

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



ANALISIS DE LA EXPRESION DE UN NUEVO GEN  
AISLADO DE LA REGION MESENCEFALICA DE  
RATON MEDIANTE HIBRIDACION *IN SITU*

POR

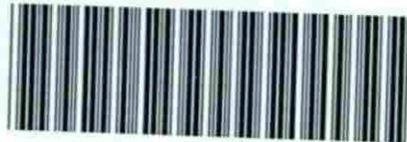
BIOL. BLANCA ROCIO RANGEL COLMENERO

Como requisito para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en  
MORFOLOGIA en la Facultad de Medicina de la  
Universidad Autónoma de Nuevo León

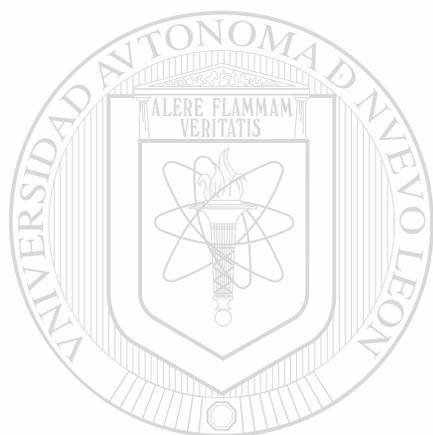
Abril, 2003

EM  
O1799  
J  
.R3  
2003  
c.1

BIOLOGIA  
BIANCA  
ROCCIO  
RAMOCEL  
COLMERO



1080117729



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN NUEVO GEN  
AISLADO DE LA REGIÓN MESENFALICA DE RATÓN  
MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU***

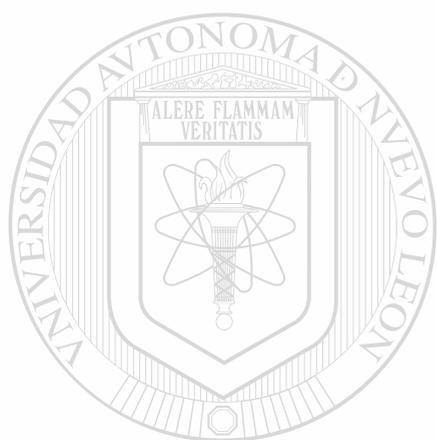
---

Por  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
**BIOL. BLANCA ROCÍO RANGEL COLMENERO**

**Como requisito para obtener el grado de MAESTRO EN  
CIENCIAS con especialidad en MORFOLOGÍA en la Facultad de  
Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Abril, 2003**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, en el Departamento de Neurogenética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS y en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, bajo la Dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la Co-Dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna.

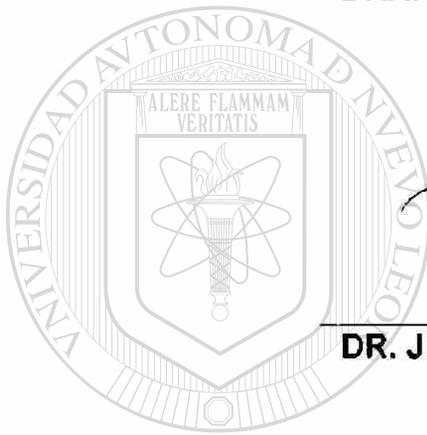
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN NUEVO GEN AISLADO DE LA  
REGIÓN MESENFALICA DE RATÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU***

**Aprobación de la Tesis:**



**DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS**  
Director de Tesis



**DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA**  
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**DRA. RAQUEL BALLESTEROS ELIZONDO**  
Comisión de Tesis

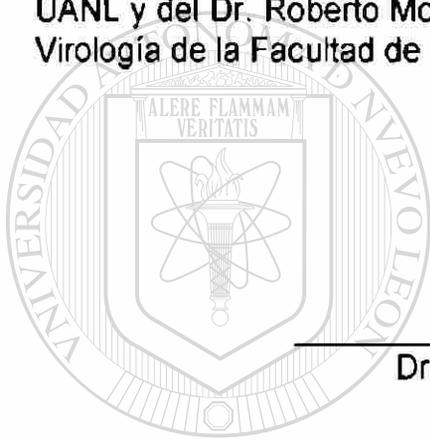


**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

# ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN NUEVO GEN AISLADO DE LA REGIÓN MESENCEFÁLICA DE RATÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Presentado por la Biol. Blanca Rocío Rangel Colmenero

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurogenética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y bajo la Co-Dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y del Dr. Roberto Montes de Oca Luna del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas  
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra  
Co-Director

Dr. Roberto Montes de Oca Luna  
Co-Director

## DEDICATORIA



A DIOS QUE ME HA LLENADO DE SUS BENDICIONES

A MI ESPOSO CON MUCHO AMOR,  
GRACIAS POR APOYARME INCONDICIONALMENTE.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
ESPECIALMENTE A LA PEQUEÑA GRAN  
ILUSIÓN QUE DENTRO DE MI SE DESARROLLA.



## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas por enseñarme pacientemente y brindarme su apoyo profesional a cada momento, de la cual aprendí a ser entusiasta y optimista aún y en los momentos más difíciles.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por haber confiado en mi y aceptarme en la maestría así como por su apoyo para sacar adelante este trabajo.

Al Dr. Roberto Montes de Oca por facilitarme el equipo del laboratorio que tiene bajo su cargo.

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría por permitir mi estancia en su laboratorio para sacar adelante una parte importante de los resultados de esta tesis así como por brindarme su asesoramiento y amistad.

---

Al CIBIN del IMSS por permitir el uso del equipo que en el se encuentra.

A la Dra. Raquel Ballesteros y al Biol. Víctor Romero por su paciente asesoramiento en algunas dudas que surgían durante la marcha de la parte experimental.

A mis compañeros del laboratorio Diana, Humberto, Juan José, Jaime, Martha, Daniel, Maribel y Mario los cuales hacen mi estancia en el laboratorio más agradable.

A todo el personal del Departamento de Histología, CIBIN así como el del Bioterio por su ayuda prestada.

# ÍNDICE

## CONTENIDO PÁGINA

LISTA DE TABLAS . . . . .	i
LISTA DE FIGURAS. . . . .	ii
NOMENCLATURA . . . . .	iii
RESUMEN . . . . .	v

### CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Región Mesencefálica y sus genes . . . . .	2
1.1.1 Región Mesencefálica . . . . .	2
1.1.2 Genes Expresados en la Región Mesencefálica . . . . .	2
1.1.3 Nurr1 . . . . .	3
1.2 Ratones Mutantes Nurr1 . . . . .	5
1.3 Enfermedad de Parkinson . . . . .	6
1.4 Métodos para Analizar la Expresión de Genes . . . . .	6
1.5 Estrategias Experimentales para conocer la función de genes nuevos . . . . .	8
1.6 Métodos de Hibridación <i>in situ</i> . . . . .	9
1.7 Importancia . . . . .	10
1.8 Objetivo General . . . . .	10
1.8.1 Objetivos Particulares . . . . .	11

---

### CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material . . . . .	12
2.1.1 Reactivos . . . . .	12
2.1.2 Material biológico. . . . .	13
2.1.3 Equipo . . . . .	14
2.1.3 Equipo de Cómputo . . . . .	14
2.2 Métodos . . . . .	15
2.2.1 Estrategia General. . . . .	15
2.2.2 Clonación de la secuencia c33 en pCRIITOP0 . . . . .	18
2.2.2.1 Amplificación por PCR de la secuencia c33 . . . . .	18
2.2.2.2 Ligación del producto de PCR al vector pCRIITOP0 . . . . .	19
2.2.2.3 Transformación . . . . .	21
2.2.3 Caracterización de las clonas obtenidas . . . . .	22
2.2.3.1 Minipreparación del DNA plasmídico . . . . .	22
2.2.3.2 Digestión con enzimas de restricción . . . . .	23
2.2.3.3 Electroforesis en gel de agarosa. . . . .	23
2.2.3.4 Maxipreparación del DNA plasmídico . . . . .	24
2.2.4 Síntesis de la sonda de RNA . . . . .	26
2.2.4.1 Obtención de moldes. . . . .	26
2.2.4.1.1 Linearización del plásmido . . . . .	26

2.2.4.1.2 Purificación de los moldes . . . . .	27
2.2.4.2 Síntesis de la sonda a partir de los moldes de DNA . . . . .	27
2.2.4.3 Purificación de las sondas de RNA . . . . .	29
2.2.5 Obtención del material embrionario . . . . .	30
2.2.6 Hibridación <i>in situ</i> . . . . .	31
2.2.7 Obtención de cortes histológicos. . . . .	33
2.2.8 Tinción de las secciones con hematoxilina y eosina . . . . .	34

**CAPÍTULO 3. RESULTADOS**

3.1 Clonación de la secuencia c33 en pCRIITOPPO . . . . .	35
3.1.1 Amplificación del fragmento del gen c33 por PCR. . . . .	35
3.1.2 Clonación del fragmento del gen c33 en pCRIITOPPO . . . . .	36
3.2 Síntesis de las sondas de RNA . . . . .	40
3.2.1 Linearización de la construcción pCRIITOPPO-c33 . . . . .	40
3.2.2 Obtención de sondas de RNA marcadas con digoxigenina. . . . .	41
3.3 Obtención de los embriones . . . . .	44
3.4 Hibridación <i>in situ</i> . . . . .	44
3.4.1 Expresión de TH (control positivo) en embriones de ratones silvestres de 12.5 días de gestación . . . . .	44
3.4.2 Expresión del gen c33 durante el desarrollo embrionario de ratón .	46
3.4.3 Obtención de cortes histológicos a partir de los embriones positivos para el gen c33 . . . . .	53

**CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN . . . . . 54**

**CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES . . . . . 57**

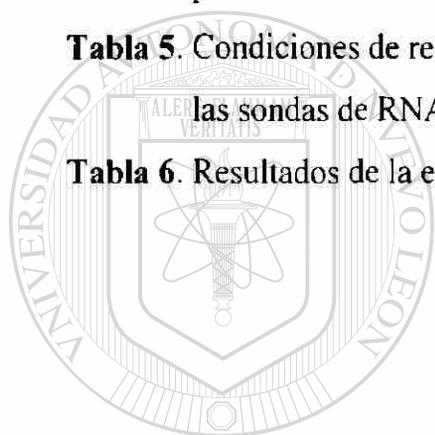
**CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA . . . . . 58**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

PÁGINA

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de reacción para la amplificación por la técnica de PCR . . . . .	18
<b>Tabla 2.</b> Programa utilizado para la amplificación del fragmento c33 . . . . .	19
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de reacción para la ligación del producto de amplificación al vector pCRIITOP0 . . . . .	21
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de reacción para la linearización del plásmido pCRIITOP0-c33 . . . . .	26
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de reacción utilizadas en la transcripción <i>in vitro</i> de las sondas de RNA . . . . .	28
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la expresión del gen c33 . . . . .	46



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo del gen Nurr1. . . . .	4
<b>Figura 2.</b> Resumen esquemático de la estrategia general. . . . .	17
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo del vector pCRIITOPPO . . . . .	20
<b>Figura 4.</b> Amplificación por PCR de c33 . . . . .	35
<b>Figura 5.</b> Clonación del gen c33 en pCRIITOPPO.. . . .	36
<b>Figura 6.</b> Mapa del vector pCRIITOPPO-c33. . . . .	37
<b>Figura 7.</b> Mapa del vector pCRIITOPPO-c33 deletado . . . . .	38
<b>Figura 8.</b> Caracterización de la clona c33 con la delección HindIII . . . . .	39
<b>Figura 9.</b> Linearización de los plásmidos c33 . . . . .	40
<b>Figura 10.</b> Linearización del plásmido TH . . . . .	41
<b>Figura 11.</b> Síntesis de las sondas de RNA . . . . .	42
<b>Figura 12.</b> Sondas antisentido y sentido para el gen c33 . . . . .	43
<b>Figura 13.</b> Síntesis de las sondas de RNA TH antisentido . . . . .	43
<b>Figura 14.</b> Expresión de TH en embriones de ratón de 12.5 días . . . . .	45
<b>Figura 15.</b> Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 10.5 días . . . . .	47
<b>Figura 16.</b> Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 11.5 días . . . . .	48
<b>Figura 17.</b> Expresión del gen c33 en embriones de 12.5 días . . . . .	49
<b>Figura 18.</b> Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 13.5 días . . . . .	50
<b>Figura 19.</b> Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de E14.5 días de gestación . . . . .	51
<b>Figura 20.</b> Ausencia de la expresión del gen c33 en cerebros de embriones de ratón de 15.5 días de gestación . . . . .	52
<b>Figura 21.</b> Expresión del gen c33 en el mesénquima de la flexura mesencefálica en embrión de ratón de 12.5 días . . . . .	53

## NOMENCLATURA

ATP	Adenin trifosfato
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
c33AS y S	Sondas c33 antisentido y sentido respectivamente
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
ddPCR	Despliegue diferencial de RNAs mensajeros
DIG-II-UTP	UTP marcado con digoxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNA mensajero
DNAsal	Enzima que degrada DNA
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
G50	Tamaño de poro de una columna
GTP	Guanin trifosfato
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
KO	Knock out
LB	Medio Luria
M	Concentración molar
ml	Mililitro
mM	Concentración milimolar
mQ	Agua ultrapura
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Concentración micromolar
NaCl	Cloruro de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio dibásico
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
ng	Nanogramos
O.C.T.	Temperatura óptima de corte

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNAsas	Enzima que degrada RNA
RNA <sub>t</sub>	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
SNC	Sistema nervioso central
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TH	Tirosina hidroxilasa
U	Unidades
UTP	Uridin trifosfato
UV	Ultravioleta
Shh	Gen hedgehog sónico
FGF8	Factor de crecimiento de fibroblasto 8
-	Menos
%	Por ciento
<hr/>	
°C	Grados centígrados
<sup>35</sup> S y <sup>32</sup> P	Isótopos radiactivos de azufre y fósforo respectivamente

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

**Blanca Rocío Rangel Colmenero**      **Fecha de Graduación: abril de 2003**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Medicina**

**Título del estudio: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN NUEVO GEN  
AISLADO DE LA REGIÓN MESENCEFÁLICA DE RATÓN  
MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU***

**Número de páginas: 62**

**Candidato para el grado de Maestro en  
Ciencias con Especialidad en  
Morfología**

**Area de estudio: Morfología**

**Objetivo y Método del estudio:** La inactivación del factor de transcripción Nurr1, generó un modelo animal carente de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, mismas que degeneran en la enfermedad de Parkinson. En el presente estudio se trabajó con una secuencia de DNAc (c33) que fue obtenida mediante la técnica del despliegue diferencial de RNAs mensajeros (ddPCR), al comparar los patrones de expresión entre ratones recién nacidos silvestres y mutantes para el gen Nurr1 (Knock out). Esta secuencia se aisló a partir de la región mesencefálica de embriones de ratones silvestres de 12.5 días. La secuencia posee una alta homología con la secuencia de un gen en el humano de función desconocida. Esta secuencia se utilizó como sonda para nuestros análisis de expresión mediante hibridación *in situ*. El objetivo del presente trabajo consistió en confirmar y determinar el sitio de expresión de c33 en la región mesencefálica y obtener su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario en el ratón.

