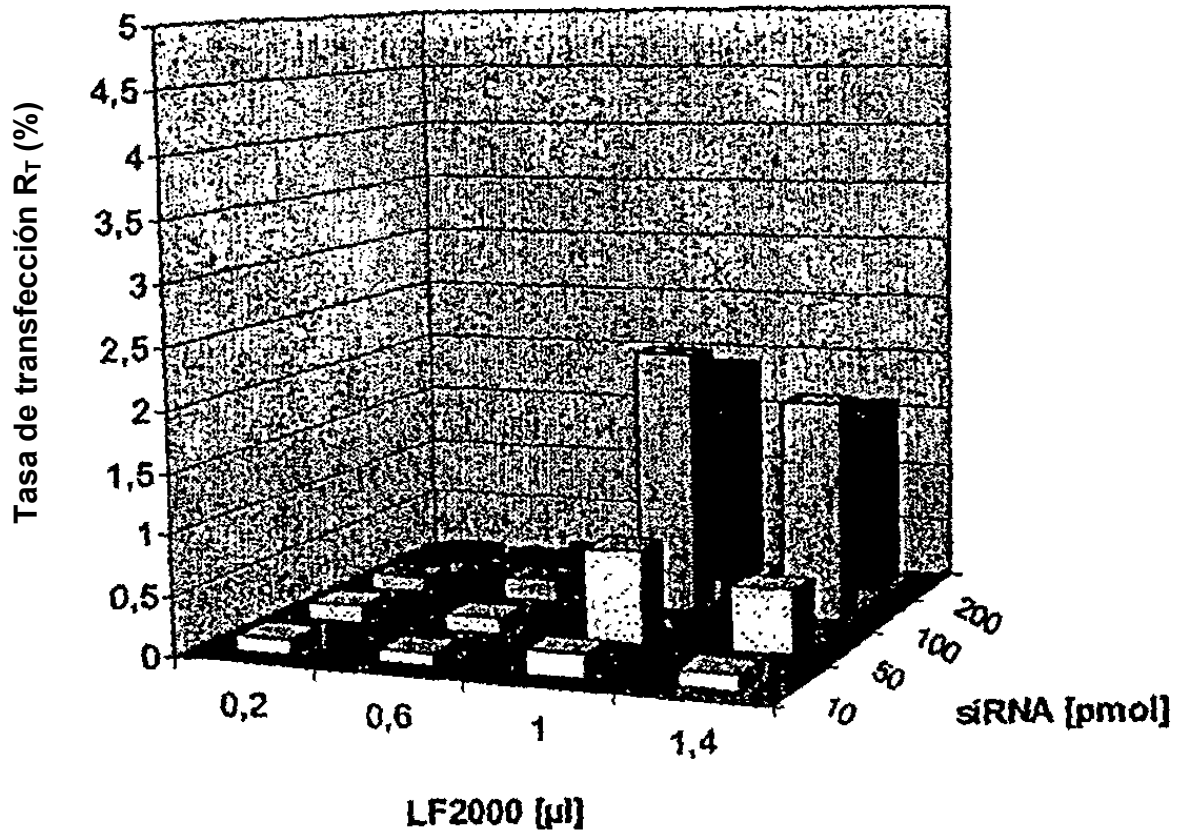


Figura 10

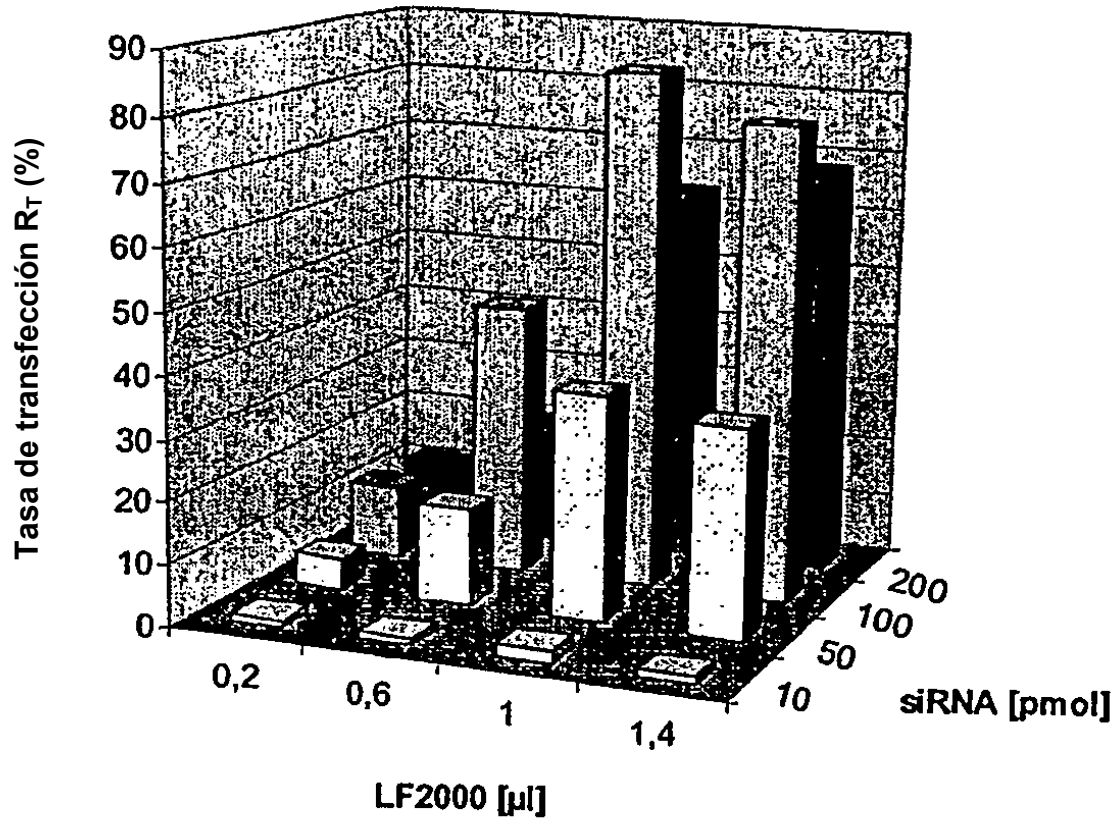


Figura 11

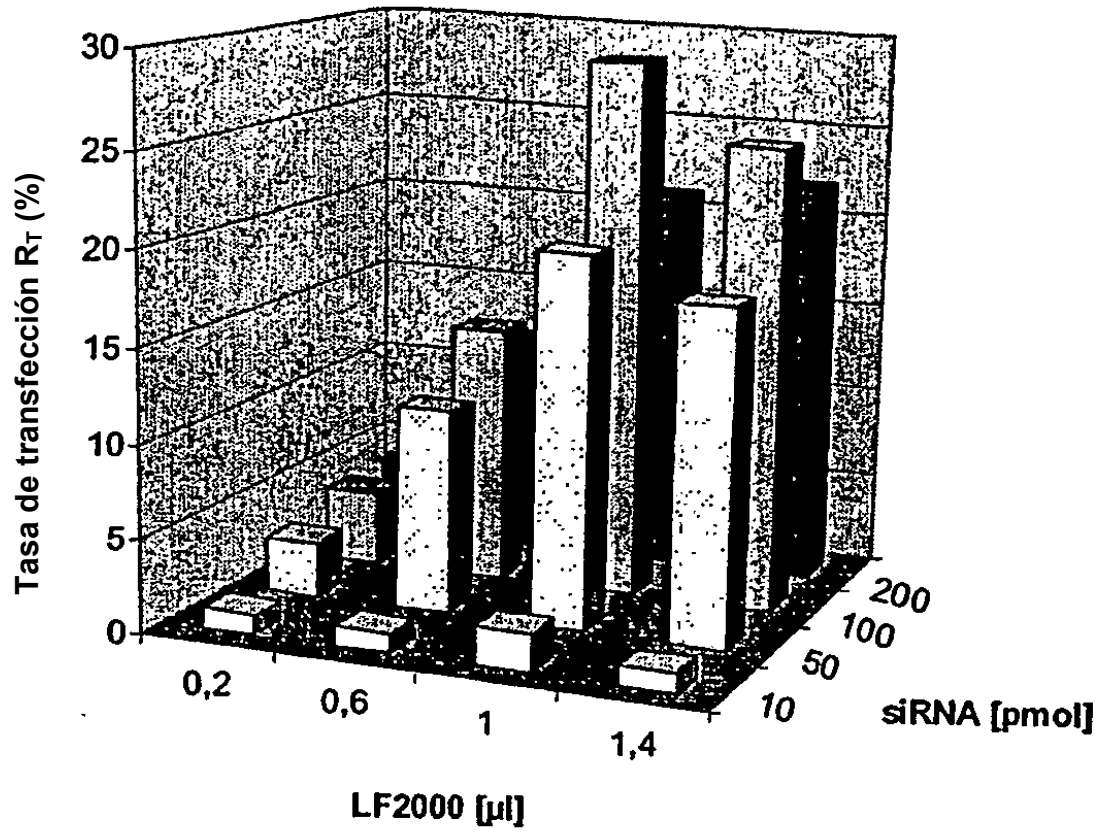


Figura 12

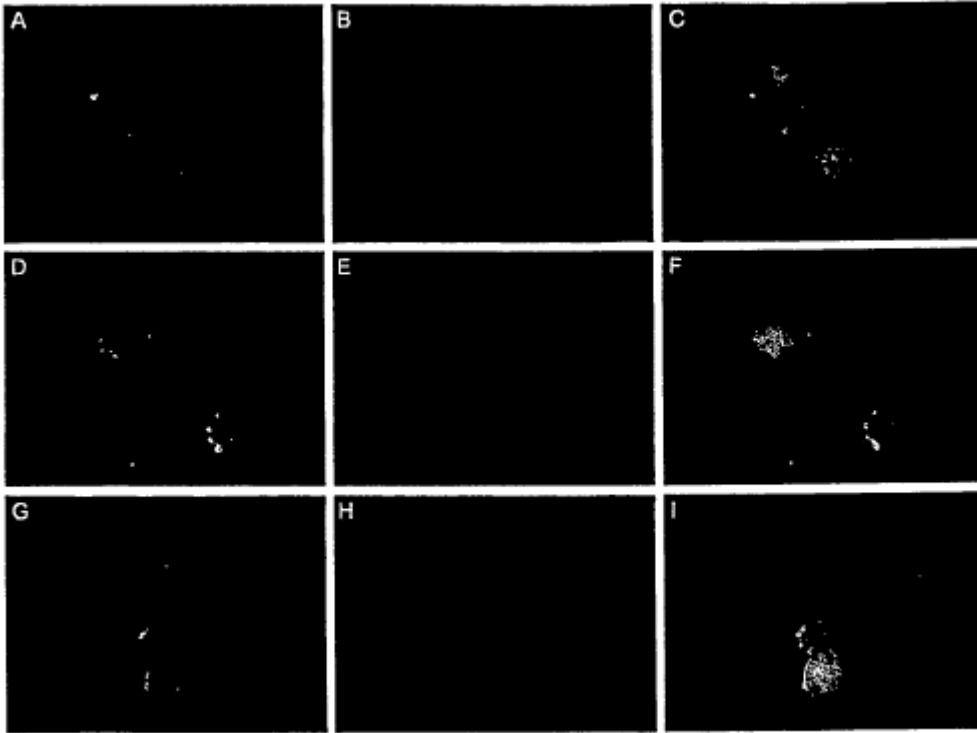


Figura 13

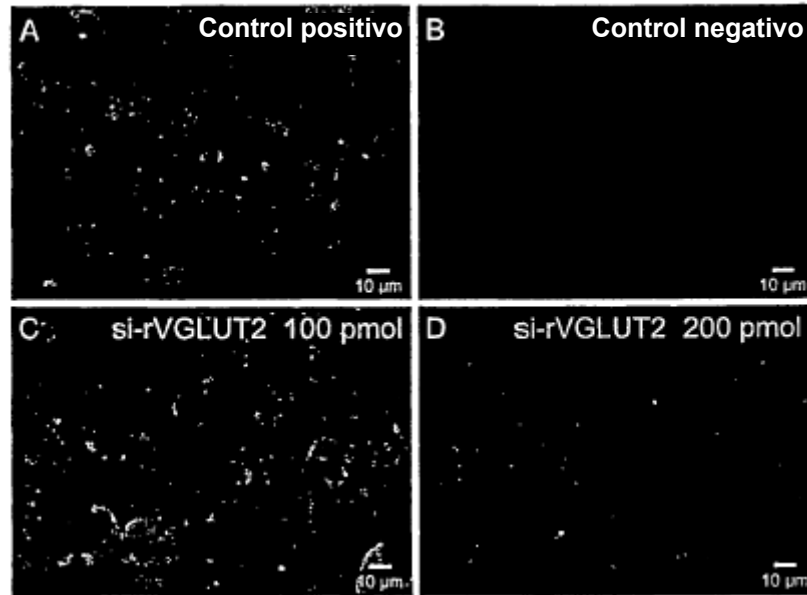


Figura 14

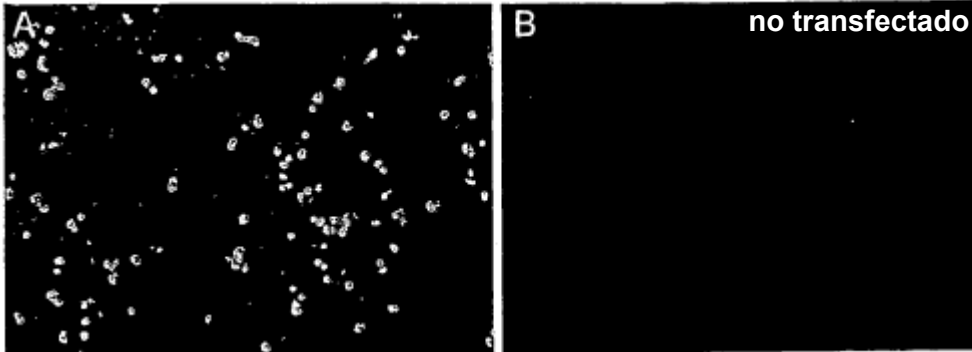


Figura 15

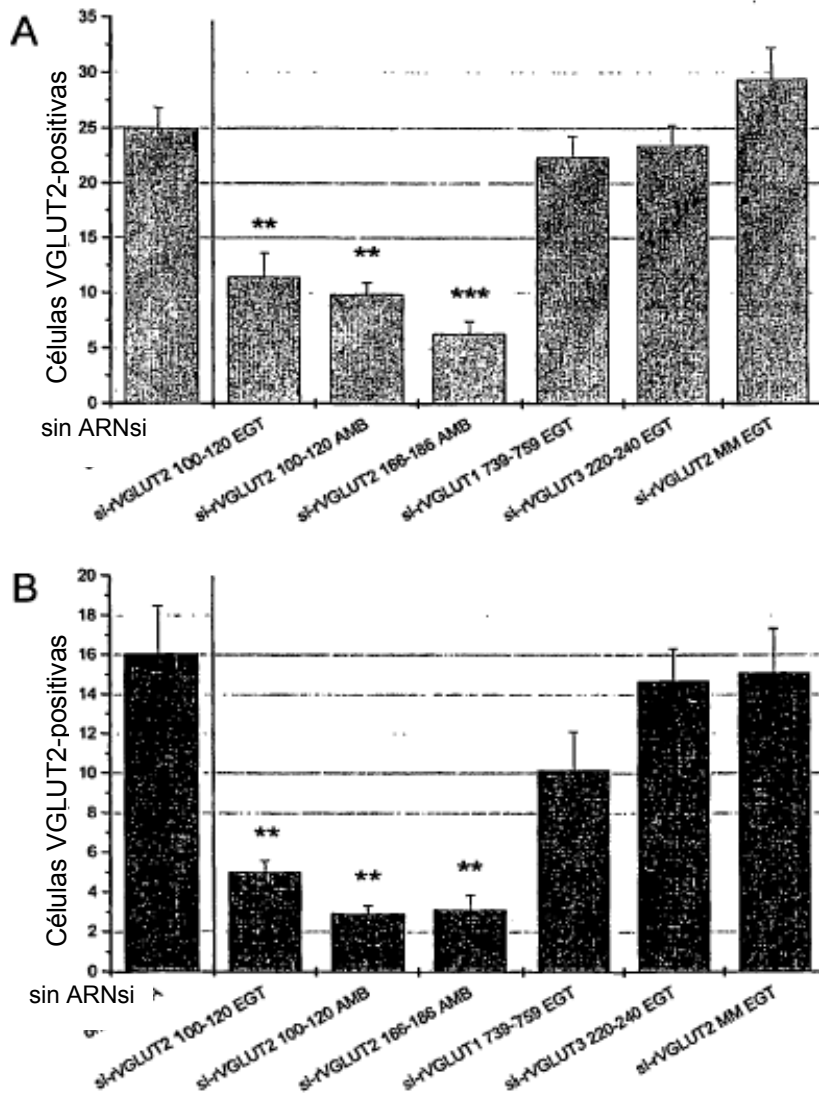


Figura 16

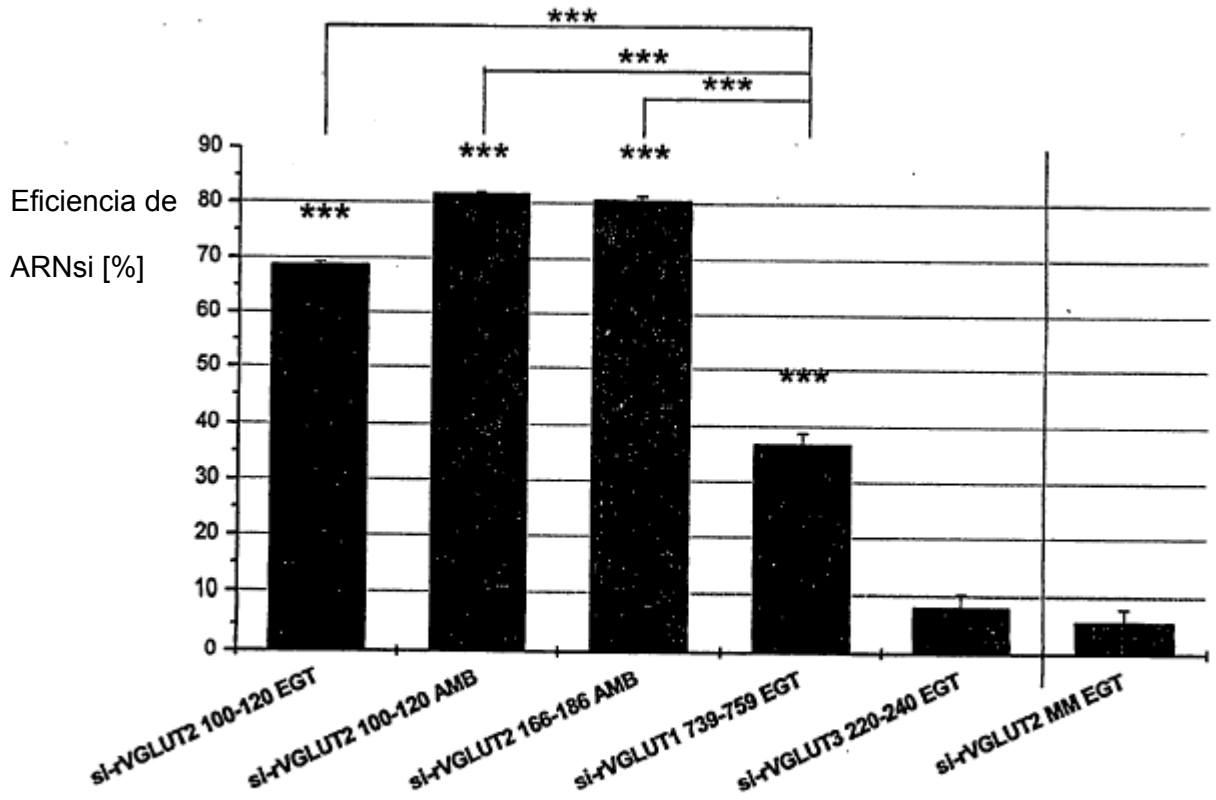


Figura 17

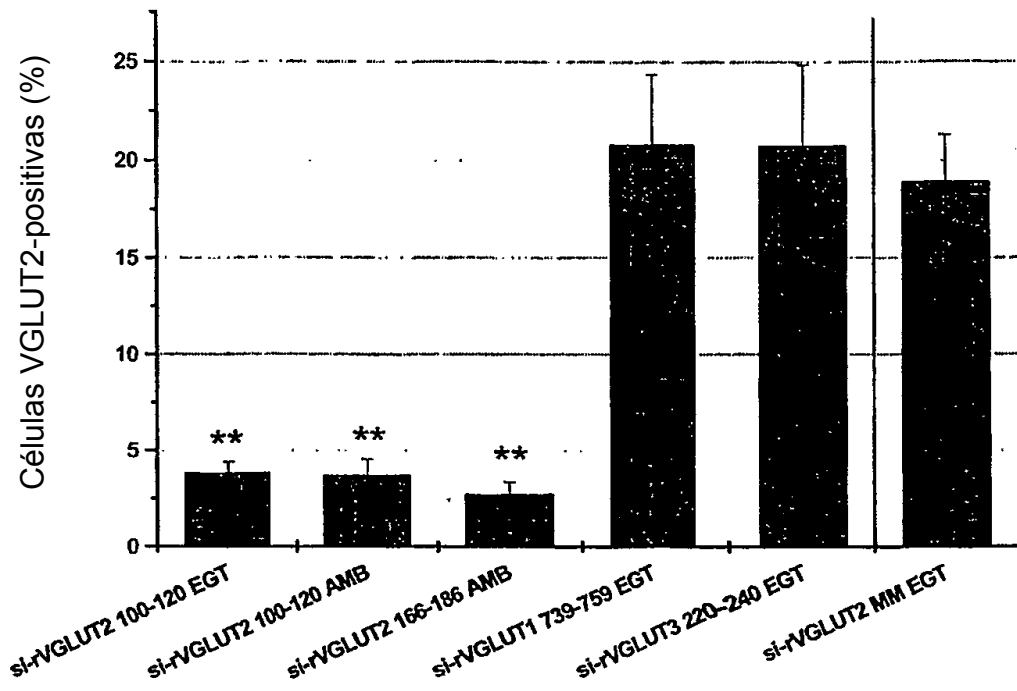


Figura 18

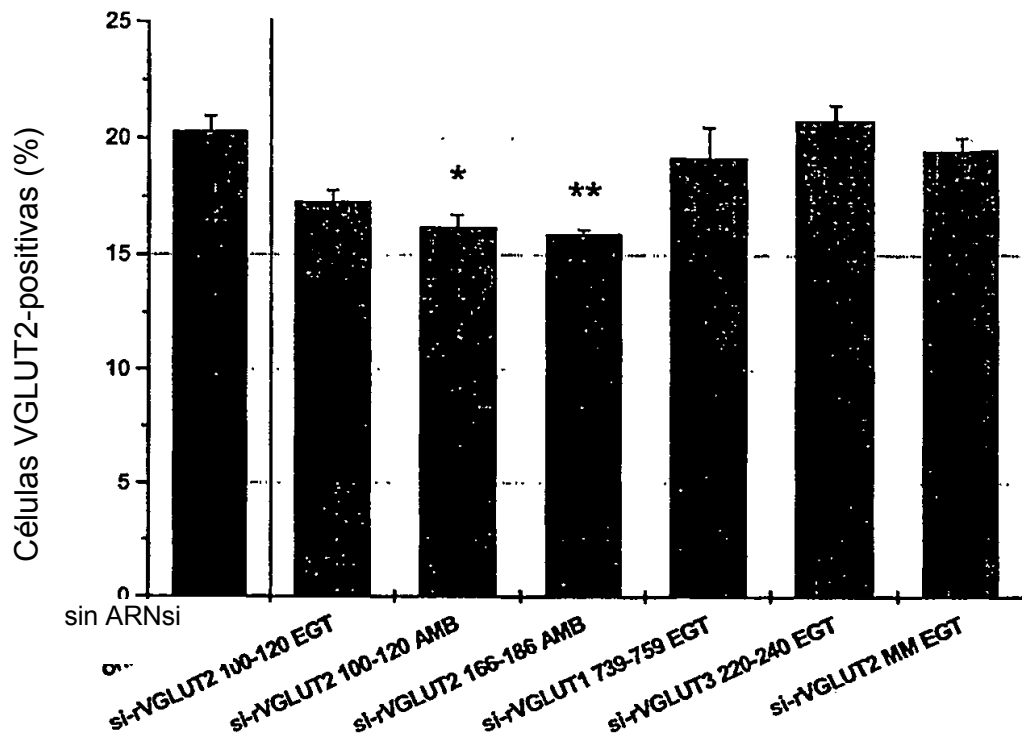


Figura 19

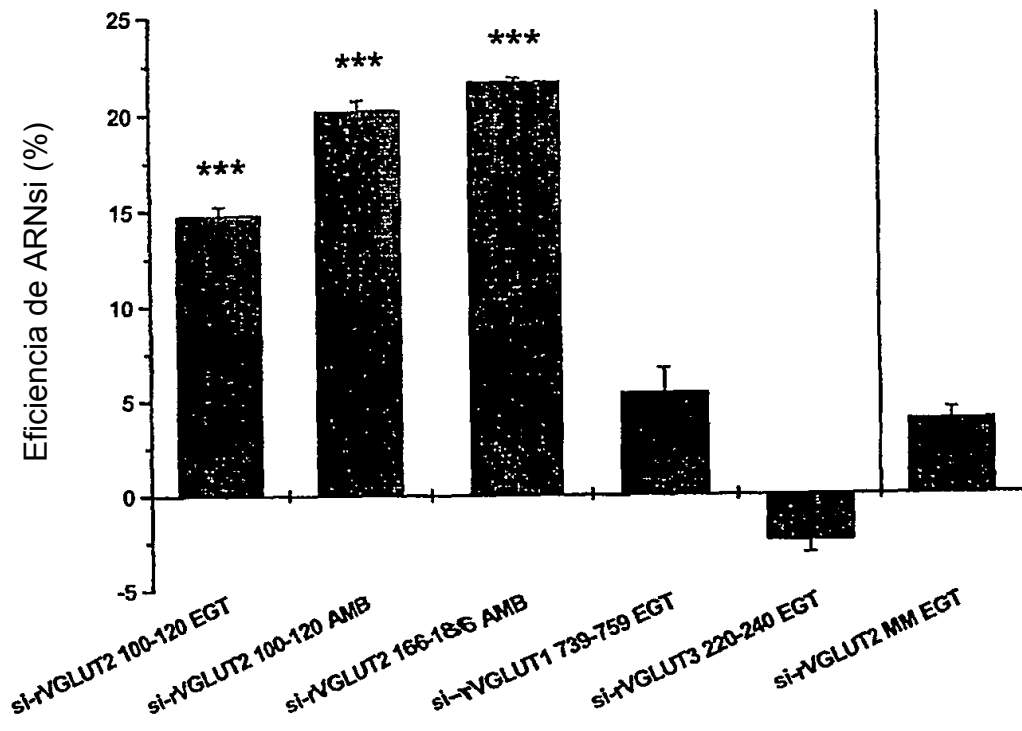


Figura 20



