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.

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.

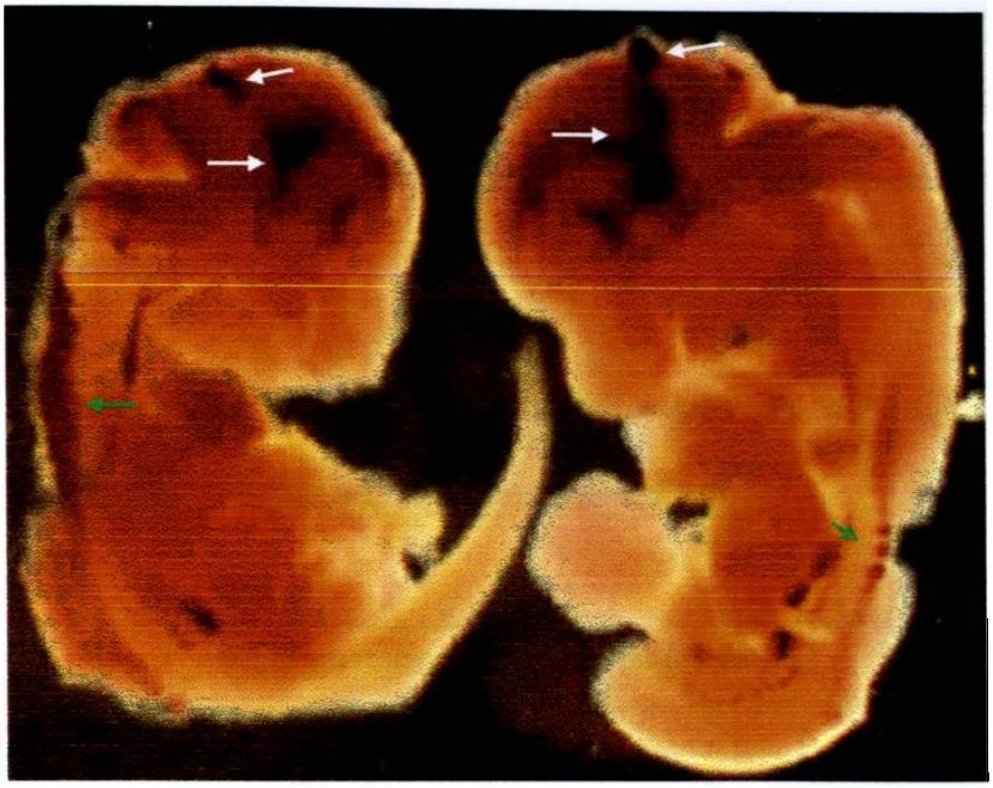

Figura 14. Expresión de TH en embriones de ratón de E12.5. Embriones de 12.5 días fueron hibridados con una sonda de RNA antisentido para detectar la expresión de TH. La señal de expresión se observa como manchas café oscuro. En este caso se observa a nivel cefálico en la región mesencefálica e hipotálamo (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.