**Contribuciones y conclusiones:** Confirmamos la presencia del gen c33 a nivel de la región mesencefálica, su expresión se restringe al mesénquima embrionario a nivel de la flexura mesencefálica, a diferencia de Nurr1 que se expresa en las neuronas de la región ventral del mesencéfalo. Se demostró que su expresión durante el desarrollo embrionario ocurre únicamente a los 12.5 días y que debido a su corto tiempo de expresión este gen podría estar involucrado en procesos de regulación génica y/o diferenciación de las células mesenquimatosas de la región mesencefálica. Nuestros resultados marcan la pauta para futuros estudios *in vitro*, donde podamos inducir la diferenciación del mesénquima embrionario por la presencia de la expresión del gen c33.

FIRMA DEL DIRECTOR:

  
Dra. Odilia Saucedo Cárdenas

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

Los estudios morfológicos y de genética molecular son de gran importancia para dilucidar el patrón de expresión y posibles funciones de los genes que día a día se van descubriendo. Por ejemplo, la inactivación de genes específicos mediante recombinación homóloga ha permitido generar modelos animales para el estudio de algunas enfermedades humanas (Saucedo-Cárdenas y cols., 1998). A estos organismos generados se les conoce como "Knock out", (KO). De manera particular, en este estudio se utilizaron estudios morfológicos y de genética molecular para caracterizar una clona (c33)

correspondiente a un gen nuevo, el cual, junto con otras clonas se obtuvo mediante un despliegue diferencial de RNAs mensajeros (ddRNA) entre ratones silvestres y ratones mutantes (KO) para el factor de transcripción Nurr1.

La clona c33, se aisló a partir de ratones silvestres y contiene un fragmento de DNAc de 722 pb, ausente en el ddRNA de la región mesencefálica en los ratones mutantes para el gen Nurr1. La secuencia de c33 se comparó en el banco de datos GENE BANK y se encontró que codifica para un gen de función desconocida que se reporta también en el humano. Por lo tanto, como un paso inicial para descifrar su función se utilizó como sonda la clona c33 para obtener su patrón de expresión espacial y temporal durante el desarrollo gestacional del

ratón. Debido a que no existen reportes acerca de este nuevo gen, el conocimiento generado a partir de los estudios de expresión del presente trabajo, aportaron información importante sobre las posibles funciones en las que podría estar involucrado.

## **1.1 REGIÓN MESENCEFÁLICA Y SUS GENES**

### **1.1.1 REGIÓN MESENCEFÁLICA**

En el cerebro medio las neuronas dopaminérgicas están localizadas en tres grupos nucleares: la sustancia negra, el área tegmental ventral y el campo retrorubral. En relación a sus proyecciones eferentes, estas neuronas están clasificadas dentro de tres sistemas: dopaminérgico mesostrial, dopaminérgico mesolímbico y dopaminérgico mesocortical. El sistema dopaminérgico mesostrial está involucrado en la integración del estímulo sensorial y el control del movimiento voluntario. La degeneración selectiva de neuronas de esta área da como resultado la enfermedad de Parkinson, en la cual se rompe el circuito de control motor por los bajos niveles de dopamina (Pfaff y cols., 2000).

### **1.1.2 GENES EXPRESADOS EN LA REGIÓN MESENCEFÁLICA**

La diferenciación de las neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo embrionario depende de la interacción entre señales de inducción y células progenitoras blanco competentes para responder a señalización molecular específica. Hallazgos recientes demuestran que las neuronas dopaminérgicas

del cerebro medio son inducidas en regiones estereotípicas en el eje dorsal-ventral y anterior-posterior del tubo neural por una interacción cooperativa entre dos señalizaciones moleculares distintas, hedgehog sónico (Shh) y el factor de crecimiento de fibroblasto 8 (FGF8) (Ye y cols., 1998). Shh tiene una actividad de centralización a lo largo del eje ventral-dorsal del tubo neural y se conoce que induce los fenotipos neuronales ventrales, como las neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y motoras (Ericson y cols., 1995; Ye y cols., 1998).

Estudios recientes en diferenciación y sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso han demostrado la existencia de moléculas clave como Shh, FGF8, Nurr1, Ptx3, BDNF, GDNF y GNF, las cuales aparentemente están implicadas en el posicionamiento de las neuronas dopaminérgicas a lo largo del eje dorso-ventral y antero-posterior, la diferenciación fenotípica final y el mantenimiento del fenotipo dopaminérgico y contacto sináptico apropiado. Las células Ptx3 positivas en cerebro medio ventral parecen ser una población de neuronas dopaminérgicas tardías (Smidt y cols., 1997).

### 1.1.3 Nurr1.

Uno de los genes participantes en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas es el factor de transcripción Nurr1. El DNAc que codifica para este receptor nuclear Nurr1 fue aislado de una biblioteca de DNAc de cerebro de ratón (Law y cols., 1992). Ichinose y cols. en 1999 determinaron la secuencia

nucleotídica completa del gen Nurr1 humano, el cual cuenta con 8 exones y con un peso molecular de 8 kb.

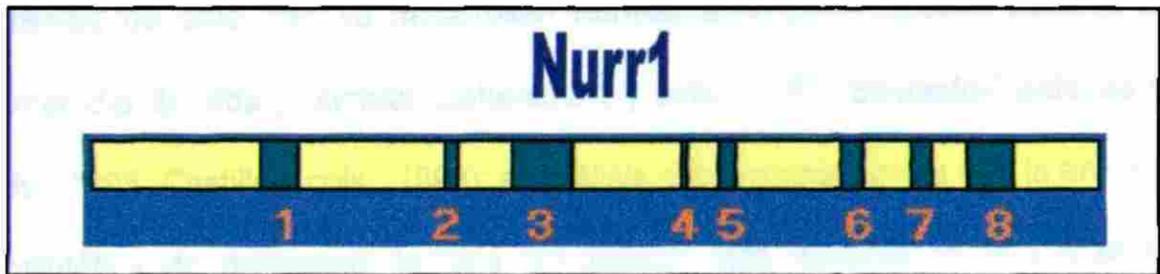


Figura 1. Esquema representativo del gen Nurr1.

Nurr1 activa la transcripción del gen de la tirosina hidroxilasa por unión a un elemento regulador en la región del promotor tirosina hidroxilasa necesario para la expresión específica en el cerebro medio (Sakurada y cols., 1999).

El receptor nuclear huérfano NURR1 es un factor de transcripción muy parecido a NUR77 y NOR-1. Estas proteínas al parecer no requieren de un ligando para ser transcripcionalmente activas (Hazel y cols., 1988; Nakai y cols., 1990; Maruyama y cols., 1995; Ohkura y cols., 1995; Searce y cols., 1993 y Mages y cols., 1994).

## 1.2 RATONES MUTANTES Nurr1

Nurr1 se expresa en la sustancia negra del cerebro medio, los ratones carentes de este gen se desarrollan normalmente pero mueren durante el primer día de vida postnatal (Zetterstrom y cols., 1997; Saucedo-Cárdenas y cols., 1998; Castillo y cols., 1998); el análisis subsecuente revela que la enzima biosintética de dopamina, tiroxina hidroxilasa, está ausente en la sustancia negra y en el área tegmental ventral de estos ratones recién nacidos. Por lo tanto se cree que Nurr1 es esencial para el desarrollo terminal de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio ventral pero no afecta los pasos tempranos de su neurogénesis (Saucedo Cárdenas y cols., 1998). Se sugiere que la activación de Nurr1 puede ser terapéuticamente usada en la enfermedad de Parkinson (Witta y cols., 2000).

Nurr1 se empieza a expresar en el día embrionario 10.5 en el área ventral de la flexura mesencefálica, justo antes de que aparezca la tirosina hidroxilasa en el día embrionario 11.5, y continúa expresándose en el adulto (Zetterstrom y cols., 1996). Aunque la expresión de Nurr1 no está restringida solo a las neuronas dopaminérgicas, los ratones con deficiencia de Nurr1 pierden solo estas neuronas (Saucedo-Cárdenas y cols., 1998; Zetterstrom y cols., 1997; Wallen, 1999).

### 1.3 ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La enfermedad de Parkinson es secundaria a la destrucción de la parte compacta de la sustancia negra, que emite fibras nerviosas secretoras de dopamina al núcleo caudado y el putamen, y se caracteriza por la rigidez de la musculatura corporal, temblor no intencionado y dificultad para iniciar el movimiento. Se cree que la causa de estos efectos está involucrada con la destrucción de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra que teóricamente permitiría que el núcleo caudado y el putamen estuvieran activados permanentemente y posiblemente esto provoque una emisión continua de señales excitadoras al sistema de control motor corticospinal (Guyton y Hall, 1997). El tratamiento para esta enfermedad está enfocado tanto en la prevención de la muerte de las células dopaminérgicas como en la repoblación de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Parkinson. Uno de los tratamientos consiste en la administración de L-dopa, ya que se sabe que esta se transforma en dopamina en el cerebro; otro de los tratamientos consiste en el implante de células secretoras de dopamina en los núcleos caudado y putamen (Aguilar-Rebolledo, 1994).

### 1.4 MÉTODOS PARA ANALIZAR LA EXPRESIÓN DE GENES

El despliegue diferencial de RNAs facilita la identificación de RNAs mensajeros en células o tejidos. Consiste en una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), en donde los productos

resultantes son separados en geles de secuenciación. La estrategia general está basada en una combinación de tres técnicas: (a) Transcripción reversa de RNA mensajero, (b) Selección de iniciadores arbitrarios para el número de DNAs complementarios que serán amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa y (c) Secuenciación en geles de alta resolución del DNAc amplificado (Liang y Pardee, 1998). El Despliegue diferencial puede visualizar simultáneamente el incremento o decremento de la expresión de muchos genes mediante múltiples condiciones experimentales. El método requiere pequeñas cantidades de tejido. Este método se ha utilizado para conocer los genes involucrados en el control molecular de la diferenciación, proliferación, senescencia y apoptosis. El despliegue diferencial es un método disponible para la identificación rápida de genes nuevos (Pardee y McClelland, 1999). Una desventaja de esta técnica de despliegue diferencial clásica es que se amplifican bandas diferenciales que son falsos positivos comunes durante el PCR, o durante los procesos de clonación de los productos de PCR expresados diferencialmente (Carulli y cols., 1998); es por esto, que es importante confirmar la expresión de los genes correspondientes en la región de donde se aislaron los RNAs.

Recientemente, con el desarrollo de las técnicas de microarreglos de DNAs complementarios se puede monitorear la expresión de genes de una célula o tejido usando chips en base de silicón. En esta técnica se sintetizan oligonucleótidos específicos para la amplificación de fragmentos de DNAc mediante PCR y estos se anclan en una placa de vidrio o membrana de nylon

(Corton y Gustafsson, 1999). Posteriormente se lleva a cabo una hibridación con los RNAs de dos diferentes células o muestras de tejidos. Cada muestra de RNA se marca mediante la incorporación de dCTP con fluoresceína. Los DNAs complementarios fluorescentes, representan todos los RNAs expresados en cada célula o muestra de tejido en donde hibridan simultáneamente. La intensidad de la hibridación se lee por una cámara, y el nivel de expresión relativo de cada gen es representado por la intensidad de la señal de hibridación (Carulli y cols., 1998).



## 1.5 ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES PARA CONOCER LA FUNCION DE GENES NUEVOS.

UANL

Algunas de las estrategias experimentales generales utilizadas para determinar las rutas fisiológicas que son reguladas por los genes son: ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

(1) La determinación del patrón de expresión temporal y espacial durante el desarrollo y en tejidos adultos. En caso de ser muy restringido este patrón de expresión proporciona información importante acerca de los procesos fisiológicos o del desarrollo en los que pudiera estar involucrado y por lo tanto se puede saber que áreas serán afectadas por la delección de ese gen. Una de los métodos utilizados en esta estrategia es la hibridación *in situ*.

(2) La inactivación de dicho gen en el organismo, mediante la introducción de una mutación específica por recombinación homóloga en células embrionarias de ratón (Thomas y cols., 1987).

## 1.6 MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La hibridación *in situ* consiste en el apareamiento de una sonda de ácidos nucleicos marcada con una secuencia complementaria que se encuentra en el tejido fijado, seguido por la visualización de dicha sonda. De manera general en las técnicas de hibridación se requiere del siguiente procedimiento: (a) preparación de la sonda, (b) preparación del tejido, (c) hibridación de la sonda al tejido y (d) visualización de la sonda (Simmons y cols., 1989). Existen dos formas de visualizar la sonda, de acuerdo al tipo de marcador que ha sido incorporado: (a) sondas radiactivas, en donde un nucleótido está marcado con  $^{35}\text{S}$  o  $^{32}\text{P}$ ; y (b) sondas no radiactivas, en donde uno de los nucleótidos está marcado con digoxigenina. En el primer caso la detección es por la exposición a una película fotográfica y en el segundo caso, se utilizan anticuerpos para detectar la digoxigenina incorporada en la sonda (Wilkinson, 1993).

## 1.7 IMPORTANCIA

Se identificó al fragmento c33 aislado mediante ddPCR a partir de la región mesencefálica como un nuevo gen, el cual es candidato de la vía funcional de Nurr1 necesario en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mismas que se destruyen en la enfermedad de Parkinson. De aquí la importancia de dilucidar la función del gen c33. El presente trabajo estuvo enfocado a comprobar que el gen c33 se expresa en la región mesencefálica y determinar su patrón de expresión durante el desarrollo gestacional del ratón.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
**1.8 OBJETIVO GENERAL**

Confirmar y determinar el sitio de expresión de c33 en la región mesencefálica y obtener su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario en el ratón.

### 1.8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener embriones de ratón en los estadios embrionarios de 10.5 a 15.5 días de desarrollo.
2. Clonar la secuencia c33 bajo la regulación de promotores T7 y SP6 utilizados en transcripción *in vitro*.
3. Obtener las sondas de RNA antisentido y sentido marcadas con digoxigenina para la hibridación *in situ*.
4. Analizar el patrón de expresión de la clona c33, utilizando sondas de RNA marcadas con digoxigenina en los estadios embrionarios del ratón de 10.5 a 15.5 días mediante hibridación *in situ*.