Figura 21

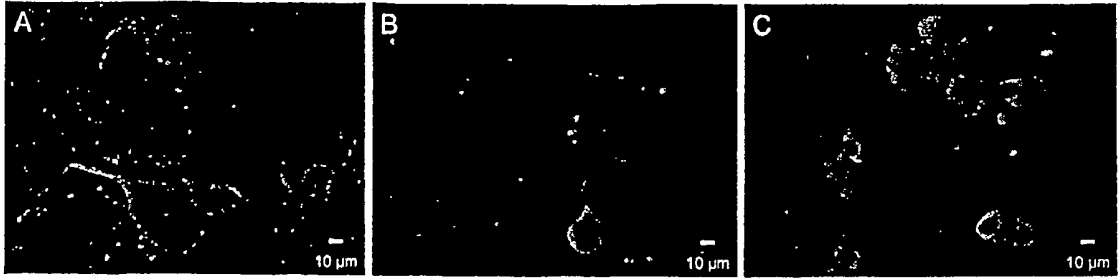


Figura 22

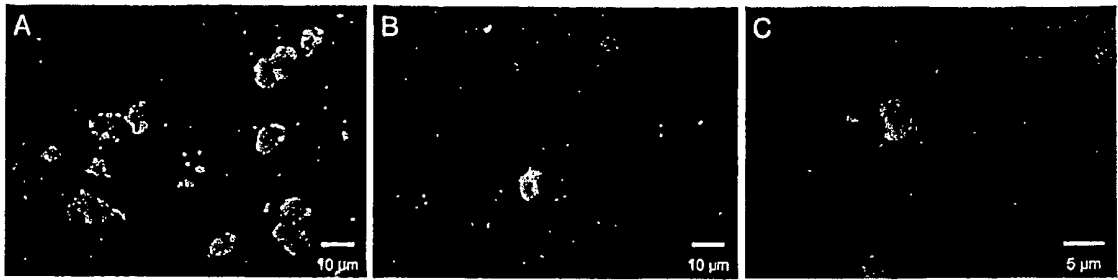


Figura 23

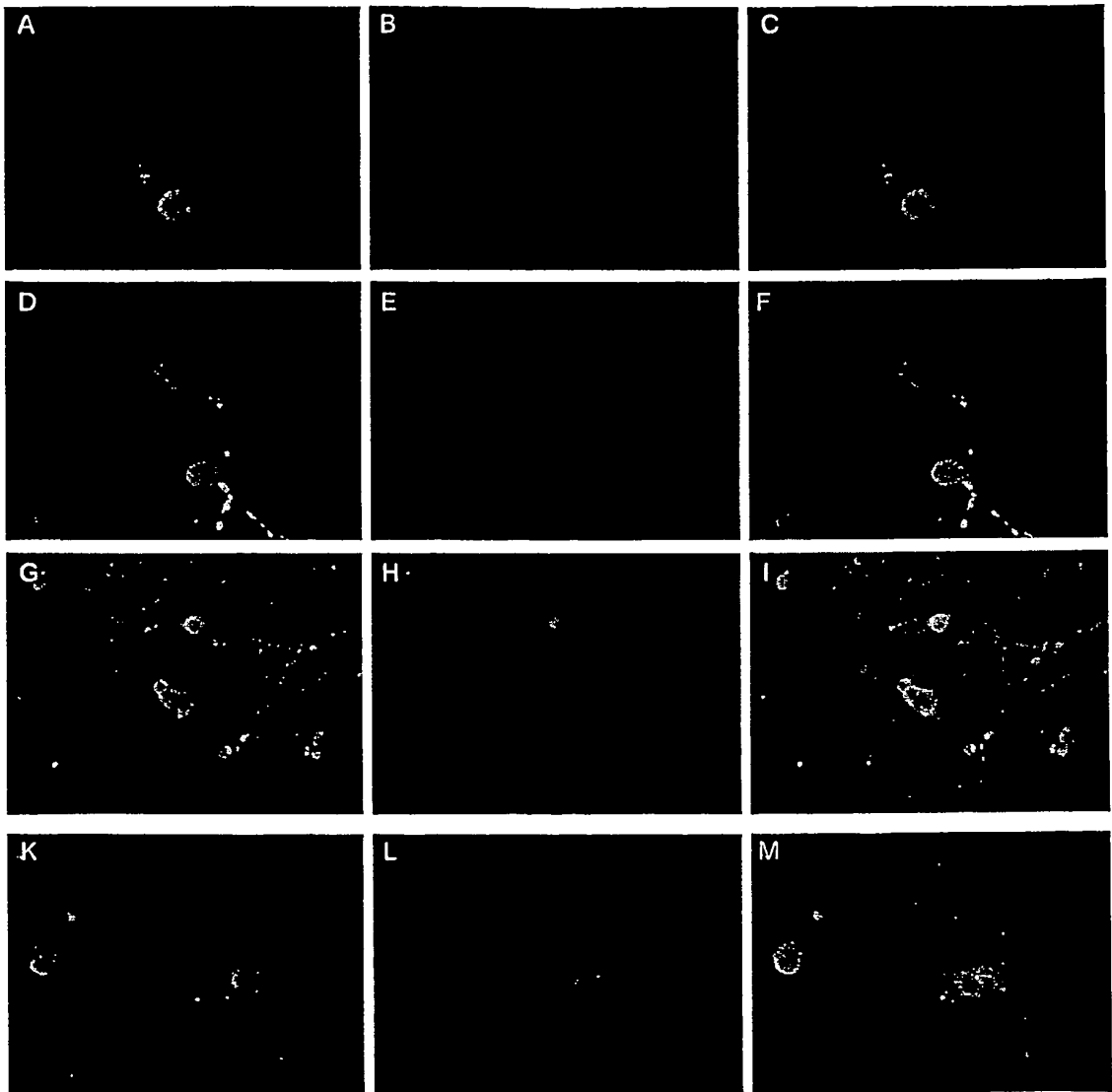


Figura 24

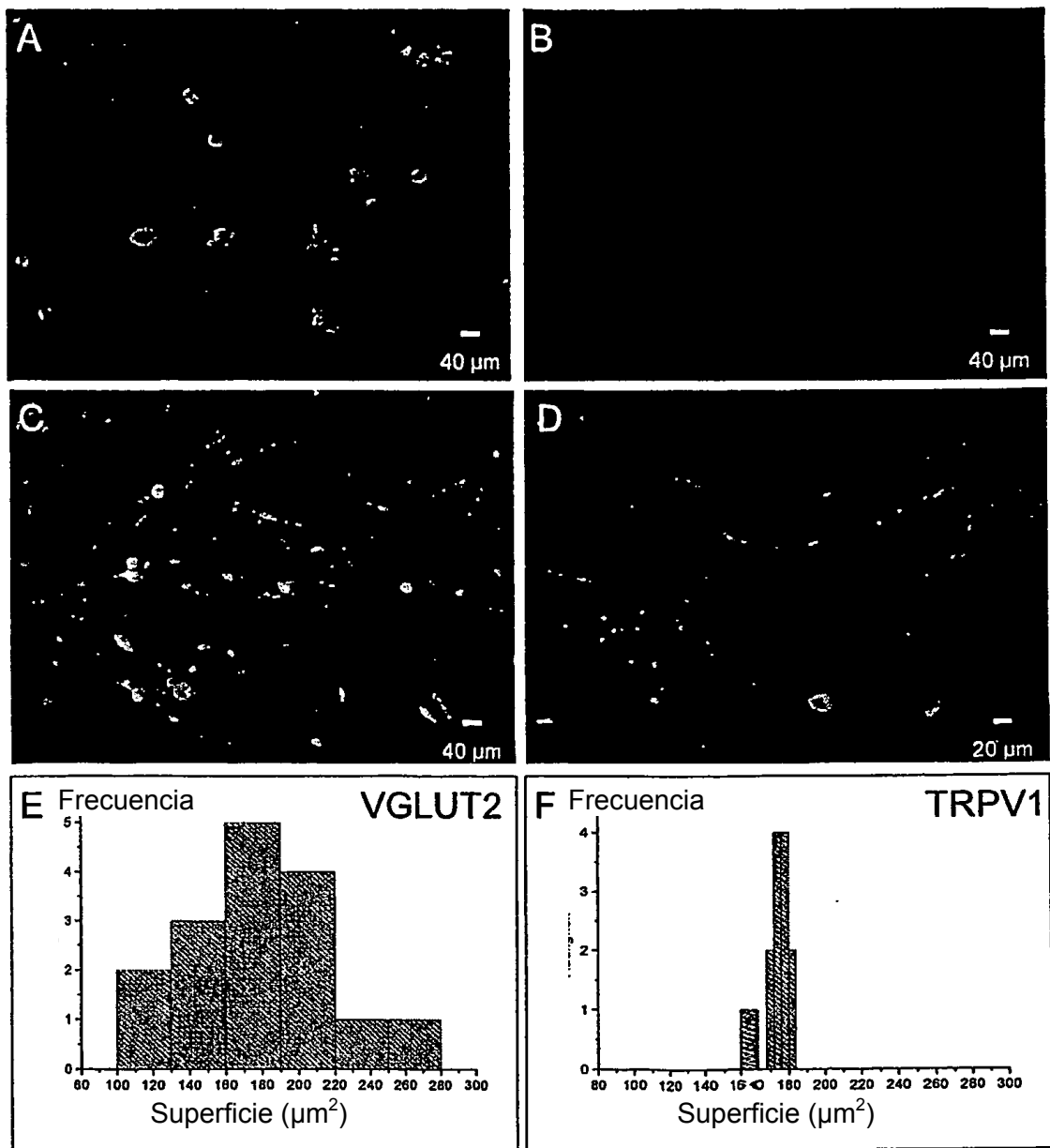


Figura 25**VGLUT**

VGLUT	Especie	Secuencia de ADNc			Sec. aminoácidos Nº acceso	Figura 27 Secuencias de ADNc
		nº acceso	Longitud [bp]	Sec. codificadora		
VGLUT1	humano	BC059379	2959	148-1830	AAH59379	1
	humano	NM_020309	2366	22-1704	NP_064705	
	rata	NM_053859	2024	124-1806	NP_446311	
VGLUT2	humano	NM_020346	3946	414-2162	NP_065079	2
	rata	NM_053427	3982	463-2211	NP_445879	