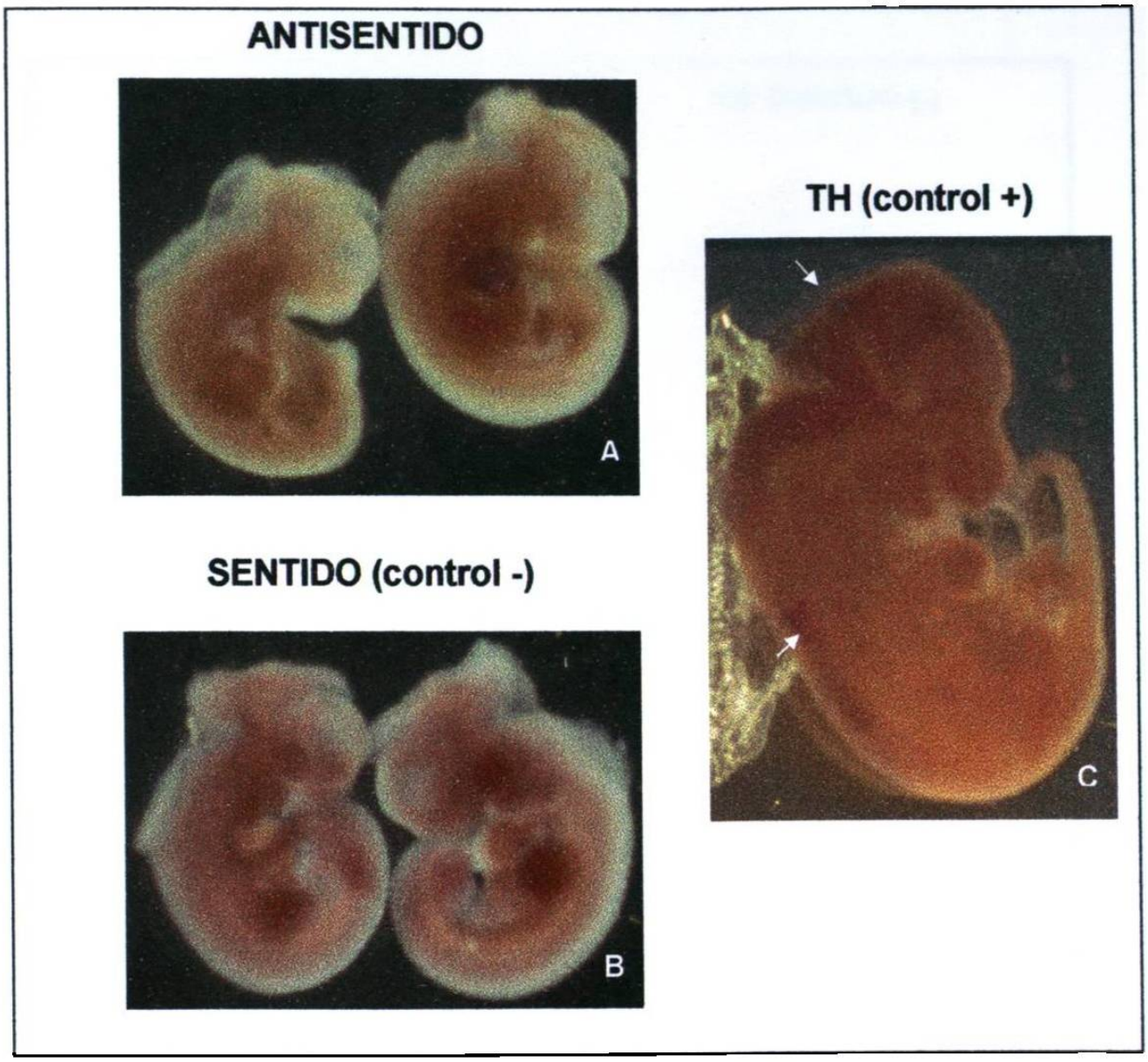

Figura 15. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 10.5 días. Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH si mostró una señal de reacción, indicado por la flecha en embrión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