## CAPÍTULO 2

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 2.1 MATERIAL

### 2.1.1 REACTIVOS

Para la amplificación del gen c33 se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa, buffer potenciador 10X y MgCl<sub>2</sub> de la marca Promega y Gibco; para la clonación del gen en el vector pCRIITOP0 se utilizó el kit de clonación del mismo nombre de la marca Invitrogen. Las enzimas de restricción (Hind III, Xho I, Bgl II) utilizadas para caracterizar y linearizar las clonas obtenidas fueron de la marca Promega, Roche y Gibco.

Los reactivos utilizados para electroforesis fueron agarosa, bromuro de etidio, azul de bromofenol y xilencianol de la marca BIOLINE y Sigma.

Para el cultivo bacteriano se utilizó Medio LB base de Gibco BRL y ampicilina de Sigma. Para la preparación de DNA plasmídico a pequeña escala (minipreparaciones) se utilizó SDS de Roche e Hidróxido de Sodio y acetato de potasio de Sigma. Para la preparación de DNA a gran escala (maxipreparaciones) se utilizó el kit de maxiprep de QiaGene.

Para la síntesis de la sonda de RNA se utilizó el kit de transcripción *in vitro* con digoxigenina de Roche así como las columnas de sephadex G-50 para la purificación de RNA, de Roche.

Para la obtención de los embriones y fijación de los mismos se utilizó cloruro de sodio de US Biological, cloruro de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y paraformaldehído, todos ellos de la marca Sigma.

En la hibridación *in situ* se utilizaron los siguientes reactivos SDS de Boehringer Mannheim, Trisma base de US Biological, cloruro de magnesio de Research Organics, MABT, Tween 20, formamida de Roche y cloruro de sodio de US Biological, anti-digoxigenina-AP, NBT y BCIP, de Gibco.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

## 2.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO DE BIBLIOTECAS

Ratones cepa CD1 del bioterio del departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL.

### 2.1.3 EQUIPO

Termociclador Techne modelo FTNENE5D de Techgene, centrífuga Spectrafuge 16M de National labnet CO, balanza analítica Mettler AE160 de Mettler Instrument Corp., estereomicroscopios Zeiss 475022-9902 de Zeiss West Germany, termoagitador y horno Felisa de fabricantes de equipos para laboratorio e industria S.A., incubadora modelo económico 2EG de GCA corporation Precision Scientific Group, cronómetros de DAIGGER, agitador o vortex Labnet VX100 de Labnet International Inc., cámara de electroforesis Minicell EC370M de E-C, fuente de Poder Power station 300 de labnet internacional Inc., transiluminador UV 2000 de BioRad, baño de agua Precisión de GCA Corporation Precision Scientific Group, agitador orbit shaker de Lab-line Instruments Inc., juego de micropipetas Gilson de 20, 200 y 1000uL, centrífuga refrigerada de Beckman, microscopios Axiophot, Zeiss y Leica, fotoestereomicroscopio, fotomicroscopio Axiophot con triple filtro.

### 2.1.4 EQUIPO DE CÓMPUTO

El equipo utilizado para el análisis de datos y redacción de la presente tesis fue: computadoras PC HP pavilion, ACER e iMac. El procesador de textos fue Microsot word XP, el gráfico fue Microsot Power Point y Microsot Photo Editor. Se utilizó el escaner Canon e impresoras EPSON y LASER.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 ESTRATEGIA GENERAL

A partir del despliegue diferencial de RNAs de la región mesencefálica de embriones de 12.5 días de gestación de ratones con inactivación del gen *Nurr1* (KO) y silvestres se obtuvieron una serie de clonas entre las cuales se aisló la c33. La secuencia de esta clona c33 se analizó contra la base de secuencias de DNA del GENE BANK encontrando que tiene una alta homología con un gen en el humano de función desconocida.

Se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la clona c33 que originalmente se encontraba en el vector pTAdv el cual solo contiene un solo promotor. El producto de la amplificación se ligó en el vector pCRIITOP0 el cual cuenta con las características requeridas de dos promotores flanqueando la secuencia a transcribir. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* calcio competentes. Solo las bacterias que captaron el vector recombinante crecieron en un medio selectivo conteniendo ampicilina. Las clonas resultantes se caracterizaron para comprobar la presencia del fragmento de DNA-c33 por medio de enzimas de restricción. Posteriormente para obtener una sonda de RNA más específica se redujo el tamaño de la clona con enzimas de restricción. Con el producto de esta religación se transformaron bacterias nuevamente y se caracterizaron y una vez seleccionada la clona resultante, se procedió a purificar el DNA plasmídico a

gran escala. El nuevo plásmido obtenido se linearizó con Hind III y Xho I para sintetizar las sondas de RNA de C33 antisentido y sentido marcadas con digoxigenina respectivamente. La sonda antisentido de la tiroxina hidroxilasa (TH) se utilizó como control positivo.

Para realizar la hibridación *in situ* fue necesario sacrificar por dislocación cervical ratones hembras preñadas con edad gestacional conocida para extraer los embriones a partir del día 10.5 hasta el día 15.5 de gestación. Los embriones se fijaron en paraformaldehído al 3.5%, se cortaron sagitalmente y se deshidrataron en metanol. El siguiente paso fue realizar la hibridación *in situ* con las sondas sentido y antisentido obtenidas en el tejido embrionario, después se hizo detección por medio del anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina y se reveló con los sustratos para la fosfatasa alcalina NBT y BCIP. Los embriones positivos para c33 fueron incluidos en tissue tek y congelados, para realizar cortes de 20µm de grosor para observar la señal a microscopía de luz.

2.3.2 CLONACIÓN DE UN GEN EN UN VECTORES

ESTRATEGIA GENERAL

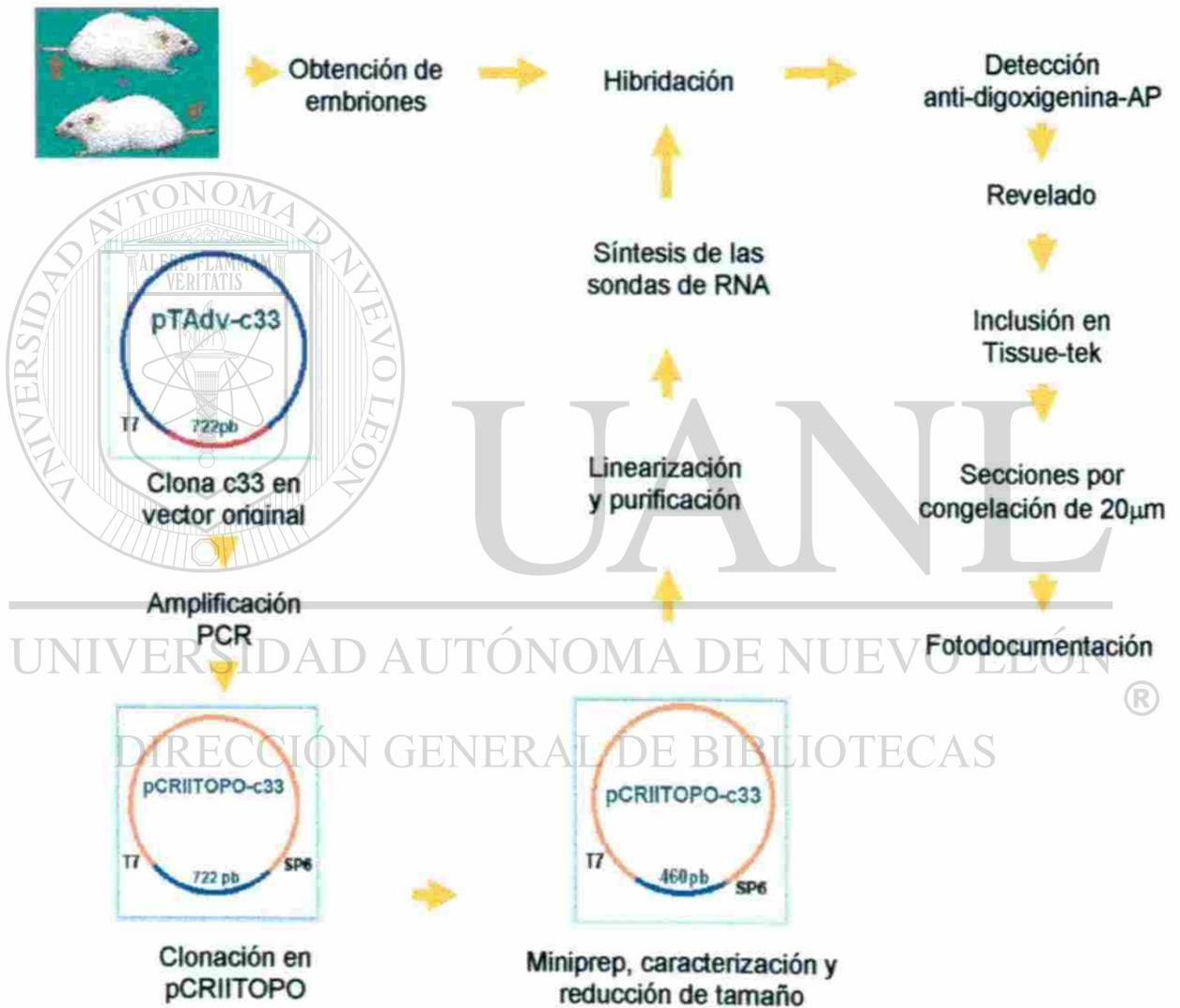


Figura 2. Resumen esquemático de la estrategia general

## 2.2.2 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA c33 EN pCRIITOPO

Se utilizó un kit de clonación para productos de PCR. El vector (pCRIITOPO) de este kit es un plásmido lineal con una timinas en cada extremo 3' a donde se ligan los productos de PCR amplificados con la enzima Taq DNA polimerasa la cual adiciona una adenina en los extremos 3' del producto de PCR.

### 2.2.2.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA SECUENCIA c33

La amplificación del fragmento c33 que originalmente se encontraba en el vector pTAdv se realizó de acuerdo a las condiciones de reacción descritas en la tabla 1.

Reactivo	Concentración final	Volumen usado
DNA plasmídico	10 ng / $\mu$ L	1 $\mu$ L
Iniciador P4 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'	4 ng / $\mu$ L	2 $\mu$ L
Iniciador P4 3'-GATGGTCGTAAATCACTCCCAATTA-5'	4 ng / $\mu$ L	2 $\mu$ L
DNTP's 2.5 mM	2.5 nM	2.5 $\mu$ L
Buffer 10X	1 X	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 30mM	1.5 mM	2 $\mu$ L
Enzima DNA polimerasa Taq	0.05 U / $\mu$ L	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O mQ estéril	ajustar a	25 $\mu$ L

Tabla 1. Condiciones de reacción para la amplificación por la técnica de PCR.

El programa utilizado para la amplificación del fragmento c33 consistió en los pasos descritos en la tabla 2.

PASO	TIEMPO
1. Desnaturalización	94°C por 2 minutos
2. 20 ciclos:	
Desnaturalización	94°C por 1 minuto
Alineación	60°C por 1 minuto
Elongación	68°C por 2 minutos
3. Extensión prolongada	68°C por 5 minutos

**Tabla 2.** Programa utilizado para la amplificación del fragmento c33.

### 2.2.2.2 LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR AL VECTOR pCRIITOP<sup>®</sup>

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El vector pCRIITOP<sup>®</sup> cuenta con dos promotores SP6 y T7 a cada lado de la región en donde se liga el fragmento de DNA, mide aproximadamente 4.7Kb y tiene resistencia a la ampicilina. Estas características son ideales para su utilización en nuestro trabajo. En la figura 3 se muestra un esquema del vector pCRIITOP<sup>®</sup>.



Figura 3. Esquema representativo del vector pCRII-TOPO.

La secuencia resultante de la amplificación por PCR se ligó al vector pCRIITOPO de acuerdo a las condiciones de reacción descritas en la tabla 3.

REACTIVO	VOLUMEN
Producto de PCR	4 $\mu$ L
Vector pCRIITOPO	1 $\mu$ L
Enzima (T4 DNA ligasa)	1 $\mu$ L
Buffer 10X T4 DNA ligasa	1 $\mu$ L
H2O mQ estéril	ajustar a 10 $\mu$ L
Incubación a 15°C por 15 minutos	

**Tabla 3. Condiciones de reacción para la ligación del producto de amplificación al vector pCRIITOPO.**

### 2.2.2.3 TRANSFORMACIÓN

Se utilizaron células calcio competentes almacenadas a -70°C<sup>®</sup> e inmediatamente se colocaron en hielo y se les agregó 1  $\mu$ L del producto de la ligación (o DNA plasmídico). Se incubó en hielo por 1 hora posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C por 1 minuto, después se regresó al hielo por 2 minutos y se le añadió cuatro veces el volumen total de reacción de medio LB sin ampicilina. Las bacterias se incubaron a 37°C a 250 rpm por 1 hora y se sembraron 50  $\mu$ L en placas con medio LB agar con ampicilina, utilizando perlas de vidrio estériles (todo esto en condiciones de esterilidad junto al mechero). Las cajas se dejaron en incubación a 37°C por una noche.

## 2.2.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS OBTENIDAS

### 2.2.3.1 MINIPREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Después de haber obtenido varias clonas como resultado de la ligación y transformación, se crecieron estas clonas en 3 mL de medio LB broth base con ampicilina (50µg/ml) toda la noche a 37°C con agitación a 150 rpm. Al día siguiente antes de proseguir con la técnica se prepararon soluciones de glicerol colocando 600 µL de células más 400µl de glicerol y se congelaron a -20°C para su uso posterior. Las células restantes se pasaron a tubos eppendoff y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y las pastillas bacterianas se congelaron a -20°C por 5 minutos; posteriormente se resuspendieron en 100µL de solución de lisis I (dextrosa 50mN, EDTA 10mM y Tris-HCl 25mM), se incubaron en hielo por 5 minutos y se les adicionó 200 µL de solución de lisis II (NaOH 0.2N y SDS 1%) recién preparada, se mezcló e incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se agregó 150 µL de la solución de lisis III fría (acetato de sodio 3M pH5.2), se mezcló por inversión y se incubó por 10 minutos en hielo y se centrifugó 15 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante se colocó en un tubo limpio y se adicionó 450 µL de isopropanol, se mezcló por inversión e incubó a -20°C por 15 minutos. Nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. A la pastilla resultante se le agregó 500µL de etanol al 70% para lavar y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se decantó el etanol y

se dejó secar la pastilla, la cual finalmente se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora TE (tris-HCl pH8 10mM y EDTA pH8 1mM).

### 2.2.3.2 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para determinar si las clonas obtenidas presentan el inserto de interés, es necesario digerir una cantidad de DNA con alguna(s) enzima(s) de restricción que corten a ambos lados del inserto para liberarlo del plásmido y verificar su peso molecular utilizando marcadores de DNA de peso molecular conocido que se separen paralelamente con los productos de las digestiones en un gel de agarosa por electroforesis.