	ratón	BC038375	3728	185-1933	AAH38375	
	ratón	NM_080853	4078	569-2317	NP_543129	
VGLUT3	humano	NM_139319	3838	177-1946	NP_647480	3
	humano	HSA459241	3838	177-1946		
	rata	NM_153725	3172	607-2373	NP_714947	
	ratón	NM_182959	4481	366-2171	NP_892004	

Figura 26

VGLUT	Nº acceso	Secuencia diana de ADN	Posición ¹	Contenido de GC
VGLUT1	NM 020309	AACGTGCGCAAGTTGATGAAC	1122	47,6
		AAGTTGATGAACTGCGGAGGC	1131	52,4
VGLUT2	NM 020346	AATGCCTTTAGCTGGCATTCT	686	42,9
		AATGGTCTGGTACATGTTTTG	758	38,1
		AAAGTCCTGCAAAGCATCCTA	796	42,9
		AAGTCCTGCAAAGCATCCTAC	797	47,6
		AAGAACGTAGGTACATAGAAG	829	38,1
		AATTGTTGCAAACCTTCTGCAG	944	38,1
		AAATTAGCAAGGTTGGTATGC	1030	38,1
		AATTAGCAAGGTTGGTATGCT	1031	38,1
		AAGGTTGGTATGCTATCTGCT	1038	42,9
		AAGCAAGCAGATTCTTTCAAC	1121	38,1
		AACCACTTGGATATCGCTCCA	1296	47,6
		AATGGGCATTTCGAATGGTGT	1334	42,9
		AATAAGTCACGTGAAGAGTGG	1407	42,9
		AAGTCACGTGAAGAGTGGCAG	1410	52,4
		AAGAGTGGCAGTATGTCTTCC	1420	47,6
		AATATTTGCCTCAGGAGAGAA	1484	38,1
		AAGTCTTATGGTGCCACAACA	1623	42,9
		AATGGAGGTTGGCCTAGTGGT	1650	52,4
		AAGACTCACATAGCTATAAGG	1708	38,1
VGLUT3	NM 139319	AATCTTGAGATTGCCATTGTG	282	42,9
		AACCGGAAATTCAGACAGCAC	340	47,6
		AAACAGTGGGCCTTATCCATG	379	47,6
		AATCCAGGTGGTTTCATTC	431	38,1
		AACATCGACTCTGAACATGTT	497	38,1
		AAGGTTTAGTGGAGGGTGTGA	574	47,6
		AAGAGGTCTTTGGATTTGCAA	1024	38,1
		AATAAGTAAGGTGGGTCTCTT	1043	38,1
		AAGTAAGGTGGGTCTCTTGTC	1046	47,6
		AAGGTGGGTCTCTTGTCAGCA	1050	52,4
		AATCGTTGTACCTATTGGAGG	1091	42,9
		AAGACCCGTGAAGAATGGCAG	1422	52,4
		AAGAATGGCAGAATGTGTTCC	1432	42,9
		AATCATTGACCAGGACGAATT	1562	38,1
		AACTCAACCATGAGAGTTTTG	1597	38,1
		AAAGAAGATGTCTTATGGAGC	1628	38,1
		AAGAGCTGACATCCTACCAGA	1717	47,6

- 1 Posición: corresponde a la cantidad de bases del extremo 5' de la secuencia diana, correspondiendo la primera base del codón de iniciación a la posición 1.