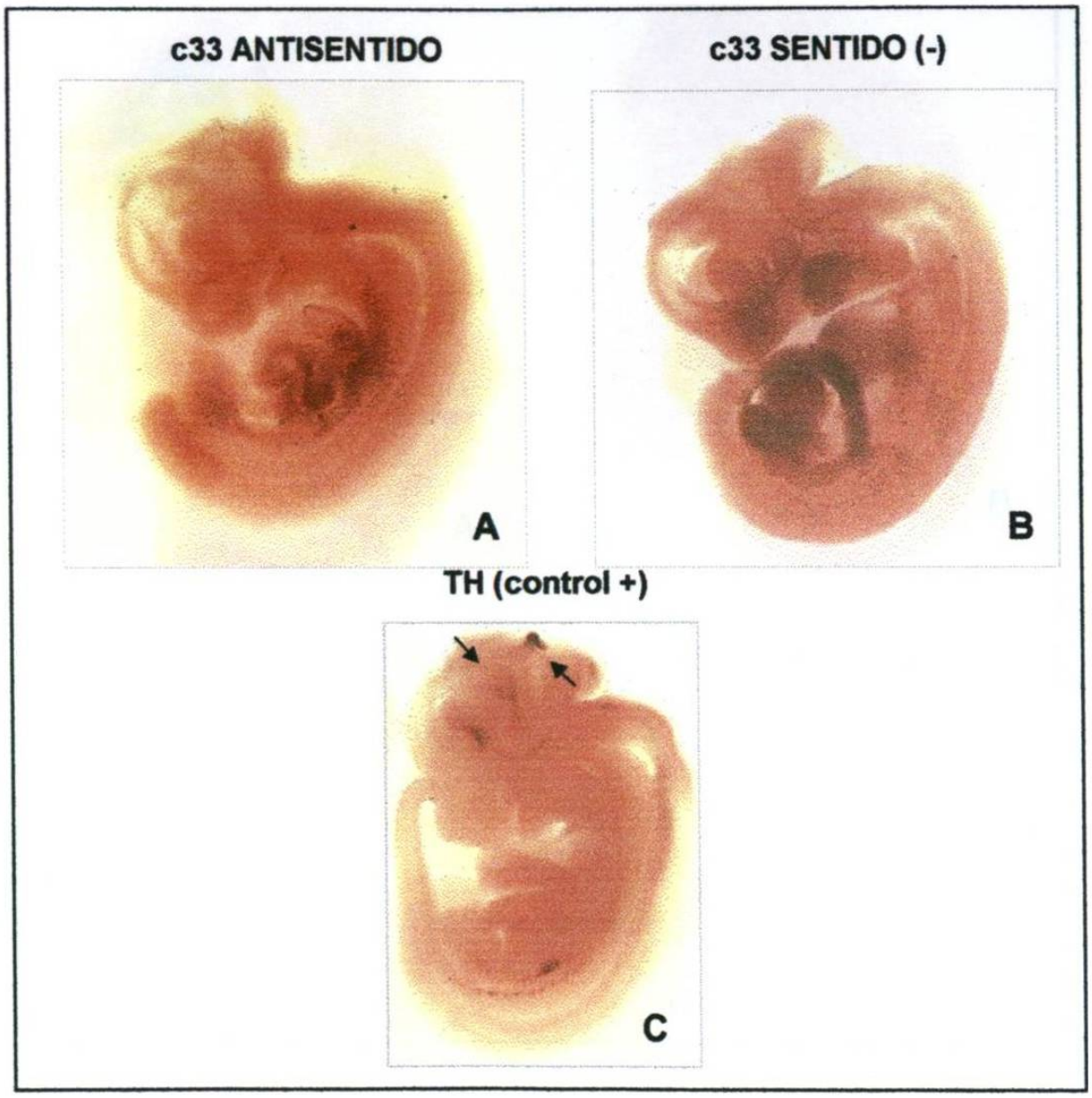

Figura 16. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 11.5 días. Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH si mostró una señal de reacción, indicado por las flechas en embrión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

