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

BIOL. BLANCA ROCIO RANGEL COLMENERO

TM
QL799
.5
.R3
2003
c.1

1080117729

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

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

Por

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

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

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.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN NUEVO GEN AISLADO DE LA REGIÓN MESENCEFÁLICA 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

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

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.

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 *in situ* 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 pCRIITOPO 18
2.2.2.1 Amplificación por PCR de la secuencia c33 18
2.2.2.2 Ligación del producto de PCR al vector pCRIITOPO . . . 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 *in situ* 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 pCRIITOPO 35
3.1.1 Amplificación del fragmento del gen c33 por PCR. 35
3.1.2 Clonación del fragmento del gen c33 en pCRIITOPO 36
3.2 Síntesis de las sondas de RNA 40
3.2.1 Linearización de la construcción pCRIITOPO-c33 40
3.2.2 Obtención de sondas de RNA marcadas con digoxigenina. 41
3.3 Obtención de los embriones 44
3.4 Hibridación *in situ* 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

LISTA DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Condiciones de reacción para la amplificación por la técnica de PCR 18

Tabla 2. Programa utilizado para la amplificación del fragmento c33 19

Tabla 3. Condiciones de reacción para la ligación del producto de amplificación al vector pCRIITOPO 21

Tabla 4. Condiciones de reacción para la linearización del plásmido pCRIITOPO-c33 26

Tabla 5. Condiciones de reacción utilizadas en la transcripción *in vitro* de las sondas de RNA 28

Tabla 6. Resultados de la expresión del gen c33 46

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. Esquema representativo del gen Nurr1. 4
Figura 2. Resumen esquemático de la estrategia general. 17
Figura 3. Esquema representativo del vector pCRIITOPO 20
Figura 4. Amplificación por PCR de c33 35
Figura 5. Clonación del gen c33 en pCRIITOPO.. 36
Figura 6. Mapa del vector pCRIITOPO-c33. 37
Figura 7. Mapa del vector pCRIITOPO-c33 deletado 38
Figura 8. Caracterización de la clona c33 con la deleción HindIII 39
Figura 9. Linearización de los plásmidos c33 40
Figura 10. Linearización del plásmido TH 41
Figura 11. Síntesis de las sondas de RNA 42
Figura 12. Sondas antisentido y sentido para el gen c33 43
Figura 13. Sintesis de las sondas de RNA TH antisentido 43
Figura 14. Expresión de TH en embriones de ratón de 12.5 días 45
Figura 15. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 10.5 días 47
Figura 16. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 11.5 días 48
Figura 17. Expresión del gen c33 en embriones de 12.5 días 49
Figura 18. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 13.5 días 50
Figura 19. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de E14.5 días de gestación 51
Figura 20. Ausencia de la expresión del gen c33 en cerebros de embriones de ratón de 15.5 días de gestación 52
Figura 21. 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
$CaCl_2$	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_2HPO_4	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
RNAt	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 *Thermus aquaticus*
TH	Tirosina hidroxilasa
U	Unidades
UTP	Uridin trifosfato
UV	Ultravioleta
Shh	Gen hedgehog sónico
FGF8	Factor de crecimiento de fibroblasto 8
-	Menos
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
^{35}S y ^{32}P	Isótopos radiactivos de azufre y fósforo respectivamente

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. Odila Saucedo Cárdenas