Figura 27 A

	VGLUT1	humano	BC059379			
1	acttgcagcc	tccttcccc	cgagcggagc	tgcggggccg	gccgggccgg	ggcggacc
61	gggaaccgg	acgcggccgc	ccggggccgc	gggcggggg	atcggcgggg	gggaccgcg
121	gggtgaccg	cggcaggagc	cgccaccatg	gagttccgcc	aggaggagt	tccgaagcta
181	gcgggtcgtg	ctctcgggaa	gctgcaccgc	cttctggaga	agcggcagg	aggcgcggag
241	acgctggagc	tgagtgcgga	tgggcgccc	gtgaccacgc	agaccggga	cccgcgggtg
301	gtggactgca	cctgcttcgg	cctccctcgc	cgctacatta	tcgccatcat	gagtggtctg
361	ggcttctgca	tcagctttgg	catccgctgc	aacctgggcg	tggccatcgt	ctccatggtc
421	aataacagca	cgaccaccgc	cgggggccac	gtggtggtgc	agaaagcca	gttcagctgg
481	gatccagaga	ctgtcggcct	catacacggc	tcctttttct	ggggctacat	tgtcactcag
541	attccaggag	gatttatctg	tcaaaaattt	gcagccaaca	gagtttctcg	ctttgctatt
601	gtggcaacat	ccactctaaa	catgctgac	ccctcagctg	cccgcgtcca	ctatggctgt
661	gtcatctctg	tgaggatcct	gcaggggttg	gtagaggggg	tcacataacc	cgctgccat
721	gggatctgga	gcaaattggc	cccaccctta	gaacggagtc	gcctggcga	gacagctttt
781	tgtggttcct	atgctggggc	ggtggtcgg	atgcccctcg	ccggggtcct	tgtgcagtac
841	tcaggatgga	gctctgtttt	ctacgtctac	ggcagcttcg	ggatcttctg	gtacctgttc
901	tggctgctcg	tctcctacga	gtcccccgcg	ctgcacccaa	gcctctcgg	ggaggagcgc
961	aagtacatcg	aggacgccat	cggagagagc	gcgaaactca	tgaaccccc	cacgaagttt
1021	agcactccct	ggcggcgctt	cttcacgtct	atgccagtct	atgccatcat	cgtggccaac
1081	ttctgcccga	gctggacggt	ctacctgctg	ctcatctccc	agcccgccta	cttcgaagaa
1141	gtgttcggct	tcgagatcag	caaggtaggc	ctggtgtccg	cgctgcccc	cctggctcatg
1201	accatcatcg	tgcccatcgg	cggccagatc	gcggaacttc	tgcggagccg	ccgcatcatg
1261	tccaccacca	acgtgcgcaa	ggtgatgaac	tgcggaggct	tcggcatgga	agccacgctg
1321	ctggttggtg	tcggctactc	gcactccaag	agcgtggcca	tctccttctt	ggtcctagcc
1381	gtgggcttca	gcggtctcgc	catctctggg	ttcaacgtga	accacctgga	catagcccgg
1441	cgctacgcca	gcctcctcat	gggcatctcc	aacggcgtgg	gcacactgtc	gggcatgggtg
1501	tgccccatca	tcgtgggggc	catgactaag	cacaagactc	gggaggagtg	gcagtacgtg
1561	ttcctaattg	cctccctggg	gcactatgga	ggtgtcatct	tctacgggg	ctttgcttct
1621	ggagagaagc	agccgtgggc	agagcctgag	gagatgagcg	aggagaagtg	tggcttcggt
1681	ggccatgacc	agctggctgg	cagtgacgac	agcgaatgg	aggatgagg	tgagcccccg
1741	ggggcacccc	ctgcaccccc	gccctcctat	ggggccacac	acagcacatt	tcagcccccc
1801	aggccccac	cccctgtccg	ggactactga	ccatgtgcct	cccactgaa	ggcagtttcc
1861	aggacctcca	ttccactcat	ctctggcctg	agtgcagctg	tcaaggaac	ctgctcctct
1921	ctgtctcctc	tcaggcctaa	gaagcactct	cccttgcttc	cagtgtgtc	aaatcctctt
1981	tccttcccaa	ttgcctctca	ggggtagtga	agctgcagac	tgacagttc	aaggataacc
2041	aaattcccct	aaaggttccc	tctccaccgg	ttctgcctca	gtggttca	atctctcctt
2101	tcagggtctt	atltgaaatg	acagttcgac	ctcttactct	ctcttggtg	tttgaggcac
2161	ccacaccccc	cgctttcctt	tatctccagg	gactctcagg	ctaacccttg	agatcactca
2221	gctcccatct	cctttcagaa	aaattcaagg	tcctcctcta	gaagtttca	atctctccca
2281	actctgttct	gcctcttcca	gattggttta	accaattact	tgtccccgc	attccaggg
2341	ttgattctca	ccagcgtttc	tgatggaaaa	tggcggtttc	aagtccccga	ttccgtgcc
2401	acttcacatc	tcccctacca	gcagattctg	cgaaagcacc	aaatttctca	agaccctctt
2461	ctccctagct	tagcataatg	tctggggaaa	caaccaaatt	cgcaatttta	acaatatgcc
2521	tctctacccc	cgtgcacttt	ttctgacatg	gttttcaggt	ctaaatagt	gctgctccag
2581	tccatgaact	caaaggtttg	aagctaccac	cattgaactc	ccccatggtg	gtttcatgat
2641	gccccctccc	caattcctcg	cactttatct	tctggtgg	tttcgaacta	cctgtttctt
2701	cagtggccat	ttgttggtgc	cctcaggggc	ttaatgactc	aaaatctggg	atccttcccc
2761	tctcagacac	ccctctttca	gottagaatt	tggggaacct	atagagaagt	cacagaatcc
2821	catgaaagg	aatggggcag	gagacagggg	tgtttttcc	cagtgcagg	ttgtgtcttt
2881	gtgtctctgt	ctctgtgact	gtaaatcctg	ccctgcccc	ctcccaata	aagctttggt
2941	gtataggcaa	aaaaaaaa				

