

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION DE UN GEN
CUYA EXPRESION ES AFECTADA POR LA
INACTIVACION DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCION NURR1**

Por

Q.F.B. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en Morfología**

Febrero, 2002

C. 1
.22
C 3
QF 356
TM

Q.F.B. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA



1080113111

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE UN GEN CUYA EXPRESIÓN
ES AFECTADA POR LA INACTIVACIÓN DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN NURR1**

Por

Q.F.B. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en Morfología**

Febrero, 2002



El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la codirección de el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y el Dr Roberto Montes de Oca Luna.

**ANÁLISIS DEL PATRON DE EXPRESIÓN DE UN GEN CUYA EXPRESIÓN
ES AFECTADA POR LA INACTIVACION DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCION NURR1**

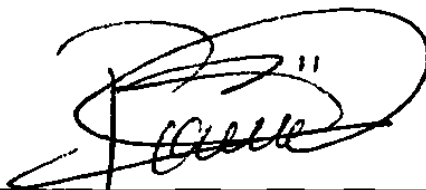
Aprobación de la Tesis:



DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS
Director de Tesis



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis



DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Comisión de Tesis



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
De Investigación y Estudios de Posgrado

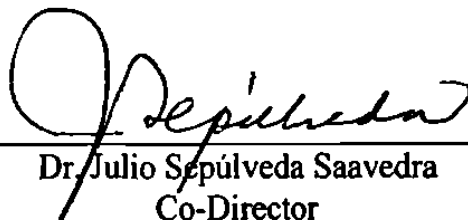
**ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION DE UN GEN CUYA EXPRESION
ES AFECTADA POR LA INACTIVACION DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCION NURRI**

Presentado por la Q.F.B. Diana Laura Castillo Carranza

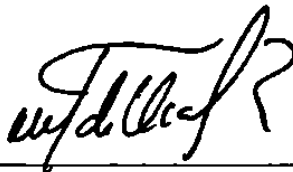
Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y bajo la co-dirección de el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL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



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra
Co-Director



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director

DEDICATORIA

A mis padres

A quienes les debo todo lo que soy y a quienes no me alcanzaría la vida para agradecerles lo mucho que de ellos he recibido.

A mis hermanos

Enrique y Jesús por estimularme a salir adelante y brindarme su apoyo.

A mis sobrinos

Anaid, Enrique y Jesús, aunque algunas veces me pregunto:
¿Dónde está Herodes?

A mi familia

Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

En la vida de cada persona siempre existen “ángeles” que nos motivan a ser mejores seres humanos, los míos son mis padres.

A mi madre, la Sra. Ma. Lucila Carranza de Castillo, agradezco todo su apoyo, consejos y el compartir mis sueños.

A mi padre, el Sr. Santos Castillo Campos, de quien aprendí que todo cuanto se desea en la vida se puede lograr con esfuerzo y tenacidad.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por aceptarme en el postgrado y sobre todo por la confianza que ha depositado en mí y el apoyo brindado para sacar adelante este trabajo.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas por todo lo que de ella he aprendido, por su entusiasmo, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Rocío Ortiz López por formar parte de mi comisión de tesis.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, a la Dra. Raquel Ballesteros, al Dr. Norberto López y al maestro Viktor Romero, por su ayuda en diferentes etapas de la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio del CIBIN: Carlos, Blanca, Perú, Catalina, Maribel y clonito, por hacer de esas horas de trabajo toda una aventura y un momento de diversión.

A mis compañeros de maestría, Carmen, Gloria y Rafa, por los buenos momentos. En especial a Marcos por lo importante que ha sido en mi vida.

A mis amigas, Marisela, América, Lucy, Francis y Lety por que siempre es posible contar con ellas.