Las condiciones de reacción seguidas para digerir nuestra clona fueron: a 5  $\mu\text{L}$  de cada minipreparación de DNA se le agregó 11  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  pura, 2  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de restricción 10X (concentración final de 1X) más 1  $\mu\text{L}$  de la enzima EcoRI (1 u/ $\mu\text{L}$ ), dando un volumen total de reacción de 20 $\mu\text{L}$ . Esta reacción se incubó por al menos 2 horas a 37°C.

### 2.2.3.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

La electroforesis en gel de agarosa consiste en la capacidad que tienen las moléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, la velocidad es directamente proporcional a la carga e inversamente proporcional a su tamaño, por lo que las moléculas de DNA se desplazan a través del gel de agarosa por

su electronegatividad hacia el ánodo de la cámara de electroforesis, de acuerdo a su peso molecular.

Para esto se preparó un gel de agarosa al 0.8% en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M pH8.0) conteniendo bromuro de etidio. Una vez solidificado, se colocó en la cámara de electroforesis con la solución amortiguadora de corrimiento (TAE 1X); las muestras se mezclaron con la solución amortiguadora de carga (Azul de bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25% y glicerol 30%) y se corrieron a 100 Volts durante una hora, para lograr la separación de las bandas y confirmar el tamaño del inserto al compararlo con un marcador de DNA de peso molecular conocido. Posteriormente se visualizó en un transiluminador UV para observar la fluorescencia que emite el bromuro de etidio que se encuentra intercalado entre las bases del DNA, la intensidad es proporcional a la concentración del DNA.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

#### 2.2.3.4 MAXIPREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

En condiciones de esterilidad junto al mechero, se inoculó una colonia en 5 ml de medio LB con ampicilina (50µg/ml) y se incubó toda la noche a 37°C y con agitación a 150 rpm. Estos 5 ml de células se colocaron en un matraz con 25 ml de medio LB Broth base con ampicilina en condiciones de esterilidad se dejó incubar otra noche a 37°C con agitación a 150 rpm, posteriormente estos 25 ml de cultivo celular se colocaron en otro matraz con 500 ml de medio LB Broth base con ampicilina y nuevamente se incubó toda la noche a 37°C en

agitación. Antes de proseguir con la técnica se prepararon 3 soluciones "stock" de glicerol como ya se mencionó.

El cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Para los siguientes pasos se utilizó un kit de extracción de DNA de QiaGene. La pastilla de bacterias se descongeló y resuspendió en 10 ml de buffer P1 frío y se pasó a un tubo falcon de 50 ml, se añadieron 10 ml de buffer P2, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos; posteriormente se añadieron 10 ml de buffer P3, se mezcló gentilmente y se incubó en hielo por 20 minutos, posteriormente se centrifugó por 30 minutos a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se preparó una columna de purificación eluyendo 10 ml de buffer QBT equilibrante y posteriormente se eluyó el sobrenadante por la columna y se lavó 2 veces con 30 ml de buffer QC. Se colocó un tubo limpio abajo de la columna y el DNA se eluyó con 15 ml de buffer QF (buffer de elución), el cual se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol absoluto y 1/10, del volumen total, de acetato de sodio 3M e incubación por 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El DNA se recuperó por centrifugación a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 15 ml de etanol al 70% frío, nuevamente se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , se decantó el sobrenadante, se secó la pastilla y el DNA se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de TE.

## 2.2.4 SÍNTESIS DE LA SONDA DE RNA

### 2.2.4.1 OBTENCIÓN DE MOLDES.

Los moldes de DNA es el DNA plasmídico linearizado por la digestión con una enzima de restricción que corte en el extremo opuesto al promotor de interés para poder producir los dos tipos de sondas; la sonda antisentido será la que reconocerá el RNAm del tejido y lo hibridará y la sonda sentido por ser el equivalente al RNAm del tejido servirá como sonda control negativo.

#### 2.2.4.1.1 Linearización del plásmido

En nuestro caso se utilizó la enzima Hind III para obtener la sonda antisentido c33, Xho I para obtener la sonda sentido c33 y Hind III para obtener la sonda antisentido de tirosina hidroxilasa (TH) y utilizarla como nuestro control positivo. La digestión enzimática se realizó bajo las condiciones de reacción descritas en la tabla 4.

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa teñidas con bromuro de etidio para comprobar la linearización del DNA plasmídico.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA plasmídico	10µg
Buffer 10X	1X
Enzima de restricción (Hind III o Xho I)	1U/µL
H <sub>2</sub> O	ajustar a 100µL de reacción
Incubar a 37°C durante 3 horas	

Tabla 4. Condiciones de reacción para la linearización del plásmido pCRIITOP0-c33.

### 2.2.4.1.2 Purificación de los moldes

Una vez concluida la digestión del vector, el siguiente paso fue su purificación por medio de la técnica fenol-cloroformo que consiste en: agregar 200 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura libre de RNAsas a la reacción de digestión, se agregaron 300 $\mu$ L de fenol, se agitó por vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 3 minutos. La fase acuosa se colocó en un tubo eppendorff limpio y se agregó un volumen de cloroformo, nuevamente se agitó por vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 3 minutos; la fase acuosa se colocó en un tubo eppendorff limpio y se procedió a precipitar con etanol absoluto y acetato de sodio, se incubó a – 20°C por 30 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla resultante se lavó con 500 $\mu$ L de etanol 70% y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla resultante se secó y se resuspendió en 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O pura libre de RNAsas. Se comprobó la calidad de los moldes por visualización en un gel de agarosa. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 2.2.4.2 SÍNTESIS DE LA SONDA A PARTIR DE LOS MOLDES DE DNA

Para la síntesis de la sonda de RNA es necesario trabajar en condiciones de ausencia total de RNAsas para poder obtener una sonda de condiciones óptimas. Para esto antes de empezar, se limpió toda el área de trabajo con la solución de RNAsa zap y se trabajó con guantes de látex.

Se realizó la síntesis de las sondas c33 antisentido, c33 sentido y TH antisentido utilizando las RNA polimerasas T7, SP6 y T7 respectivamente, bajo las condiciones de reacción descritas en la tabla 5.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Molde de DNA	1µg
Mezcla de nucleótidos marcados con digoxigenina 10X (ATP 10mM, CTP 10mM, GTP 10mM, UTP 6.5mM DIG-11-UTP 3.5mM, pH 7.5)	1X
Inhibidores de RNAsa 20U/µL	1U/µL
RNA polimerasa (T7 o SP6) 20U/µL	1U/µL
Buffer de transcripción 10X	1X
H2O libre de RNAsa	ajustar a 20µL
Incubación a 37°C por 2 horas	

Tabla 5. Condiciones de reacción utilizadas en la transcripción *in vitro* de las sondas de RNA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

Una vez terminada la reacción de transcripción *in vitro* a cada sonda se agregó 2µL de la enzima DNAsa I (10U/µL) esta mezcla de reacción se incubó a 37°C por 15 minutos para degradar los moldes de DNA y de esta manera obtener solo el RNA sintetizado. Enseguida se añadió 80 µL de agua libre de RNAsas, se mezcló gentilmente e inmediatamente se congeló a -20°C.

### 2.2.4.3 PURIFICACIÓN DE LAS SONDAS DE RNA

La purificación del RNA se llevó a cabo por medio de columnas de sephadex G-50 en donde se eliminaron los nucleótidos no incorporados durante la reacción, así como el resto de los reactivos utilizados.

El procedimiento se realizó en condiciones libres de RNAsa y con guantes de látex.

Se sacaron las columnas del contenedor, se quitaron los tapones superior e inferior y en posición vertical con un tubo colector, se dejó que fluyera el buffer que ya contenían, se desechó el filtrado y se centrifugó a 2,600 rpm por 2 minutos desechando el fluido. Posteriormente se cambió el tubo colector por uno nuevo, se colocó la muestra en el centro de la columna en el dispositivo y se centrifugó nuevamente a 2,600 rpm por 4 minutos. El fluido se recuperó en la columna, se hicieron alícuotas, se etiquetaron e inmediatamente se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación del RNA. La calidad del RNA ( $>500\text{ ng}/\mu\text{L}$ ) se comprobó por medio de electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

## 2.2.5 OBTENCIÓN DEL MATERIAL EMBRIONARIO

Se utilizaron ratones cepa CD1. Para la obtención de los embriones se aparearon los ratones y cada mañana se buscó que las hembras presentaran un tapón vaginal. Las hembras con tapón vaginal se separaron e identificaron por la fecha de cópula, el cual se contó como día 0.5 de gestación a partir de las 12:00 pm de ese día. Se colectaron embriones en los estadios de E10.5 hasta E15.5 días. Cuando los embriones llegaban a la edad requerida, las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los embriones por laparotomía. Los embriones se colocaron en cajas Petri con solución de Ringer ( NaCl 120mM, CaCl<sub>2</sub> 1.7mM, KCl 4.9mM, pH 7.2) o PBS 1X (NaCl 136mM, KCl 2.68mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76mM pH7.0) estériles, en donde se liberaron de todas sus membranas extraembrionarias. Inmediatamente se colocaron en PFA (paraformaldehído 3.5% en PBS 1X) estéril para fijación por toda la noche a 4°C, haciendo un cambio de PFA limpio. Al día siguiente, los embriones se seccionaron con un corte sagital separando en dos partes y se deshidrataron con dos cambios de metanol al 50% en PBT (PBS 1X, Tween 20 0.1%) de 30 minutos cada uno y otros dos cambios de metanol absoluto de 40 minutos. Los embriones se almacenaron a 4°C en metanol absoluto hasta su uso en la hibridación *in situ*, este tiempo de almacén no debe exceder de una semana.

## 2.2.6 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Se utilizó la técnica de hibridación *in situ* de sondas marcadas con digoxigenina en embriones seccionados sagitalmente.

Los embriones seccionados se colocaron en viales de vidrio y se rehidrataron en metanol al 66, 50 y 33% en PBT (PBS 1X, Tween 20 0.1%), el tiempo de cambio de una solución a otra fue hasta que los embriones, que en un inicio flotan, llegan a la base del vial o sedimentan; después 2 veces en PBT por 10 minutos. Al tejido se le eliminó todo el color natural haciendo un lavado de 1 hora a temperatura ambiente sin agitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6% en PBT y posteriormente 3 lavados en PBT de 5 minutos en agitación. Se hizo una digestión con proteinasa K en PBT (10 mg/ml) para permeabilizar el tejido, por 20 minutos a temperatura ambiente. Se postfijó con glutaraldehído en PFA con PBT (PFA 3.5%, Glutaraldehído 25% y Tween20 10%) y se lavó 2 veces con PBT de 5 minutos en agitación. Se hizo una prehibridación en buffer de hibridación (Formamida 50%; SSC 5X; heparina 50µL/ml; Tween 20 0.1%; tRNA 50µL/ml; DNA de esperma de salmón 50µL/ml) por una hora a 70°C y se hibridó toda la noche a 70°C con las sondas de RNA (c33 antisentido, c33 sentido y TH antisentido) a 2µg/ml en el buffer de hibridación.

Posterior a la hibridación se hizo una serie de lavados para retirar la sonda inespecífica y preparar el tejido para empezar la detección con el

anticuerpo. Se hicieron 2 lavados con solución I (Formamida 50%, SSC pH4.5 4X, SDS 1%) de 30 minutos a 70°C, otro lavado de 10 minutos con una mezcla 1:1 de la solución I y II, tres lavados de 5 minutos a 70°C con la solución II (NaCl 0.5M, Tris pH 7.5 10mM, Tween 20 0.1%), un lavado de 5 minutos y 2 de 30 minutos a 70°C con la solución III (Formamida 50%, SSC 2X pH4.5). Se hicieron otros 3 lavados con MABT [MAB 1X (ácido maléico 100mM, NaCl 150mM y NaOH 200mM), Tween 20 0.1X] de 5 minutos a temperatura ambiente y agitación, se prebloqueó (Suero de cabra 10% en MABT) por 3 horas a temperatura ambiente con agitación y por último se incubó toda la noche con el anticuerpo anti-digoxigenina-AP (1:3000) en solución de prebloqueo a 4°C y agitación.

Se eliminó el exceso de anticuerpo mediante 5 lavados de 1 hora c/u a temperatura ambiente y agitación y otro de toda la noche a 4°C en agitación con MABT.

Se observó el resultado mediante la adición del sustrato para la fosfatasa alcalina. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente y agitación en NTMT (NaCl 0.1M, Tris pH 9.5 0.2M, MgCl<sub>2</sub> 0.05M, Tween20 0.1%) y posteriormente se incubó con una solución de 4.5µL de NBT mas 3.5 µL de BCIP por mililitro de NTMT en oscuridad, temperatura ambiente y estático hasta que se revelaron. Por último se paró la reacción lavando con PBS 1X y se conservaron en PFA al 3.5% para su posible disección.

## 2.2.7 OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS.

Después de llevar a cabo la hibridación, los embriones en paraformaldehído 3.5% estéril se cambiaron a sacarosa al 30% estéril en donde se mantuvieron por 24 horas o hasta que se sumergían completamente en la solución. Posteriormente los embriones se transfirieron a moldes de plástico conteniendo Tissue-tek O.C.T. (gel para congelar tejidos) y se colocaron inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  para mantenerlos congelados hasta la obtención de los cortes histológicos.

Se hicieron cortes sagitales de  $10\mu\text{m}$  de grosor en un criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los cortes se colocaron en portaobjetos. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 minutos, se postfijaron en PFA 3.5% por 15 minutos, se lavaron en PBS y por último se montaron con glicerol al 90% en PBS para el análisis a microscopía de luz.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.2.8 TINCIÓN DE LAS SECCIONES CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

Se llevó a cabo la tinción de hematoxilina y eosina en cortes por congelación de embriones en condiciones normales sin hibridación, para observar la morfología celular.

Las secciones por congelación se lavaron por 15 minutos en PBS 1X y se postfijaron en PFA al 3.5% por 15 minutos, se hizo un siguiente lavado con PBS1X por 5 minutos y se enjuagaron en agua destilada. Se colocaron en una solución de hematoxilina por 1 minuto; se lavaron abundantemente en agua destilada y se pusieron en una solución de eosina por alrededor de 5-10 segundos, se lavaron nuevamente en abundante agua destilada y se montaron de forma semipermanente con glicerol al 90% en PBS 1X para su observación a microscopía de luz.