Figura 27 B **VGLUT2** **humano** **NM_020346**

```

1  cgtttaaaag ccatcagatt tgagagcaat aagtcttcaa aaccgggaat ttacattggt
61  tttcagctga ccgacttcca ggaaaaggac tcaaccgcat ctacccaaat accgtggcac
121 tgcttgcgct ctttgccacc ggatactccc cttccaatga gactttctga ttgtgtctac
181 caactctcct attaggaaac ccgtgggttg catgcagcta ttctgttgta ttctcattct
241 caotctccct ccottctctc actctcactc ttgctggagg cgagccacta ccattctgct
301 gagaaggaaa agcccgcaac tactttaaga gattaagaca atatgcgcaa tcctcgcctt
361 tcctagcaat cactatttaa atctggcaag aactgacaac agtctttgca agaatggaaat
421 ccgtaaaaca aaggattttg gccccaggaa aagaggggct aaagaatfff gctgaaaaat
481 cactcggcca gatctacagg gtgctggaga agaagcaaga caccggggag acaatcgagc
541 tgacggagga tgggaagccc ctagaggtgc ccgagaggaa ggccgctg tgcgactgca
601 cgtgcttcgg cctgccccgc cgctacatta tcgccatcat gaggcgctg ggcttctgca
661 tctccttcgg tatccgctgc aacctgggcg tggccattgt ggacatggtc aacaacagca
721 ccactccacc cgggggcaag gtcacaaagg agaagccaa attcaactgg gaccggaaa
781 cctggtggat gatccacggt tccttctttt ggggctacat catcactcag attcgggag
841 gctacatcgc gtctcggctg gcagccaaca gggttttcgg agctgccata cttcttacct
901 ctaccctaaa tatgctaatt ccatcagcag ccagagtgca ttatggatgt gtcacctttg
961 tcagaatact gcagggactt gttgagggtg tgacctacc agcatgcat gggatattgga
1021 gcaaatgggc cccacctcta gagaggagta gactggcaac cacctccttt tgtggttctt
1081 atgcccggagc tgtgattgca atgcctttag ctggcattct tgtgcagtac atctggtgtt
1141 cttcagtggt ttatgtctac ggaagctttg gaatggctg gtacatggtt tggcttttgg
1201 tgtcttatga aagtctgca aagcctccta ctattacaga tgaagaactg aggtacatag
1261 aagaaagcat tggagagagt gcaaatcttt taggtgcaat ggaaaaattc aagactccat
1321 ggaggaagtt ttttacatcc atgccagtct atgcaataat tgttgcaaac ttctgcagaa
1381 gctggacttt ttattttattg cttattagtc agccagcata ttttgaggaa gtctttggat
1441 ttgcaattag caaggttggt atgctatctg ctgtgccaca cttagtaattg acaattattg
1501 tgcctattgg gggacaaatt gcagatttct taagaagcaa gcagattctt tcaactacga
1561 cagtgagaaa gatcatgaat tgtggtggtt ttggcatgga agccacactg ctctggtctg
1621 ttggctatct tcatactaga ggggtagcaa tctcattctt ggtacttgca gtgggattca
1681 gtggatttgc tatactctggt ttcaatgta accacttggg tatcgctcca agatattgcca
1741 gtatcttaat gggcatttctg aatgggtgtg gcacattgtc agaatgggtt tgtcctatca
1801 ttggttggtgc aatgacaaaag aataagtcac gtgaagagtg gcagtatgct ttctgtatcg
1861 ctgcccctagt ccactatggt ggagttatat tttatgcaat atttgcctca ggagagaaac
1921 aacccctggc agacccggag gaaacaatg aagaaaaatg tggatttatt catgaagatg
1981 aactcgatga agaaacaggg gacattactc aaaattatat aaattatggt accaccaagt
2041 cttatggtgc cacacacag gccaatggag gttggcctag tggttgggaa aagaaagagg
2101 aatttgatca aggagaagta caagactcac atagctataa ggaccgagtt gattattcat
2161 aacaaaacta attactggat ttatttttag tgtttgtgat taaattcatt gtgattgcac
2221 aaaaatttta aaaacacgtg atgtaaactt gcaagcatat caaccaggca agtcttgctg
2281 taaaatgaa ,aacaaaacaa acccatgagg ttaccatcaa gtgcaatctg taagaattgtg
2341 aagttccatc atttccattc aagtcattca ttcttgcat tgtgacttaa aggttgactg
2401 gtcaaaattg tagaacaag tagttacca ttggattcat atgagctaaa actcatcact
2461 atttactaaa gcacaacatc tcactctaca aaagttaaga agccaaagct acttgatcat
2521 gcaaaatgca cttatatatt tgttactctg tattgcaaga tagcacacag aagttggctg
2581 cgtcaagtag aggcgacatt tattaagtga aaatcatgga gttgggatat ctctcaatta
2641 aagaaataca ttgtgaacta tcagctacaa agttgtactg aataactatt agaattgcat
2701 aatgtgagat attttgtag tcctcaaaag gaatatcttg cagtgttttc tatgaaatgc
2761 ttgggcacaa acacttattt ctgtgaaaga gaacatgtaa gttgaggggt atgcttcatg
2821 ttcttccatc catttaccta atagtatgaa acagttcaca tttcaataaa atcaaacttt
2881 tcatgtagcg tatcacataa cttttttgca aaaaatataa aaagaaataa acttcaatgt
2941 attttttatt acaactttgt actggttgta acttgcatat gaaaaaaaaa agagatatat
3001 aaaccacaaa gaatctaata agaaatttat tatggagata tagcccttaa aatgcaatat
3061 taagaacaaa gaaatagaaa atggtttaga tatctttctt cttcataat taaatactat
3121 atgaaacttg tgccacagag ctatatgtaa tatgaaaaga ttaacttcat agagatatg
3181 taagtaggta attttattat ttaaagtcct attaagaaat atttgtctta aatatatagg
3241 acaatacatt atattaaaat ggtctctctc tatatatac tgtatatctt atacatgtcc
3301 atacacagaa acataataaa caatcttca acgaaaccaa aaataqcata cacctaagt
3361 tgggttaggg aattgcaatt tctactttca tagagtata gaattttagg tggggaagag.
3421 gcattttgct tgcatttct taatatacct caacaagaat tgcaacattt ggtaccaag
3481 caataagtgc aatgcataaa atttcctgtc tgtatattac cttcattttg cttgtagtag
3541 ctgtttgggt ggttgaata attttatttt tcttttaaaa aagctaacat cagaccctt
3601 tataatgtcc taaaattatg ataatacatt tccaattca actcaaaata ttattggtgt
3661 attttgtcta ttctggatat ttgatctggt taatgtactg tgctagtgc tggaggccct

```

Continuación figura 27 B

3721 gctactgcaa atataaaacc taaagtttgt ttaaaaaaat gcaaatcatt ctttacctta
3781 agaaaaaaaa aatacccttt gctttgtgcc tcaaagtgat gtaatgtgat cacagctttt
3841 gttgtgttga atgaaaatat gtggactgtc attttgttgc agcaaaaaag tgtaataaa
3901 atgctctatt tacccttttt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