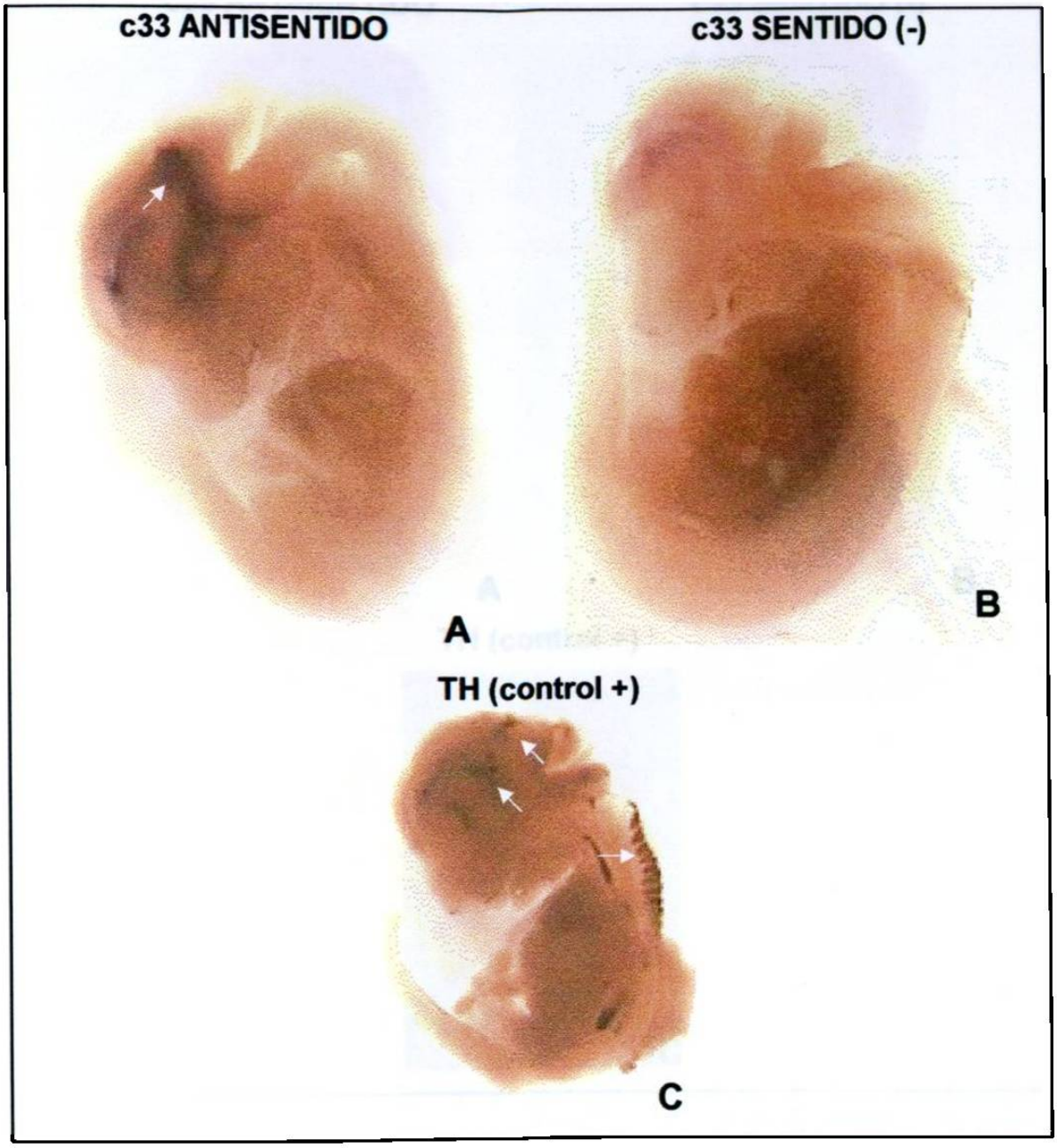

Figura 17. Expresión del gen c33 en embriones de E12.5. Durante este estadio se observa señal de expresión a nivel de la región mesencefálica, a lo largo de la flexura, con la sonda antisentido (A), lo cual no ocurre con la sonda sentido (B). En C vemos el control positivo TH para la reacción, con su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