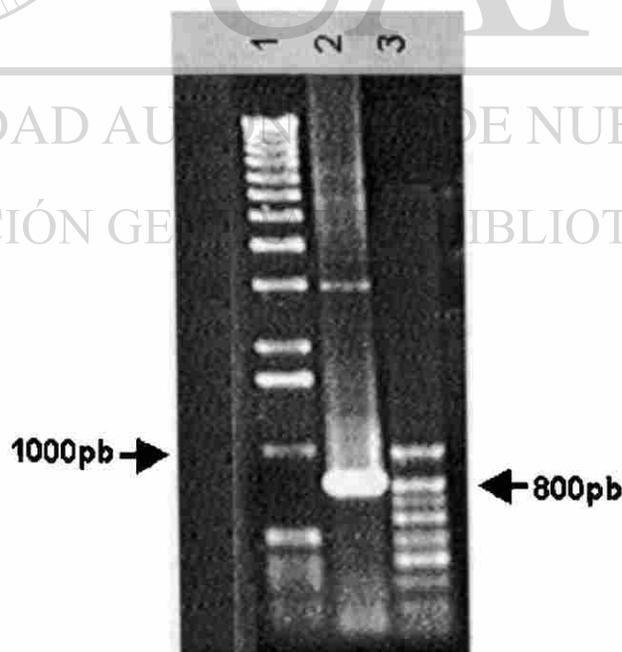
## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA c33 EN pCRIITOPO.

##### 3.1.1 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN c33 POR PCR

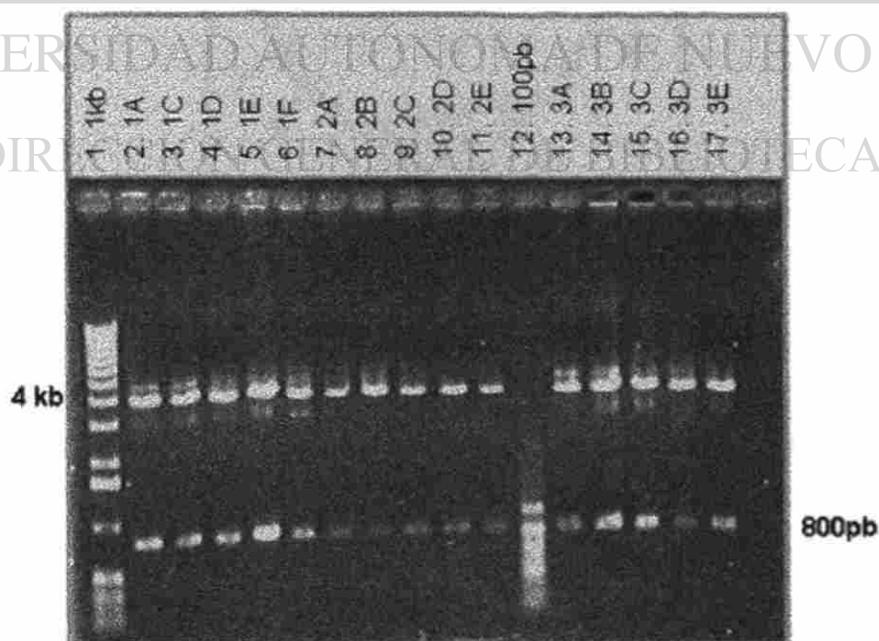
Para la clonación de la secuencia c33 se amplificó a partir del vector pTAdv-c33 y se clonó en el vector pCRIITOPO. El producto de DNA amplificado corresponde a un tamaño de 800 pb aproximadamente (figura 4).



**Figura 4. Amplificación por PCR del fragmento c33.** DNA del plásmido pTAdv que se utilizó como molde para amplificar el gen c33 (carril 2). Los marcadores de peso molecular corresponden al 1 Kb (carril 1) y de 100 pb (carril 3). Análisis en gel de agarosa al 0.8% con tinción bromuro de etidio.

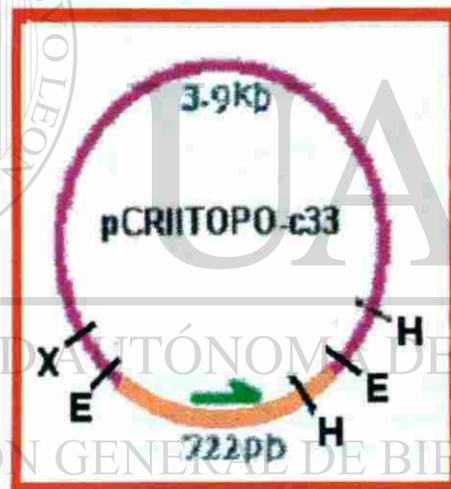
### 3.1.2 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO c33 EN pCRIITOPPO

El producto de PCR se ligó al vector pCRIITOPPO y con la reacción se transformaron bacterias *E. coli* calcio competentes. A las colonias resultantes se les determinó si contenían el plásmido pCRIITOPPO portando el fragmento del gen c33. Para esto se obtuvo su DNA plasmídico y se digirió con la enzima de restricción EcoRI que flanquea al posible inserto y comprobar que efectivamente se contaba con la presencia del fragmento del gen c33 en el vector pCRIITOPPO. La figura 5 muestra los resultados del análisis de los plásmidos, en donde se observa que de 15 colonias analizadas todas liberaron un fragmento de 800 pb aproximadamente correspondiente al fragmento del gen c33. Es decir, se logró la clonación del fragmento del gen c33 en el vector pCRIITOPPO.



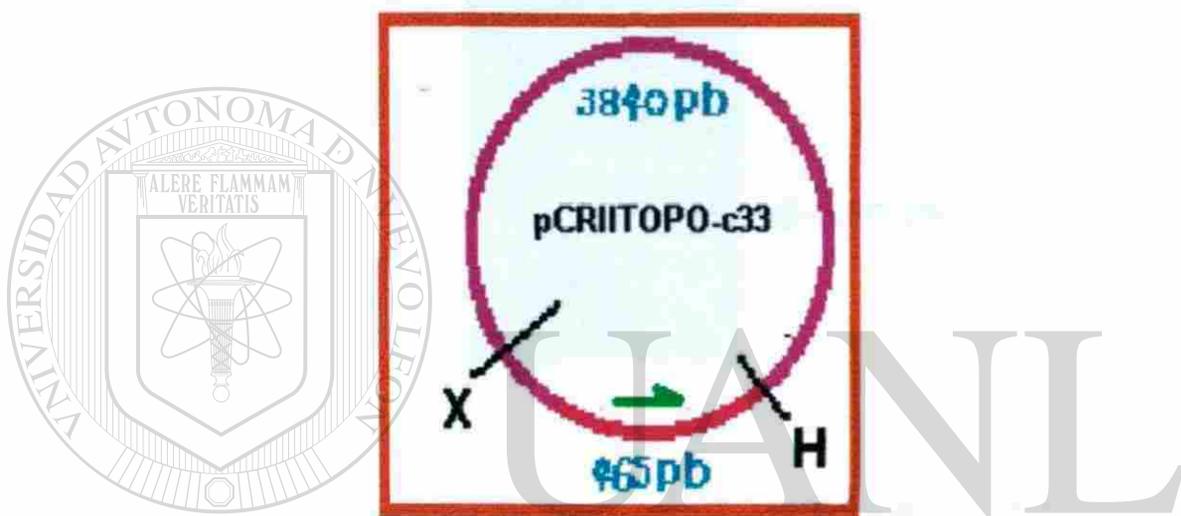
**Figura 5. Clonación del fragmento c33 en pCRIITOPPO.** Se obtuvo DNA plasmídico y se digirió con EcoRI. Carriles 2-11 y 13-17 corresponden a las clonas obtenidas. Carriles 1 y 12, marcadores de peso molecular de 1 Kb y 100 pb respectivamente. Análisis en gel de agarosa al 0.8% con tinción de bromuro de etidio.

Con el propósito de disminuir la inespecificidad durante la hibridación *in situ*, se disminuyó el tamaño de la sonda de 722 pb a 460 pb. Esto se logró eliminando un fragmento de 250 pb de un extremo de la sonda. Para esto se analizó la secuencia de nucleótidos del gen c33 y se encontró un sitio de restricción para la enzima Hind III a 250 pb de uno de los extremos del fragmento clonado. Hacia el mismo extremo en el vector pCRIITOP0 existe también un sitio de restricción Hind III. Por lo tanto procedimos a digerir el plásmido con dicha enzima liberándose el fragmento de 250 pb (figura 6).



**Figura 6. Mapa del vector pCRIITOP0-c33.** Esquema que muestra los sitios de corte de Hind III (H) en la construcción pCRIITOP0-c33 para reducir el tamaño del fragmento de c33 de 722pb a 460pb.

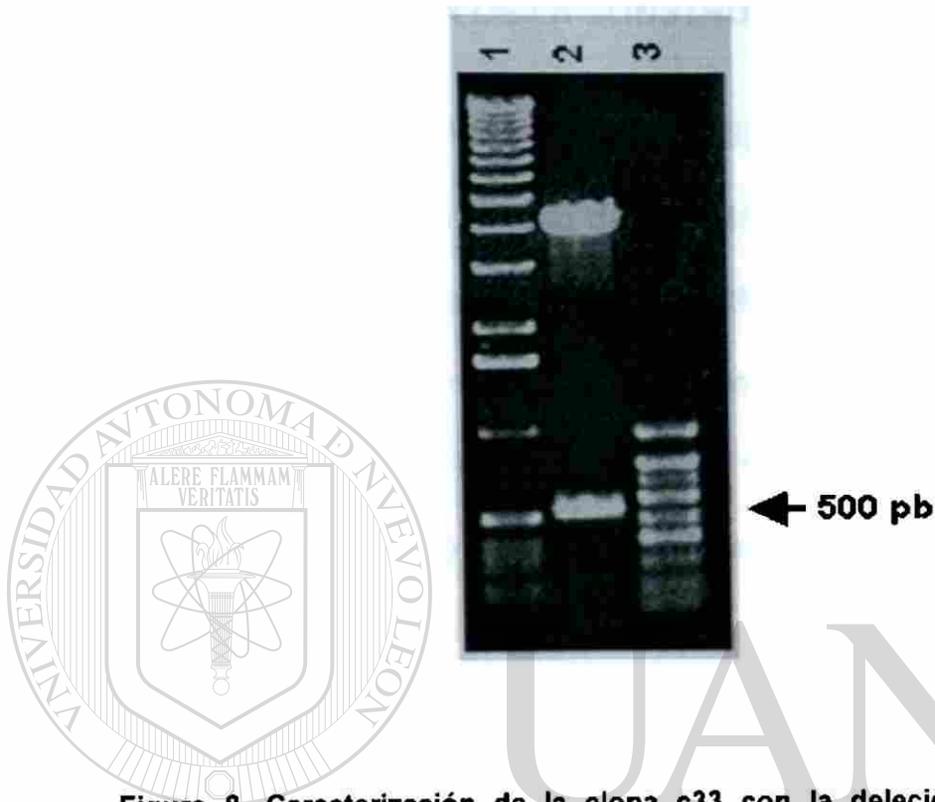
Posteriormente el vector lineal resultante se ligó sobre si mismo y se usó para transformar bacterias *E.coli*. Las clonas resultantes se analizaron con enzimas de restricción que cortan en sitios que flanquean al inserto que en este caso corresponde a un fragmento de aproximadamente 500 pb flanqueado por los sitios de corte Hind III (H) y Xho I (X) (figura 7).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Figura 7. Mapa del vector pCRIITOP0-c33 deletado.** Esquema que muestra los sitios de corte de Hind III (H) y Xho I (X) utilizados para liberar un fragmento de aproximadamente 500 pb que demostrará la presencia de c33 en su tamaño reducido de 465 pb.

La figura 8 muestra el resultado de la clona seleccionada la cual se digirió con las enzimas antes mencionadas (Xho I y Hind III) Se observa la liberación de un fragmento de 465 pb correspondiente al tamaño del fragmento génico esperado y el vector pCRIITOP0 de 4000 pb aproximadamente.



**Figura 8. Caracterización de la clona c33 con la deleción Hind III.** El vector pCRII TOPO-c33 fue digerido con Hind III (H) y Xho I (X) (Carril 2). En carriles 1 y 3 se muestran los marcadores de DNA de 1 Kb y 100 pb respectivamente. Análisis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una vez caracterizada la clona seleccionada se colocó en medio LB para su multiplicación y se llevó a cabo una maxipreparación del DNA plasmídico para tener suficiente cantidad de DNA.

## 3.2 SÍNTESIS DE LAS SONDAS DE RNA.

### 3.2.1 LINEARIZACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN pCRIITOPPO-c33.

Antes de realizar la síntesis de las sondas por transcripción *in vitro* fue necesario linearizar el vector en uno de los extremos del fragmento de 465 pb del gen c33. Esto es importante para que la RNA polimerasa se detenga y no proceda la transcripción dentro del vector, obteniéndose una sonda de RNA únicamente del gen c33. Para generar la sonda de RNA marcada con digoxigenina c33 antisentido se cortó con Hind III; para generar la sonda de RNA c33 sentido se cortó con Xho I, y para generar la sonda de RNA TH antisentido se cortó con Hind III. En las figuras 9 y 10 se observan los productos linearizados para cada enzima ya purificados.



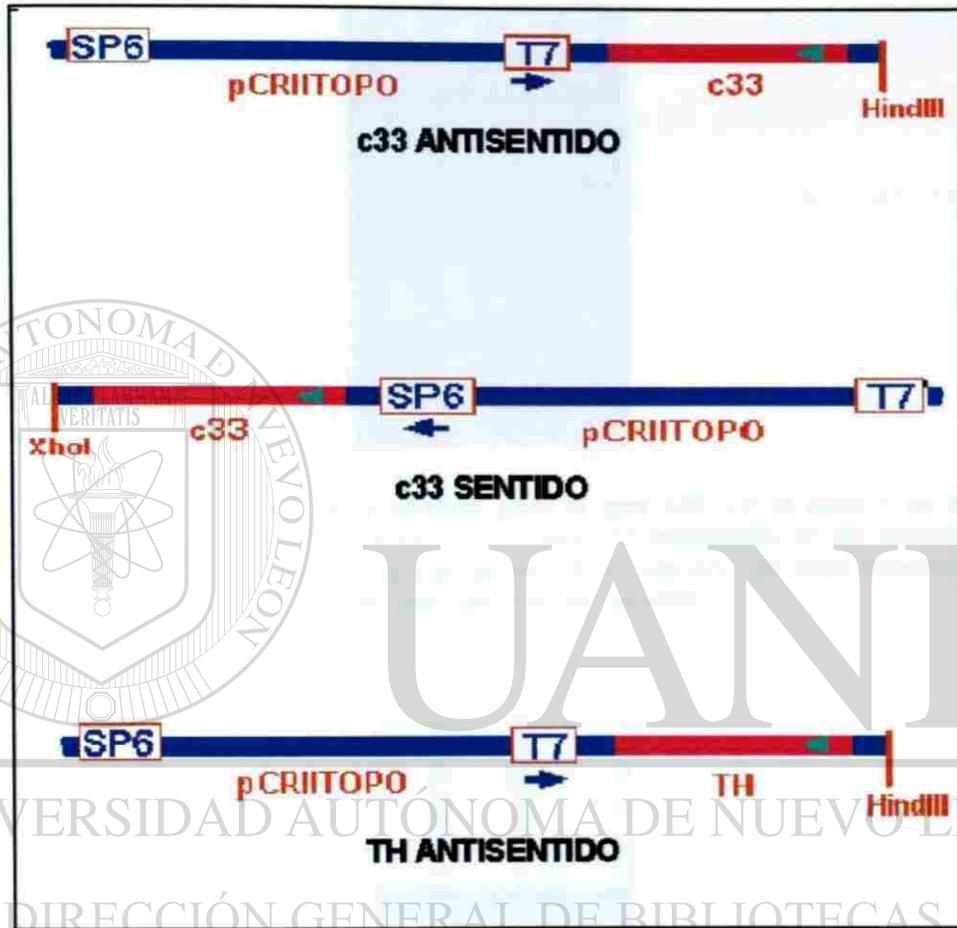
**Figura 9. Linearización de los plásmidos c33.** En los carriles 2 y 3 observamos el DNA de c33 linearizado con Hind III y Xho I respectivamente; en el carril 1 observamos el plásmido sin cortar y en el 4 vemos el marcador de 1 Kb. Análisis en gel de agarosa 0.8% con tinción de bromuro de etidio.