Fig 27 C

VGLUT3 humano NM_139319

```

1 tcttgaaga tccgagctgg gtttcatctc ctttttgatt ttgagtagtt ccctccacga
61 gaactgactt ccaggtgttc accaagggaa acaaggtggt tctcacactg gaaatgagga
121 aggatgacag tttttgagac tgactgttaa cggctcagag gtgccctca ttcaaagtgc
181 cttttaaagc atttgatacc ttcaaagaaa aaattctgaa acctgggaag gaaggagtga
241 agaacgccgt ggggagattct ttgggaatth tacaagaaa aatcgatggg acaactgagg
301 aagaagataa cattgagctg aatgaagaag gaagccgggt gcagacgtcc aggccaagcc
361 cccactctg cgactgccac tgctggggcc tcccaagcg ttacatcatt gctatcatga
421 gtgggctggg attctgcatt tcctttggga tccgggtgcaa tcttggagtt gccattgtgg
481 aaatgggtcaa caatagcacc gtatatgttg atggaaaacc ggaaattcag acagcacagt
541 ttaactggga tccagaaaca gtgggcotta tccatggatc ttttttctgg ggctatatta
601 tgacacaaat tccaggtggt ttcatttcaa acaagtttgc tgctaacagg gtctttggag
661 ctgccatctt cttaacatcg actctgaaca tgtttattcc ctctgcagcc agagtgcatt
721 acggatgcgt catgtgtgtc agaattctgc aaggtttagt ggaggggtgtg acctaccag
781 cctgccatgg gatgtggagt aagtgggcac cacctttgga gagaagccga ctggccacaa
841 cctctttttg tggttcctat gcaggggac tggttgccat gccctgggt gggtgttgg
901 tgcagtacat tggatggctc tctgtctttt atatttatgg catgtttggg atatttggg
961 acatgttttg gctgttgca gcctatgagt gccagcagc tcatccaaca atatccaatg
1021 aggagaagac ctatatagag acaagcatag gagagggggc caacgtggtt agtctaagta
1081 aatttagtac cccatggaaa agatttttca catctttgcc ggtttacgca atcattgtgg
1141 caaatttttg cagaagctgg accttttatt tgctcctcat aagtcagcct gcttattttg
1201 aagaggtctt tggatttgca ataagtaagg tgggtctctt gtcagcagtc ccacacatgg
1261 ttatgacaat cgttgtacct attggaggac aatggctga ttatthaaga agcagacaaa
1321 ttttaaccac aactgctgtc agaaaaatca tgaactgtgg aggttttggc atggaggcaa
1381 ccttactcct ggtggttggc ttttcgcata ccaaaggggt ggctatctcc tttctggtac
1441 ttgctgtagg atttagtggc ttogctatth caggttttaa tgtcaaccac ctggacattg
1501 cccacgcta tgccagcatt ctcatgggga tctcaaacgg agtgggaacc ctctctggaa
1561 tggctgtcc cctcattgtc ggtgcaatga ccaggcacia gaccctgtaa gaatggcaga
1621 atgtgttctt catagctgcc ctggtgcatt acagtgggtg gatcttctat ggggtctttg
1681 cttctgggga gaaacaggag tgggctgacc cagagaatct ctctgaggag aaatgtggaa
1741 tcattgacca ggacgaatta gctgaggaga tagaactcaa catgagagt ttgagcagtc
1801 caaaaagaaa gatgtcttat ggagccact cccagaattg tgaagccag aagaaggaat
1861 gaaaaggaca gagaggagcg accttgatg aggaagagct gacatctac cagaaagaag
1921 agagaactt ctcaactata tcctaattgc tgagaggcac ttctgtcttc tcctactttt
1981 agaacagaaa agtatccata cctattgcct ttctgttagc ccagcttggc agaggtccaa
2041 atattgggag gggagaagat ctaaccagca acagggaaaa gagaaatatt atctttcaat
2101 gacatgtata ggtaaggagc tgcgctcagt tgataacata gttgataata catatthttt
2161 gaattgacag ttgacccttc tctcaaagag ctaaacttat tcagaaagga atgactgaaa
2221 gaaaaaggag acaatccat gttgttcaaa gaaacattga aggaattgg aggtttggc
2281 cagaaggaat gtaaacagta gtagtagctg ccaccacatc tctagggtag ccatgcagag
2341 gagggcttca tattccaat aaacccacg ttgtggcagg tgctttataa acactcttat
2401 ttaatctcca cacctttatg acacacattt cttatccca ttttacaacc aaggcatcta
2461 aagcaacaag aatgaactt gcccaaggtc atctgccagg gtcagtgtctg agactgttga
2521 agctctcaat aggtggcagt tttagggag atttccattc agtgtagga agacatttgt
2581 aataatgaaa actgaaaatg gagtaattgt gagtaactca ccactttagc aggtgttggg
2641 gaagggaaac atttgggttg atgaggcaga ggggattcaa atgtgtgaga ggctagattc
2701 aaagaccctc agtgttctat gttatctgaa gagtcaaatg gttttgtgac tccatagttt
2761 ttaaagtaat aaggggtcaa gactacatca gagattcaaa taggttttta aagaaaagct
2821 aagcaagaga gccaaattht tagaaatctg atggtcaaaa tagctgaaag cagtaacaaa
2881 gagattggct attaattht aactthtccat aatattaaga atgtagctaa atgatgtccc
2941 aactactta caaactthta agacattthaa taattthaaga agtaggttca tgtgtthtct
3001 taggtaaagt tcttctgaaa gaattthtca tthttaaaa atgtatctct ttagccttht
3061 ctgctggaga ttatattag aagthtctac agattgtata aaattatgat thtgtatcaa
3121 aagtattcat gatgactcta tttggaatga tattcagggg aatcacataa atatagcagt
3181 agttatacag agaaatacta caatgaaaac atttggggca attagaccta cagttactgt
3241 tgaaaaattc acctttgatt gcataaggca attacatgga tactthttaga tatatthaaa
3301 atttaacat tggcatctaa agtgttattt gaaaataaaa thattthtct gttcattgat
3361 ttaaacatt ttattcctac tttcagaaga aaaatataat acggaaaaaa ttatagatth
3421 actttagact tattattgta aagtgtthtt thttthtttc taattthtcc cacatgtatt
3481 tctgggtccc agtgatacta gctgagttgt agtgtattht ataaatggaa taacttggg
3541 gaaaaattgc gattcttcat taataatag tctttatgct actgacatac aatttatgtt
3601 agtagacatc thtaaatctc thtaatagat gaatccatgc aagcccataa aacagttccc
3661 tagcatgcag aaaatgcccc cgtaaatagc tgtcatctac attatcttht aacattthtg

```

Continuación figura 27 C

3721 gggactttcc agttgaaaag aaaacatgct atgtcatttt tatccattat ccctggaact
3781 tattgtgaaa gttgtgctgt tttctaagta aaataaaaaa taaaaaatta gcaattta

Figura 28 A

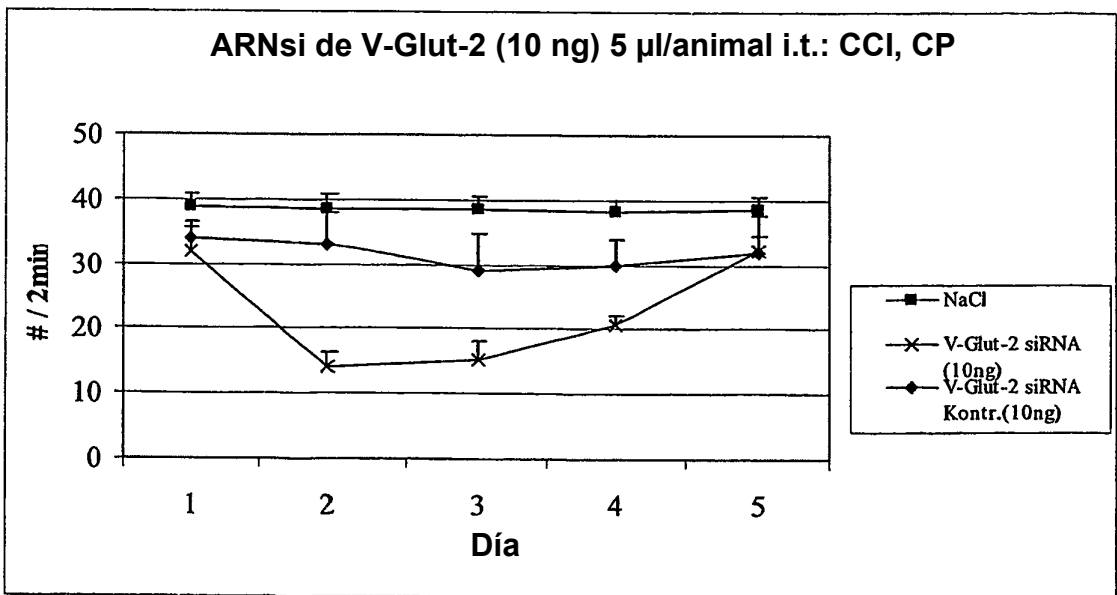
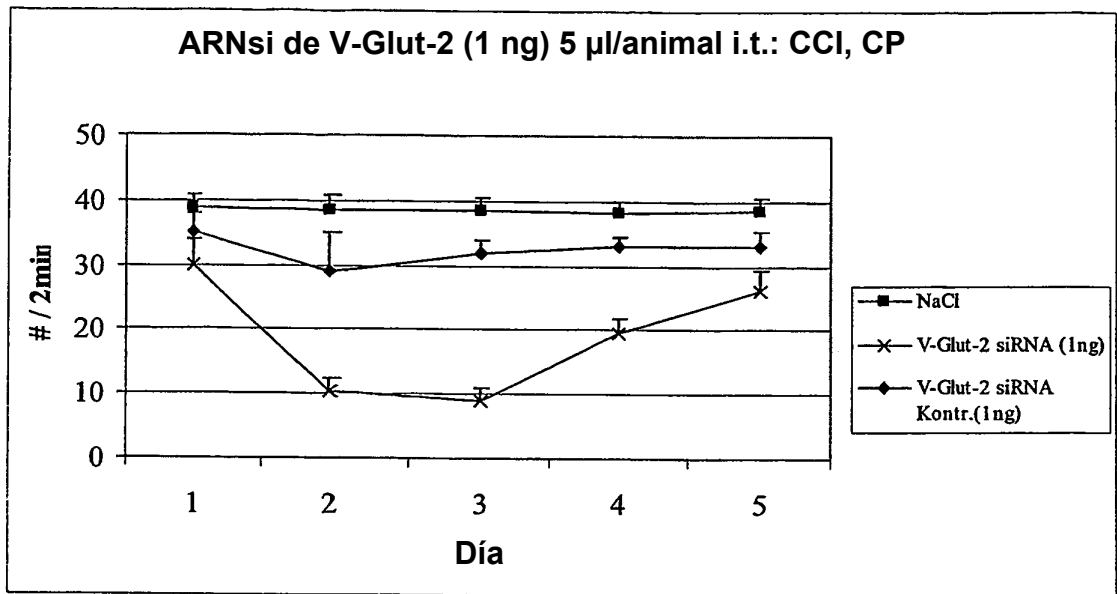


Figura 28 B

Figura 28C