Al personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y al personal del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, por facilitar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMEN	iv

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1 Superfamilia de receptores nucleares	3
1.2 Subfamilia Nurr	3
1.3 Nurr1 (Nur relacionado al factor 1)	5
1.3.1 Organización estructural del gen Nurr1	6
1.3.2 Knock-out Nurr1	7
1.4 Justificación	11
1.5 Objetivos	12
1.5.1 Objetivo general	12
1.5.2 Objetivos específicos	12
1.6 Estrategia experimental	13

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

2.1 Material	14
2.1.1 Origen de los reactivos	14
2.1.2 Material biológico.	15
2.2 Equipo	15
2.3 Métodos.	16
2.3.1 Obtención del material histológico	16
2.3.1.1 Disección de cerebros de ratones RN	16

2.3.1.2	Obtención de embriones CD1	16
2.3.1.3	Inclusión en parafina	17
2.3.1.4	Obtención de cortes histológicos	17
2.3.1.5	Desparafinación de secciones histológicas	18
2.3.2	Obtención y cuantificación del DNA	18
2.3.2.1	Extracción de DNA genómico	18
2.3.2.2	Extracción de DNA plasmídico	19
2.3.2.2.1	Pequeña escala (Mini-preparación de plásmidos)	19
2.3.2.2.2	Gran escala (Maxi-preparación de plásmidos)	20
2.3.2.3	Análisis electroforético y cuantificación de DNA	21
2.3.3	Obtención del genotipo	22
2.3.3.1	PCR	22
2.3.4	Subclonación	23
2.3.4.1	Digestión con enzimas de restricción	23
2.3.4.2	Purificación de fragmentos	23
2.3.4.3	Ligación	24
2.3.4.4	Transformación	24
2.3.5	Síntesis de sondas para los ensayos de hibridación <i>in situ</i>	25
2.3.5.1	Síntesis y marcaje de la sonda OS40	25
2.3.5.2	Síntesis y marcaje de la sonda Nurr1	26
2.3.6	Hibridación <i>in situ</i>	26
2.3.6.1	Hibridación <i>in situ</i>	26
2.3.6.2	Autorradiografía	27
2.3.6.3	Emulsión de Kodak	27
2.3.6.4	Revelado y fijación de las secciones histológicas	27
2.3.6.5	Tinción de las secciones	28
2.3.7	Obtención del material fotográfico	28

CAPITULO III. RESULTADOS

3.1	Obtención del genotipo de ratones recién nacidos	29
3.2	Subclonación de la secuencia OS40 en el vector pCRII	30
3.3	Hibridación <i>in situ</i>	31
3.3.1	Comparación de la expresión de OS40 en cerebros de ratones knock-out y silvestres	32
3.3.1.1	Expresión de OS40 en cerebros de ratones silvestres	32
3.3.1.2	Expresión de OS40 en cerebros de ratones knock-out Nurr1.	32
3.3.2	Análisis del patrón de expresión de OS40 en el desarrollo embrionario	33
3.3.2.1	Expresión de OS40 en embriones de 8.5 días de desarrollo	34
3.3.2.2	Expresión de OS40 en embriones de 9.5 días de desarrollo	34
3.3.2.3	Expresión de OS40 en embriones de 10.5 días de desarrollo	35
3.3.2.4	Expresión de OS40 en embriones de 11.5 días de desarrollo	37
3.3.2.5	Expresión de OS40 en embriones de 12.5 días de desarrollo	38
3.3.2.6	Expresión de OS40 en embriones de 13.5 días de desarrollo	39
3.3.2.7	Expresión de OS40 en embriones de 14.5 días de desarrollo	40

3.3.2.8	Expresión de OS40 en embriones de 16.5 días de desarrollo .	42
3.3.2.9	Expresión de OS40 en embriones de 18.5 días de desarrollo .	44

CAPITULO IV. DISCUSION DE RESULTADOS	47
---	-----------

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES

5.1	Conclusiones	53
5.2	Contribuciones	54

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA	55
--	-----------

LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla 1. Genotipificación: condiciones de reacción22