**Figura 10. Linearización del plásmido TH.** En el carril 2 se observa la banda que corresponde a la digestión con Hind III, en el carril 1 se observa el plásmido TH sin cortar y en el carril 3 se ve un marcador de DNA de 1Kb. Análisis en gel de agarosa al 0.8% con tinción de bromuro de etidio.

### 3.2.2 OBTENCIÓN DE SONDAS DE RNA MARCADAS CON DIGOXIGENINA.

Se realizó la síntesis de las tres sondas (c33 antisentido, c33 sentido y TH antisentido) de RNA marcadas con digoxigenina por medio de una reacción de transcripción *in vitro*, utilizando promotores de acuerdo al tipo de sonda requerida. Para la sonda c33 antisentido se utilizó la RNA polimerasa T7, para la sonda c33 sentido se utilizó la RNA polimerasa SP6 y para la síntesis de TH (control positivo) se utilizó la enzima T7 (figura 11), una vez concluida la reacción se procedió a la purificación de los RNA sintetizado, por columna de sephadex G50. En las figuras 12 y 13 se observan estas sondas de RNA producidas.



**Figura 11. Síntesis de las sondas de RNA.** Esquema que muestra el sitio de corte de la enzima utilizada para linearizar cada templado de DNA. Las flechas indican la RNA polimerasa utilizada y la dirección de síntesis del RNA. Nótese que en cada caso se transcribe únicamente la secuencia génica pero no el vector.



**Figura 12. Sondas antisentido y sentido para el gen c33.** En el carril 1 se observa el producto de la reacción de transcripción *in vitro* para c33 antisentido, en los carriles 2 y 3 se observa la sonda de RNA c33 sentido y en el carril 4 un marcador de peso molecular de 1Kb. Análisis en gel de agarosa al 0.8% teñidas con bromuro de etidio.



**Figura 13. Síntesis de la sonda de RNA TH antisentido.** En el carril 1 se observan los transcritos que corresponden a la sonda de RNA TH antisentido, en el carril 2 un marcador de 1 Kb. Análisis en gel de agarosa 0.8% teñidas con bromuro de etidio.

### 3.3 OBTENCIÓN DE LOS EMBRIONES.

De acuerdo a nuestro número de sondas: c33 AS, c33 S y TH AS, se sacrificaron 5 hembras preñadas para cada estadio gestacional de 10.5 a 15.5 días, lo que da un total de 35 hembras sacrificadas para este estudio. Como promedio, obtuvimos 175 embriones, se utilizaron 20 embriones para cada estadio embrionario.

### 3.4 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para los estudios de la expresión de c33 mediante hibridación *in situ* de embrión completo, se utilizaron embriones que no tuvieran más de dos semanas en metanol absoluto.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

#### 3.4.1 EXPRESIÓN DE TH (CONTROL POSITIVO) EN EMBRIONES DE RATONES SILVESTRES DE 12.5 DÍAS DE GESTACIÓN.

Paralelo a cada hibridación, se corrió la sonda de TH antisentido como control positivo de la reacción; se utilizó este gen de la TH debido a que ya se conoce su patrón de expresión, y se expresa a nivel de la región mesencefálica. Lo cual fue de mucha utilidad en la estandarización de la técnica. La figura 14 muestra el patrón de expresión de la sonda de TH antisentido.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 14. Expresión de TH en embriones de ratón de E12.5.** Embriones de 12.5 días fueron hibridados con una sonda de RNA antisentido para detectar la expresión de TH. La señal de expresión se observa como manchas café oscuro. En este caso se observa a nivel cefálico en la región mesencefálica e hipotálamo (indicado por las flechas). Los ganglios neuronales de la médula espinal que expresan TH también presentaron hibridación positiva (flechas verdes). 0.75X.

### 3.4.2 EXPRESIÓN DEL GEN c33 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE RATÓN.

Con el propósito de conocer la función del gen c33 y de comprobar su expresión en la región mesencefálica analizamos embriones de ratón de 10.5 a 15.5 días de desarrollo.

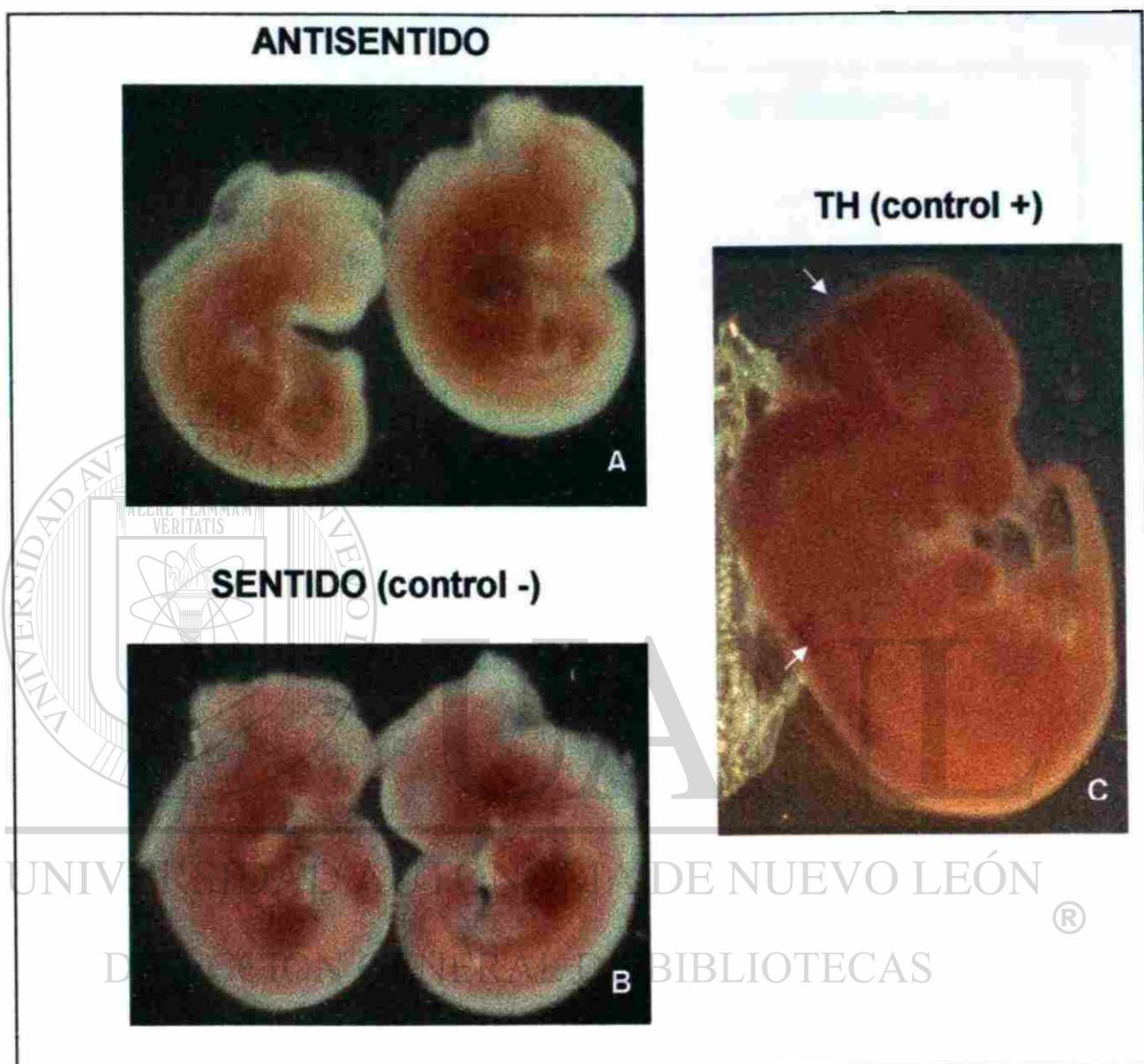
Los resultados de los análisis de expresión del gen c33 obtenidos mediante hibridación *in situ* se muestran en la tabla 6.

Edad gestacional	Expresión de c33
E10.5	-
E11.5	-
E12.5	+
E13.5	-
E14.5	-
15.5 (cerebro)	-

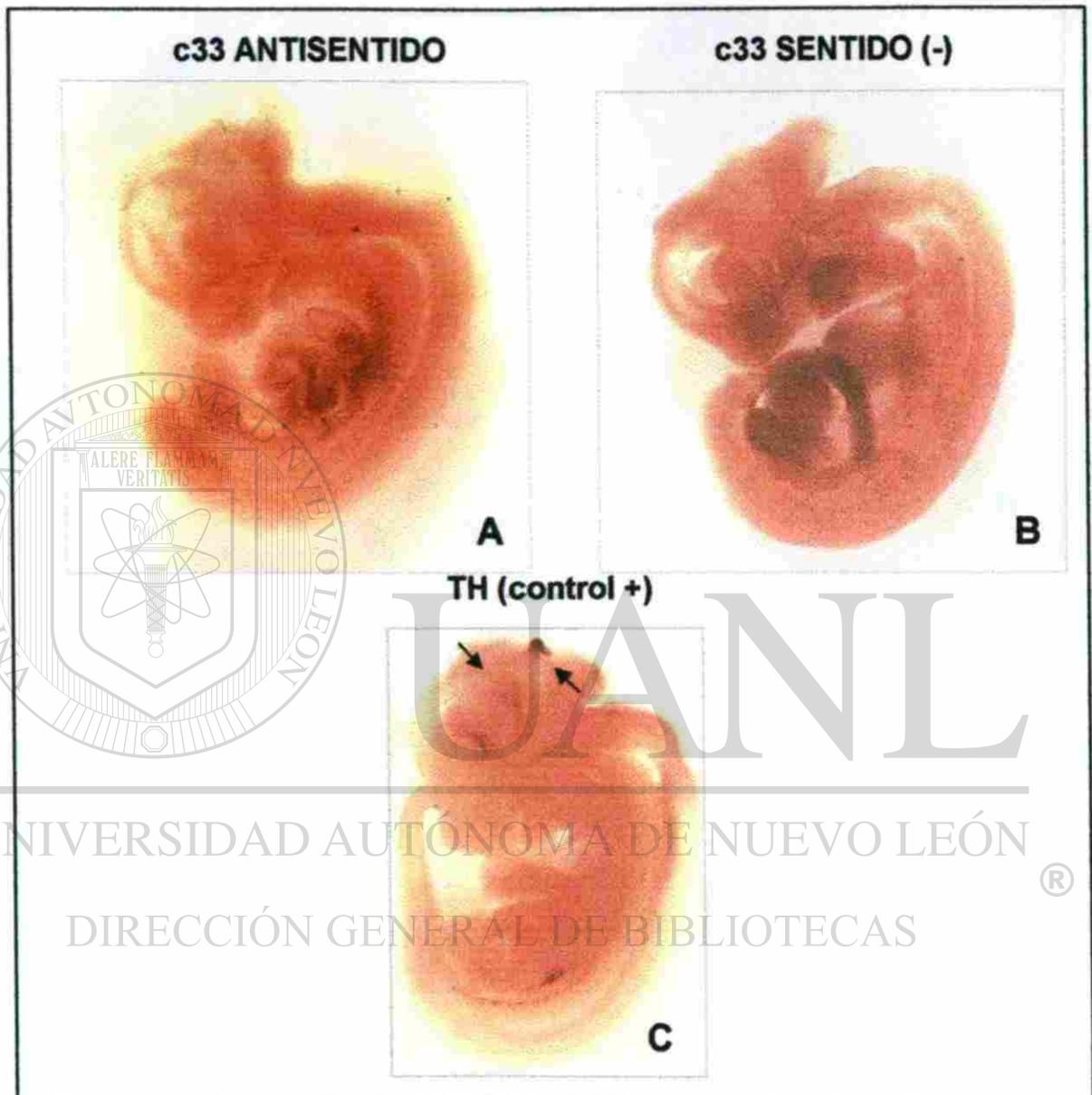
Tabla 6. Resultados de la expresión del gen c33

Los embriones analizados fueron de 10.5 días a 14.5 días, y cerebros de embriones de 15.5 días, la expresión del gen c33 se encontró únicamente en embriones de 12.5 días.