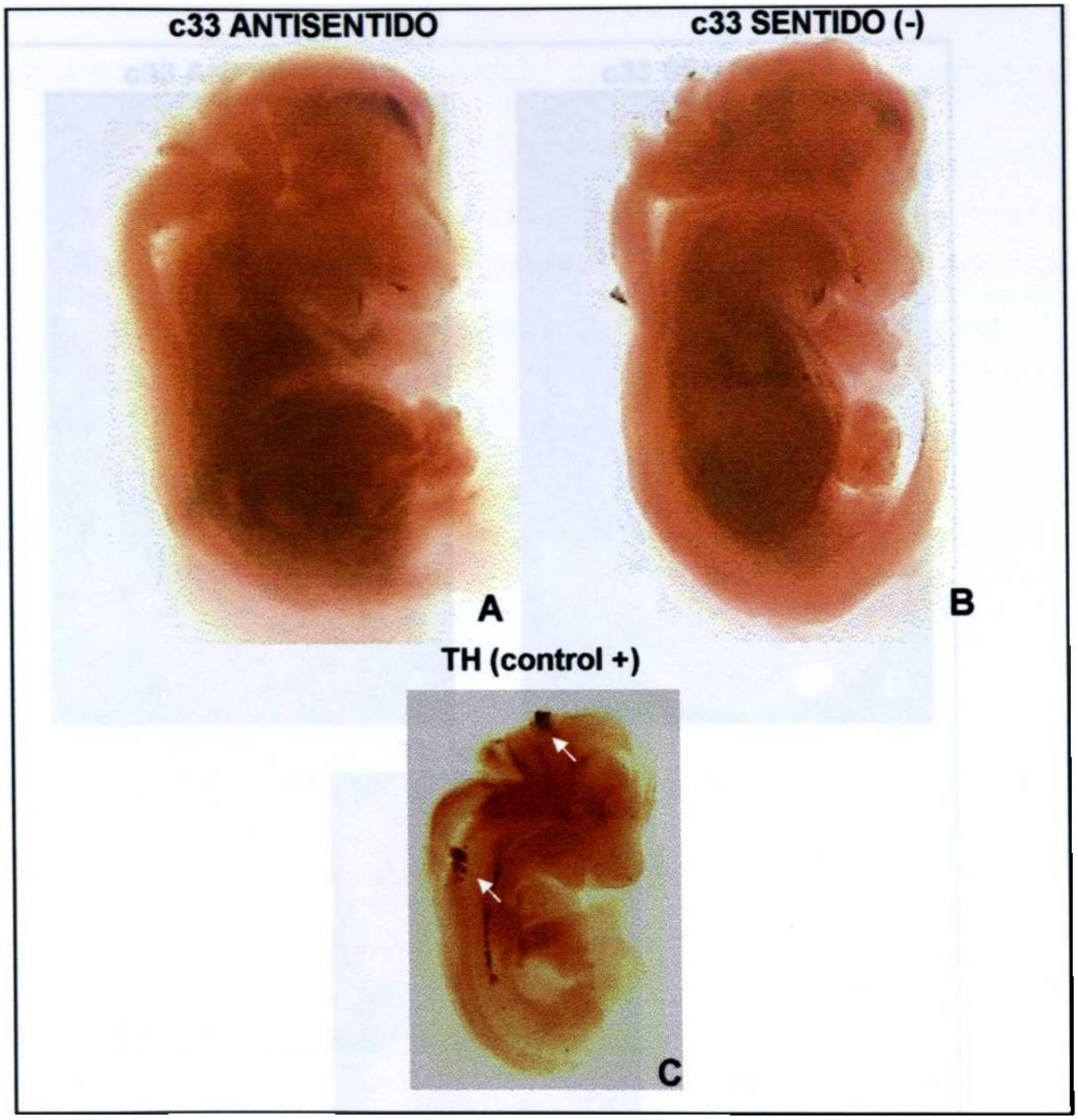

Figura 18. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de 13.5 días. Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH si mostró una señal de reacción, indicado por las flechas en embrión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