Tabla 2. Patrón de expresión de OS40 durante el desarrollo embrionario46

LISTA DE FIGURAS	PAGINA
Figura 1. Organización estructural del gen <i>Nurr1</i>	6
Figura 2. Estrategia experimental	13
Figura 3. Determinación del genotipo de ratones recién nacidos	30
Figura 4. Subclonación	31
Figura 5. Expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones silvestres	32
Figura 6. Confirmación de la ausencia de expresión de la sonda OS40 en cerebros de ratones recién nacidos knock-out <i>Nurr1</i>	33
Figura 7. Expresión de OS40 en un embrión de 8.5 días	34
Figura 8. Expresión de OS40 en un embrión de 9.5 días	35
Figura 9. Expresión de OS40 en un embrión de 10.5 días	36
Figura 10. Expresión de OS40 en embriones de 11.5 días	37
Figura 11. Expresión de OS40 en embriones de 12.5 días	38
Figura 12. Expresión de OS40 en un embrión de 13.5 días	39
Figura 13. Expresión de OS40 en un embrión de 14.5 días	41
Figura 14. Expresión de OS40 en un embrión de 16.5 días	43
Figura 15. Expresión de OS40 en un embrión de 18.5 días	45

NOMENCLATURA

DNA	Acido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
RNA	Acido ribonucleico
a.a.	Amino ácidos
KCl	Cloruro de potasio
μ M	Concentración micromolar
mM	Concentración milimolar
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
ddPCR	Despliegue diferencial de RNAs mensajeros
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
°C	Grados centígrados
μ g	Microgramo
Kb	Kilobases
KO	Knock-out
UV	Luz ultravioleta
μ Ci	Micro curie
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
mQ	MiliQ
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA _t	RNA de transferencia
RNA _m	RNA mensajero
SNC	Sistema nervioso central
TH	Tirosina hidroxilasa

RESUMEN

Diana Laura Castillo Carranza
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Febrero de 2002

**Título del estudio: ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION DE UN GEN CUYA
EXPRESION ES AFECTADA POR LA INACTIVACION DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCION NURR1**

Número de páginas: 59

**Candidata para el grado de Maestría 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 fracasan en la enfermedad de Parkinson. En el presente estudio se trabajó con una secuencia de cDNA (OS40) 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 (Knockout). La secuencia OS40 de interés, ausente en los ratones Knockout Nurr1, se aisló a partir de la región mesencefálica de ratones silvestres recién nacidos. La secuencia OS40 posee una alta homología con la secuencia de un gen humano de función desconocida. La secuencia OS40 se utilizó como sonda para nuestros análisis de expresión mediante hibridación in situ. El objetivo del presente trabajo consistió en la confirmación de la ausencia de expresión de la secuencia OS40 en el knockout Nurr1 y la obtención de su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario del ratón.

Contribuciones y conclusiones: Nosotros confirmamos la ausencia de este gen nuevo en la región ventral mesencefálica de ratones recién nacidos knockout Nurr1 y obtuvimos su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario del ratón. La expresión de este nuevo gen, comienza a partir del día 8.5 a lo largo del neuroepitelio. Su expresión se mantiene en el cerebro hasta el estado de recién nacido, no así en los otros órganos como el hígado, riñón, timo, pulmón e intestino, donde la expresión de OS40 se asocia con el inicio de la diferenciación celular de estos órganos y termina cuando están en su etapa de maduración. Entre otros órganos donde encontramos expresión para OS40 se encuentran, el epitelio nasal, la lengua, y pulpa dental. Nuestros estudios de expresión demuestran que este gen nuevo podría estar involucrado en los procesos de proliferación y/o diferenciación celular. Y aún lo más interesante es que pudiera tener un papel importante en la diferenciación y/o mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en conjunto con el gen Nurr1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan conocimiento nuevo en el área de investigación básica.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Asesor