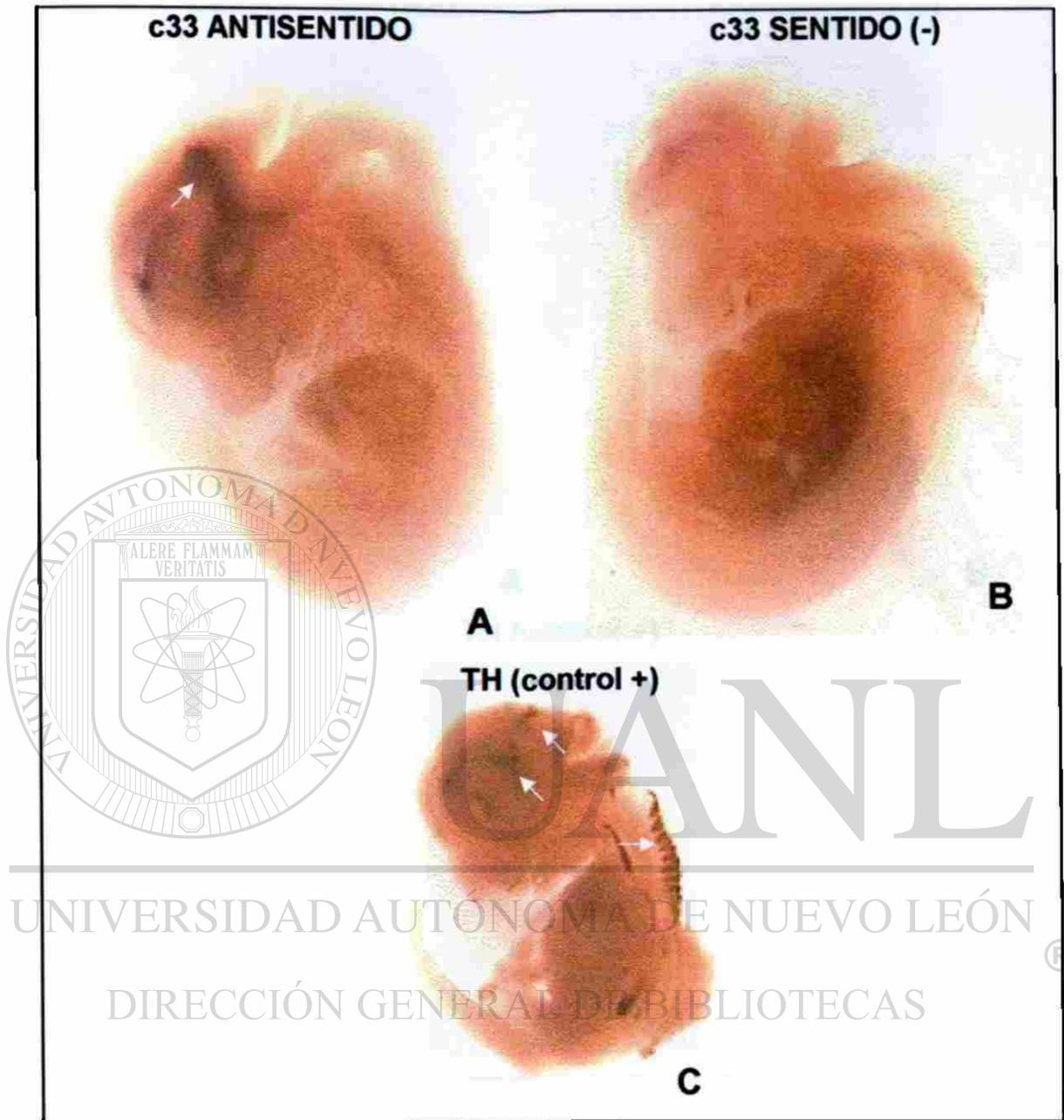
El patrón de expresión obtenido para cada una de las etapas gestacionales analizadas se describe en las figuras 15-20.



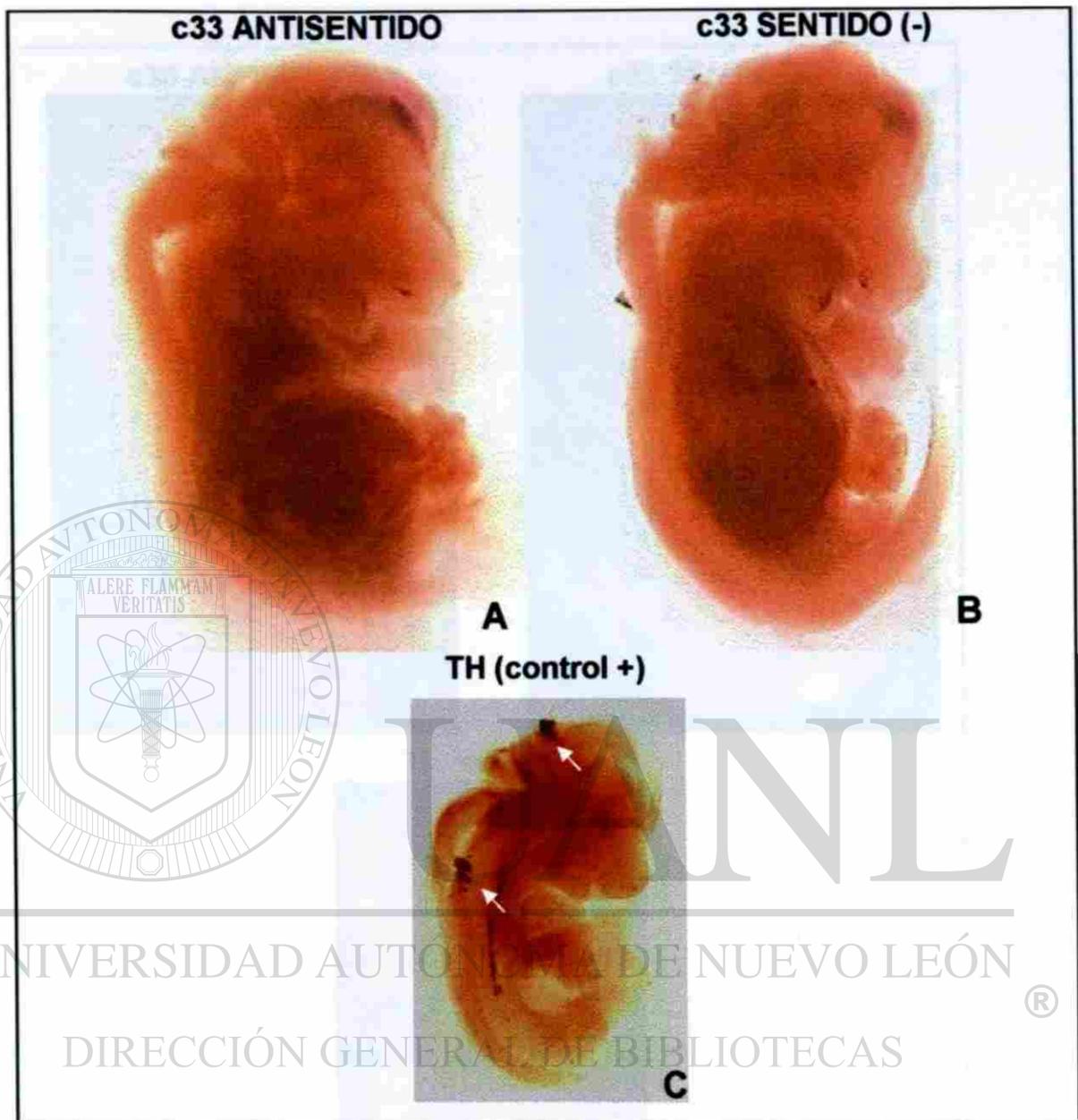
**Figura 15. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 10.5 días.** Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH si mostró una señal de reacción, indicado por la flecha en embrión de 12.5 días de desarrollo (C). A y B 1.25X, C 0.75X.



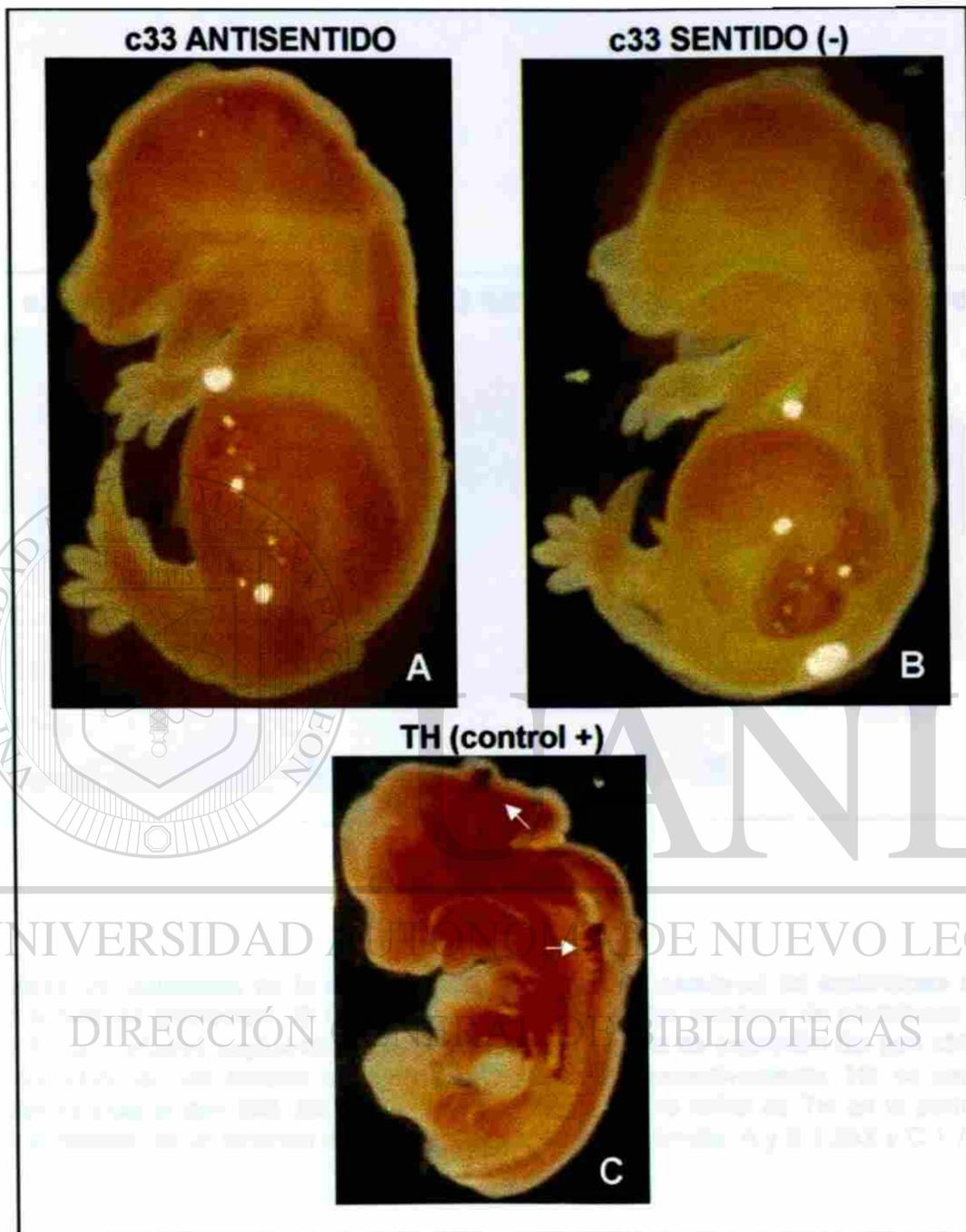
**Figura 16. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 11.5 días.** Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH sí mostró una señal de reacción, indicado por las flechas en embrión de 12.5 días de desarrollo (C). A y B 1X, C 0.75X.



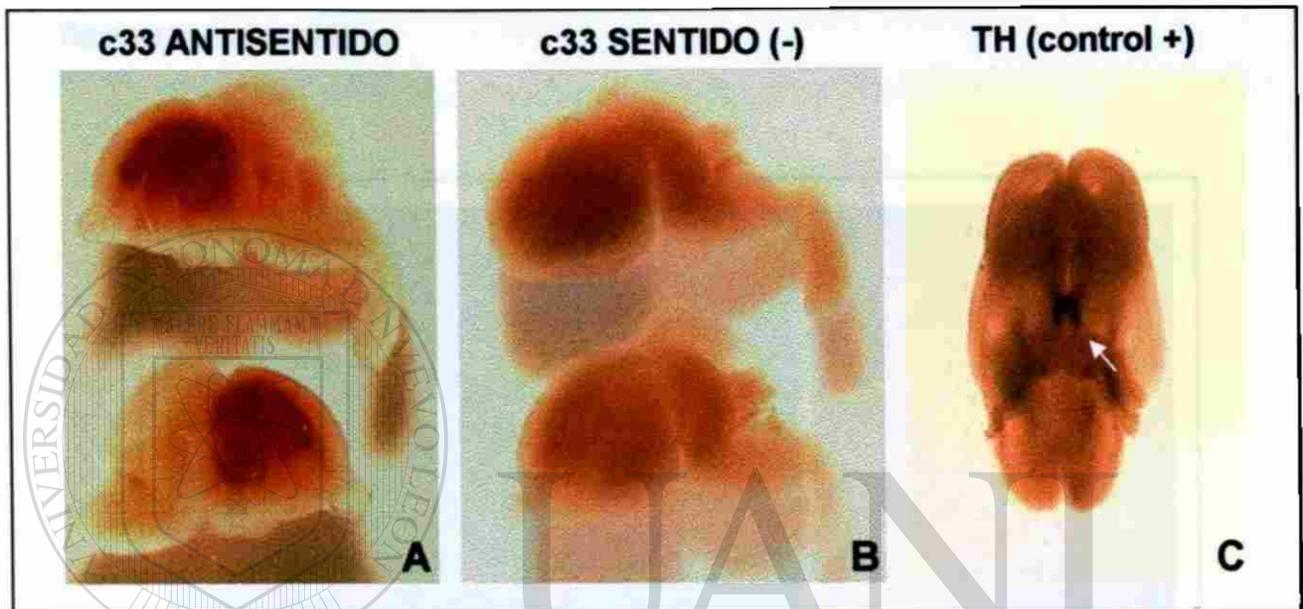
**Figura 17. Expresión del gen c33 en embriones de E12.5.** Durante este estadio se observa señal de expresión a nivel de la región mesencefálica, a lo largo de la flexura, con la sonda antisentido (A), lo cual no ocurre con la sonda sentido (B). En C vemos el control positivo TH para la reacción, con su patrón característico en embrión de 12.5 días. 0.75X.



**Figura 18. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 13.5 días.** Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH si mostró una señal de reacción, indicado por las flechas en embrión de 12.5 días de desarrollo (C). A y B 0.5X, C 0.75X.