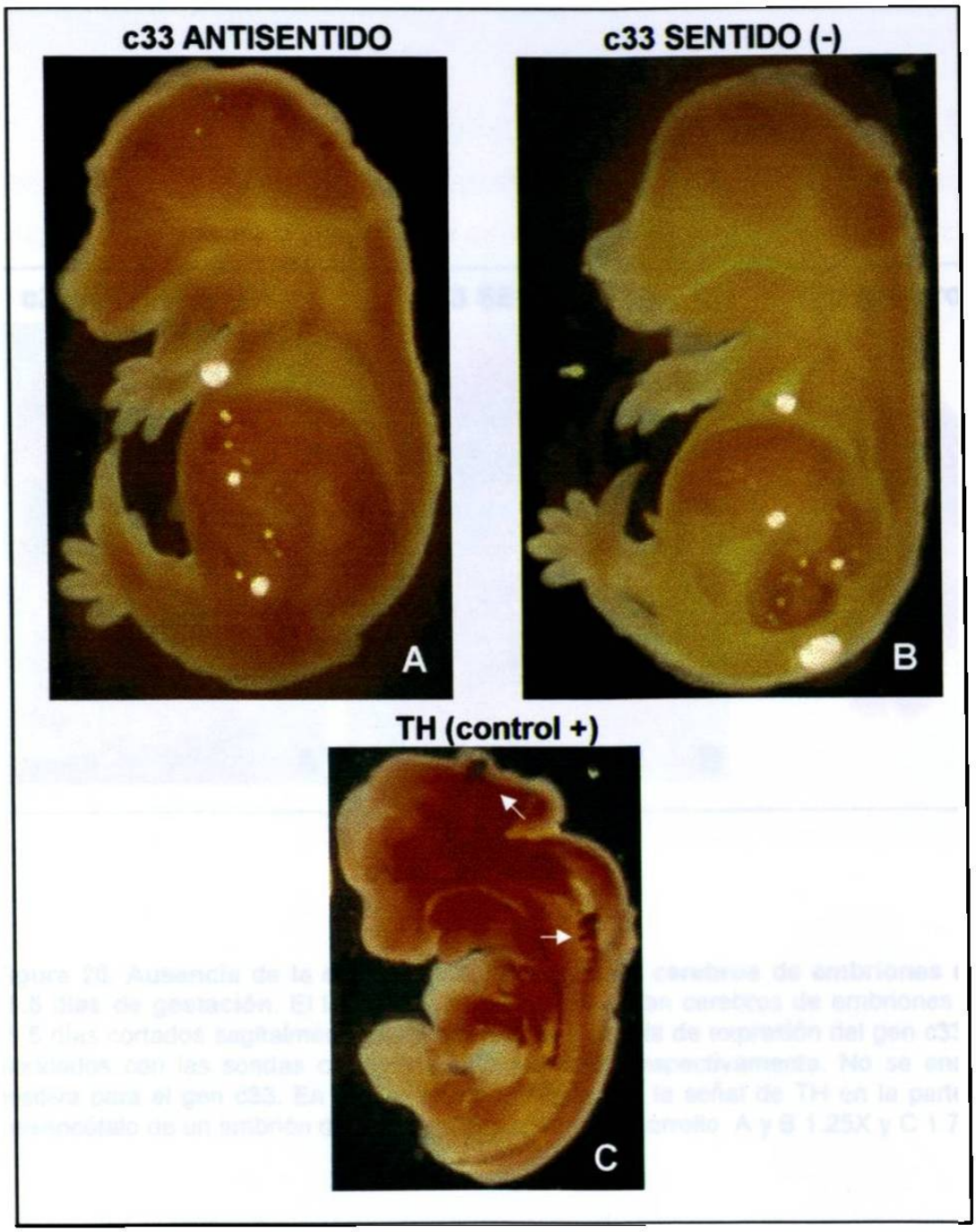

Figura 19. Ausencia de la expresión del gen c33 en embriones de ratón de E14.5 días de gestación. Durante este estadio no se observa señal de expresión en ningún órgano o tejido con la sonda antisentido (A) y sentido (B). El control positivo de TH si mostró una señal de reacción, indicado por las flechas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

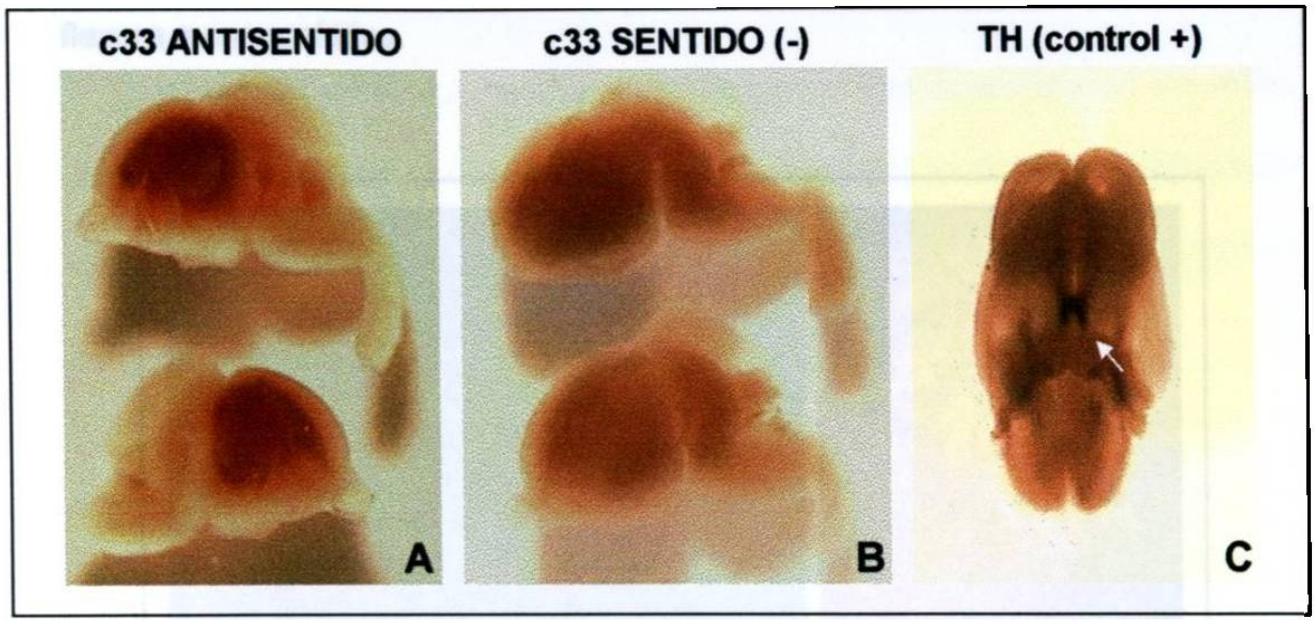

Figura 20. Ausencia de la expresión del gen c33 en cerebros de embriones de ratón de 15.5 días de gestación. El las figuras A y B se muestran cerebros de embriones de ratón de 15.5 días cortados sagitalmente, para mostrar la ausencia de expresión del gen c33 que fueron hibridados con las sondas c33 antisentido 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.