**Figura 19. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de E14.5 días de gestación. Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH si mostró una señal de reacción, indicado por las flechas en embrión de 12.5 días de desarrollo (C). A y B 1X, C 0.75X.**

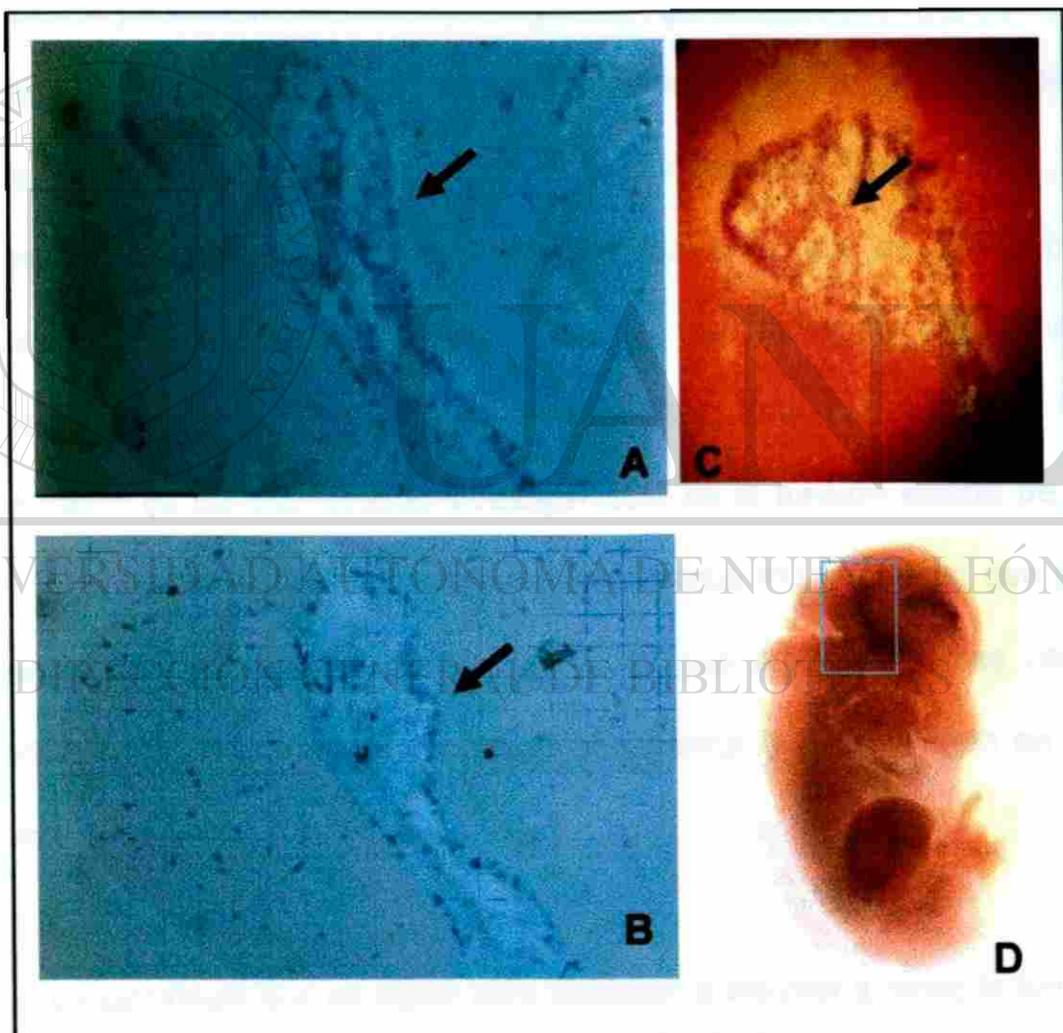


## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Figura 20. Ausencia de la expresión del gen c33 en cerebros de embriones de ratón de 15.5 días de gestación.** En las figuras A y B se muestran cerebros de embriones de ratón de 15.5 días cortados sagitalmente, para mostrar la ausencia de expresión del gen c33 que fueron hibridados con las sondas c33 antisentido y sentido respectivamente. No se encontró señal positiva para el gen c33. En la figura C la flecha indica la señal de TH en la parte ventral del mesencéfalo de un embrión de ratón de 12.5 días de desarrollo. A y B 1.25X y C 1.75X.

### 3.4.3 OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS A PARTIR DE LOS EMBRIONES POSITIVOS PARA EL GEN c33.

En las preparaciones histológicas de los embriones de 12.5 días de desarrollo que mostraron señal positiva para la sonda antisentido c33, se observó que la señal está localizada solo en el mesénquima que rodea a la flexura mesencefálica.



**Figura 21. Expresión del gen c33 en el mesénquima de la flexura mesencefálica en embrión de ratón de 12.5 días.** Se realizaron cortes sagitales de 20 $\mu$ m de espesor de la región mesencefálica de embriones de 12.5 días de desarrollo. A y B cortes sagitales de embrión de ratón a nivel de la región mesencefálica. C la misma región teñida con hematoxilina y eosina. Note que el área de expresión corresponde al mesénquima en A y B. D en el recuadro la región que se está viendo en los cortes. A y B 5X, C 10X y D 0.75X.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

Nurr1 es un factor de transcripción que al ser suprimido en un ratón, ocasiona la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Saucedo-Cardenas y cols., 1998). Debido a esta pérdida de neuronas dopaminérgicas se pensó que Nurr1 está regulando a algunos genes (Baffi y cols., 1999; Saturada y cols., 1999) involucrados en los procesos de diferenciación, maduración y mantenimiento fenotípico de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Saucedo-Cárdenas y cols., 1997; Zetterstrom y cols., 1996). Por lo tanto es de gran interés investigar cual es la función exacta de Nurr1, sobre todo por la comparación con los organismos KO para este gen con los pacientes con enfermedad de Parkinson, ya que son las mismas neuronas dopaminérgicas de la región ventral mesencefálica que degeneran en ambos casos.

La estrategia que se siguió para empezar a estudiar a fondo la función de Nurr1 fue realizar la comparación del RNA de la región mesencefálica de embriones de ratón mutante para Nurr1 con el de embriones de ratón silvestre mediante un despliegue diferencial de RNAs. Mediante esta técnica se encontró que varios genes, entre ellos c33, al parecer, habían sido afectados por la

inactivación de Nurr1. Al comparar c33 en el Genbank se observó que presentaba alta homología con un gen en el humano de función desconocida.

Al analizar el patrón de expresión de c33 en el desarrollo embrionario de ratón observamos que la expresión es positiva en el mesénquima que rodea a la flexura mesencefálica únicamente en embriones de 12.5 días de gestación. A diferencia de Nurr1 que se expresa en la parte ventral mesencefálica.

Además se observa una mancha a nivel del ventrículo telencefálico con la sonda c33 antisentido, pero ya que se presenta también con la sentido, se descarta como una señal positiva de expresión del gen.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia del gen c33 en la región mesencefálica. Ya que como se mencionó anteriormente, esta clona fue obtenida a partir de la región mesencefálica de embriones de ratones silvestres mediante un despliegue diferencial de RNAs. Cabe señalar que en esta región las tres partes importantes que se localizan son: la parte dorsal mesencefálica, la parte ventral mesencefálica y el mesénquima que está rodeando a la flexura mesencefálica.

Puesto que cuando se realizan disecciones para extraer la región mesencefálica como se hizo para el despliegue diferencial de RNAs, normalmente es muy difícil separar el tejido nervioso del mesénquima, ya que el embrión de 12.5 días no mide más de 7 mm el manejo de esta región es muy

minucioso. Por ésta razón, se logró obtener la clona c33, que de acuerdo a nuestros resultados, parece ser que la expresión del gen c33 es específica del tejido mesenquimatoso de la cabeza durante el desarrollo embrionario, donde algunas regiones del mesénquima se originan de la cresta neural y el cual da origen a diferentes tipos celulares del tejido conectivo del adulto. De allí, que la diferenciación de estos tipos celulares, podría estar influida por la expresión de Nurr1 durante este estadio embrionario, puesto que la expresión de Nurr1 se localiza en las neuronas de la región ventral del mesencéfalo.

Por otra parte, la sorpresiva expresión de este gen tan específicamente localizado en espacio y tiempo, nos genera mucho interés, ya que a estas edades, el mesénquima embrionario comienza a sufrir procesos de diferenciación. Generalmente cuando un gen presenta este tipo de características tan específicas, se cree que podría estar relacionado con procesos de proliferación y diferenciación.

Este trabajo, marca la pauta para futuros estudios *in vitro*, donde se pueda inducir la diferenciación del mesénquima embrionario por la presencia de la expresión del gen c33.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- La expresión del gen c33 se restringe al mesénquima embrionario a nivel de la flexura mesencefálica, a diferencia de Nurr1 que se expresa en las neuronas de la región ventral del mesencéfalo.
- El gen c33 se expresa durante el desarrollo embrionario únicamente a los 12.5 días en el mesénquima de la región mesencefálica.
- Debido a su corto tiempo de expresión este gen podría estar involucrado en procesos de regulación génica y/o diferenciación de las células mesenquimatosas de la región mesencefálica.
- La expresión de la clona c33 está ausente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguilar-Rebolledo F.** Avances en la restauración del sistema Nervioso. Vicova Editores. México.163-173. (1994).
2. **Baffi J.S., Palkovits M., Castillo S.O., Mezey E. and Nikodem V.M.** Differential expression of tyrosine hydroxylase in catecholaminergic neurons of neonatal wild-type and NURR1-deficient mice. *J. Neurosci.* 93: 631-642. (1999).
3. **Castillo S.O., Baffi J.S., Palkovits M., Goldstein D.S., Kopin I.J., Witta J., Magnuson M.A. and Nikodem V.M.** Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol. Cell. Neurosci.* 11(1-2):36-46. (1998).
4. **Carulli J.P., Artinger M., Swain P. M., Root C. D., Chee L., Tulig C., Guering J., Osborne M., Gary Stein, Lian J., and Lomedico P. T.** High Throughput Analysis of Differential Gene Expression. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30/31:286-296. (1998).
5. **Corton J.C. and Gustafsson J.** Update to: Increased Efficiency in Screening Large Numbers of cDNA Fragments Generated by Differential Display. *BioTechniques.* 22:802-810. (1997).
6. **Ericson J., Muhr J., Placzek M., Lints T., Jessell T.M. and Edlund T.** Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a

common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell*. 81:747-756. (1995).

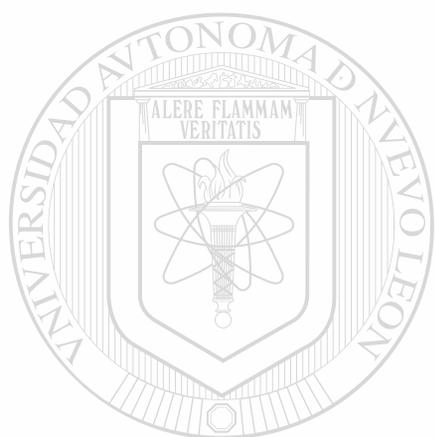
7. **Guyton A.C.** y **Hall J.E.** Tratado de Fisiología Médica. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. p. 773-791. (1997).
8. **Hazel T.G.**, **Nathans D.** and **Lau L.F.** A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8444-8448. (1988).
9. **Ichinose H.**, **Ohye T.**, **Suzuki T.**, **Sumi-Ichinose C.**, **Nomura T.**, **Hagino Y.**, **Nagatsu T.** Molecular cloning of the human Nurr1 gene: characterization of the human gene and cDNA. *Gene* 230:233-239. (1999).
10. **Kaufman M.** and **Bard J.** The anatomical Basis of Mouse Development. Academic Press. USA. p. 4-50. (1999).
11. **Law S.W.**, **Conneely O.M.**, **DeMayo F.J.** and **O'Malley B.W.** Identification of a New Brain-Specific Transcription Factor, NURR 1. *Mol. Endocrinol.* 6:2129-2135. (1992).
12. **Liang P.** and **Pardee A.B.** Differential Display of eukariotic messenger RNA by means of Polymerase chain reaction. *Science*. 257:967-971. (1992).
13. **Maruyama K.**, **Tsukada T.**, **Bandoh S.**, **Sasaki K.**, **Ohkura N.** And **Yamaguchi K.** Expresion of NOR-1 and its closely related members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily in human neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 96:117-122. (1995).

14. **Mages H.W.**, Rilke O., Bravo R., Senger G. and Kroczeck R.A. NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol. Endocrinol.* 8:1583-1591. (1994).
15. **Nakai A.**, Kartha S., Sakurai A., Toback F.G. and DeGroot L.J. A human early response gene homologous to murine Nurr77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 4:1438-1443. (1990).
16. **Ohkura N.**, Hijikuro M., Yamamoto A. and Miki K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205:1959-1965. (1995).
17. **Osborne G. S.**, Lian J. and Lomedico P. T.. High Throughput Analysis of Differential Gene Expression. *J. Cell. Biochem. Supp.* 30/31:286-296 (1998).
18. **Pardee A.B.**, McClelland M. *Expression Genetics: Differential Display*. Eaton Publishing. p.1-7. (1999).
19. **Pfaff D.W.**, Berrettini W.H., Jon T.H., Maxson S.C. *Genetics Influences on Neural and Behavioral Functions*. CRC Press. 15:277-292. (2000).
20. **Rugh R.** *The mouse its reproduction and development*. Oxford Science Publications, USA. 1-204. (1994).
21. **Saucedo Cárdenas O.** *Papel funcional del receptor nuclear NURR1 en el sistema nervioso central de mamífero*. Tesis doctoral. (1999).
22. **Saucedo-Cárdenas O.**, Quintana-Hau J.D., Le W., Smidt M.P., Cox J.J., DeMayo F., Peter J., Burbach H. and Conneely O.M. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral

mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Neurobiology*. 95:4013-4018. (1998).

23. **Sakurada K.**, Ohshima-Sakurada M., Palmer T.D. and Gage F. H. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*. 126:4017-4026. (1999).
24. **Scearce L.M.**, Laz T.M., Hazel T.G., Lau L.F. and Taub R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nurr77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J. Biol. Chem*. 268:8855-8861. (1993).
25. **Siebert P.** The PCR Technique: RT-PCR. Eaton Publishing, Natick, MA. (1998).
26. **Simmons D.**, Arriza J. and Swanson L. A Complete Protocol for In Situ Hybridization of Messenger RNAs in Brain and Other Tissues with Radio-labeled Single-Stranded RNA Probes. *J. Histotechnology*. 12:169-181. (1989).
27. **Smidt, M.P.**, Van Schaick H., Lanct C., Tremblay J., Cox J., Vander Kleij A., Wolterink G., Drouin J. and Burbach J. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:13305-13310. (1997).
28. **Thomas, K.R.** and Capecchi M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51:503-512. (1987).
29. **Wallen A.**, Zetterstrom R., Solomin L., Arvidsson M., Olson L. and Perlmann T. Fate of Mesencephalic AHD2-Expressing Dopamine Progenitor Cells in Nurr1 Mutant mice. *Cell. Res*. 253:737-746 (1999).

30. **Wilkinson D.G.** *In situ* Hybridization A Practical Approach. IRL press. p. 1-31 (1993).
31. **Witta J., Baffi J.S., Palkovits M., Mezey E., Castillo S.O., Nikodem V.M.** Nigrostriatal innervation is preserved in Nurr1-null mice, although dopaminergic neuron precursors are arrested from terminal differentiation. *Mol. Brain Res.* 84:67-78. (2000).
32. **Ye W., Shimamura K., Rubenstein J., Hynes M. and Rosenthal A.** FGF and Shh signal control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell.* 93:755-766. (1998).
33. **Zetterström R.H., Williams R., Perlmann T., Olson L.** Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopaminergic system. *Mol. Brain Res.* 41:111-120. (1996).
- 
34. **Zetterström R.H., Solomin L., Jansson L., Hoffer B.J., Olson L. and Perlmann T.** Dopamine Neuron Agenesis in Nurr1-Deficient Mice. *Science.* 276:248-250. (1997).



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