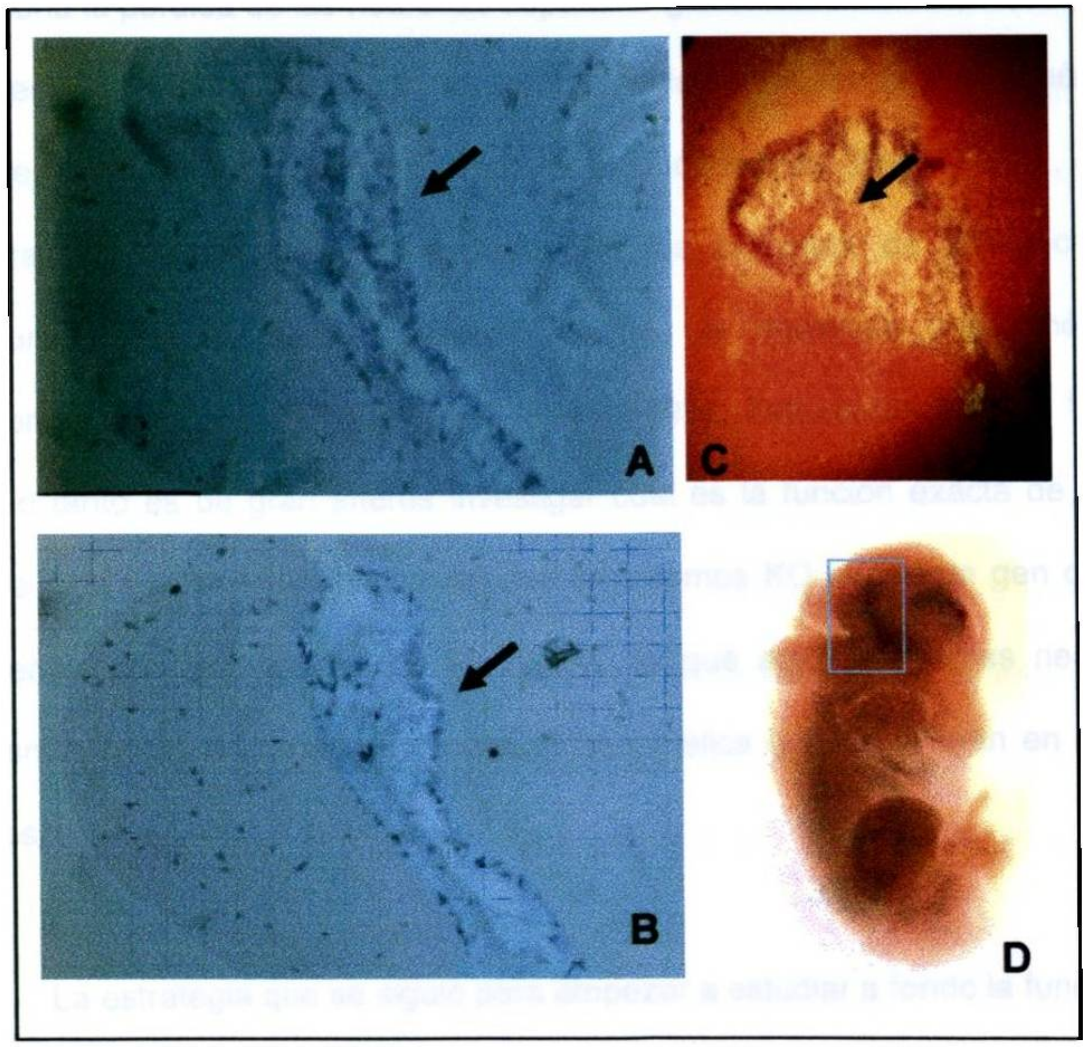

Figura 21. Expresión del gen c33 en el mesénquima de la flexura mesencefálica en embrión de ratón de 12.5 días. Se realizaron cortes sagitales de 20μm de espesor de la región mesencefálica de embriones de 12.5 días de desarrollo. A y B cortes sagitales de embrión de ratón a nivel de la región mesencefálica. 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 Genebank 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 tirosine hidroxylase 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 hedgehod 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 Kroczek 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 homologus 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 Analisis of Differential Gene Expresion. 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. Nurr! 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 in rapidly induced in regenerating liver. J. Biol. Chem. 268:8855-8861. (1993).

25. **Siebert P**. The PCR Thechnique: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 whit 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.**, Zettertrom R., Solomin L., Arvidsson M., Olson L. and Perlmann T. Fate of Mesencephalic AHD2-Expressing Dopamine Progenitor Cells in Nurr1 Mutante mice. Cell. Res. 253:737-746 (1999).

30. **Wilkinson D.G.** In situ Hibridization 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. Nigrostrial innervation in preserved in Nurr1-null mice, although dopaminergic neuron precursors are arrested from terminal differentiation. Mol. Brain Res. 84:67-78. (2000).

32. **Ye W.**, Shimarura 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 dopamina 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).

ADQUISICIÓN TIPO
DONATIVO